



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ALEXANDRA SILVA LEAL**

**“POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À HEMOGLOBINA FETAL E  
DETERMINAÇÃO MOLECULAR DA CO-HERANÇA COM A ALFA-  
TALASSEMIA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME”**

**UBERABA-MG  
2019**

ALEXANDRA SILVA LEAL

**“POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À HEMOGLOBINA FETAL E DETERMINAÇÃO MOLECULAR DA CO-HERANÇA COM A ALFA-TALASSEMIA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME”**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação Stricto-sensu em Ciências da Saúde, área de concentração “Medicina Translacional”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Paulo Roberto Juliano Martins

Co-orientadora: Dra. Gláucia Aparecida Domingos Resende

**UBERABA-MG  
2019**

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

L47p

Leal, Alexandra Silva

Polimorfismos associados à hemoglobina fetal e determinação molecular da co-herança com a alfa-talassemia em pacientes com anemia falciforme / Alexandra Silva Leal. -- 2019.

70 f. : il., fig., graf., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Juliano Martins

Coorientadora: Profa. Dra. Gláucia Aparecida Domingos Resende

1. Anemia falciforme. 2. Talassemia alfa. 3. Hemoglobina fetal. 4. Polimorfismo genético I. Martins, Paulo Roberto Juliano. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.155.194



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

### ATESTADO DE APROVAÇÃO

Uberaba, 09 de abril de 2019.

Defesa de tese e exame final de **ALEXANDRA SILVA LEAL**,  
candidato (a) ao grau de Doutor (a) em Ciências – Medicina Translacional.

A Comissão Examinadora comunica à Coordenadoria do PGCS/UFTM,  
para os devidos fins, que procedeu, nesta data, ao exame da Tese de Doutorado  
“**POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À HEMOGLOBINA FETAL E  
DETERMINAÇÃO MOLECULAR DA CO-HERANÇA COM A ALFA-  
TALASSEMIA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**” do Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, bem como ao exame final.

O (a) candidato (a) foi considerado (a) APROVADA.

#### A COMISSÃO:

Dr. Paulo Roberto Juliano Martins

Paulo Roberto Juliano Martins

Dra. Márcia Maria Ferreira da Silva

Márcia Maria Ferreira da Silva

Dr. André Rolim Belisário

André Rolim Belisário

Dra. Renata Margarida Etchebehere

Renata Margarida Etchebehere

Dr. Helio Moraes de Souza

Helio Moraes de Souza



## *Dedicatória*

Aos meus filhos João Lucas e Rafael, me faltam palavras para descrever o amor que sinto por vocês, meus maiores motivos para nunca pensar em desistir de um desafio. São as grandes riquezas da minha Vida, peço desculpas, pelos momentos de ausência, pelas vezes, que lhes privei da minha companhia para que essa Tese fosse concluída. Meus anjos, vocês são a melhor parte de mim!

Ao meu esposo Evani Júnior, obrigada por acolher meus ideais. Seu amor e sua dedicação à nossa Família foram essenciais para que eu começasse a almejar e conseguisse concluir essa tese.

À minha querida Mãe Dalva, que sempre abriu mão dos seus projetos, em favor dos meus. Você é meu porto seguro, obrigada por poder contar com a sua ajuda e pelo seu amor incondicional a mim e aos meus filhos. Minha eterna gratidão.

Ao meu querido Pai Wilson, que tanto me incentiva, sempre me estimula a ir mais longe e que nunca deixou que eu desistisse dos meus objetivos. Obrigada por tudo.

Ao meu irmão Wilson Júnior e minha cunhada Luciana que sempre são tão presentes em minha vida, obrigada pelo carinho, amizade e pelas palavras de encorajamento nos momentos que precisei. Aos meus filhos espirituais e de coração, meus afilhados Valentina e Mateus, que sempre me contagiam com alegria e afeto, a madrinha ama muito vocês.

À minha madrinha Águeda Maria, obrigada por todas as ajudas, por apoiar todos os meus sonhos.

Ao meu segundo pai, meu padrinho Mário Lúcio, que se encontra no plano espiritual e para sempre no meu coração, sou eternamente grata.

# *Agradecimentos*

Agradeço a Deus, que com sua providência Divina, nunca me abandonou, renovando minha Fé, mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço a Nossa Senhora Aparecida, por sua intercessão milagrosa, meu refúgio.

Ao meu orientador, Dr. Paulo, que sempre abriu as portas da Instituição para mim, desde a orientação do meu projeto de conclusão de curso na graduação. Sempre disposto a ajudar, com extrema competência e profissionalismo, meu muito obrigado!

À minha co-orientadora e amiga e Dra. Gláucia Aparecida Domingos Resende obrigada pelos ensinamentos, por conduzir com maestria a parte prática desse trabalho, por me acolher com tanto carinho e pela compreensão nas minhas ausências.

Ao professor Dr. Gilberto de Araújo Pereira, por contribuir tanto para esse trabalho, desde a criação do nosso banco de dados até as análises estatísticas.

Aos professores Dra. Sheila Soares Silva e Dr. Hélio Moraes de Souza, pela disposição e atenção em me auxiliar todas que foram solicitados.

Aos professores do curso de graduação em Nutrição da UFTM, que tanto contribuíram para que eu me apaixonasse cada dia mais pela ciência dos alimentos.

À minha amiga Aline Meneses, obrigada pelo carinho, pelas ajudas, pelas correções e por me manter encorajada quando tudo parecia dar errado!

À amiga Fernanda Bernadelli por todas as ajudas, muito obrigada.

Aos funcionários do Hemocentro Regional de Uberaba, em especial, à Leila e Maria Célia, pela gentileza e colaboração.

# *Epígrafe*

*“Não há progresso sem esforço, vitória sem luta, aperfeiçoamento sem sacrifício, assim como não existe tranquilidade sem paciência!”*

*Chico Xavier*

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A anemia falciforme, é uma doença com grande variedade fenotípica, causada por uma mutação pontual no gene da cadeia da  $\beta$ -globina. Os polimorfismos associados à síntese de hemoglobina fetal (HbF), têm sido associados à modulação dos níveis de HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ), cuja variação desta pode minimizar ou acentuar a gravidade da anemia falciforme. A co-herança com a alfa-talassemia também é outro fator que pode modular o fenótipo da doença. **OBJETIVO:** Avaliar a associação de polimorfismos previamente descritos nos loci *BCL11A* (rs4671393, rs11886868 e rs766432) com a expressão da hemoglobina fetal e determinar a frequência da co-herança com a alfa-talassemia e dos haplótipos da globina beta S, nos indivíduos com AF em acompanhamento na Universidade Federal do Triângulo Mineiro e Hemocentro Regional de Uberaba/Fundação Hemominas. **METODOLOGIA:** Os dados laboratoriais e clínicos foram retirados dos prontuários, a determinação da hemoglobina fetal foi realizada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A presença da co-herança da alfa-talassemia com a AF foi investigada pela técnica de Gap-PCR multiplex. Os haplótipos da globina beta S e a presença dos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) em *BCL11A* (rs4671393; rs766432 e rs1186868) foram analisados pela técnica de PCR-RFLP. **RESULTADOS:** A maioria dos pacientes possuem o haplótipo CAR, e os que possuem esse haplótipo em heterozigose fazem mais uso da terapia com Hidroxiuréia. O alelo A do SNP rs4671393 foi associado ao aumento relativo de HbF ( $p=0,0019$ ). Em relação à co-herança com  $\alpha$ -talassemia, dos 62 pacientes genotipados, 14 (22,6%) apresentaram co-herança, um homozigoto ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ) e os demais heterozigotos para as deleções (12 foram  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  e um  $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ ), sem associação significativa com os parâmetros clinico-laboratoriais avaliados. **CONCLUSÃO:** Os parâmetros avaliados e descritos podem contribuir para um melhor acompanhamento clínico da Anemia Falciforme. A associação do rs4671393 com o aumento da HbF encontrada nesse estudo, confirma a importância da análise genômica na elucidação das variações fenotípicas, sugerindo que a presença do alelo A nesse SNP, possa conferir melhor prognóstico aos portadores de anemia falciforme devido ao aumento da HbF.

**Palavras-chaves:** anemia falciforme; alfa-talassemia; hemoglobina fetal; polimorfismos

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Sickle cell anemia (SCA) is a disease with a large phenotypic variety, caused by a point mutation in the  $\beta$ -globin chain gene. The polymorphisms associated with fetal hemoglobin synthesis (HbF) have been associated with modulation of HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) levels, whose variation of this can minimize or accentuate the severity of sickle cell anemia. Co-inheritance with alpha-thalassemia is also another factor that can modulate the disease phenotype. **OBJECTIVE:** To evaluate the association of previously described polymorphisms in BCL11A loci (rs4671393, rs11886868 and rs766432) with fetal hemoglobin expression and to determine the frequency of co-inheritance with alpha-thalassemia and globine beta S haplotypes in individuals with AF in follow-up at the Service of Hematology of Federal University of Triângulo Mineiro and cromatografiaUberaba Regional Blood Center. **METHODOLOGY:** Laboratory and clinical data were taken from the medical records. The determination of fetal hemoglobin was performed using efficiency liquid chromatography (HPLC). The presence of co-inheritance of alpha-thalassemia with SCA was investigated by the multiplex Gap-PCR technique. The globin beta S haplotypes and the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in BCL11A trait (rs4671393; rs766432 and rs11886868) were analyzed by the PCR-RFLP technique. **RESULTS:** Most patients have the CAR haplotype, and those with this haplotype in heterozygosity make more use of the therapy with Hydroxyurea. Allele A of the SNP rs4671393 was associated with the relative increase of HbF ( $p = 0.0019$ ). With respect to co-inheritance with  $\alpha$ -thalassemia, of the 62 genotyped patients, 14 (22.6%) presented co-inheritance, one homozygote ( $-\alpha_{3.7} / -\alpha_{3.7}$ ) and the other heterozygotes for the deletions (12 were  $-\alpha_{3.7} / \alpha\alpha$  and one  $-\alpha_{4.2} / \alpha\alpha$ ), without significant association with the clinical-laboratory parameters evaluated. **CONCLUSION:** The parameters evaluated and described may contribute to a better clinical follow - up of Sickle Cell Anemia. The association of rs4617393 with the increase in HbF found in this study confirms the importance of genomic analysis in the elucidation of phenotypic variations, suggesting that the presence of the A allele in this SNP may give a better prognosis to patients with sickle cell anemia due to increased HbF.

**Keywords:** sickle cell anemia; alpha-thalassemia; fetal hemoglobin; polymorphisms

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Molécula da hemoglobina	16
<b>Figura 2</b>	Organização dos genes da globina $\beta$ no cromossomo 11 e <i>switching</i> de globinas ao longo do desenvolvimento ontogenético humano	17
<b>Figura 3</b>	Rota do tráfico de escravos da África para o Brasil	20
<b>Figura 4</b>	<i>Locus</i> para a globina $\beta$	26
<b>Figura 5</b>	Modelo de mediação silenciosa de BCL11A no gene da $\gamma$ -globina por meio do complexo de fatores de transição	27
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática do grupamento gênico da $\alpha$ globina, sítio de anelamento dos <i>primers</i> e extensão das deleções investigadas	41
<b>Figura 7</b>	Uso de HU em relação a classificação dos haplótipos da $\beta^S$ globina (Homo-CAR; Hetero-CAR e Não-CAR)	47
<b>Figura 8</b>	Uso de HU em relação a classificação dos haplótipos da $\beta^S$ globina (CAR/CAR versus outros haplótipos)	47
<b>Figura 9</b>	Valores de HbF em relação aos genótipos do rs4671393	52
<b>Figura 10</b>	Número de interações em relação aos genótipos do rs766432	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b>	Distribuição dos Haplótipos da Globina $\beta$ no Brasil	22
<b>Tabela 02</b>	Tamanho dos fragmentos de DNA amplificados, após clivagem pelas respectivas enzimas de restrição, usados na determinação dos haplótipos da $\beta^S$	34
<b>Tabela 03</b>	Sequência dos primers usados na determinação dos haplótipos da $\beta^S$	34
<b>Tabela 04</b>	Reagentes das reações de PCRs para amplificação das regiões polimórficas do cluster da globina $\beta$	35
<b>Tabela 05</b>	Condições das PCRs utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do cluster da globina $\beta$	35
<b>Tabela 06</b>	Reagentes das reações de digestão enzimática utilizadas para análise dos polimorfismos do cluster da globina $\beta$	36
<b>Tabela 07</b>	Padrão dos polimorfismos para cada haplótipo	37
<b>Tabela 08</b>	Reagentes das reações de digestão enzimática utilizadas para análise dos polimorfismos do cluster da globina $\beta$	38
<b>Tabela 09</b>	Reagentes das reações de digestão enzimática utilizadas para análise dos polimorfismos do cluster da globina $\beta$	38
<b>Tabela 10</b>	Primers e condições de PCR para a amplificação da região que contém o SNP rs11886868	39
<b>Tabela 11</b>	Enzimas e condições utilizados na técnica de RFLP para os SNPs da HbF	37
<b>Tabela 12</b>	<i>Primers</i> utilizados no PCR multiplex em tubo único para análises de $\alpha$ talassemia (deleções $-\alpha^{3.7}$ , $-\alpha^{4.2}$ , $--_{SEA}$ , $--_{FIL}$ , $--_{THAI}$ , $--_{MED}$ e $-\alpha^{20.5}$ )	40

<b>Tabela 13</b>	Caracterização da amostra estudada quanto ao uso de HU	42
<b>Tabela 14</b>	Parâmetros clínico-laboratoriais de acordo com os haplótipos do gene da globina $\beta^S$	44
<b>Tabela 15</b>	Associação entre o uso de HU e os haplótipos do gene da globina $\beta^S$	45
<b>Tabela 16</b>	Parâmetros clínico-hematológico quanto à co-herança com a $\alpha$ -talassemia	47
<b>Tabela 17</b>	Frequências alélicas dos polimorfismos da HbF dos loci BCL11A	49
<b>Tabela 18</b>	Frequência dos genótipos nos polimorfismos em BCL11A	50
<b>Tabela 19</b>	Parâmetros clínico-hematológicos em relação ao rs4671393	50
<b>Tabela 20</b>	Parâmetros clínico-laboratorial em relação ao rs766432	52
<b>Tabela 21</b>	Parâmetros clínico-laboratorial em relação ao rs11886868	53

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>AF</b>	Anemia Falciforme
<b>ARAB</b>	Árabe Indiano
<b>BCL11A</b>	<i>B-cell CLL/lymphoma 11A</i>
<b>BEN</b>	Benin
<b>CAM</b>	Camarões
<b>CAR</b>	República Centro Africana
<b>DF</b>	Doença Falciforme
<b>DNA</b>	Ácido dextrorribonucléico
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>Hb S</b>	Hemoglobina S
<b>HBB</b>	Gene da globina beta
<b>HbF</b>	Hemoglobina Fetal
<b>HBS1L-MYB</b>	Região intergênica do cromossomo 6q23
<b>HGB</b>	Gene da globina gama
<b>HMIP</b>	Corresponde ao <i>locus</i> HBS1L-MYB
<b>HU</b>	Hidroxiuréia
<b>HWE</b>	Equilíbrio de Hardy–Weinberg
<b>KLF1</b>	<i>Kruppel-like factor 1</i>
<b>LCR</b>	Região Controladora do Locus
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da Polimerase
<b>QTL</b>	Traço quantitativo do loci
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição
<b>SEN</b>	Senegal
<b>SNPs</b>	Polimorfismos de único nucleotídeo
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\gamma</math></b>	Gama

## SUMARIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	16
2.1	ESTRUTURA E SÍNTESE DA HEMOGLOBINA	16
2.2	ANEMIA FALCIFORME	17
<b>2.2.1</b>	<b>Fisiopatogenia da Anemia Falciforme</b>	18
2.3	HAPLÓTIPOS DO GENE B <sup>S</sup>	19
2.4	CO-HERANÇA COM A ALFA TALASSEMIA	23
2.5	HEMOGLOBINA FETAL	24
2.6	POLIMORFISMOS DA HbF	25
<b>2.6.1</b>	<b>Oncogene <i>BCL11A</i></b>	26
<b>2.6.2</b>	<b>Região intergênica <i>HBS11-MYB (HMIP)</i></b>	28
2.7	A HIDROXIURÉIA NA ANEMIA FALCIFORME	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	30
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	31
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	31
4.2	DELINEAMENTOS E CASUÍSTA	31
<b>4.2.1</b>	<b>Leitura dos prontuários</b>	31
<b>4.2.2</b>	<b>Estudo Molecular</b>	32
4.2.2.1	<i>Obtenção da Amostra</i>	32
4.2.2.2	<i>Extração do DNA</i>	32

4.2.2.3	<i>Determinação dos haplótipos da globina <math>\beta</math></i>	33
4.2.2.4	<i>Análise dos polimorfismos da Hb fetal</i>	37
4.2.2.5	<i>Análise molecular da co-herança com a alfa-talassemia</i>	40
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	43
5.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	43
5.2	HAPLÓTIPOS DA BETA-GLOBINA	44
5.3	CO-HERANÇA COM A ALFA-TALASSEMIA – Deleção – $\alpha 3.7$ e $-\alpha 4.2$	48
5.4	POLIMORFISMOS DA HEMOGLOBINA FETAL	50
<b>5.4.1</b>	<b>Frequências alélicas dos polimorfismos da HbF dos loci BCL11A e HBS1L-MYB</b>	50
<b>5.4.2</b>	<b>Frequência dos genótipos nos polimorfismos em BCL11A</b>	50
<b>5.4.3</b>	<b>Caracterização dos níveis de Hb total basal, HbF basal e número de internações por crise vaso-oclusiva quanto aos polimorfismos estudados</b>	51
5.4.3.1	<i>Polimorfismo rs4671393</i>	51
5.4.3.2	<i>Polimorfismo rs766432</i>	53
5.4.3.3	<i>Polimorfismo rs11886868</i>	54
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	56
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	57
	<b>REFERÊNCIAS</b>	58
	<b>ANEXOS</b>	67

## 1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma doença causada por uma mutação pontual no gene da cadeia  $\beta$ -globina ( $\beta^S$ ), localizado no cromossomo 11, que leva à substituição da adenina (A) para timina (T) no códon 6 (GAG  $\rightarrow$  GTG), resultando na troca do aminoácido ácido glutâmico para valina (STEINBERG, 1996).

O quadro clínico e hematológico pode variar de uma doença grave até formas assintomáticas. Suas características hematológicas, bem como a gravidade clínica, são afetadas por variações nos níveis de hemoglobina fetal, presença simultânea de  $\alpha$ -talassemia, deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, haplótipos relacionados ao aglomerado gênico da  $\beta$ -globina e disfunção endotelial (MORENO *et al*, 2002; GONÇALVES *et al*, 2003; RUSANOVA *et al*, 2010).

O conjunto de regiões polimórficas de um cromossomo são denominados haplótipos, marcadores úteis para estudos antropológicos e definição do fluxo do alelo  $\beta^S$  em populações humanas. Os haplótipos da globina  $\beta^S$  têm origens étnicas e geográficas diferentes: a República Centro-Africana (CAR), ou tipo Bantu, na África Central e do Sul; o tipo Benin (BEN), originado no Centro-Oeste Africano; o tipo Senegal (SEN), característico da África Atlântica; o tipo Camarões (CAM), encontrado dentro das fronteiras geográficas daquele país e em uma pequena parte da costa oeste da África; e os árabes-indianos ou asiáticos, presentes na Península Arábica e na Índia (ANTONARAKIS *et al*, 1985).

Esses diferentes haplótipos estão relacionados a níveis variáveis de hemoglobina fetal (HbF) e, conseqüentemente, também a características clínicas variadas: o SEN e os Árabes-Indianos geralmente estão associados a níveis elevados de HbF (> 15%) e um curso clínico moderado da doença; BEN e CAM, estão associados a níveis medianos de HbF (5% a 15%) e quadro clínico intermediário; o Bantu ou CAR mostra níveis diminuídos de HbF (<5%) e sinais clínicos mais graves (EMBURY *et al*, 1994; HIROKAWA *et al*, 1995).

Além dos haplótipos, a co-herança com a  $\alpha$ -talassemia também pode modular o fenótipo da AF. Alguns estudos, demonstraram que portadores da AF e da deleção dos genes  $\alpha$  possuem sobrevida maior que os indivíduos com genes  $\alpha$  normais, indicando que esta associação favorece uma clínica mais suave da doença (NAGEL e STEINBERG,

2001).

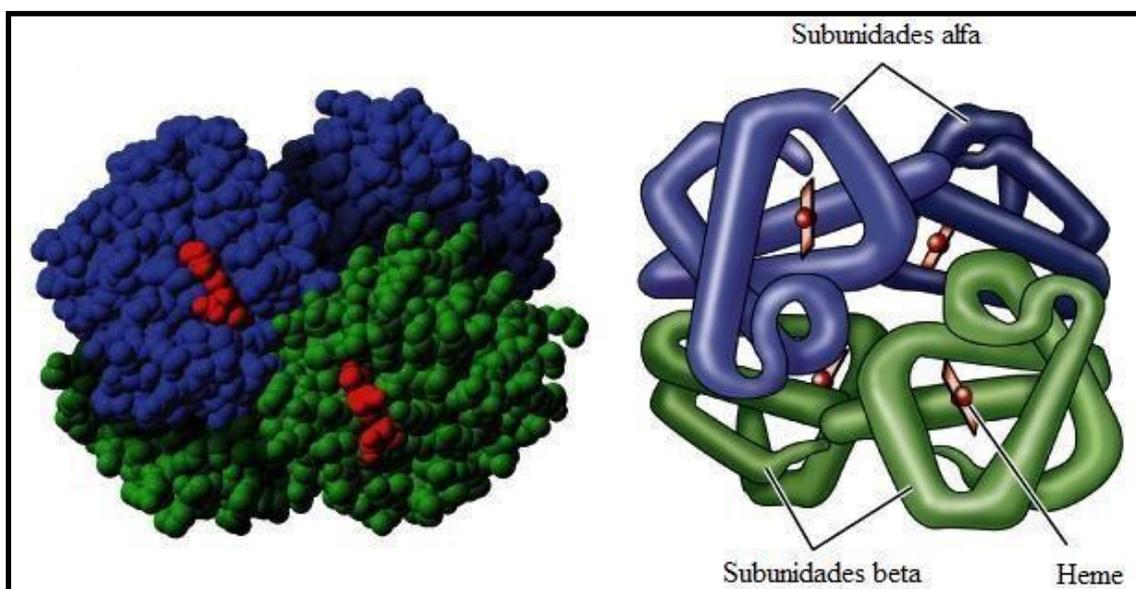
Nas últimas duas décadas, têm sido descritos a importância de polimorfismos associados à modulação dos níveis de HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ), cuja variação pode minimizar ou acentuar a gravidade da doença. Estudos de associação genômica, identificaram três importantes *loci* de características quantitativas (QTL) associados aos níveis de HbF: o polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs), Xmn1-HBG2 no cromossomo 11p15; região intergênica do HMIP (HBS1-MYB) no cromossomo 6q23; e o *locus BCL11A* no cromossomo 2p16 (SANKARAN e WEISS, 2015). Esses três QTL são responsáveis por aproximadamente 20% a 50% da variação nos níveis de HbF na doença falciforme (DF), beta-talassemia e adultos saudáveis (LETTRE *et al*, 2008).

Diante dessas premissas e poucos relatos nessa área, acreditamos que este estudo seja de relevância para um melhor entendimento dos fatores genéticos que podem modular o fenótipo da AF, haja visto que a identificação precoce de determinantes de gravidade do quadro clínico, como polimorfismos associados à variação da HbF, haplótipos da globina  $\beta^S$  e co-herança com a alfa-talassemia, poderão contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatogenia da AF com possíveis implicações prognósticas e abordagens terapêuticas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ESTRUTURA E SÍNTESE DA HEMOGLOBINA

A hemoglobina é uma molécula de estrutura quaternária composta por quatro cadeias polipeptídicas globínicas e quatro grupamentos heme. O grupamento prostético heme, é constituído por um anel tetrapirrólico protoporfirina IX com um átomo de ferro incorporado ao centro (Figura 1). Na hemoglobina A, o grupo heme se associa a uma cadeia polipeptídica alfa, contendo 141 resíduos de aminoácidos e uma cadeia beta que possui 146 aminoácidos (BUNN; FORGET, 1986; MARENGO-ROWE, 2006).

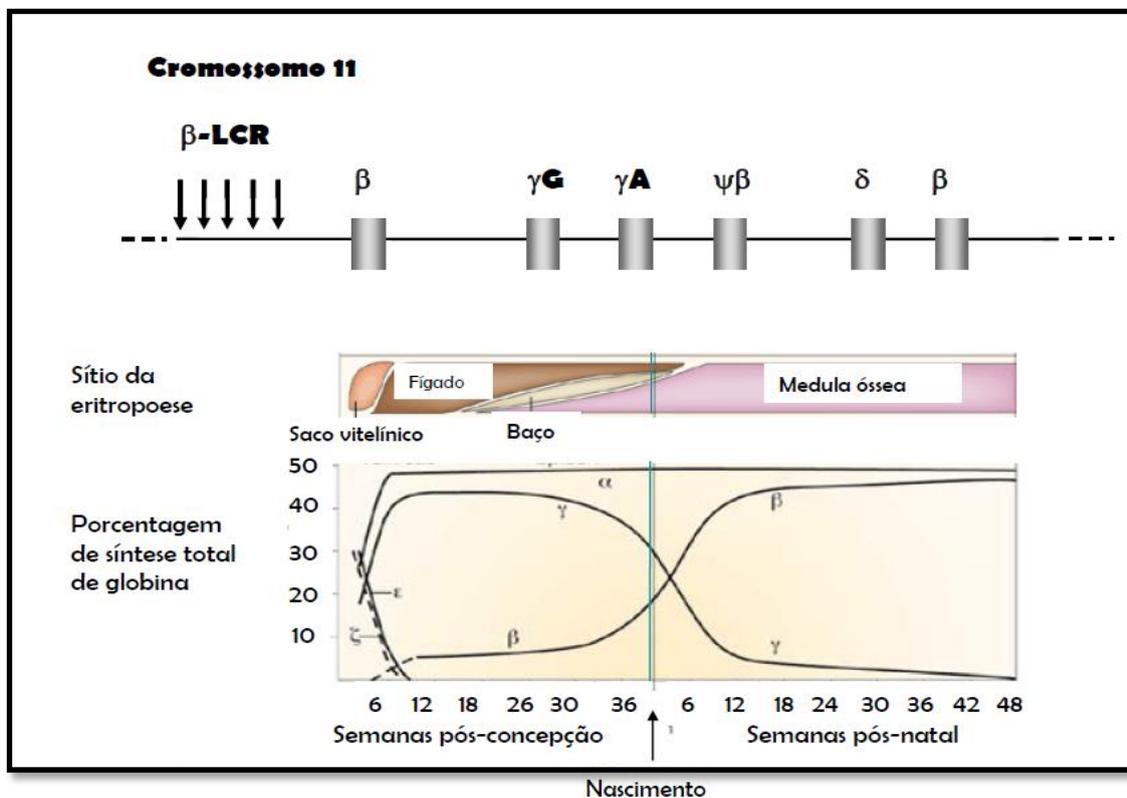


**Figura 1-** Molécula da hemoglobina **Fonte:** Adaptado de BEIGUELMAN, 2006

As hemoglobinas humanas são formadas por cadeias globínicas:  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gama),  $\delta$  (delta),  $\epsilon$  (épsilon) e  $\xi$  (zeta), em diferentes estágios do desenvolvimento, sendo as cadeias  $\alpha$  e  $\xi$  codificadas por genes localizados no cromossomo 16 e as demais, codificadas por genes no cromossomo 11 (Figura 2).

No período fetal, a partir da quinta semana de gestação, ocorre a síntese de hemoglobina fetal (Hb F), formada por cadeias  $\alpha_2$  e  $\gamma_2$  e transferência do sítio de eritropoiese para o fígado e baço. Nesse período, há o nítido predomínio de HbF e pequena quantidade de Hb A<sub>1</sub>. Na fase adulta, esta hemoglobina corresponde a uma proporção de 97%, seguida de 2% de A<sub>2</sub> e 1% de HbF (STAMATOYANNOPOULOS *et al.* 1987; SCHECHTER, 2008).

A expressão do gene beta-globina, localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5), é regulada pela sua proximidade a um grupo que contém pelo menos cinco segmentos de DNA denominados *Locus Control Region* (LCR) (SCHECHTER, 2008).



**Figura 2** – Organização dos genes da globina  $\beta$ , nos cromossomos 11 e *switching* de globinas ao longo do desenvolvimento ontogénico humano. Adaptado de WEATHERALL 2001.

## 2.2 ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme (AF), caracterizada pela homozigose da hemoglobina S ( $\alpha_2\beta^S_2$ ) que resulta de uma mutação pontual no gene da cadeia globínica  $\beta$ , localizado no cromossomo 11, que leva à substituição da base nitrogenada adenina (A) pela timina (T) no códon 6 ( $GAG \rightarrow GTG$ ), acarretando na mudança do aminoácido valina por ácido glutâmico na sexta posição da globina  $\beta$  ( $\beta^S$ ) (NAGEL e STEINBERG, 2001).

O ácido glutâmico é um aminoácido que tem sua cadeia lateral carregada negativamente, enquanto, a valina é considerada um aminoácido neutro. Essa troca modifica suas propriedades físico-químicas, levando a todas as alterações presentes na doença (NAOUM, 2000).

Essa mutação provoca alterações na solubilidade e estabilidade da hemoglobina, levando à polimerização e distorção da membrana eritrocitária, que adquire o aspecto de foice, em situações de hipóxia. Essas células são destruídas prematuramente, levando a um aumento de bilirrubina indireta, desidrogenase láctica (DHL), reticulócitos, o que caracteriza um processo hemolítico crônico (ÂNGULO, 2003; BALLAS e MARCOLINA, 2006;).

As hemácias falcizadas podem se agregar no interior dos vasos capilares e ocasionar obstrução do fluxo, caracterizando a vaso-oclusão e conseqüentemente, induzir a crises dolorosas agudas, priapismo, embolia pulmonar, acidente vascular cerebral (AVC), síndrome torácica aguda e manifestações crônicas, como osteonecrose, úlceras maleolares, déficit do crescimento somático-sexual e comprometimento de vários órgãos e tecidos (ASHLEY-KOCH *et al.*, 2000).

### **2.2.1 Fisiopatogenia da Anemia Falciforme**

O dano isquêmico causado por obstrução mecânica devido a presença de hemácias rígidas e distorcidas, tem sido considerado, o principal componente responsável pela hemólise e pelas lesões agudas e crônicas observadas na doença. No entanto, pacientes com AF apesar de compartilharem a mesma alteração genética, podem apresentar heterogeneidade de manifestações clínicas e prognósticas (ROSSE *et al.*, 2000; STUART e NAGEL, 2004; POWARS, 2005).

A vaso-oclusão e a isquemia tecidual envolvem não somente a polimerização da Hb S, mas também interações entre os eritrócitos, endotélio, plaquetas, leucócitos e fatores plasmáticos. A polimerização da Hb S é o fator mais importante no ciclo da falcização, no entanto um aumento nos níveis de Hb Fetal (HbF), influenciado pelos haplótipos da globina  $\beta^S$  e pelos polimorfismos associados à variação dessa hemoglobina, podem minimizar esse evento (VICHINSKI, 2002),

### 2.3 HAPLÓTIPOS DO GENE $\beta^S$

Os haplótipos são definidos como padrões de vários polimorfismos no DNA ao longo de uma região de um cromossomo, são utilizados para inúmeras finalidades, por exemplo, como marcadores para migração de populações em estudos antropológicos e para detectar “distâncias” genéticas entre os principais grupos étnicos em estudos sobre a origem das raças humanas (NAGEL e RANNEY, 1990).

Os haplótipos  $\beta^S$  representam diferentes origens étnicas e geográficas: o haplótipo Benin (BEN), originado na costa oeste Africana, alcança o norte da África (Argélia e Tunísia), oeste da Arábia e sul da Europa (Portugal, Sicília e Grécia). O haplótipo Bantu foi originalmente identificado na República da África Central (por essa razão, é algumas vezes conhecido como haplótipo CAR) e após, em várias populações de dialeto Bantu, em regiões geográficas separadas do sul da África. O haplótipo Senegal (SEN) originado no oeste da África Atlântica, o Camarões (CAM) ao longo da costa oeste da África e o haplótipo Árabe-indiano (ARAB) ocorre no subcontinente Indiano e a leste da península Árabe, sendo também chamado haplótipo Indo-Árabe (ZAGO *et al.*, 1999; INATI *et al.*, 2003).

O Brasil possui uma população com origem étnica heterogênea, resultado do influxo de muitos grupos imigrantes diferentes e do comércio escravo dos séculos XVIII e XIX (FIGUEIREDO *et al.*, 1996). As diferenças regionais foram marcantes em relação à quantidade e a origem dos escravos que foram recebidos por cada região do país (CURTIN, 1969; ESTIMATES DATABASE, 2010) (Figura 3). Segundo, Zago (1999), esses dados são concordantes com o perfil da frequência dos haplótipos  $\beta^S$ , sendo a grande maioria composta pelos haplótipos CAR e Ben, e uma minoria pelos haplótipos Senegal, Camarões e Árabe-Indiano, conforme ilustrado na tabela 1.



A severidade das manifestações clínicas e hematológicas na AF, é muito variável, podendo ir de uma doença grave a uma condição quase assintomática detectada apenas acidentalmente. Suas características hematológicas, bem como gravidade clínica, são influenciadas por variações nos níveis de hemoglobina fetal, presença simultânea de  $\alpha$ -talassemia, deficiência na glicose-6-fosfato desidrogenase e os haplótipos ligados ao grupamento do gene da  $\beta$ -globina (MORENO *et al.*, 2002).

Sintomas clínicos mais leves têm sido descritos em pacientes que apresentam  $\alpha$ -talassemia e altos níveis de hemoglobina fetal (HbF), ligados à presença de haplótipos específicos (GONÇALVES *et al.*, 2003).

A morbidade na AF surge de eventos vaso-oclusivos ou danos teciduais resultantes da obstrução do fluxo sanguíneo. A oclusão, principalmente em pequenos vasos, determina a grande maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes com DF, tais como: crises álgicas, crises hemolíticas, úlceras de membros inferiores, síndrome torácica aguda, sequestro esplênico, priapismo, necrose asséptica de fêmur, retinopatia, insuficiência renal crônica, auto-esplenectomia, AVC, entre outros (ASHLEY-KOCH *et al.*, 2000).

As manifestações clínicas em pacientes árabes são geralmente mais leves que as manifestações clínicas em africanos, em parte devido à frequente co-herança de elevados níveis de Hb F, que inibe a polimerização da Hb S (INATi *et al.*, 2003).

**Tabela 1** – Frequência dos haplótipos da globina  $\beta^S$  no Brasil.

Autor (Ano da Publicação)	Local	N° de Pacientes	Haplótipos da globina $\beta^S$ (%)					
			CAR	BEN	CAM	SEN	ARAB	ATP
Zago <i>et al</i> (1992)	São Paulo (SP)	37	66,2	23,0	-	1,3	-	9,5
Costa <i>et al</i> (1994)	São Paulo (SP)	37	61,0	38,0	-	-	-	1,0
	Salvador (BA)	36	49,0	51,0	-	-	-	-
Gonçalves <i>et al</i> (1994)	São Paulo (SP)	74	62,2	23,0	-	1,3	-	4,0
Figueiredo <i>et al</i> (1996)	Ribeirão Preto (SP)	67	73,1	25,4	-	1,5	-	-
Gonçalves <i>et al</i> (1996)	Campinas (SP)	142	64,8	35,2	-	-	-	-
Wagner <i>et al</i> (1996)	Porto Alegre (RS)	27	79,6	18,4	-	2,0	-	-
Pante-de-Souza <i>et al</i> (1998)	Belém (PA)	30	67,0	30,0	-	3,0	-	-
Pante-de-Souza <i>et al</i> (1999)	Região Amazônica	10	60,0	10,0	-	30,0	-	-
Gonçalves <i>et al</i> (2003)	Salvador (BA)	78	48,1	45,6	-	3,0	-	-
Adorno <i>et al</i> (2004)	Salvador (BA)	78	43,7	47,5	Outros haplótipos = 8,8%			
Galiza Neto <i>et al</i> (2005)	Fortaleza (CE)	22	31,8	43,2	-	2,3	-	-
Cardoso e Guerreiro (2006)	Belém (PA)	130	66,0	21,8	1,3	10,9	-	-
Fleury (2007)	Rio de Janeiro (RJ)	74	54,0	44,6	-	1,4	-	-
Bezerra <i>et al</i> (2007)	Recife (PE)	127	81,1	14,2	-	-	-	22,7
Adorno <i>et al</i> (2008)	Salvador (BA)	125	41,6	55,2	1,2	0,4	0,4	1,2
Silva <i>et al</i> (2009)	Fortaleza (CE)	34	66,2	22,0	-	-	-	11,8
Silva <i>et al</i> (2010)	Recôncavo Baiano (BA)	17	32,5	52,9	2,9	-	-	11,8
Cabral (2010)	Natal e Mossoró (RN)	53	75,5	11,3	6,6	-	-	6,6
Okimura (2013)	Rio de Janeiro (RJ)	295	72,9	20,3	0,57	0,19	0,28	5,7
Camilo-Araújo (2014)	São Paulo (SP)	117	57,3	33,3	0,0	0,43	0,85	8,1
Watanabe (2017)	Paraná	100	76	17,5	0,5	0,5	-	5,5

## 2.4 CO-HERANÇA COM A ALFA-TALASSEMIA

A denominação talassemia abrange um grupo heterogêneo de distúrbios genéticos da síntese de hemoglobina, caracterizado por redução na produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas de globina, que resulta no desenvolvimento de uma anemia microcítica e hipocrômica (WEATHERAL Le CLEGG, 1981; TOME-ALVES *et al*, 2000).

Indivíduos normais possuem quatro genes responsáveis pela produção de globinas alfa. As formas de talassemia alfa são resultantes da deficiência de um, dois, três ou quatro genes alfa. Seus portadores são caracterizados segundo o número de genes afetados em: portador silencioso (um gene alfa afetado); talassemia alfa heterozigota (dois genes alfa afetados); Doença de hemoglobina H (três genes alfa afetados) e Síndrome de Hidropsia Fetal por Hb Bart's (quatro genes alfa afetados) (NAOUM; BONINI-RODRIGUES, 1998).

Na anemia falciforme (HbSS), a presença de talassemia alfa associada, níveis variáveis de hemoglobina fetal, assim como a herança de diferentes haplótipos do gene da globina beta S, têm sido considerados como fatores determinantes da gravidade clínica da doença. Acredita-se, que em pacientes com a co-herança (HbSS/alfa talassemia), ocorra a inibição da polimerização intracelular da hemoglobina S, diminuição da intensidade de hemólise e por consequência, melhora do quadro clínico (TOMÉ-ALVES *et al*, 2000). Porém, em relação a algumas manifestações clínicas, essa co-herança aumenta o risco de algumas manifestações como osteonecrose, esplenomegalia e crises de dor (BALLAS, 2001).

Segundo Belisário e Viana (2010), a prevalência da  $\alpha$ -talassemia em indivíduos com AF é comum no Brasil. Manifestações graves, como a doença cerebrovascular, ocorre de forma menos frequente nos pacientes com essa co-herança, o que torna desejável a genotipagem para a  $\alpha$ -talassemia em todos os pacientes com AF.

Adicionalmente, as características laboratoriais de indivíduos com AF são modificadas pela coexistência de  $\alpha$ -Tal. Apesar de algumas divergências, a maioria dos estudos mostram aumento do número de hemácias, dos níveis de Hb total e hematócrito e a diminuição dos níveis de VCM, hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), reticulócitos, contagem de leucócitos e do nível de hemólise. No entanto, a coexistência da co-herança parece não

interferir nos níveis de HbF e plaquetas e o real efeito sobre os níveis de bilirrubina e de HbA<sub>2</sub> (BELISÁRIO e VIANA, 2010),

## 2.5 HEMOGLOBINA FETAL

A HbF tem sido o modulador genético mais estudado na AF e é considerada o mais potente modificador da doença, inibindo a polimerização da HbS quando em estado desoxigenado (STEINBERG, 2005).

A maioria dos indivíduos saudáveis produz <0,6% de HbF, embora uma pequena proporção de pessoas produza até 5% (HIGGS; WOOD, 2008).

Na AF, há uma mudança tardia da expressão do gene da gama-globina (HGB) para o gene da beta-globina (HBB) e a substituição de HbF por HbS, por isso, os níveis de HbF permanecem acima do normal na maioria dos pacientes, cuja concentração varia de 0,5% a 30%, com uma média de 8% e está relacionada com a variabilidade clínica e hematológica. Níveis mais elevados associam com redução dos eventos vaso-oclusivos, de sequestro esplênico, mortalidade precoce, redução do número de transfusões e hospitalizações (NAGEL e STEINBERG, 2001; STEINBERG, 2005; MOUSINHO-RIBEIRO *et al*, 2008).

A identificação dos mecanismos de modulação da HbF, como os polimorfismos, é importante pois, envolve não somente a identificação das variantes causais e dos genes cuja expressão é alterada, mas também das consequências funcionais subsequentes (THEIN; MENZEL, 2009).

Segundo os mesmos autores, há dois mecanismos que parecem influenciar na variação da HbF: (1) efeito direto dos produtos do gene (ativação da transcrição ou inibição da repressão do HGB) e (2) aumento da quantidade de HbF por célula devido à alteração da cinética de maturação e diferenciação eritróide, com liberação acelerada de maior número de progenitores que produzem células F com quantidade variáveis de HbF.

## 2.6 POLIMORFISMOS DA HbF

As regiões a 5' dos promotores dos genes globínicos fetais, G $\gamma$ -globina (HBG2) e A $\gamma$ -globina (HBG1), têm sido alvo de estudo devido ao seu papel regulador na expressão desses genes e substituição da síntese de HbF para HbA1. Estas regiões são conhecidas por conterem elementos de regulação a montante das sequências consenso do promotor (BARBOSA *et al.*, 2010).

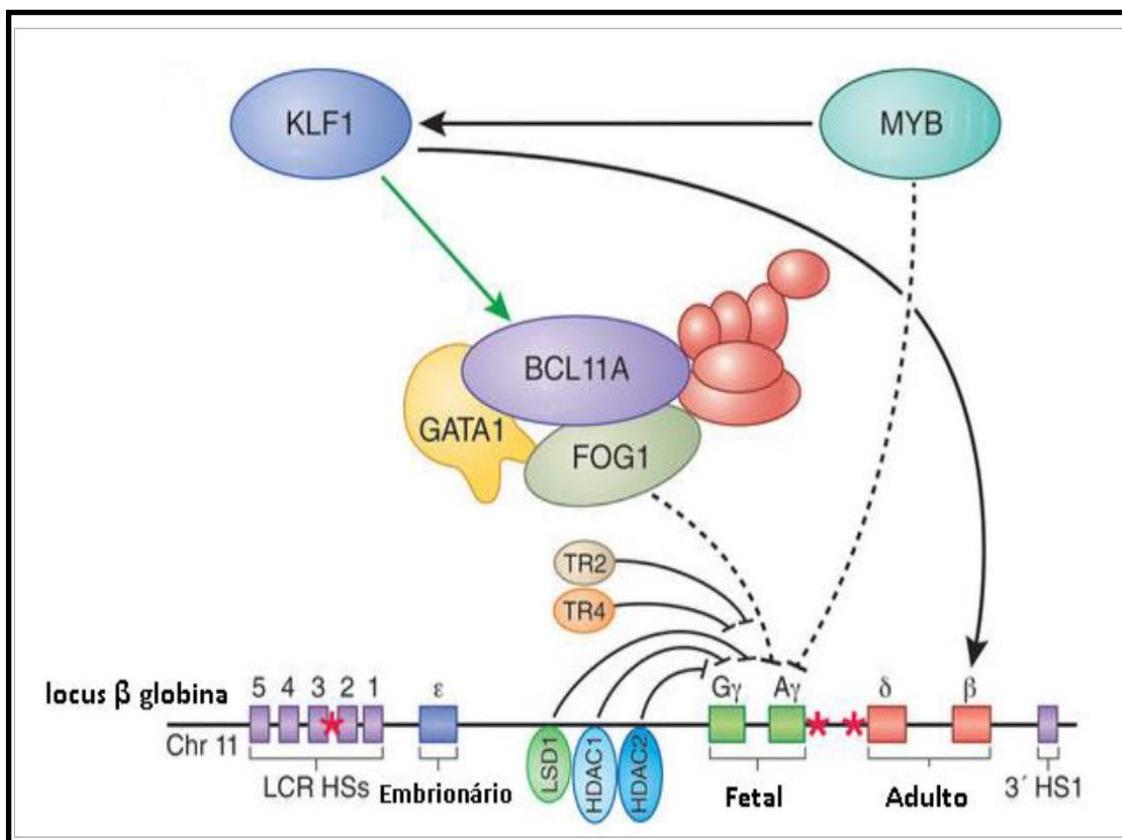
Estudos de associação genética têm revelado que a HbF está sob a influência de importantes *loci* de características quantitativas (QTLs) em portadores de AF, assim, a concentração de HbF nos adultos seria herdada como uma característica genética quantitativa; e a produção de células F é regulada por esses *loci*, que são regiões genômicas responsáveis pela expressão quantitativa de caracteres fenotípicos (MENZEL *et al.*, 2007; CREARY *et al.*, 2009).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nesses três QTLs principais são: o polimorfismo Xmn1-HBG2 no cromossomo 11p15, *locus* BCL11A no cromossomo 2p16 e a região intergênica do HMIP (HBS1-MYB) no cromossomo 6q23 (SANKARAN e WEISS, 2015). Esses polimorfismos presentes nesses QTLs são responsáveis por aproximadamente 20% a 50% da variação nos níveis de HbF na DF, beta-talassemia e em adultos (Figura 4) (MENZEL *et al.*, 2007; LETTRE *et al.*, 2008).



Apesar de não ser completamente conhecido como o fator de transcrição, o gene *BCL11A* exerce o seu efeito no *switching* globínico, sabe-se que quando este está presente, interage em conjunto com diversos fatores de transcrição referidos anteriormente, com o LCR (*Locus Control Region*). Dessa interação resulta a inibição da expressão dos genes  $G\gamma$ - e  $A\gamma$ -globina no período adulto, enquanto que na ausência de *BCL11A* é favorecida a expressão destes genes (SANKARAN *et al*, 2008).

Algumas evidências indicam que o mecanismo de mediação silenciosa do gene *BCL11A* ocorre por meio da cooperação com um fator de transcrição de alta-mobilidade SOX6; e os genes *BCL11A* e SOX6 são co-expressos e interagem fisicamente (Figura 5) (SANKARAN *et al*, 2008; FAN *et al*, 2015).



**Figura 5** - Modelo de mediação silenciosa de *BCL11A* no gene da  $\gamma$ - globina por meio do complexo de fatores de transcrição. O fator de transcrição eritroide KLF1 ativa a transcrição de *BCL11A*, ligando-se a sua região promotora. Possivelmente, a expressão de KLF1 é regulada por MYB. GATA1 e TAL1 se ligam à região acentuadora de *BCL11A*, aumentando sua expressão. *BCL11A* participa de um complexo transcricional multiproteico que atua em precursors eritroides. Suas proteínas parceiras incluem fatores de transcrição (FT's), como GATA1, FOG1 e FOX6, além de reguladores da cromatina e co-repressores transcricionais. Adaptada de Sankaran, Weiss (2015).

Estudos genéticos têm demonstrado a importância fundamental do *BCL11A* no silenciamento dos genes da globina  $\beta$  durante o *switching* e reativação da HbF em

eritroblastos. Foi identificada uma sequência acentuadora (“*enhancer*”) específica de linhagens eritróides localizada no íntron 2 do gene *BCL11A*, responsável pela diminuição da expressão desse fator de transcrição e conseqüentemente pelo aumento nos níveis de HbF (SANKARAN *et al*, 2008; BAUER, 2013).

Entre os SNPs localizados na região íntron 2 de *BCL11A*, o rs4671393 parece ser o marcador genético com associação mais forte aos níveis de HbF. No entanto, outros SNPs (rs7599488, rs766432, rs11886868 e rs10189857) também estão associados à variação dos níveis de HbF (LETTRE *et al*, 2008; GALARNEAU *et al*, 2010).

### 2.6.2 Região intergênica *HBS1L-MYB* (HMIP)

O HMIP (polimorfismo intergênico - HBS1L-MYB) é um segmento de 79Kb, altamente polimórfico, localizado no cromossomo 6 entre o gene HBS1L e o oncogene MYB (6q23.3) que codifica um fator de transcrição essencial para a diferenciação eritróide (THEIN *et al*, 2007; LETTRE *et al*, 2008).

Thein e colaboradores (2007), verificaram que a expressão elevada de mRNA dos genes *HBS1L* e *MYB* em precursores eritróides está associada ao aumento de HbF. Foi comprovado que o gene *HBS1L* está relacionado com aumento da expressão dos genes da globina beta e contagem de eritrócitos, número de plaquetas e monócitos (MENZEL *et al.*, 2007; TESTA, 2009). Estudos observaram que polimorfismos na região intergênica dos genes *MYB-HBS1L* (HMIP) estão associados à síntese de HbF e conseqüentemente redução de crises vaso-oclusivas em indivíduos HbSS (LETTRE *et al.*, 2008; UDA *et al.*, 2008; MAKANI *et al*, 2011).

O papel do gene HBS1L no desenvolvimento e maturação eritróide não está totalmente esclarecido, no entanto, sabe-se que o gene MYB codifica o fator de transcrição MYB, que tem uma função fundamental na regulação da expressão da HbF por ativar diretamente os genes *BCL11A* e *KLF1*, que são repressores da expressão de  $\gamma$ -globina. O gene MYB, portanto, estabeleceria mecanismos moleculares de repressão da síntese de HbF por meio da estimulação dos genes *BCL11A* e *KLF1* (VEGIOPOULOS *et al*, 2006; STADHOUDERS *et al*, 2014).

A região intergênica HMIP tem importante papel na regulação dos níveis de HbF

e pode se associar com parâmetros de diferenciação e maturação eritróide, leucocitária, plaquetária e percentual de HbA2. (STADHOUDERS *et al*, 2014).

Os SNPs em HMIP existem em três blocos HMIP-1, HMIP-2, e HMIP-3, onde o genótipo em cada bloco pode influenciar o número de células F e os níveis de HbF. O HMIP-2 é caracterizado por 11 SNPs (rs9376090, rs9399137, rs9402685, rs 11759553, rs4895440, rs4895441, rs9376092, rs9389269, rs9402686, rs11154792 e rs 9483788). (THEIN *et al*, 2009; GALARNEAU *et al*, 2010).

## 2.7 A HIDROXIURÉIA NA ANEMIA FALCIFORME

A HU é uma droga mielossupressora, inibidora de ribonucleotídeo redutase, enzima que impede a síntese de DNA. Ela é utilizada no tratamento de leucemias, policitemia vera e câncer de cabeça e pescoço (Rodriguez *et al*, 1998).

Inicialmente acreditava-se que a HU estava somente envolvida em aumentar os níveis de Hb F, atuando diretamente na síntese dos genes da  $\gamma$ -globina (STEINBERG e RODGERS, 2001). Atualmente, acredita-se que HU atua na medula óssea, selecionando uma população de precursores eritróides, capazes de sintetizar quantidades elevadas de Hb F, que exerce um efeito protetor na polimerização da HbS. Pacientes com níveis elevados de Hb F apresentam menos episódios de dor e síndrome torácica aguda e, por consequência maior sobrevida (GLADWIN e SCHECHTER, 2001; HALSEY e ROBERTS, 2003; HAYNES *et al.*, 2004; KLINGS, 2006; MACHADO, 2007).

A HU possui efeitos que podem beneficiar os pacientes com DF: diminuição da adesão de células falcizadas ao endotélio vascular e do nível de expressão da molécula VCAM-1 solúvel, reduz a contagem de reticulócitos, plaquetas e leucócitos circulantes. Ainda, pode causar efeito cito redutivo em neutrófilos e aumento do teor de água, plasticidade, melhora do fluxo microvascular e menor adesão de hemácias ao endotélio vascular (SALEH *et al.*, 1999; ALIYU *et al.*, 2006; FRENETTE E ATWEH, 2007).

### 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de polimorfismos nos loci *BCL11A*, co-herança com a alfa-talassemia e haplótipos do grupamento de genes da  $\beta$ -globina em características clínicas-laboratoriais de indivíduos com anemia falciforme em acompanhamento no Serviço de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hemocentro Regional de Uberaba/Fundação Hemominas;

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- (1) Caracterizar e descrever a amostra estudada quanto ao uso de Hidroxiuréia;
- (2) Genotipar e determinar a frequência dos haplótipos do agrupamento de genes da  $\beta^S$ -globina e dos genótipos de  $\alpha$ -tal ( $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $--^{SEA}$ ,  $--^{FIL}$ ,  $--^{THAI}$ ,  $-(\alpha)^{20.5}$  e  $--^{MED}$ ) na casuística analisada;
- (3) Descrever e comparar parâmetros laboratoriais e número de internações por crise vaso-oclusiva segundo os haplótipos da globina  $\beta^S$ , alfa-talassemia e SNPs em *BCL11A*;
- (4) Descrever as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos rs4671393, rs766432, rs1186868, na população estudada;

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Todos os pacientes ou seus responsáveis, após a leitura e o esclarecimento, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFTM, conforme protocolo 1949/2011 (Anexo 1). E também, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas sob o registro número 324/2011 (Anexo 2).

### **4.2 DELINEAMENTOS E CASUÍSTICA**

Trata-se de um estudo descritivo e observacional.

Esse estudo, teve a participação total de 87 pacientes com diagnóstico de Anemia Falciforme obtido pelo Teste do Pezinho ou por estudo familiar. Como critério de exclusão, os pacientes não poderiam estar em esquema de hipertransfusão. Todos eles estavam em acompanhamento no Serviço de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e Hemocentro Regional de Uberaba.

As frequências dos haplótipos do gene da globina  $\beta^S$  foram obtidas a partir do banco de dados da dissertação do mestrado (“Haplótipos da  $\beta^S$ -globina e sua correlação clínica-hematológica em portadores de anemia falciforme atendidos no serviço de Hematologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro/Hemocentro Regional de Uberaba” e classificados em CAR/CAR, CAR heterozigoto e não-CAR.

Em relação à terapia com Hidroxiuréia, os pacientes foram divididos em dois grupos, os que faziam uso por mais de 06 meses e os que não faziam uso da medicação.

#### **4.2.1 Leitura dos prontuários**

Os parâmetros hematológicos avaliados foram coletados a partir de registros nos prontuários. Para os dados hematológicos: hemoglobina total (método: automatizado – Aparelho XN3000/Sysmex Japan), hemoglobina fetal (método: Cromatografia líquida de alta eficiência), Desidrogenase Láctica ou (método: cinético automatizado no aparelho Cobas 6000/Roche Diagnostic, USA) e reticulócitos (método: citometria de fluxo

fluorescente no aparelho XN1000/Sysmex Japan).

Visando uma maior credibilidade, foram colhidos todos os resultados desses parâmetros laboratoriais no período de 2016 a 2018, porém os valores quando o paciente se encontrava em crise dolorosa ou havia recebido transfusão sanguínea foram excluídos.

Para os pacientes que faziam uso de Hidroxiuréia, a média dos valores para HbF obtidos se referem ao período de dois anos antes do início da terapia. Em relação, os dados referentes às crises vaso-oclusivas, consideramos todos os eventos ocorridos de 2016 a 2018 que culminaram com internação.

A análise molecular para determinação dos polimorfismos da HbF e das mutações mais comuns da  $\alpha$ -talassemia, foi realizada no Laboratório de Pesquisas em Hematologia da UFTM,

## **4.2.2 Estudo Molecular**

### *4.2.2.1 Obtenção da Amostra*

Foi coletado de cada participante 10 ml de sangue periférico, por venopunção, em tubos de coleta a vácuo estéril contendo EDTA.

### *4.2.2.2 Extração do DNA*

A extração do DNA foi realizada pelo método Fenol-Clorofórmio segundo Sambrook (1989). O sangue de cada participante foi colocado em um tubo cônico de 50 ml e adicionado uma solução de lise celular (TE 20:5- Tris HCl 1M, EDTA 0,5M pH=8,0 e H<sub>2</sub>O miliQ) até completar 30 ml. As amostras foram submetidas a uma agitação em vórtex para que as hemácias fossem lisadas mais facilmente. Em seguida, foi centrifugado a 3500 força G durante 15 minutos a 10°C. O sobrenadante foi desprezado e o procedimento repetido três vezes até a obtenção de um *pellet* de leucócitos livre de hemácias. Esse sedimento foi transferido para um microtubo *Bio free* de 2 ml (SARSTEDT), livre de enzimas, como DNAses e RNAses, que poderiam comprometer o DNA a ser extraído. Foi adicionado, um ml de tampão TE 20:5 e as amostras armazenadas a -20°C para posterior extração de DNA genômico.

O *pellet* armazenado foi transferido para um tubo de 15ml, adicionado 200  $\mu$ L de Tris EDTA (TE), 25 $\mu$ L de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 10 $\mu$ L da solução de proteinase K20 g/ml). As amostras foram incubadas *overnight* em banho Maria à 37°C até a dissolução completa do *pellet*. No dia seguinte, as amostras foram agitadas em vórtex até o deslocamento do sedimento.

Foram adicionados 40  $\mu$ L de acetato de sódio 0,2M, 1 ml de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e a mistura foi homogeneizada em um agitador orbital por 20 minutos. Em seguida, centrifugação a 3000 força G por 20 minutos a 4°C. O DNA solubilizado que estava no sobrenadante (fase a) foi retirado com o auxílio de uma pipeta, com o cuidado para que a camada branca (camada proteica) não fosse recolhida junto. Acrescentou-se 1 ml de clorofórmio-álcool isomático (24:1) e o tubo foi novamente levado ao agitador orbital por 15 minutos e centrifugado a 3500 força G por 15 minutos a 4°C. A fase superior foi novamente recolhida com cuidado e acrescentou-se 1 ml de etanol 100%. O tubo foi então invertido lentamente e o DNA precipitado recolhido e transferido para um micro tubo de dois ml contendo etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 15000 força G por dois minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o micro tubo ficou *overnight* para secagem. Em seguida, o DNA foi ressuspensão em 200  $\mu$ L de água pura. Em seguida, as amostras foram estocadas em *freezer* a -20°C.

A quantificação e avaliação da qualidade do DNA foi realizada por meio do aparelho GeneQuant® (USA).

#### 4.2.2.3 Determinação dos haplótipos da globina $\beta$

A determinação dos haplótipos foi realizada por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e RFLP (Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição) em seis sítios polimórficos, seguindo a metodologia de Sutton *et al* (1989), de acordo com a tabela 2.

**Tabela 2** – Tamanho dos fragmentos de DNA amplificados após clivagem com as respectivas enzimas de restrição, usados na determinação dos haplótipos da  $\beta^S$ .

Primers	Enzima	Região	Tamanho do fragmento de amplificado	Fragmentos após clivagem
H0 e H1	<i>Xmn I</i>	5' $\gamma^G$	655 pb	450 pb + 205 pb
H2 e H3	<i>Hind III</i>	$\gamma^G$	781 pb	345 pb + 436 pb
H3e H4	<i>Hind III</i>	$\gamma^A$	760 pb	360 pb + 406 pb
H5 e H6	<i>Hinc II</i>	$\psi\beta$	701 pb	361 pb + 340 pb
H7 e H8	<i>Hinc II</i>	3' $\psi\beta$	590 pb	500 pb + 92 pb
H9 e H10	<i>Hinf I</i>	5' $\beta$	380 pb	241 pb + 142 pb

Fonte: Sutton *et al*, 1989

A sequência dos oligonucleotídeos (primers) utilizados estão listados na tabela 3.

**Tabela 3** – Sequência dos primers usados na determinação dos haplótipos da  $\beta^S$ .

Sequência do oligonucleotídeo	Direção	Posição	Localização
AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	Direto	33880	
AGGAGCTTATTGATAACCTCAGA	Reverso	34535	5' $G\gamma$
AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	Direto	36221	$G\gamma$
TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	Reverso	35440 $G\gamma$ / 40371 $A\gamma$	
TAAATGAGGAGCATGCACACAC	Direto	41137	$A\gamma$
GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	Direto	46458	
ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	Reverso	47159	$\psi\beta$
TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	Direto	49529	
GGACCCTAACTGATATAACTA	Reverso	50121	3' $\psi\beta$
CTACGCTGACCTCATAAATG	Direto	60958	
CTAATCTGCAAGAGTGTCT	Reverso	61341	5' $\beta$

Fonte: Sutton *et al*, 1989

As condições para cada PCR das regiões amplificadas estão descritas nas tabelas 4 e 5.

**Tabela 4** – Reagentes das reações de PCRs para amplificação das regiões polimórficas do cluster da globina  $\beta$ 

Componentes	Volumes ( $\mu\text{L}$ )					
	Regiões Polimórficas					
	$5' \gamma^G$	$\gamma^G$	$\gamma^A$	$\psi\beta$	$3' \psi\beta$	$5' \beta$
Água	20,0	20,0	0,6	20,0	20,6	20,0
Tampão (10x)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
dNTP ( $2\mu\text{M}$ )	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Primer R (20 pmoles)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer F (20 pmoles)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
$\text{MgCl}_2$ ( $25\mu\text{M}$ )	1,8	1,8	1,2	1,8	1,2	1,2
TaqDNA polimerase (5U)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
DNA (200-500 ng)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<b>Volume Final (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>

Fonte: Sutton *et al*, 1989.

**Tabela 5** - Condições das reações de PCRs para amplificação das regiões polimórficas do cluster da globina  $\beta$ 

Região	35 Ciclos									
	Desnaturação Inicial		Desnaturação Anelamento Extensão				Extensão Final			
	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tempo	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tempo	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tempo	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tempo		
$5' \gamma^G$	94	5'	94	45''	57	30'	72	45''	72	10'
$\gamma^G$	94	5'	94	45''	57	30'	72	45''	72	10'
$\gamma^A$	94	5'	94	45''	57	30'	72	45''	72	10'
$\psi\beta$	94	5'	94	45''	60	30'	72	45''	72	10'
$3' \psi\beta$	94	5'	94	45''	57	30'	72	45''	72	10'
$5' \beta$	94	5'	94	45''	57	30'	72	45''	72	10'

Fonte: Sutton *et al*, 1989.

Os produtos de PCR foram submetidos à digestão e os componentes utilizados nas digestões estão representados na tabela 6. O mix resultante foi colocado em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 horas.

A identificação dos fragmentos de DNA amplificados e a análise dos fragmentos após a clivagem pelas endonucleases de restrição foi realizada por meio da técnica de

eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 1X sob diferença de potencial de 90V por aproximadamente 75 minutos. Em cada gel de eletroforese foi aplicado 2  $\mu$ L do padrão de tamanho molecular “100 pb DNA Ladder” (Biolabs) corados pelo GelRed e posterior aplicação no gel de agarose. As imagens foram feitas pelo sistema de captura de imagens (L- PIX<sup>®</sup>)

O genótipo de cada participante foi determinado pelo tamanho dos fragmentos digeridos e de acordo com o perfil de restrição para as regiões polimórficas do *cluster* da globina  $\beta$ , os haplótipos  $\beta^S$  foram definidos e tomando esses haplótipos como padrão (Tabela 7), qualquer outra combinação diferente da presença e/ou ausência desses sítios o haplótipo foi classificado como atípico.

**Tabela 6** – Reagentes das reações de digestão enzimática utilizadas para análise dos polimorfismos do cluster da globina  $\beta$ .

Componentes	Volumes ( $\mu$ L)					
	Regiões Polimórficas					
	5' $\gamma^G$	$\gamma^G$	$\gamma^A$	$\psi\beta$	' $\psi\beta$	5' $\beta$
	<i>XmnI</i>	<i>Hind III</i>	<i>HindIII</i>	<i>HincII</i>	<i>HincII</i>	<i>HinfI</i>
Tampão da Enzima	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
BSA (albumina bovina)	0,15	-	-	-	-	-
Enzima de restrição	0,15	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Produto de PCR	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
H <sub>2</sub> O estéril	3,2	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
<b>Volume Final (<math>\mu</math>L)</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

Fonte: Adaptado de Sutton *et al*, 1989.



**Tabela 8** - Primers e condições de PCR para a amplificação da região que contém o SNP rs4671393

rs4671393			
Primers iniciadores	Reagentes	20 µL	Condições de PCR
<b>Direto</b>	Tampão (10x)	2,0	Desnaturação inicial: 94°C por 3 min
	MgCl <sub>2</sub>	1,5	
CCTTCCTTTAATCAGCTTCCGCC	BSA (10mg/ml)	1,0	30x Desnaturação: 94°C por 1 min. Anelamento: 63°C por 1 min. Extensão: 72°C por 1 min.
	dNTP	0,5	
<b>Reverso</b>	Primer D	0,5	
GCTATCTGTTGGCTCAGCTACCA	Primer R	0,5	Extensão final: 72°C por 7 min (30x)
	Taq (5u/mL)	0,5	
	Água	12,0	Pausa: 4°C
	DNA	1,5	

**Tabela 9** – Primers e condições de PCR para a amplificação da região que contém o SNP rs766432

rs766432			
Primes iniciadores	Reagentes	20 µL	Condições de PCR
<b>Direto</b>	Tampão (10x)	2,0	Desnaturação inicial: 94°C por 3 min
	MgCl <sub>2</sub>	2,0	
GAAGGGGATTGACAGCAAAG	BSA (10mg/ml)	-	30x Desnaturação: 94°C por 1 min. Anelamento: 58°C por 1 min. Extensão: 72°C por 1 min.
	dNTP	0,5	
<b>Reverso</b>	Primer D	0,5	
CCAGTGGTGGGTGTTTTGTT	Primer R	0,5	Extensão final: 72°C por 7 min.
	Taq (5u/mL)	0,5	
	Água	12,0	Pausa: 4°C
	DNA	2,0	

**Tabela 10** – Primers e condições de PCR para a amplificação da região que contém o SNP rs11886868

rs11886868			
Primes iniciadores	Reagentes	20 µL	Condições de PCR
<b>Direto</b>	Tampão (10x)	2,0	Desnaturação inicial: 94°C por 3 min
	MgCl <sub>2</sub>	1,5	
CATAGGCCAGGGATCACCATGG	BSA (10mg/ml)	1,0	30x Desnaturação: 94°C por 1 min.
	dNTP	0,5	
<b>Reverso</b>	Primer D	0,5	Anelamento: 59°C por 1 min.
	Primer R	0,5	Extensão: 72°C por 1 min.
GCCTGGGAATGGCCCC	Taq (5u/mL)	0,5	Extensão final: 72°C por 7 min.
	Água	11,5	
	DNA	2,0	Pausa: 4°C

Os produtos de PCR foram submetidos à digestão e os componentes utilizados nas digestões estão representados na tabela 11, o mix resultante foi colocado em banho-maria a 37°C por 16 ou 24 horas.

**Tabela 11** – Enzimas e condições utilizados na técnica de RFLP para os SNPs da HbF

SNP Posição	Tamanho dos fragmentos amplificados na PCR (pb)	Enzima de restrição	Temperatura	Tempo	Tamanho dos Fragmentos digeridos (pb)
rs 4671393	533	<i>Acu I</i>	37°C	24h	533 – 334- 199
rs 766432	203	<i>Acc I</i>	37°C	16h	110- 93 93-64-46
rs 11886868	440	<i>Mbo II</i>	37°C	24h	440-383-218-57

Os produtos da RFLP foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% a 90 volts por 40 minutos, em cuba contendo o tampão TAE 1x e, posteriormente visualizados em fotocomentador de luz ultravioleta (L-PIX Molecular Imaging Locus) para interpretação dos resultados.

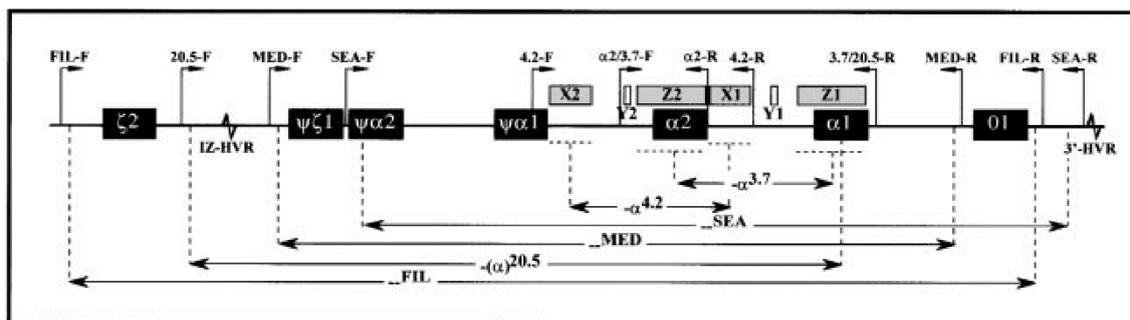
#### 4.2.2.5 Análise molecular da co-herança com a alfa-talassemia

O método de *Gap-PCR multiplex* em tubo único (QIAGEN® Multiplex PCR kit, QIAGEN, EUA) (TAN *et al.*, 2001) foi realizado para a amplificação do gDNA e identificação das deleções mais comuns da  $\alpha$ -tal ( $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $--SEA$ ,  $--FIL$ ,  $--THAI$ ,  $-(\alpha)^{20.5}$  e  $--MED$ ). Essa metodologia utiliza *primers* (oligonucleotídeos) específicos (Tabela 12) que contêm sequências complementares a região de interesse no grupamento de genes da  $\alpha$  globina para cada uma das sete deleções investigadas (Figura 6). A reação também conta com os *primers* referente ao gene LIS como controle de funcionamento do ensaio, além disso, foram utilizados controles positivos para as deleções  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$  para garantir a especificidade e sensibilidade da técnica.

**Tabela 12** - *Primers* utilizados no PCR multiplex em tubo único para análises de  $\alpha$  talassemia (deleções  $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $--SEA$ ,  $--FIL$ ,  $--THAI$ ,  $--MED$  e  $-\alpha^{20.5}$ )

Nome	Sequência 5'-3'	Concentração	Tamanho do amplicon
LIS1-F	ATACCATGGTTACCCCATGAGC	0,5 $\mu$ M	
LIS1-R	AGGGCTCATTACATGTGGACCC	0,5 $\mu$ M	2350 pb
$\alpha$ 2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	0,2 $\mu$ M	2022/2029pb
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	0,2 $\mu$ M	
$\alpha$ 2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	0,2 $\mu$ M	1800pb
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	0,5 $\mu$ M	
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCC	0,5 $\mu$ M	1628pb
SEA-F	CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	0,2 $\mu$ M	
SEA-R	AGCCACGTTGTGTTTCATGGC	0,2 $\mu$ M	1349pb
THAI-F	GACCATTCCCTCAGCGTGGGTG	0,3 $\mu$ M	
THAI-R	CAAGTGGGCTGAGCCCTTGAG	0,3 $\mu$ M	1153pb
20.5-F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	0,2 $\mu$ M	1007pb
MED-F	TACCCTTGCAAGCACACGTAC	0,2 $\mu$ M	
MED-R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	0,2 $\mu$ M	807pb
FIL-F	TTAAATGGGCAAACAGGCCAGG	1,0 $\mu$ M	
FIL-R	ATAACCTTATCTGCCACATGTAGC	1,0 $\mu$ M	546pb

Fonte: Chong *et al.*, 2000.



**Figura 6** – Representação esquemática do grupamento gênico da  $\alpha$  globina, sítio de anelamento dos *primers* e extensão das deleções investigadas. **Fonte:** Chong *et al*, 2000.

Os experimentos foram realizados usando 100  $\mu$ M de cada dNTP, 0,75  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub> e 1,25U da enzima HotStar Taq DNA polimerase, *primers* sintéticos em diferentes concentrações (Tabela 1), 1x Q solution QIAGEN®, 100 a 200 ng de gDNA, num volume final de 12,5  $\mu$ L. Os ciclos para a reação de PCR foram realizados da seguinte forma: 96°C por 15 minutos para ativação da enzima *HotStar* e desnaturação inicial, 30 ciclos de 98°C por 45 segundos (s) para desnaturação do DNA, 62°C por 90s para anelamento dos *primers*, 72°C por 135s para ação da DNA polimerase, seguido de 5 minutos a 72°C para realização da extensão final.

Os fragmentos amplificados (amplicons) foram visualizados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (1,5 $\mu$ g/ml). Para tal, foram aplicados no gel 10  $\mu$ L do produto de PCR com 1  $\mu$ L de *loading buffer* 5x em seguida, foi realizada eletroforese.

A corrida de eletroforese foi condicionada a 90 volts durante 2 horas em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no Foto documentador de luz ultravioleta (L-PIX Molecular Imaging, Loccus®) para análise dos fragmentos.

O perfil genotípico do paciente foi estabelecido conforme o tamanho dos fragmentos amplificados comparados com o padrão de peso molecular (1 Kb) e com os controles positivos ou negativos.

#### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no programa *Bioestat 5.0*, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo teste de *Bartlett*, e posteriormente, os testes de variância de Kruskal-Wallis e Anova.

O teste qui-quadrado foi utilizado para o determinar o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e para comparar as variáveis categóricas entre os grupos de interesse e análise

de variância seguida de teste de comparações múltiplas de acordo com a normalidade dos dados.

O nível de significância estatística considerado para todos os testes foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram avaliados no total 87 indivíduos portadores de AF, sendo 52 (60%) do gênero feminino e 35 (40%) do masculino. A idade do grupo variou entre 7 e 57 anos, com uma mediana de 23 anos.

Quanto ao tratamento, 43 (49,4%) estavam em terapia com Hidroxiuréia e 44 (49,6%) não. A associação do uso de HU com os parâmetros clínico-hematológicos, revelou uma diferença significativa entre a média de hemoglobina total basal e DHL.

Dos 62 pacientes genotipados para  $\alpha$ -talassemia, 48 (77,4%) não tinham co-herança, desses verificamos uma diferença significativa naqueles que faziam uso de HU (60,4%), comparados àqueles com co-herança (22,6%) (Tabela 13).

**Tabela 13** - Caracterização da amostra estudada quanto ao uso de HU

	USO DE HU		Valor <i>p</i> (a)
	Não (43)	Sim (44)	
	Média±DP (min - mediana - máximo)	Média±DP (min - mediana - máximo)	
Hb total basal (g/dl)	8,31±1,56 (6,00-8,30-13,00)	9,06±1,41 (6,00-9,00-12,00)	0,018*
HbF basal (%)	7,12± 4,30 (1,00-6,00-17,00)	7,10± 3,64 (2,00-7,00-21,00)	0,875
Reticulócitos (%)	7,60±4,37 (1,00-6,93-20,0)	6,07±2,68 (1,00-6,00-11,00)	0,210
DHL (U/L)	683,72±434,29 (188,00-558,00-2768,00)	459,00±189,94 (208,00-459,00-983,00)	0,046*
Número de Internações por CVO	1,11±2,36 (0-0-15)	0,58±1,11 (0-0-6)	0,145
	USO DE HU		Valor <i>p</i> (b)
	Não (27)	Sim (35)	
	No. (%)	No. (%)	
Co-herança com a $\alpha$ -talassemia	8 (29,6%)	6 (17,1%)	
Sem co-herança com a $\alpha$ -talassemia	19 (70,8%)	29 82,6%)	0,015*

Valores de *p* obtidos pelo teste de Kruskal- Wallis (a) e qui –quadrado (b), \**p*< 0,05.

Em nosso estudo, o uso de HU levou ao aumento da hemoglobina basal e redução de DHL, como esperado, semelhante a um estudo realizado por Scoot *et al.* (1996) que verificou um aumento na taxa de hemoglobina total com significativa redução nos níveis de reticulócitos, indicando desse modo a redução do processo hemolítico, melhora no curso da doença e maior expectativa de vida em crianças.

Observamos também, uma tendência à diminuição do número de hospitalizações e redução da taxa de reticulócitos nos pacientes que faziam uso de HU, indicando uma melhora do quadro clínico. A redução dos níveis de hemoglobina total associada ao aumento de reticulócitos caracteriza a gravidade da anemia hemolítica, assim a redução no número de reticulócitos e DHL durante o tratamento, pode sugerir diminuição das crises hemolíticas (Andrade *et al.*, 2001).

Ao contrário do descrito na literatura, não encontramos uma relação direta e significativa entre o uso de HU e o aumento da hemoglobina fetal (HbF), uma possível causa para isso, pode estar relacionado ao fato de que não avaliamos a adesão do paciente ao tratamento. No entanto, Covas e colaboradores em 2004, demonstrou que a HU tem efeitos múltiplos sobre a linhagem eritrocitária, isto é, promove elevação de Hb F em cerca de 60% dos pacientes, eleva o nível de hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM) e reduz o número de reticulócitos e a concentração da Hb F apresenta correlação com redução das crises dolorosas durante o tratamento, e por consequência, diminuição do número de internações devido a essas crises de dor.

Quanto à co-herança com a alfa-talassemia, os indivíduos que possuíam as duas heranças genéticas, faziam uso de HU em menor número do que os que não tinham a co-herança, uma relação estatisticamente significativa ( $p < 0,015$ ), resultado já esperado porque de acordo com a literatura, a talassemia alfa é um dos fatores genéticos capazes de modificar a gravidade da AF, independentemente dos níveis de HbF, já que os indivíduos com um traço alfa-talassêmico tendem a apresentar um menor quadro hemolítico, devido à microcitose e à diminuição da concentração corpuscular média de HbS que ocorre na talassemia alfa e por consequência menos crise vaso-oclusiva, o que pode justificar a ausência do tratamento com HU (STEINBERG, 1984; ADAMS *et al.*, 1994).

## 5.2 HAPLÓTIPOS DA BETA-GLOBINA

A frequência dos haplótipos encontrados no estudo foi: 24 (49,0%) eram CAR/CAR, 8 (16,3%) CAR/ATP; 7 (14,3%) CAR/BEN, 6 (12,2%) BEN/BEN, 2

BEN/ATP (4,1%) e 2 (4,1%) ATP/ATP.

O perfil hematológico e número de internação por CVO foi associado aos haplótipos, que foram divididos em CAR homozigoto, CAR heterozigoto e não-CAR. O único achado significativo foi em relação ao nível de hemoglobina aumentado nos indivíduos não-CAR, porém também foi observado uma tendência de aumento do número de internações para os pacientes CAR/CAR (Tabela 14).

**Tabela 14** – Parâmetros clínico-laboratoriais de acordo com os haplótipos do gene da globina  $\beta^S$

	HAPLÓTIPOS			Valor <i>p</i>
	CAR Homozigoto (24)	CAR Heterozigoto (15)	Não CAR (10)	
	Média ± Desvio Padrão (mínimo - mediana - máximo)			
<b>Hb total basal (g/dl)</b>	8,24±1,46 (6,00-8,35-11,00)	6,07±3,52 (6,00-7,90-10,00)	8,79±1,74 (7,00-8,80-11,0)	0,030*
<b>HbF basal (%)</b>	6,07± 1,15 (1,00-4,85-14,00)	6,78±4,62 (2,00-5,80-21,00)	5,38±1,76 (4,00-4,55-9,00)	0,063
<b>Reticulócitos (%)</b>	7,44±3,68 (2,37-6,42-16,40)	7,35±4,54 (1,90-7,93-20,00)	9,40±3,29 (3,91-10,05-13,00)	0,130
<b>DHL (U/L)</b>	670,75±488,64 (343,00-543,50-2768,00)	1008,20±1276,35 (282,00-645,00-5511,00)	746,30±356,98 (310,00-734,00-1395,00)	0,463
<b>Número de Internações</b>	0,83±1,05 (0-1-3)	0,33±0,49 (0-0-1))	0,10±0,32 (0-0-1)	0,068

Valores de p obtidos pelo teste de Kruskal- Wallis, \* $p < 0,05$ .

Em relação aos haplótipos, encontramos uma maior frequência de indivíduos com haplótipos CAR, tanto em homozigose ou heterozigose. Resultados semelhantes a outros estudos realizados no Brasil (GONÇALVES *et al*, 2003; FIGUEIREDO *et al*, 1996; FLEURY, 2007; WAGNER *et al*, 1996; BEZERRA *et al*, 2007; CABRAL *et al*, 2010; ROBENHORST, 2009; BELISÁRIO *et al*, 2010).

No presente estudo não foi encontrada diferença significativa na comparação entre os níveis de HbF com os haplótipos, resultados discordantes com a literatura, em que os estudos demonstram uma queda significativa da HbF no haplótipo CAR em relação aos demais haplótipos (NAGEL *et al.*, 1984; RIEDER *et al.*, 1991; STEINBERG *et al.*, 1995; STEINBERG *et al.*, 1997). Já em 2010, Belisário e colaboradores avaliaram a influência

dos haplótipos do *cluster* da  $\beta$ s-globina no perfil clínico e nos parâmetros hematológicos em crianças brasileiras com AF, e não encontrou associação significativa entre os haplótipos do *cluster* da  $\beta$ s-globina com a Hb, HbF, VCM, HCM, contagem dos leucócitos e dos reticulócitos.

Verificamos que os pacientes com menores níveis de HbF, apresentaram maior contagem de reticulócitos, similares aos achados de Murray e colaboradores (1988) que descreveram uma associação de níveis elevados de HbF com aumento de hemoglobina total e menores taxas de reticulócitos.

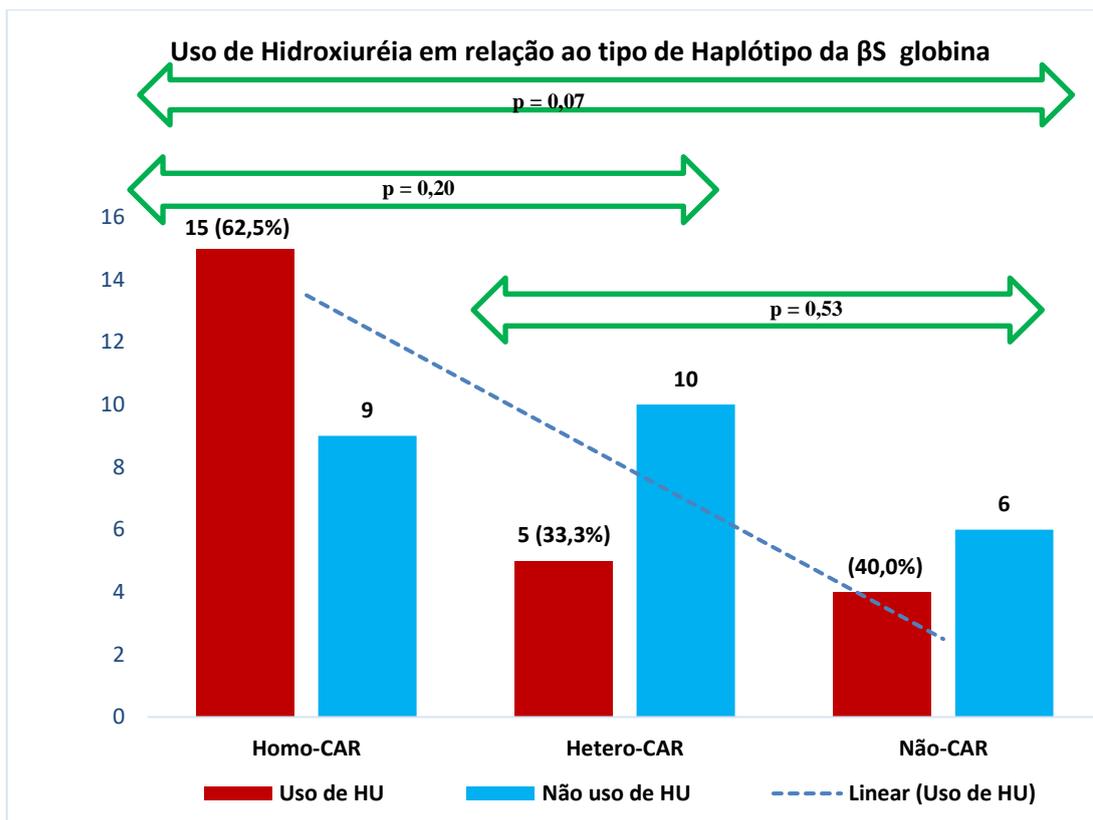
A crise vaso-oclusiva é a mais comum e dramática manifestação da anemia falciforme, sendo a maior causa de internação hospitalar, seguida por infecção (ADEKILE e HAIDER,1996). Nossos dados demonstram uma tendência de maior número de internação devido à crise vaso-oclusiva nos indivíduos que possuíam o haplótipo CAR/CAR, de acordo com Costa e colaboradores (2006), o haplótipo CAR é o de pior prognóstico, com maior gravidade das intercorrências clínicas, conseqüentemente maior número de internações e aumento da morbidade e mortalidade.

Em relação ao uso de Hidroxiuréia, realizamos uma análise relativa, entre os indivíduos que possuíam um ou dois cromossomos CAR e aqueles que não possuíam nenhum cromossomo CAR (denominados NÃO-CAR). Dos indivíduos CAR/CAR, 62,5% faziam uso da medicação. Ao contrário, seis (60%) pacientes NÃO-CAR não realizam tratamento com essa medicação (Tabela 15 e Figura 7).

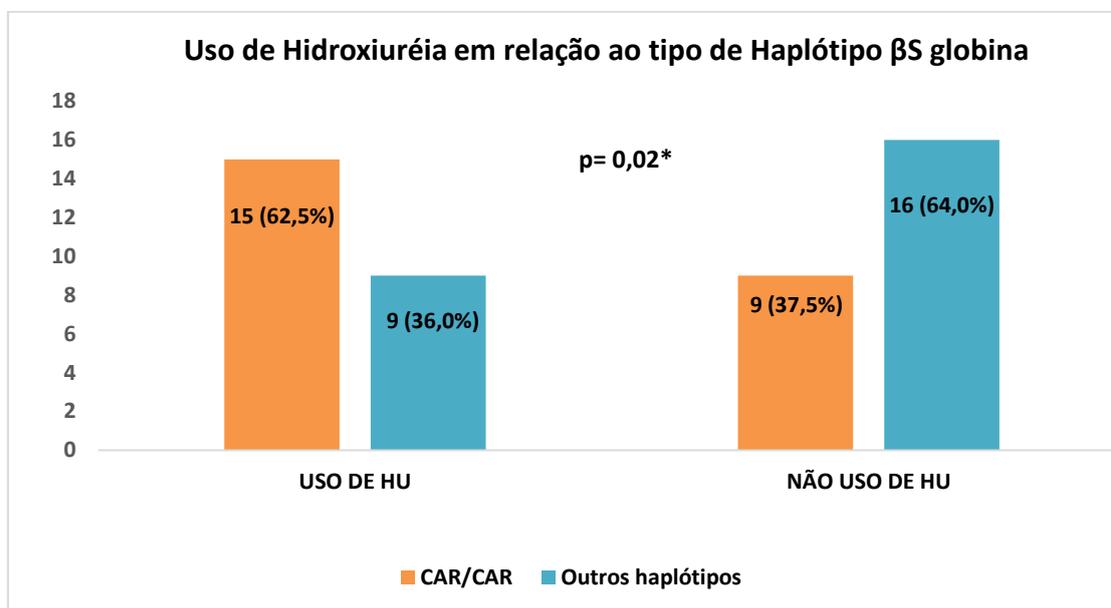
**Tabela 15** – Associação entre o uso de Hidroxiuréia e os haplótipos do gene da globina  $\beta^S$

<b>HAPLÓTIPOS</b>				
	<b>CAR. Homozigoto (24)</b>	<b>CAR Heterozigoto (15)</b>	<b>NÃO CAR (10)</b>	<b>Valor p</b>
	<b>No. (%)</b>	<b>No. (%)</b>	<b>No. (%)</b>	
<b>Uso de HU</b>	15 (62,5%)	5 (33,3%)	4 (40%)	0,287
<b>Não uso de HU</b>	9 (37,5%)	10 (66,7%)	6 (60%)	

A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de qui-quadrado (\*p<0,05).



**Figura 7** – Uso de HU em relação a classificação dos haplótipos da  $\beta^S$  globina (Homo-CAR; Hetero-CAR e Não-CAR). Valor de p obtido pelo Teste Exato de Fisher.



**Figura 8** - Uso de HU em relação a classificação dos haplótipos da  $\beta^S$  globina (CAR/CAR versus outros haplótipos). Valor de p obtido pelo Teste Exato de Fisher.

A figura 7 demonstra uma tendência onde os indivíduos com o haplótipo CAR, em homozigose tendem a fazer maior uso de Hidroxiuréia em comparação aos indivíduos heterozigotos e àqueles que não possuem nenhum cromossomo do tipo CAR.

Ao reclassificar os haplótipos em dois grupos: CAR/CAR e outros, que inclui todos os outros tipos de genótipos que não possuem o haplótipo CAR em homozigose, foi observado que os indivíduos CAR/CAR apresentaram um aumento significativo do uso de HU ( $p = 0,02^*$ ) em relação aos outros (Figura 8). Esses achados estão de acordo com a literatura que descreve que os pacientes CAR/CAR apresentam os menores níveis de HbF (5%) e tendem a ter quadro clínico mais grave e conseqüentemente dependentes da terapia com HU (NAGEL 1984; COSTA *et al*, 2006; CANÇADO, 2007; SILVA FILHO *et al*, 2012).

### 5.3 CO- HERANÇA COM ALFA-TALASSEMIA – Deleção $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$

Sessenta e dois pacientes com AF foram genotipados para verificar a presença das deleções mais comuns da  $\alpha$ -tal ( $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $--_{SEA}$ ,  $--_{FIL}$ ,  $--_{THAI}$ ,  $-(\alpha)^{20.5}$  e  $--_{MED}$ ). Quatorze (22,6%) apresentaram co-herança com a alfa-talassemia sendo que um (1,6%) era homozigoto para a deleção 3.7 ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ) e o restante ( $n=13$ ; 21,0%) era heterozigoto para as deleções 3.7 ou 4.2 (12  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  e 1 era  $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ ).

Os parâmetros hematológicos e número de internação por CVO avaliados estão ilustrados abaixo (Tabela 16) e não mostraram diferenças significativas entre os grupos com e sem co-herança com a alfa-talassemia.

**Tabela 16** – Parâmetros clínico-hematológicos quanto à co-herança com  $\alpha$ -talassemia

CO-HERANÇA COM ALFA-TALASSEMIA			
	Não (48)	Sim (14)	
	Média $\pm$ Desvio Padrão (mínimo - mediana - máximo)		Valor <i>p</i>
Hb total basal (g/dl)	8,89 $\pm$ 1,56 (6,00-8,80-13,00)	8,40 $\pm$ 1,36 (6,00-7,85-11,0)	0,232
HbF basal (%)	6,29 $\pm$ 3,59 (1,00-5,85-17,00)	7,26 $\pm$ 3,76 (3,00-7,15-15,00)	0,381
Reticulócitos (%)	7,35 $\pm$ 2,79 (1,28-7,60-13,00)	7,81 $\pm$ 3,68 (2,37-6,82-15,57)	0,620
DHL (U/L)	586,60 $\pm$ 255,36 (188,00-552,5-1200,00)	527,35 $\pm$ 142,13 (291,00-537,00-800,00)	0,631
Número de Internações por CVO	0,6 $\pm$ 4,06 (0-0-3)	0,86 $\pm$ 0,94 (0-1-3)	0,292

Valores de *p* obtidos pelo teste de Kruskal- Wallis, \* $p < 0,05$ .

Não encontramos associação significativa entre os parâmetros estudados e a presença ou não da co-herança com a alfa-talassemia, no entanto, outros estudos relatam que a co-herança leva ao aumento da hemoglobina total e diminuição dos reticulócitos e por consequência diminuição da hemólise (EMBURY *et al*, 1982; STEINBERG *et al*, 1995).

Acreditamos que o fato de não termos encontrado essa associação deva-se ao tamanho da amostra ou devido ao uso de HU, 6 (17,1%) dos pacientes com a co-herança saem da medicação.

O quadro hemolítico atenuado apresentado pelos pacientes com co-herança de  $\alpha$ -talassemia (deleção 3.7Kb) tem sido considerada como característica importante para a apresentação dos subfenótipos hemolíticos e vaso-oclusivo (KATO *et al*, 2007), fato que aponta para a importância desse marcador.

A co-herança da talassemia alfa na AF leva a muitos questionamentos acerca da atenuação clínica ou melhor prognóstico (BELISÁRIO, VIANA, 2010). Adicionalmente, outros estudos abordam que a talassemia causa impacto nos parâmetros laboratoriais, sobrevida dos pacientes e eventos clínicos. As alterações são encontradas, principalmente nos achados laboratoriais, que em sua maioria, denota aumento no número de hemácias, concentração de Hb total e hematócrito, diminuição nas concentrações de VCM, HCM, CHCM, reticulócitos, contagem de leucócitos e intensidade da hemólise (NAGEL e STEINBERG, 2001; RUMANNEY *et al.*, 2014).

Adicionalmente, Nagel (1991) relatou que a  $\alpha$ -talassemia exerce três principais impactos nos pacientes portadores de AF: modifica os parâmetros laboratoriais; afeta a sobrevida geral e modula de maneira diferenciada a frequência de complicações clínicas.

A prevalência de  $\alpha$ -Tal em indivíduos com AF no Brasil é comum, sendo que algumas manifestações graves, como a doença cerebrovascular, ocorrem com menor frequência nos pacientes que possuem a coexistência de ambas as alterações gênicas, o que torna interessante a genotipagem de a  $\alpha$ -talassemia nesses indivíduos. No entanto, apesar da importância da  $\alpha$ -talassemia na modulação do fenótipo da AF, sua presença ou ausência não permite prever, isoladamente, as características clínicas da doença (BELISÁRIO e VIANA, 2010).

## 5.4 POLIMORFISMOS DA HEMOGLOBINA FETAL

### 5.4.1 Frequências alélicas dos polimorfismos da HbF dos *loci* BCL11A

No SNPs rs4671393, o alelo selvagem G se encontra em maior frequência, igualmente como para os SNPs rs766432 e rs11886868, em que o alelo selvagem está em predominância. Todos os alelos estavam em equilíbrio *de Hardy-Weinberg* (Tabela 17).

**Tabela 17** - Frequências alélicas dos polimorfismos da HbF dos *loci* BCL11A

SNP Posição	N	Gene	Frequência Alélica	pHWE
<b>rs4671393</b> NC_000002.12:g.60493816 G > A	75	BCL11A	G = 74% A = 26%	0,5767
<b>rs766432</b> NC_000002.12:g60492835 A > C	84	BCL11A	A= 64,3% C = 36,6%	0,1184
<b>rs11886868</b> NC_000002.12: 61M..60M C > T	75	BCL11A	C = 29% T= 71%	0,1092

pHWE = valor do equilíbrio para Hardy-Weinberg, valor de p obtido pelo Teste qui-quadrado.

### 5.4.2 Frequência dos genótipos nos polimorfismos em BCL11A

Em relação aos polimorfismos localizados no *loci* BCL11A, para o rs4671393, rs766432 e rs11886868, observamos maior frequência do genótipo homozigoto GG, para o selvagem AA e o selvagem TT, respectivamente (Tabela 18).

**Tabela 18** - Frequência dos genótipos nos polimorfismos em BCL11A

Genótipo	Número de observações (n)		Frequência (%)
	rs 4671393 (G > A)		
AA	06		8,0
AG	27		36,0
GG	42		56,0
<b>Total</b>	<b>75</b>		<b>100,0</b>
rs 766432 (A > C)			
CC	14		16,7
CA	32		38,1
AA	38		45,2
<b>Total</b>	<b>84</b>		<b>100,0</b>
rs 11886868 (C > T)			
CC	09		12,0
CT	25		33,3
TT	41		54,7
<b>Total</b>	<b>75</b>		<b>100,0</b>

### 5.4.3 Caracterizações dos níveis de Hb total basal, HbF basal e número de internações por crise vaso-oclusiva quanto aos polimorfismos estudados

#### 5.4.3.1 Polimorfismo rs 4671393

Observamos diferença significativa entre os níveis de Hb F nos genótipos do SNP rs4671393 ( $p=0,0199^*$ ). A mediana de Hb F para o grupo AA foi 12,1%, para o grupo AG foi 6,9% e para GG foi 6,0%. Em relação, aos níveis de hemoglobina total basal e número de internações devido às crises vaso-oclusivas, não encontramos diferenças (Tabela 19).

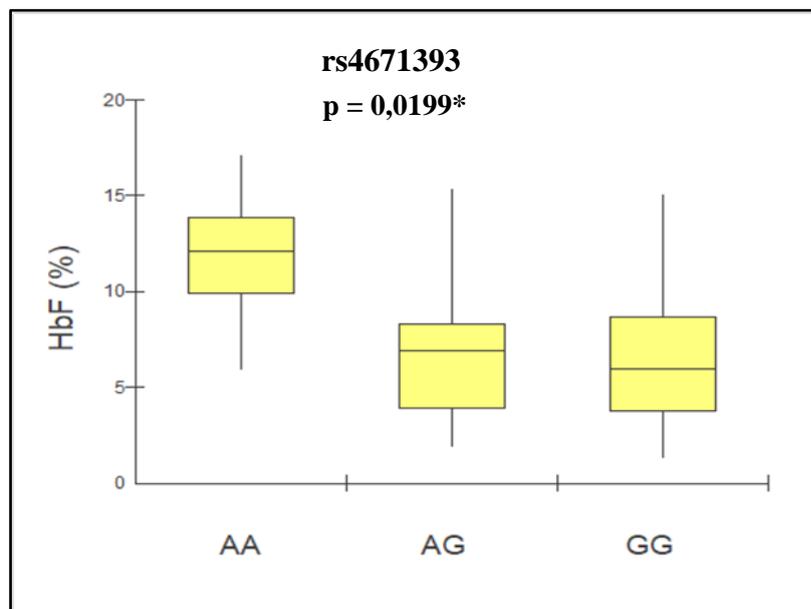
**Tabela 19** – Parâmetros clínico-hematológicos em relação ao rs 4671393

	rs 4671393			Valor de p
	AA	AG	GG	
	Média ± Desvio Padrão (mínimo - mediana - máximo)			
<b>Hb total basal (g/dl)</b>	8,78±1,06 (7,00-8,90-10,30)	8,44±1,62 (5,70-8,30-11,90)	8,54±1,42 (5,50-8,45-11,60)	0,8770
<b>HbF basal (%)</b>	11,80±3,90 (5,90-12,10-17,10)	6,36±3,10 (1,90-6,9-15,30)	6,78±3,73 (1,30-6,00-15,00)	<b>0,0199*</b>
<b>Número de Internações por CVO</b>	0,50±0,83 (0-0-2)	1,38±3,06 (0-1-15)	0,73±1,01 (0,0-3)	0,7343

Valor de p obtido pelo Teste de Kruskal- Wallis, \* $p < 0,05$ .

Em nosso estudo, o genótipo AA do polimorfismo rs4671393 foi associado com o aumento significativo da concentração relativa de HbF ( $p < 0,02$ ) quando comparado aos

demais genótipos (Figura 9).



**Figura 9** - Valores de HbF em relação aos genótipos do rs4671393.

Esses achados foram similares aos descritos por Sankaran e colaboradores (2008), que relataram que a presença do alelo A, menos frequente nas populações, influencia no aumento do nível de HbF por reduzir a expressão do gene *BCL11A*, o que confere menor repressão e aumento da expressão dos genes  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$  globina. Adicionalmente, outros estudos, demonstraram que a frequência do alelo A do SNP rs4671393, influencia na variação da hemoglobina fetal, conforme descritos no Brasil, EUA Tanzânia e Reino Unido (MA *et al*, 2007; LETTRE *et al*, 2008; CARDOSO *et al*, 2014).

Em um estudo realizado numa população de indivíduos com DF na Tanzânia também se verificou um efeito acentuado dos alelos nos *locus* rs11886868 e rs4671393 sobre os níveis de expressão de HbF, sendo que esta é notoriamente baixa quando ocorre a presença do alelo selvagem G em rs4671393 (3,7% para GG e 5,4% para AG comparativamente com 8,1% para AA (MAKANI *et al*, 2011).

Embora não tenha ocorrido uma associação significativa, foi possível observar que os indivíduos com o genótipo AA tiveram menor média de internação devido à crise vaso-oclusiva, o que está de acordo com os achados de Wonkam e colaboradores (2017) que demonstrou que os indivíduos com esse genótipo apresentaram menor frequência de crises vaso-oclusivas e número de internações.

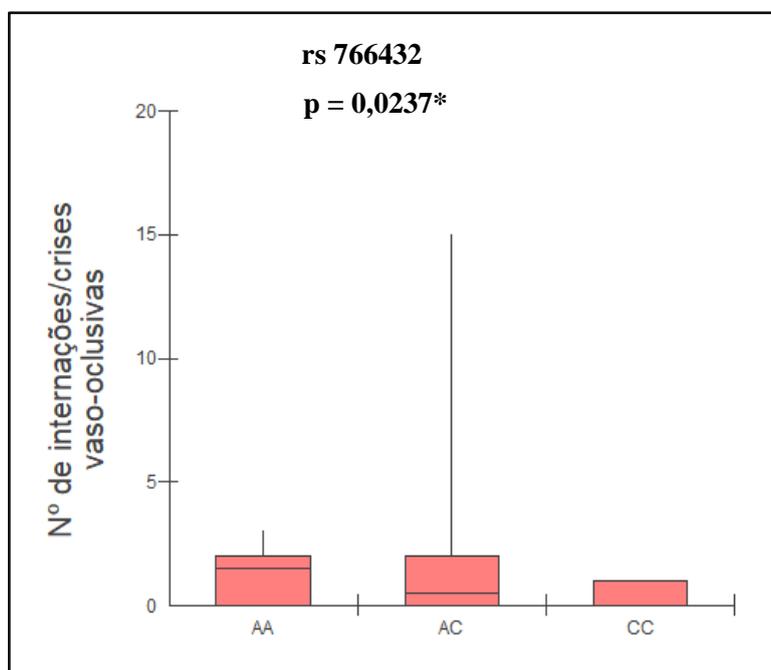
### 5.4.3.2 Polimorfismo rs766432

Encontramos associação estatisticamente significativa entre o número de internações para os diferentes genótipos (Figura 10), no entanto, não houve diferença para os níveis de Hb total e Hb F (Tabela 20).

**Tabela 20** - Parâmetros clínico-hematológicos em relação ao rs 766432

rs 766432				
	AA	CA	CC	
	Média ± Desvio Padrão (mínimo - mediana - máximo)			Valor de p
<b>Hb total basal (g/dl)</b>	8,74±1,42 (6,50-8,50-13,00)	8,92±1,57 (5,50-9,00-11,90)	8,34±1,52 (5,70-8,25-12,10)	0,2392
<b>HbF basal (%)</b>	7,74±3,65 (1,20-7,75-13,90)	6,06±2,83 (1,90-5,50-12,80)	7,31±4,31 (1,30-6,40-17,10)	0,3463
<b>Número de Internações por CVO</b>	1,28±1,26 (0-1,5-3,0)	1,37±2,81 (0-0,5-15)	0,29±0,46 (0,0,1)	<b>0,0235*</b>

Valores de p obtidos pelo teste de Kruskal- Wallis, \*p< 0,05.



**Figura 10** - Número de internações em relação aos genótipos do rs766432.

Em relação aos valores de hemoglobina fetal, não encontramos diferenças entre os três genótipos do polimorfismo rs766432, enquanto, Bhatnagar e colaboradores (2011), relataram que o alelo selvagem A está associado a níveis diminuídos de células F e

consequentemente menor taxa de HbF, onde os homozigotos CC apresentaram duas vezes mais células F, quando comparados aos AA.

Adicionalmente, Aleluia e colaboradores (2017), relataram que os homozigotos para o alelo C de rs766432 apresentaram maior contagem de hemácias, hematócrito, concentração de hemoglobina e níveis de HbF, demonstrando que na presença deste alelo nos pacientes apresentaram melhor quadro clínico. Em nosso estudo, também observamos que os homozigotos CC apresentaram menor taxa de internação devido às crises vasculares, corroborando com melhor quadro clínico nesses indivíduos.

#### 5.4.3.3 Polimorfismo rs11886868

Em relação ao SNP rs11886868, não foi observada diferença significativa entre os valores das medianas de Hb F e os genótipos do rs11886868 ( $p=0,5430$ ). A média de Hb F para o grupo CC foi  $6,57\pm 3,99$ , para o grupo CT foi  $7,24\pm 3,92$  e para TT foi  $6,28\pm 4,38$ . Para os valores de hemoglobina total basal e número de internações, também não encontramos diferenças significativas (Tabela 21).

**Tabela 21** - Parâmetros clínico-hematológicos em relação ao rs11886868.

	rs 11886868			Valor de p
	CC	CT	TT	
	Média ± Desvio Padrão (mínimo - mediana - máximo)			
<b>Hb total basal (g/dl)</b>	8,58±1,67 (5,50-8,60-12,10)	8,76±1,43 (6,30-8,50-13,00)	9,10±1,55 (6,50-8,50-11,00)	0,6706
<b>HbF basal (%)</b>	6,57±3,99 (1,30-5,90-20,60)	7,24±3,92 (1,20-8,00-17,10)	6,28±4,38 (2,30-4,10-13,60)	0,5430
<b>Número de Internações por CVO</b>	0,63±1,22 (0-0-6)	0,88±0,93 (0-1-3)	0,66±0,86 (0,0-2)	0,3119

Valores de p obtidos pelo teste de Kruskal- Wallis, \* $p < 0,05$ .

Para o polimorfismo rs11886868, não foi encontrada diferença estatística significativa entre os valores de HbF, diferentemente de um estudo realizado na Índia por Bhanushali *et al* (2015) que avaliaram a influência desse polimorfismo em 240 pacientes com AF e em 60 com o traço falciforme, onde os níveis de HbF obtidos foram de 20,4%; 19,6% e de 16,8 para os genótipos CC, CT e TT, respectivamente.

Esse efeito protetor dos alelos selvagens CC, foi confirmado por Uda e colaboradores (2008) que constataram que o alelo C da região rs11886868 no gene

BCL11A está associada com um melhor fenótipo em pacientes com anemia falciforme, devido ao aumento da produção de hemoglobina fetal nos mesmos, nosso estudo, porém, não revelou esse mesmo efeito.

Adicionalmente, Chaouch e colaboradores (2016), demonstraram que o alelo C do rs11886868 e o alelo A do rs4671393 conferem um melhor fenótipo aos pacientes com AF. No entanto, em nosso estudo, apenas o alelo A do rs4671393 foi associado ao aumento da HbF, o que pode estar relacionado à grande miscigenação e heterogeneidade da amostra estudada.

Um outro estudo de 2016, também demonstrou que BCL11A é um potente QTL associado aos níveis endógenos de HbF em uma coorte brasileira, no sul do país, onde os pacientes com SNPs em BCL11A (rs4671393e rs11886868) e além disso evidenciou que esse SNPs estão relacionados à maior eficácia terapêutica à Hidroxiuréia em relação a síntese de HbF (FRIEDRISCH *et al*, 2016).

## 6. CONCLUSÃO

Esse estudo, avaliou no total, 87 indivíduos portadores de AF, sendo 60% do gênero feminino, a idade do grupo variou entre 7 e 57 anos, com uma mediana de 23 anos, 49% faziam uso de HU e esses apresentaram maior nível de Hb total basal e menor dosagem de DHL.

Demonstramos que os indivíduos com haplótipo CAR em homozigose são mais adeptos à terapia com Hidroxiuréa.

Em relação à co-herança com  $\alpha$ -talassemia, dos 62 pacientes genotipados, 14 (22,6) apresentaram co-herança, sendo que um homozigoto ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha^{3.7}$ ) e o restante heterozigoto para as deleções (12  $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  e um era  $\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ ).

Quanto aos polimorfismos associados à variação da HbF, foram avaliados os SNPs: rs4671393, rs766432 e o rs11886868, todos localizados no gene *BCL11A*.

Dos 75 indivíduos genotipados para o rs4671393, não encontramos associações significativas entre os níveis de Hb total basal e número de internações devido às crises vaso-oclusivas. A mediana da Hb F para o genótipo AA foi 12,10, e para AG e GG, foram 6,9 e 6,0, respectivamente, com diferença significativa ( $p=0,0199^*$ ), igualmente a outros estudos, em que a presença alelo A associa com o aumento da HbF.

Em relação, aos 84 pacientes genotipados para o rs766432, encontramos associação estatisticamente significativa entre o número de internações.

A associação do SNP rs4671393 com o aumento da HbF encontrada nesse estudo, confirma a importância da análise genômica para melhor elucidação das variações fenotípicas, sugerindo que a presença do alelo A, possa conferir prognóstico nos pacientes com anemia falciforme.

Diante das evidências sobre a alta variabilidade fenotípica na doença falciforme, a contribuição desse estudo, que foi o primeiro no interior do Estado de Minas Gerais, foi determinar a frequência da co-herança com a alfa-talassemia no Serviço de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo/Hemocentro Regional de Uberaba, além de consolidar o efeito protetor do alelo A dos SNPs rs4671393 no aumento dos níveis de hemoglobina fetal, o que colaborar para o entendimento da modulação do fenótipo da doença e atuar como uma possível ferramenta de acompanhamento clínico e de prognóstico.

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Avaliar o efeito do SNPs rs4617393 na resposta terapêutica com Hidroxiuréia e sua relação com a síntese da HbF;
- Determinar os efeitos moduladores desse e de outros SNPs nos diferentes fenótipos para que possam ser utilizados como ferramentas de prognóstico e acompanhamento clínico;

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R.J., KUTLAR, A., VIRGIL, M. *et al.* Alpha thalassaemia and stroke risk in sickle cell anaemia. **American Journal of Hematology**, v. 45, n. 4, p. 279-282, 1994.

ADEKILE A.D, HAIDER M.Z. Morbidity, beta haplotype and alpha-globin gene patterns among sickle cell anemia patients in Kuwait. **Acta Haematol.** 95:150-4, 1996.

ADORNO, E.V, ANGELA, Z., ISA, L. *et al.* Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 621-625, 2008.

ALELUIA, M. M., SANTIAGO, R. P., DA GUARDA, C. C., *et al* Genetic modulation of fetal hemoglobin in hydroxyurea-treated sickle cell anemia. **American journal of hematology**, 92(5), E70-E72, 2017.

ALIYU, Z. Y., TUMBLIN, A. R., KATO, G. J. Current therapy of sickle cell disease. **Haematologica** 91(1): 7-10, 2006.

ANDRADE SR. Características hematológicas e bioquímicas da doença falciforme no estado do Rio Grande do Norte. **Rev Bras Anál Clín**, 33(4): 205-210. 2001.

ÂNGULO, I.L. Crises falciformes. *In: Simpósio Urgências e Emergências Hematológicas*, Ribeirão Preto, vol. 36, p. 427-430, 2003.

ANTONARAKIS S.E; KAZAZIAN JR HH; ORKIN SH. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. **Human Genetics**. 1985; 69:1-14.

ASHLEY-KOCH, A.; YANG, Q.; OLNEY, R. S. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease. **Am. J. Gen.**, v.1, n. 151, p. 839-845, 2000.

BALLAS S.K. Effect of alpha-globin genotype on the pathophysiology of sickle cell disease. **Pediatr Pathol Mol Med**. 2001 Mar-Apr; 20(2):107-21.

BALLAS S.K, MARCOLINA M.J. Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. **Transfusion**, 46:105–110, 2006.

BARBOSA C.G, GONÇALVES-SANTOS N.J, SOUZA-RIBEIRO S.B, *et al.* Promotor Region Sequence Differences in A and G Gamma Globin Genes of Brazilian Sickle Cell Anemia Patients. **Braz J Med Biol Res.**; v.43, p. 705-711, 2010.

BAUER, D.E., KAMRAN, S.C., LESSARD, S. An Erythroid Enhancer of BCL11A. **Science** (80- ); 253–8, 2013.

BEIGUELMAN, B. Genética de populações humanas. Livro eletrônico. [http://lineu.icb.usp.br/bbeiguel/Genetica Populações](http://lineu.icb.usp.br/bbeiguel/Genetica_Populações). Acesso em: 01/12/2018.

BELISÁRIO AR, VIANA MB. Efeitos da talassemia alfa nas manifestações clínicas e

hematológicas da anemia falciforme: uma revisão sistemática. **Rev Med Minas Gerais**; 20(1):312-21, 2010.

BELISÁRIO, A. R.; MARTINS, M. L.; BRITO, A. M. S.; RODRIGUES, *et al.*  $\beta$ -Globin Gene Cluster Haplotypes in a Cohort of 221 Children with Sickle Cell Anemia or S $\beta$ 0-Thalassemia and Their Association with Clinical and Hematological Features. **Acta Haematol.**, v. 124, p. 162–70, 2010.

BEZERRA MA, SANTOS MN, ARAUJO AS, *et al.* Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the State of Pernambuco, Brazil. **Hemoglobin**; 31(1):83-88, 2007.

BHANUSHALI, A.A.; PATRA, P.K.; PRADHAN, S. *et al.* Genetics of fetal hemoglobin in tribal Indian patients with sickle cell anemia. **Transl Res.** , v. 165, n.6, p. 696-703, 2015.

BHATNAGAR, P., PURVIS, S., BARRON-CASELLA, E., *et al.* Genome-wide association study identifies genetic variants influencing F-cell levels in sickle-cell patients. **Journal of human genetics**, 56(4), 316-23, 2011.

BUNN, HF; FORGET, BG - Hemoglobina: aspectos moleculares, genéticos e clínicos. Em: BUNN, HF; FORGET, BC **Hematologia. Filadélfia**, WB Saunders, p. 321-359. 1986.

CABRAL CHK, SERAFIM ESS, MEDEIROS WRDB, *ET al.* Determinação e haplótipos do gene  $\beta$ s em pacientes com anemia falciforme no Estado do Rio Grande do Norte. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**; 32(4):205-206, 2010.

CAMILO-ARAUJO, RF, AMANCIO OMS, FIGUEIREDO MS, *et al.* Molecular analysis and association with clinical and laboratory manifestations in children with sickle cell anemia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** São José do Rio Preto , v. 36, n. 5, p. 334-339, out. 2014 .

CANÇADO RD. Doenças Falciformes. *Prat Hosp.*; 50: 61-64, 2007.

CARDOSO GL, DINIZ IG, MARTINS DA SILVA ANL, *et al.* DNA polymorphisms at BCL11A, HBS1L-MYB and Xmn1-HBG2 site loci associated with fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia patients from Northern Brazil. **Blood Cells, Mol Dis.**;53(4):176–9. 2014.

CHAOUCH L, MOUMNI I, OURAGINI H, *et al.* rs11886868 and rs4671393 of BCL11A associated with HbF level variation and modulate clinical events among sickle cell anemia patients. **Hematol Amst Neth.**;1–5, 2016.

CHONG, S.S.; BOEHM, C.D.; HIGGS, D.R.; CUTTING, G.R. Single -tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of  $\alpha$  thalassemia. **Clin Chem**; 95: 360-2, 2000.

COSTA PJMS, VILELA RQB, CIPOLOTTI R, *et al.* Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo Bantu da anemia falciforme. **Rev. Bras. Hemat. Hemoter.**; 28(1): 40-44, 2006.

COSTA, F.F; ARRUDA, V.R; GONÇALVES, M.G.  $\beta$ S –Gene-Cluster Haplotypes in Sickle Cell Anemia Patients from two regions of Brazil. **American Journal Hematology**, vol. 45, n.1, p. 96-9, 1994.

COVAS DT, *et al.* Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica.**: 89(3):273-280. 2004.

CREARY LE, ULUG P, MENZEL S, *et al.* Genetic variation on chromosome 6 influences F cell levels in healthy individuals of African descent and HbF levels in sickle cell patients. **PLoS One**: 4(1):2–7, 2009.

CURTIN, P. D. The Atlantic slave trade: a census. Milwaukee, **The University of Wistoconsin Press**, 1969.

EMBURY SH, DOZY AM, MILLER J, *et al.* Concurrent sickle-cell anemia and alpha-thalassemia: effect on severity of anemia. **N Engl J Med**; Feb; 306(5):270-4, 1982.

EMBURY SH; HEBBEL RP; MOHANDAS N; STEINBERG MH. Sickle cell disease: basic principles and clinical practice. **Raven Press**: New York, 1994.

ESTIMATES DATABASE. 2010. Voyages: The trans-atlantic slave trade database. <http://www.slavevoyages.org/tast/assessment/estimates.faces> (acessado em 28 de março de 2018).

FAN AX, HOSSAIN MA, STEES J, GAVRILOVA E, BUNGERT J. Regulation of erythroid cell differentiation by transcription factors, chromatin structure alterations, and noncoding RNA. **Epigenetic Gene Expr Regul.**; 237– 64, 2015.

FERREIRA, E.M.C.D. **Factores Genéticos Moduladores do Fenótipo da Drepanocitose**. 2011, 71p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

FIGUEIREDO MS, KERBAUY J, GONÇALVES M S, *et al.* Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. **American Journal of Hematology**; 53(2): 72-6, 1996.

FLEURY MK. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais. **Rev Bras Anal Clin**, 39(2):89-93, 2007.

FRENETTE, P. S; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise, **J Clin Invest** 117(4): 850-8, 2007.

FRIEDRISCH JR, SHEEHAN V, FLANAGAN JM, *et al.* The role of BCL11A and HMIP-2 polymorphisms on endogenous and hydroxyurea induced levels of fetal hemoglobin in sickle cell anemia patients from southern Brazil. **Blood Cells Mol Dis.**;62:32–7, 2016.

GALARNEAU G, PALMER C D, SANKARAN V G, ORKIN S H, HIRSCHHORN J N, LETTRE G. Fine-Mapping at Three Loci Known to Affect Fetal Hemoglobin Levels Explains Additional Genetic Variation. **Nature Genetics**; 42: 1049-1051, 2010.

GALIZA NETO, G., PITOMBEIRA, M.S., VIEIRA, H.F. *et al.* Analysis of  $\beta$ S globin gene haplotypes in Ceará, Brazil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, vol. 41, n. 5, p. 315-321, 2005.

GLADWIN, M. T.; SCHECHTER, A. N. Nitric oxide therapy in sickle cell disease. **Semin. Hematol.**, 38: 333-42, 2001.

GONÇALVES MS, BOMFIM GC, MACIEL E, *et al.* Beta S haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz J Med Biol Res.**; Oct: 36(10):1283-8, 2003.

GONÇALVES, M. S., NECHTMAN, JF. FIGUEIREDO, MS., *et al.* Sickle cell disease in a brazilian population from São Paulo: a study of the  $\beta$  S haplotypes. **Human Hered**, vol. 44, p. 322-327, 1994.

GREEN NS, BARRAL S. Genetic Modifiers of HbF and Response to Hydroxyurea in Sickle Cell Disease. **Pediatr Blood Cancer**; 56(2):177–81, 2011.

HALSEY, C., ROBERTS I. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, 120: 177-86, 2003.

HAYNES, J. J. R.; BALIGA, B. S.; OBIAKO, B. *et al.* Zileuton induces hemoglobin F synthesis in erythroid progenitors: role of the L-arginine-nitric oxide signaling pathway. **Blood**, 103: 3945-50, 2004.

HIGGS DR, ALDRIDGE BE, LAMB J, *et al.* The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. **N Engl J Med**. Jun; 306(24):1441-6, 1982.

HIGGS DR, WOOD WG. Genetic complexity in sickle cell disease. **Proc Natl Acad Sci USA**;105(33), 2008.

HIROKAWA K; OHENE-FREMPONG K; HORIUSHI K. Determination of HbF level, maturation and morphology of individual sickle cell image cytometry. **Blood**. 86 (10): 139<sup>a</sup>, 1995.

INATI, A. BOU ALAWI, W., KOUSSA, S., *et al.*  $\beta$ S -Globin gene cluster haplotypes and Hb F levels are not the only modulators of 55 sickle cell disease in Lebanon. **Eur. J. Haematol.**, vol. 70, p. 79-83, 2003.

KATO GJ, GLADWIN MT, STEINBERG MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood reviews**; 21(1):37-47, 2007.

KLINGS, E. S., WYSZYNSKI, D.F., NOLAN, V.G., *et al.* Abnormal pulmonary function in adults with sickle cell anemia. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 173, p. 1264-1269, 2006.

LEAL, A.S. “Haplótipos da $\beta$ <sup>S</sup>-Globina e sua correlação clínica-hematológica em

**portadores de Anemia Falciforme atendidos no serviço de Hematologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro/Hemocentro Regional De Uberaba**". 2014, 70p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2014.

LEAL, A.S; MARTINS, P.R.J.; BALARIN, M.A.S. Haplotypes of the  $\beta^S$ - globin cluster in patients with sickle cell anemia at a University Hospital in the Triangulo Mineiro, Minas Gerais. **Rev. Bras. Hematol.Hemoter.**, 37(2):140-141, 2015.

LETTRE G, SANKARAN VG, BEZERRA MAC, *et al.* DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proc Natl Acad Sci U S A.**;105(33):11869–74, 2008.

MA Q, WYSZYNSKI DF, FARRELL JJ, *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic determinants of response to hydroxyurea. **Pharmacogenomics J.**; 7(6):386–94. 2007.

MACHADO, R. F. P. Hipertensão arterial pulmonar associada à anemia falciforme. **J. Bras.Penumol.**, v. 33, n. 5, p. 583-591, 2007.

MAKANI J, MENZEL S, NKYA S, COX SE, DRASAR E, SOKA D, *et al.* Genetics of fetal hemoglobin in Tanzanian and British patients with sickle cell anemia. **Blood.**;117(4):1390–2. 2011.

MARENGO-ROWE, A. J. Structure- unction relations of human hemoglobins. **Proc. Bayl Univ Med Cent**, v. 19, n. 3, p. 239-245, 2006.

MENZEL S, GARNER C, GUT I, MATSUDA F, *et al.* A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. **Nat Genet.**;39(10):1197–9, 2007.

MORENO N, MARTINEZ JÁ, BLANCO Z, *et al.* Beta-globin cluster haplotypes in Venezuelan sickle cell patients from the state of Aragua. **Genet Mol Biol**, 25(1) 21-24, 2002.

MOUSINHO-RIBEIRO, R.C *et al.* . Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 30, n. 2, Apr. 2008 .

MURRAY, N.; SERJEANT, B. E.; SERGEANT, G. R. Sickle cell-hereditary persistence of fetal haemoglobin and its differentiation from other sickle cell syndromes. **British Journal of Haematology**, v.69, n.1, p.89-92, 1988.

NAGEL RL, RANNEY HM. Genetic epidemiology of structural mutations of the betaglobin. **Semin Hematol**, Oct;27(4):342-59, 1990.

NAGEL RL, STEINBERG MH. Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. **Pediatr Pathol Mol Med**. 2001 Mar-Apr; 20(2):123-36, 2001.

NAGEL RL, STEINBERG MH: Hemoglobin SC Disease and HbC Disorders. In:

Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL (ed.). Disorders of Hemoglobin. Genetic, Pathophysiology, and Clinical Management. **Cambridge University Press**, New York, pp 756-766, 2001.

NAGEL RL. Severity, pathobiology, epistatic effects, and genetic markers in sickle cell anemia. **Semin Hematol.** Jul; 28(3):180-201,1991.

NAGEL, R. L.; FABRY, M. E.; PAGNIER, J.*et al.* Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. **N Engl J Med.**, v. 312, p. 880–4, 1984.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 22(1): 05-22, 2000.

NAOUM, P.C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Talassemias alfa. **LAES & HAES**, n. 113, 70-98, 1998.

OKUMURA, JV; LOBO, CLC; BONINI-DOMINGOS, CR. Beta-S Globin Haplotypes in patients with Sickle Cell Anemia: One approach to understand the diversity in Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v 35, n. 1, p. 71-72, 2013 .

PEREIRA, C. I. A. **Estudo de polimorfismos associados ao aumento da expressão de Hemoglobina Fetal (HbF)**. 2013, 84p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

POWARS, D.R.; CHAN, L.S.; HITI, A; RAMICONE, *et al.* Outcome of sickle cell anemia: a 4-decade observational study of 1056 patients. **Medicine (Baltimore)**, Nov;84(6):363-76, 2005.

RIEDER, R. F.; SAFAYA, S.; GILLETTE, P.; FRYD, *et al.* Effect of  $\beta$ -globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. **Am. J. Hematol.**, v. 36, p. 184-9, 1991.

ROBENHORST SHB. Análise dos haplótipos da Anemia Falciforme em Fortaleza revela as origens étnicas da população cearense; **J. Bras. Patol. Med. Lab**, 45 (2):115-118, 2009.

RODRIGUEZ ROMERO, SÁENZ RENAULD G, CHAVES VILLALOBOS MA. Haplótipos de La Hemoglobina S: importância epidemiológica, antropológica y clínica. **Revista Panama Salud Publica**, 3 (1):1-8, 1998.

ROSSE, W. F. et al. New views of sickle cell disease pathophysiology and treatment. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 2-17. 2000.

RUMANNEY MB, NGO BITOUNGUI VJ, VORSTER AA, *et al.* The Co-Inheritance of Alpha-Thalassemia and Sickle Cell Anemia Is Associated with Better Hematological Indices and Lower Consultations Rate in Cameroonian Patients and Could Improve Their Survival. Veitia RA. **PLOS ONE**; 9 (6), 2014.

RUSANOVA I, ESCAMES G, COSSIO G, *et al.* Oxidative stress status, clinical outcome, and  $\beta$ -globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. **European J Haematol.**; 85 (6):529-537., 2010.

SALEH, A. W., H. F. HILLEN, *et al.* Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. **Acta Haematol** 102(1): 31- 7, 1999.

SANKARAN, V.G, MENNE T.F, XU J, *et al.* Human Fetal Hemoglobin Expression is Regulated by the Developmental Stage-Specific Repressor BCL11A. **Science**. v.332, p.1839-1842, 2008.

SANKARAN, V.G, XU J, ORKIN S.H. Advances in the Understanding of Haemoglobin Switching. **Br J Hematol**,v. 149, p.181–194, 2010.

SANKARAN VG, WEISS MJ. Anemia: Progress in molecular mechanisms and therapies. **Nat Med**; 21(3):221–30, 2015.

SCHECHTER, A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, Nov 15;112(10):3927-38,2008.

SCOOT JP, *et al.* Hydroxyurea therapy in children severely affected with sickle cell disease. **Journal of Pediatrics**.128(6): 820-828, 1996.

SILVA FILHO IL, RIBEIRO GS, MOURA PG, VECHI M L, *et al.* Manifestações clínicas agudas na primeira e segunda infâncias e características moleculares da doença falciforme em um grupo de crianças do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**; 34(3): 196-201, 2012.

SILVA, LB; GONÇALVES RP.; ROBENHORST SHB. Análise dos haplótipos da Anemia Falciforme em Fortaleza revela as origens étnicas da população cearense. **J.Bras. Patol. Med. Lab**, 45 (2):115-118, 2009.

SILVA, WS; KLAUTAU-GUIMARÃES, MN; GRISOLIA, CK.  $\beta$ -globin haplotypes in normal and hemoglobinopathic individuals from Reconcavo Baiano, State of Bahia, Brazil. **Genetics And Molecular Biology**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.411-417, 2010.

STADHOUDERS R, AKTUNA S, THONGJUEA S, *et al.* HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers. **J Clin Invest.**;124(4):1699–710, 2014.

STAMATOYANNOPOULOS, G.; NIENHUIS, A. W.; LEDER, P., *et al.* **The Molecular Basis of Blood Diseases**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1987.

STEINBERG M H. Predicting Clinical Severity in Sickle Cell Anemia. **Br J Hematol**. v.129, p. 465-481 2005.

STEINBERG MH, HSU H, NAGEL RL, *et al.* Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. **Am J Hematol**; Mar; 48(3):175-81, 1995.

STEINBERG MH, ROSENSTOCK W, COLEMAN MB, *et al.* Effects of thalassemia and microcytosis on the hematologic and vasoocclusive severity of sickle cell anemia. **Blood**.

Jun; 63(6):1353-60, 1984.

STEINBERG MH. Modulation of phenotypic diversity of sickle cell anemia. *Hemoglobin*.; 20(1):1-19,1996.

STEINBERG, M. H.; LU, Z. H.; BARTON, F. B.; *et al.* Multicenter Study of Hydroxyurea: Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Determinants of response to hydroxyurea. **Blood**. v. 89, p. 1078–88, 1997.

STUART, M.J; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. **Lancet**, Oct 9-15;364(9442):1343-60, 2004.

SUTTON, M; BOUHASSIRA, E.E; NAGEL, R.L. Polymerase Chain Reaction Amplification Applied Determination of  $\beta$ -like Globin Gene Cluster Haplotypes. **American Journal of Hematology**, v. 32, p. 66-69, 1989.

TAN, S.C.A.; QUAH, T.C.; LOW, P.S.; CHONG, S.S. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for  $\alpha$ -thalassemia. **Blood**; 98(1):250-1, 2001.

THEIN S L, MENZEL S, LATHROP M, GARNER C. Control of Fetal Hemoglobin: New Insights Emerging From Genomics and Clinical Implications. **Hum Mol Genet**. v. 18, p.216–223, 2009.

THEIN S L, MENZEL S, PENG X, BEST S, *et al.* Intergenic Variants of *HBS1L-MYB* Are Responsible for a Major Quantitative Trait *Locus* on Chromosome 6q23 Influencing Fetal Hemoglobin Levels in Adults. **PNAS**, v. 104, p.11346-11351 2007.

THEIN SL, MENZEL S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. **Br J Haematol**.;145(4): 455-67,2009.

TOME-ALVES, R. *et al.* Hemoglobinas AS/alfa talassemia: importância diagnóstica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 22, n. 3, Dec. 2000.

UDA, M.; GALANELLO, R., SANNA, S. *et al.* Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobina and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. **Proc.Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.5, n. 5, p. 1620-1625, 2008.

VEGIOPOULOS A, GARCÍA P, EMAMBOKUS N, FRAMPTON J. Coordination of erythropoiesis by the transcription factor c-Myb. **Blood**; 107(12):4703–10, 2006.

VICHINSKI, J. G. T. *et al.* Variants in the VCAM1 gene and risk for symptomatic stroke in sickle cell disease. **Blood.**, v. 100, p. 4303-4309, 2002.

WAGNER, S.C; FRIEDRISCH, J.R; JOB, F.; HUTZ, M.H. Caracterização molecular da anemia falciforme em pacientes de Porto Alegre. **Revista Brasileira de Genética**, vol. 19, p.244, 1996.

WATANABE, A.M.; PIANOVSKI, M., LENZI L, *et al.* Frequência de haplótipos de  $\beta$ S-globina no estado do Paraná e manifestações clínicas de anemia falciforme. **J. Bras. Patol Med. Laboratório** Rio de Janeiro, v. 53, n. 1, p. 24 a 30 de fevereiro de 2017.

WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B. The Thalassemia Syndromes. 3ed. **Blackwell Scientific Publications**, 1981.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v.79, n.8, p.704-712, 2001.

WONKAM, A., MNIKA, K., NGO BITOUNGUI, *et al.* Clinical and genetic factors are associated with pain and hospitalisation rates in sickle cell anaemia in Cameroon. **British journal of haematology**, 180(1), 134-146, 2017.

ZAGO M.A. Origem e heterogeneidade da anemia falciforme no Brasil. **Boletim (SBHH)**; 15:3-8, 1993.

ZAGO, M.A.; SILVA, W. A. JR; FRANCO, R. F. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the Brazilian population. **Ciênc. cult.** (São Paulo), vol. 51, n. 3-4, p. 226- 234, 1999.

ZAGO, M.A; FIGUEREIDO, M.S; OGO, S.H. Bantu  $\beta^s$  cluster predominates among brazilian blacks. **Am J Phy Anthropol**, vol. 88, p. 295-298, 1992.

## ANEXO 01 - Parecer do CEP – UFTM



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba (MG)**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP**  
 Rua Madre Maria José 122 - 3º andar – Bairro Nossa Senhora da Abadia  
 38025-180 Uberaba-MG - TELEFONE 34-3318-5776  
 E-mail: [cep@pesqpg.uftm.edu.br](mailto:cep@pesqpg.uftm.edu.br)

### IDENTIFICAÇÃO

**TÍTULO DO PROJETO:** HAPLÓTIPOS DE  $\beta$ -GLOBINA E SUA CORRELAÇÃO CLÍNICO-HEMATOLÓGICA EM PORTADORES DE DOENÇA FALCIFORME ATENDIDOS NO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO/HEMOCENTRO REGIONAL DE UBERABA  
**PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL:** PAULO ROBERTO JULIANO MARTINS  
**INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:** UFTM  
**DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM:** 30/05/2011  
**PROTOCOLO CEP/UFTM:** 1949

### PARECER

De acordo com as disposições da Resolução CNS 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM considera o protocolo de pesquisa **aprovado**, na forma (redação e metodologia) como foi apresentado ao Comitê.

Conforme a Resolução 196/96, o pesquisador responsável pelo protocolo deverá manter sob sua guarda, pelo prazo de no mínimo cinco anos, toda a documentação referente ao protocolo (formulário do CEP, anexos, relatórios e/ou Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos – TCLE assinados, quando for o caso) para atendimento ao CEP e/ou à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Toda e qualquer alteração a ser realizada no protocolo deverá ser encaminhada ao CEP, para análise e aprovação.

O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início da realização do projeto.

Uberaba, 16 de Maio de 2014.

  
**Prof.ª Ana Palmira Soares dos Santos**  
**Coordenadora do CEP/UFTM**



Memorando nº 61/DHH/UFTM

Uberaba, 14 de junho de 2012

Da: Disciplina de Hematologia e Hemoterapia  
Ao :Comitê de Ética da UFTM

Assunto: Extensão do Projeto nº 1949

A hemoglobina fetal (Hb F) e os haplótipos da globina  $\beta S$  são considerados como fatores que modulam a severidade da Doença Falciforme. Sabe-se que 20% a 50% da variação dos níveis de Hb F em pacientes com anemia falciforme são atribuídos a três principais *loci*: o SNP C→T na posição -158 a 5' do gene *Gγ*, a região intergênica *HBSIL-MYB* no cromossomo 6q e o gene *BCL11A* no cromossomo 2p15.

Assim, considerando o importante papel da taxa de hemoglobina fetal sobre as manifestações clínicas e a evolução desta grave hemoblobinopatia, o estudo dos polimorfismos (genes *BCL11A* e *HBSIL-MYB*) poderia contribuir para o melhor entendimento dos fatores genéticos que modulam o fenótipo da doença falciforme.

Desta forma, solicitamos autorização deste Comitê para incluir no projeto a análise desses polimorfismos.

Informamos que a metodologia utilizada é a mesma descrita no projeto aprovado por esse Comitê, intitulado "Haplótipos de  $\beta$ -globina e sua correlação clínico-hematológica em portadores de doença falciforme atendidos no serviço de hematologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro/Hemocentro Regional de Uberaba", registrado com o nº 1949/2011.

Atenciosamente,

*Paulo Roberto Juliano Martins*  
**Dr. Paulo Roberto Juliano Martins**

Prof. Associado da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UFTM

*Aprovado em*  
*15/6/2012*  
*[Assinatura]*

## ANEXO 02 – PARECER DO CEP HEMOMINAS



Belo Horizonte, 02 de março de 2012

OFÍCIO Nº 26 / 2012  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Prezado Senhor Pesquisador, Paulo Roberto Juliano Martins

Encaminhamos o parecer consubstanciado referente ao seu projeto de pesquisa “Haplótipos da  $\beta$ -globina e sua correlação clínica-hematológica em portadores de Doença Falciforme atendidos o Serviço de Hematologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hemocentro Regional de Uberaba”, nº de registro 324. Seu projeto foi aprovado por nosso Comitê, e então, a partir deste momento, sua pesquisa pode ser desenvolvida no âmbito da Fundação Hemominas.

Desejamos boa sorte e sucesso em seu estudo.

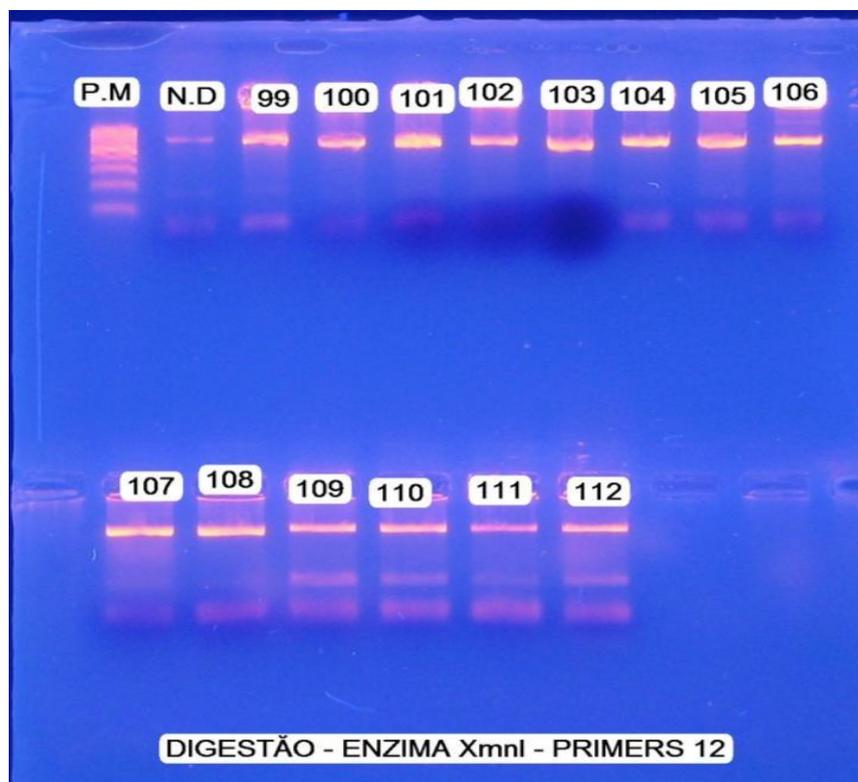
Atenciosamente,

*Simone das Virgens*  
Simone das Virgens

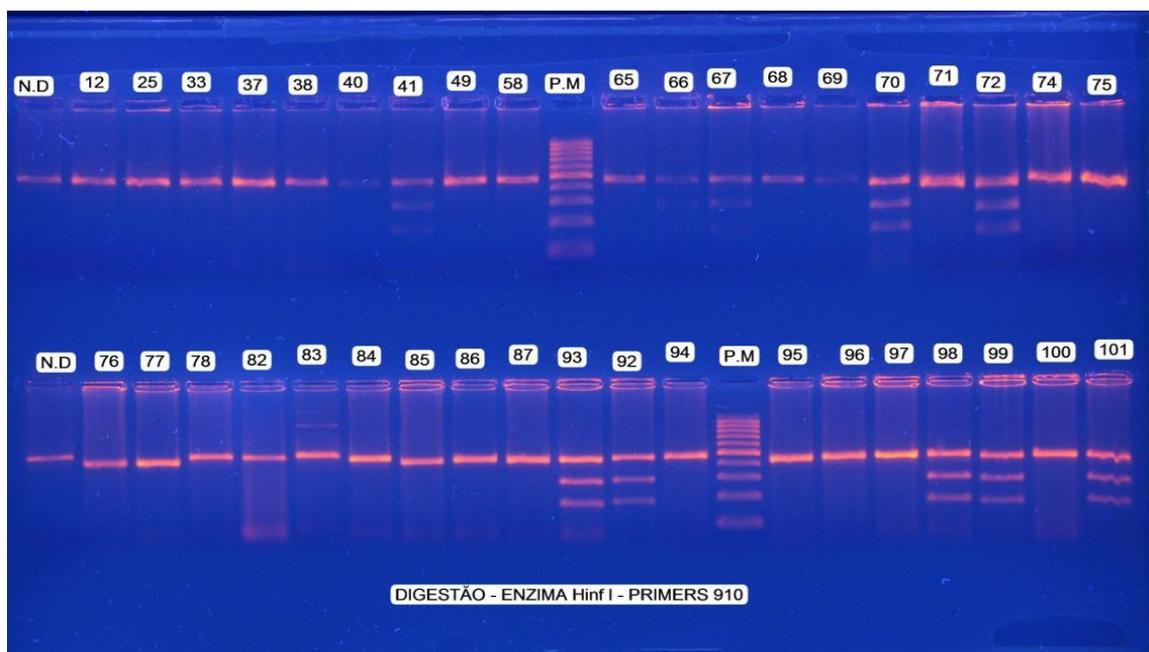
secretária do Comitê de Ética em Pesquisa  
Fundação Hemominas

### ANEXO 03 –FOTOGRAFIAS DO ESTUDO MOLECULAR

- Haplótipos  $\beta^S$



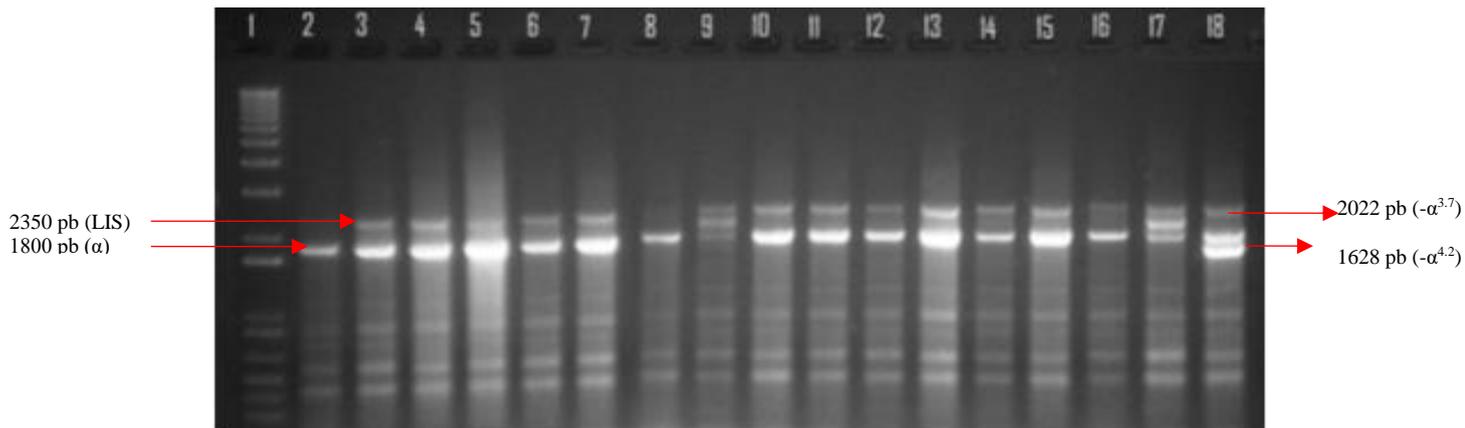
Fotografia do gel de agarose 2% contendo produtos da PCR- RFLP, mostrando sujeitos com os genótipos (-/-) para o sítio de restrição da enzima XmnI.



Fotografia do gel de agarose 2% contendo produtos da PCR-RFLP, os indivíduos 12, 25 apresentam genótipo (-/-), já os indivíduos 93,92 apresentam genótipos (+/-) para o sítio de restrição da enzima Hinf I.

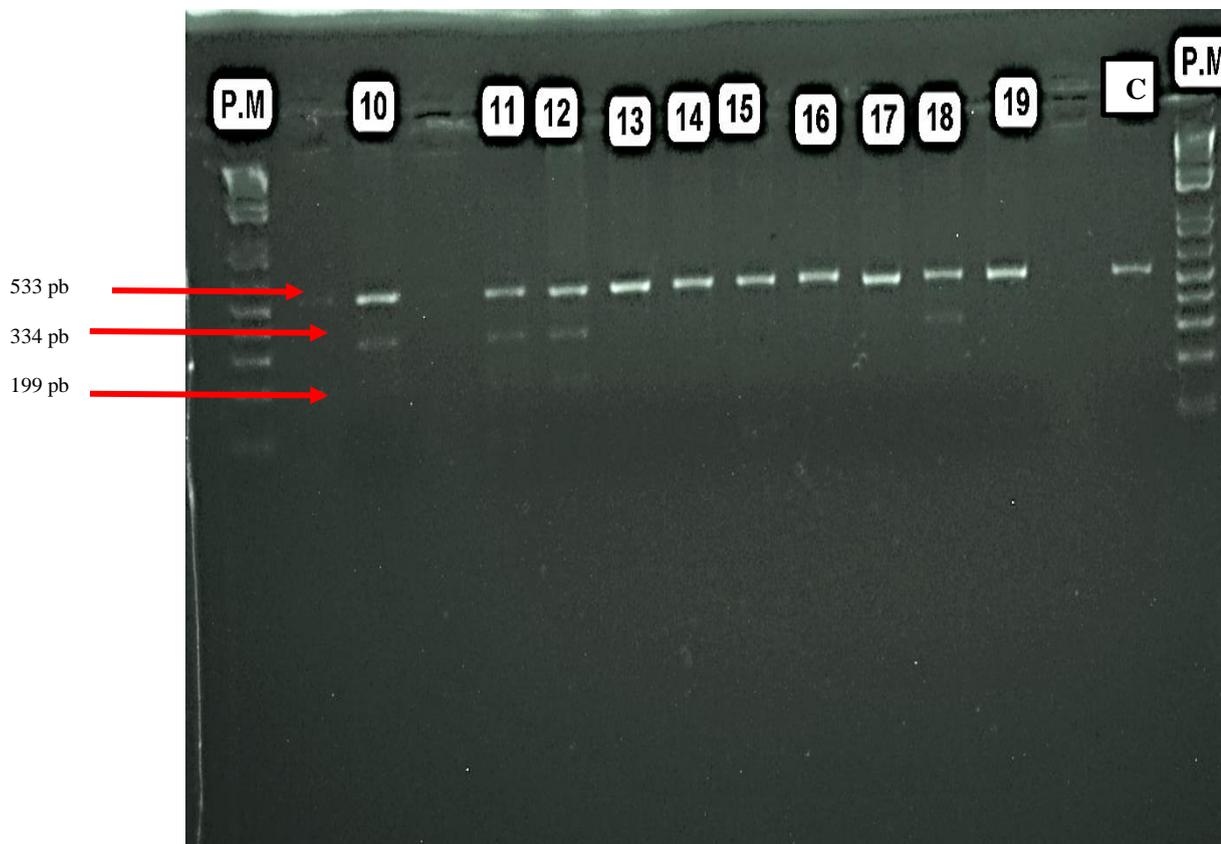
- **ALFA-TALASSEMIA:**

Fotografia de um gel eletroforético de agarose corado com brometo de etídio com os produtos amplificados da *gap-PCR multiplex* de 19 pacientes desse estudo. Nesta podemos visualizar as bandas referentes a amplificação do gene LIS; do alelo  $\alpha$  normal e das deleções  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$  em heterozigose conforme descrito na legenda.



Fotografia de um gel de agarose 1% pós-eletroforese e exposto à luz ultravioleta para identificação dos produtos amplificados. A coluna 1 corresponde ao padrão de peso molecular 1 Kb (DNA Ladder, Invitrogen), as colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 às amostras de sujeitos com genótipo normal caracterizado pela banda de 1800 pb do gene  $\alpha$ -globina. A banda de 2350pb em todas as canaletas é a do fragmento do gene LIS usado como controle positivo. Na canaleta 9 há uma amostra de indivíduo heterozigoto para a deleção  $-\alpha^{3.7}$ , na qual se notam três bandas, a do gene LIS, a do alelo híbrido de deleção do gene  $\alpha$  de 3,7 Kb de 2022/2029 pb e outra do alelo  $\alpha$  normal de 1800 pb. As colunas 17 e 18 são de heterozigotos para as deleções  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$  respectivamente, sendo que a canaleta 18 apresenta três bandas, a do gene LIS, a do alelo de deleção do gene  $\alpha$  híbrido de 1628kb e a terceira do alelo  $\alpha$  normal de 1800 kb.

- **POLIMORFISMOS DA HbF: SNP rs4671393**



Fotografia de gel de agarose 2% representativo do fragmento amplificado do gene *BCL11A* na região do polimorfismo rs4671393, digerido com *Acu* I. Nos canais 10, 11, 12 e 18 a enzima digeriu em apenas um dos alelos (genótipo AG). Nos canais 13, 14, 15, 16 e 17 a enzima não digeriu na região do polimorfismo (genótipo GG). Peso molecular de 100 pb.