

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LUCAS DA SILVA OLIVEIRA

**ESTUDO DAS VARIANTES NO GENE *HLA-G* DE PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA
E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS - HEMOAM**

**MANAUS – AM
2025**

LUCAS DA SILVA OLIVEIRA

**ESTUDO DAS VARIANTES NO GENE *HLA-G* DE PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA
E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS – HEMOAM**

Dissertação apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi

**MANAUS – AM
2025**

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- O48e Oliveira, Lucas da Silva
Estudo das variantes no gene HLA-G de pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM / Lucas da Silva Oliveira. - 2025.
80 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Adriana Malheiro Alle Marie.
Coorientador(a): Eduardo Antônio Donadi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2025.
1. Hemoglobinopatia. 2. Biomarcador solúvel. 3. Amazônia Brasileira. 4. SNVs. I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Donadi, Eduardo Antônio. III. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título
-

FOLHA DE JULGAMENTO

ESTUDO DAS VARIANTES NO GENE HLA-G DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS - HEMOAM

LUCAS DA SILVA OLIVEIRA

**“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título
de Mestre em Biotecnologia, aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em convênio com a
Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do
Amazonas, com defesa realizada dia 28/08/2025”.**

Banca Julgadora:

Prof.^a Dr.^a Adriana Malheiro Alle Marie

Presidente

Prof.^a Dr.^a Aya Sadahiro

Membro

Prof.^a Dr.^a Rafaella Oliveira dos Santos

Membro

DEDICATÓRIA

Com imensa gratidão e carinho, dedico este trabalho:

Agradeço a DEUS, por ter me criado e cuidado de mim desde o ventre da minha mãe, mesmo não enxergando, o SENHOR tem trabalhado em mim desde sempre.

A JESUS, pois por muitas vezes tentei desistir de tudo, em silêncio, o mesmo não permitiu que eu continuasse caído. Mas me deu de presente uma mulher maravilhosa, que é minha mãe, Lindinalva, meu maior apoio e suporte. Sempre digo que ela é um dos maiores presentes que Deus pôde me dar, a pessoa que me criou com tudo que tinha e depositou todos os sonhos em mim. Depois de um tempo fui presenteado por uma irmã, que de longe é gentil, simpática e minha amiga, e de perto, é muito chata (risos), clássica briga de irmãos. Mas eu a amo. Esse foi meu segundo presente.

Ao Espírito Santo de Deus, pois nos piores e melhores momentos da minha vida, pude passar com meu melhor amigo, consolador, parceiro e confidente.

É impossível eu, com uma mente limitada e fraca, conhecer e definir objetivos as três pessoas da trindade. Só sei que eu amo, e que é DEUS, sempre foi DEUS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por tudo, sei que não há maior ou melhor merecedor do que Ele, pois por Ele e para Ele são todas as coisas. Agradeço a Deus por me chamar de Filho, e por enviar aos nossos corações o Espírito de Jesus que clama: Aba, Pai (Gálatas 4:6). Sou grato por tudo que o SENHOR tem feito em minha vida. Agradeço pelas coisas fáceis e difíceis, pelas bênçãos e males, pelas montanhas e desertos, pela riqueza e pobreza, pelo pão de cada dia, e por todas as vezes que eu não vi ou agradei devidamente. Todo o sucesso, as conquistas que tive na minha vida, todas são para ele, pois tudo é DELE. E fico extremamente feliz por isso. Não gosto de relembrar a época que vivi sem ELE. Me sentia morto, como se tivesse vivendo apenas em máquinas de hospital, acamado, e apenas aguardando a reanimação ou o desligamento completo das máquinas.

Bom... o que falar da minha família? Da minha mãe, irmã, avós, tios e tias. Não consigo expressar tamanha gratidão por tudo que fizeram e fazem na minha vida. Só o fato de estarem vivos, já me deixa muito feliz. Minha mãe! Não sei o que dizer, ela é um presente junto a minha irmãzinha. É por elas que eu continuei trabalhando, sem desistir, cair e levantar, era constante esses casos, mas continuei por que penso em querer sempre o melhor para elas. Eu poderia fazer um texto gigantesco para falar o quão grato sou por elas e por minha família inteira, mas uma coisa eu desejo somente para a minha família: é que a vontade de Deus se realize na vida deles. Eu amo todos vocês!

Agradeço a minha noiva, Nara Caroline, que logo será minha esposa. Meus momentos com ela desde que a conheci são únicos e unicamente especiais. Ela será minha família e quero fazer de tudo para ela, estudar, trabalhar, estar com ela, sempre, e termos uma vida junto. Casarmos, ter nossos bens, fazer viagens, e futuros filhos, e tudo para a glória de Deus. Ela tem sido aqui comigo, um extremo suporte, me ajuda sempre que pode. Está comigo em todos os momentos, física e virtualmente. Eu a amo. E quero estar sempre com ela.

Agradeço a minha célula, chamada de Filhos da Luz. O que dizer deles? Ah, eles foram extremamente essenciais na minha vida. Eu não tinha ideia de que Deus preparava uma família querida de irmãos em Cristo aqui em Manaus, pois a minha família vive em Coari, então eles se tornaram minha família aqui em Manaus. Lembro-me que em muitos momentos da minha vida, pude ser consolado, apoiado, instruído e guiado por eles. Meus queridos irmãos e amigos são eles: Thalia (minha líder), Rafael e Thamyris (Supervisores do setor), Gabriel (amigo dino), Jordan, Marcos (Meu discipulador), Raquel, Ana, Miguel, Melicia, Larisse, Raiane e seu marido Fabricio. Todos são extremamente queridos e amados. Eu amo cada um de vocês!

Agradeço também aos meus amigos que conheci no HEMOAM, que não são poucos (risos). Pude compartilhar diversos momentos com eles. E em especial ficaram no meu coração: Suelen Farias e Stephanny Dias. Quero somente desejar que tudo de melhor se realize nas suas vidas. Que a vontade de Deus prevaleça sobre vocês. Eu amo vocês. O desejo de fazer um texto para vocês duas é gigante, pois em diversos momentos longe ou perto, tocaram o meu coração de forma que pude ser transformado. Escrevo isso em lágrimas, pois nossas memórias juntos em tantos e tantos momentos são marcantes que me deixam emotivo. Sou grato pela amizade de vocês duas.

Agradeço também por outros amigos e profissionais que passaram pela minha vida no HEMOAM desde 2020, eu amo cada um de vocês, são muito especiais para mim. E com certeza marcaram a minha história, me ensinando, instruindo, consolando, ajudando quando eu mais precisava, e simplesmente sendo vocês: Bruno Eduardo - Amo você, amigo, obrigado por fazer parte da minha vida, você é muito especial. Guardo no meu coração um forte carinho. Lilyane Xabregas, Walter Neves, Allyson Guimarães, Chanel Ribeiro, Mayara Façanha, Luiz Carlos, Jonatas Campelo entre tantos e tantos: agradeço por tudo.

Alexander Leonardo, apesar da distância física, saiba que nunca me esquecerei de você e o quanto me ensinou, sei que foi rígido, mas vejo a necessidade que foi suprida, graças a isso. Lembro-me claramente no dia que me ajudou quando fiquei sem gás em casa por uma semana, foi o gesto mais lindo que fez por mim. Só desejo que o SENHOR DEUS esteja sempre com você, te guiando, apoiando e instruindo nos caminhos que Ele tem para o senhor.

Quero agradecer também a minha orientadora: Adriana Malheiro, por inicialmente me dar a oportunidade de realizar a Iniciação científica (IC) no ano de 2020 até o mestrado a qual estou encerrando. Fiz tudo que pude para que pudesse ser o mais proativo e responsável. Obrigado por esta oportunidade.

Agradeço também ao meu coorientador: Eduardo Donadi, o qual me ajudou, me instruiu e colaborou efetivamente com o desenvolvimento do meu estudo.

Agradeço à coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pelo apoio, esclarecimentos e orientações durante os dois anos do mestrado, sempre com compreensão e respeito aos alunos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), pelo financiamento do projeto e pelo auxílio financeiro recebido durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela oportunidade de realizar esta tão sonhada etapa do meu crescimento profissional e o acompanhamento durante a jornada.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), por

fornece a estrutura e oportunidade necessária para o desenvolvimento deste projeto.

Por fim, dedico meu mais profundo respeito e gratidão aos pacientes com anemia falciforme, que generosamente consentiram em participar deste projeto e se tornaram pilares essenciais para a concretização dos resultados aqui apresentados. Que os frutos desta pesquisa possam reverberar em suas vidas, trazendo esperança renovada e alívio, assim como a presença e a colaboração de cada um foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

A todos que fizeram parte desta caminhada, minha eterna gratidão, pois cada contribuição, por menor que pareça, foi a força que tornou possível esta realização.

RESUMO

Introdução: A anemia falciforme é a doença hemolítica de caráter hereditário mais comum no mundo, acometendo principalmente pessoas de descendência africana, e apontada como uma questão de saúde pública. A hemoglobina presente no meio extracelular, resultante de hemólise da doença é reconhecida pelo sistema imune, que pode recrutar células e gerar uma inflamação crônica e estéril, que pode causar obstrução de vasos sanguíneos. O HLA-G é uma molécula de classe I do complexo principal de histocompatibilidade com propriedades tolerogências, que pode inibir tanto a imunidade inata quanto adaptativa. A isoformas solúveis do HLA-G produzido por leucócitos, tem sido implicado em várias funções imunorregulatórias e pesquisas indicam que os níveis de HLA-G solúvel estão elevados em uma proporção significativa de pacientes com anemia falciforme, tanto durante estados estacionários quanto após crises recentes. Variantes genéticas dessa proteína foram observadas influenciando a suscetibilidade a infecções, o que é relevante devido ao aumento do risco de infecções pré-existentes dos pacientes com anemia falciforme. **Objetivo:** Analisar o impacto das SNVs no gene *HLA-G* e sua correlação com a expressão da porção solúvel em pacientes com anemia falciforme e doadores de sangue saudáveis. **Metodologia:** Foram recrutados 85 pacientes com anemia falciforme, e coletado sangue em tubos de EDTA. Foi realizado o hemograma desses pacientes e foi feita a genotipagem dos SNVs *rs1049033*, *rs9380142* e *rs1710* do gene *HLA-G* por PCR tempo real, e a quantificação de HLA-G solúvel por ELISA sanduiche conforme o protocolo do fabricante (ThermoFisher). **Resultados:** O estudo incluiu 85 pacientes com anemia falciforme (44 em estado estacionário e 41 em crise vaso-oclusiva), além de 80 indivíduos saudáveis, como grupo controle. Pacientes em crise apresentaram níveis significativamente mais baixos de hemoglobina e hematócrito, e maiores contagens de leucócitos e neutrófilos. Na análise genética, o genótipo C/T da variante *rs1049033* foi mais frequente nos casos do que nos controles. Houve aumento significativo dos níveis do sHLA-G analisado no grupo em crise vaso-oclusiva em comparação ao grupo controle. **Conclusão:** Os achados deste estudo corroboram a literatura ao demonstrar alterações hematológicas compatíveis com os diferentes estados clínicos da AF, além de apontar o potencial papel da variante *rs1049033* gene *HLA-G* na modulação imunológica da doença. A elevação significativa de sHLA-G nos pacientes sugere que essa molécula pode integrar um mecanismo compensatório à inflamação, reforçando sua relevância como possível marcador imunológico.

Palavras-chave: Hemoglobinopatia; Biomarcador solúvel, Amazonia Brasileira; SNVs.

ABSTRACT

Introduction: Sickle cell anemia is the most common hereditary hemolytic disease in the world, mainly affecting people of African descent, and is considered a public health issue. The hemoglobin present in the extracellular medium, resulting from hemolysis in the disease, is recognized by the immune system, which can recruit cells and generate chronic, sterile inflammation, which can cause obstruction of blood vessels. HLA-G is a class I molecule of the major histocompatibility complex with tolerogenic properties, which can inhibit both innate and adaptive immunity. The soluble isoforms of HLA-G produced by leukocytes have been implicated in various immunoregulatory functions and research indicates that levels of soluble HLA-G are elevated in a significant proportion of patients with sickle cell anemia, both during steady states and after recent crises. Genetic variants of this protein have been observed to influence susceptibility to infections, which is relevant due to the increased risk of pre-existing infections in patients with sickle cell anemia. **Objective:** To analyze the impact of SNVs in the HLA-G gene and their correlation with the expression of the soluble portion in patients with sickle cell anemia and healthy blood donors. **Methodology:** 85 patients with sickle cell anemia were recruited and blood was collected in EDTA tubes. The blood counts of these patients were taken and the SNVs rs1049033, rs9380142 and rs1710 of the HLA-G gene were genotyped by real-time PCR, and the soluble HLA-G was quantified by sandwich ELISA according to the manufacturer's protocol (ThermoFisher). **Results:** The study included 85 patients with sickle cell anemia (44 in steady state and 41 in vaso-occlusive crisis), as well as 80 healthy individuals as a control group. Patients in crisis had significantly lower hemoglobin and hematocrit levels, and higher leukocyte and neutrophil counts. In the genetic analysis, the C/T genotype of the rs1049033 variant was more frequent in the cases than in the controls. There was a significant increase in the levels of sHLA-G analyzed in the vaso-occlusive crisis group compared to the control group. **Conclusion:** The findings of this study corroborate the literature by demonstrating hematological alterations compatible with the different clinical stages of PA, as well as pointing to the potential role of the rs1049033 HLA-G gene variant in the immune modulation of the disease. The significant elevation of sHLA-G in the patients suggests that this molecule may be part of a compensatory mechanism for inflammation, reinforcing its relevance as a possible immunological marker.

Keywords: Hemoglobinopathy; Soluble biomarker, Brazilian Amazon; SNVs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de recém-nascidos com anemia falciforme em cada país em 2015.	18
Figura 2: Fisiopatologia da Anemia Falciforme.	20
Figura 3: Mapa esquemático do locus do complexo principal de histocompatibilidade humano (HLA).	22
Figura 4: Receptores que interagem com o HLA-G e sua expressão em células do sistema imunológicos.	23
Figura 5: Diversas isoformas de HLA-G são geradas por splicing alternativo do mRNA de HLA-G.	24
Figura 6: Concentração plasmática em nanograma por mililitro (ng/mL), representado em gráfico de barras de HLA-G solúvel no grupo de doadores saudáveis (azul) e nos pacientes em estado estacionário (verde) e em crise vaso-oclusiva (vermelha).	43
Figura 7: Distribuição das concentrações de sHLA-G entre os genótipos e alelos das variantes genéticas do estudo.	45
Figura 8: Correlação das variáveis hematológicas e HLA-G solúvel no perfil estacionário (EE) de pacientes com anemia falciforme. Negrito: Estatisticamente significativos: $p < 0,05$. Verde: Correlação positiva; Branco: Correlação neutra; Vermelho: Correlação negativa.	46
Figura 9: Correlação das variáveis hematológicas e HLA-G solúvel no perfil de crise vaso-oclusiva (CVO) de pacientes com anemia falciforme. Negrito: Estatisticamente significativos: $p < 0,05$. Verde: Correlação positiva; Branco: Correlação neutra; Vermelho: Correlação negativa.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variantes do HLA-G	27
Tabela 2: Informações das variantes genéticas incluídas neste estudo.	32
Tabela 3: Variáveis sociodemográficas e clínicas dos pacientes com anemia falciforme.	34
Tabela 4: Variáveis hematimétricas dos pacientes com anemia falciforme.	35
Tabela 5: Frequência alélica e genotípica das variantes genéticas do HLA-G	37
Tabela 6: Frequências alélicas e genotípicas dos pacientes em EE e CVO	38
Tabela 7: Modelo de herança genética da variante rs1049033.....	39
Tabela 8: Modelo de herança genética da variante rs9380142.....	41
Tabela 9: Modelo de herança genética da variante rs1710.....	41
Tabela 10: Concentração de HLA-G solúvel com os perfis clínicos.	42

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
A	Adenina
AF	Anemia Falciforme
C	Citosina
CD	Cluster of Differentiation
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
CVO	Crise Vaso-oclusiva
DF	Doença Falciforme
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DAMPS	Padrões Moleculares associados ao Dano
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EE	Estado Estacionário
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
G	Guanina
Glu	Ácido Glutâmico
Gly	Glicina
Hb	Hemoglobina
HbS	Hemoglobina S
HBV	Virus da Hepatite B
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HCT	Hematócrito
HCV	Virus da Hepatite C
HDW	Amplitude de Distribuição da Hemoglobina
HGB	Hemoglobina - Hemograma
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano, Human Leucocyte Antigens
HLA-G	Antígeno Leucocitário Humano G
HTLV	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas
HW	Hardy-Weinberg
IFN- γ	Interferon gama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
ILT	Human Inhibitory Receptors Ig-Like Transcript
IQR	Intervalo Interquartil
KIR2DL4	Killer Cell Immunoglobulin Like-Receptor, Two Ig Domains And Long Cytoplasmic Tail 4
LUC	Células Atípicas do Sangue Periférico
MAF	Frequência do Alelo Menor
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
n	Quantitativo amostral
NK	Natural Killer
NKG2A	Receptor Natural Killer Group 2 member A
PBS	Solução Salina Tamponada de Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PLT	Plaquetas
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

RBC	Contagem Total de Eritrócitos
RDW	Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos
sHLA-G	HLA-G solúvel
SNV	Variante de Nucleotídeo Único
T	Timina
TALE	Termo de Assentimento Livre Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TLR-2	Receptor do Tipo Toll 2
TLR-4	Receptor do Tipo Toll 4
UTR	<i>Untranslated Region</i> , Região não traduzida
Val	Valina
VCM	Volume Corpuscular Média
VPM	Volume Médio Plaquetário
WBC	Contagem Total de Leucócitos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1. Anemia Falciforme (AF).....	18
2.2. Epidemiologia da doença.....	18
2.3. Fisiopatologia da Anemia Falciforme	19
2.4. Imunopatologia da Anemia Falciforme	20
2.5. Antígeno Leucocitário Humano (HLA)	21
2.6. Genética do HLA	21
2.7. Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G).....	23
2.8. Variantes Genéticas	25
2.9. Variantes do HLA-G do estudo	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo Geral.....	28
3.2. Objetivos Específicos	28
4. METODOLOGIA	29
4.1. Tipo de estudo	29
4.2. Amostragem	29
4.3. Aspectos Éticos	29
4.4. Critérios de Elegibilidade.....	29
4.4.1. Critérios de inclusão	29
4.4.2. Não-inclusão	30
4.4.3. Exclusão	30
4.5. Coleta e armazenamento do material biológico	30
4.6. Contagem dos Índices Hematimétricos – Hemograma	31
4.7. Extração de DNA por kit de extração de DNA <i>PureLink</i>	31
4.8. Detecção das variantes por PCR em Tempo Real (qPCR)	31
4.9. Quantificação e análise da molécula sHLA-G por ELISA.....	32
4.10. Análise de dados	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Dados sociodemográficos de pacientes e controle saudáveis.....	34
5.2. Características laboratoriais dos pacientes com AF	35
5.3. Frequências alélicas e genótípicas de pacientes e controles	36
5.4. Associação das variantes genéticas entre os grupos caso e controle	39
5.5. Concentração de HLA-G solúvel nos pacientes e nos controles	42

5.6. Distribuição das concentrações de sHLA-G por genótipo	45
5.7. Correlação entre as variáveis hematológicas e o sHLA-G	45
6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	47
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	49
9. EQUIPE DE PESQUISA	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	58
Anexo 1: Parecer Do Comitê De Ética	58
Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	59
Anexo 3: Termo de Assentimento Livre Esclarecido.....	63
Anexo 4: Questionário sociodemográfico e clínico	67
Anexo 5: Protocolo de Extração de DNA Kit: <i>Pure Link Genomic DNA Mini Kit</i>	69
Anexo 6: Protocolo de PCR.....	70
Anexo 7 – Componentes do Mix de Reagentes	72
Anexo 8 – Esquema de Identificação da Placa de 96 Poços	73
Anexo 9: Protocolo de ELISA.....	75

1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é a doença hemolítica de caráter hereditário mais comum no mundo, acometendo principalmente pessoas de descendência africana. A doença é caracterizada por uma mutação pontual da troca de adenina pela timina ($GAG \rightarrow GTG$) no sexto códon do gene da β -globina, que resulta na substituição do ácido glutâmico pela valina. A hemoglobina anormal resultante (HbS) é responsável por alterações nos eritrócitos que culminam na obstrução da microcirculação, isquemia, necrose tecidual e disfunção orgânica (Cordero *et al.*, 2009a).

Na África subsaariana, foi estimado aproximadamente 230 mil nascimentos de pessoas com anemia falciforme, em 2010. Sua incidência nos demais países pode variar dependendo da raça, etnia e localidade (Kato *et al.*, 2018a). No Brasil, entre 2014 e 2020, a média anual de novos casos de crianças diagnosticadas com Doença Falciforme no Programa Nacional de Triagem Neonatal foi de 1.087, em uma incidência de 3,78 a cada 10 mil nascidos vivos. Estima-se que, atualmente, há entre 60 mil e 100 mil pacientes com Doença Falciforme no País (Frasão, 2022). Na população amazônica, no ano de 2019, foram registrados 236 indivíduos com doença falciforme, em que 89,7% correspondem a forma homozigota (HbSS) da doença (Cesar *et al.*, 2019a).

A AF é a forma homozigota da doença, e possui o pior prognóstico clínico, quando observado entre as variantes genéticas. Esta condição pode ser categorizada clinicamente em dois perfis: O estado estacionário e a crise vaso-oclusiva. A vaso-oclusão inicia na polimerização da hemoglobina S. Essa polimerização altera a forma e propriedades físicas das hemácias, resultando em anemia hemolítica, obstrução de vasos sanguíneos e menor tempo de vida das hemácias circulantes. Esses eventos contribuem para o processo de ativação das células imunológicas devido ao maior grau de lesão tecidual, bem como do heme livre no plasma, advindo da hemólise, culminando em um perfil inflamatório crônico, com episódios agudos (Kato *et al.*, 2018a).

Essas complicações são as principais razões de internações de emergência desses indivíduos (Cela, 2008a). Pessoas com anemia falciforme sofrem frequentemente de episódios súbitos e intensos de dor, que variam em gravidade e impactam profundamente sua qualidade de vida, exigindo cuidados médicos constantes. A crise vaso-oclusiva é a manifestação mais comum dessa doença, caracterizada por sintomas como febre, leucocitose, derrame articular, fraqueza e susceptibilidade a infecções, que podem agravar a condição do paciente. Aqueles

em um período de calmaria entre as crises são considerados em estado estacionário, considerado um estado assintomático, um momento de estabilidade temporária, apesar da persistência crônica da doença (Akinola *et al.*, 1992; Musa *et al.*, 2010a)

O HLA-G é uma molécula sintetizada principalmente por leucócitos, que pode estar na membrana, ou na forma solúvel, no plasma. Essa molécula exerce funções tolerogênicas, com capacidade de regular a imunidade inata e adaptativa. Anteriormente, estudos demonstraram sua associação a funções imunorregulatórias, com um foco particular em seu envolvimento na anemia falciforme que demonstraram que polimorfismos de HLA-G estão associados em pacientes com anemia falciforme. A presença de inflamação crônica pode ser atribuída à expressão do HLA-G nos locais de inflamação, dada sua conhecida associação com condições inflamatórias (Cordero *et al.*, 2009b).

A principal função do HLA-G é modular a resposta inflamatória e em sua forma solúvel pode ser secretada por células T CD4+, que exerce efeitos que incluem a inibição da proliferação de linfócitos T CD4+ e linfócitos B, além da indução à apoptose em linfócitos T CD8+ e células NK (Contini *et al.*, 2003; Le Friec *et al.*, 2004; Lila *et al.*, 2001a; Naji *et al.*, 2014a; Rebmann *et al.*, 2003a). As variantes genéticas do *HLA-G*: *rs1049033*, *rs9380142* e *rs1710* foram avaliadas em doenças inflamatórias e crônicas mostrando que pode haver uma influência no risco de desenvolvimento de doenças infecciosas ou agravamento de doenças crônicas (Chyad *et al.*, 2023)

A análise de variantes genéticas, como a *rs1049033*, *rs9380142* e *rs1710*, dentro de uma coorte de pacientes com anemia falciforme no Amazonas, é crucial para compreender o impacto dessas variantes na manifestação clínica e na severidade da doença. Isso é particularmente importante em uma população com diversidade genética e fatores ambientais distintos. Estudar essas variantes pode revelar ligações importantes com complicações clínicas, incluindo crises vaso-oclusivas e suscetibilidade a infecções, que são comuns e desafiam a saúde na região. Além disso, identificar e caracterizar essas variantes é vital para desenvolver tratamentos personalizados, melhorando o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes com este transtorno genético grave. No entanto, estudos que investigam o papel das variantes e do componente solúvel do HLA-G na resposta imunológica desses pacientes, ainda são escassos. Desta forma, este trabalho foi crucial para avaliar o perfil de moléculas solúveis do HLA-G e estudar as variantes na região codificadora do gene HLA-G, a fim de compreender sua influência nos pacientes com anemia falciforme.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Anemia Falciforme (AF)

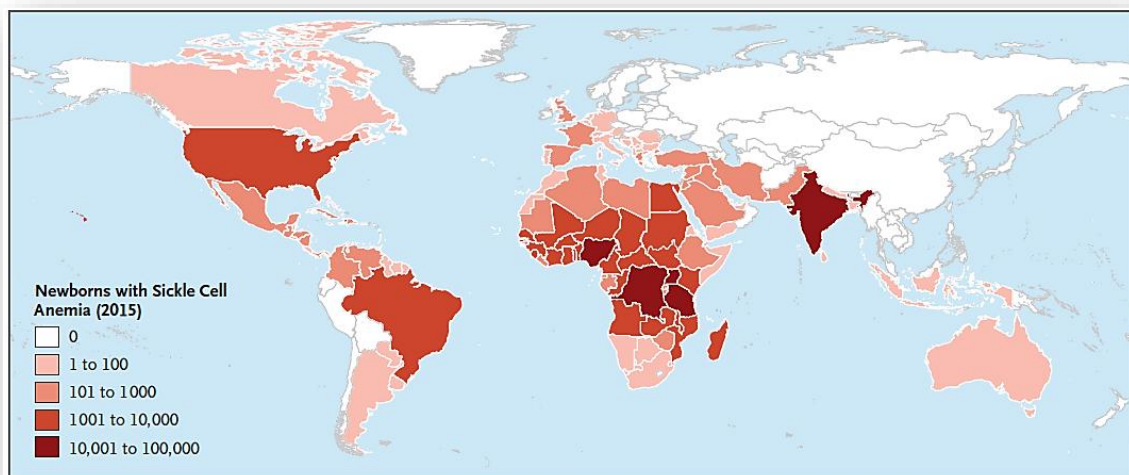
O termo Doença Falciforme constitui-se de um grupo de doenças que compõe: Traço Falciforme (HbAS), Anemia Falciforme (HbSS), HbSC, HbSD, HbSE, HbS α -talassemia e HbS β -talassemia, que são caracterizadas pela mutação no gene da β -globina (Kato *et al.*, 2018b). Em 1949, foi atribuído à doença, a presença de uma hemoglobina anormal, denominada de hemoglobina S (HbS). Foi descoberto, posteriormente, que a HbS é causada pela substituição de um ácido glutâmico pela valina, na posição 6 da cadeia β -globina, devido à substituição de uma base nitrogenada no códon 6 (A>T) (Pauling *et al.*, 1949; Williams; Thein, 2018a).

A anemia falciforme é uma doença hereditária de caráter molecular e homozigoto para a hemoglobina S (SS), em que os eritrócitos podem sofrer alterações reversíveis quando a eles é aplicada uma pressão parcial de oxigênio. A valina produzida decorrente da mutação, em condições de desoxigenação interage com outros aminoácidos para formar polímeros de hemoglobina e permitem ao eritrócito assumir a forma de foice, denominado como falcização (Kato *et al.*, 2018b; Pauling *et al.*, 1949).

2.2. Epidemiologia da doença

A anemia falciforme é a doença hemolítica de caráter recessivo mais comum do mundo, que apresenta estimativas de 300 mil crianças com anemia falciforme. Piel *et al.* (2017) apresentou em seu artigo, uma representação geográfica de nascimentos com anemia falciforme no ano de 2015 (**Figura 1**) (Piel *et al.*, 2017a).

Figura 1: Número de recém-nascidos com anemia falciforme em cada país em 2015. Os dados são baseados em estimativas de Piel *et al.* (2017). O Alasca é mostrado separadamente do resto dos Estados Unidos.
Fonte: (Piel *et al.*, 2017a).



As pessoas com característica heterozigótica da doença possuem maior resistência às formas graves da malária, dessa forma, sua incidência em ambientes altamente endêmicos do parasita foi relacionada à origem da anemia falciforme (Williams; Thein, 2018b). A estimativa da incidência de nascimentos com anemia falciforme na África Subsaariana foi de aproximadamente 230 mil em 2010, representando cerca de 75% dos nascimentos com AF em escala global (Piel *et al.*, 2013). Por muito tempo essa doença foi atribuída ao continente africano, sendo a hipótese mais aceita da mutação com o intuito de proteção contra a malária que é uma doença prevalente da região africana. Todavia, após as grandes navegações e o período da escravidão, o gene mutado da doença falciforme foi globalmente difundido e se encontra presente em muitos continentes (Kato *et al.*, 2018b).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, aproximadamente 4% da população possui o traço falciforme, enquanto a presença da doença homozigótica é estimada entre 60 e 100 mil pessoas (Brasil, 2018; Silva-Pinto *et al.*, 2022). Em 2005, a prevalência média de indivíduos heterozigotos para a mutação era de 2%, mas esse percentual aumentava para 6–10% entre pessoas de descendência africana. Esse cenário resulta em uma estimativa de 700–1.000 novos casos anuais de anemia falciforme no Brasil (Diniz; Guedes; Trivelino, 2003). No estado do Amazonas, a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) é a única instituição responsável pelo atendimento de pacientes com DF. Em 2019, segundo Purim *et al* (2019), foram registrados 236 pacientes que recebem atendimento para casos de DF na Fundação HEMOAM, em que 89,7% correspondem a pacientes com o caráter homozigótico (SS) da doença falciforme (Cesar *et al.*, 2019a).

2.3. Fisiopatologia da Anemia Falciforme

A mutação pontual do gene da β -globina leva a produção de hemoglobina S anormal, e isso resulta na polimerização da hemoglobina em condições de desoxigenação, consequentemente a hemácia assume a forma de foice. Esses ciclos de mudança de forma dos eritrócitos danificam a sua membrana levando a hemólise (Cela, 2008b; Piel *et al.*, 2017b; Zago; Pinto, 2007).

Demonstrou-se que a hemólise que causa, comumente, a anemia, pode causar disfunção no endotélio, lesão crônica nos vasos sanguíneos, advindas da liberação de hemoglobina plasmática livre e arginase 1, que coletivamente podem diminuir a biodisponibilidade de Óxido Nítrico (NO) e aumentam a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) (Gladwin; Ofori-Acquah, 2014a). Além disso, a hemólise pode induzir a liberação de armadilhas extracelulares

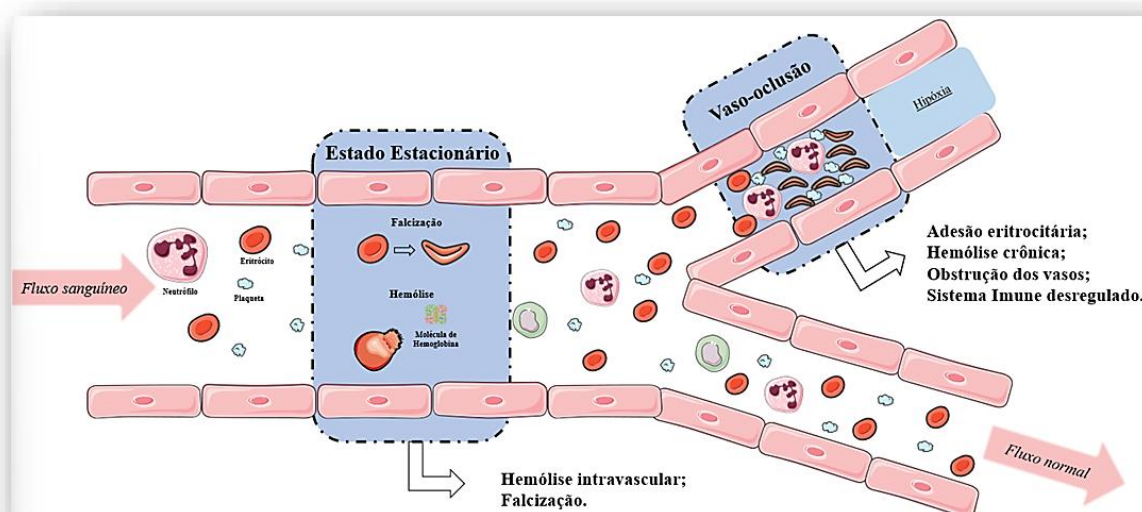
de neutrófilos (NETs), aumentando também a formação de ROS intracelular de neutrófilos (Gladwin; Ofori-Acquah, 2014a; Kato *et al.*, 2018a).

Os repetidos ciclos de falcização afetam a permeabilidade celular, o que consequentemente encurta a vida útil das hemácias, causando assim hemólise e anemia crônica, sendo este processo de falcização reversível com a oxigenação dos eritrócitos, todavia, com o aumento desse ciclo, ele chega a se cristalizar e a falcização se torna irreversível (De Sonati; Costa, 2008).

E esses eritrócitos falcizados decorrentes da polimerização da HbS podem se aderir ao endotélio e também estimular o recrutamento de leucócitos, plaquetas e outros eritrócitos que consequentemente podem causar eventos vaso-oclusivos em tecidos essenciais e causar infartos. Esses eventos em órgãos vitais como o pulmão pode causar uma síndrome torácica aguda e embolia pulmonar (Gladwin; Vichinsky, 2009). Diferentemente do estado estacionário que é caracterizado por baixo grau de hemólise e falcização (**Figura 2**).

Figura 2: Fisiopatologia da Anemia Falciforme.

Fonte: Adaptado de MORIKIS *et al.*, 2021; KATO *et al.*, 2018.



2.4. Imunopatologia da Anemia Falciforme

Durante as crises vaso-oclusivas, a hemólise intravascular estimula uma inflamação estéril, sendo o heme liberado reconhecido principalmente pelas vias de ativação de receptores do tipo *Toll* 4 (TLR4), ativando assim a imunidade inata e causando uma inflamação sistêmica na ausência de um patógeno (Gladwin; Ofori-Acquah, 2014a). A anemia falciforme é caracterizada por um estado pró-inflamatório crônico, apresentando uma contagem de

leucócitos aumentada, suscetibilidade a infecções recorrentes, subseqüentes complicações de eventos vaso-oclusivos, como a adesão de leucócitos ao endotélio, e aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-8, que contribuem assim para esse perfil intenso de inflamação da doença (Chies; Nardi, 2001a).

A liberação de componentes intracelulares dos eritrócitos como hemoglobina, heme, HMGB1, adenosina decorrentes de hemólise crônica, são reconhecidos como Padrões Moleculares associados ao Dano (DAMPs) e ativam o sistema imune inato e adaptativo. O reconhecimento desses DAMPs pelos receptores TLR-4 e TLR-2 induzem a ativação do inflamassoma NLRP3 em monócitos, e conseqüentemente a liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (Gladwin; Ofori-Acquah, 2014; Mendonça; Silveira; Conran, 2016a).

A expressão de TLR-4 em plaquetas pode ser atribuída na inflamação, pois promovem a adesão de neutrófilos, que liberam o DNA para formar as NETs. Com isso, outros leucócitos no meio circulante podem aderir uns aos outros e ao endotélio ativado, contribuindo assim para eventos vaso-oclusivos (Gladwin; Ofori-Acquah, 2014; Kato *et al.*, 2018a; Mendonça; Silveira; Conran, 2016a). A contagem elevada de leucócitos nesses pacientes, vem principalmente pelo aumento de neutrófilos circulantes, todavia, a maioria apresenta-se com aspectos disfuncionais, devido ao prejuízo no processo de migração e quimiotaxia (Humbert *et al.*, 1990a; Okpala, 1998). Logo, podemos observar que existe uma desregulação em diversos aspectos do sistema imunológicos desses pacientes.

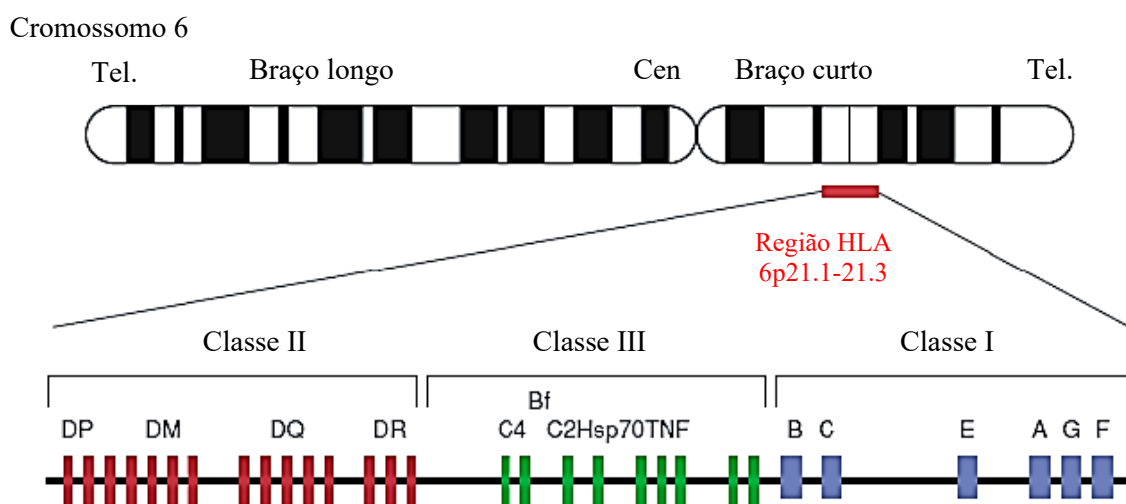
2.5. Antígeno Leucocitário Humano (HLA)

O Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano foi identificado durante uma investigação de antígenos em linhagens isogênicas de camundongos. Foram identificadas proteínas presentes em células apresentadoras de antígenos que são denominadas Antígeno Leucocitário Humano (HLA, do inglês, *Human Leukocyte Antigens*), responsáveis pelo reconhecimento de antígenos peptídicos. Essas proteínas são componentes importantes do sistema imunológico, desempenhando papéis como a apresentação antigênica aos linfócitos T, instruindo assim as respostas imunes adaptativas (Karnaukhov *et al.*, 2022). Além disso, são categorizadas em moléculas de classe I, classe II e classe III com funções distintas descritas abaixo.

2.6. Genética do HLA

O *locus* do HLA humano (**Figura 3**) abriga três tipos de genes de HLA: os genes de HLA de classe I, classe II e classe III, responsáveis pela codificação de diferentes grupos de proteínas homólogas. Essas proteínas de HLA polimórficas têm a função de apresentar antígenos peptídicos para o reconhecimento pelas células T CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente. (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019).

Figura 3: Mapa esquemático do locus do complexo principal de histocompatibilidade humano (HLA).
Fonte: (Berlingiero *et al.*, 2009).



Tel.: Telômero; Cen: Centrômero

A classe I inclui genes clássicos (*HLA-A*, *-B* e *-C*) e não clássicos (*HLA-E*, *-F* e *-G*), além de pseudogenes. Os genes clássicos codificam proteínas expressas na superfície de células nucleadas, apresentando peptídeos endógenos aos linfócitos T CD8⁺. Na classe II inclui genes familiares como *HLA-DR*, *-DQ* e *-DP*. O gene *HLA-DR* inclui *DRA* e *DRB* (*DRB1* a *DRB9*), onde *DRB1*, 3, 4 e 5 codificam cadeias β-poli-peptídicas. Outros genes como *DPA1*, *DQA1*, *DPB1* e *DQB1* codificam cadeias α e β. Há também genes não clássicos como *DM* e *FAZ*. Os produtos desses genes são expressos na superfície de linfócitos B, células apresentadoras de antígenos e linfócitos T ativados, apresentando aos Linfócitos T CD4⁺ naive (Caramalho *et al.*, 2023; Goulder; Walker, 2012; Santamaria *et al.*, 1993; Shih *et al.*, 2024). Os genes de MHC de classes I e II destacam-se como os genes mais polimórficos em qualquer genoma de mamífero (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019).

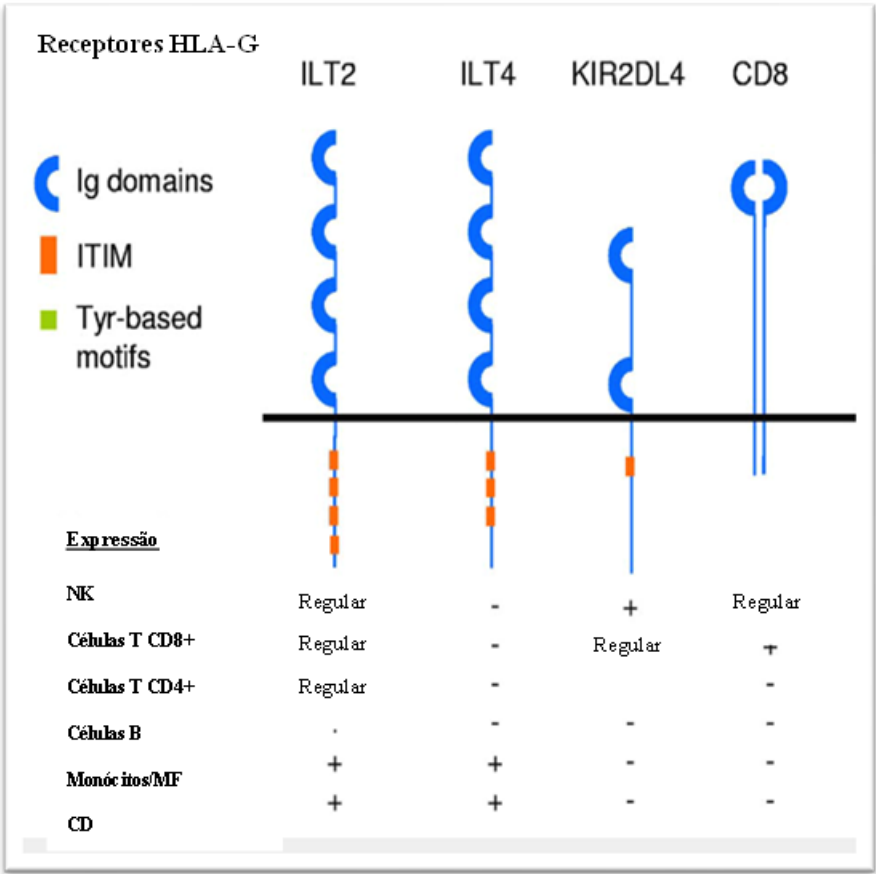
O HLA de Classe III, não sendo tão estudado quanto as outras regiões, é também chamada de região gama do HLA, é uma área não codificadora entre as Classes I e II. Contém genes do sistema complemento (C2, C4a, C4b, Bf), da 21-Hidroxilase, citocinas inflamatórias

(incluindo membros da família TNF) e proteínas de choque térmico (Dendrou *et al.*, 2018; Lehmann *et al.*, 2001).

2.7. Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G)

O HLA-G é uma molécula não clássica, pertencente a classe I não clássico (Ib), e é essencial para a tolerância imunológica, diferindo das outras moléculas HLA de classe I que ativam a resposta imune. O HLA-G pode inibir todas as células do sistema imunológico como as células T CD4+ e T CD8+ por ligação direta a receptores celulares, via interação HLA-G-ILT2. Essa molécula interage também com células NK, linfócitos T, células dendríticas e macrófagos, com os receptores presentes (**Figura 4**). O papel de tolerância imunológica foi inicialmente observado em tecidos trofoblásticos, na gravidez, onde a formação e proteção da placenta são fundamentais para o desenvolvimento do feto sem a influência do sistema imune da gestante (Carosella; Dausset; Rouas-Freiss, 1999a; Dias *et al.*, 2015a; Gomes *et al.*, 2020).

Figura 4: Receptores que interagem com o HLA-G e sua expressão em células do sistema imunológicos. Fonte: (Carosella *et al.*, 2008).

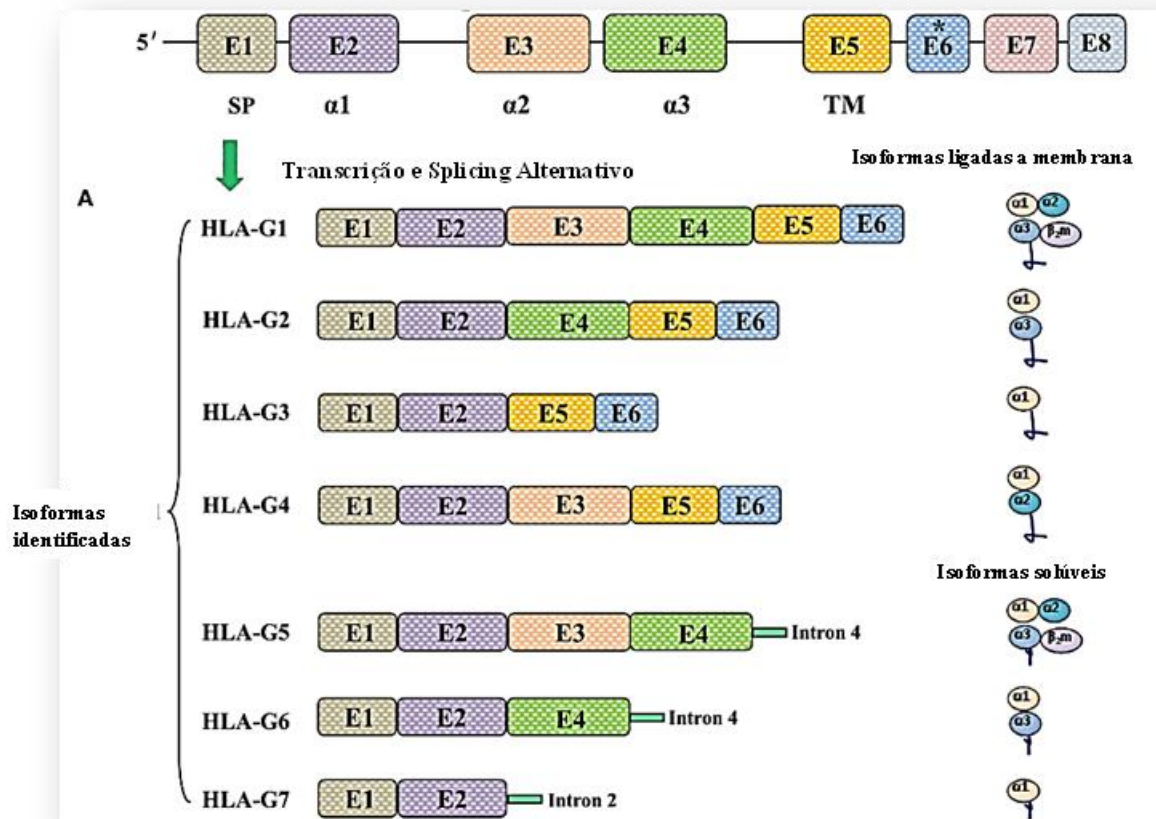


DC: Célula Dendrítica; NK: Células Natural Killers; MF: Macrófagos; ILT: Transcrito semelhante a imunoglobulina; CD: Diferenciação de Cluster;

Essa molécula tem presença restrita a alguns tecidos conhecidos como imunoprivilegiados, como no tecido trofoblástico extraembrionário, que invade a decídua materna durante a implantação do embrião. Além de ser expresso em trofoblastos, o HLA-G também é detectado em tecidos imunoprivilegiados de adultos, como o timo (Lefebvre *et al.*, 2000), córnea (Le Discorde *et al.*, 2003) e precursores eritroides e endoteliais (Menier *et al.*, 2004). A forma solúvel da molécula HLA-G pode ser identificada no soro/plasma, sendo produzida principalmente por monócitos (Rebmann *et al.*, 2003b). A expressão não fisiológica do HLA-G pode ocorrer em contextos de doenças inflamatórias, virais, cânceres e transplantes (Curigliano *et al.*, 2013; González *et al.*, 2012a).

Em seu gene, apresenta oito éxons (E) e sete íntrons, sendo o exón 2, 3 e 4 responsáveis pela produção de domínios alfa ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) que compõem a estrutura principal da proteína. Após a transcrição e splicing alternativo são descritas sete isoformas ligadas a membrana: HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 e HLA-G4 (**Figura 5**) (Lin; Yan, 2018a). A existência de um códon de parada no sexto códon (E6, Figura 5) do gene leva à exclusão dos éxons 7 e 8, originando um processo único que resulta na produção das proteínas solúveis HLA-G5, HLA-G6 e HLA-G7 (Carosella; Dausset; Rouas-Freiss, 1999a).

Figura 5: Diversas isoformas de HLA-G são geradas por splicing alternativo do mRNA de HLA-G.
Fonte: (Lin; Yan, 2018a).



E: Éxon; TM: Porção Transmembranar; *: *Stop códon*; SP: *Splicing*

2.8. Variantes Genéticas

Desde o sequenciamento do genoma humano, a próxima etapa de estudos genéticos é a avaliação de variações genéticas, sua caracterização e influência no fenótipo humano. Até o ano de 2021, mais de 200 mil variantes foram caracterizadas e identificadas e estão registradas com fidelidade na plataforma de estudos de associação genômica ampla (GWAS), todavia, a maioria das variantes ainda precisam ser elucidadas (Lappalainen; Macarthur, 2021). As variantes genéticas são definidas como alterações ou modificações nas sequências de nucleotídeos do DNA, representam uma fonte significativa de diversidade que pode ser observada entre indivíduos dentro de uma determinada população, e sua presença é fundamentalmente essencial para a manutenção e evolução da diversidade genética entre as espécies. Essas variações podem se manifestar por uma infinidade de mecanismos, desde alterações sutis envolvendo um único nucleotídeo (SNVs), até mudanças mais extensas que podem afetar segmentos maiores da molécula de DNA ou envolver flutuações na frequência de sequências repetitivas específicas localizadas em regiões genômicas distintas que são características de organismos específicos (Strachan; Read, 2010).

O gene *HLA-G* exibe baixo grau de polimorfismos, em comparação com as outras regiões HLA, a níveis de transição de aminoácidos e a variabilidade de troca de nucleotídeos sendo ligeiramente maior (Arnaiz-Villena *et al.*, 2021; Ven *et al.*, 1998). Com base no catálogo GWAS foi encontrado 161 variantes genéticas e 223 associações com doenças em 107 estudos. A análise das variantes da região 3' não traduzida (3'UTR) associadas ao gene *HLA-G*, incluindo polimorfismos de nucleotídeo único, como *rs1049033*, *rs9380142* e *rs1710*, no contexto de pacientes diagnosticados com anemia falciforme possuem o potencial de influenciar significativamente os níveis de expressão e os mecanismos regulatórios do *HLA-G*, sendo reconhecida como uma biomolécula essencial que desempenha um papel crítico na modulação da resposta imune (Nadda *et al.*, 2024).

Dentro da população específica de pacientes com anemia falciforme, o sistema imunológico frequentemente enfrenta desafios distintos e formidáveis que surgem como consequência de processos inflamatórios crônicos e episódios intermitentes caracterizados por crises vaso-oclusivas. A molécula *HLA-G* é fundamental para sustentar a tolerância imune, e alterações em suas variantes 3'UTR podem levar a modificações na estabilidade do mRNA, o que, por sua vez, pode ter implicações profundas nos níveis de expressão de proteínas que são

finalmente produzidas. Essas variações podem exercer influências diretas nos mecanismos imunoregulatórios que operam em indivíduos que sofrem de anemia falciforme, potencialmente impactando não apenas a gravidade da doença em si, mas também a frequência de episódios vaso-oclusivos dolorosos e a eficácia geral das intervenções terapêuticas empregadas nesses pacientes (Sundd; Gladwin; Novelli, 2019; Tozatto-Maio *et al.*, 2020a).

Consequentemente, a investigação completa dessas variantes genéticas pode fornecer informações valiosas sobre os mecanismos moleculares que sustentam a patologia da anemia falciforme, o que poderia posteriormente facilitar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras e personalizadas. Com isso, foi selecionado criteriosamente as variantes de nucleotídeo único mais prevalentes que foram identificadas em estudos anteriores focados nas de respostas inflamatórias e estados de doença crônica (Larsen *et al.*, 2010).

2.9. Variantes do HLA-G do estudo

As variantes genéticas deste estudo estão representadas na **Tabela 1**. A variante genética *rs1049033* [+2018 C > T] é encontrada na região do éxon 8 do gene *HLA-G*. A presença do alelo T apresentou uma fraca associação para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular na população japonesa (Okumura *et al.*, 2023a). Além disso, outro estudo observou a relação desse SNV com o vitiligo não segmentar na população coreana (Jeong, 2017).

A variante *rs9380142* [+3187 A > G] está situada na região 3'UTR (Chu *et al.*, 2023) que é conhecida por conter elementos regulatórios que podem influenciar a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) e sua tradução em proteína, e a variante *rs9380142*, pode afetar a estabilidade do mRNA do HLA-G ou sua interação com fatores de regulação, influenciando assim a quantidade de proteína HLA-G produzida pela célula (Gan *et al.*, 2022). A presença do alelo G foi associado ao elevado risco para o desenvolvimento de malária na população africana (Garcia *et al.*, 2013), bem como associação dessa variante com a doença falciforme (Tozatto-Maio *et al.*, 2020b) e câncer de próstata (Zambra *et al.*, 2016a).

A variante *rs1710* [+3010 G > C] que está situada na região 3'UTR do gene, estudos observaram que esse o polimorfismo desencadeia o splicing alternativo com a presença do alelo C (Castelli *et al.*, 2023a). Além de mostrar associação na presença do alelo G no *rs1710* ao declínio nos níveis de antígeno do Vírus da hepatite B em pacientes com Hepatite B crônica (Chu *et al.*, 2023). Outro estudo também mostrou a associação dessa variante com a artrite reumatoide e hipotireoidismo (Liu *et al.*, 2024).

Tabela 1: Variantes do HLA-G
SNVs: Variantes de Nucleotídeo Único; G: Guanina; C: Citosina; A: Adenina; T: Timina;

Gene	SNV (rs)	Posição	Alelos (1 > 2)	Associação com doenças e Ref.
HLA-G	<i>rs1049033</i>	+2018	C > T	Hepatite B (Okumura <i>et al.</i> , 2023a), vitiligo não tegumentar (Jeong, 2017)
	<i>rs9380142</i>	+3187	A > G	Doença falciforme (Tozatto-Maio <i>et al.</i> , 2020b) e Câncer de próstata (Zambra <i>et al.</i> , 2016a)
	<i>rs1710</i>	+3010	G > C	Hipotireoidismo e Artrite Reumatoide (Liu <i>et al.</i> , 2024) e para o tratamento de Câncer colorretal (Scarabel <i>et al.</i> , 2020a)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar o impacto das SNVs no gene HLA-G e sua correlação com a expressão da porção solúvel em pacientes com anemia falciforme e doadores de sangue saudáveis.

3.2. Objetivos Específicos

- Descrever o perfil sociodemográfico, clínico e hematológicos dos pacientes com Anemia Falciforme
- Estimar a frequência alélica e genotípica das variantes *rs1049033*, *rs9380142* e *rs1710* do gene HLA-G em pacientes com anemia falciforme e o grupo saudável;
- Identificar possíveis associações com a presença das variantes do gene *HLA-G* em pacientes com anemia falciforme em crise vaso-oclusiva e estado estacionário;
- Realizar a quantificação de HLA-G solúvel em pacientes em estado estacionário e crise vaso-oclusiva com anemia falciforme;
- Associar o perfil de HLA-G solúvel com o perfil clínico com os pacientes com Anemia Falciforme;
- Analisar a possibilidade das variantes e concentração solúvel do HLA-G como um biomarcador de progressão clínica em pacientes com anemia falciforme.

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de estudo

Este é um estudo caso-controle e descritivo, com coleta de amostras de pacientes diagnosticados com anemia falciforme, em crise vaso-oclusiva e em estado estacionário. Foram coletados também doadores de sangue saudáveis para comparação do perfil de HLA-G solúvel

4.2. Amostragem

A população de estudo foi coletada por demanda espontânea de pacientes com diagnóstico de anemia falciforme, homozigotos para alelo S, atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM. Sendo posteriormente segregados em pacientes em estado estacionário, aqueles que se apresentaram a consulta ambulatorial de rotina, e pacientes em crise vaso-oclusiva que se encontravam principalmente em internações emergenciais. O grupo de doadores saudáveis foi recrutado por demanda espontânea no bloco de doação de sangue realizado na Fundação HEMOAM.

4.3. Aspectos Éticos

Este projeto faz parte de um projeto maior intitulado: “Avaliação da Resposta Imunológica pós Esquema de Imunização contra COVID-19 em Pacientes com Doença Falciforme” que foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). Sendo o seguinte número de parecer: 5.414.049, coordenado pela Dra. Adriana Malheiro Alle Marie (**Anexo 1**).

4.4. Critérios de Elegibilidade

4.4.1. Critérios de inclusão

Neste estudo foram incluídos pacientes com o diagnóstico de anemia falciforme, maiores de 12 anos de idade, que aceitem participar do projeto através da assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE, **Anexo 2**) e/ou Termo de Assentimento Livre Esclarecido (TALE, **Anexo 3**), para inclusão no grupo de pacientes em estado estacionário, que precisam estar a no mínimo 3 meses sem crises de dores, ou transfusões. E aos pacientes em crise vaso-oclusiva, que estejam dentro do período de três meses, com ocorrências de crises ou internações.

Ao grupo saudável, foram incluídos candidatos aptos à doação de sangue, com sorologia negativa para HIV, HTLV, HCV, HBV, Sífilis e Doença de Chagas, e considerados aptos à doação, e, que aceitem participar do projeto através da assinatura do TCLE.

4.4.2. Não-inclusão

Aos pacientes não foram incluídos pacientes gestantes ou puérperas, heterozigotos (doença falciforme) ou indígenas. Enquanto, aos indivíduos saudáveis não foram incluídos aqueles considerados inaptos na triagem clínica da fundação HEMOAM.

4.4.3. Exclusão

Foram excluídos pacientes e indivíduos saudáveis que não atendiam as especificidades da pesquisa, bem como aqueles com prontuários incompletos.

4.5. Coleta e armazenamento do material biológico

Os pacientes do estudo foram abordados após o atendimento ambulatorial (estado estacionário) ou internações (crise vaso-oclusiva). E aos doadores de sangue (indivíduos saudáveis) foram abordados durante a doação de sangue na Fundação HEMOAM. O projeto foi explicado aos pacientes, e caso atendessem aos critérios de inclusão, e houvesse consentimento, assinaram o TCLE/TALE. E após a assinatura consentindo participar do estudo, foi aplicado um questionário para coleta de dados sociodemográficos e clínicos (**Anexo 4**). Em seguida foi realizada a coleta de material biológico. Em relação aos doadores saudáveis, foi feito o recrutamento no setor de doação de sangue, juntamente à aplicação do TCLE e questionário para coleta de dados.

O sangue era coletado pelo Laboratório de Análises Clínicas da Fundação HEMOAM, por profissionais treinados, através de punção venosa ou cateter venoso central. E para os pacientes em crise vaso-oclusiva, a coleta foi realizada na internação com os enfermeiros locais. Após a coleta, o material foi armazenado no laboratório multidisciplinar da fundação onde foram separados o plasma e o sangue total para os seguintes procedimentos: As amostras de plasma após a centrifugação (2,500rpm por 10 minutos) foram armazenadas no freezer a -80°C do laboratório multidisciplinar; e o sangue total foi utilizado para confecção dos índices hematimétricos, através do hemograma. O sangue foi utilizado também para a extração de DNA para genotipagem do gene *HLA-G*, enquanto o plasma foi utilizado para quantificação da molécula de HLA-G solúvel. Para o grupo saudável, a abordagem ocorreu durante a doação de

sangue, em que foram coletados do sangue periférico 5 mL em um tubo com EDTA K2 para a execução dos mesmos procedimentos acima citados.

4.6. Contagem dos Índices Hematimétricos – Hemograma

A aquisição das amostras para a contagem hematológica foi realizada pelo sistema ADVIA 2120i, operante no departamento de hematologia da Fundação HEMOAM. Dentre os parâmetros do Hemograma: Contagem de eritrócitos (RBC), Hemoglobina, Hematócrito, Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) e da hemoglobina (HDW), Plaquetas, Volume plaquetário médio (VPM), contagem de leucócitos (WBC), e os valores absolutos (#) de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos foram avaliados.

4.7. Extração de DNA por kit de extração de DNA *PureLink*

Para este procedimento foi empregado o kit de extração de DNA *PureLink* da *Thermofisher Scientific* (**Anexo 5**), reconhecido por sua eficácia no isolamento de DNA a partir de uma ampla gama de amostras biológicas, como células, tecidos, sangue e saliva. Este kit utiliza colunas de sílica para seletivamente ligar o DNA, permitindo a remoção de outras moléculas, como proteínas e lipídios. O processo envolve etapas de lise da amostra biológica para liberar o DNA, seguida pela ligação do DNA às colunas de sílica, enquanto contaminantes são removidos por lavagem. Após a remoção dos contaminantes, o DNA purificado é eluído das colunas em um tampão adequado, resultando em uma preparação altamente purificada e concentrada de DNA, por fim, foi quantificado o DNA genômico utilizando o espectrofotômetro NanoDrop1000. E em seguida armazenado o DNA purificado a -20°C pronta para ser usada.

4.8. Detecção das variantes por PCR em Tempo Real (qPCR)

Foi realizada a técnica de qPCR para a identificação dos SNVs no gene *HLA-G*, utilizando as sondas *TaqMan*® determinadas na Tabela 02. As variantes foram escolhidas com base na sua frequência alélica presentes no banco de dados *Ensembl* e com base na literatura. A genotipagem foi realizada em microplacas de 96 poços com 2,5µL *genotyping Master Mix* (1X), 2,25µL de água ultrapura, 0,25µL de ensaio *TaqMan*® e 2µL de DNA genômico, além disso, para cada reação foi utilizado um controle negativo. Após a preparação da placa, a amplificação ocorreu no termociclador *Step One Plus*TM da *Thermofisher Scientific* e a interpretação dos resultados foi realizada no *software StepOne v2.3*.

Tabela 2: Informações das variantes genéticas incluídas neste estudo.

Gene	SNV (rs)	Localização	MAF	Kit de genotipagem	Sequência (VIC/FAM)
HLA-G	rs9380142 (A/G)	Chr.6:29831017	0.47	C_2437886_10	TCTGTATTAAAATTAGAATCTG AGT[A/G]TAAATTTACTTTT CAAATTATTTT
	rs1049033 (C/T)	Chr.6:29829862	0.41	C_26543931_10	TCCCCATCATGGGTAT CGTTGCTGG[C/T]CTGGTTGTCCTTG CAGCTGTAGTCA
	rs1710 (G/C)	Chr.6: 29830840	0.49	C_176159804_10	ACTTCAAGAACCCTGACTCCTC TTT[G/C]TGCAG AGACCAGCCCCACCCCTGTGC

SNVs: Variantes de Nucleotídeo Único; Chr: Cromossomo; MAF: Frequência de Alelo Menor; T: Timina; A: Adenina; G: Guanina; C: Citosina;

4.9. Quantificação e análise da molécula sHLA-G por ELISA

A quantificação e análise da molécula de HLA-G solúvel foi feita pela técnica imunoenzimática de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) sanduiche no laboratório Multidisciplinar da Fundação HEMOAM, utilizando kits comerciais da ThermoFisher (*Human HLA-G ELISA Kit, Invitrogen*). O protocolo foi seguido com base nas orientações do fabricante (Anexo 5).

4.10. Análise de dados

Após a coleta dos dados clínicos, laboratoriais e genéticos dos pacientes e do grupo controle (doadores saudáveis), as informações foram organizadas e armazenadas inicialmente na plataforma Microsoft Excel, com o objetivo de viabilizar a tabulação e estruturação preliminar do banco de dados. As análises estatísticas foram conduzidas através de diferentes ferramentas computacionais, selecionadas conforme a natureza dos dados e a complexidade das análises requeridas, utilizando-se as plataformas GraphPad Prism (v.10), R (versão 4.5.1 com RStudio v.2025.05.01) e Python (versão 3.0).

O GraphPad Prism foi empregado nas análises descritivas, de normalidade e inferenciais de menor complexidade, incluindo a aplicação de testes não paramétricos (teste de Mann–Whitney para comparação entre dois grupos e Kruskal–Wallis para três grupos), teste de normalidade de Shapiro-Wilk, além da geração de representações gráficas em *box-plots* estratificados por genótipos nos diferentes grupos analisados (pacientes em estado estacionário, em crise vaso-oclusiva e controles). Para as variáveis categóricas, como sexo/gênero, tipo sanguíneo, local de nascimento e manifestações clínicas relacionadas à doença falciforme, foram descritas frequências absolutas (n) e relativas (%). No caso de variáveis contínuas, como idade e parâmetros hematológicos, foram utilizados a mediana e o intervalo interquartil (IIQ) como medidas de tendência central e dispersão.

As análises genéticas foram conduzidas no ambiente R, com o uso dos pacotes *genetics* (Warnes, 2021) e *SNPassoc*. O pacote *genetics* foi utilizado para a manipulação de genótipos, cálculo das frequências alélicas e genotípicas e avaliação do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esse pacote oferece estrutura para representação de dados genéticos em classes específicas, incluindo genótipos e haplótipos em marcadores únicos ou múltiplos. Para a avaliação de modelos de herança genética (codominante, dominante, recessivo e overdominante), foi utilizado o pacote *SNPassoc*, com base na função (*association*).

O Python foi empregado para a manipulação avançada dos dados e execução de correlações envolvendo citocinas, variáveis hematológicas e genótipos, utilizando as bibliotecas *pandas*, *scipy* e *seaborn*. O coeficiente de correlação de Spearman foi adotado para medir a associação entre variáveis contínuas, e os resultados foram visualizados por *heatmaps* em formato triangular, com destaque para as correlações estatisticamente significativas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Dados sociodemográficos de pacientes e controle saudáveis

O estudo incluiu 85 pacientes com anemia falciforme (AF), dos quais 44 estavam em estado estacionário (EE) e 41 em crise vaso-oclusiva (CVO), além de um grupo controle composto por 80 indivíduos saudáveis (CT). A mediana de idade foi de 23 anos no grupo EE (IQR: 15,5–40), 22 anos no grupo CVO (IQR: 17–36,5) e 29,5 anos entre os controles (IQR: 22–37). Observou-se predomínio do sexo feminino entre os pacientes (59,1% em EE e 65,9% em CVO), enquanto no grupo controle predominou o sexo masculino (67,5%). A maioria dos pacientes se autodeclararam pardos (86,4% em EE e 78% em CVO), seguidos por pretos, brancos e um caso amarelo no grupo CVO. Quanto à procedência, a maioria residia em Manaus (77,3% no EE e 90,2% no CVO), com menor proporção proveniente do interior do Amazonas ou de outros estados.

Em relação ao tipo sanguíneo, os mais frequentes entre os pacientes foram O+ (43,2% no EE e 68,3% no CVO) e A+ (22,7% no EE e 12,2% no CVO), com distribuição menor de outros tipos. Quase todos os pacientes relataram histórico de crises vaso-oclusivas (90,9% em EE e 92,7% em CVO).

Tabela 3: Variáveis sociodemográficas e clínicas dos pacientes com anemia falciforme.

VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES E CONTROLE SAUDÁVEIS			
Variável	EE (n=44)	CVO (n=41)	CT (n=80)
Sociodemográfica – Pacientes e Controles			
Idade, mediana [IQR]	23 [15,5-40]	22 [17-36,5]	29,5 [22-37]
Sexo, n (%)			
Masculino	18 (40,9%)	14 (34,1%)	54 (67,5%)
Feminino	26 (59,1%)	27 (65,9%)	26 (32,5%)
Cor de pele (autodeclarados), n (%)			
Pardo	38 (86,4%)	32 (78%)	-
Branco	3 (6,8%)	3 (7,3%)	-
Preto	3 (6,8%)	5 (12,2%)	-
Amarelo	-	1 (2,4%)	-
Local de residência, n (%)			
Manaus	34 (77,3%)	37 (90,2%)	-
Interior do Amazonas	9 (20,5%)	3 (7,3%)	-
Outro estado	1 (2,3%)	1 (2,4%)	-
Clínica – Pacientes somente			
Tipo sanguíneo, n (%)			

O+	19 (43,2%)	28 (68,3%)	-
O-	2 (4,5%)	2 (4,9%)	-
A+	10 (22,7%)	5 (12,2%)	-
A-	-	2 (4,9%)	-
B+	4 (9,1%)	3 (7,3%)	-
AB+	3 (6,8%)	-	-
Sem informação	6 (13,6%)	1 (2,4%)	-
Crises vaso-oclusivas			
Sim	40 (90,9%)	41 (100%)	-
Não	4 (9,1%)	-	-

Legenda: EE: Estado Estacionário; CVO: Crise vaso-oclusiva; IQR: Intervalo Interquartil.

A Anemia Falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia hereditária caracterizada por inflamação crônica, hemólise e episódios recorrentes de oclusão vascular. Nossos resultados contribuem para ampliar a compreensão dos aspectos clínico-hematológicos e imunogenéticos da doença (Sundd; Gladwin; Novelli, 2019). A distribuição etária e a predominância do sexo feminino entre os pacientes com AF seguem padrões semelhantes a estudos anteriores no Amazonas (Cesar *et al.*, 2019b), e também realizados em outras regiões do Brasil, como em Minas Gerais e Bahia, onde a maioria dos pacientes apresenta idade entre 18 e 30 anos e predomínio feminino em serviços de referência, possivelmente refletindo maior busca por atendimento médico entre mulheres (Sant'Ana *et al.*, 2017).

5.2. Características laboratoriais dos pacientes com AF

As análises hematológicas revelaram diferenças significativas entre os grupos EE e CVO em alguns parâmetros. Pacientes em CVO apresentaram níveis significativamente menores de hemoglobina (8,0 vs. 8,3 g/dL; $p = 0,0352$) e hematócrito (23,8% vs. 25,3%; $p = 0,0074$), além de contagem mais elevada de leucócitos totais ($10,8$ vs. $9,5 \times 10^3/\mu\text{L}$; $p = 0,0448$) e neutrófilos ($5,5$ vs. $4,7 \times 10^3/\mu\text{L}$; $p = 0,0462$). A contagem de plaquetas foi numericamente maior no grupo CVO (393 vs. $326 \times 10^3/\mu\text{L}$; $p = 0,0503$), embora no limiar da significância estatística. Os demais parâmetros hematológicos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Tabela 4: Variáveis hematimétricas dos pacientes com anemia falciforme.

Variável	EE (n=44)	CVO (n=41)	Valor de p
Eritrograma, mediana [IQR]			
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	2,7 [2,1-3,5]	2,4 [2,2-2,6]	0,1016
Hemoglobina (g/dL)	8,3 [7,4-9,8]	8,0 [7,0-8,6]	0,0352*
Hematócrito (%)	25,3 [22,5-30,1]	23,8 [20,8-25,4]	0,0074**

HCM (pg)	31,1 [26,6-35,1]	32,1 [29,6-33,9]	0,7116
VCM (f/L)	94,3 [80,5-106,2]	96,1 [90,3-101,3]	0,8218
CHCM (g/dL)	33,1 [32-33,7]	33,4 [32,3-33,9]	0,4316
RDW (%)	19,7 [18,1-21,6]	20,5 [19-22,4]	0,1829
HDW (g/dL)	3,8 [3,4-4,4]	4,0 [3,3-4,4]	0,6921
Leucograma, mediana [IQR]			
WBC (x10 ³ /μL)	9,5 [6,7-11,2]	10,8 [8,5-13,5]	0,0448*
#Neutrófilo (x10 ³ /μL)	4,7 [2,8-6,2]	5,5 [3,6-7,7]	0,0462*
#Linfócito (x10 ³ /μL)	3,0 [2,5-3,8]	3,2 [2,7-4,2]	0,4016
#Monócito (x10 ³ /μL)	0,68 [0,41-0,95]	0,7 [0,53-0,94]	0,4904
#Eosinófilo (x10 ³ /μL)	0,22 [0,11-0,38]	0,19 [0,095-0,45]	0,5797
#Basófilo (x10 ³ /μL)	0,05 [0,03-0,06]	0,04 [0,02-0,06]	0,4339
Plaquetograma, mediana [IQR]			
Plaquetas (x10 ³ /μL)	326 [217-449]	393 [289-499]	0,0503
VPM (f/L)	8,3 [7,9-8,5]	8,3 [7,8-8,6]	0,8591

EE: Estado Estacionário; CVO: Crise vaso-oclusiva; IQR: Intervalo Interquartil; RBC: Contagem de eritrócitos, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW: Amplitude de distribuição dos eritrócitos HDW: Amplitude de distribuição da hemoglobina; VPM: Volume plaquetário médio; WBC: Contagem de leucócitos; #: Valor absoluto. *: p<0,05. Teste utilizado: Mann-Whitney

Os parâmetros hematológicos observados corroboram o estado inflamatório sistêmico e a anemia crônica característicos da AF. A redução significativa da hemoglobina e do hematócrito durante as crises vaso-oclusivas (CVO) é compatível com aumento da hemólise intravascular e extravascular (Cesar *et al.*, 2019b; Piel *et al.*, 2017c; Rees; Gibson, 2012). O aumento de leucócitos totais e de neutrófilos nos pacientes em CVO destaca a resposta inflamatória aguda e a ativação imune exacerbada, com liberação de citocinas e recrutamento celular para os sítios de oclusão vascular (Amulic; Hayes, 2011; Garcia *et al.*, 2020; Humbert *et al.*, 1990b). Estudos prévios demonstraram que a neutrofilia durante as crises está associada à maior gravidade da doença e risco de eventos trombóticos (Chen *et al.*, 2014; Humbert *et al.*, 1990b). A trombocitose observada de forma elevada também sugere um estado pró-trombótico, corroborando a literatura que aponta a ativação plaquetária como contribuinte para as microtromboses e lesão endotelial em pacientes com AF (Santos, 2010).

5.3. Frequências alélicas e genótípicas de pacientes e controles

A descrição das análises das variantes *rs1049033*, *rs9380142* e *rs1710* do gene *HLA-G* está representada nas tabelas 5 e 6. Para o polimorfismo *rs1049033* (C/T), houve maior frequência do genótipo heterozigoto C/T entre os casos (62%) do que nos controles (39%). O genótipo C/C foi mais frequente nos controles (60%) do que nos casos (38%). Para o *rs9380142* (A/G), o genótipo A/G foi predominante em ambos os grupos (80% nos controles e 83% nos

casos), enquanto o genótipo G/G apareceu apenas em um paciente com AF. Quanto ao *rs1710* (C/G), o genótipo G/C foi o mais frequente, presente em 75% dos controles e 78% dos casos.

Tabela 5: Frequência alélica e genotípica das variantes genéticas do HLA-G

Frequências alélicas e genotípicas das variantes genéticas do <i>HLA-G</i> em pacientes e controles				
<i>rs1049033</i> (C/T)				
	Controle (n=80)		Caso (n=84)	
Alelos	Contagem	Proporção	Contagem	Proporção
C	127	0,79	108	0,69
T	33	0,21	48	0,31
Genótipos	Contagem	Proporção	Contagem	Proporção
C/C	48	0,6	30	0,38
C/T	31	0,39	48	0,62
T/T	1	0,01	0	0
N/A	0	-	6	-
<i>rs9380142</i> (A/G)				
Alelos	Contagem	Proporção	Contagem	Proporção
A	96	0,6	93	0,57
G	64	0,4	69	0,43
Genótipos	Contagem	Proporção	Contagem	Proporção
A/A	16	0,2	13	0,16
A/G	64	0,8	67	0,83
G/G	0	0	1	0,01
N/A	0	-	3	-
<i>rs1710</i> (G/C)				
Alelos	Contagem	Proporção	Contagem	Proporção
G	92	0,57	95	0,57
C	68	0,42	71	0,43
Genótipos	Contagem	Proporção	Contagem	Proporção
C/C	4	0,05	3	0,04
G/C	60	0,75	65	0,78
G/G	16	0,2	15	0,18
N/A	0	-	1	-

N/A: Não amplificado; G: Guanina; C: Citosina; A: Adenina; T: Timina

Na tabela 6 está descrito as frequências alélicas e genotípicas das variantes *rs1049033* (C/T), *rs9380142* (A/G) e *rs1710* (G/C) do gene HLA-G foram analisadas em pacientes com anemia falciforme classificados nos estados clínicos de estado estacionário (EE, n=43) e crise vaso-oclusiva (CVO, n=41). Para o polimorfismo *rs1049033*, observou-se predominância do

alelo C em ambos os grupos (67,1% em EE e 67% em CVO), com ausência do genótipo T/T nos dois estados clínicos. O genótipo heterozigoto C/T foi o mais frequente, representando 51% dos pacientes em EE e 53,7% em CVO. Em relação ao *rs9380142*, o alelo G foi mais prevalente (65% em EE e 59,8% em CVO), com destaque para o genótipo heterozigoto A/G, que foi o mais comum em ambos os grupos (60,5% em EE e 53,7% em CVO). Para o *rs1710*, observou-se uma distribuição semelhante entre os alelos G e C, com discreto predomínio do alelo G em EE (52,4%) e do alelo C em CVO (54,2%). O genótipo heterozigoto G/C foi novamente o mais frequente, representando 52,4% dos indivíduos em EE e 56,1% em CVO. Esses achados indicam perfis genotípicos similares entre os estados clínicos avaliados, com predominância de heterozigose para as três variantes analisadas.

Tabela 6: Frequências alélicas e genotípicas dos pacientes em EE e CVO

Frequências alélicas e genotípicas das variantes genéticas do HLA-G em pacientes em EE e CVO				
<i>rs1049033</i> (C/T)				
	EE (n=43)		CVO (n=41)	
Alelos	Contagem	Proporção	Contagem	Proporção
C	61	0,71	47	0,67
T	25	0,29	23	0,33
Genótipos	Contagem	Proporção	Contagem	Proporção
C/C	18	0,42	12	0,34
C/T	25	0,58	23	0,66
N/A	-	-	6	-
<i>rs9380142</i> (A/G)				
Alelos	Contagem	Proporção	Contagem	Proporção
A	48	0,56	45	0,59
G	38	0,44	31	0,41
Genótipos	Contagem	Proporção	Contagem	Proporção
A/A	5	0,12	8	0,21
A/G	38	0,88	29	0,76
G/G	-	-	1	0,03
N/A	-	-	3	-
<i>rs1710</i> (G/C)				
Alelos	Contagem	Proporção	Contagem	Proporção
G	49	0,57	46	0,57
C	37	0,43	34	0,42
Genótipos	Contagem	Proporção	Contagem	Proporção
C/C	1	0,02	2	0,05
G/C	35	0,81	30	0,75
G/G	7	0,16	8	0,2

N/A	-	-	1	-
-----	---	---	---	---

5.4. Associação das variantes genéticas entre os grupos caso e controle

Na tabela 7, onde apresentamos a análise dos modelos de herança genética as variantes genéticas, temos a variante *rs1049033* (C/T) do gene HLA-G demonstrou associação significativa entre os genótipos e os grupos clínicos caso-controle. No modelo codominante, indivíduos com o genótipo heterozigoto C/T apresentaram razão de chances (OR) de 2,43 (IC 95%: 1,16–5,07; $p = 0,042$) para estarem no grupo caso em comparação aos homozigotos C/C. Resultado semelhante foi observado no modelo dominante, com OR de 2,38 (IC 95%: 1,14–4,97; $p = 0,02$), indicando maior risco para indivíduos portadores de pelo menos um alelo T. O modelo overdominante também revelou associação estatisticamente significativa, com OR de 2,47 (IC 95%: 1,18–5,15; $p = 0,015$), sugerindo que a heterozigose confere maior susceptibilidade clínica em relação aos homozigotos. Na comparação entre os subgrupos clínicos estado estacionário (EE) e crise vaso-oclusiva (CVO), não foram observadas diferenças significativas na distribuição genotípica entre os grupos, com OR de 1,37 (IC 95%: 0,50–3,72; $p = 0,54$) para o genótipo C/T, indicando ausência de associação robusta entre essa variante e o estado clínico no momento da coleta.

Tabela 7: Modelo de herança genética da variante *rs1049033*

rs1049033 associado aos grupos caso e controle ajustado por Idade, Grupos de idade e Gênero						
Modelo	Genótipo	Controle	Caso	OR (95% IC)	Valor de p	AIC
Codominante	C/C	48 (60%)	30 (38,5%)	1,00	0,042	191,3
	C/T	31 (38,8%)	48 (61,5%)	2,43 (1,16-5,07)		
	T/T	1 (1,2%)	-	-		
Dominante	C/C	48 (60%)	30 (38,5%)	1,00	0,02	190,2
	C/T-T/T	32 (40%)	48 (61,5%)	2,38 (1,14-4,97)		
Recessivo	C/C-C/T	79 (98,8%)	78 (100%)	1,00	0,41	195
	T/T	1 (1,2%)	-	-		
Overdominante	C/C-T/T	49 (61,2%)	30 (38,5%)	1,00	0,015	189,7
	C/T	31 (38,8%)	48 (61,5%)	2,47 (1,18-5,15)		
Modelo	Genótipo	EE	CVO	OR (95% IC)	Valor de p	AIC
-	C/C	18 (41,9%)	12 (34,3%)	1,00	0,54	111,4
	C/T	25 (58,1%)	23 (65,7%)	1,37 (0,50-3,72)		

No presente estudo, a variante *rs1049033* (C>T) mostrou associação significativa no modelo overdominante, em que o genótipo C/T elevou a chance de risco ao grupo de casos em ~2,5 vezes (OR=2,47; IC95%: 1,18–5,15), com melhor ajuste em relação aos demais modelos,

quando comparado ao conjunto de homozigotos (C/C + T/T). Em termos biológicos, essa variante pode modular estabilidade do mRNA e sítios de ligação de miRNAs, alterando a expressão de HLA-G e, por consequência, o microambiente imunorregulador (Nadda *et al.*, 2024).

A quantidade de estudos na literatura sobre a variante *rs1049033* é escassa e pouco estudada, somente um estudo já mencionado anteriormente mostrou uma associação fraca da presença do alelo T, porém significativa, com o desenvolvimento de hepatocarcinoma celular (Okumura *et al.*, 2023b). Assim, nossos achados sugerem que o genótipo C/T em *rs1049033* pode configurar marcador genético de risco, possivelmente por mecanismos de regulação pós-transcricional da expressão de HLA-G.

Já na tabela 8, a variante *rs9380142* (A/G) na comparação entre casos e controles, não foram observadas associações estatisticamente significativas em nenhum dos modelos testados. No modelo codominante, indivíduos com o genótipo A/G apresentaram uma razão de chances (OR) de 1,50 (IC 95%: 0,60–3,74; $p = 0,20$), em relação aos homozigotos A/A, enquanto o modelo dominante indicou um OR de 1,54 (IC 95%: 0,62–3,82; $p = 0,35$) para indivíduos portadores do alelo G. O modelo recessivo não pôde ser interpretado devido à baixa frequência do genótipo G/G nos grupos, e o modelo overdominante também não demonstrou associação significativa (OR = 1,31; IC 95%: 0,54–3,21; $p = 0,55$). Na comparação entre os subgrupos clínicos, a distribuição genotípica também não apresentou diferenças significativas. No modelo codominante, o genótipo A/G foi mais frequente em ambos os grupos (88,4% em EE e 76,3% em CVO), porém sem associação estatística com o estado clínico ($p = 0,29$).

O gene HLA-G codifica uma molécula imunorreguladora essencial na tolerância imunológica, cuja expressão pode ser modulada por variantes genéticas em regiões regulatórias, como o 3'UTR. As variantes analisadas neste estudo (*rs1049033*, *rs9380142* e *rs1710*) têm sido associados à estabilidade do RNA mensageiro, regulação pós-transcricional e níveis de HLA-G solúvel (Nückel *et al.*, 2012). A variante *rs1049033* mostrou maior frequência do genótipo heterozigoto (C/T) entre os pacientes. Sugerindo que o alelo variante T pode estar associado ao maior risco aos indivíduos portadores deste alelo (Freitas de Oliveira; Augusto Pianezzer; Maria Silva Afonso, 2021). Estudos como o de Donadi *et al.* (2011) relatam que essas variantes estão associadas a doenças inflamatórias e infecciosas, sendo plausível sua contribuição na modulação imunológica em indivíduos com AF (Castelli *et al.*, 2011, 2023b; Donadi *et al.*, 2011).

Tabela 8: Modelo de herança genética da variante rs9380142

rs9380142 associado aos grupos caso e controle ajustado por Idade, Grupos de idade e Gênero						
Modelo	Genótipo	Controle	Caso	OR (95% IC)	Valor de p	AIC
Codominante	A/A	16 (20%)	13 (16,1%)	1,00	0,2	196,7
	A/G	64 (80%)	67 (82,7%)	1,50 (0,60-3,74)		
	G/G	-	1 (1,2%)	-		
Dominante	A/A	16 (20%)	13 (16,1%)	1,00	0,35	197,1
	A/G-G/G	64 (80%)	68 (84%)	1,54 (0,62-3,82)		
Recessivo	A/A-A/G	80 (100%)	80 (98,8%)	1,00	0,11	195,4
	G/G	-	1 (1,2%)	-		
Overdominante	A/A-G/G	16 (20%)	14 (17,3%)	1,00	0,55	197,6
	A/G	64 (80%)	67 (82,7%)	1,31 (0,54-3,21)		
Modelo	Genótipo	EE	CVO	OR (95% IC)	Valor de p	AIC
Codominante	A/A	5 (11,6%)	8 (21,1%)	1,00	0,29	119,1
	A/G	38 (88,4%)	29 (76,3%)	0,42 (0,11-1,71)		
	G/G	-	1 (2,6%)	-		
Dominante	A/A	5 (11,6%)	8 (21,1%)	1,00	0,25	118,3
	A/G-G/G	38 (88,4%)	30 (79%)	0,45 (0,11-1,81)		
Recessivo	A/A-A/G	43 (100%)	37 (97,4%)	1,00	0,33	118,6
	G/G	-	1 (2,6%)	-		
Overdominante	A/A-G/G	5 (11,6%)	9 (23,7%)	1,00	0,17	117,7
	A/G	38 (88,4%)	29 (76,3%)	0,39 (0,10-1,55)		

Em relação a variante *rs1710* (Tabela 9), no modelo codominante, indivíduos com o genótipo G/C apresentaram um *odds ratio* (OR) de 1,62 (IC 95%: 0,62–4,21; $p=0,28$), enquanto os com o genótipo C/C exibiram OR de 0,41 (IC 95%: 0,05–3,38; $p=0,4$), ambos sem significância estatística. De modo semelhante, nos modelos dominante e recessivo, os valores de p permaneceram acima de 0,05. Na análise específica dos subgrupos clínicos: estado estacionário (EE) e crise vaso-oclusiva (CVO) também não foram detectadas associações relevantes com os genótipos, ainda que o modelo recessivo tenha apresentado um OR elevado de 4,81 (IC 95%: 0,26–89,65; $p=0,26$), sugerindo uma possível tendência que requer maior amostragem para confirmação. Esses achados indicam que, na amostra estudada, o *rs1710* não demonstrou associação significativa com a presença da doença ou seus estados clínicos.

Tabela 9: Modelo de herança genética da variante rs1710

rs1710 associado aos grupos caso e controle ajustado por Idade, Grupos de idade e Gênero						
Modelo	Genótipo	Controle	Caso	OR (95% IC)	Valor de p	AIC
Codominante	G/G	16 (20%)	15 (65%)	1,00	0,28	199,2
	G/C	60 (75%)	65 (78,3%)	1,62 (0,62-4,21)		
	C/C	4 (5%)	3 (3,6%)	0,41 (0,05-3,38)		

Dominante	G/G	16 (20%)	15 (18,1%)	1,00	0,4	199,1
	G/C-C/C	64 (80%)	68 (81,9%)	1,49 (0,58-3,80)		
Recessivo	G/G-G/C	76 (95%)	80 (96,4%)	1,00	0,21	198,2
	C/C	4 (5%)	3 (3,6%)	0,29 (0,04-2,10)		
Overdominante	G/G-C/C	20 (25%)	118 (21,7%)	1,00	0,18	197,9
	G/C	60 (75%)	65 (78,3%)	1,85 (0,75-4,57)		
Modelo	Genótipo	EE	CVO	OR (95% IC)	Valor de p	AIC
Codominante	G/G	7 (16,3%)	8 (20%)	1,00	0,51	124
	G/C	35 (81,4%)	30 (75%)	0,85 (0,26-2,74)		
	C/C	1 (2,3%)	2 (5%)	4,20 (0,20-90,55)		
Dominante	G/G	7 (16,3%)	8 (20%)	1,00	0,86	123,3
	G/C-C/C	36 (83,7%)	32 (80%)	0,90 (0,28-2,90)		
Recessivo	G/G-G/C	42 (97,7%)	38 (95%)	1,00	0,26	122,1
	C/C	1 (2,3%)	2 (5%)	4,81 (0,26-89,65)		
Overdominante	G/G-C/C	8 (18,6%)	10 (25%)	1,00	0,52	122,9
	G/C	35 (81,4%)	30 (75%)	0,70 (0,23-2,12)		

5.5. Concentração de HLA-G solúvel nos pacientes e nos controles

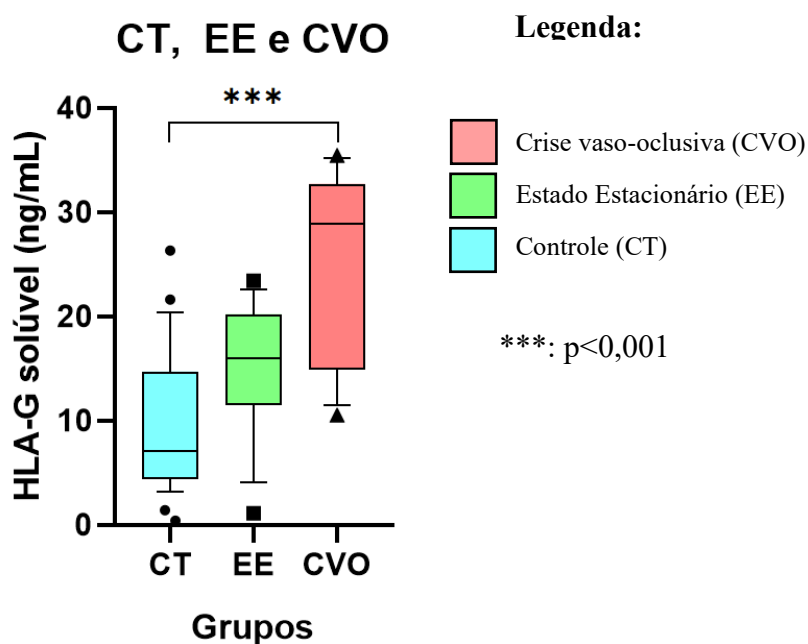
A Tabela 10 e o gráfico de boxplot apresentam os níveis plasmáticos de HLA-G solúvel (sHLA-G, em ng/mL) em três grupos: CT, EE e CVO. Foi avaliado entre os grupos e com base nas análises, houve uma diferença significativa com a apresentação de um aumento elevado no grupo de crise vaso-oclusiva (CVO) em comparação com o grupo controle (CT) ($p < 0,001$). E em uma comparação global ($p = 0,0004$). O gráfico boxplot mostra um aumento progressivo nos níveis de sHLA-G entre os grupos, com destaque para a elevação significativa em CVO comparado aos controles (CT), conforme evidenciado pela marcação de $p < 0,001$.

Tabela 10: Concentração de HLA-G solúvel com os perfis clínicos.

Concentração de HLA-G solúvel (ng/mL)			
CT (n=29)	EE (n=14)	CVO (n=12)	Valor de p
8,3 [4,6 – 17,5]	18,50 [12,10 – 21,45]	28,90 [14,93 – 32,73]	a: 0,0659 b: 0,0005*** c: 0,4747 d: 0,0004***

a: CT e EE; b: CT e CVO; c: EE e CVO; d: CT, EE e CVO; IQR: Intervalo Interquartil; EE: Estado Estacionário; CVO: Crise Vaso-oclusiva; ng/mL: nanograma por mililitros; ***: $p < 0,001$. O teste de Kruskal Wallis foi utilizado para múltiplos grupos e as múltiplas comparações de Dunn para os grupos.

Figura 6: Concentração plasmática em nanograma por mililitro (ng/mL), representado em gráfico de barras de HLA-G solúvel no grupo de doadores saudáveis (azul) e nos pacientes em estado estacionário (verde) e em crise vaso-oclusiva (vermelha).



Leg.: Boxplots representam a mediana, quartis e valores extremos. Os símbolos geométricos (▲ triângulo, ● círculo, ■ quadrado) representam valores individuais de pacientes.

Um dos achados mais relevantes do presente trabalho foi a elevação significativa dos níveis de HLA-G solúvel nos pacientes com AF. Essa elevação foi mais acentuada durante as crises, embora a comparação entre EE e CVO não tenha alcançado significância estatística ($p = 0,0577$), sugerindo uma tendência à elevação progressiva de sHLA-G em resposta à inflamação. O n amostral dos pacientes analisados para essas comparações foi de 26 pacientes, sendo 14 pacientes em estado estacionário e 12 em crise vaso-oclusiva, e de 29 controles saudáveis (Le Gal *et al.*, 1999; Naji *et al.*, 2014b).

O HLA-G solúvel exerce função imunossupressora, modulando a atividade de células NK, T citotóxicas e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Carosella *et al.*, 2015; Carosella; Dausset; Rouas-Freiss, 1999b; González *et al.*, 2012b; Lila *et al.*, 2001b). Sua elevação em estados inflamatórios crônicos, como na AF, pode representar uma tentativa de controle da inflamação e proteção tecidual. Estudos em outras condições inflamatórias crônicas, como lúpus eritematoso sistêmico e hepatite viral, também demonstraram elevações de sHLA-G correlacionadas com a gravidade da doença (Carosella *et al.*, 2015). No contexto da AF, os níveis aumentados de sHLA-G podem refletir a ativação de vias regulatórias em resposta à

inflamação persistente e à lesão tecidual decorrente da oclusão vascular (Kato *et al.*, 2018c; Le Gal *et al.*, 1999; Le Rond *et al.*, 2004; Martelli-Palomino *et al.*, 2013).

Na anemia falciforme, episódios de CVO são marcados por inflamação intensa, estresse oxidativo, ativação endotelial e aumento de citocinas pró-inflamatórias (Musa *et al.*, 2010b; Sant'Ana *et al.*, 2017). O aumento significativo de sHLA-G observado em pacientes em CVO pode refletir uma tentativa do organismo de contrabalançar o estado inflamatório ativado, promovendo a tolerância imunológica e protegendo os tecidos contra danos mediados por células efectoras. Pode-se conciliar com estudos anteriores que q quantidade elevada de sHLA-G é característica das doenças inflamatórias crônicas como lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla e artrite reumatoide (Moore *et al.*, 1998; Pistoia *et al.*, 2007; Zambra *et al.*, 2016b).

A presença elevada de HLA-G é observada em diversos tipos de cânceres como o carcinoma hepatocelular (Okumura *et al.*, 2023b), próstata, hiperplasia prostática benigna (Zambra *et al.*, 2016b), glioma, melanoma cutâneo, tumores hematopoiéticos e trofoblásticos, entre outros tipos (Cao *et al.*, 2011; Lin; Yan, 2018b; Zheng; Jia; Yang, 2022). Níveis aumentados sHLA-G foram relatados em pacientes com melanoma, neuroblastoma, doenças linfoproliferativas, carcinoma de mama, ovário e colorretal, quando comparados a controles saudáveis ou indivíduos com neoplasias benignas (Pistoia *et al.*, 2007; Scarabel *et al.*, 2020b; Zambra *et al.*, 2016b; Zheng; Jia; Yang, 2022).

Estudos prévios também sugerem que polimorfismos no gene HLA-G podem influenciar a expressão de sua forma solúvel, o que reforça a importância de avaliar os níveis plasmáticos em associação com o genótipo. Em contextos como a gravidez e infecções virais, certos alelos e haplótipos têm sido associados a maior estabilidade do mRNA e níveis mais altos de sHLA-G circulante (Castelli *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2015b; Larsen *et al.*, 2010; Pyo *et al.*, 2006). Assim, embora este estudo não tenha identificado associação significativa entre variantes genéticas do HLA-G e os estados clínicos da AF, foi observado somente entre os pacientes e o grupo controle, a diferença fenotípica nos níveis de sHLA-G sugere regulação pós-transcricional ou ambiental associada ao estado inflamatório.

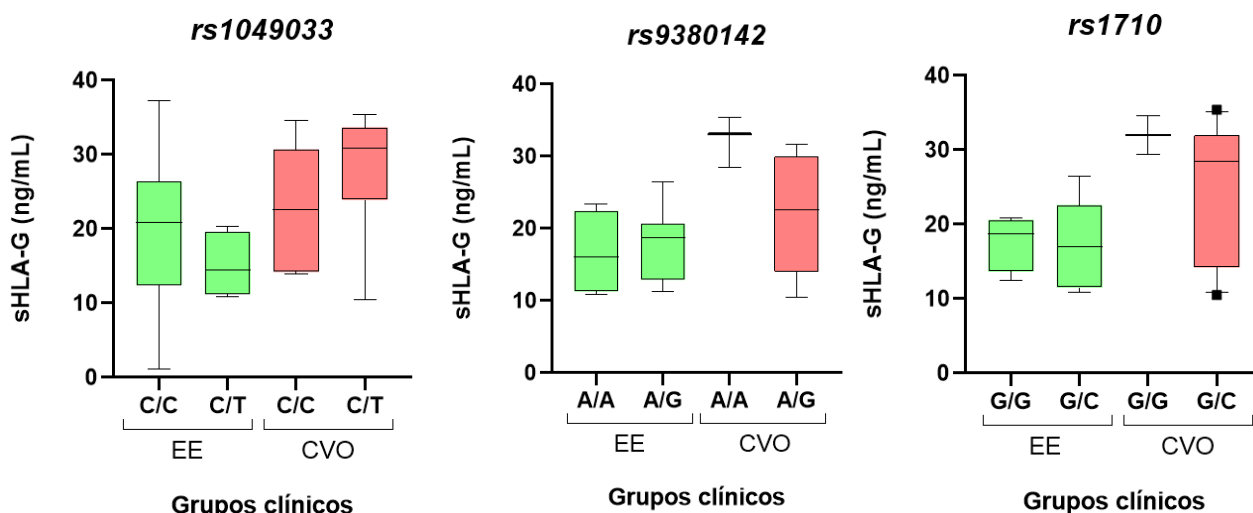
Além disso, os níveis de sHLA-G elevados podem servir como um potencial biomarcador de gravidade ou fase ativa da doença, sendo úteis na estratificação de risco e monitoramento clínico de pacientes com AF. No entanto, é necessário cautela na interpretação

desses achados, dada a amostra relativamente reduzida e a variabilidade intraindividual da expressão de HLA-G.

5.6. Distribuição das concentrações de sHLA-G por genótipo

A Figura 7 apresenta a concentração plasmática de HLA-G solúvel (sHLA-G, em ng/mL) estratificada por genótipos das variantes *rs1049033*, *rs9380142* e *rs1710* do gene HLA-G, nos grupos clínicos de pacientes com anemia falciforme em estado estacionário (EE) e em crise vaso-oclusiva (CVO). Para as três variantes genéticas analisadas neste estudo não foram observadas comparações estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 7: Distribuição das concentrações de sHLA-G entre os genótipos e alelos das variantes genéticas do estudo.



A: Adenina; G: Guanina; C: Citosina; T: Timina; ng/mL: Nanograma por mililitro.

Chyad *et al.*, em um estudo associado a doenças inflamatórias, foi demonstrado que a presença do alelo C da variante *rs1710* e o alelo A da variante *rs9380142* foram associadas ao Lúpus, tanto a nível de alelo quanto a genótipo (Chyad *et al.*, 2023). Estudos anteriores já demonstraram que polimorfismos nesta região podem influenciar a estabilidade do mRNA e, consequentemente, a expressão da proteína HLA-G (Castelli *et al.*, 2010).

5.7. Correlação entre as variáveis hematológicas e o sHLA-G

Após esse processo de comparação, utilizamos o teste de correlação de Spearman para avaliar a concentração de HLA-G solúvel com as variáveis hematológicas e a idade dos pacientes em estado estacionário (**Figura 8**) e crise vaso-oclusiva (**Figura 9**). As correlações abaixo apresentadas, apesar de serem consideradas fracas, podem estar relacionadas, além disso, o n amostral reduzido juntamente a outras limitações do estudo, por isso, é necessário realizar a leitura abaixo com cautela, sem retirar conclusões precipitadas.

Na Figura 8, que faz a correlação de sHLA-G com parâmetros clínicos e hematológicos dos pacientes em estado estacionário (EE), o RBC com o sHLA-G solúvel ($r = -0,38$), o que pode indicar que níveis mais elevados de HLA-G estão associados a menor contagem de glóbulos vermelhos, e sugerir maior grau de hemólise ou supressão eritropoética em estados inflamatórios crônicos. Em relação as plaquetas que apresentaram uma correlação positiva ($r = 0,42$), pode indicar uma alta na atividade plaquetária e o aumento de sHLA-G, e os processos que acontecem na inflamação decorrente da doença.

Figura 8: Correlação das variáveis hematológicas e HLA-G solúvel no perfil estacionário (EE) de pacientes com anemia falciforme. Negrito: Estatisticamente significativos: $p < 0,05$. Verde: Correlação positiva; Branco: Correlação neutra; Vermelho: Correlação negativa.

	sHLA-G	Idade	WBC	RBC	HGB	HCT	HCM	VCM	CHCM	RDW	HDW	PLT	VPM	NEUT	LINF	MON	EOS	BASO
sHLA-G																		
Idade	-0,379																	
WBC	0,110	-0,305																
RBC	-0,381	0,400	-0,273															
HGB	-0,246	0,542	-0,073	0,680														
HCT	-0,319	0,472	-0,130	0,767	0,954													
HCM	0,363	-0,040	0,233	-0,623	0,078	-0,034												
VCM	0,306	-0,128	0,262	-0,673	-0,033	-0,104	0,972											
CHCM	0,501	-0,055	-0,015	-0,292	0,179	-0,044	0,567	0,442										
RDW	-0,508	-0,011	-0,112	-0,055	-0,499	-0,441	-0,521	-0,481	-0,414									
HDW	-0,116	-0,195	0,064	-0,619	-0,641	-0,728	0,075	0,097	0,050	0,678								
PLT	0,423	-0,442	0,229	-0,890	-0,630	-0,681	0,586	0,678	0,208	-0,141	0,352							
VPM	0,333	0,046	-0,103	-0,251	0,085	0,021	0,518	0,557	0,516	-0,460	-0,021	0,259						
NEUT	-0,055	0,066	0,684	0,277	0,166	0,143	-0,220	-0,266	-0,095	0,086	-0,196	-0,356	-0,392					
LINF	0,288	-0,296	0,719	-0,535	-0,086	-0,238	0,535	0,547	0,305	-0,305	0,295	0,493	0,337	0,077				
MON	0,275	-0,433	0,803	-0,537	-0,372	-0,486	0,275	0,293	0,117	0,088	0,490	0,469	-0,063	0,370	0,794			
EOS	-0,179	-0,506	0,143	-0,018	-0,359	-0,270	-0,296	-0,196	-0,242	0,457	0,466	-0,122	0,011	0,077	0,064	0,305		
BASO	-0,083	-0,140	0,589	0,087	0,069	0,110	-0,165	-0,129	-0,328	0,033	-0,049	-0,048	-0,217	0,366	0,442	0,479	0,027	

O RDW (*Red Cell Distribution Width*) é uma medida da variação no tamanho dos glóbulos vermelhos (anisocitose). Na anemia falciforme, valores elevados de RDW são comuns e refletem um estresse hematopoiético aumentado, com presença de células imaturas ou fragmentadas (Thame *et al.*, 1991). A correlação negativa entre sHLA-G e RDW ($r = -0,508$) pode indicar que níveis mais altos de HLA-G solúvel estão associados a um grau menor de anisocitose, o que ser um possível papel imunomodulador protetor associado a um microambiente mais regulado, com menor inflamação e, conseqüentemente, menor estresse eritropoético e destruição eritrocitária (Chies; Nardi, 2001b; Gladwin; Ofori-Acquah, 2014b).

Na Figura 9, que faz associação entre sHLA-G e variáveis clínicas e hematológicas em pacientes em crise vaso-oclusiva (CVO). Nos parâmetros hematológicos, como o RBC ($r = -0,44$) e Linfócitos ($r = -0,45$) apresentam as correlações negativas mais fortes com sHLA-G, esses achados sugerem que menores contagens de glóbulos vermelhos e linfócitos estão associadas a níveis mais altos de HLA-G, o que pode refletir um estado inflamatório ou imunomodulador mais intenso em pacientes com maior gravidade clínica durante a crise. WBC

($r = -0,27$), indica que altas concentrações de leucócitos estão associadas a menores níveis de HLA-G, o que pode apontar para um papel imunossupressor do HLA-G frente à resposta inflamatória aguda.

Figura 9: Correlação das variáveis hematológicas e HLA-G solúvel no perfil de crise vaso-oclusiva (CVO) de pacientes com anemia falciforme. Negrito: Estatisticamente significativos: $p < 0,05$. Verde: Correlação positiva; Branco: Correlação neutra; Vermelho: Correlação negativa.

	sHLA-G	Idade	WBC	RBC	HGB	HCT	HCM	VCM	CHCM	RDW	HDW	PLT	VPM	NEUT	LINF	MON	EOS	BASO
sHLA-G																		
Idade	0,196																	
WBC	-0,270	-0,410																
RBC	-0,442	-0,658	0,102															
HGB	-0,161	0,174	0,343	-0,275														
HCT	-0,161	0,137	0,462	-0,051	0,879													
HCM	0,060	-0,053	0,427	-0,301	0,816	0,592												
VCM	0,063	0,658	-0,182	-0,722	0,420	0,179	0,406											
CHCM	0,368	0,004	-0,245	-0,441	0,235	-0,042	0,336	0,084										
RDW	-0,098	0,056	0,531	-0,245	0,862	0,830	0,748	0,217	0,070									
HDW	-0,372	-0,456	0,760	0,156	0,468	0,489	0,343	-0,315	-0,046	0,581								
PLT	0,021	-0,119	-0,455	0,144	-0,767	-0,722	-0,783	-0,140	-0,217	-0,713	-0,382							
VPM	-0,039	0,121	0,228	-0,311	0,527	0,271	0,649	0,544	0,018	0,323	0,283	-0,393						
NEUT	-0,158	-0,084	0,727	-0,168	0,778	0,809	0,664	0,112	0,028	0,909	0,658	-0,622	0,207					
LINF	-0,455	-0,175	0,406	0,081	0,522	0,427	0,336	-0,084	0,259	0,266	0,683	-0,448	0,453	0,343				
MON	-0,126	0,053	0,399	0,032	0,441	0,571	0,189	-0,294	0,000	0,552	0,634	-0,636	-0,004	0,455	0,441			
EOS	-0,442	-0,288	0,466	0,193	-0,147	-0,082	-0,151	-0,039	-0,662	0,018	0,475	0,305	0,318	0,067	0,116	-0,007		
BASO	-0,020	-0,272	-0,215	0,294	-0,803	-0,731	-0,741	-0,304	-0,444	-0,684	-0,122	0,834	-0,215	-0,633	-0,340	-0,340	0,574	

6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar da relevância dos achados apresentados, este estudo possui algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. A principal limitação está relacionada ao tamanho amostral relativamente reduzido, especialmente em subgrupos clínicos (estado estacionário vs. crise vaso-oclusiva) e nas análises genéticas por genótipo. Essa limitação compromete o poder estatístico para detectar associações mais sutis, principalmente nos modelos genéticos codominante e recessivo, nos quais a baixa frequência de homozigotos pode ter influenciado a ausência de significância estatística.

Devido a atrasos na chegada de outros dois kits de ELISA que estão programados para o mês de agosto, não foram possíveis realizar o restante das quantificações dos pacientes e controles, por isso, foram realizadas as quantificações de 26 pacientes e 29 controles para as devidas análises e compor o nosso estudo. Embora os resultados contribuam para o avanço do conhecimento sobre a imunogenética e os biomarcadores da AF, as limitações descritas destacam a necessidade de estudos futuros com amostras maiores, maior diversidade populacional, e metodologias integrativas que considerem múltiplos níveis de análise molecular e clínica.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados deste estudo corroboram a literatura ao demonstrar alterações hematológicas compatíveis com os diferentes estados clínicos da AF, além de apontar o potencial papel da variante *rs1049033* gene *HLA-G* na modulação imunológica da doença. A elevação significativa de sHLA-G nos pacientes sugere que essa molécula pode integrar um mecanismo compensatório à inflamação, reforçando sua relevância como possível marcador imunológico.

Ainda que os modelos genéticos testados tenham revelado associações estatisticamente significativas com o SNV *rs1049033* analisado, as diferenças nas frequências alélicas justificam a continuidade de investigações com amostras maiores e a integração com dados de expressão gênica ou funcional. Portanto, este estudo reforça a importância de se considerar fatores genéticos e imunológicos na compreensão da variabilidade clínica da Anemia Falciforme e sugere caminhos promissores para identificação de novos biomarcadores com valor diagnóstico ou prognóstico.

8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Atividades	2023		2024		2025
		1º semestre	2º semestre	1º semestre	2º semestre	1º semestre
01	Créditos-disciplinas	R	R	R		
02	Revisão bibliográfica	R	R	R	R	R
03	Submissão ao CEP-HEMOAM	R				
04	Coleta de dados e amostras	R	R	R		
05	Genotipagem e Quantificação de HLA-G solúvel				R	R
06	Análise de resultados				R	R
07	Análise estatística		R		R	R
08	Redação da dissertação	R	R	R	R	R
09	Submissão do artigo					R
10	Defesa					R

R: Realizado

X: Pendente

9. EQUIPE DE PESQUISA

Nº	Integrante	Instituição	Formação	Função
01	Lucas da Silva Oliveira	UFAM/HEMOAM	Biomédico	Aluno a desenvolver o projeto.
02	Adriana Malheiro Alle Marie	UFAM/FHEMOAM	Bióloga, Dra	Pesquisadora, orientadora do projeto.
03	Eduardo Antonio Donadi	USP/Ribeirão Preto	Médico, Dr	Coorientador e colaborador na análise dos dados e interpretação dos resultados
03	Andréa Monteiro Tarragô	HEMOAM	Farmacêutica, Dra	Pesquisadora, colaboradora do projeto.
04	Allyson Guimarães da Costa	UFAM/FHEMOAM	Enfermeiro, Dr	Pesquisador, colaborador do projeto.
05	Stephanny Dias	UEA/HEMOAM	Farmacêutica, Esp.	Pesquisadora, colaborador do projeto.
06	Nara Caroline	UEA/HEMOAM	Biomédica, Esp.	Pesquisadora, colaborador do projeto.
07	Mariana Costa Dias	UFAM/HEMOAM	Bióloga, Dra.	Pesquisadora, colaborador do projeto.
08	Nelson Abrahim Fraiji	HEMOAM	Médico, Dr.	Colaborador na análise dos dados e interpretação dos resultados
09	Alexander Leonardo Silva Junior	UFAM / FHEMOAM	Biomédico, Dr.	Pesquisador e Colaborador do projeto.
10	Thaís Lohana Chanel Pereira	UEA/HEMOAM	Biomédica, Esp.	Colaborador nos procedimentos laboratoriais e interpretação dos resultados.
11	Mayara Façanha	UEA/HEMOAM	Biomédica, Esp.	Pesquisadora, colaborador do projeto.
12	Suelen Farias	UFAM/HEMOAM	Biomédica	Pesquisadora, colaborador do projeto.
13	Jonatas Campelo	UNINORTE/HEMOAM	Aluno de graduação	Pesquisador, colaborador do projeto.
14	Luiz Carlos	Estácio/HEMOAM	Aluno de graduação	Pesquisador, colaborador do projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. **Elsevier Editora Ltda**, n. 9, p. 631–667, 2019.
- AKINOLA, N. O. *et al.* Subclinical ischaemic episodes during the steadystate of sickle cell anaemia. **Pathology**, p. 902–906, 1992.
- AMULIC, B.; HAYES, G. Neutrophil extracellular traps. **Current Biology**, v. 21, n. 9, p. R297–R298, 2011.
- ARNAIZ-VILLENA, A. *et al.* HLA-G: Function, polymorphisms and pathology. **International Journal of Immunogenetics**, v. 48, n. 2, p. 172–192, 2021.
- BERLINGERIO, M. *et al.* Mining clinical, immunological, and genetic data of solid organ transplantation. **Studies in Computational Intelligence**, v. 224, n. March 2015, p. 211–236, 2009.
- BRASIL, M. DA S. DO. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: doença falciforme/Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines: sickle cell disease**. BrasíliaLILACS, 2018.
- CAO, M. *et al.* Plasma soluble HLA-G is a potential biomarker for diagnosis of colorectal, gastric, esophageal and lung cancer. **Tissue Antigens**, v. 78, n. 2, p. 120–128, 2011.
- CARAMALHO, I. *et al.* The rare DRB1*04:08-DQ8 haplotype is the main HLA class II genetic driver and discriminative factor of Early-onset Type 1 diabetes in the Portuguese population. **Frontiers in Immunology**, v. 14, n. January, p. 1–11, 2023.
- CAROSELLA, E. D. *et al.* Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862–4870, 2008.
- CAROSELLA, E. D. *et al.* **HLA-G. An Immune Checkpoint Molecule**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 127
- CAROSELLA, E. D.; DAUSSET, J.; ROUAS-FREISS, N. Immunotolerant functions of HLA-G. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 3, p. 327–333, 1999a.
- CASTELLI, E. C. *et al.* The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: Polymorphisms and haplotypes. **Genes and Immunity**, v. 11, n. 2, p. 134–141, 1 mar. 2010.
- CASTELLI, E. C. *et al.* A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: Implication for gene regulation and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 11, p. 3069–3086, 2011.

CASTELLI, E. C. *et al.* The + 3010/C single nucleotide polymorphism (rs1710) at the HLA-G 3' untranslated region is associated with a short transcript exhibiting a deletion of 92 nucleotides. **Immunogenetics**, v. 75, n. 2, p. 155–160, 2023a.

CELA, E. Anemia falciforme. Em: **Acta Pediatrica Espanola**. [s.l: s.n.]. v. 66p. 327–329.

CESAR, P. *et al.* Epidemiological, clinical, and severity characterization of sickle cell disease in a population from the Brazilian Amazon. **Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 12, n. 4, p. 204–210, 2019a.

CHEN, G. *et al.* Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. **Blood**, v. 123, n. 24, p. 3818–3827, 2014.

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

CHU, Y. J. *et al.* HBV genotype-dependent association of HLA variants with the serodecline of HBsAg in chronic hepatitis B patients. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2023.

CHYAD, I. A. *et al.* Association study of 3-UTR haplotype of HLA-G gene with Lupus. 9 jun. 2023.

CONTINI, P. *et al.* Soluble HLA-A, -B, -C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8⁺ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 125–134, 2003.

CORDERO, E. A. A. *et al.* HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. **Tissue Antigens**, v. 74, n. 4, p. 308–313, 2009a.

CURIGLIANO, G. *et al.* Molecular pathways: Human leukocyte antigen G (HLA-G). **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 20, p. 5564–5571, 2013.

DE SONATI, M. F.; COSTA, F. F. The genetics of blood disorders: Hereditary hemoglobinopathies. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4 SUPPL., p. 40–51, 2008.

DENDROU, C. A. *et al.* HLA variation and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 5, p. 325–339, 2018.

DIAS, F. C. *et al.* The role of HLA-G molecule and HLA-G gene polymorphisms in tumors, viral hepatitis, and parasitic diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. FEB, p. 2–11, 2015a.

DINIZ, D.; GUEDES, C.; TRIVELINO, A. Educação para a genética em saúde pública: um estudo de caso sobre a anemia falciforme. Genetics education in public health: a case study on sickle cell anaemia in Brazil. **Ciências e Saúde Coletiva**, v. 10, p. 365–372, 2003.

DONADI, E. A. *et al.* Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 3, p. 369–395, 2011.

FRASÃO, G. **Governo Federal reforça necessidade do diagnóstico precoce da Doença Falciforme.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/junho/governo-federal-reforca-necessidade-do-diagnostico-precoce-da-doenca-falciforme>>.

FREITAS DE OLIVEIRA, V.; AUGUSTO PIANEZZER, G.; MARIA SILVA AFONSO, S. O equilíbrio de Hardy-Weinberg no sistema sanguíneo ABO: um estudo de caso em Engenheiro Coelho – SP. **Ciência e Natura**, v. 43, p. 1, 1 jan. 2021.

GAN, J. *et al.* HLA-G 3'UTR polymorphism diplotypes and soluble HLA-G plasma levels impact cervical cancer susceptibility and prognosis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. December, p. 1–11, 2022.

GARCIA, A. *et al.* Association of HLA-G 3'UTR polymorphisms with response to malaria infection: A first insight. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 263–269, 2013.

GARCIA, F. *et al.* CXCR4hi effector neutrophils in sickle cell anemia: potential role for elevated circulating serotonin (5-HT) in CXCR4hi neutrophil polarization. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.

GLADWIN, M. T.; OFORI-ACQUAH, S. F. Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. **Blood**, v. 123, n. 24, p. 3689–3690, 2014a.

GLADWIN, M. T.; VICHINSKY, E. Pulmonary Complications of Sickle Cell Disease. **Sciences-New York**, p. 2254–2265, 2009.

GOMES, R. P. *et al.* Avaliação da molécula de checkpoint imunológico HLA-G em lesões melanocíticas. p. 1–4, 2020.

GONZÁLEZ, Á. *et al.* The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 49, n. 3, p. 63–84, 2012a.

GOULDER, P. J. R.; WALKER, B. D. HIV and HLA Class I: An Evolving Relationship. **Immunity**, v. 37, n. 3, p. 426–440, 2012.

HUMBERT, J. *et al.* Neutrophil dysfunctions in Sickle Cell Disease. **Biomed & Pharmacother**, v. 44, p. 153–158, 1990a.

JEONG, K. P217 Exonic polymorphisms of H LA-G gene are associated with non- segmental vitiligo in the Korean population. **Kiss**, v. 10, p. 436–437, 2017.

KARNAUKHOV, V. *et al.* HLA variants have different preferences to present proteins with specific molecular functions which are complemented in frequent haplotypes. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. December, p. 1–17, 2022.

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

LAPPALAINEN, T.; MACARTHUR, D. G. From variant to function in human disease genetics. **Human Genomics**, v. 1468, n. September, p. 1464–1468, 2021.

LARSEN, M. H. *et al.* The 3'-untranslated region of the HLA-G gene in relation to pre-eclampsia: Revisited. **Tissue Antigens**, v. 75, n. 3, p. 253–261, 2010.

LE DISCORDE, M. *et al.* Expression of HLA-G in Human Cornea, an Immune-Privileged Tissue. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1039–1044, 2003.

LE FRIEC, G. *et al.* Capacity of myeloid and plasmacytoid dendritic cells especially at mature stage to express and secrete HLA-G molecules. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 6, p. 1125–1133, 2004.

LE GAL, F. A. *et al.* HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **International Immunology**, v. 11, n. 8, p. 1351–1356, 1999.

LE ROND, S. *et al.* Alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: In vivo implications in transplanted patients. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 3, p. 649–660, 2004.

LEFEBVRE, S. *et al.* Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. **Human Immunology**, v. 61, n. 11, p. 1095–1101, 2000.

LEHMANN, D. J. *et al.* HLA class I, II & III genes in confirmed late-onset *alzheimer's* disease. **Neurobiology of Aging**, v. 22, n. 1, p. 71–77, 2001.

LILA, N. *et al.* Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4⁺ T cells suppresses the allo-proliferative response: A CD4⁺ T cell regulatory mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 12150–12155, 2001a.

LIN, A.; YAN, W. H. Heterogeneity of HLA-G Expression in Cancers: Facing the Challenges. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. September, p. 1–12, 2018a.

LIU, R. *et al.* Shared genetic architecture between hypothyroidism and rheumatoid arthritis: A large-scale cross-trait analysis. **Molecular Immunology**, v. 168, n. April, p. 17–24, 2024.

MARTELLI-PALOMINO, G. *et al.* Polymorphic Sites at the 3' Untranslated Region of the HLA-G Gene Are Associated with Differential HLA-G Soluble Levels in the Brazilian and French Population. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.

MENDONÇA, R.; SILVEIRA, A. A. A.; CONRAN, N. Red cell DAMPs and inflammation. **Inflammation Research**, v. 65, n. 9, p. 665–678, 2016.

MENIER, C. *et al.* Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3153–3160, 2004.

MOORE, C. *et al.* Increased circulating levels of soluble HLA class I heterodimers in patients with sickle cell disease. **Journal of the National Medical Association**, v. 90, n. 3, p. 157–163, 1998.

MUSA, B. O. P. *et al.* Pattern of serum cytokine expression and T-cell subsets in sickle cell disease patients in vaso-occlusive crisis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 4, p. 602–608, 2010a.

NADDA, N. *et al.* Immune-checkpoint HLA-G gene polymorphisms, 3'-UTR types and their association with hepatocellular carcinoma and treatment response in Indian population. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 5 dez. 2024.

NAJI, A. *et al.* Binding of HLA-G to ITIM-Bearing Ig-like Transcript 2 Receptor Suppresses B Cell Responses. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 4, p. 1536–1546, 2014a.

NÜCKEL, H. *et al.* Simple methods for the detection of HLA-G variants in coding and non-coding regions. **Methods in Molecular Biology**, v. 882, p. 123–142, 2012.

OKPALA, I. E. Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anaemia (SCA). **European Journal of Haematology**, v. 60, n. 4, p. 267–268, 1998.

OKUMURA, T. *et al.* HLA-G susceptibility to hepatitis B infection and related hepatocellular carcinoma in the Japanese population. **Human Immunology**, v. 84, n. 8, p. 401–407, 2023a.

PAULING, L. *et al.* Sickle cell anemia, a molecular disease. **Science**, v. 286, n. 5444, p. 1488–1490, 1949.

PIEL, F. B. *et al.* Global epidemiology of Sickle haemoglobin in neonates: A contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **The Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 142–151, 2013.

PIEL, F. B. *et al.* Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 260, n. 5547, p. 98–100, 2017a.

PIEL, F. B. *et al.* Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 260, n. 5547, p. 98–100, 2017c.

PISTOIA, V. *et al.* Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, n. 6, p. 469–479, 2007.

PYO, C. W. *et al.* HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphism: Genomic sequence defines haplotype structure and variation spanning the nonclassical class I genes. **Immunogenetics**, v. 58, n. 4, p. 241–251, 2006.

REBMANN, V. *et al.* Detection of HLA-G5 Secreting Cells. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1017–1024, 2003a.

REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 156, n. 4, p. 433–445, 2012.

SANTAMARIA, P. *et al.* HLA class I sequence-based typing. **Human Immunology**, v. 37, n. 1, p. 39–50, 1993.

SANT'ANA, P. G. DOS S. *et al.* Clinical and laboratory profile of patients with sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 40–45, 1 jan. 2017.

SANTOS, M. E. DOS. Marcadores de trombofilia em portadores de anemia falciforme. p. 94, 2010.

SCARABEL, L. *et al.* Soluble HLA-G expression levels and HLA-G/irinotecan association in metastatic colorectal cancer treated with irinotecan-based strategy. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020a.

SHIH, N. R. *et al.* HLA class I peptide polymorphisms contribute to class II DQ β 0603: DQ α 0103 antibody specificity. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2024.

SILVA-PINTO, A. C. *et al.* Economic burden of sickle cell disease in Brazil. **PLoS ONE**, v. 17, n. 6 June, p. 1–15, 2022.

STRACHAN, T.; READ, A. P. **Human Molecular Genetics**. 4th ed. ed. [s.l: s.n.].

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annu Rev Pathol.**, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2019.

THAME, M. *et al.* The red cell distribution width in sickle cell disease—is it of clinical value? **Clinical & Laboratory Haematology**, v. 13, n. 3, p. 229–237, 1991.

TOZATTO-MAIO, K. *et al.* Polymorphisms in Inflammatory Genes Modulate Clinical Complications in Patients with Sickle Cell Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. September, 2020a.

VEN, K. VAN DER *et al.* HLA-G Polymorphisms and Allele Frequencies in Caucasians. **Human Immunology**, v. 59, n. 5, p. 302–212, 1998.

WILLIAMS, T. N.; THEIN, S. L. Sickle cell anemia and its phenotypes. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 19, p. 113–147, 2018a.

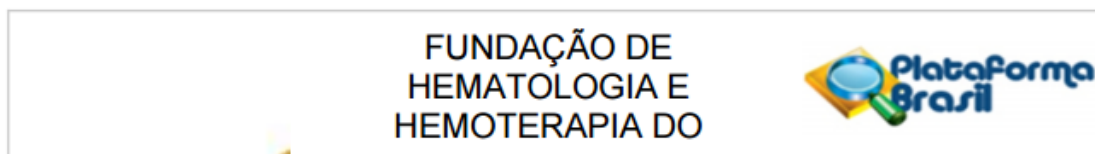
ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: Da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 207–214, 2007.

ZAMBRA, F. M. B. *et al.* Immunogenetics of prostate cancer and benign hyperplasia – The potential use of an HLA-G variant as a tag SNP for prostate cancer risk. **Hla**, v. 87, n. 2, p. 79–88, 2016a.

ZHENG, G.; JIA, L.; YANG, A. G. Roles of HLA-G/KIR2DL4 in Breast Cancer Immune Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. February, p. 1–8, 2022.

ANEXOS

Anexo 1: Parecer Do Comitê De Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PÓS ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO CONTRA COVID-19 EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

Pesquisador: Evilázio Cunha Cardoso

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56756022.5.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.414.049

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1891291.pdf	05/05/2022 11:03:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.pdf	05/05/2022 11:03:04	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Outros	Questionario.doc	05/05/2022 11:01:46	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_ANUENCIA_pesquisadores_setores.pdf	05/05/2022 10:58:30	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_Doutorado.pdf	05/05/2022 10:54:18	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tale.pdf	05/05/2022 10:53:41	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	05/05/2022 10:53:12	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_assinada.pdf	03/03/2022 18:06:23	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Declaração de concordância	Carta_Anuencia_Setores.pdf	03/03/2022 17:25:06	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Orçamento	Orcamento_Projeto.docx	03/03/2022 17:22:07	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_Institucional_HEMOAM.pdf	03/03/2022 17:20:26	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Cronograma	Cronograma_Projeto_V_3.docx	03/03/2022 17:19:45	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Título do projeto: Avaliação da resposta imunológica após esquema de imunização contra COVID -19 em pacientes com doença falciforme.

Coordenação da Pesquisa: Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie; Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula; Evilázio Cunha Cardoso.

NÚMERO DO CAAE: 56756022.5.0000.0009.

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) dessa pesquisa sobre a doença falciforme. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tem por objetivo garantir seu direito como participante, é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador. Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com os pesquisadores. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou se quiser retirar sua autorização a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA:

Doença Falciforme (DF) é a hemoglobinopatia mais comum no mundo, decorrente de uma mutação no gene que codifica a cadeia beta da hemoglobina (Hb), e dá origem a uma variante estrutural da Hb conhecida como hemoglobina S (HbS). Do ponto de vista fisiopatológico, a DF é uma doença inflamatória, caracterizada pela ativação da imunidade inata, por consequência de dois elementos fisiológicos principais: vasoclusões repetidas e a hemólise crônica, na qual ativam e alimentam esse processo inflamatório

No Brasil estima-se a prevalência de 25 a 30 mil pessoas com AF, com nascimento de 1.000 a 1.200 novos casos por ano. Entre os estados, o Amazonas possui uma estimativa de prevalência de 300 a 320 de indivíduos com pelo menos um gene mutado em tratamento no hospital de referência para doenças hematológicas.

Grande parte dos pacientes com DF e com resultado positivo para COVID-19 podem desencadear graves complicações pulmonares, crise vaso-oclusiva e síndrome torácica aguda, mesmo na ausência de sintomas gripais. Estes sintomas são apresentações clínicas recorrentes nestes pacientes, advinda da própria DF, porém ainda não se sabe a interferência da COVID-19 no risco de agravamento e piora clínica nos pacientes falciformes em atendimento na Fundação HEMOAM.

As publicações mais recentes referem infecção e disfunção do endotélio vascular como eventos maiores que ocorrem principalmente no trato pulmonar, mas também podem estar presentes em outros órgãos. Esse dano ao endotélio também aparece em pacientes com DF, assim como uma tempestade de citocinas. Assim, há necessidade de classificar os pacientes com DF como uma população vulnerável às complicações do COVID-19, e compreender a eficácia do esquema de imunização contra COVID-19.

Nesse sentido, essa pesquisa visa investigar e avaliar a resposta imune ativa desencadeada pelo imunizante contra COVID-19 em pacientes com anemia falciforme, visto que ainda há poucos estudos a respeito do assunto. A identificação dos mecanismos

imunológicos, assim como maior compreensão da temática pode permitir o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e futuras pesquisas biotecnológicas nessa população.

2. PROCEDIMENTOS:

O paciente será recrutado ao longo de cada consulta ambulatorial de rotina realizado da Fundação HEMOAM. Nesse momento, e antes da consulta médica, será convidado a participar da pesquisa. Caso aceite participar, será acompanhado por 6 meses, com intervalo de 3 meses. As crises serão tratadas como visitas extras, e tratadas de forma diferencial.

Para este projeto de pesquisa, serão coletadas amostras nas consultas ambulatorial e/ou no momento das crises vaso-oclusivas, no atendimento de urgência e emergência por profissionais devidamente treinados da Fundação HEMOAM, por punção venosa ou cateter venoso central e cateter central inserção periférica (PICC), sendo que nestes dois últimos caso, um volume de 2ml será descartado.

A técnica utilizada será aquela descrita nos procedimentos operacionais padrão da instituição, observando o mínimo de garroteamento e traumas necessários. Estas amostras serão obtidas do Laboratório de Análises Clínicas da Fundação HEMOAM. Serão utilizadas 1 amostra coletada em tubos de EDTA, 1 em gel separador e 1 em citrato de sódio atendendo as seguintes especificações: 01 tubo de EDTA (4,0) ml para realização de hemograma, imunofenotipagem e pesquisa de biomarcadores moleculares, 01 tubo seco (4,0) ml para obtenção de soro e dosagens imunológicas e bioquímicas, e 01 tubo de Citrato de Sódio (4,0) ml para obtenção do plasma citratado e dosagem de microvesículas.

3. DESCONFORTOS E RISCOS:

Durante a coleta, você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da punção (hematoma). Para amenizar estes desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal treinado. Cuidados locais serão tomados para a diminuição do desconforto, tais como compressão do local puncionado, manutenção do curativo por no mínimo 4 horas, como ocorre em qualquer coleta de sangue para exames.

Este projeto apresenta um risco mínimo, de confidencialidade de dados, constrangimento e/ou desconforto. Para solucionar, os pesquisadores garantem que os pacientes serão tratados com sigilo e respeito, de forma ética e profissional, visando os anseios morais, físicos, psíquicos, social e afetivo dos participantes e seus responsáveis.

4. BENEFÍCIOS:

Não há benefícios diretos na participação neste estudo. Porém, você estará contribuindo para maior compreensão dos mecanismos imunológicos ligados à resposta dos pacientes com doença falciforme, bem como ao atendimento e tratamento dos pacientes e obtermos dados para identificação de biomarcadores imunológicos voltados à soroconversão.

5. ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

Após sua participação nesta pesquisa, você continuará seu tratamento em sua instituição, mesmo após o encerramento da pesquisa. Os resultados dos exames realizados nestes tubos não incluem exames utilizados para o seu tratamento, e serão usados apenas na análise desta pesquisa.

6. **SIGILO E PRIVACIDADE:**

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos.

7. **RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:**

Não haverá ressarcimento de despesas de transporte, alimentação, diárias, já que o estudo será feito durante um atendimento médico. Caso você tenha que comparecer a sua instituição apenas devido a este estudo, você será ressarcido com os custos de transporte (ônibus) e alimentação. Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

8. **ARMAZENAMENTO DE MATERIAL:**

O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda com o armazenamento deste material. Caso seja realizado outro estudo com este material futuramente, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda ou não com a participação em outro estudo, que só será realizado após nova autorização do Comitê de Ética em pesquisa desta instituição.

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____
(Nome e telefone de uma pessoa a ser contatada).

9. **CONTATO:**

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores listados abaixo:

- Profª. Dra. Adriana Malheiro - Hemoam - Contato: (92) 9XXXX-XXXX
- Profº. Erich Vinicius de Paula - Hemocentro da UNICAMP - Contato: (19) 9XXXX-XXXX
- Pesquisador: Evilázio Cunha Cardoso – Hemoam – (92) 9XXXX-XXXX

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

- Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOAM: Av. Constantino Nery, 3240 – Chapada CEP 69050-001, Manaus – AM; telefone (92) 9XXXX-XXXX.

10. **O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP).**

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

11. OUTRAS INFORMAÇÕES:

1. O participante da pesquisa estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
2. O participante poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que aparecerem durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
3. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica.
4. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em outro tratamento ou procedimento que possa necessitar em qualquer serviço de nosso hospital.
5. Caso você se sinta prejudicado ou de alguma forma lesionado, você tem o direito de procurar obter indenização por danos eventuais.

12. CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante: _____

Contato telefônico: () _____ e-mail (opcional): _____

Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

13. DO PESQUISADOR:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução N° 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP da Fundação HEMOAM perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Manaus/AM, Data: ____/____/____

Assinatura do pesquisador

Assinatura do (a) participante ou responsável

Anexo 3: Termo de Assentimento Livre Esclarecido

Título do projeto: Avaliação da resposta imunológica após esquema de imunização contra COVID -19 em pacientes com doença falciforme.

Coordenação da Pesquisa Orientadora: Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie,
 Coorientador: Profº Dr Erich Vinicius de Paula e pesquisador: Evilázio Cunha Cardoso
NÚMERO DO CAAE: 56756022.5.0000.0009.

Você está sendo convidado (a) a participar como participante (a) dessa pesquisa sobre a doença falciforme. Este documento, chamado Termo de Assentimento Livre e Esclarecido-TALE tem por objetivo garantir seu direito como participante, é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador. Leia com atenção e calma, aproveitando para fazer qualquer pergunta. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá fazê-las com os pesquisadores. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar.

Se você não quiser participar ou se quiser retirar sua autorização a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

As informações contidas neste Termo de Assentimento Livre e Esclarecido – TALE, estão de acordo com as normas éticas contida na Resolução CNS Nº 466/12, envolvendo seres humanos e como anuência do participante **criança e adolescente** destinada a pesquisa da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde. Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você pode entrar em contato com os pesquisadores abaixo listados ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):

- Profª. Dra. Adriana Malheiro - Hemoam - Contato: (92) 9XXXX-XXXX
- Profº. Erich Vinicius de Paula - Hemocentro da UNICAMP - Contato: (19) 9XXXX-XXXX
- Pesquisador: Evilázio Cunha Cardoso – Hemoam – (92) 9XXXX-XXXX

A pesquisa tem objeto de investigar e a avaliar a resposta imune ativa desencadeada pela vacina contra COVID-19 em pacientes com anemia falciforme, visto que ainda há poucos estudos a respeito do assunto. A identificação dos mecanismos imunológicos, assim como maior compreensão da temática pode permitir o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e futuras pesquisas biotecnológicas nessa população. Você só precisa participar da pesquisa se quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. A recusa não causará nenhum prejuízo na relação com os pesquisadores, e/ou instituição. As crianças que irão participar desta pesquisa têm de idade igual ou superior a 12 anos.

Todas as informações que serão obtidas são confidenciais, e serão armazenadas em um computador, ou seja, o seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem a garantia que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos

Não há despesas pessoais para o participante. Também não haverá compensação financeira relacionada à participação. Os dados coletados nesta pesquisa serão utilizados apenas para este estudo e artigos relacionados à própria pesquisa, não podendo ser utilizados para nenhuma outra pesquisa de outra ordem sem seu consentimento. A pesquisa será realizada na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas –HEMOAM.

PROCEDIMENTOS:

O paciente será recrutado ao longo de cada consulta ambulatorial de rotina realizado da Fundação HEMOAM. Nesse momento, e antes da consulta médica, será convidado a participar da pesquisa. Caso aceite participar, será acompanhado por 6 meses, com intervalo de 3 meses. As crises serão tratadas como visitas extras, e tratadas de forma diferencial.

Para este projeto de pesquisa, serão coletadas amostras nas consultas ambulatorial e/ou no momento das crises vaso-oclusivas, no atendimento de urgência e emergência por profissionais devidamente treinados da Fundação HEMOAM, por punção venosa ou cateter venoso central e cateter central inserção periférica, sendo que nestes dois últimos caso, um volume de 2ml será descartado.

A técnica utilizada será aquela descrita nos procedimentos operacionais padrão da instituição, observando o mínimo de garroteamento e traumas necessários. Estas amostras serão obtidas do Laboratório de Análises Clínicas da Fundação HEMOAM. Serão utilizadas 1 amostra coletada em tubos de EDTA, 1 em gel separador e 1 em citrato de sódio atendendo as seguintes especificações: 01 tubo de EDTA (4,0) ml para realização de hemograma, imunofenotipagem e pesquisa de biomarcadores moleculares, 01 tubo seco (4,0) ml para obtenção de soro e dosagens imunológicas e bioquímicas, e 01 tubo de Citrato de Sódio (4,0) ml para obtenção do plasma citratado e dosagem de microvesículas.

DESCONFORTOS E RISCOS:

Durante a coleta, você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da punção (hematoma). Para amenizar estes desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal treinado. Cuidados locais serão tomados para a diminuição do desconforto, tais como compressão do local puncionado, manutenção do curativo por no mínimo 4 horas, como ocorre em qualquer coleta de sangue para exames.

Este projeto apresenta um risco mínimo, de confidencialidade de dados, constrangimento e/ou desconforto. Para solucionar, os pesquisadores garantem que os pacientes serão tratados com sigilo e respeito, de forma ética e profissional, visando os anseios morais, físicos, psíquicos, social e afetivo dos participantes e seus responsáveis.

BENEFÍCIOS:

Não há benefícios diretos na participação neste estudo. Porém, você estará contribuindo para maior compreensão dos mecanismos imunológicos ligados à resposta dos pacientes com doença falciforme, bem como ao atendimento e tratamento dos pacientes e obtermos dados para identificação de biomarcadores imunológicos voltados à soroconversão.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

Após sua participação nesta pesquisa, você continuará seu tratamento em sua instituição, mesmo após o encerramento da pesquisa. Os resultados dos exames realizados neste tubo não incluem exames utilizados para o seu tratamento, e serão usados apenas na análise desta pesquisa.

SIGILO E PRIVACIDADE:

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação,

apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:

Não haverá ressarcimento de despesas de transporte, alimentação, diárias, já que o estudo será feito durante um atendimento médico. Caso você tenha que comparecer a sua instituição apenas devido a este estudo, você será ressarcido com os custos de transporte (ônibus) e alimentação. Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

ARMAZENAMENTO DE MATERIAL:

O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda com o armazenamento deste material. Caso seja realizado outro estudo com este material futuramente, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda ou não com a participação em outro estudo, que só será realizado após nova autorização do Comitê de Ética em pesquisa desta instituição.

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____
(Nome e telefone de uma pessoa a ser contatada).

CONTATO:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores listados abaixo:

- Profª. Dra. Adriana Malheiro - Hemoam - Contato: (92) 9XXXX-XXXX
- Profª. Erich Vinicius de Paula - Hemocentro da UNICAMP - Contato: (19) 9XXXX-XXXX
- Pesquisador: Evilázio Cunha Cardoso – Hemoam – (92) 991836887

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

- Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOAM: Av. Constantino Nery, 3240 – Chapada CEP 69050-001, Manaus – AM; telefone (92) 9XXXX-XXXX.

CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO:

Eu _____ aceito participar da pesquisa “Avaliação da resposta imunológica após esquema de imunização contra COVID -19 em pacientes com doença falciforme”.

- ✓ Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer.
- ✓ Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir, que ninguém vai ficar com raiva de mim.

- ✓ Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.
- ✓ Recebi uma cópia deste termo de assentimento, li e concordo em participar da pesquisa.

Manaus/AM, ____ / ____ / ____.

Nome do (a) **participante**

Assinatura do (a) **responsável**

Anexo 4: Questionário sociodemográfico e clínico

Data: ____/____/____

QUESTIONÁRIO E FICHA DE CADASTRO INDIVIDUAL:

Projeto: “Avaliação da resposta imunológica pós esquema de imunização contra COVID-19 em pacientes com Doença Falciforme”

Nome: _____

Sexo: (M) (F) Data de Nascimento: _____ Idade: _____ anos

Local de Nascimento: _____ UF: _____

Cor de Pele: Branco () Pardo () Preto () Amarelo () Escolaridade: _____

Trabalha: _____ Profissão: _____

Estado Civil: Solteiro () Amigado () Casado () Divorciado () Separado () Viúvo () a quanto tempo () Possuem Filhos: Sim () Não () Quantos: _____

CPF: _____ N° do SUS: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Município: _____ UF: _____

Tipo Sanguíneo	Transfusões Sanguíneas	Uso de Medicamentos
O () A () AB () B () Rh: + () - ()	Quantas por ano (média) _____ Data da última transfusão: _____	Medicamento: _____ A quanto tempo faz uso: _____ Já apresentou reação ao medicamento? Sim () Não ()
	Reação Transfusional Sim () Não () Quantas vezes? _____	Medicamento: _____ A quanto tempo faz uso: _____ Já apresentou reação ao medicamento? Sim () Não ()
Pressão arterial: _____	Data da última reação: _____	Medicamento: _____ A quanto tempo faz uso: _____ Já apresentou reação ao medicamento? Sim () Não ()
Nível de oxigenação: _____ %		Medicamento: _____ A quanto tempo faz uso: _____ Já apresentou reação ao medicamento? Sim () Não ()

Alguma Comorbidades?	Tomou alguma vacina, além da COVID-19 nos últimos 6 meses?	Alcoolismo	Vacinação em dia?
Sim () Não () Qual (ais)? _____ _____ _____ _____	() Sim () Não Qual (ais)? _____ _____ _____	Sim () Não () Quanto/ Dia _____ Fumante Sim () Não () Quant. Tempo _____ Quant. Dia _____	() Sim () Não () Não sabe Vacina para gripe nos últimos 2 anos? () Sim () Não () Não sabe Profilaxia com penicilina até os 5 anos? () Sim () Não () Não sabe

Apresentou alguma síndrome gripal nos últimos 6 meses? ☐ Sim ☐ Não	Alguma doenças infecciosas? ☐ Sim ☐ Não Qual (ais)? _____ _____ _____	Usa alguma droga ilícita? Sim ☐ Não ☐ Tipo _____ Quant. Temp. _____ _____	Tomou a vacina para COVID-19? ☐ Sim ☐ Não Qual? _____ Data 1º dose: _____ Data 2º dose: _____ Qual? _____ Data 3º dose: _____ Data 4º dose: _____																
Já teve o diagnóstico da COVID-19? ☐ Sim ☐ Não Data do teste: ____/____/____ Teste utilizado: ☐ RT-PCR ☐ Teste rápido ☐ Antígeno Início dos sintomas: ____/____/____ Final dos sintomas: ____/____/____ Apresentou alguma reação à vacina do COVID-19? ☐ Sim ☐ Não Sinal e sintoma da reação: _____ _____		Caso já tenha tido COVID-19, favor assinalar quais sintomas você sentiu, e a intensidade de cada um em uma escala de 1 a 10* <table border="1"> <tr> <td>☐ Febre</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Tosse</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Dor de garganta</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Dor no corpo</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Náuseas</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Perda de olfato</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Perda de paladar</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Diarreia</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> </table> 1= Fraco; 10= Intenso. Teve quadro de reinfeção? ☐ Sim ☐ Não		☐ Febre	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Tosse	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Dor de garganta	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Dor no corpo	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Náuseas	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Perda de olfato	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Perda de paladar	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Diarreia	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
☐ Febre	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Tosse	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Dor de garganta	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Dor no corpo	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Náuseas	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Perda de olfato	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Perda de paladar	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Diarreia	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		

Sintomatologia	
Febre ☐ Sim ☐ Não	Crise Vaso-Oclusiva: Já teve? ☐ Sim ☐ Não Quantas? _____ Quando foi a última? _____
Dor de Cabeça ☐ Sim ☐ Não	Síndrome Torácica Aguda: Já teve? ☐ Sim ☐ Não
Dor nas articulações ☐ Sim ☐ Não	Hipertensão Pulmonar: Já teve? ☐ Sim ☐ Não
Fraqueza: ☐ Sim ☐ Não	Sequestro Esplênico: Já teve? ☐ Sim ☐ Não
Icterícia: ☐ Sim ☐ Não	Colelitíase: Já teve? ☐ Sim ☐ Não
Úlceras da Perna: ☐ Sim ☐ Não	Osteonecrose de cabeça de fêmur: Já teve? ☐ Sim ☐ Não
Infecção de pele e nas úlceras: ☐ Sim ☐ Não	Priapismo: Já teve? ☐ Sim ☐ Não

Anexo 5: Protocolo de Extração de DNA Kit: *Pure Link Genomic DNA Mini Kit*

Protocolo de células de mamífero e lisado de sangue

1. Defina um banho-maria ou bloco de aquecimento a 55°C.
2. Adicione 20 µL de Proteinase K a um tubo de microcentrifuga estéril.
3. Transfira 200 µL de células ou sangue em PBS para o tubo contendo Proteinase K.
4. Adicione 20 µL de RNase A à amostra.
5. Misture bem em vórtex breve e incube à temperatura ambiente por 2 minutos.
6. Adicione 200 µL de PureLink™ *Genomic Lysis/Binding Buffer* e misture bem por vórtex para obter uma solução homogênea.
7. Incube a 55°C por 10 minutos para promover a digestão de proteínas.
8. Adicione 200 µl de etanol 96-100% ao lisado. Misture bem por vórtex para produzir uma solução homogênea.

Protocolo de purificação

1. Remova da embalagem uma coluna *PureLink™ Spin* em um tubo de coleta.
2. Transfira o lisado (+/-640 µl) para coluna Spin.
3. Centrifugue a coluna a $10.000 \times g$ por 1 minuto em temperatura ambiente.
4. Centrifugue novamente a coluna a $10.000 \times g$ por 1 minuto em temperatura ambiente.
5. Descarte o tubo de coleta e coloque a coluna Spin em um novo tubo de coleta
6. Adicione 500 µL de *Wash Buffer* 1 preparado com etanol à coluna.
7. Centrifugue a coluna a $10.000 \times g$ por 1 minuto em temperatura ambiente.
8. Descarte o tubo de coleta e coloque a coluna giratória em um novo tubo de coleta.
9. Adicione 500 µL de *Wash Buffer* 2 preparado com etanol à coluna.
10. Centrifugar a coluna à velocidade máxima durante 3 minutos à temperatura ambiente.
11. Centrifugar a coluna por 1 minuto em temperatura ambiente. Descarte o tubo coletor.
12. Coloque a coluna Spin em um tubo de microcentrifuga estéril de 1,5 mL.
13. Deixe em temperatura ambiente por 2 minutos para evaporar o álcool residual
14. Adicione 25-200 µL de PureLink™ *Genomic Elution Buffer* à coluna. Escolha o volume de eluição adequado às suas necessidades.
15. Incube à temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a coluna à velocidade máxima durante 1 minuto à temperatura ambiente o tubo contém DNA genômico purificado. Remova e descarte a coluna.
16. Use o DNA para a aplicação posterior desejada ou armazene o DNA purificado a 4°C (curto prazo) ou -20°C (longo prazo).

Anexo 6: Protocolo de PCR

Procedimento Operacional Padrão (POP) para PCR em Tempo Real

Objetivo:

Este POP descreve os procedimentos para a realização da PCR em tempo real, com ênfase na limpeza dos fluxos de trabalho, manipulação adequada dos reagentes, preparo e manuseio da placa de 96 poços, e as etapas de adição de amostras.

Obs.: Favor ler item por item antes de fazer o passo a passo

1. Limpeza dos Fluxos de Amostra e Reagente

1.1. Limpe os fluxos de amostra e de reagentes com álcool 70% e papel toalha.

1.2. Exponha os fluxos à luz UV por 15 minutos.

Obs.: Somente a luz UV do fluxo de amostras é automática, então desligará de forma automática ao passar os 15 minutos.

1.3. Durante a exposição à luz UV, os seguintes itens devem estar no fluxo de reagentes:

- Placa de 96 poços, com o selo transparente (parte mais brilhante virada para cima);
- Ponteiras a serem utilizadas, com as caixas abertas;
- Pipetas devidamente apoiadas nas suas bases.

2. Separação e Descongelamento de Reagentes

2.1. Enquanto a luz UV está em funcionamento, separe os seguintes reagentes:

- **Master Mix;**
- **Sonda;**
- **Água Ultrapura.**

2.2. Mantenha a sonda sobre gelo para evitar descongelamento.

3. Preparação do Mix de Reagentes

3.1. Após os 15 minutos de UV, uma pessoa será responsável por preparar o **mix de reagentes** no fluxo de reagentes, enquanto outra pessoa irá vortexar as amostras no fluxo de amostras.

3.2. O **mix de reagentes** deve ser preparado conforme a ordem descrita na **Tabela 1**, utilizando um microtubo de 1.5 mL identificado como "MIX".

4. Adição do Mix de Reagentes à Placa de 96 Poços

4.1. Adicione o mix de reagentes a cada poço da placa de 96 poços conforme o planejamento.

4.2. Após a adição do mix de reagentes:

- Feche o fluxo de reagentes.
- Coloque o selo sobre a placa, cobrindo os poços.
- Cubra a placa com um papel toalha.

4.3. Organize o fluxo de reagentes e prepare-se para transferir a placa de 96 poços (já selada) para o fluxo de amostras.

5. Adição das Amostras à Placa de 96 Poços

5.1. No fluxo de amostras, após vortexar as amostras, adicione a amostra correspondente em cada poço que já contém o mix de reagentes, conforme se apresenta a **Tabela 2**.

Obs.: Ao pipetar as amostras, certifique-se de que não há resíduo de amostra na ponteira ao dispensar no poço.

5.2. Após a adição de todas as amostras nos poços:

- Coloque o selo sobre a placa de 96 poços.

6. Vortexagem e Verificação da Placa

6.1. Com a placa selada, cubra-a com um papel toalha e proceda com a **vortexagem** da placa para garantir a homogeneização do conteúdo dos poços por 20 segundos após a velocidade máxima do vortex.

6.2. Após a vortexagem, verifique se há **bolhas** em cada poço. Caso haja bolhas, corrija com leves toques na lateral da placa, e se não corrigir favor repetir o **item 6.1**.

7. Finalização

7.1. Após verificar a placa e corrigir da presença de bolhas, coloque-a na cabine de ligação entre os setores de Genômica 1 e Genômica 2, coberta por um papel toalha.

8. Limpeza Final

8.1. Antes de sair do Genômica 1, verifique as câmeras de fluxo de amostras e de reagentes para garantir que todas as ponteiras usadas foram descartadas no **Descartex**.

8.2. Realize a limpeza e desinfecção do fluxo de amostras, incluindo a esterilização com luz UV por 15 minutos.

Anexo 7 – Componentes do Mix de Reagentes

(Preencher de acordo com o protocolo específico)

Reagentes	1 Amostra	Cálculo p/ 100 poços
Master Mix (20x)	2,5 µL	250 µL
Água ultrapura	1,375 µL	137,50 µL
Sonda TaqMan	0,125 µL	12,5 µL
Total	4,0 µL	400 µL
Reagentes	1 Amostra	Cálculo p/ 50 poços
Master Mix (20x)	2,5 µL	125 µL
Água ultrapura	1,375 µL	68,75 µL
Sonda TaqMan	0,125 µL	6,25 µL
Total	4,0 µL	200 µL

Obs.: Veja que há duas categorias de preenchimento – Para 50 poços e para 100 poços

Anexo 8 – Esquema de Identificação da Placa de 96 Poços
MAPA DA PLACA – 31/08/2024
Gene: HLA-G

MAF: 0.49

ID: *Ex.: HLAGrs1710_PL1_31082024*
Alelo Selvagem: G

Alelo variante: C

Sonda: VIC (G) FAM (C)

Amostras: Caixa 1 (AF), Caixa 2 (AF)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	BRANCO	SS 004	SS 012	SS 020	SS 028	CTL-001							A
B	CVO 001	SS 005	SS 013	SS 021	SS 029	CTL-002							B
C	CVO 002	SS 006	SS 014	SS 022	SS 030	CTL-003							C
D	CVO 003	SS 007	SS 015	SS 023	SS 031	CTL-004							D
E	CVO 004	SS 008	SS 016	SS 024	SS 032	CTL-005							E
F	CVO 005	SS 009	SS 017	SS 025	SS 033	CTL-006							F
G	CVO 006	SS 010	SS 018	SS 026	SS 034	CTL-007							G
H	CVO 008	SS 011	SS 019	SS 027	SS 035	CTL-008							H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

* Adicionar: 4µL Δ: inserida □: inserida # Adicionar a duplicada na placa

Ø Acabou/Discardada

○ Acabou

✗ Não foi colocado; não tinha

Anexo 9: Protocolo de ELISA

POP: Quantificação de HLA-G Solúvel por ELISA Sandwich

1. Objetivo

Quantificar a concentração de HLA-G solúvel (sHLA-G) em amostras humanas (soro, plasma ou outros fluidos biológicos) através do ensaio imunoenzimático tipo ELISA (Sanduíche), utilizando o kit Thermo Fisher – Código: EEL051.

2. Materiais e Reagentes

2.1. Fornecidos no kit:

- Microplaca 96 poços pré-revestida com anticorpo anti-HLA-G.
- Anticorpo de detecção biotilado (100X).
- Conjugado HRP (100X).
- Diluentes: amostra/padrão, anticorpo biotilado e conjugado HRP.
- Padrão HLA-G (2 frascos).
- Solução de lavagem (25X).
- Substrato TMB.
- Solução de parada (ácido sulfúrico 1M).
- Seladores de placa.

2.2. Não fornecidos:

- Pipetas e ponteiros estéreis.
- Leitor de microplacas (450 nm).
- Lavadora de placas ou sistema manual.
- Tubos estéreis para diluição.
- Água deionizada/ultrapura.
- Incubadora a 37°C.
- Centrífuga refrigerada.

3. Amostras

3.1. Plasma:

- Anticoagulante: EDTA (preferencial).
- Centrifugar: 1000×g por 15 min (2-8°C).
- Coletar sobrenadante.

Observações:

- Usar tubos livres de endotoxinas.
- Evitar amostras hemolisadas/lipêmicas.
- Armazenamento: 2–8°C até 7 dias; -20°C até 1 mês; -80°C até 3 meses. Evitar ciclos de congelamento/descongelamento.

4. Preparo dos Reagentes

4.1. Solução de Lavagem 1X

- 1) Diluir 30 mL de tampão 25X em 720 mL de água deionizada.
- 2) Validade após diluição: 3 meses (2–8°C).

4.2. Anticorpo Biotinilado 1X

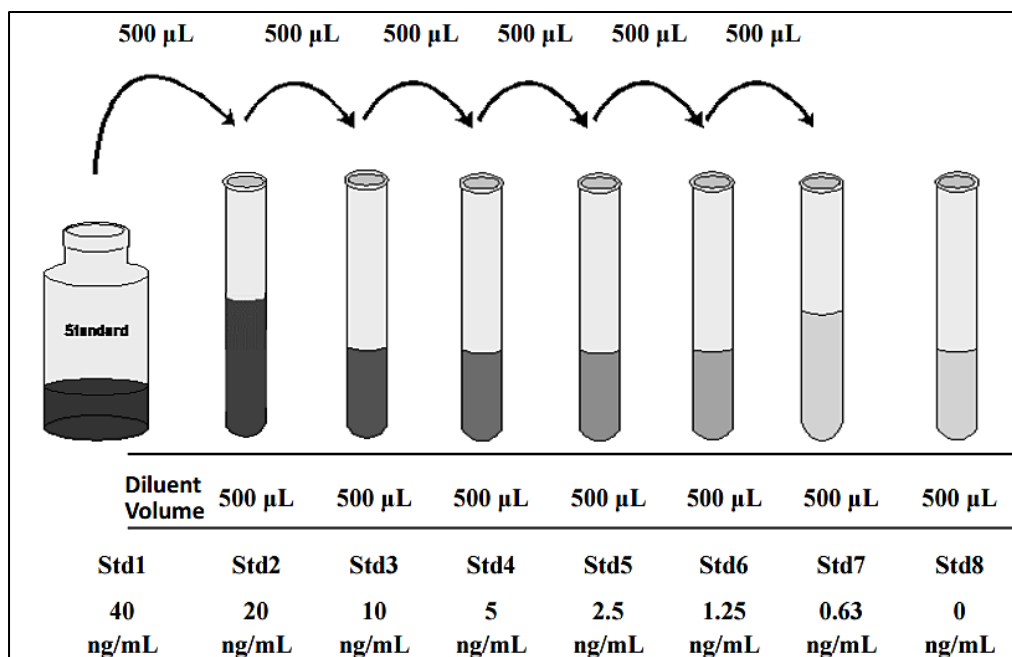
- 1) Centrifugar o concentrado (800×g, 1 min, 2–8°C).
- 2) Diluir 1:100 com diluente apropriado (descrito na tabela abaixo). Preparar antes do uso.

4.3. Conjugado HRP 1X

- 1) Centrifugar o concentrado (800×g, 1 min, 2–8°C).
- 2) Diluir 1:100 com diluente apropriado (descrito na tabela abaixo). Preparar antes do uso.

4.4. Curva Padrão

- 1) Reconstituir padrão com 1 mL do diluente.
- 2) Preparar diluições seriadas (1:2) para obter: 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0 ng/mL.
- 3) Seguir exemplo abaixo:



Utilize os padrões diluídos em até 2 horas após a preparação. Se forem realizados vários testes padrão, a solução padrão redissolvida (padrão com a maior concentração) pode ser dividida em 2 a 3 frascos e congelada a -20°C, para ser usada em até meio mês. Evite múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento.

Reagente	Estoque (fornecido)	Diluição	Diluyente apropriado	Observações
Anticorpo Biotinilado (Detection Ab)	100X	1:100	Biotinylated Detection Antibody Diluent	Preparar 100 µL/poço . Centrifugar antes de diluir.
Conjugado HRP	100X	1:100	HRP Conjugate Diluent	Preparar 100 µL/poço . Centrifugar antes de diluir.
Solução de Lavagem (Wash Buffer)	25X	1:25	Água deionizada/destilada	Ex: 30 mL concentrado + 720 mL água = 750 mL (1X).
Padrão HLA-G (Standard)	Pó liofilizado	Reconstituir + 1:2	Standard & Sample Diluent	Reconstituir com 1 mL → fazer diluições seriadas 1:2.
Amostras	-	Conforme curva	Standard & Sample Diluent	Ajustar diluição para ficar dentro da curva (0.63–40 ng/mL).
Substrato TMB	Pronto para uso	Nenhuma	-	Proteger da luz. Adicionar 90 µL/poço .
Solução de Parada (Stop Solution)	Pronto para uso	Nenhuma	-	Adicionar 50 µL/poço , com cuidado.

Recomendações importantes:

- Sempre centrifugar os reagentes concentrados antes da diluição.
- Preparar apenas o volume necessário (com pequena sobra).
- **Usar os diluentes fornecidos no kit** — eles são otimizados para evitar ruído de fundo e aumentar a sensibilidade.
- Preparar as soluções imediatamente antes do uso, exceto a solução de lavagem 1X que pode ser armazenada por até 3 meses (2–8 °C).

5. Procedimento Experimental

1. Ligação do antígeno

Observação: as soluções devem ser adicionadas ao fundo do poço da placa de ELISA, evitando tocar a parede interna e causar formação de espuma, tanto quanto possível.

a. Para a curva padrão, adicione 100 μL de padrões aos poços apropriados.

Para amostras, adicione 100 μL de amostras pré-tratadas aos poços.

b. Cubra a placa com selante e incube por 90 min a 37°C.

c. Aspire completamente a solução. Não lave.

2. Adicione o anticorpo de detecção biotinizado.

a. Adicione 100 μL da Solução de Trabalho para Anticorpo de Detecção Biotinilado em cada poço.

b. Cubra a placa com selante e incube por 60 min a 37°C.

c. Aspire completamente a solução e lave os poços 3 vezes com 350 μL de Tampão de Lavagem 1X. Decante a solução de cada poço, adicione 350 μL de tampão de lavagem a cada poço. Deixe de molho por 1 minuto e aspire ou decante a solução de cada poço, secando-a com papel absorvente limpo.

Prossiga imediatamente para a próxima etapa, certificando-se de que os poços não sequem.

3. Adicione o conjugado HRP

a. Adicione 100 μL da Solução de Trabalho do Conjugado HRP em cada poço.

b. Cubra a placa com selante e incube por 30 minutos a 37°C.

c. Aspire completamente a solução e repita o processo de lavagem por 5 vezes, conforme realizado na etapa 2.

4. Adicione o substrato

a. Adicione 90 μL do Reagente de Substrato a cada poço.

b. Cubra a placa com selante e incube por cerca de 15 minutos a 37°C.

Proteja a placa da luz.

Nota: O tempo de reação pode ser reduzido ou estendido de acordo com a mudança de cor real, mas não mais do que 30 min.

5. Adicione a solução de parada

a. Adicione 50 μL da solução de parada a cada poço. Esta etapa deve ser realizada na mesma ordem da solução do substrato. Bata levemente na lateral da placa para misturar.

b. A solução nos poços mudará de azul para amarelo

6. Análise dos Resultados

Leia a placa e gere a curva padrão

1. Pré-aqueça o Leitor de Microplacas por cerca de 15 minutos antes da medição da DO.
2. Leia a absorbância a 450 nm. Leia a placa em até 10 minutos após a adição da Solução de Parada.
3. Use um software de ajuste de curva para gerar a curva padrão. Um algoritmo de quatro parâmetros fornece o melhor ajuste da curva padrão. Idealmente, a absorbância de fundo pode ser subtraída de todos os pontos de dados, incluindo padrões, incógnitas e controles, antes da plotagem.
4. Leia as concentrações das amostras incógnitas e controles da curva padrão. Multiplique o(s) valor(es) obtido(s) para a(s) amostra(s) pelo fator apropriado para corrigir a diluição da amostra.

Observação: Se a DO da amostra ultrapassar o limite superior da curva padrão, você deverá testar novamente com uma diluição apropriada.

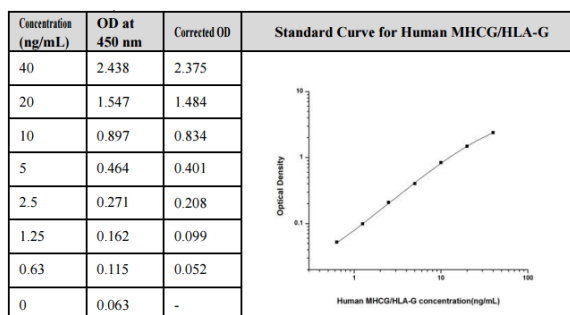
7. Critérios de Aceitação

- 1) CV intraensaio <10%.
- 2) CV interensaio <15%.
- 3) Amostras devem se situar dentro da faixa da curva padrão.
- 4) Substituir reagentes vencidos ou contaminados.

8. Características de desempenho

Curva padrão (exemplo)

Como os valores de DO da curva padrão podem variar de acordo com as condições de desempenho do ensaio (por exemplo, operador, técnica de pipetagem, técnica de lavagem ou efeitos de temperatura), o operador deve estabelecer uma curva padrão para cada teste. A curva padrão típica e os dados na faixa de 0 a 40 ng/mL de MHCG/HLA-G são fornecidos abaixo apenas para referência.



9. Referência

Manual do Kit ELISA Thermo Fisher Scientific - Cat. EEL051 – Rev 2.0 (Dez/2024).