

**RAHYSSA RODRIGUES SALES**

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA  
FETAL EM CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME TRIADAS PELO  
PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS E  
ACOMPANHADAS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE DA  
FUNDAÇÃO HEMOMINAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**BELO HORIZONTE**

**2017**

**RAHYSSA RODRIGUES SALES**

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA  
FETAL EM CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME TRIADAS PELO  
PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS E  
ACOMPANHADAS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE DA  
FUNDAÇÃO HEMOMINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Marcos Borato Viana

Coorientador: Dr. André Rolim Belisário

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**BELO HORIZONTE**

**2017**

S163a Sales, Rahyssa Rodrigues.  
Avaliação da modulação dos níveis de hemoglobina fetal em crianças com anemia falciforme triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas [manuscrito]. / Rahyssa Rodrigues Sales. - - Belo Horizonte: 2017.  
109f.  
Orientador: Marcos Borato Viana.  
Coorientador: André Rolim Belisário.  
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.  
1. Anemia Falciforme. 2. Hemoglobina Fetal. 3. Polimorfismo Genético. 4. Criança. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Viana, Marcos Borato. II. Belisário, André Rolim. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WS 300

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Faculdade de Medicina**  
**Pós-graduação em Ciências da Saúde**  
**Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente**

Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramírez  
Vice-Reitora: Profa. Sandra Regina Goulart Almeida  
Pró-Reitora de Pós-graduação: Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira  
Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Ado Jório

**Faculdade de Medicina**

Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes  
Vice-diretor: Prof. Humberto José Alves

**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração  
Saúde da Criança e do Adolescente**

Coordenador Geral do Centro de Pós-Graduação  
Prof. Luiz Armando Cunha de Marco

Subcoordenador Geral do Centro de Pós-Graduação  
Prof. Selmo Geber

Chefe do Departamento de Pediatria: Profa. Maria do Carmo Barros de Melo

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da  
Criança e do Adolescente: Profa. Ana Cristina Simões e Silva

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde  
da Criança e do Adolescente: Profa. Roberta Maia de Castro Romanelli

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da  
Criança e do Adolescente:

Profa Ana Cristina Simões e Silva – Titular  
Prof. Leandro Fernandes Malloy Diniz – Suplente  
Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira – Titular  
Profa. Benigna Maria de Oliveira – Suplente  
Profa. Helena Maria Gonçalves Becker – Titular  
Profa. Ana Cristina Côrtes Gama – Suplente  
Prof. Jorge Andrade Pinto – Titular  
Profa. Luana Caroline dos Santos – Suplente  
Profa. Juliana Gurgel – Titular  
Profa. Ivani Novato Silva – Suplente  
Profa. Roberta Maia de Castro Romanelli – Titular  
Profa. Débora Marques de Miranda – Suplente  
Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro – Titular  
Profa. Eugênia Ribeiro Valadares – Suplente  
Arabele Teixeira de Lacerda – Discente Titular  
Ariene Silva do Carmo – Discente Suplente

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por mais uma conquista e pela capacidade de cumprir meus objetivos.

Aos participantes da pesquisa e seus familiares, pela confiança que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao meu orientador Professor Marcos Borato Viana, pela oportunidade, excelente orientação desde a época da graduação, e que sempre foi marcada por admirável entusiasmo e dedicação.

Ao meu coorientador André Rolim Belisário, com quem aprendi muito mais do que pesquisa com ética e profissionalismo, pela excelente orientação, por sempre ter acreditado em meu potencial e pela participação efetiva em minha formação profissional, participação esta que esteve presente desde meus primeiros passos na vida acadêmica.

Às bolsistas de iniciação científica, Fabíola Mendes e Gabriela Faria que, com muito trabalho e dedicação, viabilizaram a execução do projeto.

Aos meus pais Reginaldo Guedes Sales e Valéria Maria Magalhães Rodrigues Sales que, com todo amor e dedicação, sempre proporcionaram todos os recursos necessários para meu crescimento pessoal e profissional. À minha irmã Arianne Rodrigues Sales, por sua presença sempre amiga e carinhosa, por todo amor e por sempre poder compartilhar meus projetos e sentimentos. Vocês foram os grandes norteadores da minha conduta pessoal e profissional. Tudo que sou hoje devo a vocês.

Ao meu noivo Vinícius de Souza Silva, por todo amor e apoio, sempre me incentivando o crescimento pessoal e profissional e, principalmente, por estarmos construindo juntos nossa própria família.

A toda a equipe do Serviço de Pesquisa da Fundação HEMOMINAS, onde fiz verdadeiros amigos, por toda ajuda e por tornarem meus dias mais agradáveis.

A todos os outros familiares e amigos, por todo apoio e por compreenderem minhas ausências.

À minha amiga Nayara Evelin de Toledo que, desde a graduação, sempre me apoiou e aconselhou de forma carinhosa e com quem pude compartilhar inseguranças e projetos de vida.

A todas as instituições envolvidas, Fundação HEMOMINAS, UFMG, NUPAD, CAPES e FAPEMIG pela estrutura e apoio financeiro que tornaram possível a realização do projeto.

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 Hemoglobina – estrutura e função .....	17
2.2 Hemoglobinopatias .....	19
2.3 Doença Falciforme .....	20
2.4 A Doença Falciforme no Brasil .....	23
2.5 Fisiopatologia da Doença Falciforme .....	26
2.6 Características clínicas e laboratoriais da Doença Falciforme .....	29
2.7 Efeitos dos níveis elevados de Hb F na Anemia Falciforme .....	32
2.8 Bases genéticas da regulação da Hb F .....	37
2.9 Modificadores genéticos dos níveis de Hb F e seu impacto na diversidade fenotípica da doença falciforme.....	44
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	47
3.1 Objetivo Geral .....	47
3.2 Objetivos Específicos.....	47
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	48
4.1 Delineamento e local do estudo .....	48
4.2 Casuística .....	48
4.3 Variáveis laboratoriais .....	51
4.4 Variáveis genéticas .....	53
4.5 Análise Estatística .....	56
4.6 Aspectos Éticos .....	57
<b>5 RESULTADOS</b> .....	58
5.1 Características da população de estudo .....	58
5.2 Variáveis genéticas.....	58
5.3 Dados hematológicos .....	62
5.4 Testes de associação genética.....	63
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	71
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	82

<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	84
<b>10</b>	<b>ANEXOS</b> .....	92
10.1	Anexo 1: Protocolos de genotipagem para a identificação dos SNP's estudados .....	92
10.1.1	SNPs em <i>BCL11A</i> .....	92
10.1.2	SNPs em <i>HMIP2A</i> .....	96
10.1.3	SNPs em <i>HMIP2B</i> .....	97
10.1.4	SNP em <i>HBBP1</i> .....	100
10.2	Anexo 2: Banco de dados .....	102
10.3	Anexo 3: Comprovante de Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas.....	103
10.4	Anexo 4: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	104
10.5	Anexo 5: Termo de Assentimento .....	106



## RESUMO

**Introdução:** As manifestações clínicas da anemia falciforme (AF) são derivadas da polimerização da Hb S desoxigenada, que causa uma cascata de eventos fisiopatológicos. A hemoglobina fetal (Hb F) inibe essa polimerização, levando a fenótipo menos grave da doença. Polimorfismos em *loci* de herança quantitativa têm sido associados aos níveis de Hb F. O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre polimorfismos em *HBBP1*, *BCL11A* e na região intergênica *HBS1L-MYB* e a concentração relativa total de Hb F, bem como a outros parâmetros hematológicos em crianças com AF. **Materiais e Métodos:** Trata-se de um estudo de coorte retrospectiva, envolvendo crianças nascidas entre 1999 e 2008, com anemia falciforme confirmada por técnicas moleculares, triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PTN-MG) e encaminhadas ao Hemocentro de Belo Horizonte. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por PCR-RFLP, sequenciamento gênico ou PCR em tempo real. A determinação da concentração relativa de Hb F foi feita por eletroforese de Hb em pH alcalino. As análises de associação entre as variáveis nominais foram feitas pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Para as variáveis contínuas com distribuição normal, as análises foram realizadas utilizando o teste T ou ANOVA e as variáveis com distribuição não-normal foram analisadas pelos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. **Resultados:** Foram analisadas 233 crianças, sendo 119 (51,1%) do gênero masculino. O tempo médio de acompanhamento foi 9,78 ( $\pm$  0,18) anos. O SNP rs10128556 (*HBBP1*) não foi significativamente associado à concentração relativa de Hb F ( $p > 0,05$ ). A frequência do alelo T foi extremamente baixa (MAF=0,001). Foram identificados apenas 3 (1,3%) heterozigotos (CT) e nenhum homozigoto TT. Em *BCL11A*, os polimorfismos rs4671393 (alelo A) e rs11886868 (alelo C) foram associados significativamente ao aumento da concentração de Hb F ( $p < 0,001$  e  $p = 0,008$ ). Os polimorfismos rs7557939, rs11886868 e rs4671393 foram associados ao aumento de Hb total ( $p < 0,001$ ). Em *HBS1L-MYB*, todos os polimorfismos foram associados à concentração de Hb F. Os polimorfismos rs9399137 e rs35786788 apresentaram desequilíbrio de ligação total; os alelos “C” e “A”, respectivamente, foram associados ao aumento da concentração de Hb F ( $p = 0,002$ ) e de Hb total ( $p = 0,001$ ) e à diminuição da contagem de leucócitos ( $p = 0,004$ ), reticulócitos ( $p = 0,003$ ) e plaquetas ( $p = 0,04$ ). Os polimorfismos rs4895441 (alelo G) e rs9402686 (alelo A) associaram-se ao aumento da concentração de Hb F ( $p = 0,001$ ), de Hb total ( $p = 0,001$ ), e da saturação periférica de oxigênio ( $SpO_2$ ) ( $p = 0,001$  e  $0,004$ , respectivamente). Esses polimorfismos também foram associados à diminuição da contagem de reticulócitos ( $p = 0,001$ ). O polimorfismo rs9494145 foi significativamente associado ao aumento de Hb F ( $p = 0,006$ ), Hb total ( $p = 0,001$ ) e  $SpO_2$  ( $p = 0,01$ ) e à diminuição da contagem de leucócitos ( $p = 0,01$ ) e reticulócitos ( $p = 0,006$ ). No fragmento sequenciado em *HBS1L-MYB*, a inserção/deleção (In/del) AACCC/AAAC foi associada ao aumento da concentração de Hb F e de Hb total ( $p = 0,006$ ) e à diminuição da contagem de leucócitos ( $p = 0,03$ ) e reticulócitos ( $p = 0,01$ ). Já a troca de base A>G na posição 135097850 de *HBS1L-MYB* (rs não disponível) não foi significativamente associada a concentração de Hb F nem a nenhum outro fator hematológico ( $p > 0,05$ ). **Conclusões:** Este trabalho mostrou pela primeira vez a influência de polimorfismos em *BCL11A* e *HBS1L-MYB* na concentração de Hb F e de outros parâmetros hematológicos em população pediátrica com AF do estado de

Minas Gerais. Os resultados encontrados corroboram a maioria dos estudos previamente publicados.

## ABSTRACT

**Introduction:** The clinical features of sickle cell anemia (SCA) are derived from the polymerization of deoxy-Hb S that causes a pathophysiological cascade. Fetal hemoglobin (Hb F) inhibits this polymerization, leading to a milder disease. Polymorphisms at quantitative inheritance loci (QTL) have been associated with Hb F levels. This study aimed to evaluate associations between *HBBP1*, *BCL11A* and intergenic *HBS1L-MYB* and the relative concentration of Hb F, as well as other hematological parameters in children with SCA. **Materials and Methods:** This is a retrospective cohort study involving children born between 1999 and 2008, with SCA confirmed by molecular techniques, screened by Newborn Screening Program of Minas Gerais state and followed-up at the Blood Center of Belo Horizonte. Polymorphism genotyping was performed by PCR-RFLP, sequencing or real-time PCR. Relative Hb F concentration was determined by hemoglobin electrophoresis at alkaline pH. Associations between the nominal variables were performed by the chi-square test or Fisher's exact test. For the continuous variables with normal distribution, analyses were performed using T or ANOVA test; variables with non-normal distribution were analyzed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests. **Results:** 233 children were analyzed, of which 119 (51.1%) were male. The mean follow-up period was 9.78 ( $\pm$  0.18) years. No association between rs10128556 (*HBBP1*) and the relative concentration of Hb F ( $p > 0.05$ ) was found. The frequency of the T allele was extremely low (MAF = 0.001), as expected. Only three (1.3%) heterozygotes (CT) and no TT homozygotes were identified. Regarding *BCL11A*, rs4671393 (allele A) and rs11886868 (allele C) were significantly associated with increased concentration of Hb F ( $p < 0.001$  and  $p = 0.008$ , respectively). Polymorphisms rs7557939, rs11886868 and rs4671393 were associated with increased total Hb ( $p \leq 0.001$ ). Regarding *HBS1L-MYB*, all polymorphisms were associated with Hb F concentration. Polymorphisms rs9399137 and rs35786788 were in total linkage disequilibrium and their "C" and "A" alleles, respectively, were associated with increased Hb F ( $p = 0.002$ ) and total Hb ( $p = 0.001$ ) and decreased white blood cell count ( $p = 0.004$ ), reticulocytes ( $p = 0.003$ ) and platelets ( $p = 0.04$ ). SNPs rs4895441 (allele G) and rs9402686 (allele A) were associated with increased Hb F ( $p = 0.001$ ), total Hb ( $p \sim 0.001$ ), and peripheral oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>) ( $p = 0.001$  and  $0.004$ , respectively). These polymorphisms were also associated with decreased reticulocyte counts ( $p = 0.001$ ). The rs9494145 polymorphism was significantly associated with increased Hb F ( $p = 0.006$ ), total Hb ( $p = 0.001$ ) and SpO<sub>2</sub> ( $p = 0.01$ ) and decreased white blood cell count ( $p = 0.01$ ) and reticulocytes ( $p = 0.006$ ) counts. The insertion/deletion (In/del) AACCC/AAAC was associated with increased Hb F and total Hb concentration ( $p = 0.006$ ) and decreased white blood cell count ( $p = 0.03$ ) and reticulocytes ( $p = 0.01$ ) count. On the other hand, no association was found between single-base substitution A>G at position 135097850 of *HBS1L-MYB* (rs not available) and Hb F concentration or other hematological parameter ( $p > 0.05$ ). **Conclusions:** This study showed for the first time the influence of *BCL11A* and *HBS1L-MYB* polymorphisms on Hb F concentration and other hematological parameters in pediatric population with SCA from Minas Gerais state. This results corroborates most of the previously published studies.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BCL11A** – *B-cell CLL/lymphoma 11A*  
**BCOR** – BCL 6 correpressor  
**Ben** – Benin  
**Cam** – Camarões  
**CAR** - Central African Republica  
**CEP** - Comitê de Ética em Pesquisa  
**cm** – Centímetros  
**dL** – Decilitro  
**DL** - Desequilíbrio de Ligação  
**DNA** - Ácido desoxirribonucleico  
**DNMT1** – DNA Metil-transferase 1  
**DRS** - Diretorias Regionais de Saúde  
**EHW** - Equilíbrio de Hardy-Weinberg  
**FDA** - United States Food Drug Administration  
**g** – Gramas  
**GATA1** - *GATA Binding Protein 1*  
**Glu** - Ácido Glutâmico  
**Hb A** - Hemoglobina do adulto  
**Hb A2** - Hemoglobina A2  
**Hb C** - hemoglobina C  
**Hb D** - hemoglobina D  
**Hb F** - Hemoglobina F  
**Hb S** - hemoglobina S  
**Hb SS** - Homozigosidade para o alelo S  
**HBBP1** – Hemoglobina Beta Pseudogene 1  
**HBG2** – Hemoglobina gama 2  
**HBH** - Hemocentro de Belo Horizonte  
**HBS1L** - HBS1 like translational GTPase  
**HCM** - Hemoglobina Corpuscular Média  
**HPLC** – *High performance liquid chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
**HU** – Hidroxiureia  
**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
**In/Del** – Inserção/Deleção  
**KLF1** - *Kruppel-like factor 1*  
**L** – Litro  
**LCR** - *Locus Control Region*  
**LEU** – Leucócitos  
**MAF** - *Minor Allele Frequency*  
**mg** – Miligrama  
**MSH** - *Multicenter Study of Hydroxyurea*  
**MYB** - *MYB Proto-oncogene, Transcription Factor*  
**NCoR** - *Nuclear Receptor Corepressor 1*  
**NO** - *Nitric Oxide* – Óxido Nítrico

**PCR** - *Polymerase Reaction Chain* – Reação em Cadeia da Polimerase

**PTN** - Programa de Triagem Neonatal

**pg** – Picograma

**pH** - Potencial Hidrogeniônico

**PHHF** - Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal

**PLAQ** – Plaquetas

**QTL** - *Quantitative Trait Loci*

**Retic** – Reticulócitos

**RFLP** - Restriction Fragment Length Polymorphism

**RNA** - Ácido ribonucleico

**s** – Segundo

**Sen** – Senegal

**SNP** - *Single Nucleotide Polymorphism*

**SpO2** – Saturação Periférica de Oxigênio

**SUS** - Sistema Único de Saúde

**TAL1** - *T cell acute lymphocytic leukemia 1*

**TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TCTH** - Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas

**TWITCH** - *Transcranial Doppler with Transfusions Changing to Hydroxyurea*

**Val** – Valina

**VCM** - Volume Corpuscular Médio

**VMM** - Velocidade Média Máxima

**WBC** - *White Blood Cells*

**β-tal** - Beta Talassemia

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da mudança no padrão de expressão dos genes do agrupamento da $\beta$ -globina.....	18
Figura 2: Estrutura da molécula de hemoglobina.....	21
Figura 3: Distribuição do alelo $\beta^S$ .....	22
Figura 4: Incidência da anemia falciforme em Minas Geais.....	25
Figura 5: Mecanismo de vaso-oclusão na anemia falciforme.....	27
Figura 6: Hemólise e disfunção endotelial na anemia falciforme.....	28
Figura 7: Como a Hb F inibe a polimerização da Hb S.....	32
Figura 8: Mecanismos de ação da hidroxiureia na doença falciforme. ....	35
Figura 9: Localização dos SNPs utilizados na determinação dos haplótipos $\beta^S$ .....	36
Figura 10: Comparação da distribuição de Hb F .....	37
Figura 11: Organização genômica do cromossomo 6, com ênfase na região intergênica <i>HBS1L</i> e <i>MYB</i> . .....	39
Figura 12: Via de repressão BCL11A-Hb F. ....	40
Figura 13: Abordagem da edição de genoma terapêutica para indução da produção de Hb F em pacientes com anemia falciforme. ....	42
Figura 14: Distribuição hipotética da Hb F por célula F em paciente com anemia falciforme e 30% de Hb F. ....	43
Figura 15: Fluxograma de seleção dos pacientes, com base nos critérios de inclusão e exclusão adotados.....	49
Figura 16: Frequência haplotípica em 464 cromossomos de crianças com anemia falciforme. 60	
Figura 17: Desequilíbrio de ligação nas regiões <i>BCL11A</i> e <i>HMP2</i> .....	61
Figura 18: Boxplot da concentração relativa basal de Hb F em 223 crianças com anemia falciforme (Hb SS). ....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Incidência de nascidos vivos diagnosticados com doença falciforme (todas os subtipos) em alguns estados brasileiros .....	24
Tabela 2: Algumas manifestações clínicas da doença falciforme de acordo com o principal componente fisiopatológico .....	30
Tabela 3: Algumas características laboratoriais da anemia falciforme .....	31
Tabela 4: Efeitos do nível elevado de Hb F em fatores clínicos e hematológicos da Doença Falciforme .....	33
Tabela 5: Associação entre SNPs nos <i>loci BCL11A, HBS1L-MYB, HBG2 e HBBP1</i> e o nível de Hb F ou a porcentagem de células F na doença falciforme.....	44
Tabela 6: Associação relatada entre SNPs nos <i>loci BCL11A, HBS1L-MYB e HBG2</i> e fatores hematológicos e clínicos da doença falciforme.....	46
Tabela 7: Posição, localização e iniciadores utilizados para amplificação dos polimorfismos estudados .....	54
Tabela 8: Técnica de genotipagem utilizada para genotipagem dos SNPs .....	55
Tabela 9: Frequências genotípicas e alélicas para variantes em <i>HBBP1, BCL11A e HBS1L-MYB</i> em 232 crianças com anemia falciforme (Hb SS).....	59
Tabela 10: Classificação haplotípica em HMIP2 encontrada em 232 crianças com anemia falciforme (Hb SS).....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Tabela 11: Estatística descritiva das variáveis hematológicas estudadas em 233 crianças com anemia falciforme (Hb SS) .....	63
Tabela 12: Associação entre SNPs em <i>BCL11A</i> e a concentração relativa média de Hb F em 223 crianças com anemia falciforme (Hb SS).....	65
Tabela 13: Associação entre SNPs na região HMIP e a concentração relativa média de Hb F em 223 crianças com anemia falciforme (Hb SS).....	66
Tabela 14: Associação variantes genéticas em <i>HBBP1 e BCL11A</i> e fatores hematológicos em 232 crianças com anemia falciforme (Hb SS).....	68
Tabela 15: Associação variáveis hematológicas e variantes genéticas na região <i>HBS1L-MYB</i> em 232 crianças com anemia falciforme (Hb SS).....	70

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As doenças falciformes incluem um conjunto de desordens genéticas com herança autossômica recessiva caracterizadas pela concentração de hemoglobina S (Hb S;  $\alpha_2\beta^S_2$ ) superior a 50% (1). A anemia falciforme, estado homozigótico para o alelo  $\beta^S$  (Hb SS), além de ser o genótipo mais prevalente no Brasil, apresenta quadro clínico e hematológico frequentemente mais grave do que os demais genótipos (2,3). A origem do alelo  $\beta^S$  é uma mutação *missense* (rs334) no sexto códon do gene da globina beta, codificando uma valina residual no lugar do ácido glutâmico, aminoácido codificado normalmente nessa posição (4).

A introdução do alelo  $\beta^S$  no Brasil ocorreu como consequência do fluxo gênico promovido pelo tráfico de escravos africanos ao longo dos séculos XVI a XIX. Nesse período, quase quatro milhões de negros foram trazidos da costa ocidental da África (1). Atualmente, em virtude de sua considerável prevalência e morbimortalidade associadas, a doença falciforme constitui problema de Saúde Pública no País (5).

Embora seja transmitida por herança monogênica, a anemia falciforme é caracterizada por ampla diversidade fenotípica, evidenciando a influência de outros fatores na modulação do curso clínico da doença. Entre eles, citam-se fatores ambientais, socioeconômicos e outros fatores genéticos como, por exemplo, haplótipos do agrupamento da beta globina, coexistência de alfa talassemia e a concentração relativa de hemoglobina fetal (6,7). Inúmeras associações de variantes genéticas com subfenótipos da anemia falciforme têm sido relatadas (8).

A hemoglobina fetal (Hb F;  $\alpha_2\gamma_2$ ) é a mais importante moduladora do curso clínico da anemia falciforme. A Hb F dificulta, ou mesmo, impede a polimerização da desoxi-Hb S, evento que desencadeia as manifestações clínicas da doença (9). Trata-se da hemoglobina predominante desde a gestação até um a dois meses após o nascimento, quando os níveis de Hb F começam a diminuir e ocorre substituição pela hemoglobina do adulto (Hb A;  $\alpha_2\beta_2$ ) (9). A produção residual de Hb F passa, então, a representar menos de 1% da produção total de hemoglobina em indivíduos sem anemia falciforme (10). Em indivíduos com anemia falciforme, a troca de Hb F para Hb S acontece mais lentamente e níveis estáveis de Hb F não são atingidos antes dos 5 anos de idade (11).



A Hb F altera características clínicas e hematológicas da anemia falciforme, resultando em curso clínico menos grave. Níveis elevados de Hb F estão associados ao aumento da hemoglobina total e da sobrevivência de eritrócitos, além da redução da incidência de intercorrências clínicas, como crises de dor, síndrome torácica aguda, úlcera de perna e colelitíase (12–16). Adicionalmente, nível aumentado de Hb F prolonga a sobrevivência dos pacientes (17).

Embora os efeitos benéficos do nível elevado de Hb F no curso clínico da anemia falciforme estejam amplamente descritos na literatura científica, as bases moleculares da regulação da expressão de Hb F ainda não estão bem definidas. Pacientes com anemia falciforme possuem grande variação na concentração de Hb F, que é uma característica hereditária (18).

O entendimento da modulação dos níveis de Hb F é de grande relevância clínica, tendo em vista que níveis elevados de Hb F resultam, como referido, em menor gravidade clínica nos pacientes com anemia falciforme (10).

O esclarecimento das bases genéticas e moleculares da regulação da Hb F pode identificar, ainda, alvos terapêuticos que poderiam ser utilizados como meio para aumentar a concentração dessa hemoglobina e, conseqüentemente, diminuir, ou até mesmo inibir, as manifestações clínicas da doença.

Nos últimos anos, estudos de associação genética têm identificado inúmeras variantes em *loci* de herança quantitativa (QTL – *quantitative trait loci*) associadas aos níveis de Hb F (19–22). Os três principais *loci* envolvidos na expressão do gene  $\gamma$ -globina são: *BCL11A* (linfoma de células B 11A), localizado no cromossomo 2p16; a região intergênica *HBS1L-MYB* no cromossomo 6q23 e o sítio *XmnI* na região promotora do gene *HBG2*, localizado no cromossomo 11p15 (10,22). Polimorfismos genéticos encontrados nesses *loci* são responsáveis por cerca de 50% da variação fenotípica de Hb F (22).

A influência desses *loci* na regulação de Hb F tem sido confirmada em várias coortes, entretanto, diferenças nas frequências alélicas em populações distintas ou no delineamento dos estudos, tornam os resultados ainda controversos (23–32). Mais estudos se fazem necessários para a obtenção de resultados mais consistentes e conclusivos. Poucos estudos analisaram a influência dessas variantes nos níveis de Hb F em pacientes brasileiros e nenhum até o momento analisou a população de Minas Gerais (21,33,34). Adicionalmente, a grande maioria

desses estudos não explorou a interferência desses polimorfismos no curso clínico da doença, isto é, alterando outras características laboratoriais e clínicas (25,35,36). A razão principal da presente pesquisa funda-se, portanto, nos dados ora resumidos.

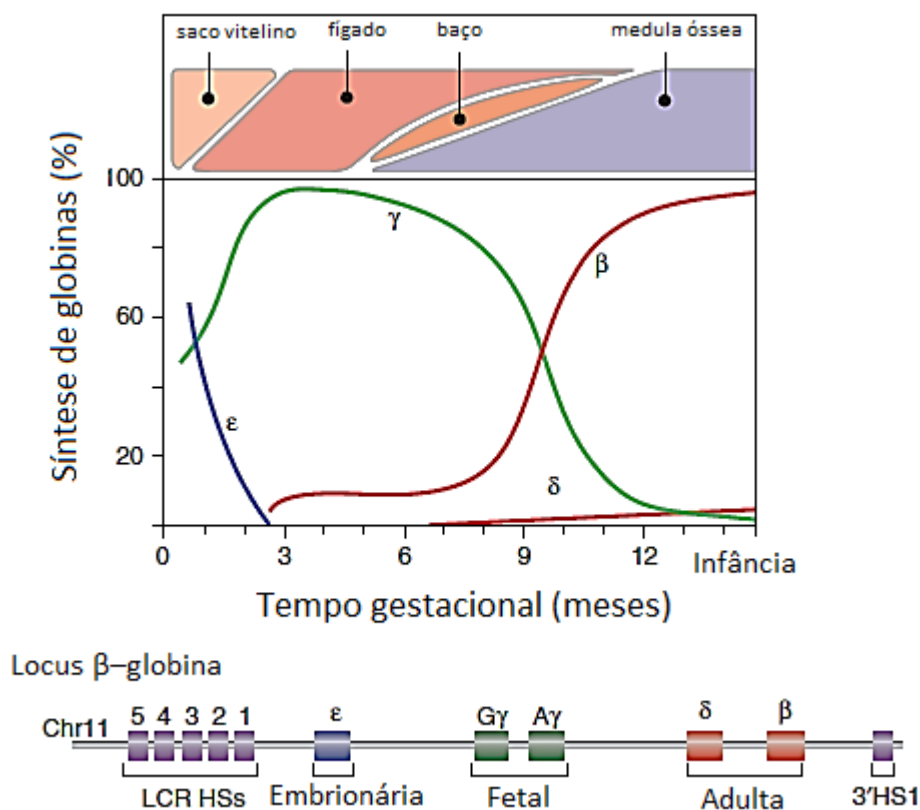
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Hemoglobina – estrutura e função

A hemoglobina humana é uma proteína globular tetramérica, composta por dois pares de cadeias polipeptídicas. Cada polipeptídeo possui uma área central, onde se inserem os grupos heme ligados a átomos de ferro. Sua principal função é o transporte de oxigênio ( $O_2$ ) dos pulmões para os tecidos. Mas também carrega outros gases como, por exemplo, dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e óxido nítrico (NO) (37).

As diferentes hemoglobinas humanas diferem quanto às cadeias peptídicas constituintes. Os genes que codificam as cadeias alfa ( $\zeta$ ,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) e beta ( $\epsilon$ ,  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\delta$  e  $\beta$ ) estão localizados nos cromossomos 16 e 11, respectivamente. Em cada agrupamento, o ordenamento dos genes reflete seu padrão de expressão ao longo do desenvolvimento embrionário (37,38).

Até o primeiro trimestre de gestação, a expressão do gene  $\epsilon$ -globina leva à produção de globina embrionária pela linhagem primitiva de eritrócitos presente no saco vitelino. Concomitantemente, no agrupamento alfa, a expressão do gene  $\zeta$ -globina ocorre durante os primeiros estágios da embriogênese. Em seguida, com o surgimento dos primeiros eritrócitos anucleados no fígado, os genes  $\gamma$ -globina passam a ser expressos, juntamente com o gene da  $\alpha$ -globina, predominando, portanto, a Hb F ( $\alpha^2\gamma^2$ ). Os dois genes  $\gamma$ , embora funcionalmente idênticos, diferem quanto à presença dos aminoácidos glicina ( $G\gamma$ ) ou alanina ( $A\gamma$ ) na posição 136 da cadeia alfa. Após o nascimento, a Hb F vai sendo gradativamente substituída pela hemoglobina do adulto (Hb A) em um processo mediado por reguladores transcricionais. Ocorre nesse período progressivo silenciamento dos genes  $\gamma$  e ativação do gene  $\beta$  (Figura 1) (38,39).



**Figura 1:** Representação esquemática da mudança no padrão de expressão dos genes do agrupamento da β-globina. O gráfico mostra a porcentagem da síntese de cada gene do agrupamento, em relação ao local onde é produzido e o período de gestação. Modificado de: (38).

Nos eritrócitos de adultos saudáveis, as hemoglobinas presentes são representadas por aproximadamente 97% de Hb A, seguida de cerca de 2% de Hb A<sub>2</sub> e cerca de 1% de Hb F. Em indivíduos com anemia falciforme, a troca de Hb F para Hb S acontece mais lentamente e níveis estáveis de Hb F não são atingidos antes dos cinco a dez anos de idade. Devido à pressão seletiva atribuída aos efeitos benéficos da Hb F na anemia falciforme, muitos desses pacientes possuem concentração aumentada de Hb F, mas trata-se de característica quantitativa com grande variabilidade interpessoal (40).

## 2.2 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias abrangem um conjunto de desordens geneticamente determinadas, com consequências estruturais e/ou funcionais na molécula de hemoglobina (41). Estima-se que 7% da população mundial seja afetada e que entre 300.000 e 400.000 bebês nascem anualmente com alguma hemoglobinopatia grave, sendo a grande maioria (90%) em países de baixa ou média renda (42,43).

Em termos gerais, podemos classificar as hemoglobinopatias em dois principais grupos, as talassemias e as variantes estruturais da hemoglobina.

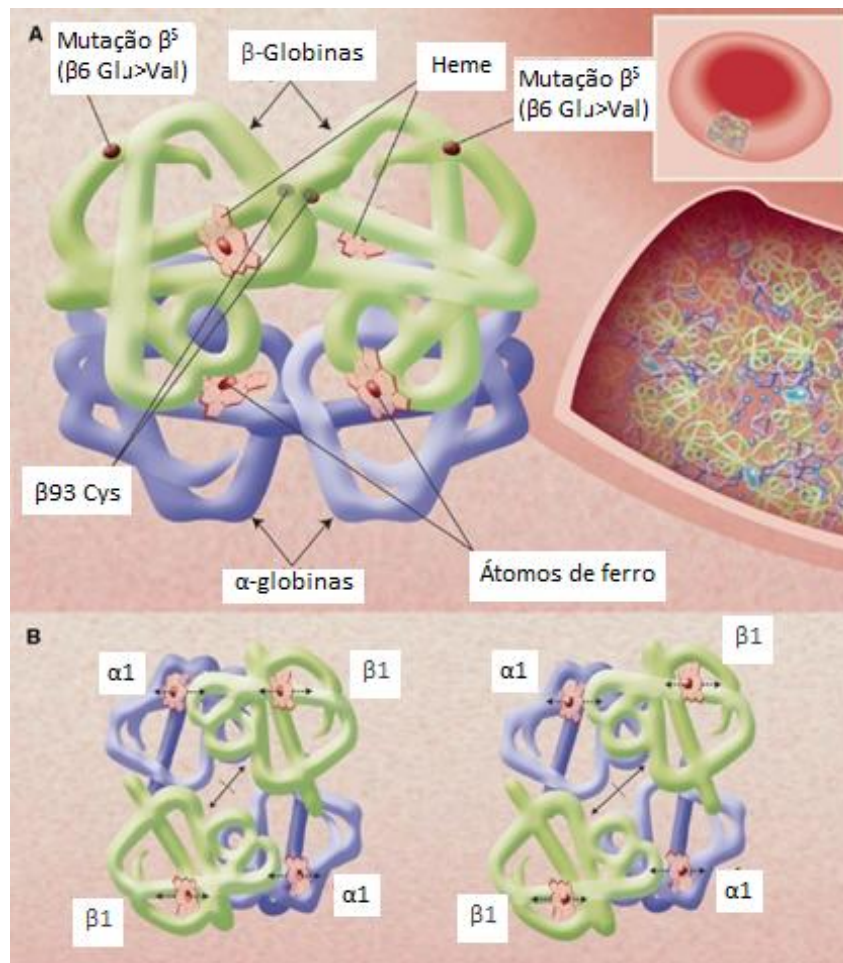
As talassemias consistem em alterações quantitativas na síntese de cadeias globínicas, sendo, a  $\alpha$ -talassemia e a  $\beta$ -talassemia as mais importantes sob o ponto de vista clínico. Em ambos os casos, mutações nos genes correspondentes reduzem ( $\alpha^+$  ou  $\beta^+$ ) ou suprimem ( $\alpha^0$  ou  $\beta^0$ ) sua expressão, causando desequilíbrio das concentrações de cadeias alfa e beta. O quadro clínico desses pacientes é bem variado e depende do grau de deficiência na síntese de hemoglobina (41,44).

Já as alterações estruturais, levam a produção de hemoglobinas variantes. Mais de 1.200 variantes de hemoglobina já foram descritas até o momento; a maioria, clinicamente silenciosa (45). Grande parte das hemoglobinas variantes é causada por mutações *missense* que levam a troca de aminoácido na cadeia peptídica. Entre elas, podemos destacar as variantes Hb S, Hb C e Hb D, as mais encontradas em nosso meio (46).

### 2.3 Doença Falciforme

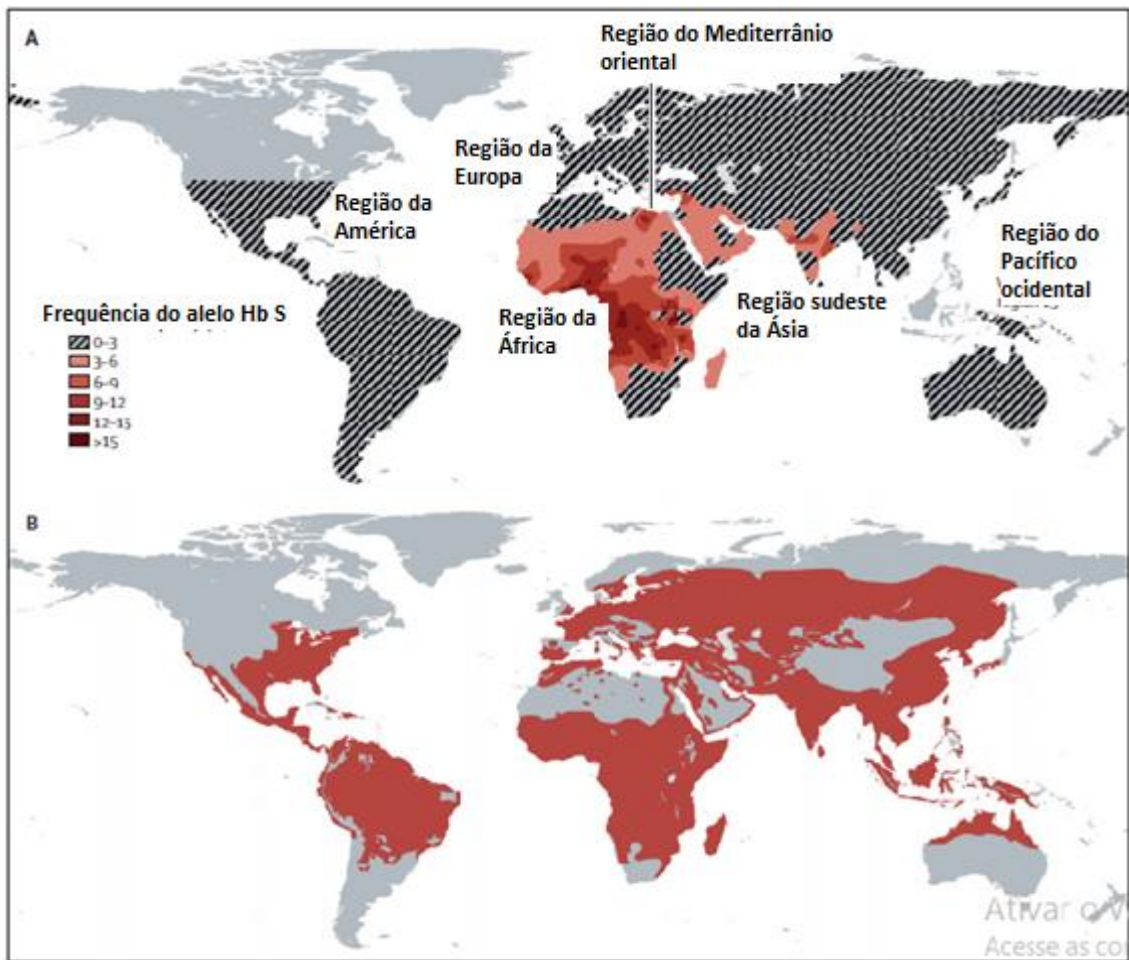
A variante Hb S é responsável pela doença falciforme, a hemoglobinopatia mais prevalente, totalizando mais de 80% dos casos (47). A Hb S é resultante de uma mutação de ponto, com alteração de nucleotídeo (HBB:c.20A>T) no gene da beta globina, levando à substituição do sexto aminoácido (beta 6(A3) Glu>Val) da cadeia polipeptídica (4).

A figura 2 mostra a estrutura da molécula de hemoglobina, com suas quatro hélices e grupos heme associados a átomos de ferro, onde os gases se ligam. Mostra, também, a localização da mutação  $\beta^s$  na cadeia. No lado direito da figura, pode-se aquilatar o grau de empacotamento das moléculas de hemoglobina dentro dos eritrócitos, o que diminui a área de contato com o líquido solvente (plasma), permitindo maior eficiência no transporte de gases. Por outro lado, pode acarretar polimerização de moléculas da Hb S por meio de ligeira desoxigenação. A parte inferior da figura mostra a alteração na estrutura quaternária da Hb S quando desoxigenada. Nesse estado, os átomos de ferro deslocam-se em relação aos planos dos grupos heme e a cavidade central torna-se maior (37).



**Figura 2:** Estrutura da molécula de hemoglobina. (A) Representação do tetrâmero, localização dos grupos heme ligados aos átomos de ferro e posição da substituição do sexto aminoácido quando da formação da Hb S. No lado direito, empacotamento das moléculas dentro dos eritrócitos. (B) Alteração na estrutura quaternária da Hb S: no lado esquerdo oxi-Hb S e no lado direito desoxi-Hb S. Modificado de: (37)

Dois principais fatores permitem compreender a distribuição global do alelo  $\beta^S$ . Primeiramente, a vantagem adaptativa conferida aos portadores do traço falcêmico (Hb AS) por meio da resistência à infecção pelo *Plasmodium*, causador da malária. A figura 3 mostra a distribuição mundial da Hb S em coincidência com a distribuição global da malária. Por outro lado, a distribuição mundial do alelo  $\beta^S$  é influenciada pelo local geográfico onde ocorreu a mutação, locais estes correspondentes aos cinco haplótipos mais comuns associados ao alelo  $\beta^S$ . Quatro são africanos, Bantu ou CAR (*Central African Republic*), Benin (Ben), Senegal (Sen) e Camarões (Cam), e um asiático, o Árabe-Indiano. A existência desses haplótipos em combinação com a região de maior prevalência de cada um deles suporta a evidência de que a mutação causadora da Hb S ocorreu mais de uma vez e sua distribuição foi sendo ampliada progressivamente com as migrações (7).



**Figura 3:** Distribuição do alelo  $\beta^S$ . Frequência do alelo  $\beta^S$  (A) em sincronia com a distribuição global da malária (B). Modificado de: (7)

O termo doença falciforme abarca um conjunto de desordens genéticas, caracterizadas pela presença de pelo menos um alelo  $\beta^S$  (1). Dentre os genótipos associados à doença falciforme, destacam-se os de maior relevância clínica em nossa região, os genótipos Hb SS, Hb SC, Hb S $\beta^+$ -tal, Hb S $\beta^0$ -tal e HbSD<sub>Punjab</sub>. A anemia falciforme, estado de homozigose para o alelo  $\beta^S$ , é a mais prevalente no Brasil e a mais grave (5).



## 2.4 A Doença Falciforme no Brasil

A formação da população brasileira recebeu contribuição de grupos ameríndios, europeus e africanos. O alelo  $\beta^S$  não está presente em populações ameríndias, tendo sido introduzido no Brasil pela população africana durante o regime escravocrata. A contribuição da população europeia nesse sentido foi insignificante (48,49).

A triagem neonatal para doenças congênitas foi incorporada ao SUS em 1992, por meio da Portaria GM/MS n.º 22/1992, com testes para fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito (Fase I). Sua função é detectar, confirmar, diagnosticar, acompanhar e tratar os casos suspeitos para as doenças triadas (51). Em 2001, a inclusão das doenças falciformes e outras hemoglobinopatias na Fase II de implantação do programa (Portaria GM/MS n.º 822/2001) foi um passo fundamental para o início da mudança da história natural da doença falciforme no país (52,53). Antes mesmo da publicação dessa portaria, em março de 1998, Minas Gerais já havia iniciado o Programa de Triagem Neonatal (PTN-MG), com recursos estaduais.

O diagnóstico precoce permite ações de intervenção e manejo dos pacientes com doença falciforme, capazes de evitar algumas intercorrências graves e, até mesmo, reduzir a taxa de morbimortalidade da doença (53). Essas ações incluem antibioticoterapia profilática, vacinação preventiva, detecção e tratamento de vasculopatia cerebral e uso de hidroxiureia para os casos mais graves (54,55).

Os hemocentros têm sido referência para tratamento de distúrbios hematológicos, o que inclui os pacientes com doença falciforme. Na maioria dos estados brasileiros, os centros de referência localizam-se nos ambulatórios dos hemocentros, como em Minas Gerais.

O próximo passo para a consolidação do reconhecimento da doença falciforme como um problema de saúde pública no Brasil foi a criação da Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias, instituída em 2005.

A população africana foi trazida para o Brasil como mão de obra escrava. Mesmo com a abolição da escravatura, o contexto histórico a que foram submetidos os afrodescendentes fez com que eles tivessem poucas oportunidades de desenvolvimento social e econômico. Nesse sentido, muitos dos pacientes com doença falciforme incluem-se nos segmentos de menor poder econômico e são, em

sua maioria, usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) (Fonte: dados da SVS/MS e do IBGE). Por essa razão, a doença falciforme foi incluída nas ações da Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da População Negra e nos artigos 187/188 da Portaria MS/GM nº 2.048, que regulamenta o SUS.

Mais recentemente, em 2015, foi incorporado ao SUS o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico aparentado para tratamento da doença falciforme, obedecendo a critérios de inclusão e recomendações especificados na Portaria nº 30/2015. Vale ressaltar que o TCTH é o único tratamento curativo para doença falciforme até o momento (56), apesar dos notórios avanços recentes da terapia gênica (57)

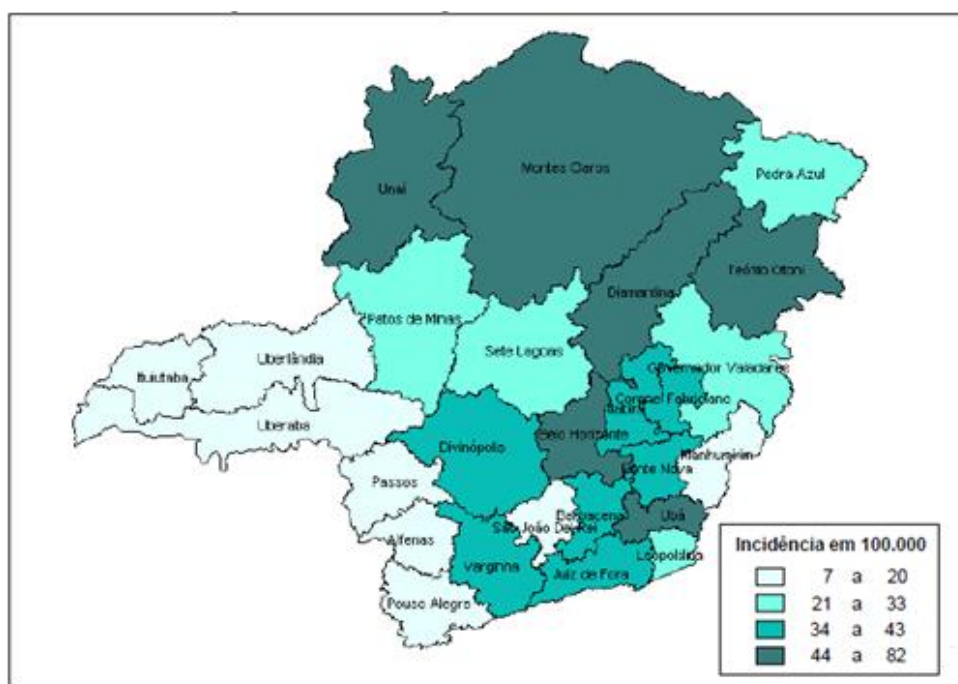
A distribuição do alelo  $\beta^S$  no Brasil é bastante heterogênea e depende da composição relativa de negroides e caucasoides nas diversas áreas populacionais (53). A tabela 1 mostra a incidência de nascidos vivos diagnosticados com doença falciforme em alguns estados brasileiros, a partir de dados dos PTN. Nota-se maior incidência nas regiões norte e nordeste em comparação às regiões sul e sudeste.

**Tabela 1: Incidência de nascidos vivos diagnosticados com doença falciforme (todas os subtipos) em alguns estados brasileiros**

ESTADOS	INCIDÊNCIA
Bahia	1: 650
Rio de Janeiro	1: 1.300
Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais e Goiás	1: 1.400
Espírito Santo	1: 1.800
São Paulo	1: 4.000
Rio Grande do Sul	1: 11.000
Santa Catarina e Paraná	1: 13.500

Fonte: Programas Estaduais de Triagem Neonatal (Ministério da Saúde, 2014)

No estado de Minas Gerais, o PTN-MG mostrou que a incidência de anemia falciforme (Hb FS ao nascimento) é de um a cada 2.400 recém-nascidos vivos (5). A figura 4 mostra a incidência da anemia falciforme em nascidos vivos no estado de Minas Gerais, de acordo com as Diretorias Regionais de Saúde (DRS) (46).



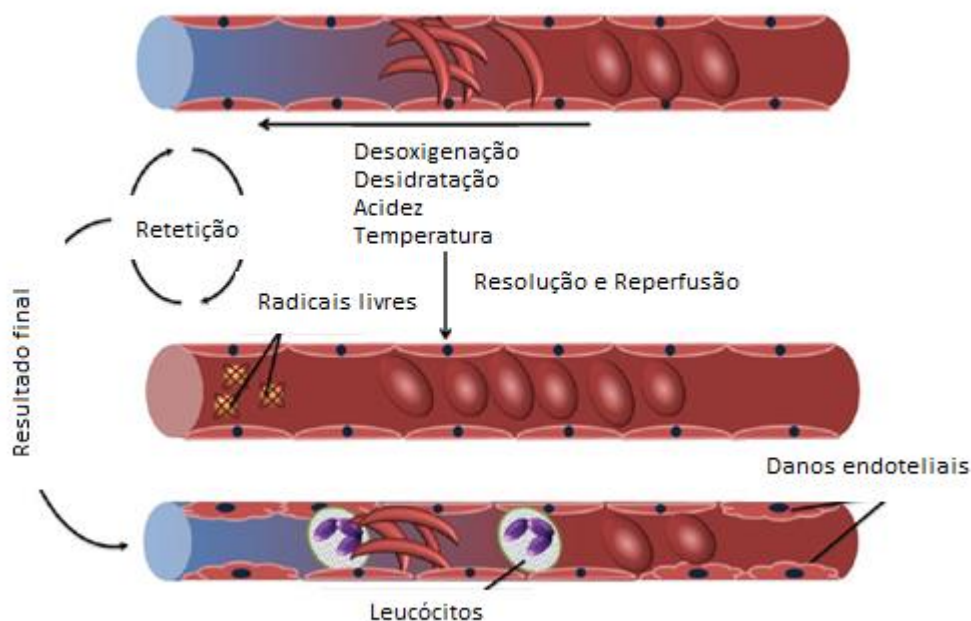
**Figura 4:** Incidência da anemia falciforme em Minas Gerais. Incidência da anemia falciforme em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde – DRS Programa Estadual de Triagem Neonatal - Minas Gerais - 1998/2001 Fonte: (46)

## 2.5 Fisiopatologia da Doença Falciforme

Apesar da aparente simplicidade da mutação causadora, a doença falciforme produz uma diversidade de eventos fisiopatológicos que se iniciam a nível molecular e alcançam consequências sistêmicas (6).

Primariamente, a desoxigenação da molécula Hb S favorece a formação de pontes de hidrogênio entre a valina codificada como primeiro aminoácido da cadeia beta globina e a valina resultante da substituição de nucleotídeo no sexto códon (1). As pontes de hidrogênio causam modificações estruturais na molécula, promovendo interações moleculares entre outros aminoácidos da cadeia. Assumindo nova conformação espacial, os filamentos de Hb S se agregam e formam extensos polímeros que distorcem a membrana e citoesqueleto da hemácia, levando ao formato de foice (1,4).

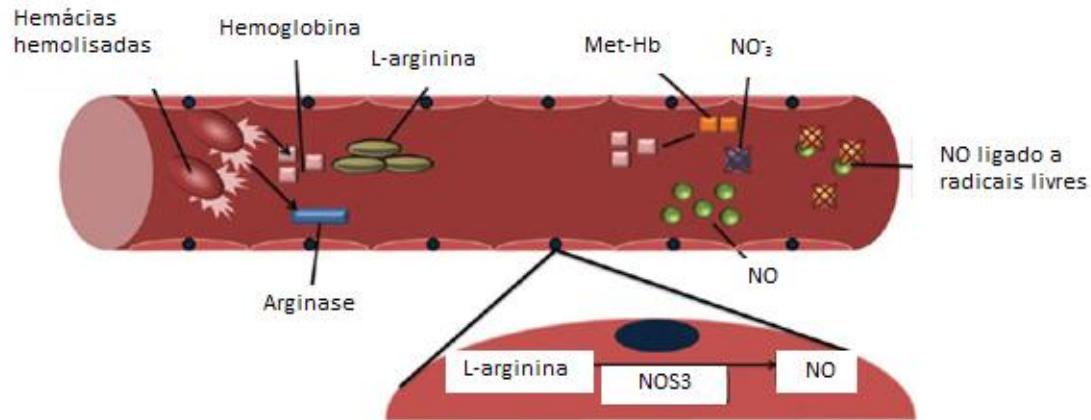
O processo de falcização reflete alterações físico-químicas na membrana das hemácias que as tornam mais rígidas e aderentes ao endotélio vascular (6). Como consequência, e em combinação com recrutamento de leucócitos e plaquetas, ocorre obstrução do fluxo sanguíneo na microcirculação. Esse processo, conhecido como vaso-oclusão (figura 5), desencadeia resposta inflamatória e disfunção endotelial (58).



**Figura 5:** Mecanismo de vaso-oclusão na anemia falciforme. A falcização dos eritrócitos ocorre como resultado da desoxigenação da Hb S e também por outros fatores, como desidratação, acidose e temperatura. Esse processo resulta em vaso-oclusão. Com a resolução da vaso-oclusão, ocorre reperusão. Ciclos repetidos de isquemia e reperusão causam estresse oxidativo, acentuando o processo inflamatório. Os radicais livres causam dano endotelial e ocorre agregação celular. A parede vascular torna-se, em última instância, mais vulnerável à oclusão. Modificado de: (2)

Ao circularem nos capilares teciduais, hemácias contendo Hb S passam por ciclos de oxigenação e desoxigenação e, assim, polímeros de Hb S formam-se repetidamente (58). Com a reoxigenação, as hemácias podem reassumir a forma normal, entretanto, a repetição desse processo diminui sua sobrevivência (4). A taxa de hemólise, frequentemente, excede a capacidade de produção de novos glóbulos vermelhos pela medula óssea, resultando em anemia hemolítica crônica (58).

Conforme ilustrado na figura 6, uma das consequências da hemólise intravascular é a geração de espécies reativas de oxigênio, as quais consomem o NO local produzido pelas células endoteliais. O NO modula a atividade hemostática por meio de inibição plaquetária, além de ser um potente vasodilatador. Portanto, a depleção desse gás causa estado de hipercoagulabilidade e pode comprometer a reologia sanguínea (7).



**Figura 6:** Hemólise e disfunção endotelial na anemia falciforme. A hemólise libera hemoglobina e arginase no plasma. A arginina é precursora da produção de NO. A arginase degrada a L-argina, levando a produção de NO reduzido. A hemoglobina livre no plasma interage com o NO, produzindo metemoglobina (Met-Hb) e nitratos, levando à depleção do NO produzido. Um mecanismo adicional que ocorre normalmente durante os episódios vaso-oclusivos refere-se à produção de radicais livres com a oxidação do NO. O NO é um vasodilatador e sua depleção complica ainda mais o processo vaso-oclusivo. A quantidade de hemólise intravascular varia entre os pacientes. Modificado de: (2)

A vaso-oclusão e a hemólise são os principais fenômenos fisiopatológicos que dão origem às manifestações clínicas da anemia falciforme.

## 2.6 Características clínicas e laboratoriais da Doença Falciforme

Os primeiros três a quatro meses de vida das crianças com doença falciforme são assintomáticos, pois quantidades significativas de Hb F produzidas nesse período as protegem das complicações da doença. Esse período, que dura em torno de três meses, permite a triagem neonatal e ações de intervenção precoce, como por exemplo, a introdução de penicilina profilática (58).

Após os três meses de vida, com o decaimento progressivo da produção Hb F e concomitante aumento da Hb S, começam aparecer algumas complicações, como sequestro esplênico e dactilite. Entretanto, a maioria das complicações tende a surgir após o primeiro ano de vida (58).

A anemia falciforme é doença inflamatória crônica, permeada de eventos agudos ao longo da vida dos pacientes. Dentre os principais eventos, estão as frequentes crises de dor aguda no peito, costas, abdômen e extremidades. Elas podem durar dias ou, muito raramente, até mesmo semanas (59).

A tabela 2 mostra algumas complicações da doença, de acordo com o fenômeno fisiopatológico primário responsável, vaso-oclusão ou hemólise.

**Tabela 2: Algumas manifestações clínicas da doença falciforme de acordo com o principal componente fisiopatológico**

---

**Complicações vaso-oclusivas**

Episódios de dor aguda  
Acidente vascular cerebral  
Síndrome torácica aguda  
Priapismo  
Doenças hepáticas  
Sequestro esplênico  
Úlcera de perna  
Retinopatia proliferativa  
Insuficiência Renal

---

**Complicações hemolíticas**

Infecções  
Colelitíase  
Anemia  
Crise aplástica  
Icterícia

---

Modificado de: (59)

A expressão fenotípica da doença falciforme é bastante variável. A anemia falciforme (Hb SS) é, sem dúvida, o genótipo que apresenta maior gravidade clínica e hematológica (1). A tabela 3 mostra algumas características laboratoriais da anemia falciforme.



**Tabela 3: Algumas características laboratoriais da anemia falciforme**

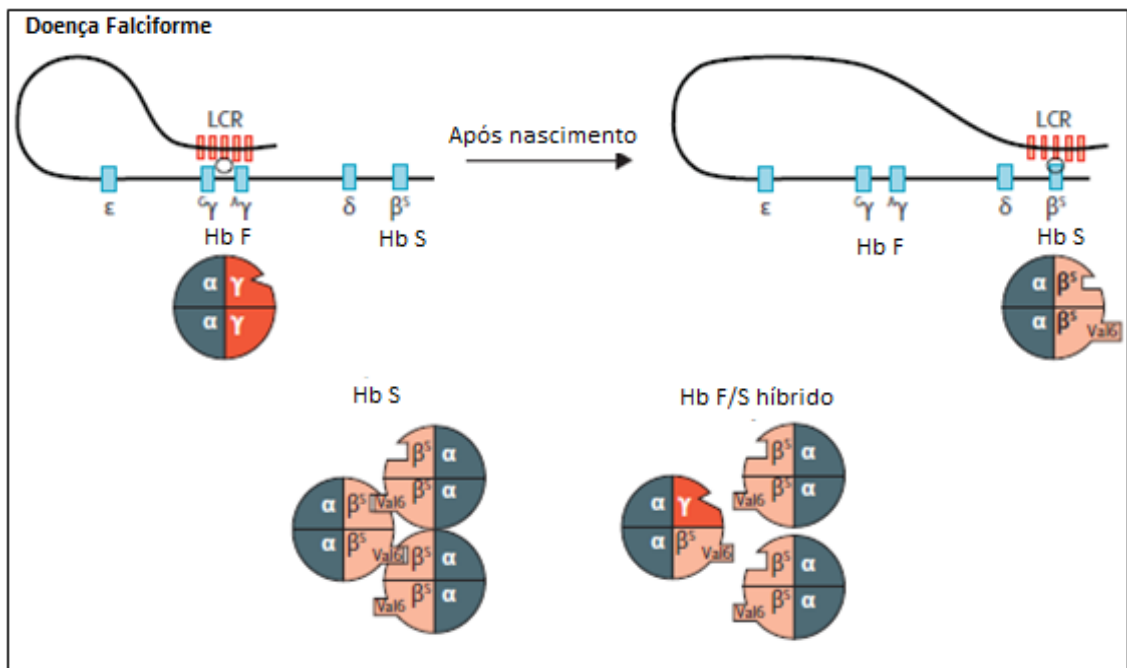
<b>Hb S</b>	80-100%
<b>Anemia normocítica e normocrônica</b>	Hb = 5-10 g/dL
<b>Reticulócitos</b>	Aumentados (5% a 30%)
<b>Leucócitos</b>	Aumentados, principalmente durante as crises
<b>Plaquetas</b>	Aumentadas e com formas anormais
<b>Bilirrubina Indireta</b>	Elevada ( $\geq 6$ mg/dL)

Modificada de: (1)

## 2.8 Efeitos dos níveis elevados de Hb F na Anemia Falciforme

A Hb F é a principal modificadora de eventos clínicos e parâmetros hematológicos da anemia falciforme. Ela eleva a solubilidade da Hb S, evitando sua polimerização em situações de baixa oxigenação. Além disso, ela reduz a concentração corpuscular média de Hb S (60).

A estrutura microrradiográfica revela que a fibra se estabiliza através da ligação entre a valina mutante hidrofóbica ligada a uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos, nas posições 85 a 88 da cadeia adjacente. Como a  $\gamma$ -globina possui glutamina no lugar de treonina na posição 87 da  $\beta$  globina, a interação hidrofóbica torna-se mais fraca. Consequentemente, o tetrâmero de Hb F possui probabilidade muito menor de copolimerização com o tetrâmero de Hb S, contendo duas cadeias  $\beta^S$  (figura 7) (61).



**Figura 7:** Como a Hb F inibe a polimerização da Hb S. A parte superior da figura mostra a mudança de expressão dos genes  $\gamma$ -globina para  $\beta^S$ -globina após o nascimento em pacientes com doença falciforme. A parte inferior da figura mostra a estabilização da fibra Hb S através de ligação hidrofóbica entre a valina mutante e outros aminoácidos hidrofóbicos. No híbrido Hb F/Hb S, a presença do aminoácido glutamina no lugar da treonina da posição 87 da Hb F torna a interação hidrofóbica mais fraca e com menos probabilidade de copolimerização. Modificada de: (61)

Com a redução da polimerização, os eventos de vaso-oclusão, bem como a anemia hemolítica, também reduzem, amenizando as complicações da doença. A

tabela 4 mostra os efeitos do nível elevado de Hb F em características clínicas e hematológicas da doença falciforme.

**Tabela 4: Efeitos do nível elevado de Hb F em fatores clínicos e hematológicos da Doença Falciforme**

<b>Fatores clínicos/hematológicos</b>	<b>Efeito do nível elevado de Hb F</b>
Sobrevida	Prolonga sobrevida
Crises de dor/dactilite	Reduz a incidência
Síndrome torácica aguda	Reduz a ocorrência
Úlcera de pernas	Efeito protetor
Osteonecrose	Evidência controversa de efeito protetor
Priapismo	Pouca ou nenhuma evidência de efeito protetor
Função renal/albuminúria	Pouca ou nenhuma evidência de efeito protetor
Doença cerebrovascular	Evidência controversa de efeito protetor em crianças, mas com evidências de proteção em adultos
Sequestro esplênico	Efeito protetor
Bacteremia	Pouca ou nenhuma evidência de efeito protetor
Colelitíase	Efeito protetor
Retinopatia	Baixos níveis de Hb F possivelmente aumentam oclusão capilar
Vasculopatia/velocidade de regurgitação tricúspide	Pouca ou nenhuma evidência de efeito protetor
Morte do feto em gestação	Diminuição do risco
Sobrevida de eritrócitos	Aumenta a vida útil de reticulócitos
Hemoglobina total	Aumenta o nível

Revisado em: (8)

O *Multicenter Study of Hydroxyurea* (MSH), publicado em 1995, estudou a eficácia da hidroxiureia (HU), indutora da produção de Hb F em pacientes adultos

com anemia falciforme. Esse estudo clínico de fase III, randomizado, duplo-cego e controlado, mostrou que o tratamento com HU promove melhora significativa na evolução da doença, com diminuição significativa da taxa anual de crises de dor, síndrome torácica aguda e necessidade de transfusão sanguínea, sem causar efeitos adversos importantes (62).

Em nove anos de seguimento dos pacientes inscritos no estudo MSH, Steinberg e colaboradores investigaram se a HU atenuaria a mortalidade em pacientes com anemia falciforme. Esse estudo mostrou que a HU reduziu em 40% a mortalidade e que a sobrevida estava relacionada ao aumento dos níveis de Hb F e à redução de crises vaso-oclusivas (17).

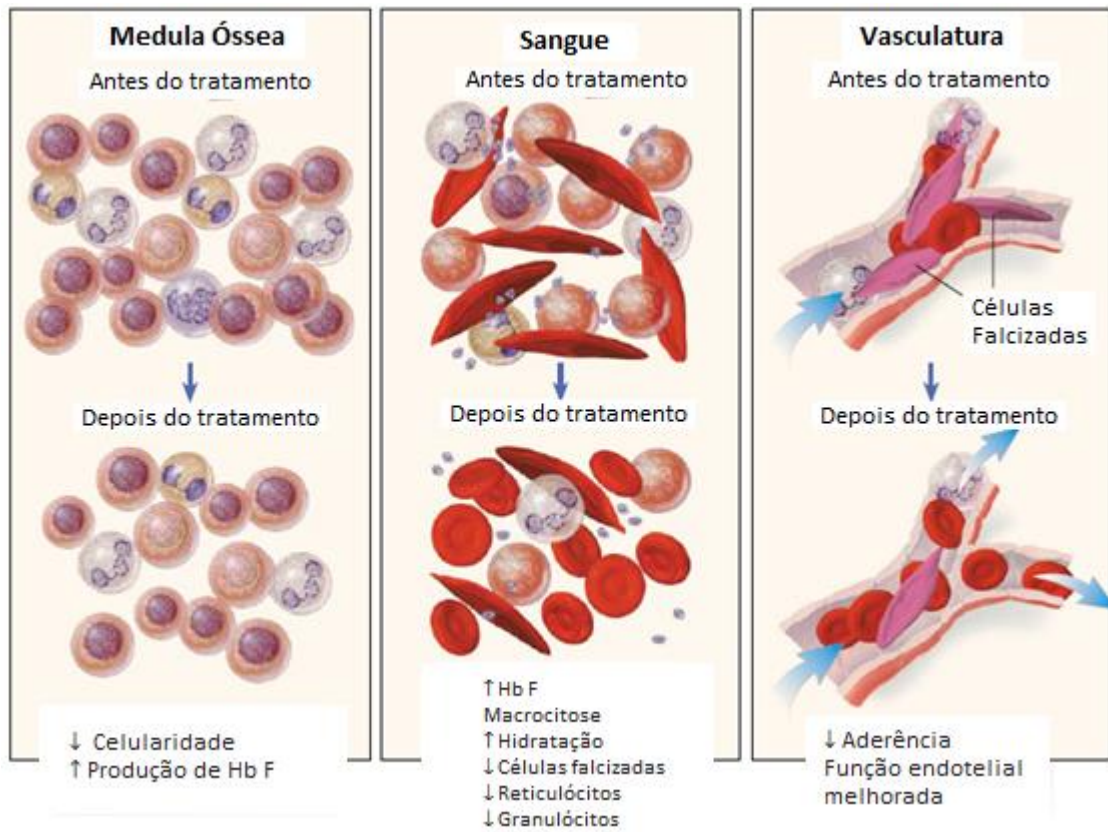
Esses resultados levaram à aprovação da HU, em 1998, para tratamento de pacientes sintomáticos com doença falciforme pela *United States Food Drug Administration* (FDA) (63).

Em 2000 iniciou-se o *Hydroxyurea to Prevent Organ Damage in Children With Sickle Cell Anemia – Baby Hug trial*, com o objetivo de avaliar a segurança e eficácia da hidroxiureia em 193 bebês entre nove e 18 meses, com Hb SS ou S $\beta^0$ -talassemia. Quanto aos fatores hematológicos, o tratamento com HU aumentou a concentração de Hb F e diminuiu a contagem de leucócitos. Houve tendência à diminuição de síndrome torácica aguda, hospitalização e transfusão. Embora o tratamento não tenha reduzido a disfunção esplênica e renal (desfechos primários desse ensaio clínico), resultou em grande benefício clínico por meio da redução de eventos agudos como dactilite e dor. Os efeitos adversos foram restritos a neutropenia leve a moderada (64). A HU passou, então, a ser considerada para esse grupo de pacientes.

Recentemente, em 2016, o ensaio clínico de fase III randomizado *Transcranial Doppler with Transfusions Changing to Hydroxyurea* (TWITCH) mostrou que o tratamento com HU reduziu a velocidade média máxima de fluxo sanguíneo (VMM) no mesmo grau que o regime de transfusão crônica em crianças com anemia falciforme com alto risco de desenvolvimento de acidente vascular cerebral detectado pelo Doppler transcraniano (65).

A HU é, atualmente, o único fármaco disponível para tratamento de pacientes com doença falciforme. O efeito benéfico da HU na anemia falciforme é consequência, entre outros mecanismos, da indução de elevação dos níveis de Hb

F, como anteriormente mencionado. A HU bloqueia o ciclo celular na fase S e é um potente indutor de Hb F (66). A elevação do nível de Hb F aumenta a sobrevivência das hemácias, reduzindo a hemólise. Além disso, a redução no número de hemácias falcizadas diminui a aderência ao endotélio vascular e, conseqüentemente, a vaso-oclusão. A figura 8 ilustra o mecanismo de ação da HU na medula óssea, na circulação sanguínea e na parede vascular (59,67).



**Figura 8:** Mecanismos de ação da hidroxiureia na doença falciforme. Ao eliminar seletivamente as células da medula óssea, a hidroxiureia aumenta o número de eritroblastos que produzem Hb F. Não são conhecidos efeitos diretos da hidroxiureia na expressão gênica. A celularidade da medula óssea também pode ser diminuída. Concentrações mais elevadas de HbF reduzem a polimerização da Hb S e o número de eritrócitos deformados, densos e danificados. Células com teor elevado de Hb F sobrevivem por mais tempo, atenuando a hemólise e levando a uma redução na contagem de reticulócitos. A contagem de granulócitos, monócitos e plaquetas circulantes é diminuída. A probabilidade de vaso-oclusão é reduzida pela redução do número de eritrócitos falcizados que podem aderir e danificar o endotélio. Modificado de: (59)

Os haplótipos  $\beta^S$  são definidos pela variação de seqüências de DNA no agrupamento de genes da  $\beta$ -globina, que alteram o sítio de reconhecimento de endonucleases de restrição. Esses haplótipos influenciam a gravidade da doença por influenciarem, principalmente, os níveis de Hb F. Pacientes com os haplótipos Senegal ou Árabe-Indiano possuem níveis mais elevados de Hb F e apresentam

quadro clínico menos grave, enquanto pacientes com o haplótipo *Central African Republic* (CAR) têm os menores níveis de Hb F e apresentam quando clínico mais grave. Os haplótipos Benin e Camarões são associados à níveis intermediários de Hb F. A figura 9 mostra a localização dos polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* - SNP) do agrupamento da beta globina utilizados na determinação dos haplótipos. Mostra, também, as endonucleases de restrição que identificam esses SNPs por meio do reconhecimento de sítios de clivagem específicos na sequência de DNA. A parte inferior da figura caracteriza o quadro clínico normalmente encontrado em cada haplótipo, bem como suas respectivas quantidades de hematócrito e Hb F. Entretanto, em todos os haplótipos ocorre variação nos níveis de Hb F, sugerindo a influência de outros *loci* nessa regulação (9).

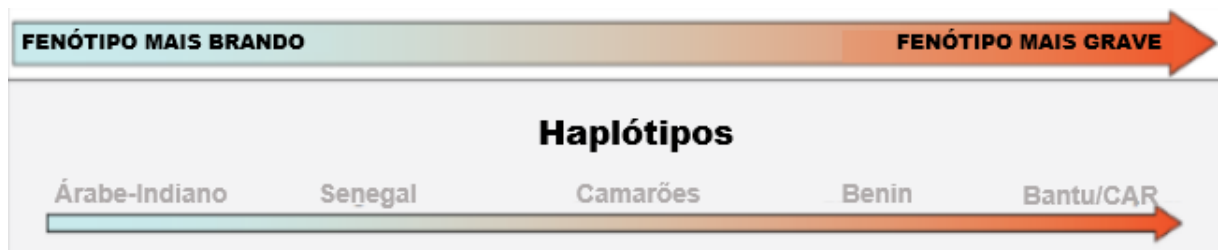
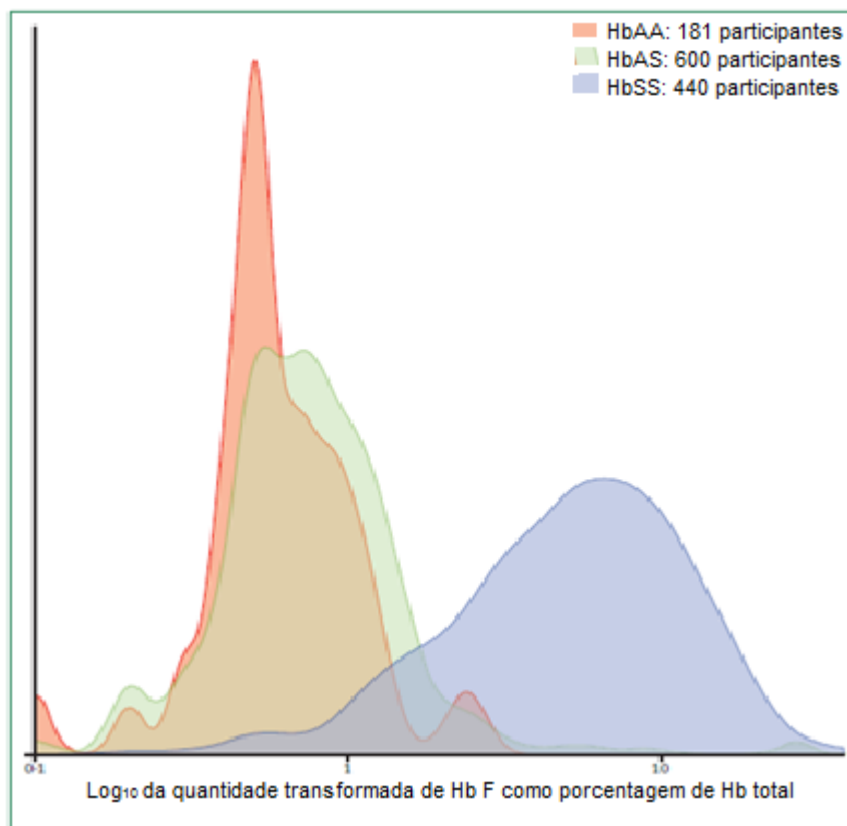


Figura 9: Representação da relação entre haplótipos da beta globina e a gravidade clínica da doença falciforme. Modificado de : (68)

## 2.8 Bases genéticas da regulação da Hb F

Na fase adulta de uma pessoa sem doença falciforme, quantidades mínimas de Hb F produzidas são restritas às células-F, células que apresentam quantidades mensuráveis de Hb F (69). Algumas pessoas continuam produzindo quantidades consideráveis de Hb F na fase adulta. Em geral, pacientes com anemia falciforme apresentam concentrações mais elevadas de Hb F, conforme mostra a figura 10. Isso se deve, em parte, ao estresse eritropoiético a que estão submetidos esses pacientes (61).



**Figura 10:** Comparação da distribuição de Hb F. Comparação da distribuição de Hb F entre indivíduos não portadores do alelo  $\beta^S$  (Hb AA), com traço falciforme (Hb AS) e com anemia falciforme (Hb SS). A concentração média de Hb F foi 0,8% para os indivíduos com o genótipo Hb AA, 0,9% para Hb AS e 5,2% para Hb SS. Modificada de: (61)

Portadores dos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano possuem um SNP (rs7482144) identificado pela endonuclease de restrição *XmnI*, localizado na região promotora do gene *HBG2* (9). Esse polimorfismo foi fortemente associado com níveis elevados de Hb F em várias coortes (28,33,70). Já os portadores dos haplótipos CAR e Benin, não possuem esse polimorfismo e apresentam

concentração menos elevada de Hb F, conforme discutido anteriormente. Em 2010, Galarneau e colaboradores demonstraram que o SNP designado *Xmnl* não seria a variante causal da concentração elevada de Hb F. Os autores sugeriram que outro polimorfismo (rs10128556), localizado no gene *HBBP1* e que está em desequilíbrio de ligação com *Xmnl*, seria o responsável pela elevação do nível de Hb F (32).

Estudos de associação genômica ampla identificaram que o *locus BCL11A* está associado com variações no nível de Hb F (9). A associação desse *locus* com o fenótipos Hb F foi observada em indivíduos saudáveis, com  $\beta$ -talassemia e também em pacientes com doença falciforme (19,22,27,28,33).

O gene *BCL11A* é localizado no cromossomo 2p16 e codifica uma proteína dedo de zinco (*zinc finger*), que se liga ao DNA (39). A proteína BCL11A se liga em vários locais ao longo do *cluster* da  $\beta$ -globina, incluindo a região de controle do *locus* e elementos acentuadores da transcrição (39). Análises de nocaute gênico em eritrócitos mostraram que BCL11A é uma repressora da expressão do gene  $\gamma$ -globina e que sua perda evita o silenciamento desse gene que normalmente ocorre durante o desenvolvimento tardio do feto (71,72). Consistentemente com a função silenciadora do gene  $\gamma$ -globina, BCL11A é expressa em precursores eritroides (28). A influência desse *locus* no nível de Hb F tem sido amplamente confirmada (ver tabela 5).

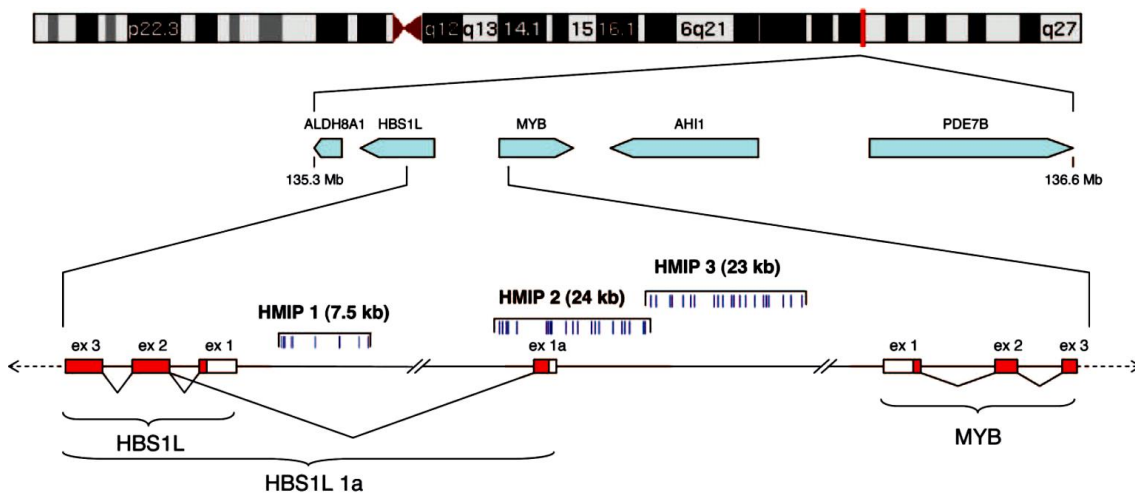
O *locus HBS1L-MYB*, designado *HMIP*, compreende uma região entre os genes *HBS1L* e *MYB* no cromossomo 6q23. Essa região é dividida em três blocos em desequilíbrio de ligação (*HMIP* 1, 2 e 3) e abrange aproximadamente 79 kb (quilobases). Conforme ilustrado na figura 11, o segmento quase contínuo de *HMIP* inicia-se a 188 pb 5' do éxon 1 de *HBS1L* e termina a 45 kb a 5' de *MYB* (73). Inúmeros SNPs em *HMIP* foram associados com o nível de Hb F e com o número de células-F (24,27,30,34,35,74,75).

A proteína MYB é um bem caracterizado fator de transcrição nuclear expresso em células hematopoiéticas (76). O aumento da expressão de *MYB* inibe a expressão de *HBG*. A diminuição dos níveis de MYB foi associada com expansão celular reduzida e diferenciação eritroide acelerada (77). Isso sugere que o nível de MYB pode afetar a quantidade de Hb F por meio de seu efeito no ciclo celular (9).

Estudos filogenéticos sugerem que a proteína HBS1L participa do processo de tradução, auxiliando na passagem de polipeptídios nascentes dos ribossomos ou



carreando t-RNA (RNA transportador) (78). Sua expressão foi negativamente correlacionada com o nível de células-F (73).

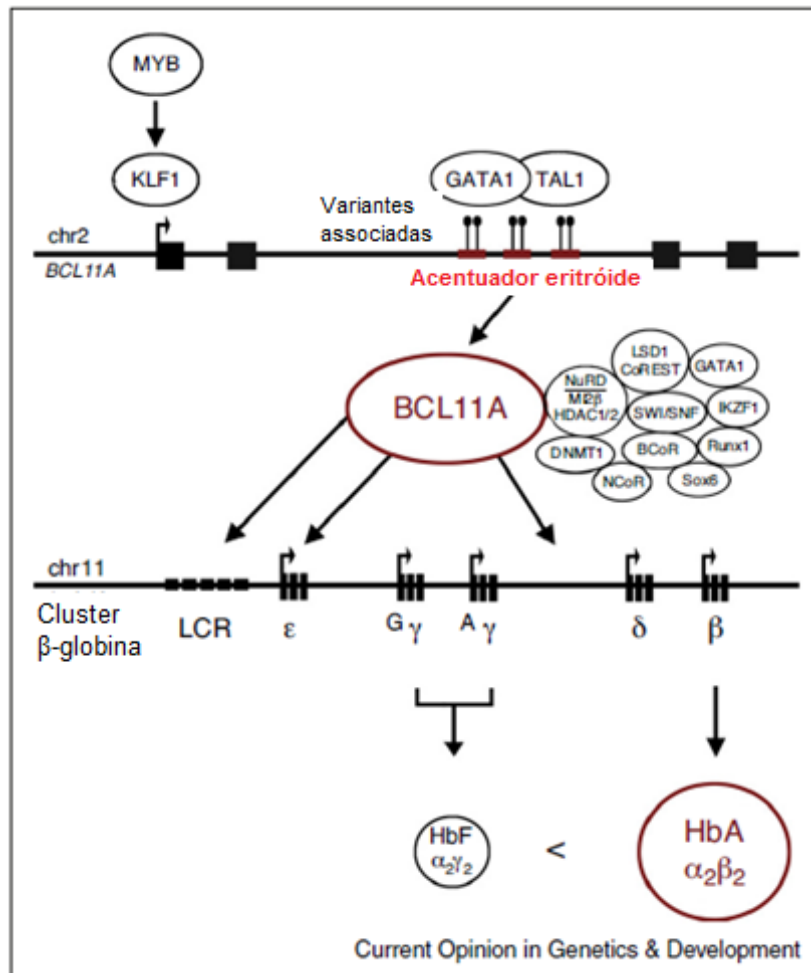


**Figura 11:** Organização genômica do cromossomo 6, com ênfase na região intergênica *HBS1L* e *MYB*. As regiões cobertas pelos três blocos (HMIP 1, 2 e 3) são indicadas por colchetes e os pequenos traços verticais dentro desses três colchetes indicam a localização de SNPs. As setas tracejadas indicam a orientação transcricional nos dois genes. Fonte: (73)

Menzel e colaboradores, estudando grupos de pacientes afrodescendentes e europeus com anemia falciforme, observaram dois blocos alélicos espacialmente separados e que aumentam o nível de Hb F. Esses blocos foram denominados “A” e “B” (79). Polimorfismos em *HMIP2A* e *HMIP2B* que promovem elevação de Hb F existem em clados (*clades*) distintos que definem haplótipos. O haplótipo A-B associa-se a concentrações mais elevadas de Hb F, enquanto o haplótipo a-b associa-se a concentrações mais baixas (74).

Reunindo uma série de informações provenientes de estudos experimentais, Bauer e Orkin propuseram um modelo que explica a via de repressão dos genes  $\gamma$ -globina por *BCL11A* (figura 12). 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 precursores eritroides. Suas proteínas parceiras incluem fatores de transcrição (FT's), como *GATA1* e *FOX6*, por exemplo, além de reguladores da cromatina (*NuRD* e *DNMT1*) e correpressores transcricionais (*NCoR* e *BCoR*). Apesar de *BCL11A* ocupar a cromatina eritroide na região do cluster da  $\beta$ -globina e se ligar em vários locais desse agrupamento, não se liga diretamente aos genes  $\gamma$ -globina. Isso sugere que sua atuação na repressão

desses genes dá-se à distância, ligando-se à LCR, acentuadores e outras regiões do agrupamento. A consequência da expressão “normal” de BCL11A em eritrócitos adultos é a predominância da Hb A em detrimento da Hb F (39).



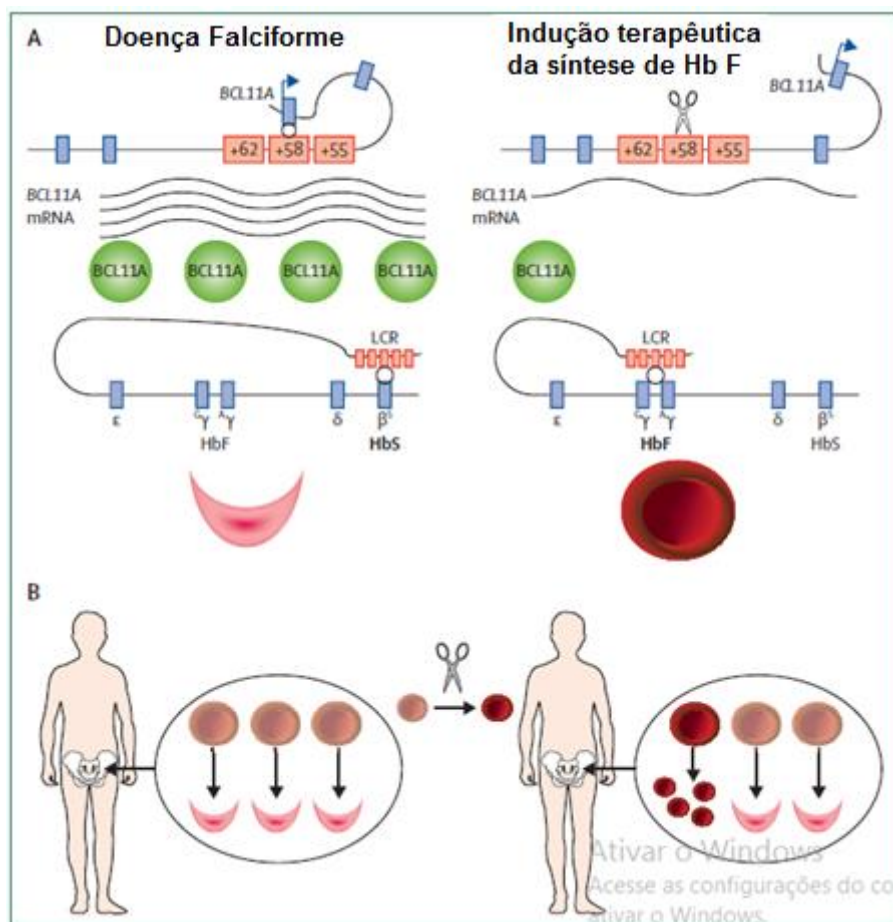
**Figura 12:** Via de repressão BCL11A-Hb F. A expressão de *BCL11A* é regulada por KLF1, GATA1 e TAL1. KLF1, por sua vez é regulado por MYB. BCL11A atua no *cluster* da  $\beta$ -globina associada a um complexo proteico regulador da transcrição. A expressão de *BCL11A* reprime a expressão dos genes  $\gamma$ -globina, aumentando concomitantemente a expressão do gene  $\beta$ -globina. Modificado de: (39)

Conforme discutido por Bauer e Orkin, diversas razões sustentam a relevância desses achados da associação entre os *loci* *BCL11A*, *HBS1L-MYB* e *HBG2* e o nível de Hb F(39). Primeiro, diferentemente da maioria dos SNPs encontrados em estudos de associação genômica ampla, que resultam em pequeno efeito no desfecho de interesse, SNPs nesses três *loci* explicam cerca de 50% da variação nas concentrações de Hb F em pacientes com anemia falciforme (32,61). Ou seja, trata-se de uma arquitetura genética relativamente simples, mas com grande efeito. Em segundo lugar, os resultados têm sido robustos e, na maioria das

vezes, reprodutíveis. Há relatos de associação em populações europeias, africanas, asiáticas, em indivíduos saudáveis ou com  $\beta$ -hemoglobinopatias (22,24,33,80). Terceiro, muitas das variantes associadas à concentração da Hb F também foram associadas com gravidade clínica na anemia falciforme e na  $\beta$ -talassemia, evidenciando o potencial terapêutico dessas descobertas (25,35,36,80–82). Por último, e não menos importante, os resultados corroboram conhecimentos prévios da atuação molecular desses *loci* em vias biológicas, conforme discutido anteriormente (39).

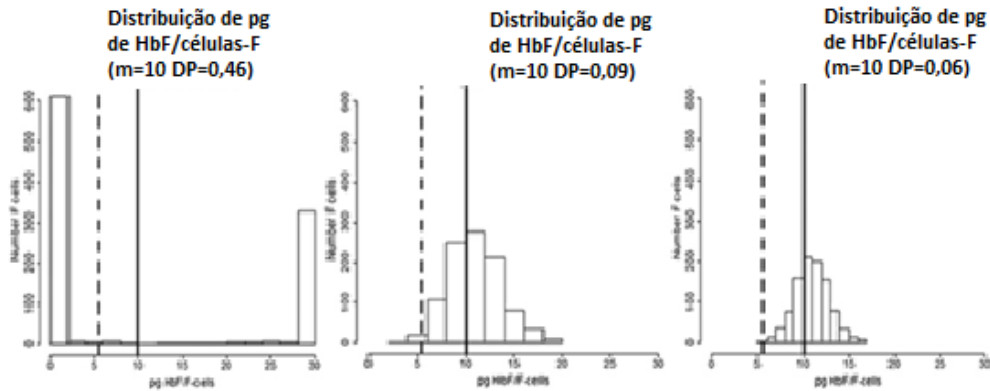
Essas descobertas têm sugerido novas abordagens terapêuticas para a anemia falciforme e para a  $\beta$ -talassemia, por meio de edição do genoma (39,57,61). Um exemplo de terapia gênica para tratamento de doença falciforme é a indução de Hb F por meio de edição de genoma em *BCL11A* (figura 13).

O mecanismo do efeito de SNPs em *BCL11A* na regulação da produção de Hb F parece decorrer da destruição de sequências regulatórias específicas de produção da proteína correspondente por essas variantes intrônicas em eritroblastos (83). A clivagem de sítios-alvo com o uso de nucleases, seguida de reparo por junção de extremidades não homólogas, susceptível a erros, pode alterar sequências críticas dentro do acentuador de *BCL11A* em eritroblastos. A identificação de acentuadores de *BCL11A* específicos de eritroblastos ou células mais primitivas, mas já “comprometidas” com a linhagem eritroide (*committed stem cells*) permitiria contornar os efeitos negativos do comprometimento de *BCL11A* em outras células. Assim, a expressão de *BCL11A* seria prejudicada apenas em células precursoras eritroides, enquanto outras células dependentes de *BCL11A*, como neurônios e linfócitos B, por exemplo, seriam poupadas. Como resultado, o número de transcritos de *BCL11A* em eritroblastos seria diminuído, permitindo a reconfiguração do agrupamento da  $\beta$ -globina de modo a favorecer a expressão de  $\gamma$ -globina e, conseqüentemente, aumentar a produção de Hb F. Essa terapia incluiria o isolamento de células tronco hematopoiéticas de pacientes com doença falciforme, seguida de edição *ex vivo* do genoma com nucleases, confirmação da modificação genômica por análise de sequências e reinfusão celular autóloga. Ainda que o resultado final seja uma mescla de hemácias modificadas e não modificadas, a vantagem da sobrevivência das células que expressarem quantidades consideráveis de Hb F poderia trazer benefícios clínicos para os pacientes (61).



**Figura 13:** Abordagem da edição de genoma terapêutica para indução da produção de Hb F em pacientes com anemia falciforme. (A) A clivagem de sequências específicas em *BCL11A* seguida de junção não homóloga alteraria sequências importantes em acentuadores de *BCL11A*, levando à diminuição da expressão desse gene e, assim, aumento da produção de Hb F. (B) A modificação genômica seria feita *ex vivo* em células tronco hematopoéticas isoladas de pacientes com doença falciforme, seguida de confirmação das sequências alteradas e reinfusão autóloga. Modificada de: (61)

Apesar dos efeitos benéficos da Hb F no curso clínico da anemia falciforme, alguns pacientes com níveis elevados de Hb F ainda possuem doença grave. Isso aconteceria por causa da distribuição heterogênea da Hb F entre as hemácias, sendo que algumas não contêm concentração de Hb F suficiente para impedir o processo de polimerização da Hb S (figura 14). Steinberg e colaboradores propuseram que a quantidade intracelular de Hb F em torno de 10 picogramas (pg) seria capaz de impedir a polimerização da Hb S desoxigenada (40). Esse valor é atingido em quase todas as células quando a concentração relativa total de Hb F é próxima de 30%. Vale ressaltar que, assim como a concentração relativa total de Hb F, sua distribuição entre as hemácias também teria caráter hereditário (84).



**Figura 14:** Distribuição hipotética da Hb F por célula F em paciente com anemia falciforme e 30% de Hb F. Os dados foram gerados utilizando uma distribuição beta com média fixa (10 pg Hb F) e desvio padrão decrescente. O painel esquerdo mostra um exemplo extremo de distribuição, com variância muito grande. Neste caso, várias células F seriam totalmente protegidas contra os danos provocados pela polimerização da Hb S, enquanto muitas outras hemácias ficariam totalmente desprotegidas. O painel direito ilustra a situação mais favorável, na qual a diminuição da variância aumenta a proporção de células F, aumentando a proteção global contra a polimerização da Hb S. Modificada de: (40)

As deleções causadoras de Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) são associadas com níveis de Hb F variando entre 20 e 40%. Nesses indivíduos, a Hb F é distribuída igualmente entre as hemácias (distribuição pancelular), tendo cada célula aproximadamente 10 pg de Hb F. Pacientes com PHHF não apresentam anemia hemolítica e, normalmente, não desenvolvem complicações da doença (9,40,85). Estratégias terapêuticas que elevassem os níveis de Hb F para 30%, provavelmente, levariam a uma distribuição de Hb F tal que cada célula possuiria quantidade necessária de Hb F (~10 pg) para impedir a polimerização.

## 2.9 Modificadores genéticos dos níveis de Hb F e seu impacto na diversidade fenotípica da doença falciforme

A influência dos loci *BCL11A*, *HMIP* e *HBG2* nos níveis de Hb F ou na porcentagem de células F tem sido estudada em várias populações. A tabela 5 resume os resultados de estudos que analisaram associação entre SNPs nesses loci e a concentração de Hb F em pacientes com doença falciforme, incluindo as principais variantes candidatas em cada loci.

**Tabela 5: Associação entre SNPs nos loci *BCL11A*, *HBS1L-MYB*, *HBG2* e *HBBP1* e o nível de Hb F ou a porcentagem de células F na doença falciforme**

QTL	SNP	Alelo	Referências de estudos que encontraram associação com nível elevado de Hb F (p<0,05)	Referências de estudos que não encontraram associação com nível de Hb F (p>0,05)
HBG2	rs7482144	A	(21 Brasileiros, 24 Africanos, 25 Baby Hug, 29 Americanos, 31 Indianos, 33 CSSCD, 36 Africanos, 70, 86–90) Indianos e Afroamericanos 22 Afroamericanos	(35, 91 ,92) Africanos
HBBP1	rs10128556	T	(29 Americanos, 32 Europeus/Africanos/Afroamericanos)	
BCL11A	rs1427407	T	(25 Baby Hug, 27–29 Africanos/Europeus/Afroamericanos, 7 5 Brasileiros, 93 Asiáticos, 94 Afroamericanos, Asiáticos e Indianos)	(95 Indianos)
	rs7557939	G	(25 Baby Hug, 29 Americanos, 33 CSSCD)	
	rs11886868	C	(19 Europeus ,25 Baby Hug, 29 Americanos, 33–36 CSSCD/Brasileiros/ Africanos, 88 Indianos, 91 Africanos, 93 Asiáticos, 96 Africanos)	
	rs4671393	A	(21 Brasileiros, 28 Europeus, 29 Americanos, 32 Europeus/Africanos/Afroamericanos, 33 CSSCD, 35 Africanos, 75 Brasileiros, 82,91–93 Africanos/Africanos/Asiáticos, 95 Indianos, 96 Africanos)	
	rs7599488	T	(32 Europeus/ Africanos/Afroamericanos)	(29 Americanos, 94 Afroamericanos/Asiáticos/Indianos)
	rs766432	C	(28–30 Europeus/Americanos/ Afroamericanos, 87 Afroamericanos, 93 Asiáticos)	(95 Indianos)
HBS1L-MYB	rs9399137	C	(28 Europeus, 30 Afroamericanos, 33–35 CSSCD/Brasileiros/Africanos, 74 Africanos, 75 Brasileiros, 87 Afroamericanos, 88 Indianos, 91 Africanos, 92 Africanos, 97 Afroamericanos)	(22 Afroamericanos, 26 Africanos, 91 Africanos, 94 Africanos)
	rs35786788	A	(74 Africanos)	
	rs9494145	C	(27 Africanos, 30 Afroamericanos, 74 Africanos)	
	rs28384513	A	(32 Europeus/Africanos/ Afroamericanos, 33 CSSCD, 91 Africanos, 92 Africanos)	(25 Baby Hug, 29 Americanos, 32 Europeus/Africanos/Afroamericanos, 35 Africanos, 91 Africanos)
	rs4895441	G	(19 Europeus, 21 Brasileiros, 30 Afroamericanos, 33 Indianos, 74	(30 Afroamericanos, 91 Africanos, 94 Afroamericanos/Asiáticos/Indianos)

			Africanos, 89 Indianos, 97 Afroamericanos)	
	rs9402686	A	(32 Europeus/Africanos/Afroamericanos, 34 Brasileiros, 74 Africanos, 75 Brasileiros, 91 Africanos)	(35 Africanos, 93 Asiáticos, 95,97 Afroamericanos)
	rs9389269	C	(34 Brasileiros, 36 Africanos, 74 Africanos, 91 Africanos)	(35 Africanos, 97 Afroamericanos)

Conforme revisado na tabela 5, a associação entre muitos desses SNPs e Hb F tem sido confirmada em vários estudos, em populações distintas. Entretanto, dificuldades inerentes a estudos de associação genética possivelmente têm levado a resultados por vezes controversos. Essas dificuldades incluem diferença nas frequências alélicas entre as populações, heterogeneidade no delineamento dos estudos e desequilíbrio de ligação entre SNPs, que pode levar a resultados falso-positivos, entre outras (98).

Mesmo diante dessas dificuldades, a robustez dos resultados encontrados e a replicação em um grande número de estudos - que na maioria das vezes não é observada em estudos de associação genética - faz com que alguns desses SNPs tenham grande potencial para validação da associação, além da possibilidade de aplicação em estratégias terapêuticas, como discutido anteriormente.

Poucos estudos avaliaram o efeito desses SNPs nas características clínicas e laboratoriais da doença, mas os que avaliaram encontraram resultados promissores (tabela 6).

**Tabela 6: Associação relatada entre SNPs nos loci *BCL11A*, *HBS1L-MYB* e *HBG2* e parâmetros hematológicos e clínicos da doença falciforme**

QTL	SNP	Alelo	Fatores hematológicos	Fatores clínicos
HBG2	rs7482144	A	Aumento da concentração de Hb(%) (36)	
BCL11A	rs1427407	T	Aumento da Hb (%), diminuição da bilirrubina e da contagem de reticulócitos(25)	Diminuição da taxa de crises de dor, de episódios de dactilite, e da velocidade de DTC(25)
	rs7557939	G	Aumento da concentração de Hb(%) (25)	Diminuição da taxa de crises de dor, episódios de dactilite, e da velocidade de DTC(25)
	rs11886868	C	Aumento da concentração de Hb(%) (25,36)	Diminuição da taxa de crises de dor, episódios de dactilite, velocidade de DTC(25)
HBS1L-MYB	rs9399137	C	Diminuição da contagem de linfócitos, Hb(%) (82)	Diminuição da taxa de crises de dor e episódios de dactilite(25)
	rs9389269	C	Aumento de VCM e HCM (36)	
	rs66650371	“del”	Diminuição da contagem de leucócitos(36)	



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação entre polimorfismos em *BCL11A*, *HBS1L-MYB* e *HBBP1*, e a concentração de hemoglobina fetal e parâmetros hematológicas em crianças com anemia falciforme triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte (HBH) da Fundação Hemominas.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar as técnicas de genotipagem para polimorfismos localizados nos *loci BCLL11A*, na região intergênica *HBS1L-MYB* (*HMIP 2A* e *HMIP 2B*) e o polimorfismo rs10128556 em *HBBP1*;
- Genotipar e determinar a frequência desses polimorfismos na casuística estudada;
- Verificar a associação de tais polimorfismos com a concentração relativa de Hb F na casuística estudada;
- Verificar a associação dos polimorfismos em questão com parâmetros hematológicos em crianças com anemia falciforme;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento e local do estudo

Trata-se de um estudo do tipo coorte retrospectiva realizado com crianças com anemia falciforme diagnosticadas pelo PTN-MG e acompanhadas no ambulatório do HBH da Fundação Hemominas.

### 4.2 Casuística

A casuística constou de crianças nascidas entre 01 de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2008, triadas pelo PTN-MG e encaminhadas para tratamento inicial no ambulatório do HBH. Foram incluídas crianças nascidas até 2008, para que o acompanhamento clínico fosse, no mínimo, até os oito anos de idade. Durante esse período, 472 crianças foram triadas com o perfil hemoglobínico FS ao nascimento (genótipos SS, S/HPFH - Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal - ou S $\beta^0$ -talassemia) e encaminhadas para o ambulatório do HBH. A partir dessa potencial casuística, os seguintes critérios de seleção dos participantes foram aplicados:

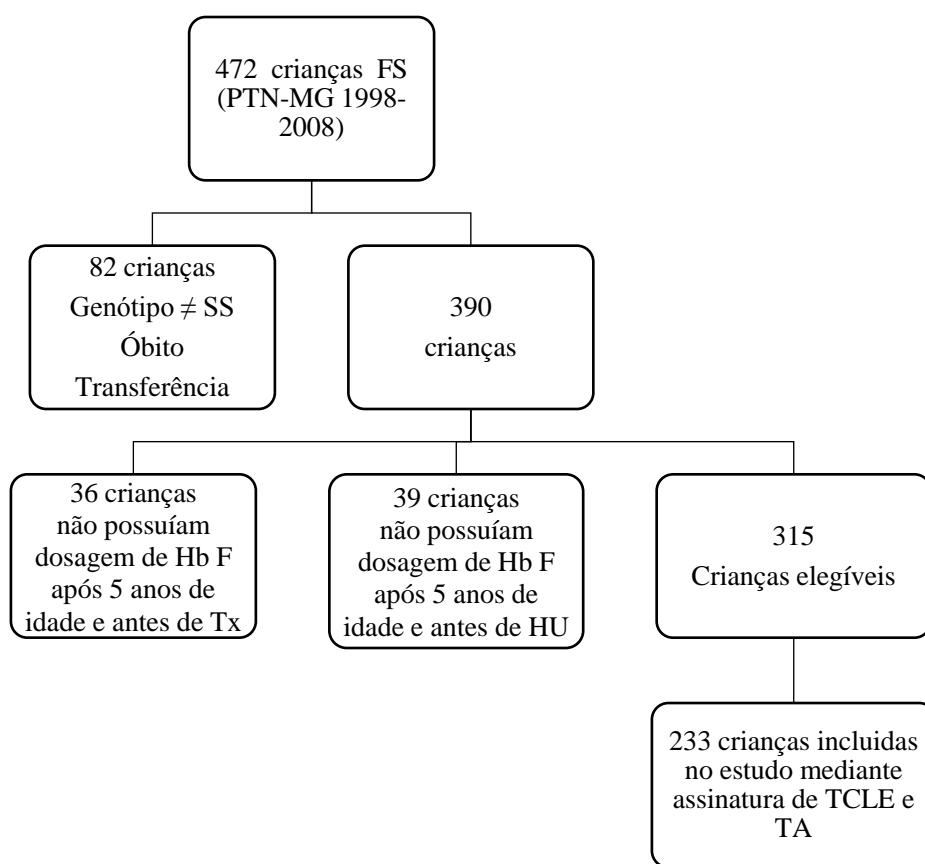
Critérios de inclusão:

- Crianças triadas pelo PTN-MG, com perfil hemoglobínico compatível com anemia falciforme (FS ou SS determinado por HPLC e/ou eletroforese com focalização isoelétrica e confirmado por métodos moleculares, como sendo homozigóticas para o alelo  $\beta^S$ ) e acompanhada no Hemocentro de Belo Horizonte;
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pais e do Termo de Assentimento pelas próprias crianças, quando aplicável.

Critérios de exclusão:

- Crianças com outros subtipos de doença falciforme, ou seja, FSC, FSA (S $\beta^+$ -talassemia), S $\beta^0$ -talassemia e persistência hereditária de Hb F.

- Crianças que vieram a óbito por qualquer razão;
- Crianças transferidas para acompanhamento em outros ambulatorios;
- Crianças que não possuíam dosagem de Hb F após cinco anos de idade e antes de regime transfusional crônico ou de tratamento com hidroxiureia;
- Crianças que não puderam ser encontradas, durante o período de realização do estudo, para obtenção do consentimento e/ou amostra biológica;
- Crianças e/ou pais ou responsáveis que não aceitaram participar do estudo.



**Figura 15:** Fluxograma de seleção dos pacientes, com base nos critérios de inclusão e exclusão adotados.

Foram utilizadas informações referentes ao acompanhamento clínico da população de estudo no período compreendido entre janeiro de 1999 (início do acompanhamento da coorte) e junho de 2015 (término do acompanhamento da coorte). As informações clínicas e hematológicas dos pacientes foram retiradas dos prontuários médicos arquivados no ambulatório do HBH e lançadas no programa

Access (Microsoft®), em banco de dados criado pelos pesquisadores envolvidos no estudo.

### 4.3 Variáveis laboratoriais

As seguintes variáveis laboratoriais foram analisadas:

- Concentração total de hemoglobina (Hb, g/dL)
- Concentração relativa de hemoglobina fetal (Hb F, %)
- Leucometria basal ( $10^9/L$ )
- Contagem relativa de reticulócitos (Retic, %)
- Contagem de plaquetas (PLAQ,  $10^9/L$ )
- Saturação periférica de oxigênio ( $SpO_2$ , %)

Os valores de Hb total, leucometria basal e contagem de reticulócitos foram determinados por contador eletrônico de células (Coulter T890, Coulter, Hialeah, FL, EUA ou CELL-DYN Ruby, Abbott Laboratories, Santa Clara, CA, USA). Para a contagem de reticulócitos, usou-se o método de azul de cresil brilhante à microscopia óptica. A quantificação da porcentagem de Hb F foi realizada utilizando-se o método de eletroforese de Hb em pH alcalino. Esses exames são realizados normalmente para acompanhamento clínico dos pacientes na Fundação Hemominas, estando os resultados disponíveis no prontuário médico.

Para determinação do nível basal de cada parâmetro hematológico, foi considerada a média de todos os valores de exames, após os dois anos de idade, desprezando-se os valores após transfusões sanguíneas (90 dias) ou eventos clínicos significativos (crise de dor, infecção grave, sequestro esplênico agudo e crise aplástica). Nas crianças em regime de transfusão ou sob tratamento com hidroxiureia, os valores foram considerados até a data anterior ao início das respectivas condutas terapêuticas.

Com relação ao valor basal de Hb F, foi utilizado o resultado do último exame após os cinco anos de idade, desprezando-se os valores após transfusões sanguíneas (90 dias) ou eventos clínicos significativos (crise de dor, infecção grave, sequestro esplênico agudo, crise aplástica e síndrome torácica aguda). Para as crianças que entraram em regime de transfusão crônica ou que iniciaram tratamento com hidroxiureia, foi considerado o último exame até a data anterior ao início das respectivas terapêuticas.

O Anexo 2 mostra imagem do banco de dados eletrônico criado pelo grupo de pesquisadores envolvidos no projeto, onde foram inseridos os dados do prontuário médico dos participantes da pesquisa.

#### 4.4 Variáveis genéticas

Para extração do DNA genômico, foram realizados os seguintes procedimentos:

- As amostras de sangue obtidas foram centrifugadas a 2.000 x g em centrífuga (Z323K, Hermle, Wehingen, Germany) durante 10 minutos para a separação do sangue total em plasma, leucócitos e eritrócitos.

- A partir da camada leucocitária das amostras de sangue coletadas, a extração do DNA genômico foi realizada utilizando um kit comercial (QIAamp, DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as orientações do fabricante.

- A determinação da concentração e do grau de pureza do DNA foi realizada em espectrofotômetro (NanoVueplus, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Posteriormente, o DNA foi diluído para 50 ng/ $\mu$ L, concentração utilizada nas reações de PCR.

A tabela 7 mostra os iniciadores, na forma de oligonucleotídeos sintéticos, no sentido direto (D) e reverso (R) da fita de DNA utilizados na reação de PCR, o tamanho do fragmento amplificado, localização e posição dos polimorfismos estudados no cromossomo.

**Tabela 7: Posição, localização e iniciadores utilizados para amplificação dos polimorfismos estudados**

SNP	Iniciadores	Tamanho do fragmento amplificado	Localização no cromossoma e troca de base nitrogenada
rs7557939	D: ACCATGGCCTGGTCACCA R: TCCCCCACTAGCTCAGAAAT	698	BCL11A (Intron) NC_000002.12:g.60494212 G>A
rs4671393	D: AGGTGACCAGGCCATGGT R: ATTTCTGAGCTAGTGGGGGCT	698	BCL11A (Intron) NC_000002.12:g.60493816 A>G
rs7599488	D: CACTCATCCCATGCACCACT R: TAGCTGAAGGGGGCCAAAAG	739	BCL11A (Intron) NC_000002.12:g.60491212 C>T
rs9402686	D: GTGCTCGTTGAAAATGGGGG R: ATACGTGGCGTGACCATGAA	470	HBS1L-MYB (região intergênica) NC_000006.12:g.135106679 G>A
rs4895441	D: AGT TGGCCAGAGCACACTTG R: TCTCCCTGTCCCCAGATACT	371	HBS1L-MYB (região intergênica) NC_000006.12:g. 135105435 A>G
rs10128556	D: GAACAGAAGTTGAGATAGAGA R: ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	701	HBBP1(Intron) NG_000007.3:g.a 55163 C>T
rs9399137	D: GCGGTTCCCTCAGAAGACAC R: ATGCTTGCCAAAGTGCTTCTG	477	HBS1L-MYB (região intergênica) NC_000006.12:g. 135097880 T>C
rs35786788	D: GCGGTTCCCTCAGAAGACAC R: ATGCTTGCCAAAGTGCTTCTG	477	HBS1L-MYB (região intergênica) NC_000006.12:g. 135097904 G>A

A tabela 8 mostra a técnica de genotipagem utilizada para identificação de cada SNP. As condições de reação e concentração dos reagentes utilizadas estão descritas detalhadamente no Anexo 1.



**Tabela 8: Técnica de genotipagem utilizada para genotipagem dos SNPs**

Técnica de genotipagem	SNP
<b>PCR-RFLP</b>	rs7557939, rs4671393, rs7599488 ( <i>BCL11A</i> ) rs4895441, rs9402686 ( <i>HBSIL-MYB</i> ) rs10128556 ( <i>HBBP1</i> )
<b>PCR e sequenciamento do fragmento DNA</b>	rs4671393 ( <i>BCL11A</i> ), rs9399137 e rs35786788 ( <i>HBSIL-MYB</i> )
<b>PCR em tempo real*</b>	rs9494145 ( <i>HBSIL-MYB</i> ) e rs11886868 ( <i>BCL11A</i> )

\* Foram usadas as “sondas” TaqMan C\_\_2737532\_10 e C\_\_3119894\_10, respectivamente, produzidas pela ThermoFisher Scientific.

\*\*Para o SNP rs4671393, parte das amostras foram genotipadas por PCR-RFLP e parte por PCR seguida de sequenciamento de DNA.

#### 4.5 Análise Estatística

A associação entre variáveis nominais foi investigada utilizando-se o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Para as variáveis contínuas com distribuição normal foi utilizado o teste t de Student e o teste ANOVA para comparação de médias entre dois e três grupos, respectivamente. Para as variáveis contínuas com distribuição não-normal foi utilizado o teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis para comparação de médias entre dois ou três grupos, respectivamente. A distribuição normal ou não-normal dos dados contínuos foi verificada utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram considerados como estatisticamente significativos os testes em que a probabilidade de erro alfa foi igual ou inferior a 0,05. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS, versão 20.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

Os testes de Equilíbrio de Hardy- Weinberg ou equilíbrio gênico foram realizados no programa SNPStats (99).

As análises haplotípicas e de desequilíbrio de ligação foram realizadas no software HaploView, versão 4.2 (100).

#### 4.6 Aspectos Éticos

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas (CEP Hemominas), instituição de execução do projeto e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP), instituição coparticipante (anexo 3).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 4) e o Termo de Assentimento (TA) (anexo 5) foram apresentados aos responsáveis legais e à própria criança, quando aplicável. O estudo foi explicado verbalmente pelos pesquisadores envolvidos durante as consultas de rotina. Quando concedida a autorização para participação, o responsável legal e a própria criança, assinaram o TCLE e o TA, respectivamente, ficando sob sua guarda uma cópia e outra sob a guarda dos pesquisadores.

A consulta aos prontuários foi feita exclusivamente pelos pesquisadores envolvidos e cadastrados na Plataforma Brasil, mediante aprovação pelo CEP Hemominas e de modo a garantir o sigilo das informações pessoais de cada sujeito da pesquisa. Os pesquisadores envolvidos se comprometeram a utilizar o material biológico e os dados coletados exclusivamente para os fins previstos no projeto de pesquisa.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características da população de estudo

A população estudada foi composta por 233 crianças com anemia falciforme (Hb SS). Destas, 119 (51,1%) eram do sexo masculino e 114 (48,9%), do feminino.

O tempo médio de acompanhamento foi 9,78 ( $\pm 0,18$ ) anos, com mediana de 9,4 anos, variando entre 5,2 e 16,1 anos.

### 5.2 Variáveis genéticas

Dentre as 233 crianças incluídas no estudo, não foi possível a obtenção da amostra de sangue de uma criança e, conseqüentemente, de seu DNA genômico. Dessa forma, 232 crianças foram incluídas nas análises genéticas.

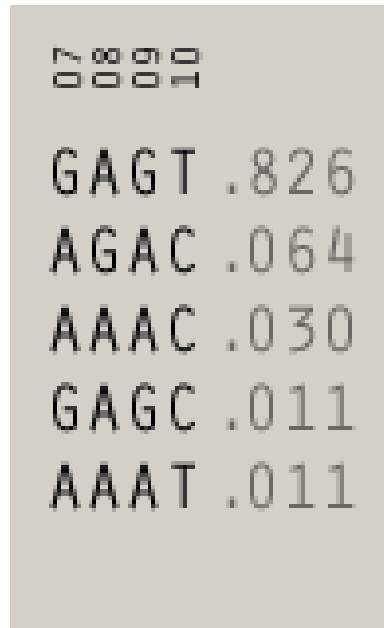
As frequências dos alelos menos frequentes (MAF – *Minor Allele Frequency*), as frequências genotípicas, absoluta e relativa e os resultados do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE – Hardy-Weinberg Equilibrium) encontram-se na tabela 9. Todas as variantes estudadas estão em HWE ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 9: Frequências genótípicas e alélica para variantes em *HBBP1*, *BCL11A* e *HBSIL-MYB* em 232 crianças com anemia falciforme (Hb SS)**

SNP	MAF	GENÓTIPOS	FREQUÊNCIA ABSOLUTA	FREQUÊNCIA RELATIVA	HWE (VALOR P)
<b>rs10128556 (<i>HBBP1</i>)</b>	0,01	CC	229	98,7%	1
		CT	3	1,3%	
<b>rs7599488(<i>BCL11A1</i>)</b>	0,37	CC	96	41,4%	0,33
		CT	101	43,5%	
		TT	35	15,1%	
<b>rs4671393(<i>BCL11A1</i>)</b>	0,23	GG	135	58,2%	0,35
		GA	88	37,9%	
		AA	9	3,9%	
<b>rs7557939(<i>BCL11A1</i>)</b>	0,34	AA	96	41,4%	0,25
		AG	113	48,7%	
		GG	23	9,9%	
<b>rs11886868(<i>BCL11A</i>)</b>	0,33	TT	101	43,9%	0,46
		TC	107	46,5%	
		CC	22	9,6%	
<b>rs9399137(<i>HMIP</i>)</b>	0,12	TT	180	77,6%	0,36
		TC	47	20,3%	
		CC	5	21,1%	
<b>rs35786788(<i>HMIP</i>)</b>	0,12	GG	180	77,6%	0,36
		GA	47	20,3%	
		AA	5	21,1%	
<b>rs4895441(<i>HMIP</i>)</b>	0,1	AA	189	81,5%	1
		AG	41	17,7%	
		GG	2	0,8%	
<b>rs9402686 (<i>HMIP</i>)</b>	0,14	GG	169	72,8%	0,27
		GA	61	26,3%	
		AA	2	0,9%	
<b>rs9494145 (<i>HMIP</i>)</b>	0,13	TT	175	75,4%	0,78
		TC	54	23,3%	
		CC	3	13,3%	
<b>In/Del: AACCC/AAAC (<i>HMIP</i>)*</b>	0,22	AACCC/AACCC	144	62%	0,7
		AACCC	76	32,8%	
		/AAAC	12	5,2%	
		AAAC/AAAC			
<b>A&gt;GPosic_135097850 (<i>HMIP</i>) *</b>	0,09	AA	192	82,8%	0,09
		AG	38	16,3%	
		GG	2	0,9%	

\*As variantes Inserção/Deleção (In/Del) AACCC/AAAC e A>G foram identificadas acidentalmente durante o sequenciamento de *HMIP2A* nas posições 135097901 e 135097850 do cromossomo 6q23, respectivamente, e incluídas no estudo. Como essas variantes não possuem identificação formal no NCBI, padronizamos neste texto a identificação utilizada nesta tabela.

A figura 16 mostra a frequência dos haplótipos *HMIP* identificados em 464 cromossomos de crianças com anemia falciforme e a figura 17 mostra o desequilíbrio de ligação (DL) encontrado entre os polimorfismos em *BCL11A* e *HMIP2*.



**Figura 16:** Frequência haplotípica em 464 cromossomos de crianças com anemia falciforme.  
Descrição: Os alelos são apresentados na seguinte ordem: rs35786788, rs4895441, rs9402686 e rs9494145

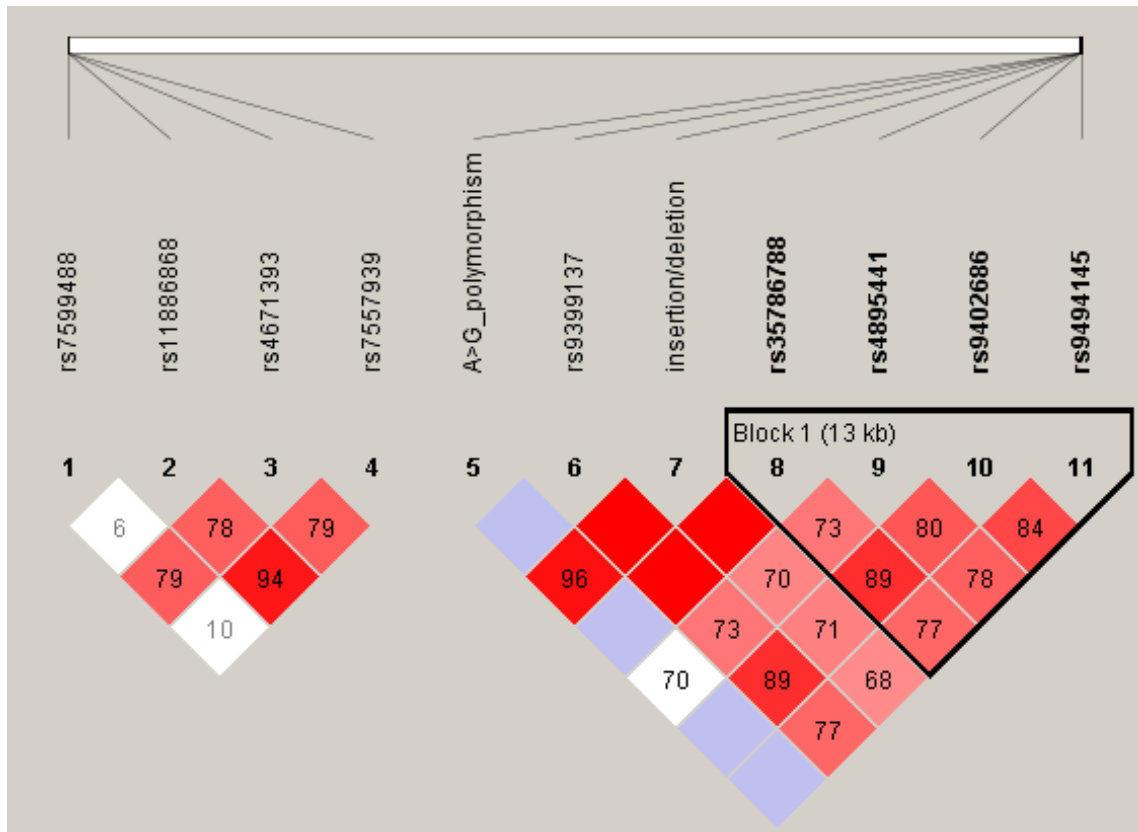


Figura 17: Desequilíbrio de ligação nas regiões *BCL11A* e *HMP2*. Plot de desequilíbrio de ligação entre polimorfismos em *BCL11A* (esquerda) e *HMP2* (direita). Os valores descritos em cada quadrado do bloco representam o grau de desequilíbrio de ligação ( $D'$ ) entre os dois polimorfismos adjacentes.  $D'$  descreve a magnitude do desequilíbrio de ligação. O LOD score compara a probabilidade de obter dos dados testados caso estejam ligados e a probabilidade de se obter estes dados ao acaso. O programa considera desequilíbrio significativo  $LOD > 2$ . O esquema de cores padrão indica: branco,  $D' < 1$  e  $LOD < 2$ ; azul,  $D' = 1$  e  $LOD < 2$ ; vermelho claro,  $D' < 1$  e  $LOD \geq 2$ ; vermelho escuro,  $D' = 1$  e  $LOD \geq 2$ . Ou seja, quanto mais forte é a cor, maior o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos adjacentes.

### 5.3 Dados hematológicos

Dentre as 233 crianças analisadas, dez não possuíam registros do valor basal de Hb F após os cinco anos de idade e antes da data de início de tratamento com hidroxiureia e/ou regime de hipertransfusão. Elas foram excluídas das análises referentes à Hb F, mas mantidas nas análises das demais características hematológicas.

A concentração relativa média de Hb F encontrada foi 13,25% ( $\pm 0,44$ ), com valores basais variando entre 2,6% e 35%. O gráfico 1 mostra a concentração relativa de Hb F na população estudada. A idade média ao exame utilizado para determinação do valor basal de Hb F foi 8,78 ( $\pm 0,19$ ) anos. Não houve correlação entre idade e a concentração relativa média de Hb F (coeficiente de Spearman,  $r = -0,014$ ;  $p = 0,83$ ). Os dados descritivos referentes a todas as variáveis hematológicas estudadas estão reunidos na tabela 10.

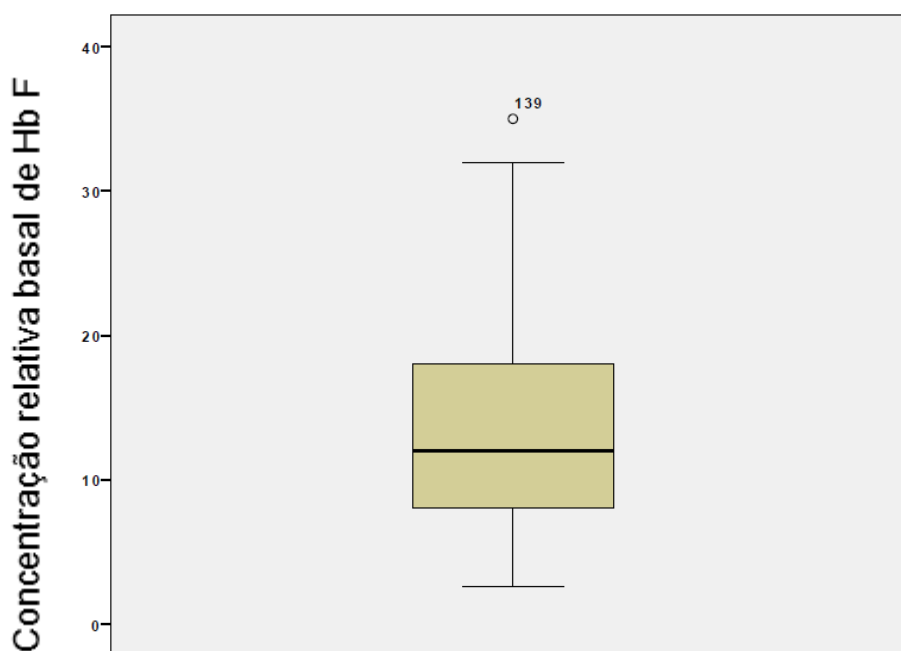


Figura 18: Boxplot da concentração relativa basal de Hb F em 223 crianças com anemia falciforme (Hb SS).

Foi observada diferença significativa na concentração relativa média de Hb F em relação ao gênero. As crianças do sexo feminino apresentaram concentração



relativa média de Hb F significativamente ( $p=0,018$ ) mais alta ( $14,3\%\pm 0,6$ ) do que as do sexo masculino ( $12,2\%\pm 0,6$ ).

**Tabela 10: Estatística descritiva das variáveis hematológicas estudadas em 233 crianças com anemia falciforme (Hb SS)**

Variável	Média (desvio padrão)	IC (95%)	Valor mínimo	Valor máximo
Hb fetal (%)*	13,25 ( $\pm 0,44$ )	12,38-14,13	2,6	35,0
Hb total (g/dL)	7,87 ( $\pm 0,93$ )	7,75-7,99	5,9	11,9
Reticulócitos (%)	14,75 ( $\pm 4,09$ )	14,26-15,27	2,3	25,8
Leucometria ( $10^9/L$ )	15,39 ( $\pm 3,4$ )	14,95-15,82	3,5	25,1
Plaquetas ( $10^9/L$ )	412,17 ( $\pm 111,73$ )	398,24-427,21	44,6	923,0
SpO <sub>2</sub> (%)	93,64 ( $\pm 3,22$ )	93,20-94,05	81,0	99,0

\* Resultado referente a 223 crianças

As variáveis hematológicas “Leucometria” e “Plaquetas” apresentaram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ( $p>0,05$ ).

#### 5.4 Testes de associação genética

##### SNP EM *HBBP1* E Hb F

Não foi observada diferença significativa entre as médias de Hb F e os genótipos encontrados para rs10128556 ( $p=0,8$ ). A média de Hb F para o grupo CC foi  $14,18\pm 0,44$  e para o grupo CT foi  $14,0\pm 4,35$ .

##### SNPs EM *BCL11A* E Hb F

A tabela 11 mostra os resultados de associação entre os SNPs estudados em *BCL11A* e a concentração relativa de Hb F.

Em *BCL11A1*, não houve associação significativa entre a concentração relativa média de Hb F e os SNPs rs7599488 ( $p=0,8$ ) e rs7557939 ( $p=0,06$ ). Com relação ao rs7599488, os resultados de associação, supondo dominância (CC contra CT/TT) ou recessividade (CC/CT contra TT), foram similares ( $p=0,9$  e  $0,1$ , respectivamente) e as média de Hb F foram  $13,22\pm 0,56$  para o grupo CT/TT e  $13,35\pm 0,56$  para o grupo

CC/CT. O SNP rs7557939 não se associou com a concentração relativa de Hb F, embora tenha sido observado tendência de associação ( $p=0,06$ ). Novamente, os testes de dominância (AA contra AG/GG) ou recessividade (AA/AG contra GG) mostraram resultados similares ( $p=0,06$  e  $p=0,1$ , respectivamente), não apresentando associação significativa. A concentração média de Hb F para os grupos AG/GG e AA/AG foram  $13,89\pm 0,57$  e  $12,87\pm 0,44$ , respectivamente.

O polimorfismo rs4671393 foi fortemente associado à concentração relativa de Hb F ( $p<0,001$ ), sendo o alelo A associado ao aumento da concentração média. Testando a dominância do alelo A (GG contra GA/AA), o resultado foi similar ( $p<0,001$ ) e a média de Hb F para o grupo GA/AA foi  $15,49\pm 0,71$ .

Finalmente, o SNP rs1886868 foi também associado a concentração relativa de Hb F ( $p=0,008$ ). Testando CC contra TT/CT o resultado foi similar ( $p=0,009$ ) e a média do grupo TT/CT foi de  $12,72\pm 0,44$ .

**Tabela 11: Associação entre SNPs em BCL11A e a concentração relativa média de Hb F em 223 crianças com anemia falciforme (Hb SS)**

SNP	Genótipos	Concentração relativa média de Hb F (%)	Valor de p
<b>rs7599488</b>	CC	13,15(±0,71)	0,8
	CT	13,55(±0,7)	
	TT	12,21(±0,7)	
<b>rs7557939</b>	AA	12,21(±0,67)	0,06
	AG	13,45(±0,57)	
	GG	15,93(±1,8)	
<b>rs4671393</b>	GG	11,53(±0,1)	<b>&lt;0,001</b>
	AG	14,9(±0,71)	
	AA	20,93(±2,51)	
<b>rs11886868</b>	TT	12,16(±0,67)	<b>0,008</b>
	TC	13,25(±0,57)	
	CC	17,38(±1,7)	

#### SNPs EM HMIP E Hb F

A tabela 12 mostra os resultados de associação entre os SNPs estudados na região *HMIP* e a concentração relativa de Hb F.

O SNPs rs35786788 e rs9399137 apresentaram DL total e seus resultados, conseqüentemente, são equivalentes. Esses SNPs foram fortemente associados à concentração relativa de Hb F ( $p=0,002$ ), sendo os alelos C e A, respectivamente, associados a níveis mais elevados de Hb F. O teste de domiância (TT contra TC/CC) também apresentou diferença significativa ( $p=0,03$ ) e a concentração relativa média de Hb F para o grupo TC/CC foi  $15,76\pm 6,62$ .

Devido à baixa frequência do alelo "menor" dos polimorfismos rs4895441, rs9402686, rs9494145 e A>G Posic\_135097850, as análises foram conduzidas testando apenas a recessividade desses alelos. Dentre eles o único que não apresentou associação significativa com a concentração relativa média de Hb F foi o polimorfismo A>G Posic\_135097850 ( $p=0,3$ ).

Os SNPs rs4895441 e rs9402686 em *HMIP2B* tiveram resultados similares. Seus alelos G e A, respectivamente, foram significativamente associados à concentrações relativas mais elevadas de Hb F ( $p=0,001$ ).

O SNP rs9494145 também associou-se significativamente à Hb F, sendo o alelo C associado à elevação da concentração relativa média de Hb F ( $p=0,006$ ).

Finalmente, a In/Del AACCC/AAAC, encontrada entre as variáveis rs939937 e rs35786788, também associou-se significativamente à concentração relativa média de Hb F ( $p=0,03$ ).

**Tabela 12: Associação entre SNPs na região HMIP e a concentração relativa média de Hb F em 223 crianças com anemia falciforme (Hb SS)**

12	Genótipos	Concentração relativa média de Hb F (%)	Valor de p
rs9399137	TT	12,46( $\pm 0,48$ )	<b>0,002</b>
	TC	15,44( $\pm 0,98$ )	
	CC	20,66( $\pm 1,66$ )	
rs4895441	AA	12,36( $\pm 0,45$ )	<b>0,001</b>
	AG/GG	16,87( $\pm 1,12$ )	
rs9402686	GG	12,34( $\pm 0,49$ )	<b>0,001</b>
	GA/AA	15,48( $\pm 0,88$ )	
rs9494145	TT	12,52( $\pm 0,49$ )	<b>0,006</b>
	TC/CC	15,34( $\pm 0,89$ )	
In/Del AACCC/AAAC	AACCC/AACCC	12,54( $\pm 0,55$ )	<b>0,03</b>
	AACCC/AAAC	13,86( $\pm 0,75$ )	
	AAAC/AAAC	17,25( $\pm 2,12$ )	
A>G Posic_135097850	AA	13,37( $\pm 0,49$ )	0,3
	AG/GG	12,35( $\pm 0,95$ )	

## SNPS E VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS

O genótipo CT do SNP rs10128556 em *HBBP1* foi significativamente associado ao aumento na contagem de reticulócitos ( $p=0,02$ ) e diminuição da Hb total ( $p=0,01$ ) e leucócitos ( $p=0,03$ ).

Os SNPs em *BCL11A*, rs4671393 ( $p<0,001$ ), rs7557939 ( $p=0,02$ ) e rs11886868 ( $p=0,001$ ) foram significativamente associados à concentração de Hb total. Nos três casos, o alelo “menor” foi associado ao aumento da concentração de Hb total (A, G e C, respectivamente).

A tabela 13 reúne os resultados das análises de associação entre os parâmetros hematológicos estudados e variáveis genéticas em *HBBP1* e *BCL11A*.

**Tabela 13: Associação de polimorfismos genéticos em *BCL11A* e parâmetros hematológicos em 232 crianças com anemia falciforme (Hb SS)**

SNP		MÉDIA DE Hb TOTAL (IC 95%)	MÉDIA DE LEUCÓCITOS GLOBAL (IC 95%)	MÉDIA DE RETICULÓCITOS (IC 95%)	MÉDIA DE PLAQUETAS (IC 95%)	MÉDIA DE SPO2 (IC 95%)
rs10128556 (HBB)	CC	7,87 (7,74-7,99)	15,43 (14,99-15,88)	14,77 (14,24-15,30)	412,75 (398,16-427,34)	93,66 (93,21-94,11)
	CT	7,76 (6,82-8,70)	14,20 (3,84-24,55)	15,23 (6,31-24,15)	372,9 (87,95-657,84)	91,75 (56,80-126,69)
	Valor p	<b>p=0,01</b>	<b>p=0,03</b>	<b>p=0,02</b>	p>0,05	p>0,05
rs7599488 (BCL11A1)	CC	8,04 (7,84-8,24)	14,87 (14,21-15,53)	14,04 (13,21-14,88)	412,97 (389,94-436,01)	93,82 (93,11-94,52)
	CT	7,80 (7,63-7,98)	15,76 (15,05-16,47)	15,18 (14,39-15,97)	410,99 (387,80-434,17)	93,67 (93,06-94,29)
	TT	7,57 (7,29-7,84)	15,94 (14,88-17,01)	15,62 (14,22-17,01)	413,84 (382,2-445,47)	93,10 (91,68-94,51)
	Valor p	p>0,05	p>0,05	<b>p=0,09</b>	p>0,05	p>0,05
rs4671393 (BCL11A1)	GG	7,67 (7,52-7,82)	15,55 (14,97-16,12)	14,93 (14,26-15,61)	422,4 (402,67-442,14)	93,3 (92,71-93,89)
	GA	8,11 (7,93-8,29)	15,41 (14,69-16,13)	14,54 (13,65-15,42)	401,26 (379,44-423,08)	94,07 (93,37-94,76)
	AA	8,42 (7,21-9,59)	13,63 (11,15-16,1)	14,77 (10,66-18,89)	367,11 (269,43-464,78)	94,7 (91,49-97,9)
	Valor p	<b>p&lt;0,001</b>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
rs7557939 (BCL11A1)	AA	7,71 (7,52-7,9)	15,41 (14,66-16,16)	14,58 (13,74-15,72)	406,2 (383,07-429,34)	93,07 (92,33-93,81)
	AG	7,94 (7,79-8,1)	15,64 (15,05-16,23)	14,99 (14,23-15,75)	421,46 (401-441,91)	94,13 (93,59-94,67)
	GG	8,14 (7,6-8,69)	14,35 (13,06-15,64)	14,54 (12,76-16,33)	392,14 (342,75-441,53)	93,63 (91,65-95,61)
	Valor p	<b>p=0,02</b>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
rs11886868 (BCL11A1)	TT	7,7 (7,5-7,89)	15,69 (14,94-16,44)	14,61 (13,78-15,45)	411,54 (387,11-435,97)	92,95 (92,21-93,7)
	TC	7,95 (7,77-8,13)	15,54 (14,94-16,15)	15,08 (14,27-15,89)	420,69 (398,11-443,27)	94,07 (93,53-94,61)
	CC	8,4 (7,88-8,95)	14,77 (12,98-16,53)	13,6 (11,8-15,4)	395,92 (345,86-445,98)	94,34 (92,49-96,18)
	Valor p	<b>p=0,001</b>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Os SNPs em *HMIP* se associaram significativamente às variáveis hematológicas estudadas. Os alelos C e A dos dois SNPs em total DL (rs9399137 e rs35786788) associaram-se significativamente ao aumento de Hb total ( $p=0,001$ ) e diminuição de leucócitos ( $p=0,004$ ), reticulócitos ( $p=0,003$ ) e plaquetas ( $p=0,04$ ). Os

resultados para rs4895441 e rs9402686 foram similares. Os alelos G e A, respectivamente, foram associados a aumento da concentração de Hb total ( $p < 0,001$  e  $p = 0,001$ , respectivamente) e SpO2 ( $p = 0,001$  e  $p = 0,004$ , respectivamente) e diminuição da contagem de reticulócitos ( $p = 0,001$ , nos dois casos). Foi observada tendência à associação entre esses SNPs e diminuição de leucócitos ( $p = 0,07$ ). O polimorfismo rs9494145 associou-se significativamente a todas as variáveis hematológicas estudadas, exceto contagem de plaquetas. A presença de pelo menos um alelo C para esse SNP foi associada ao aumento de Hb total ( $p = 0,001$ ) e SpO2 ( $p = 0,01$ ), e à diminuição de leucócitos ( $p = 0,01$ ) e reticulócitos ( $p = 0,006$ ). O polimorfismo In/Del AACCC/AAAC foi associado significativamente ao aumento de Hb total ( $p = 0,006$ ) e diminuição de leucócitos ( $p = 0,03$ ) e reticulócitos ( $p = 0,01$ ). Finalmente, a troca de base A>G identificada em HMIP2A não se associou a nenhum parâmetro hematológico estudado.

A tabela 14 reúne os resultados das análises de associação entre os parâmetros hematológicos estudados e os polimorfismos genéticos em *HMIP*.

**Tabela 14: Associação de parâmetros hematológicos e polimorfismos genéticos na região *HBS1L-MYB* em 232 crianças com anemia falciforme (Hb SS)**

SNP		MÉDIA DE HB TOTAL (IC 95%)	MÉDIA DE LEUCÓCITOS GLOBAL (IC 95%)	MÉDIA DE RETICULÓCITOS (IC 95%)	MÉDIA DE PLAQUETAS (IC 95%)	MÉDIA DE SPO2 (IC 95%)
rs9399137 (HMIP)*	TT	7,78 (7,65-7,9)	15,54 (15,06-16,02)	15,15 (14,58-15,73)	405,28 (390,13-420,44)	93,36 (92,83-98,89)
	TC	7,99 (7,68-8,3)	15,48 (14,43-16,53)	14,06 (12,81-15,3)	445,37 (445,07-485,67)	94,48 (93,74-95,22)
	CC	9,84 (8,86-10,81)	10,52 (6,27-14,76)	7,9 (3,87-11,92)	351,2 (211,65-490,82)	95,5 (90,72-100,27)
	Valor p	<b>p=0,001</b>	<b>p=0,004</b>	<b>p=0,003</b>	<b>p=0,04</b>	p>0,05
rs4895441 (HMIP)	AA	7,75 (7,63-7,87)	15,61 (15,14-16,08)	15,2 (14,65-15,75)	411,42 (395,75-427-10)	93,41 (92,89-93,93)
	AG/GG	8,36 (8,01-8,71)	14,58 (13,43-15,73)	12,89 (11,46-14,32)	415,83 (377,49-454,16)	94,60 (93,87-95,33)
	Valor p	<b>p&lt;0,001</b>	<b>p&gt;0,07</b>	<b>p=0,001</b>	p>0,05	<b>p=0,01</b>
rs9402686 (HMIP)	GG	7,72 (7,6-7,83)	15,66 (15,15-16,17)	15,31 (14,73-15,88)	406,83 (390,92-422,75)	93,28 (92,73-93-83)
	GA/AA	8,27 (7,97-8,56)	14,76 (13,9-15,63)	13,35 (12,21-14,48)	426,74 (394,22-459,26)	94,57 (93,9-95,23)
	Valor p	<b>p=0,001</b>	<b>p=0,07</b>	<b>p=0,001</b>	p>0,05	<b>p=0,004</b>
rs9494145 (HMIP)	TT	7,73 (7,61-7,85)	15,73 (15,23-16,24)	15,19 (14,63-15,76)	407,48 (391,93-423,02)	93,36 (92,82-93,90)
	TC/CC	8,29 (7,98-8,6)	14,45 (13,6-15,3)	13,5 (12,25-14,75)	426,85 (391,55-462,15)	94,5 (93,78-95,22)
	Valor p	<b>p=0,001</b>	<b>p=0,01</b>	<b>p=0,006</b>	p>0,05	<b>p=0,01</b>
In_Del: AACCC/AAAC (HMIP)	AACCC/AACCC	7,8 (7,65-7,94)	15,53 (14,99-16,06)	15,2 (14,56-15,84)	393,32 (386,08-419,78)	93,32 (92,73-93,91)
	AACCC/AAAC	7,83 (7,62-8,05)	15,6 (14,83-16,37)	14,66 (13,76-15,56)	434,83 (406,66-463,01)	94,15 (93,44-94,87)
	AAAC/AAAC	8,89 (8,18-9,6)	12,94 (10,21-15,66)	10,42 (7,08-13,76)	380,84 (295,87-465,8)	94,5 (92,43-96,56)
	Valor p	<b>p=0,006</b>	<b>p=0,03</b>	<b>p=0,01</b>	<b>p=0,08</b>	p>0,05
A>G Posic_135097850 (HMIP)	AA	7,9 (7,76-8,04)	15,38 (14,89-15,87)	14,76(14,18-15,34)	412,23 (396,13-428,32)	93,7 (93,22-94,17)
	AG/GG	7,7 (7,48-7,92)	15,6 (14,58-16,63)	14,85(13,53-16,16)	412,3 (377,82-446,78)	93,33 (92,01-94,65)
	Valor p	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05



## 6 DISCUSSÃO

Uma característica marcante da anemia falciforme é a heterogeneidade na gravidade do quadro clínico (6). Sabe-se que o nível de Hb F exerce grande influência na história natural da anemia falciforme, modificando fatores clínicos e hematológicos envolvidos na fisiopatologia da doença (8). Os benefícios clínicos da elevação dos níveis de Hb F, bem como a gama de estratégias terapêuticas decorrentes dos avanços da engenharia genética, impulsionaram esforços no sentido de compreender os mecanismos moleculares da regulação genética da produção de Hb F (61). Embora muitos avanços tenham sido alcançados, existe ainda muita controvérsia. Os *loci* XmnI no cluster do gene beta globina, *BCL11A* e *HBS1L-MYB* são marcantes pelo envolvimento na modulação da Hb F e isso tem sido cada vez mais reconhecido na literatura científica (9). Entretanto, existe ainda muita dificuldade na definição de quais variantes exercem de fato efeitos causais e ainda, da amplitude da contribuição de cada uma delas, tendo em vista que correspondem a *loci* de herança quantitativa.

Este é o primeiro estudo que avalia a influência desses *loci* na regulação de Hb F em pacientes de Minas Gerais. A relevância desses resultados é reforçada pela variabilidade fenotípica esperada entre pacientes de diferentes regiões do Brasil, haja vista as diferenças regionais observadas na distribuição de haplótipos da  $\beta$ -globina (101).

As meninas apresentaram média de Hb F significativamente maior que a média observada nos meninos. Esse achado já foi relatado anteriormente, e sugere a atuação de algum fator modulador que atue de forma gênero específico, embora não isso não tenha sido avaliado neste estudo(11). Como o gênero explica apenas 2,7% da variação dos níveis de HbF, seria necessário estudo com amostra muito maior para detectar os efeitos de moduladores dependentes do gênero (11).

Conforme esperado, dada a baixa frequência dos haplótipos Árabe-Indiano e Senegal na população de indivíduos com doença falciforme de Minas Gerais (101), a frequência do alelo T do polimorfismo rs10128556 foi muito baixa (MAF=0,01). Sendo assim, ainda que essa variável tenha sido analisada, com o objetivo de observar tendências, seus resultados não permitem conclusões a respeito de seu efeito. Um número amostral maior seria necessário para aumentar a frequência do alelo T e, conseqüentemente, a confiabilidade dos resultados.

Dentre os SNPs localizados em *BCL11A*, rs4671393 e rs11886868 associaram-se significativamente à concentração de Hb F. Em relação ao SNP rs7599488, apenas um estudo havia demonstrado associação com a concentração de Hb F em pacientes com anemia falciforme. Essa associação foi restrita a análise condicional à rs4671393 nos indivíduos inscritos no *Cooperative Study of Sickle Cell Disease* (CSSCD) (33). Note-se que, como demonstrado na Figura 17 do presente estudo, rs7599488 encontra-se em DL de grau moderado (índice = 79) com rs4671393 e praticamente sem DL com rs11886868 (índice = 6). Outros dois estudos não encontraram influência desse SNP na concentração de Hb F em populações distintas (29,94). Os resultados do presente estudo (probabilidade de associação com Hb F,  $p=0,8$ ) sugerem que essa variante exerce pouco ou nenhum efeito na concentração de Hb F.

Corroborando os resultados de estudos previamente publicados, o SNP rs4671393 foi fortemente associado à concentração relativa de Hb F. O genótipo AA foi associado a concentração relativa de Hb F superior a 20%, concentração frequentemente encontrada em indivíduos portadores de deleções causadoras de PHHF. Pacientes com anemia falciforme e PHHF apresentam quadro clínico menos grave e, por vezes, assintomático (85). Consistentemente com o aumento da Hb F, o alelo A de rs4671393 foi associado com o aumento de Hb total. Esse SNP é forte candidato a estudos adicionais de validação de seu efeito, tendo em vista a reprodutibilidade dos resultados em populações distintas e sua grande influência no nível de Hb F (21,29,32,33,35,75,82,91–93,95,96).

Quanto à variante rs7557939, houve tendência a associação do alelo G ao aumento da concentração de Hb F, embora o resultado não tenha sido estatisticamente significativo. Esse SNP foi associado ao aumento da concentração de Hb F em três estudos previamente publicados (25,29,33). Não encontramos, até o momento, resultados contraditórios na literatura. Como demonstrado na Figura 17, esse polimorfismo encontra-se em elevado grau de desequilíbrio de ligação (índice = 94) com o rs11886868, sendo esperado, portanto, que a associação com a concentração de Hb F seja realmente significativa. O polimorfismo rs7557939 também associou-se significativamente ao aumento da concentração de Hb total, conforme demonstrado em estudo prévio (25).

Em relação ao rs11886868, este estudo confirma todos os resultados de relatos anteriores, que mostraram associação desse polimorfismo com o nível de Hb F na anemia falciforme (19,25,29,33–35,74,88,91,93,96). Este SNP também associou-se a concentração mais elevada de Hb total, mais uma vez corroborando resultados prévios (25,36). A uniformidade dos dados disponíveis na literatura e a forte correlação frequentemente encontrada, fazem desse SNP mais um candidato à validação de seu efeito na concentração de Hb F.

A proteína BCL11A é a principal repressora dos genes  $\gamma$ -globina identificada até o momento. A repercussão do seu efeito é a diminuição da produção de  $\gamma$ -globina, substituindo a predominância da Hb F no recém-nascido pela Hb A do adulto (61). Juntamente com outras proteínas correpressoras parceiras, BCL11A interage com regiões específicas dentro do cluster da  $\beta$ -globina, incluindo sequências deletadas em pacientes com PHHF (102). Por essas razões, seu potencial terapêutico no tratamento de  $\beta$ -hemoglobinopatias tem sido explorado e mostrado resultados promissores (61).

Estudos experimentais mostraram que diminuições sutis na expressão de *BCL11A* levam a considerável aumento na concentração de Hb F (71,72,103,104). Uma característica importante de seu efeito é a inibição dose-dependente. Camundongos portadores de uma única cópia de *BCL11A* apresentam efeitos intermediários na repressão de  $\gamma$ -globina em comparação ao tipo selvagem (103). Polimorfismos associados a variações de Hb F levam a pequenas diminuições da expressão de *BCL11A* e, conseqüentemente, aumento da concentração de Hb F (83). Esses achados sugerem que pequenas contribuições de cada SNP podem levar a efeito somatório final significativo. Possivelmente, uma análise conjunta do efeito desses SNPs seria mais esclarecedora do que analisar cada um separadamente.

Outros SNPs localizados em *BCL11A* como, por exemplo, rs1427407 e rs766432, parecem desempenhar papel importante na regulação da Hb F. Por dificuldades metodológicas, não foi possível analisar essas variantes no presente estágio desta pesquisa. Reconhecendo a importância de *BCL11A* na regulação dos genes  $\gamma$ -globina, pretendemos estudá-las. Em todo caso, esse estudo representa um passo fundamental para o esclarecimento do papel de *BCL11A* em crianças com anemia falciforme.

Em relação a região *HMIP*, todas as variantes estudadas associaram-se, em graus variados, à concentração de Hb F, exceto uma das acidentalmente identificadas na região sequenciada e cuja avaliação não fazia parte dos objetivos iniciais deste estudo (variante A>G posição 135097850). Independentemente da identificação acidental, constitui informação científica relevante a ausência de associação desse polimorfismo com a concentração de Hb F e demais características hematológicas em crianças com anemia falciforme. Entretanto, são necessários novos estudos em populações distintas para confirmar essa ausência de associação.

Confirmou-se, no presente estudo, o desequilíbrio de ligação já relatado entre rs9399137 e rs357896788 (74). Essas variantes se associaram fortemente à Hb F, embora não saibamos qual das duas seria a variante causal ou, mesmo, se estariam associadas a outro polimorfismo ainda não identificado. Os resultados corroboram a grande maioria dos estudos que analisaram o efeito de rs9399137 na concentração de Hb F, ou seja, aumento da concentração relativa pelo alelo C (ver tabela 5). Os estudos que não encontraram associação desse polimorfismo com Hb F podem não ter tido poder suficiente para replicar os achados, tendo em vista o pequeno número amostral analisado para um polimorfismo de baixa frequência (MAF: ~0,1) (21,25,93,95). Quanto aos fatores hematológicos, o alelo C foi associado ao aumento de Hb F e diminuição significativa de leucócitos, reticulócitos e plaquetas. Esses resultados possuem plausibilidade biológica. A redução da concentração de Hb F reflete-se, conseqüentemente, nas características hematológicas da doença, diminuindo o nível basal de marcadores laboratoriais clássicos da gravidade da anemia falciforme como, por exemplo, a contagem de leucócitos e reticulócitos. Esses achados reforçam o potencial dessa variante como biomarcador não só da concentração de Hb F, mas também de outras características da anemia falciforme.

Além da associação com maior concentração de Hb F, observou-se associação da variante rs9494145 com aumento de Hb total e redução da contagem de leucócitos e reticulócitos. A associação dessa variante na concentração de Hb F confirma resultados anteriormente publicados e reforça mais uma vez a importância da região *HMIP* na modulação da Hb F (27,30,74).

A associação entre rs4895441 e rs9402686 e o nível de Hb F é controversa na literatura (ver tabela 5). No presente estudo, observou-se associação do alelo

menor desses SNPs com aumento de Hb F, Hb total e SpO<sub>2</sub> e diminuição de reticulócitos. Sabendo-se das dificuldades inerentes a estudos epidemiológicos de associação genética e tendo em vista a divergência dos resultados obtidos até o momento, estudos experimentais poderiam ser uma alternativa mais adequada para melhor elucidar o papel desses polimorfismos no fenótipo Hb F.

Os polimorfismos em *HMIP* formam haplótipos na região, que parecem exercer maior influência no nível de Hb F do que cada uma separadamente (74,79). Apesar de termos classificado e relatado os grupos haplotípicos identificados na população estudada, a ausência de dados de todos os polimorfismos do bloco impediu a realização de análises de avaliação da influência desses haplótipos na concentração de Hb F e demais variáveis estudadas. Pretende-se, em breve, realizar a determinação desses SNPs e as análises de associação.

A In/del na sequência *HMIP* foi associada a concentração mais elevada de Hb F. Isso era esperado, tendo em vista proximidade dessa variante com os dois SNPs investigados nessa região (19 pb em relação ao rs9399137 e 2 pb em relação ao rs35786788), sendo muito remota a possibilidade de permutação entre eles. Além disso, o presente estudo demonstrou o total desequilíbrio de ligação entre esse polimorfismo e os dois outros (Figura 17). O polimorfismo In/del também associou-se significativamente com a contagem de reticulócitos e leucócitos. Embora a In/del já tenha sido mencionada em estudo prévio (87), essa foi a primeira vez que essa variante foi associado à concentração de Hb F e de outros parâmetros hematológicos da anemia falciforme. É recomendável, entretanto, que se realizem estudos em populações distintas para confirmar a associação dessa variante com a Hb F e outros parâmetros hematológicos.

*HMIP* corresponde a uma região do cromossomo 6q23 margeada pelos genes *HBS1L* e *MYB*, que são expressos em células hematopoiéticas, principalmente em células da linhagem eritrocitária (105). Análises de imunoprecipitação da cromatina (ChIP-chip) e sequenciamento *ultra-high-throughput* (ChIP-seq) – técnicas capazes de identificar e mapear interações DNA-proteína – identificaram sítios de acetilação de histonas e de ligação para RNA polimerase II e GATA1 na região *HMIP* (106,107). Esses achados sugerem que essa região, fortemente associada com o aumento da produção de Hb F, contém elementos regulatórios para a expressão dos genes *HBG*. Além disso,

SNPs associados ao aumento da produção de Hb F nessa região intergênica apresentaram correlação positiva com os níveis de mRNA (RNA mensageiro) de *HBS1L* e *MYB* e com o aumento da expressão de *HBS1L* (105). É provável que a influência da região *HMIP* na produção de Hb F seja exercida mediante regulação da expressão dos genes *HBS1L* e *MYB*, que a flanqueiam.

Tem sido demonstrado que *MYB* exerce influência indireta na expressão de  $\gamma$ -globina, através da via de regulação de *BCL11A*. *KLF1* é um fator de transcrição que se liga à região promotora de *BCL11A*, regulando positivamente sua expressão (39). Experimentos de nocaute de *KLF1* em eritrócitos humanos e de camundongos reduziram os níveis de *BCL11A* e aumentaram a expressão de  $\gamma$ -globina (108). *MYB*, por sua vez, se liga a região promotora de *KLF1*, ativando sua expressão (109). Conforme essa via de ativação, a repressão de  $\gamma$ -globina durante a troca de expressão da Hb F para Hb A, depende dos níveis de *BCL11A*, cujo gene é ativado por *KLF1*, que é ativado por *MYB*. Dessa forma, se os polimorfismos identificados na região *HMIP* levarem a menor expressão de *MYB*, a expressão de *KLF1* e de *BCL11A* também seriam atingidas. A consequência seria, então, a persistência da expressão de  $\gamma$ -globina, elevando as concentrações de Hb F na fase adulta.

De forma semelhante, a expressão do gene *HBS1L* foi negativamente correlacionado com o número de células-F (105). Embora mecanismos pelos quais *HBS1L* possa interferir na expressão de  $\gamma$ -globina não tenha sido demonstrado até o momento, sua participação no processo de tradução em células eritroides é condizente com essa provável influência (78).

Os polimorfismos em *HMIP* que foram associados ao aumento de Hb F também associaram-se significativamente à diminuição de contagem de reticulócitos. Isso é importante pois, além de ser um resultado inédito, a reticulocitose é característica marcante de doença clinicamente mais grave, uma vez que indica atividade compensatória da medula óssea como resposta à anemia hemolítica (110). Dessa forma, a diminuição da contagem de reticulócitos representa diminuição da taxa de hemólise. Além disso, os reticulócitos são células extremamente aderentes ao endotélio vascular, com papel fundamental na fisiopatologia da vaso-oclusão. Esse é um possível mecanismo pelo qual os polimorfismos em *HMIP* poderiam influenciar a ocorrência das manifestações

clínicas da doença. Essas informações podem ajudar a esclarecer as bases da variação fenotípica observada na anemia falciforme, além de levar a uma melhor compreensão da patogênese das manifestações clínicas, bem como a identificação de potenciais alvos terapêuticos.

De forma similar, as variantes em *HMIP* foram associadas a redução da contagem de leucócitos, exceto os polimorfismos rs9402686 e rs4895441, em que houve tendência estatística a tal associação. Leucocitose é outra característica relevante na fisiopatologia da anemia falciforme, observada pelo menos durante as crises (1). A quimiotaxia de leucócitos ocorre durante resposta inflamatória (2). Leucocitose pode então indicar aumento da adesão de hemácias e leucócitos ao endotélio vascular e da taxa de hemólise, que são processos que desencadeiam resposta inflamatória. Além disso, por se tratarem de células grandes, contribuem para a ocorrência de vaso-oclusão (2). Nesse sentido, a diminuição da contagem de leucócitos, além de ser um indício de menor taxa de hemólise e adesão ao endotélio, pode ter como consequência menor ocorrência de eventos vaso-oclusivos, que são responsáveis por boa parte das complicações clínicas da doença.

Os SNPs em *HMIP* que se associaram à diminuição da contagem de reticulócitos e leucócitos também foram associados ao aumento da concentração de Hb F. Entretanto, permanece a dúvida se esses SNPs exercem influência direta em outros parâmetros hematológicos da doença ou se tal influência seria apenas consequente ao aumento da concentração de Hb F. *MYB* está envolvido no processo de expansão celular, além de codificar um fator de transcrição essencial na diferenciação eritroide. Se os SNPs que regulam Hb F na região *HMIP* também tiverem efeito na expressão de *MYB*, assim como foi mostrado para *HBS1L*, sua participação no ciclo celular isoladamente já poderia explicar a influência destes SNPs na contagem de reticulócitos e leucócitos (105). Note-se que no caso dos polimorfismos em *BCL11A* (rs4671393 e rs118886868, por exemplo), o presente estudo demonstrou clara associação com os níveis de Hb F, mas sem associação estatisticamente significativa com outros parâmetros hematológicos, exceto a concentração de Hb total, para a qual a associação foi significativa.

Houve associação significativa entre a contagem de plaquetas e o polimorfismo rs9399137. O alelo C associou-se com menor contagem de plaquetas. Esse resultado pode, mais uma vez, representar benefício para os portadores desse alelo, dado que a ativação plaquetária também ocorre durante resposta inflamatória e contribui para a vaso-oclusão (2). Outros genótipos da doença falciforme apresentam redução da hipercoagulabilidade e, conseqüentemente, quadro clínico menos grave. A contagem de plaquetas nos genótipos SC e S $\beta$ -talassemia relatadas são inferiores à encontrada em homocigotos SS (111,112).

Os SNPs rs4895441, rs9402686 e rs9494145 foram associados a valores mais elevados de saturação periférica de oxigênio (SpO<sub>2</sub>). O aumento de SpO<sub>2</sub> também pode conferir vantagem para os pacientes, uma vez que as hemácias possuem tendência a falcização em situações de hipóxia (59).

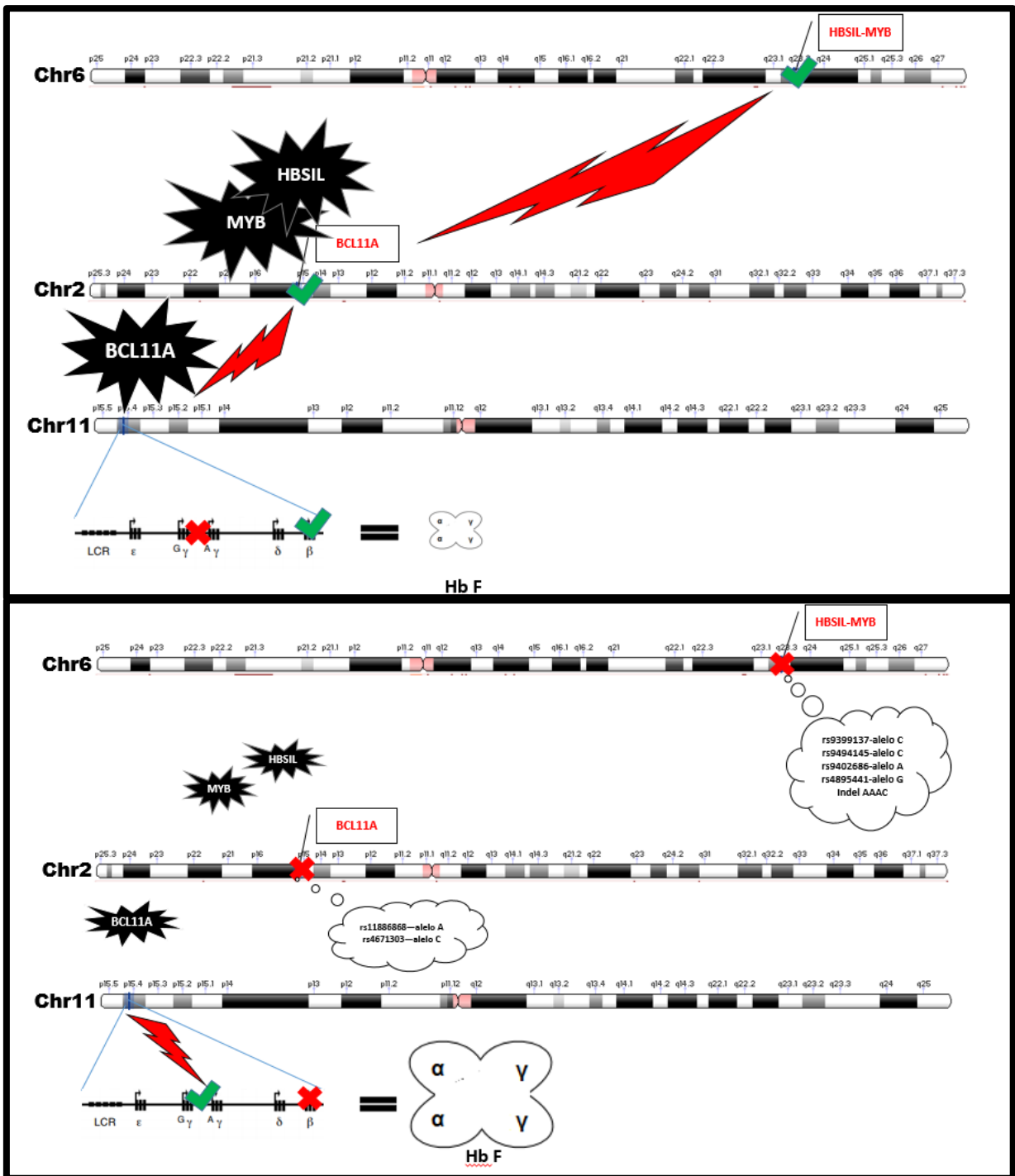
É importante reconhecer as limitações do presente estudo. Em primeiro lugar, a coleta de dados foi realizada de forma retrospectiva, a partir dos prontuários clínicos dos pacientes. Esses dados foram registrados com o objetivo de acompanhamento clínico e não direcionados para os fins propostos na pesquisa. Outra limitação é referente ao número amostral. Em torno de 20% das crianças com anemia falciforme que são acompanhadas no hemocentro de Belo Horizonte não puderam ser incluídas no estudo por não terem resultado de Hb F após os 5 anos de idade e antes do início do tratamento com hidroxiureia ou de iniciar regime de hipertransfusão. Esse critério de inclusão foi estabelecido com a intenção de retirar vieses das análises de associação dos SNPs com a concentração de Hb F, uma vez que a concentração de Hb F não se encontra “estabilizada” antes dessa idade. Por outro lado, a análise, ao excluir crianças com curso clínico mais grave que exigiu a adoção de terapias de intensificação antes dos 5 anos, contém vieses de seleção, não desejáveis, mas impossíveis de serem evitados com o desenho de estudo adotado. Além disso, para a análise de polimorfismos que apresentam baixa frequência nessa população como, por exemplo o rs10128556, número amostral mais elevado é imprescindível para a interpretação dos resultados.

Outra observação a ser feita refere-se ao fato de que o simples aumento da concentração da Hb F pode não ser suficiente para resultar em benefícios para o paciente. A distribuição da Hb F entre as células F também parece ser importante na



modulação do curso clínico (40). Os efeitos da distribuição da Hb F no curso clínico da anemia falciforme, bem como a influência desses *loci* nessa distribuição ainda não foi analisada por nosso grupo de pesquisa. Tal análise já foi planejada e representa outra perspectiva futura para continuidade do projeto.

A figura 19 é um esquema representativo dos achados deste estudo, em conjunto com as informações disponíveis na literatura, já discutidas no decorrer do texto. Trata-se de uma ilustração da atuação dos genes *BCL11A*, *HBSIL* e *MYB*, localizados em diferentes cromossomos e operando em uma mesma via biológica, a via de regulação da Hb F. A parte superior da figura ilustra o que aconteceria normalmente no desenvolvimento humano no período de troca de produção de Hb F para produção de hemoglobina do adulto. A ativação dos genes *HBSIL* e *MYB*, ativaria a expressão de *BCL11A*, principal silenciador dos genes  $\gamma$ , diminuindo conseqüentemente a produção de Hb F. Em outro cenário, ilustrado na parte inferior da figura, os SNPs destacados levariam a menor expressão dos genes *HBSIL* e *MYB*, diminuindo a ativação de *BCL11A*, influenciada também pelos SNPs destacados neste gene, o que permitiria a persistência da expressão dos genes  $\gamma$  e manutenção de altas concentrações de Hb F.



**Figura 199:** Esquema representativo da via de regulação da Hb F, conforme possível atuação dos genes *HBSIL*, *MYB* e *BCL11A* e influência dos polimorfismos estudados. A parte superior ilustra a regulação que ocorre normalmente no desenvolvimento humano, durante a troca da produção de Hb F pela hemoglobina do adulto. A parte inferior ilustra a influência dos polimorfismos que podem influenciar a expressão de *BCL11A*, diminuindo o silenciamento dos genes  $\gamma$  e mantendo níveis elevados de Hb F.

Em resumo, no presente estudo, avaliamos pela primeira vez a influência de polimorfismos localizadas em *HBBP1*, *BCL11A* e *HBS1L-MYB* na concentração relativa de Hb F em população pediátrica com anemia falciforme do estado de Minas

Gerais. Avaliamos, ainda, a influência desses polimorfismos em características laboratoriais da doença. Os resultados obtidos confirmam a influência desses polimorfismos na concentração de Hb F na população estudada e identificam associação com parâmetros hematológicos que influenciam a gravidade do curso clínico de crianças com anemia falciforme. Os resultados encontrados estão de acordo com a grande maioria de estudos previamente publicados e são sustentados pelo conhecimento atual da atuação molecular dos *loci* envolvidos em vias biológicas.

## 7 CONCLUSÕES

- Houve associação entre o alelo T de rs10128556 (*HBBP1*) e o aumento da concentração de Hb total, bem como com a diminuição da contagem de leucócitos e de reticulócitos;
- O alelo G de rs7557939 (*BCL11A*) foi associado ao aumento de Hb total embora não tenha se associado significativamente à concentração de Hb F;
- O alelo A de rs4671393 e o alelo C de rs11886868, ambos em *BCL11A*, associaram-se fortemente ao aumento da concentração de Hb F e Hb total;
- Todos os polimorfismos em *HBS1L-MYB* associaram-se ao aumento da concentração de Hb F e Hb total, bem como à diminuição da contagem de reticulócitos, exceto A>G posição 135097850, este ainda não descrito na literatura consultada;
- Os polimorfismos rs9399137 (alelo C) e rs9494145 (alelo C) e In/del (AAAC) em *HBS1L-MYB* associaram-se à diminuição da contagem de leucócitos;
- Os polimorfismos rs4895441, rs9402686 e rs9494145 e *HBS1L-MYB* associaram-se ao aumento da saturação periférica de oxigênio.

## 8 PERSPECTIVAS

- Verificar se os polimorfismos em *BCL11A* e *HBSIL-MYB*, associados com concentrações elevadas de Hb F, estão associados com redução de episódios clínicos importantes da doença;
- Estimar a frequência de haplótipos formados por SNPs dos genes *BCL11A* e *HBSIL-MYB* na casuística e avaliar sua associação com parâmetros clínicos e hematológicos;
- Caracterizar interações gene-gene entre SNPs em *BCL11A* e *HBSIL-MYB* e avaliar sua associação com parâmetros clínicos e hematológicos;
- Avaliar se os SNPs e/ou haplótipos influenciam distribuição da Hb F/hemácia.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Naoum PC. Erythrocytes and environmental interferences on sickle cell anaemia. *Rev Bras Hematol E Hemoter.* abril de 2000;22(1):5–22.
2. Habara A, Steinberg MH. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. *Exp Biol Med.* 1º de abril de 2016;241(7):689–96.
3. Serjeant GR. Sickle-cell disease. *The Lancet.* 1997;350(9079):725–730.
4. Steinberg MH. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *Sci World J.* 2008;8:1295–324.
5. Fernandes APPC, Januário JN, Cangussu CB, Macedo DL de, Viana MB. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 27 de maio de 2010 [citado 23 de fevereiro de 2016];0(0). Disponível em: [http://www.jped.com.br/conteudo/Ing\\_resumo.asp?varArtigo=2090&cod=&idSecao=1](http://www.jped.com.br/conteudo/Ing_resumo.asp?varArtigo=2090&cod=&idSecao=1)
6. Zago MA, Pinto ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):207–14.
7. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet Lond Engl.* 11 de dezembro de 2010;376(9757):2018–31.
8. Steinberg MH, Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *Am J Hematol.* agosto de 2012;87(8):795–803.
9. Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood.* 7 de julho de 2011;118(1):19–27.
10. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Hum Mol Genet.* 15 de outubro de 2009;18(R2):R216–23.
11. Solovieff N, Milton JN, Hartley SW, Sherva R, Sebastiani P, Dworkis DA, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5' olfactory receptor gene cluster. *Blood.* 2010;115(9):1815–1822.
12. Serjeant G, Serjeant B, Stephens A, Roper D, Higgs D, Beckford M, et al. Determinants of haemoglobin level in steady-state homozygous sickle cell disease. *Br J Haematol.* janeiro de 1996;92(1):143–9.
13. Franco RS, Yasin Z, Palascak MB, Ciruolo P, Joiner CH, Rucknagel DL. The effect of fetal hemoglobin on the survival characteristics of sickle cells. *Blood.* 1º de agosto de 2006;108(3):1073–6.
14. Bailey K, Morris JS, Thomas P, Serjeant GR. Fetal haemoglobin and early manifestations of homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child.* abril de 1992;67(4):517–20.
15. Nolan VG, Baldwin C, Ma Q, Wyszynski DF, Amirault Y, Farrell JJ, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* janeiro de 2005;128(2):266–72.

16. Webb DK, Darby JS, Dunn DT, Terry SI, Serjeant GR. Gall stones in Jamaican children with homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child*. maio de 1989;64(5):693–6.
17. Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA*. 2 de abril de 2003;289(13):1645–51.
18. Garner C, Tatu T, Reittie JE, Littlewood T, Darley J, Cervino S, et al. Genetic influences on F cells and other hematologic variables: a twin heritability study. *Blood*. 2000;95(1):342–346.
19. Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 de fevereiro de 2008;105(5):1620–5.
20. Mtatiro SN, Singh T, Rooks H, Mgaya J, Mariki H, Soka D, et al. Genome wide association study of fetal hemoglobin in sickle cell anemia in Tanzania. *PLoS One*. 2014;9(11):e111464.
21. Cardoso GL, Diniz IG, Silva ANLM da, Cunha DA, Silva Junior JS da, Uchôa CTC, 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*. dezembro de 2014;53(4):176–9.
22. Bhatnagar P, Purvis S, Barron-Casella E, DeBaun MR, Casella JF, Arking DE, et al. Genome-wide association study identifies genetic variants influencing F-cell levels in sickle-cell patients. *J Hum Genet*. abril de 2011;56(4):316–23.
23. Lettre G. The Search for Genetic Modifiers of Disease Severity in the -Hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1º de outubro de 2012;2(10):a015032–a015032.
24. 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*. 27 de janeiro de 2011;117(4):1390–2.
25. Sheehan VA, Luo Z, Flanagan JM, Howard TA, Thompson BW, Wang WC, et al. Genetic modifiers of sickle cell anemia in the BABY HUG cohort: influence on laboratory and clinical phenotypes. *Am J Hematol*. julho de 2013;88(7):571–6.
26. Mtatiro SN, Makani J, Mmbando B, Thein SL, Menzel S, Cox SE. Genetic variants at HbF-modifier loci moderate anemia and leukocytosis in sickle cell disease in Tanzania. *Am J Hematol*. janeiro de 2015;90(1):E1-4.
27. Mtatiro SN, Singh T, Rooks H, Mgaya J, Mariki H, Soka D, et al. Genome Wide Association Study of Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia in Tanzania. Li Y, organizador. *PLoS ONE*. 5 de novembro de 2014;9(11):e111464.
28. Menzel S, Garner C, Gut I, Matsuda F, Yamaguchi M, Heath S, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nat Genet*. outubro de 2007;39(10):1197–9.
29. Green NS, Ender KL, Pashankar F, Driscoll C, Giardina PJ, Mullen CA, et al. Candidate Sequence Variants and Fetal Hemoglobin in Children with Sickle Cell Disease Treated with Hydroxyurea. Covas DT, organizador. *PLoS ONE*. 7 de fevereiro de 2013;8(2):e55709.

30. Bae HT, Baldwin CT, Sebastiani P, Telen MJ, Ashley-Koch A, Garrett M, et al. Meta-analysis of 2040 sickle cell anemia patients: BCL11A and HBS1L-MYB are the major modifiers of HbF in African Americans. *Blood*. 30 de agosto de 2012;120(9):1961–2.
31. Bhagat S, Patra PK, Thakur AS. Association between XmnI polymorphism and HbF level in sickle cell disease patients from Chhattisgarh. *Int J Biomed Sci*. 2012;8(1):36–39.
32. Galarneau G, Palmer CD, Sankaran VG, Orkin SH, Hirschhorn JN, Lettre G. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nat Genet*. dezembro de 2010;42(12):1049–51.
33. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MAC, Araújo AS, Uda M, Sanna S, 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*. 19 de agosto de 2008;105(33):11869–74.
34. Leonardo FC, Brugnerotto AF, Domingos IF, Fertrin KY, de Albuquerque DM, Bezerra MAC, et al. Reduced rate of sickle-related complications in Brazilian patients carrying HbF-promoting alleles at the BCL11A and HMIP-2 loci. *Br J Haematol*. 16 de fevereiro de 2016;
35. Wonkam A, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, Ramesar R, Cooper RS, Tayo B, et al. Association of variants at BCL11A and HBS1L-MYB with hemoglobin F and hospitalization rates among sickle cell patients in Cameroon. *PLoS One*. 2014;9(3):e92506.
36. Mtatiro SN, Makani J, Mmbando B, Thein SL, Menzel S, Cox SE. Genetic variants at HbF-modifier loci moderate anemia and leukocytosis in sickle cell disease in Tanzania. *Am J Hematol*. janeiro de 2015;90(1):E1-4.
37. Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*. 2008;112(10):3927–3938.
38. Sankaran VG, Orkin SH. The Switch from Fetal to Adult Hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1º de janeiro de 2013;3(1):a011643–a011643.
39. Bauer DE, Orkin SH. Hemoglobin switching's surprise: the versatile transcription factor BCL11A is a master repressor of fetal hemoglobin. *Curr Opin Genet Dev*. agosto de 2015;33:62–70.
40. Steinberg MH, Chui DH, Dover GJ, Sebastiani P, Alsultan A. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? *Blood*. 2014;123(4):481–485.
41. Kohne E. Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. *significance*. 2011;5(11):12.
42. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ*. 2001;79(8):704–712.
43. Christianson A, Howson CP, Modell CB. March of Dimes Global Report on Birth Defects: The Hidden Toll of Dying and Disabled Children [Internet]. *The March of Dimes*; 2006 jan [citado 24 de novembro de 2016] p. 1–85. Disponível em: <http://discovery.ucl.ac.uk/7223/>
44. Naoum PC, Bonini-Domingos CR. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(3):226–8.
45. HbVar query page [Internet]. [citado 24 de novembro de 2016]. Disponível em: [http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query\\_vars3](http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3)



46. Januario J. Incidência da doença falciforme em um milhão de nascidos vivos em Minas Gerais (1998-2001). Incidência Doença Falciforme Em Um Milhão Nascidos Vivos Em Minas Gerais 1998-2001 [Internet]. 2002 [citado 27 de setembro de 2016]; Disponível em: [http://www.cehmob.org.br/wp-content/uploads/2014/10/Dissertacao\\_JoseNelio.pdf](http://www.cehmob.org.br/wp-content/uploads/2014/10/Dissertacao_JoseNelio.pdf)
47. Modell B. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. Bull World Health Organ. 1º de junho de 2008;2008(6):480–7.
48. Rogers ZR, Powars DR, Kinney TR, Williams WD, Schroeder WA. Nonblack patients with sickle cell disease have African beta S gene cluster haplotypes. JAMA. 26 de maio de 1989;261(20):2991–4.
49. Zago MA, Figueiredo MS, Ogo SH. Bantu  $\beta$ S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. Am J Phys Anthropol. 1992;88(3):295–298.
50. Espelho [Internet]. [citado 30 de novembro de 2016]. Disponível em: [http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg\\_norma\\_espelho\\_consulta.cfm?id=3223898&highlight=&tipoBusca=post&slcOrigem=0&slcFonte=0&sqlcTipoNorma=27&hdTipoNorma=27&buscaForm=post&bkp=pesqnorma&fonte=0&origem=0&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo\\_norma=27&numero=22&data=%20&dataFim=&ano=1992&pag=1](http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg_norma_espelho_consulta.cfm?id=3223898&highlight=&tipoBusca=post&slcOrigem=0&slcFonte=0&sqlcTipoNorma=27&hdTipoNorma=27&buscaForm=post&bkp=pesqnorma&fonte=0&origem=0&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo_norma=27&numero=22&data=%20&dataFim=&ano=1992&pag=1)
51. de Oliveira Werneck Rodrigues D, Ferreira MCB, Pereira PM, Bustamante MTT, Campos EMS, de Oliveira CM. DIAGNÓSTICO HISTÓRICO DA TRIAGEM NEONATAL PARA DOENÇA FALCIFORME. Rev Atencao Primaria Saude [Internet]. 2010 [citado 1º de dezembro de 2016];13(1). Disponível em: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=15167704&AN=49765207&h=XH6uSrK1HwGbsS%2Bvmo0sxx6%2B0ZMNaJcZTYiWw8f3RMcOmyzWfWXTmzQlyMQYJQ0uvUP6EDB0V0ghE%2F4JJDjQw%3D%3D&crl=c>
52. Portaria GM-MS nº 822, de 06-06-2001.doc - PORTARIA\_822\_MS.pdf [Internet]. [citado 30 de novembro de 2016]. Disponível em: [http://www.cehmob.org.br/wp-content/uploads/2014/08/PORTARIA\\_822\\_MS.pdf](http://www.cehmob.org.br/wp-content/uploads/2014/08/PORTARIA_822_MS.pdf)
53. Cançado RD, Jesus JA. Sickle cell disease in Brazil. Rev Bras Hematol E Hemoter. 2007;29(3):204–206.
54. Braga JAP. Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes. Rev Bras Hematol E Hemoter [Internet]. 2007 [citado 1º de dezembro de 2016]; Disponível em: <http://www.repositorio.unifesp.br/handle/11600/3876>
55. De Montalembert M, Tshilolo L. [Is therapeutic progress in the management of sickle cell disease applicable in sub-Saharan Africa?]. Med Trop Rev Corps Sante Colon. dezembro de 2007;67(6):612–6.
56. Archer N, Galacteros F, Brugnara C. 2015 Clinical trials update in sickle cell anemia. Am J Hematol. 1º de outubro de 2015;90(10):934–50.
57. Hoban MD, Orkin SH, Bauer DE. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. Blood. 18 de fevereiro de 2016;127(7):839–48.
58. Quinn CT. Sickle Cell Disease in Childhood. Pediatr Clin North Am. dezembro de 2013;60(6):1363–81.

59. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1º de abril de 1999;340(13):1021–30.
60. Poillon WN, Kim BC, Rodgers GP, Noguchi CT, Schechter AN. Sparing effect of hemoglobin F and hemoglobin A2 on the polymerization of hemoglobin S at physiologic ligand saturations. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90(11):5039–5043.
61. Lettre G, Bauer DE. Fetal haemoglobin in sickle-cell disease: from genetic epidemiology to new therapeutic strategies. *The Lancet*. 2016;387(10037):2554–2564.
62. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 1995;332(20):1317–1322.
63. Green NS, Barral S. Emerging Science of Hydroxyurea Therapy for Pediatric Sickle Cell Disease. *Pediatr Res*. janeiro de 2014;75(0):196–204.
64. Wang WC, Ware RE, Miller ST, Iyer RV, Casella JF, Minniti CP, et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). *The Lancet*. maio de 2011;377(9778):1663–72.
65. Ware RE, Davis BR, Schultz WH, Brown RC, Aygun B, Sarnaik S, et al. Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia-TCD With Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWITCH): a multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl*. 13 de fevereiro de 2016;387(10019):661–70.
66. Platt OS, Orkin SH, Dover G, Beardsley GP, Miller B, Nathan DG. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *J Clin Invest*. 1984;74(2):652.
67. Silva MC, Shimauti EL. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2006;28(2):144–8.
68. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 20 de 2017;376(16):1561–73.
69. Boyer SH, Belding TK, Margolet L, Noyes AN. Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults. *Science*. 25 de abril de 1975;188(4186):361–3.
70. Nguyen TKT, Joly P, Bardel C, Moulisma M, Bonello-Palot N, Francina A. The XmnI (G)gamma polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to BCL11A and HBS1L-MYB SNPs in a cohort of 57 beta-thalassemia intermedia patients. *Blood Cells Mol Dis*. 15 de agosto de 2010;45(2):124–7.
71. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*. 19 de dezembro de 2008;322(5909):1839–42.
72. Sankaran VG, Xu J, Ragoczy T, Ippolito GC, Walkley CR, Maika SD, et al. Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature*. 27 de agosto de 2009;460(7259):1093–7.

73. Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3 de julho de 2007;104(27):11346–51.
74. Mtatiro SN, Mgaya J, Singh T, Mariki H, Rooks H, Soka D, et al. Genetic association of fetal-hemoglobin levels in individuals with sickle cell disease in Tanzania maps to conserved regulatory elements within the MYB core enhancer. *BMC Med Genet*. 2015;16:4.
75. Friedrisch JR, Sheehan V, Flanagan JM, Baldan A, Summarell CCG, Bittar CM, 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*. novembro de 2016;62:32–7.
76. Oh IH, Reddy EP. The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene*. 13 de maio de 1999;18(19):3017–33.
77. Jiang J. cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults. *Blood*. 1º de agosto de 2006;108(3):1077–83.
78. Close J, Game L, Clark B, Bergounioux J, Gerovassili A, Thein SL. Genome annotation of a 1.5 Mb region of human chromosome 6q23 encompassing a quantitative trait locus for fetal hemoglobin expression in adults. *BMC Genomics*. 2004;5(1):1.
79. Menzel S, Rooks H, Zelenika D, Mtatiro SN, Gnanakulasekaran A, Drasar E, et al. Global Genetic Architecture of an Erythroid Quantitative Trait Locus, *HMIP-2*: *HMIP-2* Global Architecture. *Ann Hum Genet*. novembro de 2014;78(6):434–51.
80. Nuinon M, Makarasara W, Mushiroda T, Setianingsih I, Wahidiyat PA, Sripichai O, et al. A genome-wide association identified the common genetic variants influence disease severity in  $\beta$ 0-thalassemia/hemoglobin E. *Hum Genet*. março de 2010;127(3):303–14.
81. Galanello R, Sanna S, Perseu L, Sollaino MC, Satta S, Lai ME, et al. Amelioration of Sardinian 0 thalassemia by genetic modifiers. *Blood*. 29 de outubro de 2009;114(18):3935–7.
82. Rumaney MB, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, Ramesar R, Kengne AP, Ngogang J, 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, organizador. *PLoS ONE*. 30 de junho de 2014;9(6):e100516.
83. Bauer DE, Kamran SC, Lessard S, Xu J, Fujiwara Y, Lin C, et al. An Erythroid Enhancer of BCL11A Subject to Genetic Variation Determines Fetal Hemoglobin Level. *Science*. 11 de outubro de 2013;342(6155):253–7.
84. Steinberg MH, Voskaridou E, Kutlar A, Loukopoulos D, Koshy M, Ballas SK, et al. Concordant fetal hemoglobin response to hydroxyurea in siblings with sickle cell disease. *Am J Hematol*. fevereiro de 2003;72(2):121–6.
85. Belisário AR, Sales RR, Silva CM, Velloso-Rodrigues C, Viana MB. The Natural History of Hb S/Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin in 13 Children from the State of Minas Gerais, Brazil. *Hemoglobin*. junho de 2016;40(3):215–9.
86. Dadheech S, Jain S, Madhulatha D, Sharma V, Joseph J, Jyothy A, et al. Association of Xmn1 - 158  $\gamma$ G variant with severity and HbF levels in  $\beta$ -thalassemia major and sickle cell anaemia. *Mol Biol Rep*. maio de 2014;41(5):3331–7.

87. Akinsheye I, Solovieff N, Ngo D, Malek A, Sebastiani P, Steinberg MH, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: molecular characterization of the unusually high fetal hemoglobin phenotype in African Americans. *Am J Hematol.* fevereiro de 2012;87(2):217–9.
88. Bhanushali AA, Patra PK, Pradhan S, Khanka SS, Singh S, Das BR. Genetics of fetal hemoglobin in tribal Indian patients with sickle cell anemia. *Transl Res J Lab Clin Med.* junho de 2015;165(6):696–703.
89. Roy P, Bhattacharya G, Mandal A, Dasgupta UB, Banerjee D, Chandra S, et al. Influence of BCL11A, HBS1L-MYB, HBBP1 single nucleotide polymorphisms and the HBG2 Xmn1 polymorphism On Hb F levels. *Hemoglobin.* 2012;36(6):592–9.
90. Nemati H, Rahimi Z, Bahrami G. The Xmn1 polymorphic site 5' to the  $\gamma$ G gene and its correlation to the  $\gamma$ G:  $\gamma$ A ratio, age at first blood transfusion and clinical features in  $\beta$ -Thalassemia patients from Western Iran. *Mol Biol Rep.* 1º de janeiro de 2010;37(1):159–64.
91. 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.* 2011;117(4):1390–1392.
92. Bitoungui VJN, Ngogang J, Wonkam A. Polymorphism at BCL11A compared to HBS1L-MYB loci explains less of the variance in HbF in patients with sickle cell disease in Cameroon. *Blood Cells Mol Dis.* março de 2015;54(3):268–9.
93. Ngo D, Bae H, Steinberg MH, Sebastiani P, Solovieff N, Baldwin CT, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic studies of the Arab-Indian haplotype. *Blood Cells Mol Dis.* junho de 2013;51(1):22–6.
94. Sebastiani P, Farrell JJ, Alsultan A, Wang S, Edward HL, Shappell H, et al. BCL11A enhancer haplotypes and fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis.* março de 2015;54(3):224–30.
95. Alsultan A, Ngo D, Bae H, Sebastiani P, Baldwin CT, Melista E, et al. Genetic studies of fetal hemoglobin in the Arab-Indian haplotype sickle cell- $\beta$ 0 thalassemia. *Am J Hematol.* 2013;88(6):531–532.
96. Chaouch L, Moumni I, Ouragini H, Darragi I, Kalai M, Chaouachi D, et al. rs11886868 and rs4671393 of BCL11A associated with HbF level variation and modulate clinical events among sickle cell anemia patients. *Hematol Amst Neth.* 3 de março de 2016;1–5.
97. Creary LE, Ulug P, Menzel S, McKenzie CA, Hanchard NA, Taylor V, 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.* 2009;4(1):e4218.
98. Lewis CM, Knight J. Introduction to Genetic Association Studies. *Cold Spring Harb Protoc.* 1º de março de 2012;2012(3):pdb.top068163-pdb.top068163.
99. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinforma Oxf Engl.* 1º de agosto de 2006;22(15):1928–9.
100. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinforma Oxf Engl.* 15 de janeiro de 2005;21(2):263–5.
101. Belisário AR, Martins ML, Brito AMS, Rodrigues CV, Silva CM, Viana MB.  $\beta$ -Globin Gene Cluster Haplotypes in a Cohort of 221 Children with Sickle Cell Anemia or  $\beta$ 0

- Thalassemia and Their Association with Clinical and Hematological Features. *Acta Haematol.* 2010;124(3):162–70.
102. Xu J, Bauer DE, Kerenyi MA, Vo TD, Hou S, Hsu Y-J, et al. Corepressor-dependent silencing of fetal hemoglobin expression by BCL11A. *Proc Natl Acad Sci.* 16 de abril de 2013;110(16):6518–23.
  103. Xu J, Peng C, Sankaran VG, Shao Z, Esrick EB, Chong BG, et al. Correction of Sickle Cell Disease in Adult Mice by Interference with Fetal Hemoglobin Silencing. *Science.* 18 de novembro de 2011;334(6058):993–6.
  104. Esteghamat F, Gillemans N, Bilic I, van den Akker E, Cantù I, van Gent T, et al. Erythropoiesis and globin switching in compound Klf1:: Bcl11a mutant mice. *Blood.* 2013;121(13):2553–2562.
  105. Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(27):11346–11351.
  106. Stadhouders R, Thongjuea S, Andrieu-Soler C, Palstra R-J, Bryne JC, Van Den Heuvel A, et al. Dynamic long-range chromatin interactions control Myb proto-oncogene transcription during erythroid development. *EMBO J.* 2012;31(4):986–999.
  107. Wahlberg K, Jiang J, Rooks H, Jawaid K, Matsuda F, Yamaguchi M, et al. The HBS1L-MYB intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. *Blood.* 6 de agosto de 2009;114(6):1254–62.
  108. Zhou D, Liu K, Sun C-W, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and  $\gamma$ - to  $\beta$ -globin gene switching. *Nat Genet.* setembro de 2010;42(9):742–4.
  109. Bianchi E, Zini R, Salati S, Tenedini E, Norfo R, Tagliafico E, et al. c-myb supports erythropoiesis through the transactivation of KLF1 and LMO2 expression. *Blood.* 25 de novembro de 2010;116(22):e99-110.
  110. Arai M, Henneberg R, Nascimento AJ do, Arai JY, Silva PH da. RETICULOCITOGRAMA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E HEMOGLOBINOPATIA SC. *Publ UEPG Cienc Biol E Saude.* 21 de julho de 2011;17(1):53–8.
  111. Rezende PV, Santos MV, Campos GF, Vieira LLM, Souza MB, Belisário AR, et al. Clinical and hematological profile in a newborn cohort with hemoglobin SC. *J Pediatr (Rio J).* 29 de novembro de 2017;
  112. Trincherro A, Marchetti M, Giaccherini C, Tartari CJ, Russo L, Falanga A. Platelet haemostatic properties in  $\beta$ -thalassaemia: the effect of blood transfusion. *Blood Transfus.* setembro de 2017;15(5):413–21.

## 10 ANEXOS

### 10.1 Anexo 1: Protocolos de genotipagem para a identificação dos SNP's estudados

#### 10.1.1 SNPs em *BCL11A*

Como a localização dos SNP rs4671393 e rs7557939 é próxima (396 pb de distância), utilizou-se os mesmos iniciadores para amplificação de um fragmento de DNA que contém os dois polimorfismos.

Inicialmente, foi feita amplificação de fragmentos de DNA de 698 pb do gene *BCL11A*, flanqueados pelos iniciadores descritos na tabela 1, através da técnica de PCR. O volume final da reação foi 10µL. As concentrações finais dos reagentes da PCR foram: 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de dNTP's (dATP + dGTP + dTTP + dCTP), 10pmol de cada oligonucleotídeo sintético e 0,8 U de Platinum®Taq DNA Polymerase e tampão de enzima 1X. A amplificação foi realizada em termociclador (Veriti, AppliedBiosystems; Foster City, CA, USA ou T100 thermalcycler, Bio-Rad, California, USA), usando o seguinte programa de ciclagem: temperatura inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação da dupla fita, anelamento dos primers e extensão pela TaqDNApolimerase a 94°C/30 segundos, 64°C/30 segundos e 72°C/30 segundos, respectivamente, e extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

Para análise de RFLP do SNP rs7557939, utilizou-se a endonuclease de restrição *BlnI* (sequência de reconhecimento: GC<sup>A</sup>TNAGC). Foram adicionadas 2 U da enzima ao produto de PCR, além de tampão da enzima 1X. A mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora e a 65°C durante 15 minutos, para digestão dos fragmentos e inativação da enzima de restrição, respectivamente. Os produtos da RFLP foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, em cuba contendo o tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x e, posteriormente visualizados em transiluminador (Gel Doc™, XR+ com imageLab™ software, BIO-RAD) para interpretação dos resultados. Na presença do alelo A, não ocorre sítio de reconhecimento para essa enzima e o fragmento permanece com 698 pb. Já na presença do alelo G, essa enzima cliva esse fragmento de DNA, gerando dois fragmentos, sendo um de 568 pb e outro de 130 pb (figura 1).

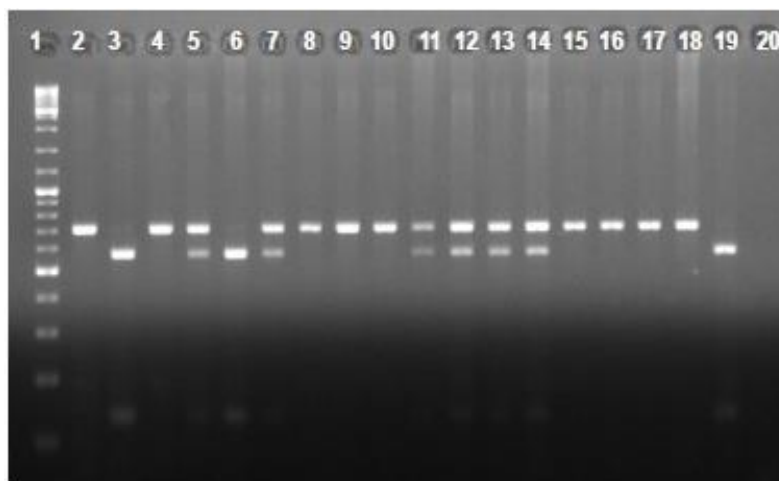


Figura 1: Fotografia de gel de agarose 2% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene de *BCL11A*, contendo o polimorfismo rs7557939. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular de 100 pb. Nas canaletas 2, 4, 8-10 e 15-18 foram aplicadas amostras de indivíduos com o genótipo AA; em 5,7,11-14 genótipo GA; nas 3 e 9 genótipo GG. A canaleta 20 corresponde ao controle negativo da PCR.

Para sequenciamento de rs4671393 foi feita a purificação do produto de PCR. Ao remanescente do produto da PCR foi adicionado 20  $\mu$ L de polietilenoglicol (PEG), em tubos de 0,5 ml. A mistura foi homogeneizada por pipetagens sucessivas e incubada a 37°C por 15 minutos em forno (*Vortemp 56, Labnet, Woodbridge, NJ*). As amostras foram centrifugadas em centrífugas a X por 15 minutos em centrífuga (*MiniSpin, Eppendorf, AG, Germany*). Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e duas etapas de lavagem foram realizadas, por meio da adição 125  $\mu$ L de etanol 80% durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente e as amostras foram centrifugadas com os tubos invertidos e abertos, de modo a retirar todo o etanol residual.

As amostras foram ressuspensas em 25  $\mu$ L de água morna (~37%) e aplicadas em gel de agarose 1% em cuba contendo TAE 1x à 90 volts durante 45 minutos. A visualização foi feita em transiluminador (*Gel Doc™, XR+ com imageLab™ software, BIO-RAD*) para quantificação do DNA.

Para cada amostra, 20 a 30 ng de DNA para cada 100pb, juntamente a 10 pmol do iniciador direto que flanqueia o fragmento amplificado em *HMIP2A* foram encaminhadas para reação de sequenciamento na empresa Myleus Biotechnology.

As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1 e a análise das sequências foi feita no software BioEditSequenceAlignment Editor versão 7.2.

A figura 2 mostra o eletroferograma gerado a partir das amostras sequenciadas e a identificação dos SNPs rs4671393.

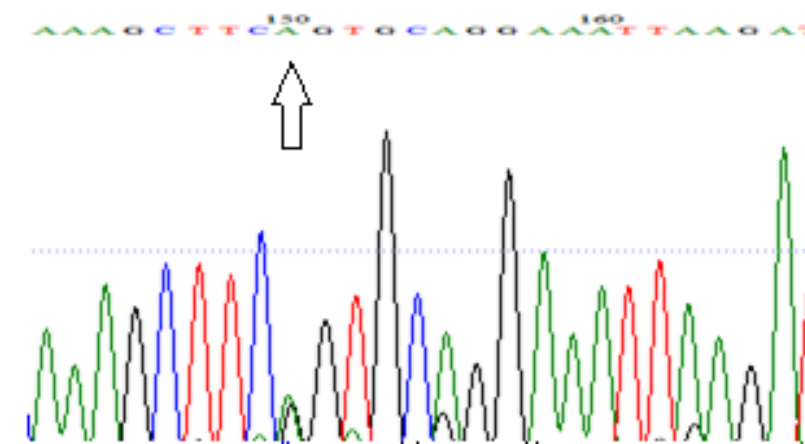


Figura 2: Eletroferograma correspondente ao sequenciamento de fragmento do gene *BCL11A* para identificação do SNP rs4671393. Neste exemplo, a sobreposição de picos indica heterozigose (GA).

Para amplificação do SNP rs7599488, fragmentos de 739 pb do gene *BCL11A* foram amplificados pela técnica de PCR. O volume final da reação foi 10 $\mu$ L. As concentrações finais dos reagentes da PCR foram: 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de dNTP's (dATP + dGTP + dTTP + dCTP), 10 $\mu$ mol de cada oligonucleotídeo sintético e 0,8 U de Platinum®Taq DNA Polymerase e tampão de enzima 1X. A amplificação foi realizada em termociclador (Veriti, AppliedBiosystems; Foster City, CA, USA ou T100 thermalcycler, Bio-Rad, California, USA), usando o seguinte programa de ciclagem: temperatura inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação da dupla fita, anelamento dos primers e extensão pela Taq DNA polimerase a 94°C/30 segundos, 65°C/30 segundos e 72°C/30 segundos, respectivamente, e extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

Posteriormente, para RFLP referente ao SNP rs7599488, utilizou-se a endonucleas e *FspI* (sequência de reconhecimento: TGC<sup>^</sup>GCA). Foram adicionadas 2 U da enzima ao produto de PCR, além do tampão da enzima 1X. A mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora e a 65°C durante 15 minutos, para digestão dos fragmentos e inativação da enzima de restrição, respectivamente. Os produtos da RFLP foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, em cuba contendo o tampão TAE 1x e, posteriormente visualizados em transiluminador (Gel DocTM, XR+ com imageLabTM software, BIO-RAD) para interpretação dos resultados. Na presença do alelo T, não ocorre sítio de reconhecimento para essa enzima e o



fragmento permanece com 739 pb. Já na presença do alelo C, essa enzima cliva esse fragmento de DNA, gerando dois fragmentos, sendo um de 607 pb e outro de 132 pb (figura 17).

Para genotipar o rs11886868, foi realizada PCR em tempo real com a “sonda” Taqman C\_3119894\_10, produzida pela Thermo Fisher Scientific. A reação foi feita a partir de 50 ng de DNA, 5 µL de Master Mix TaqMan® GTXpress™ Master Mix (2x) e 0,5 µL da “sonda” (20x). A reação de amplificação foi feita em um instrumento de PCR em Tempo real (modelo 7500, Applied Biosystems, CA, EUA) nos seguintes ciclos de temperatura: 60°C por 1 minuto e 95°C por 10 minutos, seguindo-se 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e uma etapa final de 60°C por 1 minuto. A figura 18 exemplifica os resultados correspondentes a 99 crianças genotipadas por essa técnica.

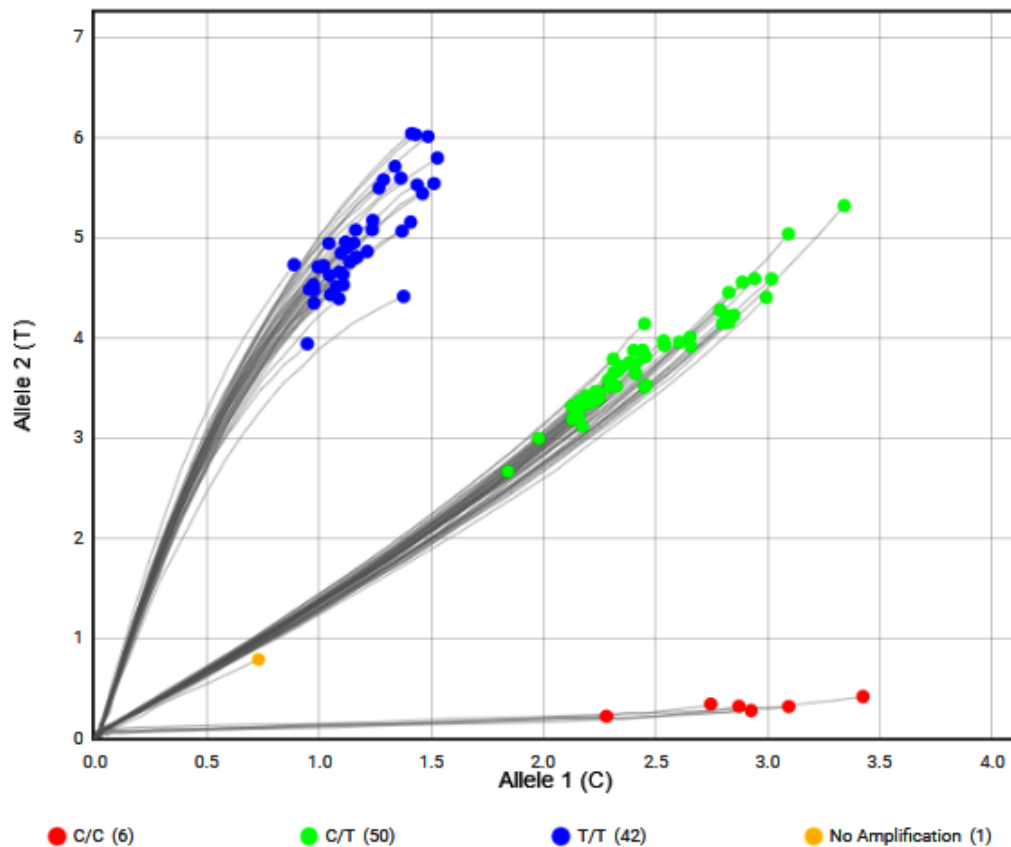


Figura 3: Gráfico gerado a partir da genotipagem do polimorfismo rs11886868, em BCL11A, em 99 crianças com anemia falciforme

### 10.1.2 SNPs em *HMIP2A*

Devido à proximidade (24 pb) dos SNPs rs9399137 e rs35786788, utilizou-se uma mesma reação de PCR e de sequenciamento para a genotipagem de ambos os polimorfismos.

Foi amplificado um fragmento de 477 pb, flanqueado pelos iniciadores descritos na tabela 1, no *loci HMIP 2A*. O volume final da reação foi 20µL e as concentrações finais dos reagentes da PCR foram: 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de dNTP's (dATP + dGTP + dTTP + dCTP), 10 de cada oligonucleotídeo sintético e 0,8 U de Platinum®Taq DNA Polymerase e tampão de enzima 1X. A amplificação foi realizada em termociclador (Veriti, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA ou T100 thermal cycler, Bio-Rad, California, USA), usando o seguinte programa de ciclagem: temperatura inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação da dupla fita, anelamento dos primers e extensão pela Taq DNA polimerase a 94°C/30 segundos, 64°C/30 segundos e 72°C/30 segundos, respectivamente, e extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

As figuras 4 e 5 mostram os eletroferogramas gerados a partir das amostras sequenciadas e a identificação dos SNP's rs9399137 e rs35786788.

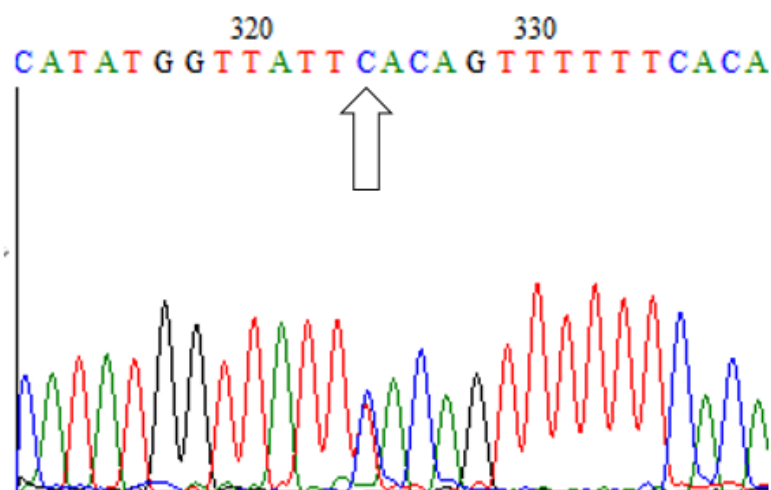


Figura 4: Eletroferograma correspondente ao sequenciamento de fragmento da região *HMIP2A* para identificação do rs9399137. Neste exemplo, a sobreposição de picos indica heterozigose (TC).

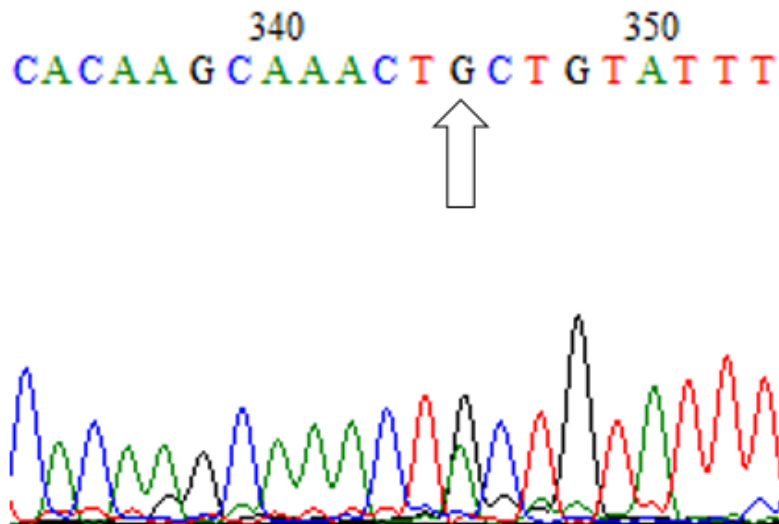


Figura 5: Eletroferograma correspondente ao sequenciamento de fragmento da região *HMIP2A* para identificação do rs35786788. Neste exemplo, a sobreposição de picos indica heterozigose (GA).

#### 10.1.3 SNPs em *HMIP2B*

Para genotipagem do SNP rs9402686, foi feita a amplificação de fragmentos de DNA de 470pbdo *loci HMIP 2B*, flanqueados pelos iniciadores descritos na tabela 1, através da técnica de PCR. O volume final da reação foi 10µL. As concentrações finais dos reagentes da PCR foram: 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de dNTP's (dATP + dGTP + dTTP + dCTP), 10µmol de cada oligonucleotídeo sintético e 0,8 U de Platinum®Taq DNA Polymerase e tampão de enzima 1X. A amplificação foi realizada em termociclador (Veriti, AppliedBiosystems; Foster City, CA, USA ou T100 thermalcycler, Bio-Rad, California, USA), usando o seguinte programa de ciclagem: temperatura inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação da dupla fita, anelamento dos primers e extensão pela TaqDNApolimerase a 94°C/30 segundos, 55°C/30 segundos e 72°C/30 segundos, respectivamente, e extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

Para análise de RFLP, utilizou-se a endonuclease de restrição *BsII* (sequência de reconhecimento: CCNNNNN^NNGG). Foram adicionadas 5 U da enzima ao produto de PCR, além de tampão da enzima 1X. A mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora e a 65°C durante 15 minutos, para digestão dos fragmentos e inativação da enzima de restrição, respectivamente. Os produtos da RFLP foram

submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, em cuba contendo o tampão TAE 1x e, posteriormente visualizados em transiluminador (Gel Doc™, XR+ com imageLab™ software, BIO-RAD) para interpretação dos resultados. Na presença do alelo A, não ocorre sítio de reconhecimento para essa enzima e o fragmento permanece com 470 pb. Já na presença do alelo G, essa enzima cliva esse fragmento de DNA, gerando dois fragmentos, sendo um de 270 pb e outro de 200 pb (figura 6).

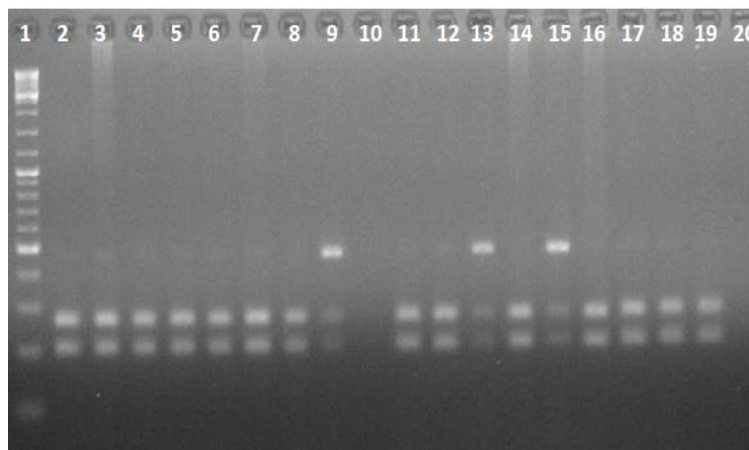


Figura 6: Fotografia de gel de agarose 2% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado da região intergênica *HMIP2B* para genotipagem do rs9402686. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular de 100 pb. Nas canaletas 9, 13 e 15 foram aplicadas amostras de indivíduos com o genótipo AG; nas demais, amostras de indivíduo GG. A canaleta 20 corresponde ao controle negativo da PCR.

Para genotipagem do SNP rs4895441, foi feita amplificação de fragmentos de DNA de 371pb do *loci HMIP 2B*, flanqueados pelos iniciadores descritos na tabela 1, através da técnica de PCR. O volume final da reação foi 10µL. As concentrações finais dos reagentes da PCR foram: 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de dNTP's (dATP + dGTP + dTTP + dCTP), 10pmol de cada oligonucleotídeo sintético e 0,8 U de Platinum®Taq DNA Polymerase e tampão de enzima 1X. A amplificação foi realizada em termociclador (*Verit Thermal Cycler 96well; Applied Biosystems*), usando o seguinte programa de ciclagem: temperatura inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação da dupla fita, anelamento dos primers e extensão pela Taq DNA polimerase a 94°C/30 segundos, 55°C/30 segundos e 72°C/30 segundos, respectivamente, e extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

Para análise de RFLP, utilizou-se a endonuclease de restrição *RsaI* (sequência de reconhecimento: GT<sup>^</sup>AC). Foram adicionadas 5 U da enzima ao produto de PCR, além de tampão da enzima 1X. A mistura foi incubada a 37°C

durante 1 hora e a 65°C durante 15 minutos, para digestão dos fragmentos e inativação da enzima de restrição, respectivamente. Os produtos da RFLP foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, em cuba contendo o tampão TAE 1x e, posteriormente visualizados em transiluminador (Gel Doc™, XR+ com imageLab™ software, BIO-RAD) para interpretação dos resultados. Na presença do alelo A, são gerados dois fragmentos, um de 207 pb e outro de 164 pb. Já na presença do alelo G, essa enzima cliva esse fragmento de DNA, gerando três fragmentos, de 207 pb, 162 pb e 62 pb (figura 7).

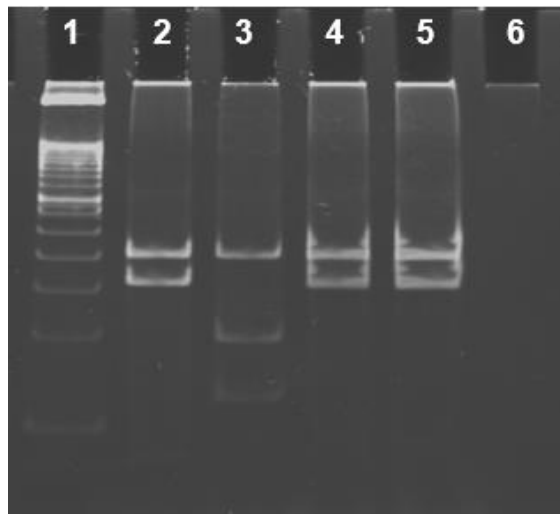


Figura 7: Fotografia de gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídeo, contendo fragmentos de DNA amplificados e restringidos de *HMIP2B* para identificação do polimorfismo rs4895441. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de 50 pb. As canaletas 2, 4 e 5 correspondem a amostras de paciente AA e a canaleta 3 GG. A canaleta 6 corresponde ao controle negativo da reação.

A genotipagem do polimorfismo rs9494145 foi feita por PCR em temp real, utilizando-se a “sonda” TaqMan\_C\_2737532\_10, produzida pela Thermo Fisher Scientific, com técnica semelhante à já descrita para o polimorfismo rs11886868 (ver no ítem 8.1.1). A figura 8 mostras os resultados de 91 crianças genotipadas com essa técnica.

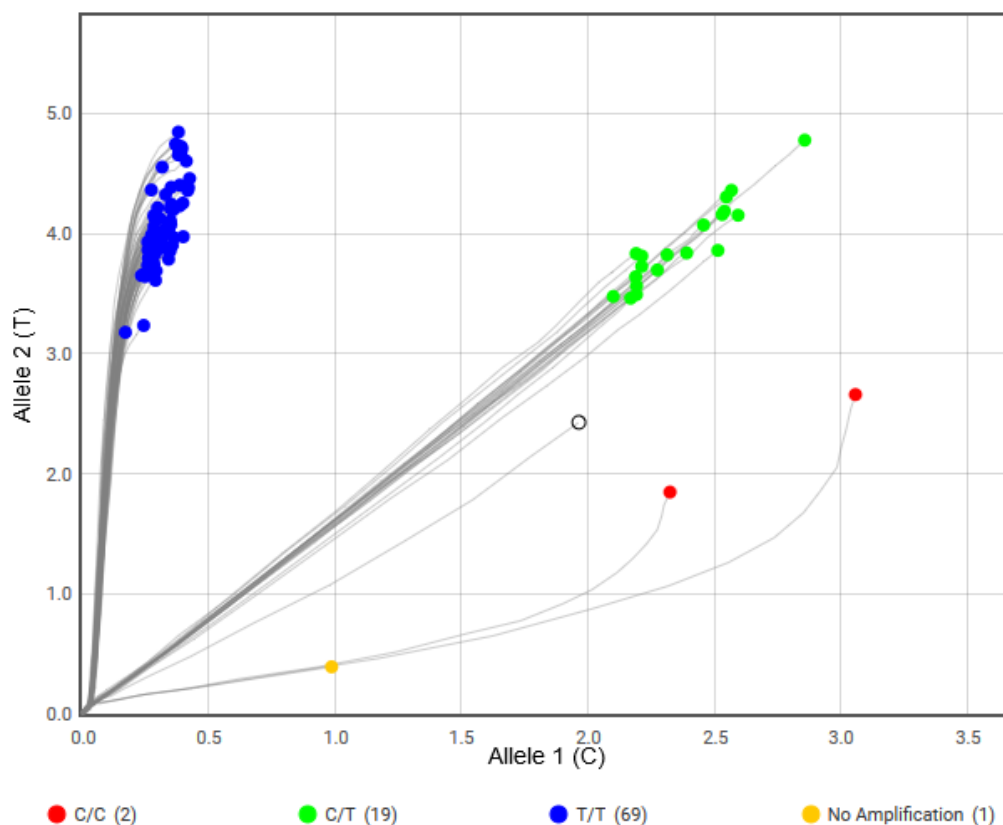


Figura 8: Gráfico gerado a partir da genotipagem do polimorfismo rs9494145, em HMIP, em 91 crianças com anemia falciforme

#### 10.1.4 SNP em *HBBP1*

Para rs10128556, foi feita a amplificação de fragmentos de DNA de 701 pb do *loci HBP1*, flanqueados pelos iniciadores descritos na tabela 1, através da técnica de PCR. O volume final da reação foi 20 $\mu$ L. As concentrações finais dos reagentes da PCR foram: 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de dNTP's (dATP + dGTP + dTTP + dCTP), 10pmol de cada oligonucleotídeo sintético e 0,8 U de Platinum®Taq DNA Polymerase e tampão de enzima 1X. A amplificação foi realizada em termociclador (Veriti, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA ou T100 thermalcycler, Bio-Rad, California, USA), usando o seguinte programa de ciclagem: temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação da dupla fita, anelamento dos primers e extensão pela TaqDNApolimerase a 94°C/45 segundos, 57°C/45 segundos e 72°C/45 segundos, respectivamente, e extensão final a 72°C/10 minutos.

Para análise de RFLP, utilizou-se a endonuclease de restrição *HincII* (sequência de reconhecimento: GTY<sup>^</sup>RAC). Foram adicionadas 10 U da enzima

produto de PCR, além de tampão da enzima 1X. A mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora e a 65°C durante 15 minutos, para digestão dos fragmentos e inativação da enzima de restrição, respectivamente. Os produtos da RFLP foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, em cuba contendo o tampão TAE 1x e, posteriormente visualizados em transiluminador (Gel Doc™, XR+ com imageLab™ software, BIO-RAD) para interpretação dos resultados. Na presença do alelo C, não ocorre sítio de reconhecimento para essa enzima e o fragmento permanece com 701 pb. Já na presença do alelo T, essa enzima cliva esse fragmento de DNA, gerando dois fragmentos, sendo um de 361pb e outro de 340pb (figura 9).

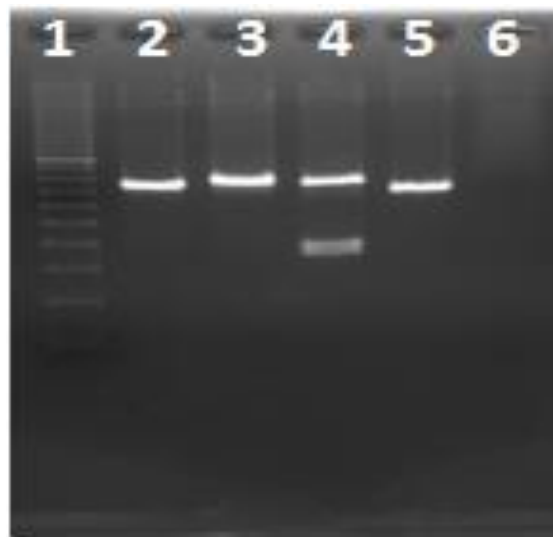


Figura 9: Fotografia de gel de agarose 2% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene *HBBP1* para genotipagem do rs10128556. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular de 100 pb. Nas canaletas 2, 3 e 5 foram aplicadas amostras de indivíduos com o genótipo CCe na canaleta 4 amostra de indivíduo CT. A canaleta 6 corresponde ao controle negativo da PCR.

## 10.2 Anexo 2: Banco de dados

**Anemia Falciforme - [Dados Gerais da Criança]**

Arquivo Editar Exibir Inserir Formatar Registros Ferramentas Janela Ajuda

MS Sans Serif 8

DADOS GERAIS DA CRIANÇA

Dados Gerais | História Neonatal | Óbito | Esplenectomia/TMO

Código do NUPAD: ACA/000306 N° prontuário Hemominas: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Nascimento: \_\_\_\_\_ Idade atual: (sem data de nascimento) \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_

Resultado PETN: \_\_\_\_\_ Eletroforese no Hemominas: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ UF: MG

Telefone: \_\_\_\_\_

Não comparecimentos à consulta: \_\_\_\_\_ 9

Data da 1ª consulta: 03/03/1999

Evolução	Crises Vaso-Oclusivas	Infecções	Doença Cérebro-Vascular	Seqüestros Esplênicos
Priapismos	Úlcera-Perna	Exames Hematológicos	Outros Exames	Exames de Imagem
Hidroxiúria (HU)	Reg. Hipertans. (HTX)	Sangrias	Interconsultas	Transfusões

Tabelas Importar Novas Crianças

Registro: 1 de 2153

Nome da criança \_\_\_\_\_ NUM \_\_\_\_\_

Windows Taskbar: Iniciar, (0 message...), Projeto mar..., Resumo HE..., Microsoft P..., Banco de D..., Doença Fal..., Dados Gera..., PT, 14:40

Figura 10: Imagem do banco de dados, onde são informatizados os dados dos prontuários médicos dos participantes da pesquisa.



**10.3 Anexo 3: Comprovante de Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas**



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**DECLARAÇÃO**

Belo Horizonte, 18 de março de 2016.

Declaro que o projeto de pesquisa **“Avaliação da modulação dos níveis de hemoglobina F em crianças com anemia falciforme triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas” (CAAE 42048215.6.0000.5118)**, coordenado pelo pesquisador Dr. André Rolim Belisário, foi **APROVADO** em 24/04/2015 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas.

Daniel Gonçalves Chaves  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Fundação Hemominas

Daniel Gonçalves Chaves

Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa  
Fundação Hemominas

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Alameda Ezequiel Dias, 321 – Santa Efigênia – Belo Horizonte – MG – CEP 30130-110  
e-mail: cep@hemominas.mg.gov.br – Tel: 3768-4587

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/12

**Título da Pesquisa:** Avaliação da modulação dos níveis de hemoglobina F em crianças com anemia falciforme triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas

A anemia falciforme é uma doença do sangue caracterizada pela presença de uma hemoglobina variante, a hemoglobina S. A hemoglobina S distorce as hemácias, que modificam sua forma de arredondada para forma de foice. Esse fenômeno é responsável pelas manifestações clínicas da anemia falciforme. A gravidade da anemia falciforme pode ser influenciada por características ambientais e genéticas.

A hemoglobina F é uma hemoglobina produzida pelo feto e recém-nascido até um a dois meses de vida, mas indivíduos com anemia falciforme podem produzi-la até a vida adulta. Na anemia falciforme, a presença dessa hemoglobina é capaz de impedir que a hemoglobina S distorça as hemácias, podendo tornar a doença menos grave. Muitos indivíduos com anemia falciforme possuem concentração aumentada de hemoglobina F e essa característica tem caráter hereditário. O nosso objetivo é estudar os fatores genéticos que influenciam os níveis de hemoglobina F na anemia falciforme e confirmar sua influência nas características clínicas e laboratoriais da doença. Os resultados podem auxiliar os médicos a identificar a conduta clínica mais adequada para cada paciente, além da possibilidade de gerar novos medicamentos para tratamento da doença.

É por isso que nós pedimos sua autorização para incluir seu (sua) filho (a) neste estudo. Caso você autorize, você não terá nenhum custo. Iremos colher um pouco de sangue da veia (5 ml) da criança para realização dos testes. A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas em alguns casos pode causar um hematoma (coloração roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, esta amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta. O material coletado ficará guardado no Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas e será usado para análises moleculares e celulares propostos na pesquisa. Será necessário também coletar dados no prontuário da criança, como, por exemplo, resultados de exames de sangue e informações clínicas.

Na divulgação dos resultados, o nome da criança não será mostrado, garantindo seu sigilo e sua privacidade. Também é importante esclarecer que você tem toda a liberdade para decidir se quer ou não autorizar a participação do seu (sua) filho (a) nesta pesquisa. Se você não autorizar, ele não será prejudicado no atendimento, e se desistir durante a pesquisa, não sofrerá nenhum prejuízo.

Caso você autorize, o material genético (DNA) recolhido para este estudo poderá ser usado pelos mesmos pesquisadores envolvidos nestas pesquisas em futuras investigações com objetivos semelhantes: investigar marcadores genéticos que podem ter influência nas manifestações clínicas da anemia falciforme. Nesse caso, a amostra da criança será conservada por um prazo máximo de dez anos. Durante todo o tempo de armazenamento, você tem o direito de conhecer os resultados obtidos nas pesquisas, além de poder retirar a autorização de armazenamento. Para isso, basta entrar em contato com os pesquisadores nos telefones fornecidos abaixo. Após o prazo máximo de dez anos ou até antes se os pesquisadores julgarem necessário, o material armazenado será descartado. Você pode

negar a permissão para o uso da amostra em estudos futuros, e ainda participar deste projeto. Se você autorizar o uso futuro da amostra da criança, qualquer novo estudo utilizando essa amostra deverá ser avaliado e autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação.

Qualquer dúvida que você tiver, fale com Rahyssa Rodrigues Sales, no telefone 3768-4569, ou com André Rolim Belisário, no telefone 3768-0548, nos horários de 8:00 às 17:00h.

Eu, \_\_\_\_\_, responsável pelo menor \_\_\_\_\_, após esclarecimentos, autorizo o pesquisador a incluí-lo(a) neste estudo.

---

**Assinatura do responsável**

**Data:**

**Rua:**

**Bairro:**

**Cidade:**

**CEP:**

**Telefone:**

**Quanto ao armazenamento de amostras, marque com um X no quadrado abaixo sua decisão:**

**Estou ciente das condições de armazenamento e aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.**

**NÃO aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.**

Assinatura do pesquisador:

\_\_\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pesquisadores responsáveis: Rahyssa Rodrigues Sales, André Rolim Belisário e Marcos Borato Viana.

**Serviço de Pesquisa – Fundação HEMOMINAS: 31-3768-4587**  
**Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas: 31-3768-4587**

**COEP/ UFMG – COMITÊ DE ETICA EM PESQUISA**

Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Unidade Administrativo II, 2º andar, sala 2005. CEP: 31.270-901 – BH – MG / TEL: 3409-4592 / [coep@prpq.ufmg](mailto:coep@prpq.ufmg)

## 10.5 Anexo 5: Termo de Assentimento

### TERMO DE ASSENTIMENTO

Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/12

**Título da Pesquisa:** Avaliação da modulação dos níveis de hemoglobina F em crianças com anemia falciforme triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas

Você está sendo convidado para participar de um projeto de pesquisa. Seus pais já permitiram sua participação. Participarão desta pesquisa, crianças e adolescentes que, assim como você, têm anemia falciforme.

A anemia falciforme é uma doença do sangue, caracterizada pela presença da hemoglobina S. A hemoglobina S muda a forma das hemácias, que ficam com a forma de foice. A forma de foice das hemácias provoca “incômodos” nas crianças com anemia falciforme. Nós já tivemos algumas pistas de que certa proteína (a hemoglobina fetal) presente no seu sangue ajuda a melhorar esses “incômodos” da doença. Queremos descobrir que quantidade dessa proteína deve estar presente no sangue para que isso aconteça. Sabemos que a quantidade dessa proteína no sangue é controlada pelo DNA. O DNA é muito importante para nós, pois possui a “receita” utilizada para formar todo o nosso corpo. Neste projeto queremos também investigar quais as “receitas” presentes no DNA são capazes de aumentar a quantidade dessa proteína no sangue.

Nós estamos pedindo sua permissão para utilizar um pouco do seu sangue nesta investigação. Daremos preferência para utilizar a amostra de sangue coletada para exames de rotina, ou seja, o sangue que você coleta para fazer os exames que o seu médico solicita. Se não for possível, iremos colher um pouco do seu sangue. A coleta de sangue será feita por uma pessoa treinada, mas em alguns casos pode causar um hematoma (coloração roxa) no braço. O material coletado ficará guardado no Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas e será usado em exames propostos na pesquisa. Será necessário também coletar alguns dados no seu prontuário, como, por exemplo, resultados de exames de sangue e informações de quando você teve os “incômodos” da doença.

Na divulgação dos resultados, o seu nome não será revelado, garantindo seu sigilo e sua privacidade. Também é importante esclarecer que você tem toda a liberdade para decidir se quer ou não autorizar sua participação nesta pesquisa. Se você não autorizar, você não será prejudicado no atendimento e, se desistir durante a pesquisa, não sofrerá nenhum prejuízo.

Caso você autorize, o material genético (DNA) colhido para este estudo poderá ser usado pelos mesmos pesquisadores envolvidos nestas pesquisas em outras pesquisas com objetivos semelhantes: investigar quais as receitas presentes no DNA são capazes de fazer com que os “incômodos” da doença falciforme sejam mais ou menos graves. Neste caso, a amostra será guardada por um prazo máximo de dez anos. Durante todo o tempo que a amostra ficar guardada, você tem o direito de conhecer os resultados obtidos nas pesquisas, além de poder retirar a autorização de armazenamento. Para isso, basta entrar em contato com os pesquisadores nos telefones fornecidos abaixo. Após o prazo máximo de dez anos ou até antes se os pesquisadores julgarem necessário, o material armazenado será descartado. Você pode negar a permissão para o uso da amostra em outros estudos e ainda assim participar deste projeto. Se você autorizar o uso da amostra em outros estudos, qualquer

novo estudo utilizando esta amostra deverá ser avaliado e autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação.

Qualquer dúvida que você tiver, fale com Rahyssa Rodrigues Sales, no telefone 3768-4569, ou com André Rolim Belisário, no telefone 3768-0548, nos horários de 8:00 às 17:00h.

Eu, \_\_\_\_\_, após esclarecimentos, autorizo o pesquisador a me incluir neste estudo.

---

**Assinatura do paciente menor de 18 anos**

Assinatura do pesquisador:

\_\_\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Quanto ao armazenamento de amostras, marque com um X no quadrado abaixo sua decisão:**

- Estou ciente das condições de armazenamento e aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.**
- NÃO aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.**

Pesquisadores responsáveis: Rahyssa Rodrigues Sales, André Rolim Belisário e Marcos Borato Viana.

<i>Serviço de Pesquisa – Fundação HEMOMINAS: 31-3768-4587</i> <i>Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas: 31-3768-4587</i>
---

COEP/ UFMG – COMITÊ DE ETICA EM PESQUISA
--

Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Unidade Administrativo II, 2º andar, sala 2005. CEP: 31.270-901 – BH – MG / TEL: 3409-4592 / <a href="mailto:coep@prpq.ufmg">coep@prpq.ufmg</a>
---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA FETAL EM CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME TRIADAS PELO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS E ACOMPANHADAS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS**

### **RAHYSSA RODRIGUES SALES**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Ciências da Saúde..

Aprovada em 29 de maio de 2017, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Marcos Borato Viana - Orientador  
UFMG

  
Dr. André Rolim Belisário - Coorientador  
HEMOMINAS

  
Prof.ª Ana Cristina Simões e Silva  
UFMG

  
Dr.ª Marina Lobato Martins  
HEMOMINAS

Belo Horizonte, 29 de maio de 2017.