

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EXPRESSÃO DE MICRORNAs EM PACIENTES COM ANEMIA  
FALCIFORME, SEU POSSÍVEL PAPEL REGULADOR DAS  
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E POTENCIAIS BIOMARCADORES PARA  
NOVAS TERAPÊUTICAS**

IANAÊ INDIARA WILKE

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM PACIENTES COM ANEMIA  
FALCIFORME, SEU POSSÍVEL PAPEL REGULADOR DAS  
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E POTENCIAIS BIOMARCADORES PARA  
NOVAS TERAPÊUTICAS**

IANAÊ INDIARA WILKE

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre  
2016

*BANCA EXAMINADORA*

Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Prof. Dr. Marino Muxfeldt Bianchin

Profa. Dra. Bruna Amorim

Dra. Fernanda dos Santos Pereira

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos...

... À Dra Lúcia Silla pelo conhecimento e experiência transmitidos, pela orientação, e incentivo em todos os momentos de execução deste trabalho;

... Aos colegas de laboratório Maria Aparecida da Silva, Bruna Zambonato, Annelise Pezzi, Vanessa Valim, Alice Dahmer, Filipe Sehn, Andriele Guterres, Raul Marques Rodrigues, Betina de Souza, Nathan Bugs, Bruna Amorim, pelo companheirismo e apoio;

...À Marina Seibert pelos primeiros passos e orientações em biologia molecular;

...À minha família, Mãe Isabel Wilke, manos Juliano Wilke e Jacson Muzykant e meu amado noivo Maikon Gomes pelo mais importante incentivo e apoio que se pode ter.

## RESUMO

A anemia falciforme (AF) é a doença hereditária monogênica mais prevalente no Brasil, caracterizada pelo alto índice de morbimortalidade. Uma mutação de ponto no gene da globina beta da hemoglobina é a causa da doença. Características genéticas dos indivíduos além da possível heterogeneidade das moléculas associadas à hemólise e vasculopatia são responsáveis por uma variedade de manifestações e complicações clínicas. Os tratamentos disponíveis atualmente consistem no objetivo de amenizar as manifestações clínicas e reduzir o número de crises para uma melhor qualidade de vida destes pacientes. Considerando a importância dos MicroRNAs na regulação da expressão gênica e na fisiopatologia de diversas doenças, este estudo tem por objetivo a elucidação do mecanismo de ação destes potenciais reguladores na fisiopatologia da AF. Caracteriza-se por um estudo prospectivo comparativo, do tipo de pesquisa clínica transversal. Foram incluídos neste estudo 50 indivíduos, dos quais, 25 indivíduos normais sem a patologia, doadores do banco de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), e 25 pacientes homocigóticos SS, em acompanhamento médico no Centro de Referência em Doença Falciforme do HCPA. A obtenção dos dados se deu pela reação da polimerase em cadeia em tempo real, com a seleção de quatro microRNAs candidatos selecionados de acordo com a predição de suas funções alvo já disponíveis na literatura (hsa-mir-15a, hsa-mir-210, hsa-mir-144 e hsa-mir-223). Foram comparadas as diferenças dos perfis de expressão de cada microRNA com a média do grupo controle, além das correlações entre as variáveis hematológicas, bioquímicas e manifestações clínicas, com a finalidade de avaliar a influência entre as variáveis positivamente ou negativamente. Resultados: Três dos quatro microRNAs tiveram seus níveis de expressão estatisticamente significativos em relação ao grupo controle (mir-15a, mir-210 e mir-223). As correlações positivas identificadas foram do microRNA 15a com o microRNA 144, do microRNA 210 com o microRNA 223, além do microRNA 223 com as manifestações de úlceras. As correlações negativas identificadas foram do microRNA 15a em relação às plaquetas e síndrome torácica aguda, e do microRNA 144 em relação aos reticulócitos. Conclusão: Tal conhecimento poderá possibilitar estabelecer novos tratamentos e possíveis abordagens terapêuticas através do controle da expressão de genes específicos e sua interação direta com RNAs alvo.

Palavras chave: Anemia Falciforme, MicroRNAs, terapia, fisiopatologia

## ABSTRACT

Sickle cell anemia (FA) is the most prevalent monogenic hereditary disease in Brazil; it is characterized by variable and sometimes severe symptoms and high morbi-mortality. A point mutation of the beta globin gene is a cause of the disease. Genetic characteristics of individuals and the heterogeneous possibility of molecules associated with hemolysis and vasculopathy are responsible for the variability of clinical manifestations. The available treatments are aimed at mitigating the clinical manifestations and reducing the number of crisis for a better quality of life of these patients. This study aims to elucidate the mechanism of action of regulatory molecules in the pathophysiology of FA. It is characterized by a prospective comparative study, type of cross-sectional clinical research. Fifty individuals, 25 normal subjects, from the blood bank of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and 25 homozygous SS patients, from the Reference Center on Sickle Disease of HCPA. Real-time polymerase chain reaction measuring four microRNAs selected according to the predictions of their target functions in the literature (hsa-mir-15a, hsa-mir-210, Hsa-mir-144 and hsa-mir-223). Differences in the expression profiles of each microRNA with a mean of the control group were compared, as well as the correlations between hematological, biochemical and clinical manifestations, with the purpose of evaluating positive or negative influence between variables. Results: Three of the four microRNAs had their expression levels statistically significant in relation to the control group (mir-15a, mir-210 and mir-223). A positive correlation was identified between microRNA 15a with the microRNA 144, the microRNA 210 with the microRNA 223, and microRNA 223 with positively correlated with leg ulcers. As for negative correlation we identified for microRNA 15a in relation to platelets and acute thoracic syndrome, and for microRNA 144 in relation to reticulocytes. Conclusion: Such knowledge may enable new treatments and possible therapeutic approaches by controlling the expression of specific genes and their direct interaction with target RNAs.

Key Words: Sickle cell anemia, MicroRNAs, current therapies, pathophysiology

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos.....	24
Figura 2: Frequência das manifestações clínicas dos pacientes do estudo.....	49
Figura 3: Valores do conjunto de dados obtidos após a normalização do “Ct” dos microRNAs mir-15a (A), mir-210 (B), mir-144 (C) e mir-223 (D).....	51
Figura 4: Quantificação relativa dos microRNAs hsa-mir-15a (A), hsa-mir210 (B), hsa-mir-144 (C) e hsa-mir-223 (D).....	53
Figura 5: Variáveis hematológicas, bioquímicas, perfil de microRNAs e manifestações clínicas com as correlações estatisticamente significativas.....	56

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Sequência de referência dos quatro microRNAs candidatos selecionados .... 48

Tabela 2: Características laboratoriais dos indivíduos Hb SS avaliados no estudo ..... 48

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

AGO – Argonaute

AF – Anemia Falciforme

Ct – Threshold cycles

DGCR8 - Gene da Síndrome de Di George região crítica 8

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EXP-5 – Exportina 5

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HU – Hidroxiuréia

Hb F – Hemoglobina fetal

MicroRNP - Complexo ribonucleoproteico associado a um RNA não codificante

MiRNAs – MicroRNAs

mRNA – RNA mensageiro

MYB – Membro da família de fatores de transcrição de mieloblastose

NRF2 – Fator nuclear eritróide

PCR – Reação da polymerase em cadeia

RNA – Ácido ribonucleico

TCTH – Transplante de células tronco hematopoéticas

## INDÍCE

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
2.1 ANEMIA FALCIFORME: FISIOPATOLOGIA E ETIOLOGIA .....	12
2.2 EPIDEMIOLOGIA .....	14
2.3 COMPLICAÇÕES.....	15
2.4 TRATAMENTO .....	18
2.5 DIAGNÓSTICO .....	19
2.6 MICRORNAS.....	19
2.7 BIOGÊNESE DOS MICRORNAS .....	20
2.8 VALIDAÇÃO FUNCIONAL DAS INTERAÇÕES DOS MICRORNAS COM RNA-ALVO.....	20
2.9 ASSOCIAÇÃO MICRORNAS E ANEMIA FALCIFORME .....	21
2.10 TERAPIA COM MICRORNAS.....	23
<b>3 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES</b>	<b>23</b>
<b>4 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>24</b>
<b>5 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO .....	25
5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	25
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>26</b>
<b>7 ORIGINAL PAPER .....</b>	<b>33</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>56</b>
<b>9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>57</b>
ANEXO 1 .....	57
ANEXO 2 .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

Hemoglobinopatias são distúrbios hereditários da hemoglobina, causadas por mutações pontuais no gene da globina, que vai resultar na estrutura anormal das cadeias de globina. Com uma herança autossômica recessiva, podem ser classificadas em duas classes: as que possuem variação em sua estrutura e aquelas que são provocadas por um defeito na síntese de globina (WEATHERALL & CLEGG, 2001).

A herança para Hb S pode ocorrer de forma heterozigótica, onde a doença é ocasionada pela herança da HbS em conjunto com outro defeito na hemoglobina, tanto estrutural como de síntese, originando os genótipos Hb SC, Hb SD, Hb SE, S beta talassemia, e S alfa talassemia. Quando a mutação ocorre de forma homozigótica, Hb SS, o genótipo é denominado de Anemia Falciforme (ZAGO & PINTO, 2007).

Uma mutação pontual no sexto códon do gene da globina, com a substituição de um único aminoácido, o ácido glutâmico pela valina, vai acarretar a polimerização da hemoglobina falciforme quando desoxigenada. Esta deformabilidade das células vermelhas do sangue vai levar a episódios de dor, anemia hemolítica, lesões de órgãos e mortalidade precoce (RAMIREZ, MEARS & BANK, 1980).

Apesar de sua herança monogênica, as manifestações clínicas da doença são bastante heterogêneas. A variabilidade da expressão fenotípica, está relacionada com a interação de múltiplos genes, além da mutação principal no gene da globina beta, outros genes polimórficos com potencial epistático vão afetar a densidade das células falciformes, possuindo envolvimento na adesividade celular ao endotélio, angiogênese, na hematopoese, e principalmente na resposta da medula em relação à anemia e até mesmo, na reatividade vascular (BRITTENHAM, SCHECHTER & NOGUCHI, 1985).

Os micrornas como potenciais reguladores de diversos mecanismos moleculares têm sido apontados como potenciais reguladores da expressão gênica, envolvidos no processo de proliferação, desenvolvimento e imunidade celular (BARTEL, 2004).

Dentre os MicroRNAs já identificados nos seres humanos, diversos deles tem sido detectados em linhagens celulares sanguíneas: granulócitos, linfócitos, monócitos, plaquetas, e eritrócitos (MERKEROVA, BELICKOVA & BRUCHOVA, 2008).

Estudos demonstram evidências de um importante papel da função reguladora dos MicroRNAs na hematopoese (MERKEROVA, BELICKOVA & BRUCHOVA, 2008).

Diante deste contexto, explorar a interação direta destes pequenos reguladores com genes alvo poderá possibilitar estabelecer novas abordagens terapêuticas através do controle da expressão de genes específicos.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Anemia Falciforme: Fisiopatologia e Etiologia**

A AF é uma condição patológica hereditária, transmitida por herança recessiva, onde a estrutura anormal de uma hemoglobina (hemoglobina S), provocada por uma mutação na cadeia  $\beta$  da cadeia de hemoglobina, com a substituição do ácido glutâmico pela valina, apresenta um quadro clínico de anemia hemolítica crônica, dor e falência orgânica (RAMIREZ, MEARS & BANK, 1980).

A AF foi a primeira doença monogênica a ser diagnosticada molecularmente, sendo atualmente a hemoglobinopatia hereditária mais comum na população mundial (WILLIAMS & WEATHERALL, 2012).

Importantes descobertas proporcionaram o conhecimento das características patológicas e clínicas da doença. A AF foi descrita pela primeira vez na literatura em 1910, por James Herrick, médico de Chicago, que observou no sangue de um estudante negro, células em forma peculiares, de foice, e sinais clínicos de anemia severa (SAVITT & GOLDBERG, 1989). Em 1949, Pauling e colaboradores conseguiram demonstrar através de anormalidades eletroforéticas, que a drepanocitose é resultado de uma proteína anormal, ocasionada por alteração de uma molécula de hemoglobina (STRASSER, 2002; STEINBERG, 2008). Alguns anos mais tarde, em 1956, Ingram, elucidou a natureza bioquímica do defeito na hemoglobina, identificando e relatando um único ponto de mutação, que altera a sequência de aminoácidos, neste caso do ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia  $\beta$  da hemoglobina (INGRAM, 1956). Desde então, mecanismos de compreensão da fisiopatologia da doença começaram a ser estudados, proporcionando a conclusão de que, a polimerização ocasionada pela desoxigenação da hemoglobina é a principal causa da deformação dos eritrócitos (INGRAM, 1956).

Nos indivíduos heterozigóticos (Hb AS) apenas 40% da hemoglobina consiste nesta mutação, porém o indivíduo homozigoto apresenta de 80 a 95% da hemoglobina anormal, propiciando um mecanismo de afoçamento dos eritrócitos e suas consequências na anemia falciforme (POWARS, CHAN & SCHROEDER, 1990).

A polimerização da hemoglobina provoca o afoçamento da Hb S, através da desoxigenação do tetrâmero, que vai propiciar a ligação das cadeias  $\beta 1$  e  $\beta 2$  da hemoglobina, através de uma força de atração entre as moléculas de hemoglobina, levando uma distorção na morfologia dos eritrócitos e influenciando na sua solubilidade. Devido a este afoçamento, à distorção na morfologia e a influência na solubilidade dos eritrócitos, as hemácias não conseguem fluir normalmente através de pequenas artérias e veias. Acabam agrupando-se, e impedindo uma distribuição adequada do oxigênio para todo o sistema, provocando dor intensa, dano tecidual, oclusão vascular e anemia hemolítica crônica (BRITTENHAM, SCHECHTER & NOGUCHI, 1985).

A taxa de polimerização é proporcional à concentração de Hb S e à presença da hemoglobina fetal no eritrócito. Assim, existem variações nestas concentrações, que estão diretamente relacionados ao risco de afoçamento dos eritrócitos e consequentemente com a gravidade da doença (BRITTENHAM, SCHECHTER & NOGUCHI, 1985).

Por possuir fenótipos heterogêneos, a AF leva a uma clínica bastante complexa, devido a variáveis na composição genética juntamente com variáveis ambientais. Apesar da herança monogênica, a fisiopatologia da doença ainda não tem seu mecanismo bem identificado. Estudos apontam que a variabilidade da expressão fenotípica está relacionada com a interação de múltiplos genes, além do gene da globina beta, que é a mutação principal, outros genes polimórficos com potencial epistático, que não são idênticos em todos indivíduos, vão causar inibição, afetando a densidade das células falciformes, possuindo envolvimento na adesividade celular ao endotélio, angiogênese, na hematopoese, e principalmente na resposta da medula em relação a anemia, e até mesmo na reatividade vascular (BRITTENHAM, SCHECHTER & NOGUCHI, 1985).

As manifestações clínicas da anemia falciforme estão diretamente relacionadas com as alterações fisiopatológicas a nível molecular e celular, de tecidos e órgãos. (ZAGO & PINTO, 2007).

Alterações a nível molecular e celular são dependentes de fenômenos como a mutação da hemoglobina, polimerização da hemoglobina desoxigenada, falcização e alterações na membrana. A taxa de extensão e formação da hemoglobina anormal é dependente da concentração intracelular de hemoglobina, presença ou ausência da hemoglobina fetal e o grau de desoxigenação da célula. Múltiplas alterações na célula vão resultar nestes polímeros de HB S. As contribuições mais importantes para este fenômeno são o aumento cálcio intracelular e de membrana, perda de íons, especialmente o potássio, desidratação celular pela perda de água, e conseqüentemente o aumento da densidade destes eritrócitos, oxidação da hemoglobina, desnaturação da hemoglobina, anormalidades das proteínas de membrana e por fim o aumento da adesão ao endotélio mediada por moléculas plasmáticas tanto da membrana quanto do endotélio. A adesão aumentada entre os eritrócitos, leucócitos, plaquetas e células endoteliais leva à vaso-oclusão, com redução do fluxo sanguíneo, estase venosa e áreas de necrose hipóxica nos diversos órgãos (BUNN, 1997; ZAGO & PINTO, 2007).

O aumento da adesividade intercelular leva a um processo inflamatório crônico que é decorrente da produção de mediadores inflamatórios e exposição de fatores teciduais que vão ativar a cascata de coagulação, concomitantemente com a hemólise das hemácias que liberarão fatores que vão ocasionar vaso-constricção (BUNN, 1997; ZAGO & PINTO, 2007)

O quadro de anemia tem como principal fator a menor sobrevivência dos eritrócitos. Além da hemólise, são diversos fatores que podem contribuir para este quadro, como a deficiência nutricional, em especial carência de folato, insuficiência renal, crises aplásticas, dentre outras (BUNN, 1997).

## **2.2 Epidemiologia**

A AF é a hemoglobinopatia mais frequente no mundo, com distribuição extremamente heterogênea entre os diversos países (NAGEL RL, 2001).

Existem fortes evidências de que a frequência da anemia falciforme está correlacionada com a exposição de populações à malária, um dos principais fatores responsáveis pela frequência das hemoglobinopatias hereditárias em muitos países tropicais e subtropicais (RICHER & CHUDLEY, 2005).

O gene da AF é amplamente encontrado em toda África, Oriente Médio e algumas partes do continente Indiano (WILLIAMS & WEATHERALL, 2012). Entretanto, também ocorre com alta frequência em regiões tropicais que ao longo dos anos tenha recebido muitas migrações populacionais, acarretando em uma transição epidemiológica (WILLIAMS & WEATHERALL, 2012).

Estimativas sugerem que atualmente haja cerca de 270 milhões de portadores de hemoglobinopatias no mundo, e que entre 300 a 400 mil crianças nasçam com uma desordem na hemoglobina a cada ano (WILLIAMS & WEATHERALL, 2012).

No Brasil, a AF distribui-se heterogeneamente, sendo mais frequente onde a quantidade de antepassados negros é maior. Estima-se que cerca de 30 a 40 mil indivíduos sejam portadores da AF, com cerca de 700 a 1000 novos casos por ano (Ministério da Saúde., 2009; Lyra *et al.*, 2005), que acaba se tornando um grave problema de saúde pública no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

### **2.3 Complicações**

A AF é caracterizada pelo início das manifestações clínicas a partir de 4 a 6 meses de idade. São inúmeras complicações que podem afetar órgãos e sistemas, levando a uma alta morbidade e redução da expectativa de vida (WEATHERALL & PROVAN, 2000).

A rigidez dos glóbulos vermelhos em forma de foice leva a uma sobrevida diminuída destes eritrócitos a alterações imunológicas, particularmente inflamatórias, e vasculares. O quadro dos portadores de AF inclui manifestações de anemia hemolítica crônica, episódios de dactilite em mãos e pés, dores abdominais, dores orleoarticulares, infecções, comprometimento crônico de diversos órgãos e sistemas, como sequestro esplênico, síndromes torácica aguda, doença pulmonar crônica, doença biliar, sequestro hepático, doença cardiovascular, renal e do sistema nervoso central, além de doenças

oculares, úlceras de perna, deficiência no crescimento e desenvolvimento, e priapismo (SIDDIQUI & AHMED, 2003; BUCHANAN *et al.*, 2004; GURKAN *et al.*, 2005; RAMAN *et al.*, 2006; STEINBERG, 2008).

As principais manifestações clínicas em indivíduos portadores de AF se diferem de acordo com fatores ambientais, genéticos, tratamentos disponibilizados, variando em diferentes graus de gravidade:

- Anemia: caracterizada por cronicidade correspondendo a uma anemia normocítica/normocrômica, com níveis de hemoglobina que variam de 6,0 a 10 g/dl (CRISTINA, & PINTO, 2007);
- Crises dolorosas: resultado da obstrução da microcirculação causada pelo afoiçamento das hemácias, atingindo frequentemente ossos e articulações, de início agudo que pode durar até 5 dias (ZAGO & PINTO, 2007).
- Úlceras: habitualmente de membros inferiores, é uma complicação cutânea crônica frequente que ocorre devido às vasos oclusões, hipóxia e hemólise, com elevada taxa de recorrência (SERJEANT *et al.*, 2005).
- Síndrome torácica aguda: classificada como a segunda causa mais comum de hospitalização dentre as manifestações clínicas e causa comum de morte em portadores de anemia falciforme, caracterizada por infiltrado pulmonar, febre, tosse, dores e relacionada a infecções (JOHNSON, 2005).
- Priapismo: consiste na ereção peniana prolongada e dolorosa que pode ocorrer em episódios mais curtos ou duradouros, ocasionada pelo aprisionamento das hemácias no corpo cavernoso (FIGUEIREDO, 2007).
- Acidente vascular cerebral: uma das complicações mais graves relacionada a falcização com o estreitamento subsequente das artérias ou aneurismas arteriais e presença de neovascularização cerebral (BRUNETTA *et al.*, 2010).
- Infecções: portadores de anemia falciforme tem um risco aumentado de infecções principalmente no trato respiratório e septicemia devido a alterações na imunidade celular (BRUNETTA *et al.*, 2010).

A modulação do quadro clínico da anemia falciforme é definido por diversos fatores. Além da variação da HbF, o tipo de haplótipo e polimorfismos em diversos genes estão relacionados as formas e gravidade nas manifestações clínicas (STEINBERG & ADEWOYE, 2006).

Haplótipos na anemia falciforme são definidos como sítios polimórficos do DNA que estão ligados ao complexo da beta globina. Cinco diferentes haplótipos têm sido relatados na AF recebendo definição de acordo com sua origem: República Centro-Africana, Senegal, Camarões, Benin, Arábia Saudita e Índia. Diferenças na expressividade e na evolução clínica da doença têm caracterizado estes sítios polimórficos como fatores importantes na compreensão da heterogeneidade clínica da doença (GALIZA & PITOMBEIRA, 2003).

Novos estudos com informações sobre os efeitos da hemólise sobre a biologia do óxido nítrico (ON) com posterior correlação dos genótipos dos indivíduos portadores da doença, ressaltam novos conceitos na compreensão da fisiopatologia desta doença. O óxido nítrico é um vasodilatador que regula a homeostase vascular, sua desregulação e alterações na sua disponibilidade podem influenciar diretamente na gravidade das manifestações clínicas (KATOA; GLADWINA; STEINBERGB, 2007).

Quando comparada com a vaso-oclusão, a hemólise tem sido considerada de baixa relevância para a severidade das manifestações clínicas na anemia falciforme. Entretanto, estudos tem reforçado sua importância na bioatividade desta patologia. Achados sugerem que polimorfismos no gene eNOS (óxido nítrico-sintase endotelial) podem atuar como modificadores genéticos da hemólise com predição de aumento na suscetibilidade a complicações relacionadas a mesma (KATOA; GLADWINA; STEINBERGB, 2007).

Diante deste contexto, a diminuição da hemólise restaura a disponibilidade de ON reduzindo a incidência e gravidade dos sub-fenótipos hemolíticos da AF. Dentre as manifestações clínicas que supõem-se estarem ligadas ao subfenótipo da hemólise encontra-se o priapismo, úlceras de perna, hipertensão pulmonar, e o acidente vascular cerebral. Já nas complicações vaso-oclusivas viscosas, a hemólise parece desempenhar

um papel menor como nos episódios agudos de dor, osteonecrose e a síndrome torácica aguda (KATOA; GLADWINA; STEINBERGB, 2007).

## 2.4 Tratamento

O transplante de Células Tronco Hematopoéticas (TCTH) parece ser uma alternativa curativa para crianças e adultos portadores de AF, no entanto, menos de 20% dos indivíduos tem doadores HLA idênticos na família (ALIYU, TUMBLIN & KATO, 2006). Ainda não há um tratamento clínico específico para AF. Os tratamentos existentes atualmente consistem em amenizar as manifestações clínicas e reduzir o número de crises para uma melhor qualidade de vida destes pacientes. Neste contexto, o mesmo se baseia em medidas gerais e preventivas. Podem-se citar as terapias profiláticas, que englobam três medidas: administração de Folato, na qual atua de maneira interdependente com a vitamina B12 para formação de novos eritrócitos, profilaxia com penicilina e imunização contra a infecção pneumocócica, uma vez que estes pacientes são suscetíveis a infecções (ALIYU, TUMBLIN & KATO, 2006).

A terapia transfusional é alternativa no manejo de complicações agudas e crônicas (REES, WILLIAMS & GLADWIN, 2010). O objetivo é promover a diminuição aguda da fração de glóbulos vermelhos em foice, e um aumento das hemácias normais no volume total do sangue, levando a uma diminuição na produção da hemoglobina anormal, suprimindo a síntese e aumentando, portanto, a capacidade de transporte de oxigênio, além de evitar complicações clínicas oriundas da falcização do eritrócito (ECKMAN, 2001; JUNQUEIRA, HAMERSCHLAK & ROSENBLIT, 2009).

Como já ressaltado, o transplante de medula óssea é o único tratamento que proporciona uma possibilidade de supressão do mecanismo de falcização e suas consequências clínicas. No entanto, riscos oriundos do procedimento e benefícios devem ser analisados, além de sua limitação pela disponibilidade de doadores compatíveis e complicações (WALTERS, 2004; GAZIEV & LUCARELLI, 2005).

Diversos estudos têm demonstrado a eficácia do tratamento com uma substância antineoplásica que atua de maneira específica no ciclo celular, interferindo na síntese de DNA (RODGERS *et al.*, 1993; CHARACHE *et al.*, 1995; SUMOZA *et al.*, 2002). A Hidroxiuréia é a terapia medicamentosa mais bem sucedida e melhor tolerada sem

maiores complicações (SUMOZA *et al.*, 2002). Este quimioterápico aumenta a produção de hemoglobina fetal, inibindo a polimerização da Hb S, e consequentemente levando a uma melhora das manifestações vaso-oclusivas e hemólise (RODGERS *et al.*, 1993). Porém, a mesma é capaz de reduzir apenas 44% a taxa de algumas manifestações clínicas como crises dolorosas, e necessidade de transfusões (CHARACHE *et al.*, 1995).

## 2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da AF pode ser estabelecido por diversos métodos capazes de detectar quantidades significativas de Hb S e a sua associação com outras frações de hemoglobinas. Dentre elas, podem-se citar técnicas eletroforéticas, cromatográficas e análise de DNA. (RYAN *et al.*, 2010).

## 2.6 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA de fita simples, não codificantes de proteínas, de 18 a 25 nucleotídeos, apontados como potenciais reguladores da expressão gênica, envolvidos entre outros no processo de proliferação, desenvolvimento e imunidade celular (BARTEL, 2004).

A regulação da expressão gênica mediada por estes pequenos RNAs foi evidenciada pela primeira vez em um nematódeo, *Caenorhabditis elegans* (FIRE *et al.*, 1998). Atualmente, de acordo com banco de dados miRBase, através de estudos de sequenciamento, 24521 microRNAs já foram identificados, no qual 1872 humanos, e seus possíveis genes alvos, através de sistemas de predição computacionais que estimam que um único MicroRNA seja capaz de regular centenas de genes alvos (MIRANDA *et al.*, 2006).

Os microRNAs regulam a tradução de genes diretamente envolvidos na proliferação, diferenciação e apoptose celular, bem como na regulação da expressão de proteínas em nível de tradução. Estudos têm evidenciado quantidades significantes em líquidos corporais, como urina, plasma, sangue, saliva e até mesmo sêmen, onde o extravasamento destes pequenos reguladores está sendo utilizado como biomarcadores de diversas patologias (ZUBAKOV *et al.*, 2010; TURCHINOVICH *et al.*, 2011).

## 2.7 Biogênese dos MicroRNAs

A biogênese dos miRNAs envolve três processos: Inicia com a transcrição de miRNAs primários (primiRNAs) dos genes dos mRNAs, os miRNAs precursores que são parcialmente processados em pré-miRNAs nos núcleos e por fim, os miRNAs maduros são gerados no citoplasma (LEE *et al.*, 2003).

O início da biogênese ocorre no núcleo, onde o primiRNA é processado para pré-miRNA por uma enzima chamada RNase III (drosha), que requer um cofator, a proteína DGCR8 (DiGeorgeSyndromeCriticalRegion gene 8). Esta proteína formará um complexo conhecido como “*complexo microprocessador*” que vai reconhecer e clivar o primiRNA originando uma molécula com uma estrutura de “hairpin”, uma estrutura em que ocorre o emparelhamento de pares de bases intramoleculares. Após o processamento nuclear cada pré-miRNA é exportado para o citoplasma pela exportina-5 (EXP-5), onde vai ser convertido em miRNA maduro e funcional pela Dicer nuclear. Após a clivagem pela Dicer, uma molécula da dupla fita de RNA associa-se à proteína Argonauta para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), enquanto a outra parte vai ser degradada (LEE *et al.*, 2002).

## 2.8 Validação funcional das interações dos microRNAs com RNA-alvo

A associação dos microRNAs com o potencial RNA-alvo, pode ser identificada através de métodos químicos ou genéticos e pela bioinformática. Os métodos que medem essa interação se baseiam na medida do grau de tradução (aumentada ou diminuída) do RNA na presença de um microRNA específico. O mecanismo se baseia no reconhecimento de sequências alvo, e no emparelhamento direto de bases em um complexo com RNA mensageiro, que vai mediar a regulação tanto de superexpressão quanto de supressão, em condições específicas (VASUDEVAN, 2012).

A análise de microRNAs e seus alvos candidatos através da bioinformática têm como princípio algoritmos computacionais com parâmetros distintos, como a análise de sequências de mRNA, que preveem através de bancos de dados com informações já conhecidas, a probabilidade de um determinado microRNA se ligar a um determinado RNA alvo. Dentre estes programas pode-se citar Targetscan, Miranda, miRBaseTargets, Pictar e PITA (WANG *et al.*, 2010). Outro método plausível é através da genética, onde

os efeitos causados sobre uma determinada célula são decorrentes de vários genes envolvidos em uma certa via. Com base nestes efeitos, a triagem de microRNAs pode fornecer a relação de prováveis alvos para estes pequenos RNAs (MAVRAKIS & WENDEL, 2010). Por fim, as análises bioquímicas, através da interação de proteínas AGO (Argonaute) e microRNP (complexo ribonucleoproteico associado a um RNA não codificante), vão influenciar no mecanismo bioquímico e posteriormente na função celular, proporcionando então o reconhecimento de possíveis genes alvo (VASUDEVAN, S. 2012).

Diante de tantos métodos, estudos sugerem um conjunto de diretrizes que devem ser seguidas para validar a regulação de um determinado mRNA alvo por um determinado microRNA. Iniciando pela análise dos perfis de expressão em determinada doença, e posteriormente por sistemas de predição de bioinformática. Para uma maior seleção sugere-se ainda análise *in silico* dos possíveis selecionados, uma vez que muitos alvos de miRNA previstos por sistemas computacionais falham nos testes de validação *in vivo*. Após, a interação alvo miRNA/mRNA deve ser verificada, no qual o gene alvo e miRNA previsto também devem ser co-expressos, obtendo um efeito previsível sobre a expressão da proteína alvo. Assim, a expressão mediada pela regulação de um determinado microRNA a um gene alvo deve corresponder a alterações nas funções biológicas (KUHN, et al, 2009).

## **2.9 Associação MicroRNAs e Anemia Falciforme**

Dentre os MicroRNAs já identificados nos seres humanos, diversos deles tem sido detectados em linhagens celulares sanguíneas: granulócitos, linfócitos, monócitos, plaquetas, e eritrócitos (MERKEROVA, BELICKOVA & BRUCHOVA, 2008).

Estudos atuais demonstram evidências de um importante papel da função reguladora dos MicroRNAs na hematopoese. Análises da expressão de microRNAs durante a diferenciação eritróide, indicam que os mesmos podem possuir importante papel regulador durante os estágios iniciais da eritropoiese, na maturação e diferenciação terminal destas células, além de ainda persistir em eritrócitos maduros após o termino da diferenciação celular (CHEN *et al.*, 2008).

A expressão de microRNAs em eritrócitos normais e os que possuem homozigose para Hb S são extremamente variáveis, indicando que tal expressão pode desempenhar um papel efetivo na diferenciação terminal dos mesmos, caracterizando alterações fenotípicas dos eritrócitos durante adaptações fisiológicas e patológicas (CHEN *et al.*, 2008).

Na diferenciação megacariótica com a repressão ou supressão dos mesmos, dependendo da patologia, sugere-se que o controle regulatório da expressão gênica de plaquetas humanas seja feito por microRNAs (GARZON *et al.*, 2006; LANDRY *et al.*, 2009). A análise de expressão de microRNAs isolados a partir de plaquetas de pacientes com a AF, fornece dados extremamente importantes de um conjunto de transcritos diferencialmente expressos. Assim, a identificação de diferenças significativas na expressão destes microRNAs em plaquetas de pacientes com AF em comparação aos controles, direciona novos estudos para o papel dos mesmos na regulação de um estado hipercoagulável ou de hiper-adesividade provocado pela ativação excessiva das plaquetas, que é característica da doença em questão com as crises vaso-oclusivas (WUN *et al.*, 1998).

Khalyfa *et al* (2016), salientou que as potenciais diferenças de microRNAs nas microvesículas extracelulares derivadas de plasma poderiam estar ligadas a trajetórias clínicas divergentes destes pacientes. Visto que a comunicação celular é um fator vital para regulação e coordenação de vários processos, evidências destacam o papel e o conteúdo destas vesículas extracelulares. O conteúdo molecular destas, inclui os microRNAs com uma influência importante sobre as funções biológicas. Assim, a análise deste conteúdo intracelular das vesículas extracelulares poderia fornecer uma oportunidade de identificação de biomarcadores específicos de gravidade da doença, diagnóstico precoce, trajetória da doença e possibilidade de avaliação terapêutica.

Saki *et al* (2016), por sua vez, mostrou a ligação direta que os microRNAs têm em relação ao transcrito da globina e seu papel na indução da hemoglobina fetal. Relatando não apenas o efeito direto destes pequenos reguladores sobre os genes alvo, mas também a importância que eles podem representar da inibição dos mesmos na indução da HbF. Estudos clínicos e observacionais sugerem que a possibilidade da regulação ou aumento da HbF em pacientes com AF possibilitará a redução da gravidade desta doença, além de abordagens através de microRNAs tenderem a ser promissoras no aumento da expressão e produção da HbF.

Por fim, uma análise do transcriptoma dos eritrócitos, efetuada por Doss *et al* (2015), mostrou a persistência dos microRNAs nos eritrócitos, identificando vários loci com co-expressão e permitindo a caracterização e quantificação dos mesmos. Apresentando um perfil extenso para futuros estudos com doenças que envolvem células eritróides.

## **2.10 Terapia com MicroRNAs**

A expressão anormal de MicroRNAs parece caracterizar muitas doenças. Os perfis de expressão de miRNAs tendem a se tornar ferramentas de diagnóstico e prognóstico promissoras, bem como a sua modulação em potencial fator para novas terapias gênicas (CALIN & CROCE, 2006).

A partir da descoberta destes pequenos RNAs como reguladores dos mecanismos moleculares das doenças humanas, diversos estudos apontam diferenças de níveis de expressão do estado patológico em comparação a indivíduos normais. Ainda não se sabe se esta expressão diferenciada ocorre como consequência deste estado patológico, ou se a doença é o resultado direto desta diferença de expressão. Porém, acredita-se que a normalização destes níveis possa levar a elucidação dos mecanismos e ser uma promessa de um nova classe de terapias (BUDHU, JI & WANG, 2010).

O objetivo dos estudos voltados para terapia com MicroRNAs se baseia na identificação e validação dos MicroRNAs e a correlação dos níveis de expressão com o envolvimento na fisiopatologia da doença (BADER *et al.*, 2011).

A terapêutica com MicroRNAs se baseia em dois métodos: MicroRNAs antagonistas e MicroRNAs idênticos artificiais. Os antagonistas possuem a função de inibir os MicroRNAs endógenos que estejam provocando um ganho de função em células ou tecidos. Já os MicroRNAs artificiais tem a finalidade de suprir uma perda de função de determinado gene (SOIFER, ROSSI & SAETROM, 2007).

## **3 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES**

Esta revisão da literatura foi focada nos aspectos relacionados aos principais fatores da fisiologia da anemia falciforme – conceituação, fisiopatologia e etiologia,

epidemiologia, complicações, tratamento, e diagnóstico – e sua correlação com microRNAs, sua biogênese e validação funcional, além de sua associação na anemia falciforme e uso terapêutico. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PUBMED, SCIELO, no período de 1910 a 2016. Foram realizadas buscas através dos termos “*sickle cell*”, “*microRNAs*”, “*therapy*”, “*pathophysiology*” e suas combinações apresentadas na Figura 1.

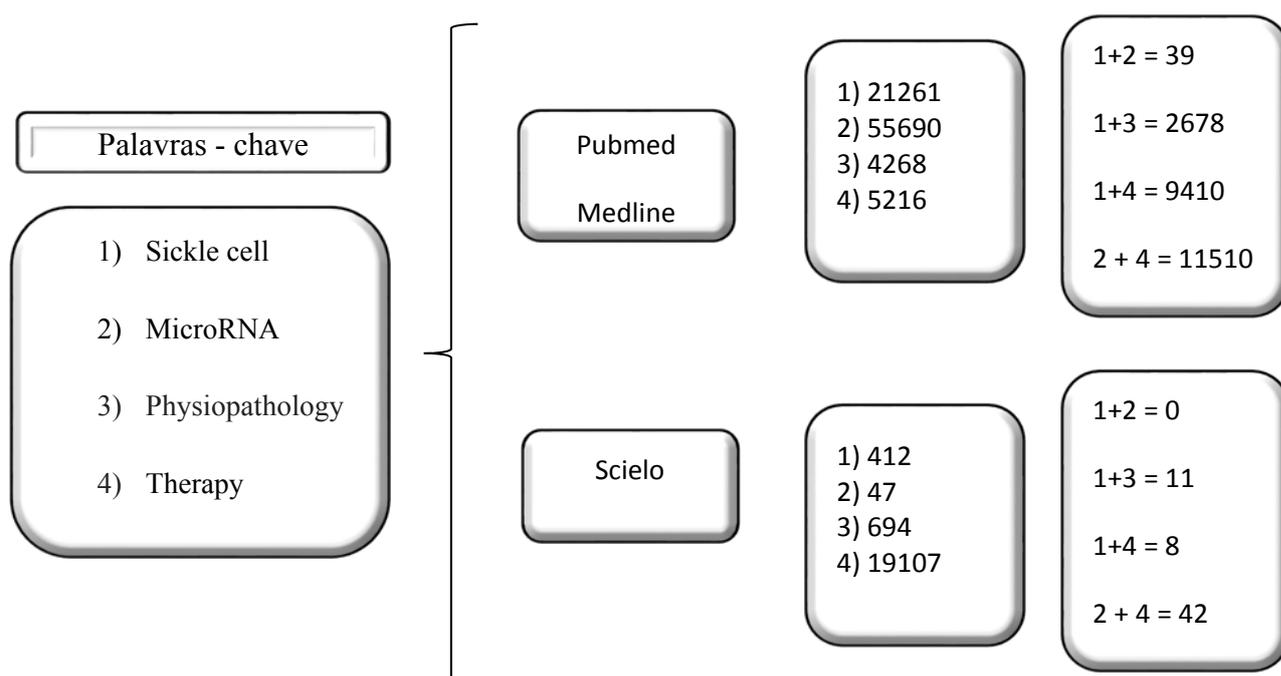


Figura 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentaram os objetivos

#### 4 JUSTIFICATIVA

Considerando a importância dos microRNAs como reguladores críticos na modulação de diversas patologias, este estudo tem por objetivo a elucidação da influência deste potencial regulador nos mecanismos fisiopatológicos da Anemia Falciforme. O padrão de expressão distinto oferece oportunidades para o estudo da regulação de seus alvos e a compreensão do mecanismo destes pequenos reguladores nos processos celulares, além da avaliação de seu impacto e significado biológico,

possibilitando a descoberta de terapias contra alvos fisiopatológicos específicos e uma maior elucidação dos aspectos clínicos envolvidos na evolução da doença.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO**

Analisar os perfis de expressão de microRNAs no sangue periférico de pacientes portadores e não portadores de Anemia Falciforme através da reação da polimerase em cadeia, em uma população de indivíduos do Hospital de Clínicas da região metropolitana de Porto Alegre.

### **5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- Analisar por PCR quantitativo os níveis de expressão de microRNAs em amostras de pacientes com Anemia Falciforme;
- Identificar microRNAs diferencialmente expressos no sangue periférico de pacientes com Anemia Falciforme em relação a indivíduos sem a doença;
- Comparar os níveis de expressão com o grupo controle;
- Correlacionar os níveis de expressão com genes candidatos alvos e dados clínicos da doença;
- Identificar processos biológicos relevantes para a patogênese de acordo com a finalidade do gene alvo;
- Correlacionar os resultados com potenciais novas terapêuticas para a doença.

## 6 REFERÊNCIAS

1. ALIYU, Z. Y.; TUMBLIN, A. R.; KATO, G. J. Current therapy of sickle cell disease. *Haematologica*, v. 91, n. 1, p. 7-10, Jan 2006. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16434364> >.
2. ALAVI, A.; KIRSNER, R. S. Hemoglobinopathies and Leg Ulcers. p. 10–13, 2016.
3. ARNOLD, S. D. et al. Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease – current practice and new approaches. n. June, p. 515–525, 2016.
4. BADER, A. G. et al. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther*, v. 18, n. 12, p. 1121-6, Dec 2011. ISSN 1476-5462. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633392> >.
5. BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438> >.
6. BRITTENHAM, G. M.; SCHECHTER, A. N.; NOGUCHI, C. T. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood*, v. 65, n. 1, p. 183-9, Jan 1985. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3965046> >.
7. BRUNETTA, D. M. et al. Manejo das complicações agudas da doença falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 43, n. 3, p. 231–237, 2010.
8. BUCHANAN, G. R. et al. Sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, p. 35-47, 2004. ISSN 1520-4391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561675> >.
9. BUDHU, A.; JI, J.; WANG, X. W. The clinical potential of microRNAs. *J Hematol Oncol*, v. 3, p. 37, 2010. ISSN 1756-8722. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20925959> >.
10. BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med*, v. 337, n. 11, p. 762-9, Sep 1997. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9287233> >.
11. CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, v. 6, n. 11, p. 857-66, Nov 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060945> >.
12. CHARACHE, S. et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med*, v. 332, n. 20, p. 1317-22, May 1995. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7715639> >.

13. CHEN, C. et al. Lineage Differentiation. v. 189, 1983.
14. CHEN, S. Y. et al. The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. PLoS One, v. 3, n. 6, p. e2360, 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18523662> >.
15. CHOU, S. T. Transfusion therapy for sickle cell disease : a balancing act. p. 439–446, 2013.
16. CRISTINA, A.; PINTO, S. Fisiopatologia das doenças falciformes : da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. v. 29, n. 3, p. 207–214, 2007.
17. DAVIS, B. A. et al. Guidelines on red cell transfusion in sickle cell disease Part II : indications for transfusion. 2016.
18. DOSS, J. F. et al. A comprehensive joint analysis of the long and short RNA transcriptomes of human erythrocytes. BMC Genomics, p. 1–16, 2015.
19. ECKMAN, J. R. Techniques for blood administration in sickle cell patients. Semin Hematol, v. 38, n. 1 Suppl 1, p. 23-9, Jan 2001. ISSN 0037-1963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11206958> >.
20. FERRAZ, M. H. C. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida Laboratorial diagnosis of sickle cell disease in the neonate and after the sixth month of life. v. 29, n. 3, p. 218–222, 2007.
21. FIGUEIREDO, M. S. Priapismo na doença falciforme. v. 29, n. 3, p. 275–278, 2007.
22. FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, v. 391, n. 6669, p. 806-11, Feb 1998. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486653> >.
23. FRANCISCO S. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. York N, Hospital M. 2000;1855–65.
24. GALIZA NETO, G; PITOMBEIRA, M. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro , v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442003000100011&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442003000100011&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 1 novembro. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442003000100011>.
25. GARZON, R. et al. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 103, n. 13, p. 5078-83, Mar 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16549775> >.

26. GAZIEV, J.; LUCARELLI, G. Stem cell transplantation and gene therapy for hemoglobinopathies. *Curr Hematol Rep*, v. 4, n. 2, p. 126-31, Mar 2005. ISSN 1541-0714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15720961> >.
27. GÜRKAN, E. et al. Liver involvement in sickle cell disease. *Turk J Gastroenterol*, v. 16, n. 4, p. 194-8, Dec 2005. ISSN 1300-4948. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16547846> >.
28. HANEKLAUS, M. et al. miR-223 : infection , inflammation and cancer. p. 215–226, 2013.
29. HOSSEINI, P. et al. Cellular normoxic biophysical markers of hydroxyurea treatment in sickle cell disease. v. 113, n. 34, p. 9527–9532, 2016.
30. INGRAM, V. M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature*, v. 178, n. 4537, p. 792-4, Oct 1956. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13369537> >.
31. JUNQUEIRA, P. C.; HAMERSCHLAK, N.; ROSENBLIT, J. *Hemoterapia Clínica*. 2009.
32. KATOA, G. J.; GLADWINA, M. T.; STEINBERGB, M. H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. v. 21, n. 1, p. 37–47, 2007.
33. KHALYFA, A. et al. Extracellular microvesicle microRNAs in children with sickle cell anaemia with divergent clinical phenotypes. n. May, p. 786–798, 2016.
34. KAMATH, A. F. et al. Surgical management of osteonecrosis of the femoral head in patients with sickle cell disease. v. 6, n. 10, p. 776–782, 2015.
35. LANDRY, P. et al. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol*, v. 16, n. 9, p. 961-6, Sep 2009. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668211> >.
36. LEE, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, v. 425, n. 6956, p. 415-9, Sep 2003. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508493> >.
37. LEE, Y. et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, v. 21, n. 17, p. 4663-70, Sep 2002. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12198168> >.
38. LI, X. et al. Biomechanics and biorheology of red blood cells in sickle cell anemia. 2016.

39. LIM, L. P. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, v. 433, n. 7027, p. 769-73, Feb 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15685193> >.
40. LINDSAY, M. A. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol*, v. 29, n. 7, p. 343-51, Jul 2008. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18515182> >.
41. LYRA, I. M. et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cad Saude Publica*, v. 21, n. 4, p. 1287-90, 2005 Jul-Aug 2005. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16021267> >.
42. MARRA, V. N.; SILVA, R. M. G. Crises dolorosas na doença falciforme. v. 29, n. 3, p. 247–258, 2007.
43. MARTÍ-CARVAJAL, A.J; SOLÀ, I.; AGREDA, LH. Treatment for avascular necrosis of bone in people with sickle cell disease ( Review ). n. 8, 2016.
44. MAVRAKIS, K. J.; WENDEL, H. G. TargetScreen: an unbiased approach to identify functionally important microRNA targets. *Cell Cycle*, v. 9, n. 11, p. 2080-4, Jun 2010. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20505335> >.
45. MERKEROVA, M.; BELICKOVA, M.; BRUCHOVA, H. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol*, v. 81, n. 4, p. 304-10, Oct 2008. ISSN 1600-0609. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573170> >.
46. MIRANDA, K. C. et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*, v. 126, n. 6, p. 1203-17, Sep 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990141> >.
47. PLATT, O. S. et al. Pain in Sickle Cell Disease — Rates and Risk Factors. *N Engl J Med*, n. 325, p. 11–26, 1991.
48. POWARS, D.; CHAN, L. S.; SCHROEDER, W. A. The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. *Semin Hematol*, v. 27, n. 4, p. 360-76, Oct 1990. ISSN 0037-1963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2255920> >.
49. RAMAN, S. V. et al. Myocardial ischemia and right ventricular dysfunction in adult patients with sickle cell disease. *Haematologica*, v. 91, n. 10, p. 1329-35, Oct 2006. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17018381> >.
50. RAMIREZ, F.; MEARS, J. G.; BANK, A. The molecular basis of disorders of human hemoglobin synthesis. *Mol Cell Biochem*, v. 31, n. 3, p. 133-45, Aug

1980. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6255309> >.
51. REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. *Lancet*, v. 376, n. 9757, p. 2018-31, Dec 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131035> >.
  52. RICHER, J.; CHUDLEY, A. E. The hemoglobinopathies and malaria. *Clin Genet*, v. 68, n. 4, p. 332-6, Oct 2005. ISSN 0009-9163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16143020> >.
  53. RODGERS, G. P. et al. Augmentation by erythropoietin of the fetal-hemoglobin response to hydroxyurea in sickle cell disease. *N Engl J Med*, v. 328, n. 2, p. 73-80, Jan 1993. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7677965> >.
  54. RYAN, K. et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol*, v. 149, n. 1, p. 35-49, Apr 2010. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20067565> >.
  55. SAKI, N. et al. MicroRNA Expression in  $\beta$  -Thalassemia and Sickle Cell Disease : A Role in The Induction of Fetal Hemoglobin. v. 17, n. 4, p. 583–592, 2016.
  56. SANGOKOYA, C.; TELEN, M. J.; CHI, J. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. v. 116, n. 20, p. 1–3, 2016.
  57. SANKARAN, V. G. et al. MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. v. 108, n. 4, p. 1519–1524, 2011.
  58. SAVITT, T. L.; GOLDBERG, M. F. Herrick's 1910 case report of sickle cell anemia. The rest of the story. *JAMA*, v. 261, n. 2, p. 266-71, Jan 1989. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2642320> >.
  59. SAÚDE, M. D. Manual de Condutas básicas na Doença Falciforme. SAÚDE, S. D. A. À. Brasília 2006.
  60. SERJEANT GR , SERJEANT BE , MOHAN JS , CLARE A . Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. /*Oncology Clinics of North America*. 2005.19: 943-956.
  61. SIDDIQUI, A. K.; AHMED, S. Pulmonary manifestations of sickle cell disease. *Postgrad Med J*, v. 79, n. 933, p. 384-90, Jul 2003. ISSN 0032-5473. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897216> >.

62. SINGH, A.; XU, Y. The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. 2016.
63. SIWAPONANAN, P.; FUCHAROEN, S.; SIRANKAPRACHA, P. Elevated levels of miR - 210 correlate with anemia in  $\beta$  - thalassemia / HbE patients. *International Journal of Hematology*, v. 104, n. 3, p. 338–343, 2016.
64. SOIFER, H. S.; ROSSI, J. J.; SAETROM, P. MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther*, v. 15, n. 12, p. 2070-9, Dec 2007. ISSN 1525-0016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878899> >.
65. SONKOLY, E.; STÄHLE, M.; PIVARCSI, A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol*, v. 18, n. 2, p. 131-40, Apr 2008. ISSN 1096-3650. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18291670> >.
66. STEINBERG; ADEWOYE . Modifier genes and sickle cell anemia. *Curr opin hematology*. V.13(3), 2006 p.131-136.
67. STEINBERG, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal*, v. 8, p. 1295-324, 2008. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19112541> >.
68. STRASSER, B. J. Linus Pauling's "molecular diseases": between history and memory. *Am J Med Genet*, v. 115, n. 2, p. 83-93, Aug 2002. ISSN 0148-7299. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12400054> >.
69. SUMOZA, A. et al. Hydroxyurea (HU) for prevention of recurrent stroke in sickle cell anemia (SCA). *Am J Hematol*, v. 71, n. 3, p. 161-5, Nov 2002. ISSN 0361-8609. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12410569> >.
70. TAGANOV, K. D. et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n. 33, p. 12481-6, Aug 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16885212> >.
71. TURCHINOVICH, A. et al. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, v. 39, n. 16, p. 7223-33, Sep 2011. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609964> >.
72. VASUDEVAN, S. Functional validation of microRNA-target RNA interactions. *Methods*, v. 58, n. 2, p. 126-34, Oct 2012. ISSN 1095-9130. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22910526> >.
73. VERMYLEN, C. et al. Bone marrow transplantation in sickle cell anaemia. *Arch Dis Child*, v. 66, n. 10, p. 1195-8, Oct 1991. ISSN 1468-2044. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1953001> >.

74. VICHINSKY BEP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B. Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease: Clinical Presentation and Course. 2016;
75. WALTERS, M. C. Sickle cell anemia and hematopoietic cell transplantation: When is a pound of cure worth more than an ounce of prevention? *Pediatr Transplant*, v. 8 Suppl 5, p. 33-8, Jun 2004. ISSN 1397-3142. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15125704> >.
76. WANG, Y. et al. MicroRNAs expression signatures are associated with lineage and survival in acute leukemias. *Blood Cells Mol Dis*, v. 44, n. 3, p. 191-7, Mar 2010. ISSN 1096-0961. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20110180> >.
77. WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ*, v. 79, n. 8, p. 704-12, 2001. ISSN 0042-9686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11545326> >.
78. WEATHERALL, D. J.; PROVAN, A. B. Red cells I: inherited anaemias. *Lancet*, v. 355, n. 9210, p. 1169-75, Apr 2000. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10791394> >.
79. WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 2, n. 9, p. a011692, Sep 2012. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22951448> >.
80. WU, H. et al. miRNA profiling of naïve, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One*, v. 2, n. 10, p. e1020, 2007. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17925868> >.
81. WUN, T. et al. Platelet activation in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol*, v. 100, n. 4, p. 741-9, Mar 1998. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9531343> >.
82. ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, p. 207-214, 2007. ISSN 1516-8484. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842007000300003&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300003&nrm=iso) >.
83. ZHANG, D. Editorial Sickle cell disease : challenges and progress. v. 127, n. 7, 2016.
84. ZUBAKOV, D. et al. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med*, v. 124, n. 3, p. 217-26, May 2010. ISSN 1437-1596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20145944> >.

## 7 ORIGINAL PAPER

### **EXPRESSION PROFILES OF MICRORNAS IN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA AND THEIR POSSIBLE ROLE AS REGULATORS OF CLINICAL MANIFESTATIONS AND POTENTIAL BIOMARKERS FOR NEW THERAPEUTICS**

Ianaê Indiará Wilke <sup>1,2</sup>, Letícia Baggio <sup>2</sup>, Bruna Zambonato <sup>1,2</sup>, Annelise Pezzi <sup>2</sup>, Gabriela Hoss <sup>3</sup>, Vanessa Valim <sup>2</sup>, Maria Aparecida da Silva <sup>2</sup>, Bruna Amorim <sup>2</sup>, Alice Dahmer <sup>2</sup>, Filipe Sehn <sup>2</sup>, Raul Marques Rodrigues <sup>3</sup>, Betina de Souza <sup>3</sup>, Andriele Guterres <sup>3</sup>, Lúcia Silla <sup>1,2,4</sup>.

1. Post-graduation in Medicine: Medical Sciences - Federal University of Rio Grande do Sul.
2. Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells from the Research Center of the Hospital das Clínicas of Porto Alegre
3. Graduation student of the Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells of the Research Center of the Hospital of Clinics of Porto Alegre
4. PhD. Teacher of postgraduate of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, head of the Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells of the Research Center of the Hospital das Clínicas of Porto Alegre.

Correspondence:

Professora Dra. Lucia Silla, MD, PhD

Laboratório de Cultura Celular e Análise Molecular de Células Hematopoiéticas

Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcellos, 2350

CEP: 90035-903- Porto Alegre/RS, Brasil

Phone number: +55 (51) 3359-8317

E-mail: lsilla@hcpa.ufrgs.br

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Sickle cell anemia (SCA) is the most prevalent monogenic hereditary disease in Brazil, characterized by high morbi-mortality. Although it is a disease caused by a single point mutation, genetic characteristics are responsible for a variety of clinical manifestations and complications. Considering the importance of MicroRNAs in regulation of gene expression and physiopathology of several diseases, studies have shown an important role of regulatory function of these small regulators in hematopoiesis. **OBJECTIVES:** This study aims to elucidate the mechanism of action of these potential regulators in SCA physiopathology, and their correlation and significance for clinical phenotype. **METHODS:** Fifty individuals were included in this study, 25 normal subjects, donors from the Blood Bank of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and 25 homozygous SS patients, from the Centro de Referência de Doença Falciforme of HCPA. Data were obtained by real-time polymerase chain reaction with selection of four microRNAs candidates, selected according to prediction of their target functions already available in literature (hsa-mir-15a hsa-mir-210, hsa-mir-144, and hsa-mir-223). Differences in expression profiles of each microRNA were compared with mean of control group, as well as correlations between hematological and biochemical variables, and clinical manifestations, in order to evaluate the influence of variables positively or negatively. **RESULTS:** Three of four microRNAs had their expression levels statistically significant in relation to control group, mir-15a ( $p = 0.0001$ ), mir-210 ( $p = 0.0001$ ), mir-223 ( $p = 0.0011$ ), and mir-144 ( $p = 0.345$ ). Positive correlations identified were of microRNA 15a with microRNA 144 ( $p = 0.018$ ), microRNA 210 with microRNA 223 ( $p = 0.006$ ), and microRNA 223 with leg ulcers ( $p = 0.035$ ). Negative correlations identified were of microRNA 15a in relation to platelets ( $p = 0.038$ ) and acute thoracic syndrome ( $p = 0.042$ ), and of microRNA 144 in relation to reticulocytes ( $p = 0.002$ ). **CONCLUSIONS:** Such findings may allow the establishment of new treatments and possible therapeutic approaches by controlling expression of specific genes and their direct interaction with target RNAs.

**Keywords:** Sickle cell anemia, MicroRNAs, therapy, physiopathology

## Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is a hemoglobin disorder caused by homozygous hemoglobin S. A point mutation (Glu6val) in globin gene will lead to a clinical setting of complex phenotypic variability, with hemolysis, vasculopathy, vaso-occlusion, necrosis, osteomyelitis, acute thoracic syndrome, cerebrovascular accident, priapism, pain crisis, and organ damage <sup>(1,2)</sup>. The mutation polymorphisms (GAT → GTG) in the gene encoding the  $\beta$  chain of hemoglobin, originating different haplotypes of the disease, leads to clinical heterogeneity with different degrees of severity. At molecular level, the disease is characterized by polymerization of hemoglobin. In cellular aspect, erythrocytes are early destroyed and characterized by wide range of stiffness, density, and sickle shape. In biochemical aspects, there are changes in functionality of sodium-potassium pump, cell dehydration, increase in intracellular and membrane calcium, oxidation of hemoglobin, abnormalities in membrane proteins, loss of monovalent ions, among others <sup>(1,3)</sup>.

The only drug currently approved to treat SCA is Hydroxyurea, a cytotoxic, antineoplastic drug, and DNA synthesis inhibitor, considered to be the most successful and best tolerated drug therapy without major complications. This drug results in increase of fetal hemoglobin, inhibiting polymerization of HbS and consequently leading to an improvement of hemolysis. Though the only possible curative therapy remains bone marrow transplantation there are risks and benefits from the procedure that must be analyzed, in addition to its limitation of availability of compatible donors and complications <sup>(4-6)</sup>. Another alternative in the management of acute and chronic complications is transfusion therapy that aims to reduce fractions of sickled red blood cells and increase normal red blood cells in total blood volume, supplying synthesis and increasing oxygen transport capacity <sup>(7,8)</sup>.

Despite advances in knowledge of new factors and cellular, biochemical, and molecular aspects, and early diagnosis, treatments developed so far aimed only to ameliorate clinical manifestations for better quality of life of these patients. And, in this context, searching for a genetic approach has been subject of studies <sup>(9)</sup>.

MicroRNAs (miRNAs) are single-stranded, non-coding RNAs molecules of 18 to 25 nucleotides that are identified as potential regulators of gene expression <sup>(10)</sup>. From

the discovery of these small regulators of molecular mechanisms, studies point out differences in expression levels in pathological state compared to normal individuals. It is not known yet whether this different expression occurs as a consequence of the pathological state, or whether the disease is the direct result of this difference in expression. However, it is believed that the normalization of these levels can lead to elucidation of the mechanisms and be a promise of a new class of therapies. <sup>(11)</sup>.

Studying factors associated with modulation of SCA phenotype, including molecular, hematological, extrinsic, and regulatory factors, may allow establishing new possible therapeutic approaches by controlling expression of specific genes and their direct interaction with target RNAs.

## Materials and Methods

### Collection of Samples

This study included samples from 50 individuals, of which 25 healthy donors obtained from normal adult subjects (HbAA), blood donors from Blood Bank of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and 25 from patients homozygous for genotype of hemoglobin S, clinically stable and using hydroxyurea in regular medical follow-up at Centro de Referência de Anemia Falciforme of HCPA. 2.5 mL of peripheral blood were collected in *PAXgene*® tubes (Qiagen/BD) containing a lysate that stabilizes intracellular RNA, in order to preserve expression profile of each gene, and thereafter stored at -20 ° C. Exclusion criteria was all individuals presenting variant Hb other than Hb S.

The study was approved by local Institutional Review Board under the number 140075, and a written informed consent was signed by each patient or their parents.

### Selection of miRNAs candidates

MiRNAs candidates were selected according to predictions of their target functions, already available in literature, and its possible correlation with clinical manifestations (table 1):

hsa-mir-15a: related to fetal hemoglobin levels

hsa-mir-210: related to hypoxic environment

hsa-mir-223: related to inflammatory states

hsa-mir-144: related to oxidative stress and severity of SCA

#### Total RNA Extraction

Total RNA was isolated using a specific kit for the chosen collection tubes, *PAXgene Blood MicroRNA Kit*® (Qiagen/BD), following manufacturer's recommendations which consists of silica-based purification and stabilization of RNA with Spin columns. Subsequently, RNA concentration and purity were determined by measuring absorbance at 260 nm and 280 nm in spectrophotometer Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE, USA). To guarantee RNA quality of samples, a ratio of 260/280 absorbances of approximate two or higher was accepted. Then all samples were standardized in their final volume of total RNA at 3 ng/μl.

#### cDNA Synthesis

For cDNA synthesis samples were transcribed using *TaqMan*® *MicroRNA Reverse Transcription Kit* and *Veriti Thermal Cycler* thermocycler (Applied Biosystems®), according to manufacturer's guidelines. Complementary DNA was synthesized from a mature miRNA molecule by reverse transcriptase and DNA polymerase enzymes, through oligonucleotides specific for miRNAs of interest.

## Amplification and detection of miRNAs - qPCR

To determine level of expression, a technique of relative quantification was used by “delta delta ct” ( $\Delta\Delta Ct$ ) method, which uses *threshold cycles* (CTs) for calculation. The Ct values obtained were normalized by reference gene for each sample of each miRNA through endogenous control RNU48, in order to minimize variation between data and to increase precision of expression measures that can be masked by biological changes of each individual. The  $\Delta\Delta Ct$  calculated for cases was the difference between mean CTs between target miRNAs and mean CTs of control group. As for Calibrator, calculated  $\Delta\Delta Ct$  was the difference between mean CTs of control group and itself again. Control group was used as calibrator.

$$\Delta\Delta Ct \text{ Samples} = Ct (\text{target gene}) - Ct (\text{reference gene})$$

$$\Delta\Delta Ct \text{ Calibrator} = Ct (\text{reference gene}) - Ct (\text{reference gene})$$

Afterwards results obtained of  $\Delta\Delta Ct$  were used to calculate “fold change”, which is based on the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## Statistical Analysis

Initially, normal distribution of data was verified through Shapiro-Wilk test. Differences in quantitative data were analyzed using *student t* test, where differences in expression profiles of each miRNA candidate were compared to the mean of control group. These values were measured with mean  $\pm$  standard deviation. Correlations between variables were tested using Spearman's test. For this purpose, SPSS Software version 20.0 (SPSS, Chicago, IL) was used. A significance level of  $p < 0.05$  and a power of 95 % were considered.

## Results

The present study investigated 50 individuals, 25 of whom were normal, i.e. without disease (controls), mean age of controls was  $26.5 \pm 6.230$  years, and 25 were individuals Hb SS treated with Hydroxyurea and clinically stable being 14 (56 %) female and 11 (44 %) male. Mean age of patients was  $30.20 \pm 12.649$  years, being 11/25 below mean age.

The group of patients that composed this study was evaluated for variables associated with hemolysis and inflammatory process, being evaluated hematological and biochemical laboratory characteristics. Data of investigated variables are presented in table 1.

Clinical history of 25 HbSS patients were also evaluated. Data were obtained from clinical records review. The main clinical characteristics were painful crisis (present in 32.30 %), infections (21.50 %), bone necrosis (15.40 %), leg ulcers (9.20 %), priapism (7.70 %), hepatosplenomegaly (7.70 %), acute thoracic syndrome (3.10 %), and cerebrovascular accident (3.10 %), as shown in figure 1.

Characteristics of the data set obtained after samples' "Ct" normalization are presented in figure 2 in order to show variability, asymmetry, and dispersion of data.

Comparison between miRNAs levels in whole blood of HbSS patients and control individuals without disease by "fold change", which is based on the formula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , showed that mir-15a has a three-fold overexpression in relation to controls (300 %); mir-144 overexpression of 43 % was verified. Mir-210, however, showed 60 % suppression. The same was noted for mir-223, in which a suppression of 49 % was observed in the patients.

Correlations between hematological and biochemical variables, clinical manifestations and miRNAs were also assessed, in order to evaluate positively or negatively the influence among variables. Graphical demonstration between hematological and biochemical variables, miRNA profile, and clinical manifestations with statistically significant correlations ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ) between two distinct parameters are presented in figure 3.

When molecular parameter was evaluated, a positive correlation was observed between miRNA 15a and miRNA 144 ( $p = 0.018$ ), where both are simultaneously increased or their overexpression is verified in the patients. It was also found that miRNA 210 has a positive correlation with 223 miRNA ( $p = 0.006$ ), also indicating positive influence of one variable upon the other.

Correlating hematological and biochemical variables with molecular parameters, a significant association with negative correlation between miRNA 144 and reticulocytes was observed ( $p = 0.002$ ), similarly observed with miRNA 15a and platelets, which also had a negative correlation ( $p = 0.038$ ).

In the evaluation of clinical manifestations with molecular parameters, miRNA 223 was significantly associated with ulcer manifestations, in a positive correlation ( $p = 0.035$ ). MiRNA 15a had a significant negative correlation with acute thoracic syndrome ( $p = 0.042$ ).

Regarding manifestations of osteonecrosis, factor age showed a positive correlation ( $p = 0.003$ ).

## **Discussion**

Individuals with SCA present hematological findings characteristic of normocytic/normochromic anemia, with total hemoglobin ranging from 6.0 to 10 g/dL, mean corpuscular volume (MCV) ranging from 80 to 100 fl, mean reticulocyte ranging from 4 to 30 %, and fetal hemoglobin of 2 to 15 %<sup>(12,13)</sup>. The 25 studied patients presented a classic profile of patients with hemoglobinopathy, with mean values of total hemoglobin of  $8.06 \pm 1.29$  g/dL, MCV of  $93.90 \pm 10.01$  fl, and reticulocytes  $11.11 \pm 5.47$  %, compatible with hemolytic anemia. In biochemical parameters, it was observed elevation of hemolysis markers, such as lactate dehydrogenase (LDH), with a mean value of  $923.52 \pm 450.63$  U/L, and total bilirubin  $2.88 \pm 1.62$  mg/dl.

SCA is characterized by onset of clinical manifestations from 4 to 6 months of age. There are numerous complications that can affect organs and systems, leading to high morbidity and reduced life expectancy<sup>(14)</sup>. Amongst the most frequent are painful

crisis caused by obstruction of small circulation by sickled red blood cells, along with bone damage, which will directly affect quality of life of patients with SCA<sup>(15,16)</sup>. In addition, these patients are susceptible to infections, chronic ulcers, priapism, necrosis and chronic osteomyelitis<sup>(14)</sup>. In this study, pain crisis were responsible for a frequency of 32.30 % of clinical manifestations of the studied patients. Followed by infections (21.50 %), osteonecrosis (15.40 %), ulcers (9.20 %), priapism (7.70 %), hepatosplenomegaly (7.70 %), acute thoracic syndrome (3.40 %), and cerebrovascular accident (3.40 %).

In view of the role that miRNAs play in modulating various aspects of hematopoiesis<sup>(17)</sup>, miRNAs hsa-mir-15a, hsa-mir-210, hsa-mi-144, and hsa-mir-223 stand out for possible regulatory role of molecular mechanisms and physiopathology of SCA, with functions targeting fetal hemoglobin levels, hypoxia environment, oxidative stress and disease severity, and inflammatory processes, respectively<sup>(18-21)</sup>. In this present study, relative expression levels of these four miRNAs candidates were compared between patients and control subjects, and a significant threefold increase in miRNA 15a was observed in relation to controls. HbF regulation has been of great interest, considering the role of miRNA 15a in elevating HbF and improving clinical severity, suggesting that it may be an important target in new therapies for the disease in question<sup>(18)</sup>. In the present study, when comparing expression levels, it was found that this overexpression of mir 15a is related to the clinical status of the patients analyzed, since at the time of collection they were clinically stable with Hydroxyurea.

Ineffective erythropoiesis together with premature death of the red blood cells lead to chronic anemia and hypoxia. The expression of the microRNA 210 has a modulation linked to this critical environment<sup>(19)</sup>. Under hypoxia conditions the unspeakable factor of hypoxia (HIF1) accumulates by activating a transcription of target genes such as erythropoietin. Erythropoietin in turn has a regular function of producing red blood cells, maintaining stable hemoglobin levels<sup>(20)</sup>. In this study, a 60% suppression of microRNA 210 levels was observed in treated and stable clinical patients. This finding is consistent with a literature that suggests that mir-210 at high or overexpressed concentrations regulates HIF1 in hypoxic environments by silencing a transcription of target genes such as erythropoietin.

Regarding miRNA 144, the expression of this small regulator in relation to individuals without disease shows dramatic differences. The erythrocytes of individuals with ACS are characterized as having a reduced tolerance for the imbalance between the production of oxidizing compounds and the defense performance of antioxidant systems. Its increase leads to a decrease in NRF2 (nuclear factor (erythroid-derived 2) - like 2) that is activated by changes in the state of the cell. MiRNA 144, on the other hand, acts to silence this gene, and its overexpression will consequently result in the reduction of antioxidant capacity <sup>(21)</sup>. In this study, the relative expression of this miRNA presented an overexpression of 40% in relation to the controls, resulting in an environment with greater oxidative stress associated with the severity levels of this pathology.

Evidences suggest an important role of miRNA 223 in maintaining homeostasis, in addition to a variety of processes and cell types. Among them immune system, denoting the possibility of its role in inflammation <sup>(22)</sup>. MiRNA 223 functions as an important regulator that controls inflammation activity of NLRP3, that is a multiprotein signaling platform formed by detecting molecular patterns associated with damage. MiRNA 223 then suppresses NLRP3 expression through a conserved binding site <sup>(22)</sup>. Considering this context, relative suppression of 49 % with respect to controls found in this study shows an increase in this signaling platform, with reduction of inflammation in these patients. Emphasizing again that findings are consistent, since analyzed patients were clinically stable on HU use at time of collection.

Regarding correlations, in evaluation of molecular parameters in consideration to hematological parameters, it was verified that miRNA 15a showed a negative correlation ( $p = 0.034$ ) compared to platelets, tending to the increase of one influencing on the decrease of the other. Since miRNA 15a is known as a MYB inhibitor, and being MYB a transcription factor that represses platelet production, increase of this miRNA, as evidenced in the patients of this study, demonstrates regulation exerted by the use of hydroxyurea on these patients who are clinically stable. Otherwise, and seen the relationship of this miRNA with increase of Hb F through inhibition of transcription factor MYB, without treatment, miRNA 15a levels would probably be suppressed, considering platelet activation found in these patients in crisis.

About miRNA 144, it has a negative correlation with reticulocytes, since hemolysis is associated with marked reticulocytosis, and reticulocytosis to severity of anemia, it is then concluded that miRNA 144 is associated with severity of clinical manifestations in these patients.

Decreased blood flow to the bone, caused by SCA will lead to episodes of avascular necrosis, also known as osteonecrosis. Although any individual in any age group can be affected, it is more common among people between 30 and 60 years <sup>(23,24)</sup>. Positive correlation of factor age with clinical manifestation was then observed, demonstrating this positive association already described in literature.

Acute thoracic syndrome is a form of pulmonary disease often found in patients with SCA, and it is estimated that half of patients in adulthood present at least one episode during life, and is one of the main causes of death in these individuals <sup>(25,26)</sup>. It is suggested possible negative contribution of miRNA 15a in the physiopathology of the disease when in low concentrations.

The etiology of ulcers is complex and multifactorial. In patients with SCA, hypoxia associated with trauma, infection or inflammation have been associated with main causes for development of ulcers in the discussed disease <sup>(27)</sup>. In this study, a positive correlation of miRNA 223 with incidence of this clinical manifestation was observed in these patients. Considering the relationship of this miRNA with inflammation already reported in literature, this result becomes consistent with causes associated to their appearing.

Finally, positive correlations found between miRNA 15a and miRNA 144, and miRNA 210 with miRNA 223 are based on the concept that a single miRNA can regulate more than one target mRNA, and even other miRNAs, indicating positive influence of one over the other on the physiopathology of the disease.

## Conclusion

Identification of involvement in regulation and physiopathology of disease makes miRNAs promising for future therapeutic approaches in SCA. Normalization of

this differential expression through therapies has been target of several studies. However, a greater understanding of the breadth of action of these small regulators deserve attention, since a single miRNA can regulate hundreds of genes at the same time. The distinct pattern of expression found provides opportunities to study the regulation of their targets and understand the mechanism of these small regulators in cellular processes, as well as evaluation of their biological impact and significance, allowing discovery of therapies against specific physiopathological targets and greater elucidation of clinical aspects involved in evolution of disease.

### **Acknowledgment**

The study received financial support from Research and Event Incentive Found of Hospital das Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

### **References**

1. Li X, Dao M, Lykotra G, Em G. Biomechanics and biorheology of red blood cells in sickle cell anemia. 2016;
2. Zhang D. Editorial Sickle cell disease : challenges and progress. 2016;127(7).
3. Brittenham GM, Schechter AN, Constance TN. Hemoglobin Hemolytic. 2016;65(1):183–9.
4. Singh A, Xu Y. The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. 2016;
5. Hosseini P, Abidi SZ, Du E, Papageorgiou DP, Choi Y, Park Y. Cellular normoxic biophysical markers of hydroxyurea treatment in sickle cell disease. 2016;113(34):9527–32.
6. Arnold SD, Bhatia M, Horan J, Krishnamurti L. Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease – current practice and new approaches. 2016;(June):515–25.
7. Chou ST. Transfusion therapy for sickle cell disease : a balancing act. 2013;439–46.

8. Davis BA, Allard S, Qureshi A, Porter JB, Pancham S, Win N, et al. Guidelines on red cell transfusion in sickle cell disease Part II : indications for transfusion. 2016;
9. Aliyu ZY, Tumblin AR, Gregory J, Kato. Current therapy of sickle cell disease. *Haematologica*. 2008;91(1):7–10.
10. Bartel DP, Lee R, Feinbaum R. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function *Genomics : The miRNA Genes*. 2004;116:281–97.
11. Budhu A, Ji J, Wang XW. The clinical potential of microRNAs. 2010;(Table 1):1–7.
12. Cristina A, Pinto S. Fisiopatologia das doenças falciformes : da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. 2007;29(3):207–14.
13. Ferraz MHC. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida *Laboratorial diagnosis of sickle cell disease in the neonate and after the sixth month of life*. 2007;29(3):218–22.
14. Weatherall DJ, Provan AB. Red cells I : inherited anaemias. 2000;355:1169–75.
15. Marra VN, Silva RMG. Crises dolorosas na doença falciforme. 2007;29(3):247–58.
16. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, et al. Pain in Sickle Cell Disease — Rates and Risk Factors. *N Engl J Med*. 1991;(325):11–26.
17. Chen C, Li L, Lodish HF, Bartel DP. Lineage Differentiation. 1983;189.
18. Sankaran VG, Menne TF, Danilo Š, Thiru P, Orkin SH, Lander ES. MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. 2011;108(4):1519–24.
19. Siwaponanan P, Fucharoen S, Sirankapracha P. Elevated levels of miR - 210 correlate with anemia in  $\beta$  - thalassemia / HbE patients. *Int J Hematol* [Internet]. 2016;104(3):338–43. Available from: "<http://dx.doi.org/10.1007/s12185-016-2032-0>

20. DANG, K.; MYERS, K. A. The Role of Hypoxia-Induced miR-210 in Cancer Progression. p. 6353–6372, 2015.
21. Sangokoya C, Telen MJ, Chi J. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. 2016;116(20):1–3.
22. Haneklaus M, Gerlic M, Neill LAJO, Masters SL. miR-223 : infection , inflammation and cancer. 2013;215–26.
23. Kamath AF, Mcgraw MH, Israelite CL, Kamath AF, Mcgraw MH, Israelite CL. Surgical management of osteonecrosis of the femoral head in patients with sickle cell disease. 2015;6(10):776–82.
24. Aj M, Solà I, Lh A. Treatment for avascular necrosis of bone in people with sickle cell disease ( Review ). 2016;(8).
25. Francisco S, York N, Hospital M. Causes and outcome of the acute chest syndrome in sickle cell disease . 2000;1855–65.
26. Vichinsky BEP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B. Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease: Clinical Presentation and Course. 2016;
27. Alavi A, Kirsner RS. Hemoglobinopathies and Leg Ulcers. 2016;10–3.

MicroRNA	Primer (5'-3')	Chromosomal location	Reference location NCBI
hsa-mir-15 <sup>a</sup>	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	13q14.2	NR_029485
hsa-mir-210	AGCCCCUGCCCACCGCACACUG	11p15.5	NR_029623
hsa-mir-144	GGAUAUCAUCAUAUACUGUAAG	17q11.2	NR_029685
hsa-mir-223	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU	Xq12	NR_029637

Tabela 1: Reference sequence of the four selected microRNAs candidates

---

**Laboratory characteristics of 25 Hb SS individuals evaluated in the study**

---

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
<b>GOT (U/L)</b>	25	17	98	43.2	21.69869
<b>GPT (U/L)</b>	25	2	52	24.9	12.41947
<b>Bilirubin (mg/dl)</b>	25	0.50	7.00	2.88	1.62267
<b>Urea (mg/dl)</b>	25	10	39	19.96	7.84474
<b>Creatinine (mg/dl)</b>	25	0.30	17.75	1.16	3.45869
<b>Total Hb (g/dl)</b>	25	5.40	10.90	8.06	1.29996
<b>Fetal Hb (%)</b>	25	2.80	35.20	14.46	8.02439
<b>LDH (U/L)</b>	25	382	2377	923.52	450.63438
<b>MCV (fl)</b>	25	74	115.40	93.90	10.01790
<b>Platelets (10<sup>3</sup>/ul)</b>	25	155	566	382.84	121.26544
<b>Reticulocytes (%)</b>	25	2.10	20.47	11.11	5.47332
<b>Leukocyte count (10<sup>3</sup>/ul)</b>	25	4.41	18.82	9.54	3.27219
<b>Total</b>	25				

---

Tabela 2: Laboratory characteristics of Hb SS individuals assessed in the study

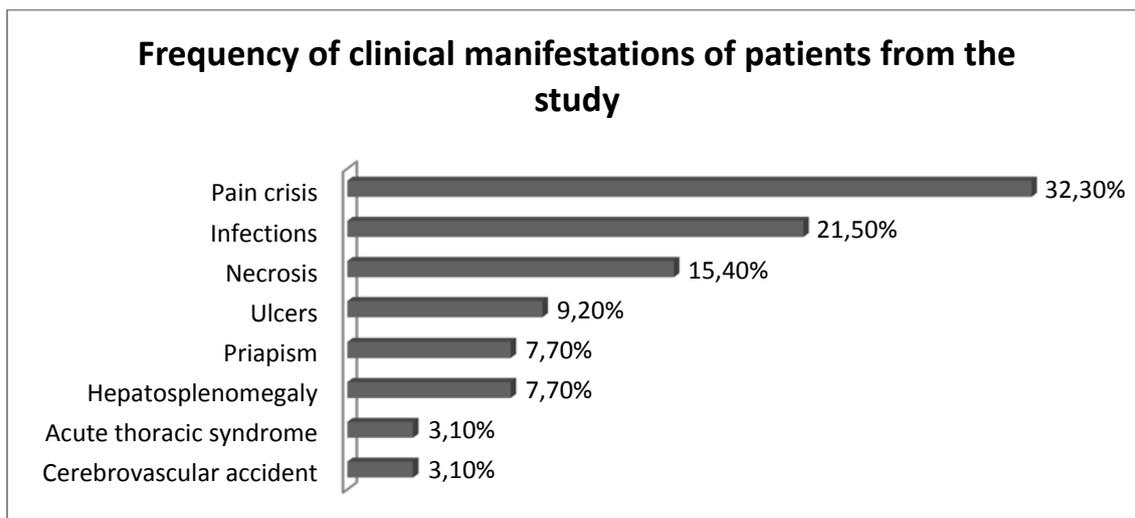
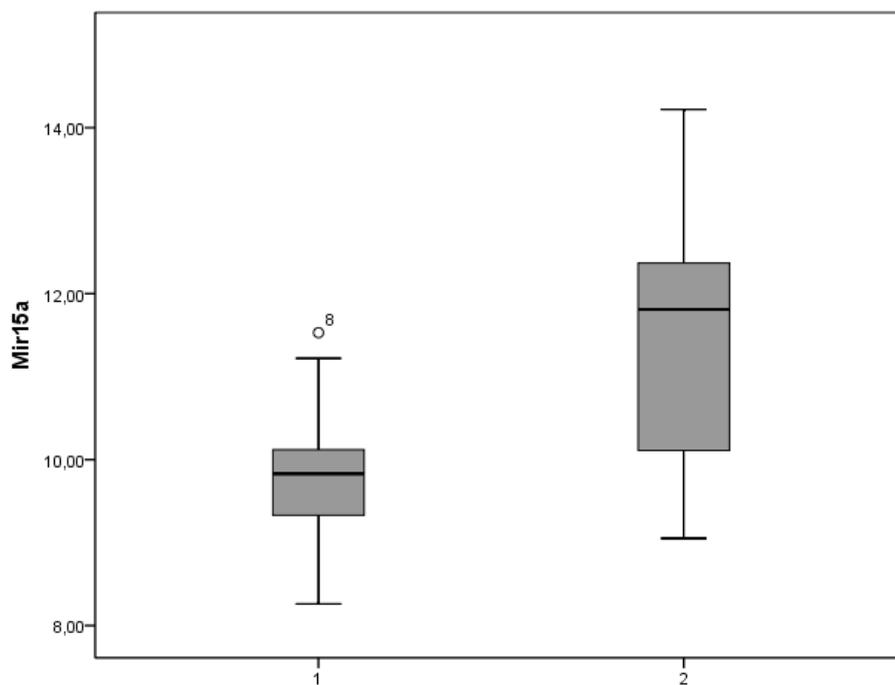
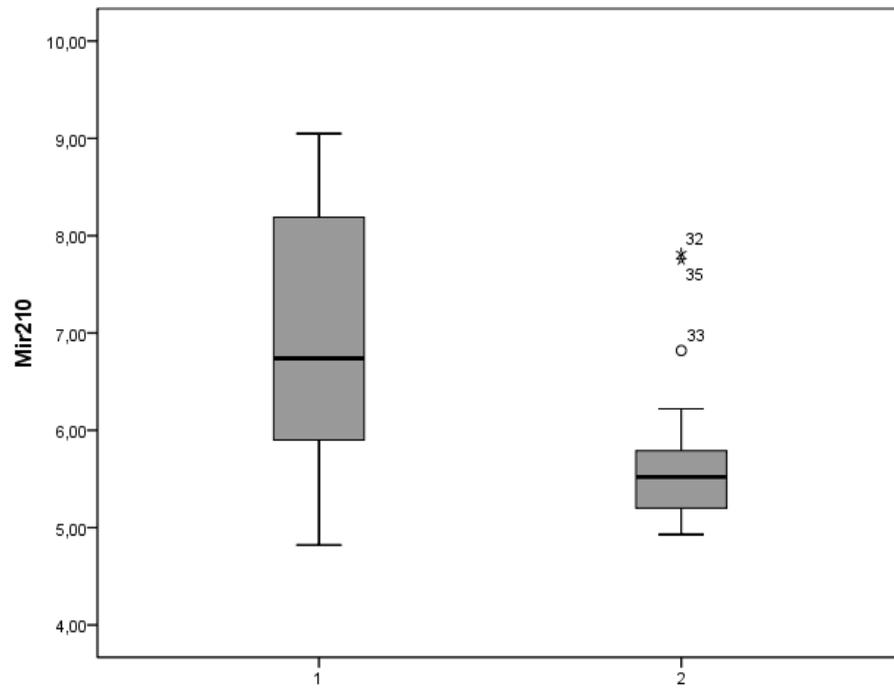
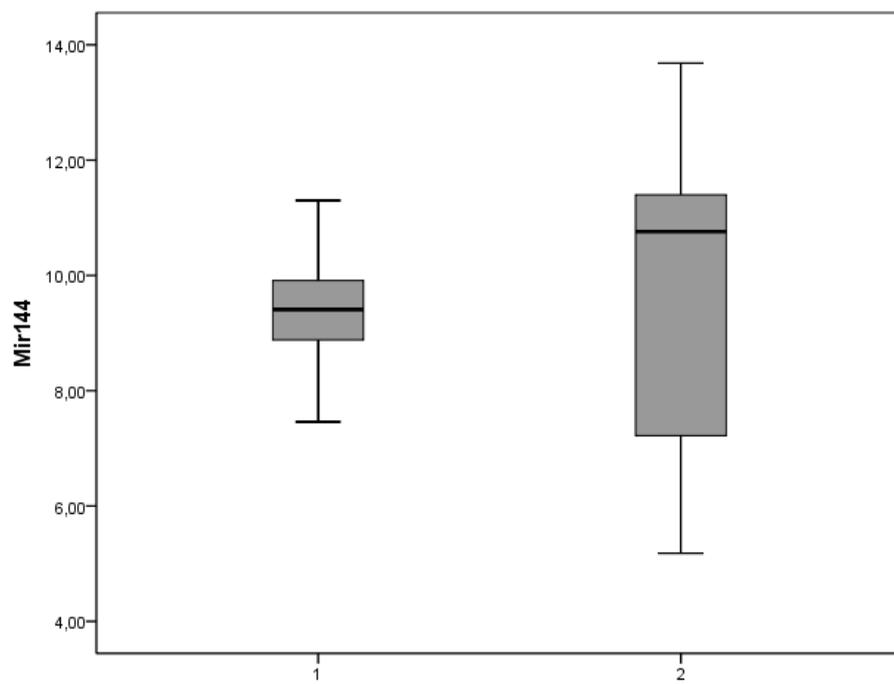


Figure 2: Frequency of clinical manifestations of the 25 patients from the study

A)



**B)****C)**

D)

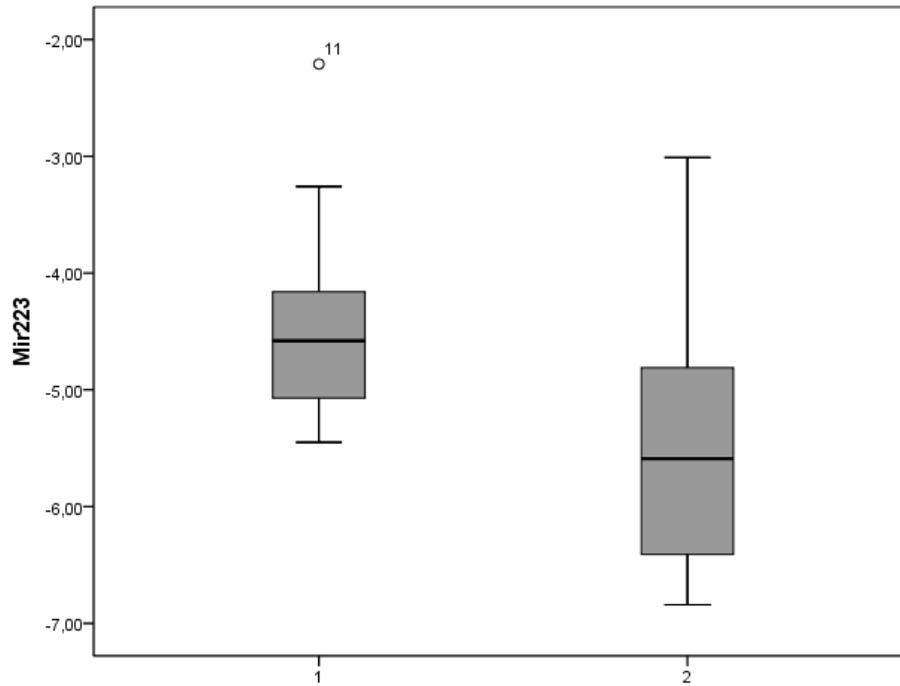
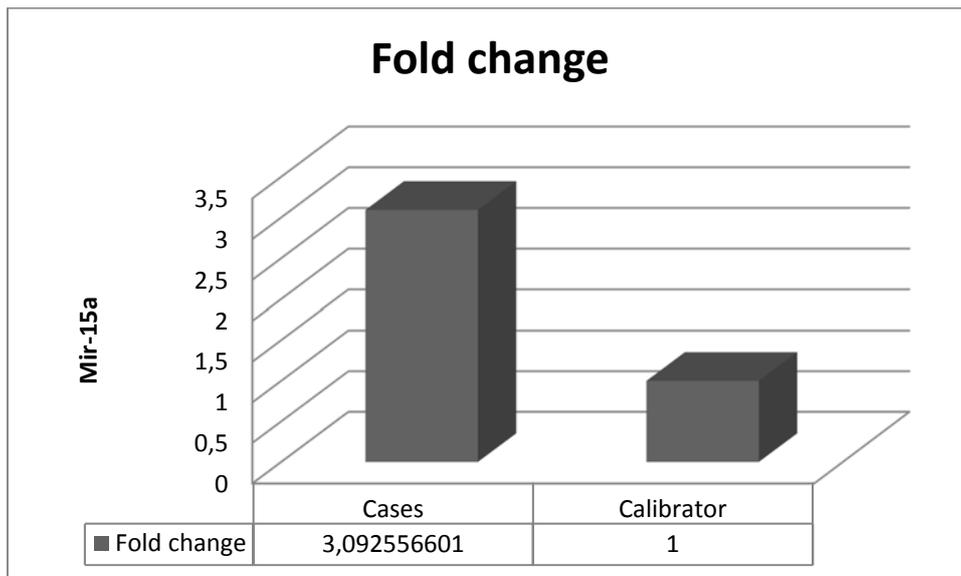
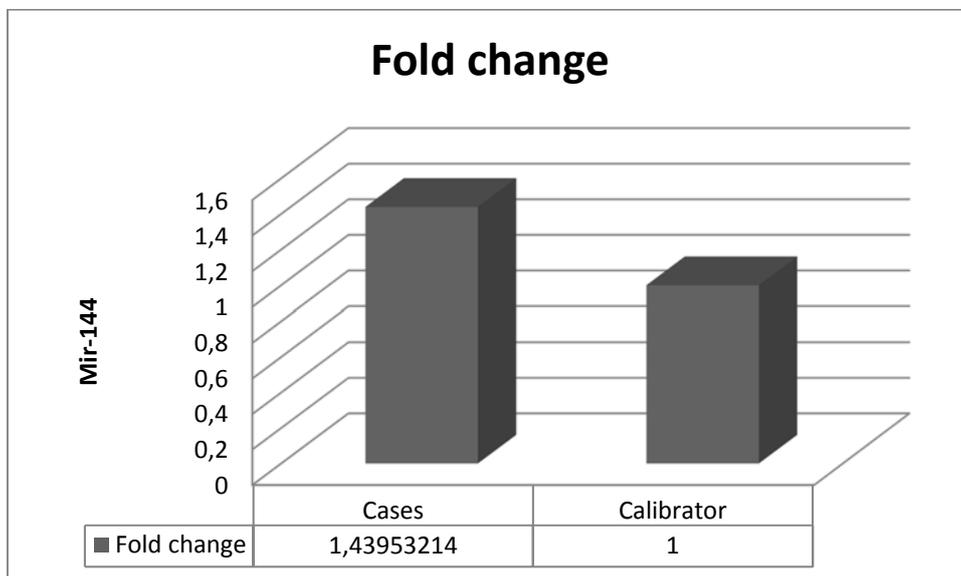
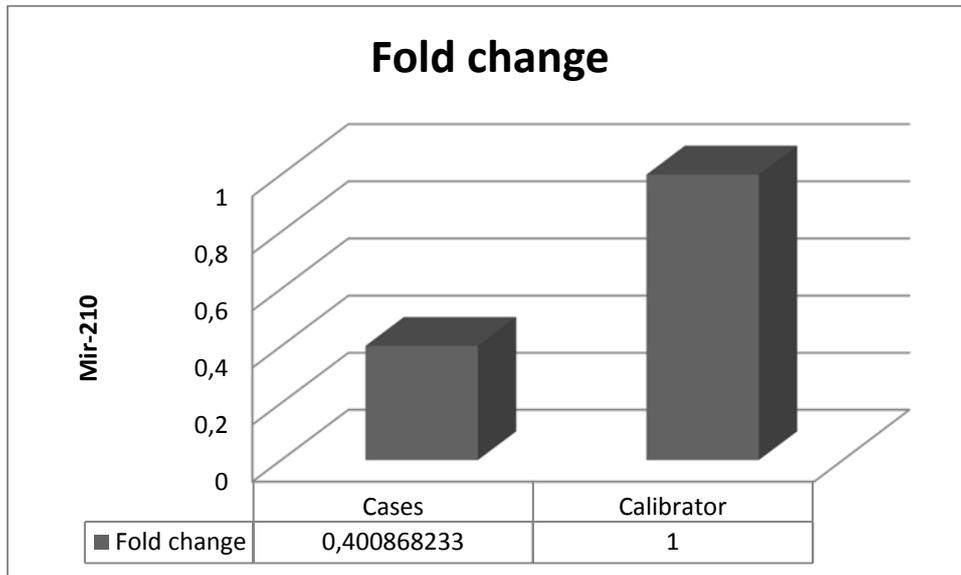


Figure 3: Data set values obtained after "CT" normalization of microRNAs mir-15a (A), mir-210 (B), mir-144 (C), and mir-223 (D) – Cases (1) and Controls (2).





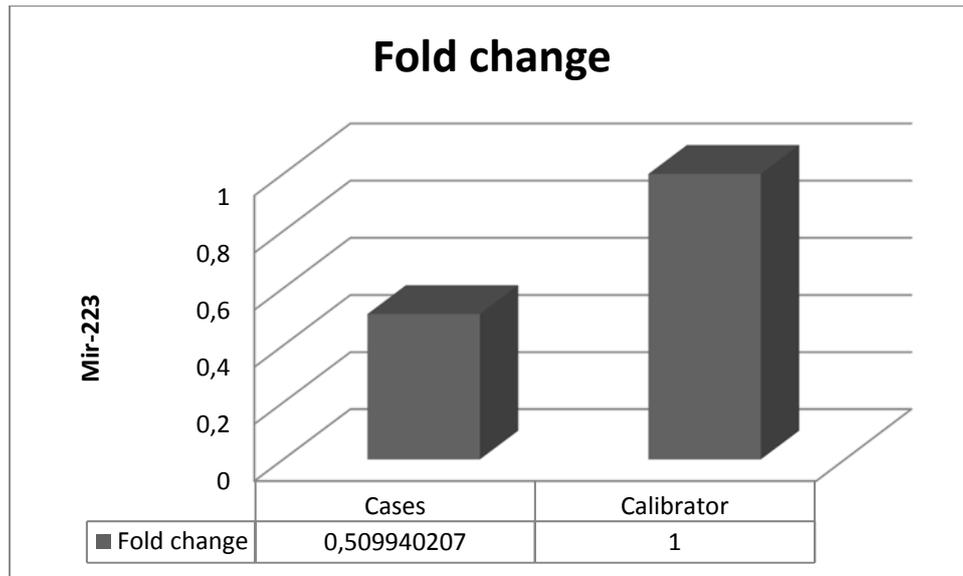
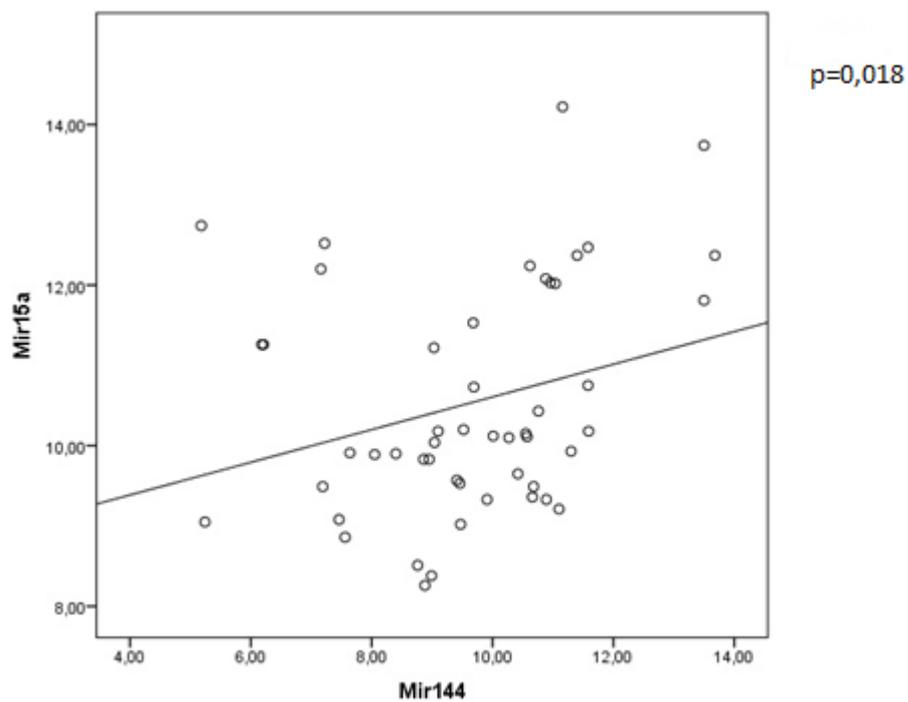
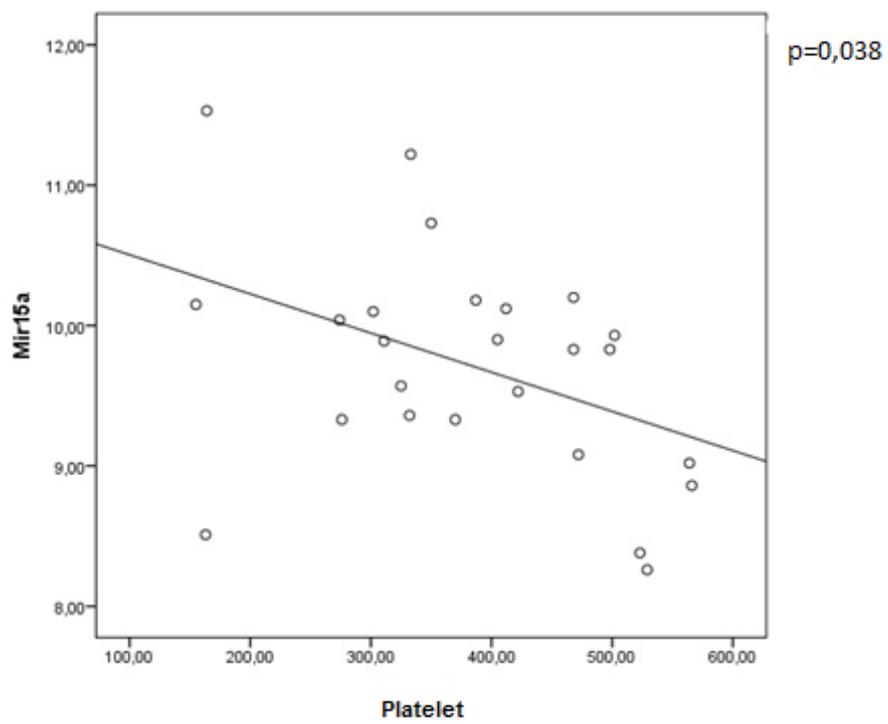
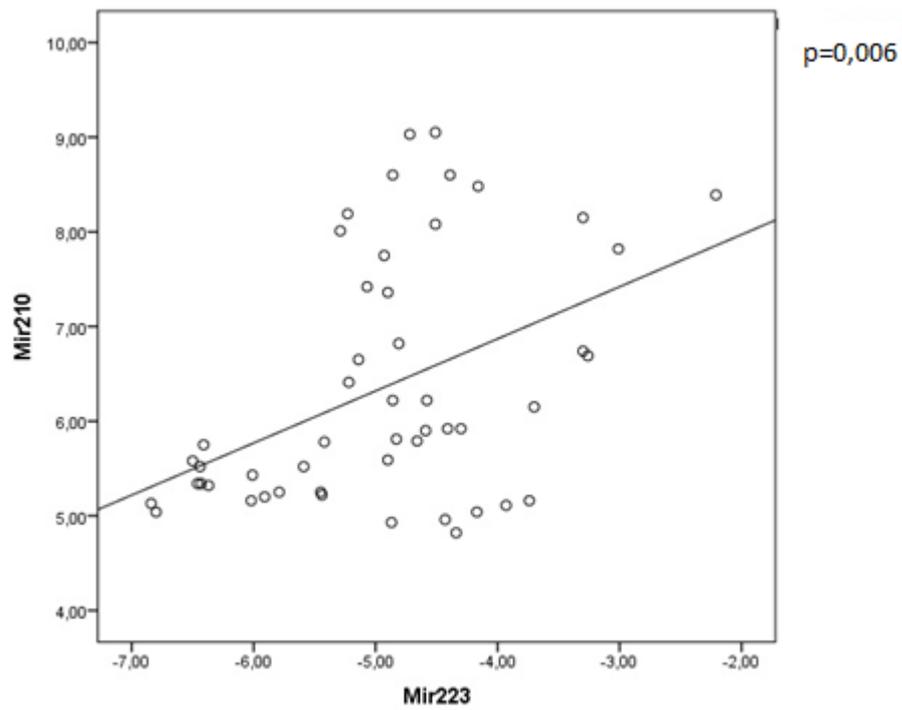
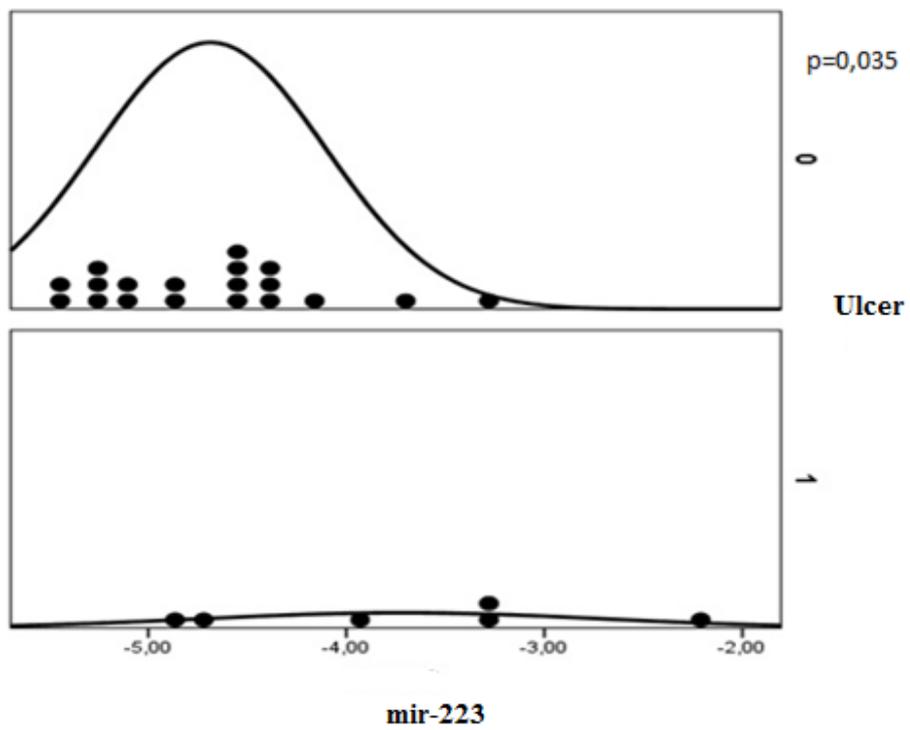
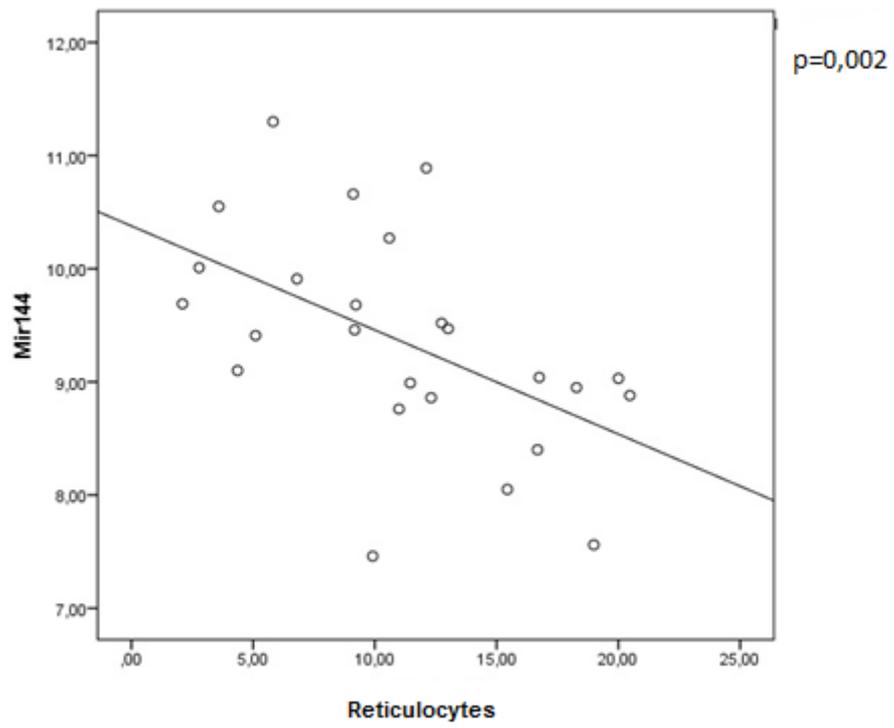


Figure 4: Relative quantification of microRNAs hsa-mir-15a (A), hsa-mir210 (B), hsa-mir-144 (C), and hsa-mir-223 (D) in 25 Hb SS patients on Hidroxiureia and clinical steady state.







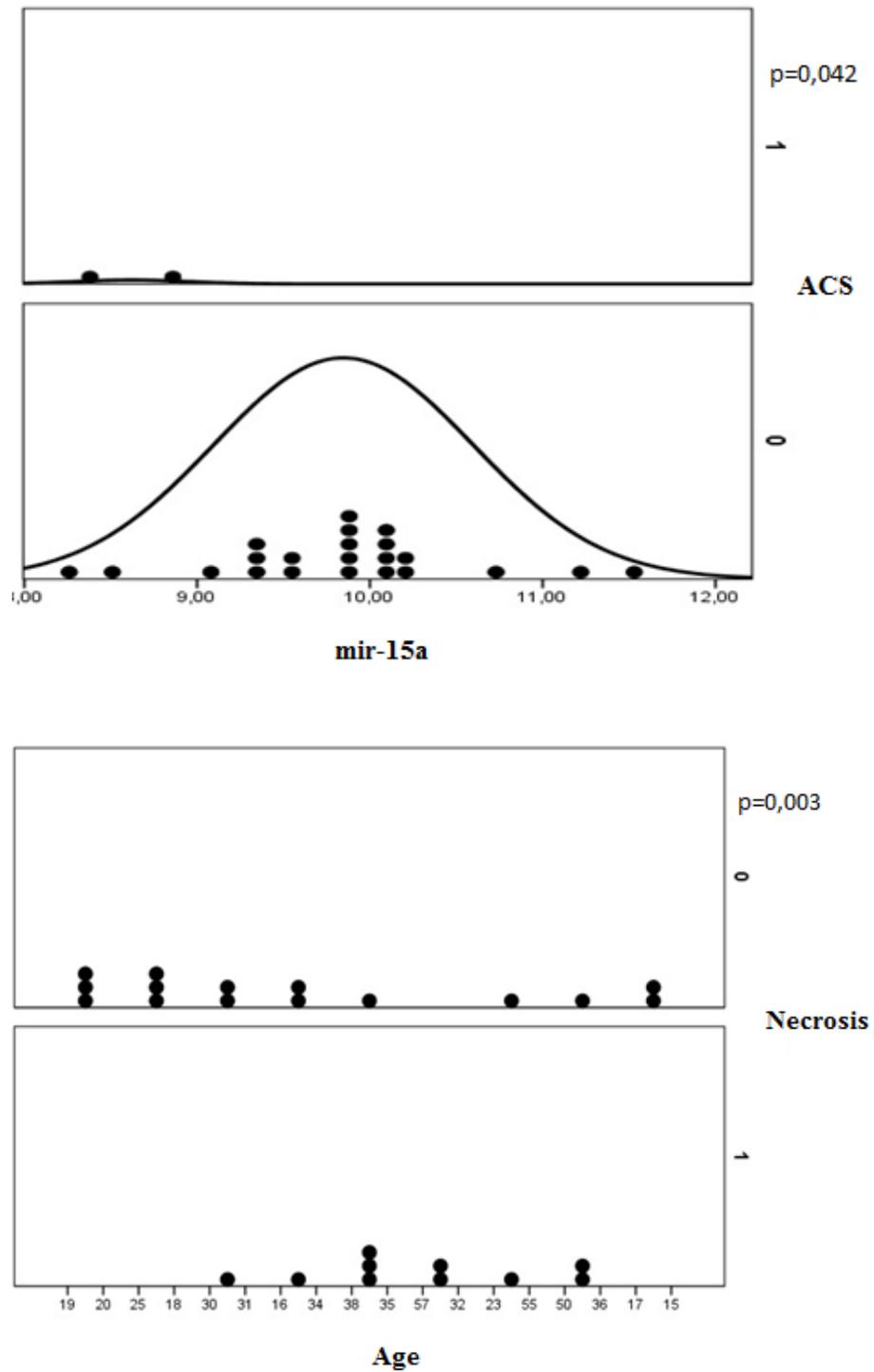


Figure 5: Hematological and biochemical variables, microRNA profiles, and clinical manifestations with correlations statistically significant

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com a descoberta dessa nova classe de reguladores gênicos e seu envolvimento direto com o desenvolvimento, proliferação, morte celular e principalmente na hematopoese, há evidências de um impacto regulatório tão abrangente quanto se acreditava. Pesquisas demonstram que há uma expressão significativa, e diferencial em indivíduos com alguma patologia em comparação a indivíduos normais.

Em relação à AF, estudos evidenciam que os MicroRNAs podem estar relacionados com os níveis de HbS, heterogeneidade clínica e fisiopatologia da doença.

Assim, o conhecimento e a identificação destes diferentes perfis de expressão, bem como o mecanismo de ação destes potenciais reguladores permitirão estabelecer novos tratamentos e possíveis abordagens terapêuticas através do controle da expressão de genes específicos e sua interação direta com RNAs alvo.

## **9 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Apesar da biologia destes pequenos reguladores ainda ser pouco conhecida, cada vez mais estudos correlacionam os mesmos com diversos processos biológicos, demonstrando a importância e sua característica promissora perante a terapia gênica. A continuidade dos estudos voltados a suas funções nos mecanismos fisiopatológicos poderão levar a um futuro com métodos eficazes não apenas no prognóstico e diagnóstico, mas também à novas abordagens terapêuticas para muitas doenças, especialmente no âmbito da anemia falciforme.

## ANEXOS

### ANEXO 1

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
SERVIÇO DE HEMATOLOGIA CLÍNICA  
LABORATÓRIO DE CULTURA E ANÁLISE MOLECULAR DE CÉLULAS  
HUMANAS

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

#### PACIENTES

Prezado paciente,

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa : “Análise dos Perfis de expressão de MicroRNAs no sangue total de pacientes com Anemia Falciforme e seu possível papel regulador nos mecanismos moleculares na fisiopatologia da doença e potenciais biomarcadores para novas terapêuticas”, que irá investigar características genéticas responsáveis por uma variedade de manifestações e complicações clínicas na Anemia Falciforme.

Ainda não existem tratamentos específicos para AF. Os tratamentos disponíveis atualmente consistem no objetivo de amenizar as manifestações clínicas e reduzir o número de crises para que você tenha uma melhor qualidade de vida.

Este projeto de pesquisa pretende estudar os mecanismos que influenciam no desenvolvimento desta doença, que permitirá o desenvolvimento de novos tratamentos e possíveis abordagens terapêuticas que possam agir diretamente na causa da mesma.

Os dados necessários para realização do projeto serão obtidos através de análise de prontuários e uma coleta de 2,5 ml de sangue da veia. Procedimento que pode provocar um leve desconforto no momento da coleta, no local onde a agulha for introduzida. Poderá surgir neste local uma área vermelha ou até mesmo roxa (hematoma) na pele, mas que também desaparecerá com o decorrer do tempo.

O material coletado será utilizado para análise da expressão genética para fins de pesquisa no entendimento dos mecanismos da doença.

A participação no estudo não trará benefício direto ao participante, porém contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos futuros.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

As informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, garantido assim o anonimato das informações obtidas, reservando apenas ao paciente ou familiar o acesso às mesmas.

Ressaltando que sua participação é voluntária, você tem a liberdade de recusar ou retirar o consentimento em qualquer fase do estudo sem nenhum prejuízo para você.

Todas as dúvidas poderão ser esclarecidas antes e durante o curso da pesquisa, através do contato com o pesquisador(a) responsável: Dra. Lucia Silla – (51) 33598850 e Pesquisador(a) executor Ianaê Wilke – (51) 33598850 do serviço de Hematologia Clínica do HCPA.

Em caso de dúvida em relação ao conteúdo ético desta pesquisa, não hesite em contatar o Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA – (51) 33597640, das 08h às 17h.

Este documento é fornecido em duas vias, sendo uma do paciente e outra do pesquisador.

Pelo presente Consentimento Pós-informação, declaro que li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Fui igualmente informado de receber esclarecimentos sobre a pesquisa a ser realizada, da liberdade de não participar do estudo, do anonimato e caráter confidencial das informações.

Nome do Participante: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do Responsável: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_  
(Se aplicável)

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Loca e Data: \_\_\_\_\_

**ANEXO 2**

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
SERVIÇO DE HEMATOLOGIA CLÍNICA  
LABORATÓRIO DE CULTURA E ANÁLISE MOLECULAR DE CÉLULAS  
HUMANAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO  
CONTROLE

Prezado(a) Colaborador(a),

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa : “Análise dos Perfis de expressão de MicroRNAs no sangue total de pacientes com Anemia Falciforme e seu possível papel regulador nos mecanismos moleculares na fisiopatologia da doença e potenciais biomarcadores para novas terapêuticas”, que irá investigar características genéticas responsáveis por uma variedade de manifestações e complicações clínicas na Anemia Falciforme.

Ainda não existem tratamentos específicos para AF. Os tratamentos disponíveis atualmente consistem no objetivo de amenizar as manifestações clínicas e reduzir o número de crises para uma melhor qualidade de vida destes pacientes. Tal conhecimento permitirá estabelecer novos tratamentos e possíveis abordagens terapêuticas que ajam diretamente na fisiopatologia desta doença.

Para realização deste estudo é necessário comparar um grupo de pacientes que apresentam a característica estudada com um grupo de colaboradores que não apresenta esta característica. Você está sendo convidado então, a participar do grupo controle, ou seja, que não possui a doença em questão.

Os dados necessários para realização do projeto serão obtidos através de análise de prontuários e uma coleta de 2,5 ml de sangue da veia, neste caso, será utilizada uma alíquota do sangue doado. Procedimento que pode provocar um leve desconforto no momento da coleta, no local onde a agulha for introduzida. Poderá surgir neste local

uma área vermelha ou até mesmo roxa (hematoma) na pele, mas que também desaparecerá com o decorrer do tempo.

A participação no estudo não trará benefício direto ao participante, porém contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos futuros.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

As informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do colaborador a todo momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, garantido assim o anonimato das informações obtidas, reservando apenas ao paciente o acesso às mesmas.

Ressaltando que sua participação é voluntária, você tem a liberdade de recusar ou retirar o consentimento em qualquer fase do estudo sem nenhum prejuízo para você.

Todas as dúvidas poderão ser esclarecidas antes e durante o curso da pesquisa, através do contato com o pesquisador(a) responsável: Dra. Lucia Silla – (51) 33598850 e Pesquisador(a) executor Ianaê Wilke – (51) 33598850 do serviço de Hematologia Clínica do HCPA.

Em caso de dúvida em relação ao conteúdo ético desta pesquisa, não hesite em contatar o Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA – (51) 33597640, das 08h às 17h.

Este documento é fornecido em duas vias, sendo uma do paciente e outra do pesquisador.

Pelo presente Consentimento Pós-informação, declaro que li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Fui igualmente informado de receber esclarecimentos sobre a pesquisa a ser realizada, da liberdade de não participar do estudo, do anonimato e caráter confidencial das informações.

Nome do Participante: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do Responsável: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_  
(Se aplicável)

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Loca e Data: \_\_\_\_\_