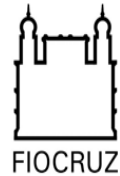




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Programa de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**POLIMORFISMOS NOS GENES UGT1A1 E BCL11A: RELAÇÃO COM FATORES
LABORATORIAIS E COM A RESPOSTA À HIDROXIUREIA EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME**

RIFKATH MARIE LAURENCE RAHIMY

Salvador - Bahia

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Patologia

**POLIMORFISMOS NOS GENES UGT1A1 E BCL11A: RELAÇÃO COM FATORES
LABORATORIAIS E COM A RESPOSTA À HIDROXIUREIA EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME**

RIFKATH MARIE LAURENCE RAHIMY

Orientadora: Dra. Dalila Lucíola Zanette

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia Humana
para a obtenção do grau de Mestre

Salvador - Bahia

2017

A meu príncipe Raphaël,
à minha família,
a meu noivo e sua família,
a todos os companheiros dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus o Pai todo-poderoso.

A minha mãe e meu pai pelo que me ensinaram, a meus irmãos e irmãs pelo seu apoio. O amor incondicional e carinho de todos vocês foi o que me sustentou nessa jornada.

A meu noivo pelo seu apoio, paciência e carinho, e a toda sua família.

A Professora Marilda de Souza Gonçalves por ter me aceitado na sua equipe de pesquisa, pelo que ela, com muito amor, paciência e dedicação nos ensina, e especialmente pelo carinho que ela me demonstrou. Muito obrigada Professora, pela confiança, atenção, e conselhos que permitiram o bom andamento do trabalho.

A minha orientadora, a Dra. Dalila Lucíola Zanette, mais do que uma orientadora, uma irmã, pessoa muito simples que me passou de forma clara e com muito amor e paciência os conhecimentos dela. Grata por acreditar em mim e ter aceitado a orientação deste trabalho, e tudo que fez para mim. Tenho aprendido muito com você.

À Msc. Corynne Stephanie Ahouefa Adanho, pela ajuda neste trabalho.

Aos Professores da banca, por aceitar em participar da avaliação deste trabalho. São muito bem-vindas a suas correções e sugestões para a melhoria do presente trabalho.

Aos Professores do PgPat, pelo ensino de ótima qualidade, conselhos e encorajamentos.

A todos os colegas do PgPat, e especialmente os da turma 2015.2.

A todos os do LHGB.

Ao pessoal da Plataforma de Sequenciamento do IGM/Fiocruz-Ba.

Ao pessoal da Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna do IGM/Fiocruz-Ba.

Ao pessoal do IGM/Fiocruz-Ba, pelo seu carinho e ajuda.

A todos os amigos do Brasil e de fora, pela sua amizade, apoio, carinho.

Aos pacientes do presente trabalho.

À Capes, pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

A todos e todas, muito obrigada!

RAHIMY, Rifkath Marie Laurence. Polimorfismos nos genes *UGT1A1* e *BCL11A*: Relação com fatores laboratoriais e com a resposta à hidroxiureia em pacientes pediátricos com anemia falciforme. 118 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os níveis séricos de bilirrubina encontram-se frequentemente aumentados em pacientes com anemia falciforme, já acometidos por hemólise exacerbada, favorecendo a agravação do quadro clínico e a ocorrência de litíases biliares. **OBJETIVO:** O objetivo foi analisar a influência do polimorfismo A(TA)_nTAA no promotor do gene *UGT1A1* (rs8175347) e de dois polimorfismos no gene *BCL11A* (rs1427407 e rs7606173), sobre alguns parâmetros laboratoriais e sobre a resposta à hidroxiureia em pacientes pediátricos com anemia falciforme. **MATERIAL E MÉTODOS:** Amostras de sangue total e soro foram utilizadas para a realização das análises hematológicas e bioquímicas. O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue periférico, e os fragmentos contendo os polimorfismos foram amplificados por PCR seguida de sequenciamento com primers específicos. **RESULTADOS:** Foram estudados 97 pacientes, com idade variando entre dois e 17 anos (7,433±4,075). Para o polimorfismo em *UGT1A1*, foram encontrados de cinco até oito repetições (TA) e as frequências do alelo selvagem (TA)₆ e do alelo mutante (TA)₇ foram respectivamente de 0,60 e 0,34. Quarenta pacientes (41,24%) eram homocigotos para o alelo (TA)₆, 33 heterocigotos (TA)_{6/7}, e 13 homocigotos (TA)_{7/7}. Os níveis de bilirrubina total e indireta foram significativamente maiores nos pacientes com sete ou mais repetições (TA), p=0,0038 e p=0,0022, respectivamente, em comparação aos homocigotos (TA)_{6/6} ou heterocigotos (TA)_{5/6} ou (TA)_{5/7}. Foi encontrada uma correlação negativa significativa entre os níveis de hemoglobina fetal e os níveis de bilirrubina total (r=-0,3782, p=0,0001) e de bilirrubina indireta (r=-0,3761, p=0,0015), sendo que para os indivíduos (TA)_{7/7} e (TA)_{7/8}, essa correlação deixou de ser válida (p>0,05), tanto para a bilirrubina total quanto para a bilirrubina indireta. Ademais, os níveis maiores de bilirrubina nos indivíduos (TA)_{7/7} e (TA)_{7/8} não estavam associados com o aumento dos níveis de marcadores de hemólise. A frequência do alelo mutante T do rs1427407 foi de 0,22 e a do alelo selvagem G do rs7606173 foi 0,57. Nenhum indivíduo com o genótipo mutante TT para o rs1427407 estava sob tratamento com hidroxiureia. Em indivíduos sem uso de hidroxiureia, o maior nível de hemoglobina fetal foi associado com o genótipo mutante TT. Já para o genótipo selvagem GG do rs7606173 ocorreu aumento de hemoglobina fetal, mas não foi significativo. Quanto aos níveis de bilirrubina, os homocigotos TT para o rs1427407 e GG para o rs7606173 apresentaram níveis menores. Além disso, o efeito dos polimorfismos em *BCL11A* sobre a bilirrubina pareceu superar o efeito do rs8175347 no grupo (TA)_{7/7} e (TA)_{7/8}. Não foi encontrada associação TT/CC, e também não foi encontrado nenhum mutante TT entre os portadores do haplótipo CAR/CAR. **Conclusões:** Este estudo confirmou a associação do alelo (TA)₇ a níveis elevados de bilirrubina, independentemente do grau de hemólise. O alelo mutante T do rs1427407 e o alelo ancestral G do rs7606173 são associados a níveis maiores de hemoglobina fetal e menores níveis de bilirrubina, sendo o efeito maior associado ao alelo T.

Palavras-chave: Anemia falciforme; UGT1A1, BCL11A, Hidroxiureia.

RAHIMY, Rifkath Marie Laurence. *UGT1A1* and *BCL11A* gene polymorphisms: laboratory parameters and response to hydroxyurea therapy in pediatric patients with sickle cell anemia. 118 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Serum bilirubin levels are frequently increased in patients with sickle cell anemia, who already are affected by exacerbated hemolysis, which worsens symptoms and especially favors the occurrence of pigment gallstones. **AIM:** The aim of the present study was to analyze the influence of the polymorphism A(TA)_nTAA in the *UGT1A1* gene promoter (rs8175347) and two polymorphisms in the *BCL11A* gene (rs1427407 and rs7606173), on some laboratory parameters and on the response to hydroxyurea in pediatric patients with sickle cell anemia. **MATERIAL AND METHODS:** Whole blood and serum samples were used to perform hematological and biochemical analysis. DNA was extracted from peripheral blood samples, and fragments containing the polymorphisms were amplified by Polymerase Chain Reaction followed by sequencing with specific primers. **RESULTS:** We studied 97 patients, ranging in age from 2 to 17 years (7.433±4.075). For the *UGT1A1* polymorphism, five to eight (TA) repeats were found and the wild-type (TA)₆ and mutant allele (TA)₇ frequencies were respectively 0.60 and 0.34. Forty patients (41.24%) were homozygous (TA)_{6/6}, 33 heterozygotes (TA)_{6/7}, and 13 homozygous (TA)_{7/7}. Total and unconjugated bilirubin levels were significantly higher in patients with seven or more (TA) repeats, p=0.0038 and p=0.0022, respectively, compared to homozygotes (TA)_{6/6} or heterozygotes (TA)_{5/6} or (TA)_{5/7}. A significant negative correlation was found between fetal hemoglobin levels and total bilirubin levels (r =-0.3782, p=0.0001) and unconjugated bilirubin levels (r =-0.3761, p=0.0015). This correlation was no longer valid (p> 0.05) for individuals (TA)_{7/7} and (TA)_{7/8}. In addition, the higher levels of bilirubin in (TA)_{7/7} and (TA)_{7/8} individuals were not associated with increased markers of markers of hemolysis. The frequency of the mutant allele G of rs1427407 was 0.22, and for the wild-type allele G of rs7606173, the frequency was 0.57. In individuals that were not using hydroxyurea, a significant higher fetal hemoglobin level was associated with the TT mutant genotype, while a non-significant increase occurred for the wild-type genotype GG of rs7606173. Subsequently, patients homozygous for the TT genotype of rs1427407 had significant lower levels of total and unconjugated bilirubin (p=0.0102 and p=0.0108, respectively). Furthermore, the effect of the *BCL11A* polymorphisms on bilirubin levels appeared to outweigh the effect of rs8175347 in the group (TA)_{7/7} and (TA)_{7/8}. No patient simultaneously carrying the homozygous mutant genotypes TT/CC was found; and no mutant homozygotes TT was found in patients with the CAR/CAR haplotype. **CONCLUSION:** This study confirmed that allele (TA)₇ is associated with elevated levels of bilirubin, regardless of the rate of hemolysis. The mutant allele T of rs1427407 and the ancestral allele G of rs7606173 are associated with higher levels of fetal hemoglobin and lower levels of bilirubin, the strongest effect being associated with the T allele.

Keywords: Sickle Cell Anemia; UGT1A1, BCL11A, Hydroxyurea.

LISTA DAS ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fisiopatologia da anemia falciforme (Adaptado de REES et al., 2010)	17
Figura 2. Exemplos dos perfis do polimorfismo no promotor do gene UGT1A1 no sequenciamento. 43	
Figura 3. Frequência dos genótipos dos haplótipos do gene da globina β^s	49
Figura 4. Frequência dos grupos genotípicos do polimorfismo no promotor do gene UGT1A1	55
Figura 5. Distribuição dos parâmetros laboratoriais nos diferentes grupos genotípicos de UGT1A1 ..	57
Figura 6. Níveis de bilirrubina nos diferentes grupos genotípicos em UGT1A1 em indivíduos em uso de HU	60
Figura 7. Correlação dos níveis séricos de bilirrubina com Hb, HbF, e LDH.....	68
Figura 8. Diferença dos níveis de HbF entre os genótipos dos polimorfismos rs1427407 e rs760617373	
Figura 9. Níveis séricos de bilirrubina total e bilirrubina indireta nos genótipos dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173	74
Figura 10. Diferenças dos níveis de HbF entre os genótipos dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173 nos diferentes grupos de haplótipos do gene da globina β^s	76
Figura 11. Níveis de HbF entre os genótipos dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173 de acordo com o uso de HU	78
Figura 12. Níveis de bilirrubina total e bilirrubina indireta dos genótipos dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173 de acordo com o uso de HU.....	80
Figura 13. Níveis de bilirrubina de bilirrubina nos genótipos dos rs1427407 e rs7606173 do grupo (TA) _{7/7} + (TA) _{7/8} em UGT1A1 nos pacientes sem uso de HU	81
Figura 14. Níveis de HbF dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173 nos diferentes haplótipos do gene da globina β^s em indivíduos sem uso de HU.....	82
Figura 15. Distribuição dos genótipos nos polimorfismos rs1427407 e 7606173 de acordo com os níveis de bilirrubina total nos diferentes haplótipos nos indivíduos sem uso de HU.	83
Figura 16. Associações genotípicas entre o SNP rs1427407 e o SNP rs7606173.....	85
Figura 17. Distribuição das associações genotípicas nos diferentes grupos de haplótipos do gene da globina β^s	86
Figura 18. Níveis de HbF e de bilirrubina das diferentes associações genotípicas em indivíduos sem uso de HU.....	87

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1. Descrição dos polimorfismos investigados e métodos utilizados.....	40
Tabela 2. Condições das reações de PCR.....	41
Tabela 3. Características laboratoriais dos pacientes de acordo com o uso de hidroxiureia	47
Tabela 4. Distribuição dos parâmetros de acordo com a faixa etária	48
Tabela 5. Distribuição dos parâmetros de acordo com os haplótipos do gene da globina β^S	49
Tabela 6. Distribuição dos parâmetros nos haplótipos do gene da globina β^S de acordo com o tratamento com HU	50
Tabela 7. Distribuição dos parâmetros de acordo dos pacientes com o número de deleções $\alpha_2^{\text{del}3,7\text{kb}}$..	52
Tabela 8. Distribuição dos parâmetros de acordo com o número de deleções $\alpha_2^{\text{del}3,7\text{kb}}$ em pacientes sem uso e com uso de HU.....	53
Tabela 9. Frequência dos genótipos do polimorfismo no promotor do gene UGT1A1	54
Tabela 10. Frequências alélicas do polimorfismo no promotor do gene UGT1A1	54
Tabela 11. Grupos genotípicos e alélicos do polimorfismo no promotor do gene UGT1A1 de acordo com o uso de HU	55
Tabela 12. Distribuição dos parâmetros nos diferentes grupos genotípicos de UGT1A1 de acordo com uso de HU (1)	58
Tabela 13. Distribuição dos parâmetros nos diferentes grupos genotípicos de UGT1A1 de acordo com uso de HU (2)	59
Tabela 14. Distribuição dos genótipos do polimorfismo no promotor de UGT1A1 de acordo com os quartis de níveis de bilirrubina	61
Tabela 15. Distribuição dos alelos do polimorfismo no promotor do gene UGT1A1 em função dos quartis dos níveis de bilirrubina sérica	62
Tabela 16. Distribuição dos genótipos dos haplótipos do gene da globina β^S acordo com os quartis dos valores da bilirrubina.....	63
Tabela 17. Distribuição dos alelos dos haplótipos do gene da globina β^S acordo com os quartis dos valores da bilirrubina.....	63
Tabela 18. Associação entre os níveis de bilirrubina e os haplótipos do gene da globina β^S nos grupos genotípicos de risco	64
Tabela 19. Associação da talassemia alfa com os níveis da bilirrubina	64
Tabela 20. Associação entre os níveis de bilirrubina e o número de deleções $\alpha_2^{3,7\text{kb}}$ nos grupos genotípicos de risco	65
Tabela 21. Distribuição dos parâmetros laboratoriais de acordo com a ocorrência de litíase biliar	65

Tabela 22. Distribuição dos grupos genotípicos e dos alelos em UGT1A1 de acordo com a ocorrência de litíase.....	66
Tabela 23. Correlação dos níveis de bilirrubina total e de bilirrubina indireta com os parâmetros clínicos e laboratoriais.....	67
Tabela 24. Correlação dentro dos grupos de polimorfismos no promotor do gene UGT1A1 entre os níveis de HbF e de bilirrubina.	68
Tabela 25. Correlação dentro dos grupos de polimorfismos no promotor do gene UGT1A1 entre os níveis de HbF e de LDH.....	69
Tabela 26. Correlação dentro dos grupos de haplótipos do gene da globina β^S entre níveis de HbF e os de bilirrubina.	69
Tabela 27. Distribuição dos valores da bilirrubina e da hemoglobina fetal de acordo com os grupos de genótipos em UGT1A1 no homocigotos BEN/BEN.....	70
Tabela 28. Correlação entre os níveis de HbF e de bilirrubina nos diferentes grupos de genótipos em UGT1A1 nos homocigotos BEN/BEN.....	70
Tabela 29. Análise de regressão linear multivariada entre os níveis de bilirrubina e os parâmetros clínicos e laboratoriais.....	71
Tabela 30. Frequência dos genótipos nos polimorfismos em BCL11A.....	72
Tabela 31. Frequência alélica dos polimorfismos em BCL11A.....	72
Tabela 32. Distribuição dos genótipos dos rs1427407 e rs7606173 de acordo com o uso de HU.....	77
Tabela 33. Distribuição dos alelos dos rs1427407 e rs7606173 de acordo com o uso de HU.....	77
Tabela 34. Distribuição dos alelos dos polimorfismos no gene BCL11A de acordo com os níveis de bilirrubina total nos pacientes sem uso de HU.....	84
Tabela 35. Distribuição dos alelos dos polimorfismos no gene BCL11A de acordo com os níveis de HbF nos pacientes sem uso de HU.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AF	anemia falciforme
AVC	acidente vascular cerebral
BEN	haplótipo de tipo Benin
BCL11A	<i>B-cell Lymphoma/Leukemia 11A</i>
CAR	haplótipo de tipo Republica Centrafricana
CEP	comitê de ética em pesquisa
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DF	doença falciforme
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GWAS	<i>Genome wide association study</i>
Hb	hemoglobina
HbA	hemoglobina A
HbF	hemoglobina Fetal
HbS	hemoglobina S
HBB	gene da globina beta
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i>
HCM	hemoglobina corpuscular média
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
HTLV	<i>Human T-Lymphotropic Virus</i>
HU	hidroxiureia
LDH	desidrogenase láctica
NO	óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
P-CR	proteína C-reativa
PCR	reação em cadeia da polimerase
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SEN	haplótipo de tipo Senegal

SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
STA	Síndrome Torácica Aguda
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UGT1A1	Uridine difosfato glucuronosiltransferase família 1 membro A1
VCM	volume corpuscular médio
A	alfa
B	beta
y	gama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME.....	16
1.1.1	Papel dos reticulócitos	17
1.1.2	Papel dos leucócitos e das plaquetas e ativação do endotélio vascular.....	18
1.1.3	Alterações do metabolismo do óxido nítrico e estresse oxidativo	19
1.2	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	19
1.3	EVOLUÇÃO.....	21
1.4	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E PREVALÊNCIA.....	21
1.5	FATORES MODIFICADORES DA EXPRESSÃO FENOTÍPICA DA ANEMIA FALCIFORME	22
1.5.1	A co-herança da talassemia alfa.....	23
1.5.2	Níveis de hemoglobina fetal	24
1.5.3	Haplótipos do gene da globina β^S	25
1.5.4	Polimorfismos no gene <i>BCL11A</i>	26
1.5.5	Polimorfismos no promotor do gene <i>UGT1A1</i>	27
1.6	TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME	28
1.6.1	Terapia não farmacológica.....	28
1.6.2	Farmacoterapia.....	29
1.6.3	Hidroxiureia	29
1.6.4	L-Glutamina.....	31
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	DESENHO DO ESTUDO	37
4.1.1	Dados utilizados.....	37

4.1.1.1	Dados clínicos	37
4.1.1.2	Coleta de material biológico	38
4.1.1.3	Análises hematológicas e bioquímicas	38
4.1.1.4	Extração de DNA	38
4.1.1.5	Detecção da talassemia alfa	38
4.1.1.6	Determinações dos haplótipos do gene da globina β^S	39
4.1.2	Seleção dos pacientes.....	39
4.1.3	Determinação de polimorfismo no promotor do gene <i>UGT1A1</i> e no gene <i>BCL11A</i>	39
4.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4.3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	44
5	RESULTADOS	46
5.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	46
5.1.1	Características clínicas e laboratoriais	46
5.1.2	Haplótipos do gene da globina β^S	48
5.1.3	Talassemia alfa.....	51
5.2	ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM <i>UGT1A1</i>	54
5.2.1	Genótipos e alelos dos polimorfismos no promotor do gene <i>UGT1A1</i>	54
5.2.2	Distribuição dos genótipos de <i>UGT1A1</i> de acordo com o uso de HU	55
5.2.3	Distribuição dos parâmetros clínicos e laboratoriais de acordo com o grupo genotípico de <i>UGT1A1</i>	56
5.2.4	Distribuição do polimorfismo no promotor do gene <i>UGT1A1</i> de acordo com os níveis de bilirrubina.....	60
5.2.5	Distribuição dos haplótipos do gene da globina β^S de acordo com níveis de bilirrubina nos grupos de genótipos de <i>UGT1A1</i>	62
5.2.6	Associação entre a talassemia alfa e os níveis de bilirrubina nos grupos de genótipos de <i>UGT1A1</i>	64
5.3	ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE ACORDO COM A OCORRÊNCIA DE LITÍASES 65	
5.3.1	Análise dos parâmetros laboratoriais de acordo com a ocorrência de litíases	65
5.3.2	Distribuição do polimorfismo de <i>UGT1A1</i> de acordo com a ocorrência de litíases	66

5.4	ANÁLISES DE CORRELAÇÃO E DE REGRESSÃO	66
5.4.1	Análises de correlação entre os níveis de bilirrubina sérica e os parâmetros clínicos e laboratoriais.....	66
5.4.2	Análise de regressão linear multivariada entre os níveis de bilirrubina sérica e os parâmetros clínicos e laboratoriais	71
5.5	POLIMORFISMOS EM <i>BCL11A</i>	71
5.5.1	Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos em <i>BCL11A</i>	71
5.5.2	Associação entre os níveis de hemoglobina fetal e os polimorfismos em <i>BCL11A</i>	73
5.5.3	Associação entre os níveis séricos de bilirrubina e os polimorfismos em <i>BCL11A</i>	73
5.5.4	Associação entre os níveis de hemoglobina fetal e os polimorfismos em <i>BCL11A</i> nos haplótipos do gene da globina β^S	75
5.5.5	Distribuição dos polimorfismos de <i>BCL11A</i> de acordo com o uso de HU	77
5.5.6	Associação entre os níveis de hemoglobina fetal e os polimorfismos em <i>BCL11A</i> de acordo com o uso de HU.....	78
5.5.7	Associação entre os níveis séricos de bilirrubina e os polimorfismos em <i>BCL11A</i> de acordo com o uso de HU.....	79
5.5.8	Níveis de bilirrubina nos genótipos dos rs1427407 e rs7606173 do grupo (TA) _{7/7} + (TA) _{7/8} em <i>UGT1A1</i> nos pacientes sem uso de HU	80
5.5.9	Associação entre os níveis de HbF e os genótipos dos polimorfismos em <i>BCL11A</i> nos diferentes haplótipos do gene da globina β^S em indivíduos sem uso de HU	81
5.5.10	Distribuição dos polimorfismos em <i>BCL11A</i> de acordo com os níveis séricos de bilirrubina nos diferentes grupos de haplótipos do gene da globina β^S	83
5.5.12	Associações genotípicas entre os polimorfismos em <i>BCL11A</i>	85
6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÕES	102
8	REFERÊNCIAS	103
	ANEXOS	112

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME

A doença falciforme (DF) é um conjunto de distúrbios genéticos resultantes da presença de uma forma mutante de hemoglobina, a hemoglobina S (HbS). Esse termo se refere à anemia falciforme (AF) e suas variantes (REES *et al.*, 2010). Herrick (1910) descreveu pela primeira vez a AF, que é a forma mais comum de DF. A AF é uma doença genética com um padrão de herança autossômico recessivo, caracterizada pela homozigose do alelo beta S (β^S), com produção de hemoglobina S (HbS) em substituição à hemoglobina A (HbA). A produção da HbS é decorrente de uma troca de uma base adenina por uma timina (GAG>GTG) no sexto códon do gene da globina beta (*HBB*), e como consequência ocorre uma substituição do ácido glutâmico (aminoácido polar) pela valina (aminoácido apolar) na sexta posição da cadeia polipeptídica beta (BUNN, 1997). Em situações de desoxigenação, essa troca para um aminoácido hidrofóbico leva ao acoplamento entre duas cadeias β de duas moléculas de hemoglobina (Hb) e formação de um polímero que vai crescendo de forma proporcional à desoxigenação e à quantidade de HbS, preenche o eritrócito, altera sua arquitetura, compromete sua flexibilidade, promove desidratação e gera estresse oxidativo celular (BRITTENHAM *et al.*, 1985). A HbS polimerizada interfere na bomba de Ca^{2+} , responsável pela manutenção da integridade da membrana, diminuindo a sua eficiência (BUNN *et al.*, 1997). A polimerização da HbS altera a conformação bicôncava normal das hemácias, que adquirem o formato de foice (drepanócito), tornando-se mais rígidas e frágeis, e mais susceptíveis à hemólise (CALDAS *et al.*, 2010; FELIX *et al.*, 2010; PROENÇA-FERREIRA *et al.*, 2014). As hemácias falcizadas têm sobrevida média reduzida (16 a 20 dias), em relação às hemácias normais (80 a 120 dias) (SERJEANT, 1997).

As manifestações da AF ocorrem por meio de dois principais mecanismos (Figura 1), a vasooclusão com danos de isquemia-reperfusão, e a hemólise (REES *et al.*, 2010). A vasooclusão é o resultado da interação dinâmica entre os eritrócitos e também as demais células sanguíneas, com o endotélio vascular, com subsequente hipóxia. Os fenômenos vasooclusivos diminuem o aporte de oxigênio aos órgãos e sustentam, em um círculo vicioso, a falcização das hemácias. À restauração do fluxo sanguíneo, ocorrem danos de isquemia-reperfusão, aumentando o comprometimento a órgãos. Os ciclos de isquemia e de reperfusão causam estresse oxidativo e inflamatório, com ativação de moléculas de adesão e aumento da expressão de citocinas, recrutamento e ativação de leucócitos (FRENETTE, 2002).

A hemólise é responsável pela anemia, que acarreta prejuízo ao funcionamento dos órgãos, e evidências da contribuição da hemólise crônica ao desenvolvimento de vasculopatia progressiva e outras manifestações clínicas foram demonstradas (KATO *et al.*, 2007).

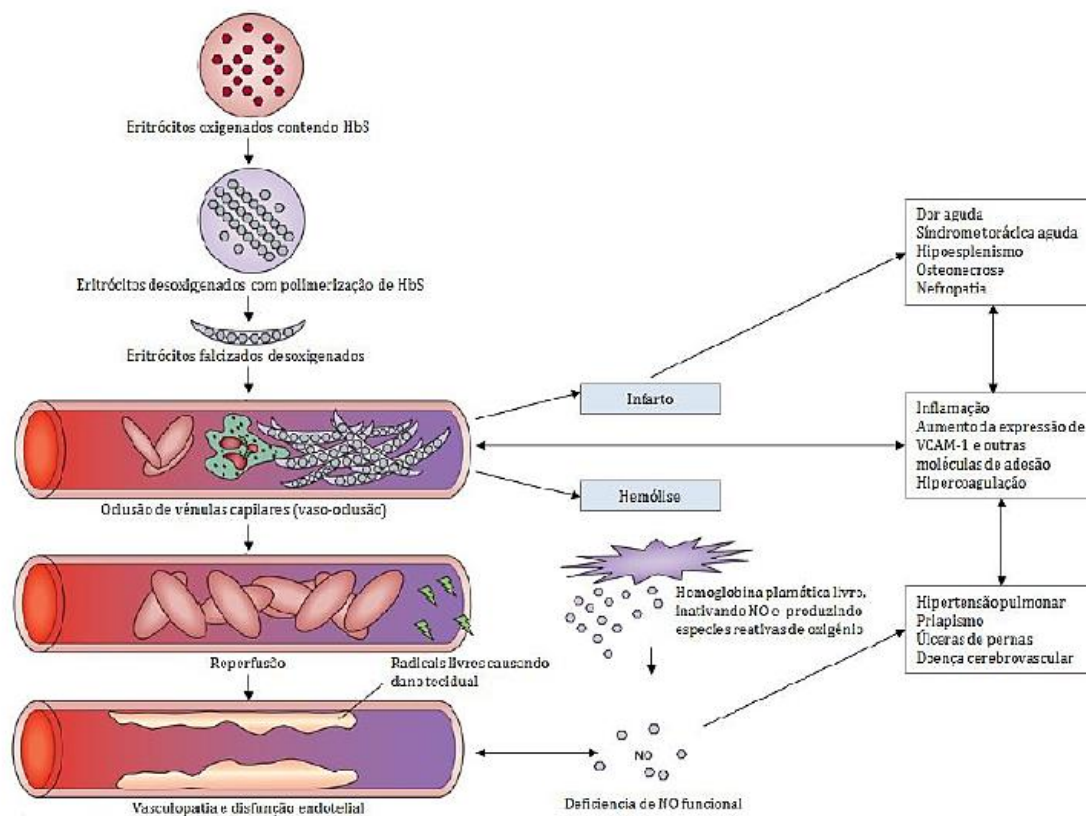


Figura 1. Fisiopatologia da anemia falciforme (Adaptado de REES *et al.*, 2010)

1.1.1 Papel dos reticulócitos

Em resposta à anemia hemolítica crônica, há uma hiperatividade medular, com a liberação de reticulócitos de estresse na circulação periférica (MOHANDAS *et al.*, 1984; HEBBEL, 1997). Estes reticulócitos são jovens e expressam moléculas de adesão presentes na superfície de células progenitoras eritróides na medula óssea, e que normalmente desapareceriam durante o processo de maturação da linhagem eritróide, não sendo expressas na superfície de eritrócitos maduros. A expressão anormal destas proteínas nos reticulócitos jovens circulantes resulta na adesão destas células e de outras células circulantes entre si e ao endotélio vascular, promovendo os fenômenos de vasoclusão (ODIÈVRE *et al.*, 2011). O CD36 é um receptor que se liga a uma variedade de proteínas extracelulares expressas em precursores

eritróides da medula cuja expressão desaparece progressivamente durante a maturação das células, estando ausente em eritrócitos maduros. O CD36 é expresso em porcentagem anormalmente elevada nas hemácias falciformes circulantes. Estudos têm demonstrado que a trombospondina derivada de plaquetas ativadas medeia a adesão do receptor CD36 dos reticulócitos falciformes às células endoteliais vasculares. O CD36 e sua interação com a trombospondina, portanto, são um potencial mecanismo pelo qual os receptores de adesão das células falciformes podem contribuir para a vasooclusão. Assim como o CD36, a expressão de *very late activation antigen-4* (VLA-4) é perdida durante a maturação das hemácias que na circulação normalmente não expressam este receptor. Swerlick *et al.* (1993) e Joneckis *et al.* (1993) demonstraram que a expressão do VLA-4 é elevada nos reticulócitos falciformes circulantes. Os ligantes para o VLA-4 incluem a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a proteína da matriz extracelular, a fibronectina. A presença de VLA-4 nos reticulócitos falciformes é consistente com achados que demonstraram que estes reticulócitos exibem maior grau de aderência ao endotélio vascular. A VCAM-1 é expressa no endotélio vascular e é exposta a reticulócitos falciformes circulantes que expressam VLA-4 proporcionando assim um mecanismo adicional pelo qual as hemácias falcizadas podem aderir ao endotélio (ELION *et al.*, 2004; HEBBEL, 2008; SOLOVEY *et al.*, 1997). Estudos mostraram que a expressão de CD36 e VLA-4 é reduzida nos reticulócitos de pacientes com AF tratados com hidroxiureia, o que pode ser uma forma de monitorar os benefícios terapêuticos. No entanto, a não-existência hereditária do receptor CD36 não alterou as manifestações da AF, diminuindo assim o valor da adesão das hemácias como biomarcador (LEE *et al.*, 2001). A contagem de reticulócitos, como um biomarcador de hemólise, correlaciona-se bem com o tempo de vida das hemácias. No entanto, não está claro se ela fornece qualquer informação adicional sobre valores totais de Hb (HEBBEL *et al.*, 2011).

1.1.2 Papel dos leucócitos e das plaquetas e ativação do endotélio vascular

O aumento da contagem de leucócitos e sua ativação são importantes mediadores da inflamação na doença falciforme. Os leucócitos podem aderir uns aos outros e aos eritrócitos falciformes ou normais, às plaquetas e ao endotélio vascular. Inflamação recorrente e citocinas inflamatórias aumentam a capacidade de adesão dos leucócitos. Essa adesão de leucócitos a outros elementos figurados do sangue e ao endotélio vascular são importantes na patogênese dos episódios vasooclusivos da doença falciforme (CHIANG; FRENETTE, 2005). Ao aderir ao endotélio vascular, os leucócitos reduzem o lúmen do vaso, diminuindo assim o fluxo

sanguíneo. Por causa de seu grande tamanho, os leucócitos reduzem ainda mais o lúmen vascular que eritrócitos (FRENETTE; ATWEH, 2007). As plaquetas ativadas também expressam moléculas de adesão que promovem a adesão entre as células sanguíneas e o endotélio (BRITTAIN *et al.*, 1993; KAUL *et al.*, 1995; VILLAGRA *et al.*, 2007). O endotélio vascular é ativado por hipóxia, infecções e citocinas inflamatórias, pela reologia anormal e pela presença de células aderentes. Estes estímulos ativam leucócitos que por sua vez ativam o endotélio vascular, em uma espécie de círculo vicioso. Esta dupla ativação endotelial e de leucócitos leva a uma expressão muito maior de moléculas de adesão, o que contribui ainda mais para a obstrução do lúmen do vaso (FRENETTE, 2004; OKPALA, 2006; REES *et al.*, 2010; SCHMID-SCHONBEIN, 1993).

1.1.3 Alterações do metabolismo do óxido nítrico e estresse oxidativo

A regulação do tônus vascular é função do equilíbrio entre mediadores produzidos pelo endotélio vascular, com ação vaso-constritiva, e o óxido nítrico (NO), potente vasodilatador. Na AF, os níveis de NO são baixos, especialmente durante os episódios vasooclusivos, e isso favorece a redução do fluxo sanguíneo. A Hb é um potente *scavenger* (coletor) do NO. A Hb livre é capaz de destruir o NO, diminuindo assim sua biodisponibilidade, e também de reagir com o NO levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS do termo inglês *reactive oxygen species*). Ademais, a hemólise libera a arginase na corrente sanguínea, que degrada a L-arginina, substrato da enzima endotelial eNOS para a produção de NO (KATO *et al.*, 2007; MORRIS *et al.*, 2005; REITER; GLADWIN, 2003). O ferro do heme livre também participa da produção de ROS, cuja elevação influencia o processo vasooclusivo, por meio de um aumento das propriedades adesivas dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas ao endotélio (CHAVES *et al.*, 2008). A produção elevada de ROS é comum em indivíduos com hemoglobinopatias, quando comparados com os indivíduos sem estas alterações (TORRES *et al.*, 2012).

1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A expressão fenotípica da AF é altamente variável, com alguns indivíduos tendo uma vida normal e poucas complicações, até casos em que ocorrem numerosas complicações com expectativa de vida reduzida. A AF cursa com uma anemia hemolítica crônica, complicações agudas e crônicas (OHENE-FREMPONG; STEINBERG, 2001). Os fatores desencadeantes das complicações agudas na maioria das vezes estão associados a hipóxia e falcização das hemácias

(SERJEANT, 1997). A ocorrência de complicações agudas é favorecida pela desidratação, diminuição da oxigenação como ocorre em altitudes elevadas, infecção pulmonar, crise de asma, ou até por eventos menores como resfriado comum, roupas muito apertadas, exposição ao frio. Podem também ocorrer devido a esforços físicos importantes e/ou incomuns, cansaço importante, tomada de tóxicos como álcool, drogas, gravidez, o estresse, infecção bacteriana, parasitária ou viral (TEWARI *et al.*, 2015).

As complicações agudas, que constituem emergências de intervenção necessitando tratamento imediato, são principalmente as seguintes:

- Episódios vasooclusivos dolorosos, consequência da falcização das hemácias, corresponde ao acúmulo de hemácias, leucócitos e plaquetas que bloqueiam a microcirculação sanguínea, ocasionando obstrução vascular e isquemia tissular. Ela se manifesta por dores agudas principalmente ósseas nos membros e no abdome (PLATT *et al.*, 1991);
- Anemia aguda (piora da anemia) que pode ser devido a infecção intercorrente parasitária ou viral, ou também a um sequestro esplênico (EMOND *et al.*, 1985);
- Síndrome torácica aguda (STA), complicação frequente e causa de mortalidade elevada. Diferentes mecanismos inter-relacionados estão envolvidos na patogênese da STA: hipoventilação alveolar (que pode ser induzida pela morfina no tratamento da dor), vasooclusão pulmonar ou no esterno, ocasionando dor e hipoventilação, que por sua vez resulta em hipóxia. A hipóxia agrava a patologia, em um círculo vicioso. A STA pode também ocorrer por causa de embolia gordurosa ou de infecção (GLADWIN; VICHINSKY, 2008).
- Priapismo, ereção dolorosa e prolongada (acima de quatro horas), que ocorre na ausência de atividade ou desejo sexual. Na AF, o tipo mais descrito é o priapismo isquêmico, devido a vasooclusão no pênis (BRODERICK, 2012; MILLER *et al.*, 1995);
- Acidentes vascular cerebral (AVC) e outras complicações neurológicas (BALKARAN *et al.*, 1992);
- Diminuição súbita da acuidade visual devido a uma vasooclusão na retina (SERJEANT, 1997);
- Infecções graves que são muito frequentes em indivíduos com AF, principalmente nos cinco primeiros anos de vida, favorecidas por distúrbios na imunidade celular e disfunção esplênica, com maior susceptibilidade aos estreptococos (BOOTH *et al.*, 2010).

A expectativa de vida dos pacientes com AF aumenta com o aprimoramento do manejo da doença e com as medidas preventivas. As complicações crônicas são as sequelas dos episódios vasooclusivos agudos não percebidos ou tratados inadequadamente e/ou complicações da anemia crônica. Podem afetar o sistema cardiovascular (hipertrofia do

ventrículo direito, cardiomiopatia dilatada, insuficiência cardíaca, vasculopatias), o fígado (litíases biliares, consequência da hemólise crônica), a retina (retinopatia proliferativa), o rim (atrofia renal, microalbuminúria e proteinúria, insuficiência renal), o baço (asplenismo funcional), o cérebro (infarto silencioso, doença cerebrovascular oclusiva crônica, distúrbios de memória, déficit neuropsicológico com dificuldade de aprendizagem, atraso escolar), a coluna vertebral (vertebras em H, cifose ou escoliose), os membros (dores crônicas, osteonecrose principalmente da cabeça do fêmur e do úmero), o pulmão (hipertensão arterial pulmonar, síndrome restritiva), úlceras cutâneas que podem ser recorrentes, incapacitantes e refratárias ao tratamento, fibrose cavernosa e impotência sexual, sequelas de priapismo (MILLER *et al.*, 1995). Existe também a possibilidade de complicações ligadas ao tratamento medicamentoso como toxicidade medular medicamentosa (HANFT *et al.*, 2000; KOVACIC, 2011; LATAGLIATA *et al.*, 2012). As complicações crônicas são geralmente silenciosas, portanto devem ser sistematicamente rastreadas através de protocolos específicos pré-estabelecidos.

1.3 EVOLUÇÃO

A evolução da AF em si é altamente variável entre os indivíduos acometidos, pela diferença fenotípica aliada a fatores genéticos e ambientais. Alguns terão poucas complicações, enquanto outros terão danos graves a órgãos. A mortalidade e a morbidade relacionada à AF tende a regredir principalmente nos países desenvolvidos. A AF apresenta um curso melhor quando os pais, pacientes, médicos e profissionais de saúde em geral, implementam um cuidado adequado.

1.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E PREVALÊNCIA

A doença falciforme é uma doença hereditária com elevada prevalência mundial (TORRES *et al.*, 2012), sendo a doença genética mais comum no mundo, com 250.000 recém-nascidos acometidos anualmente (SILVA *et al.*, 2006). Cerca de 5,2% da população mundial é portadora de uma variante da hemoglobina (HbS, HbC, HbE, HbD, β talassemia, α^0 talassemia) e cerca de 2,28% de crianças nascem com doença falciforme (SS, SC, S/ β talassemia) (MODELL; DARLINSON, 2008). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que, mundialmente, 300.000 a 400.000 crianças nascidas vivas apresentam o genótipo HbSS (BANDEIRA *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2010) e a maior prevalência ocorre nas populações com ascendência africana. O alelo β^S está amplamente distribuído em toda a África,

parte da Ásia, península Arábica, América e parte do sul da Europa. No continente africano, a frequência do alelo β^S é mais elevada em países como a Nigéria, Gana, Gabão e Zaire, com 10 a 40 % de portadores, frequência maior que a descrita na Itália, Grécia, Oriente médio e na Índia (CHIKEZIE *et al.*, 2011; FOLSHADE; OMEREGIE, 2013). Nos Estados Unidos da América, aproximadamente 75.000 indivíduos são portadores da DF (FRANCESCHI *et al.*, 2011). A prevalência de indivíduos com DF na população afro-americana é de um a cada 500 recém-nascidos; enquanto na população hispano-americana, a doença é encontrada na razão de um a cada 1.000 a 4.000 recém-nascidos (GONÇALVES *et al.*, 2003). Na Europa, entre 20.000 a 25.000 indivíduos apresentam alguma forma de hemoglobinopatia (FRANCESCHI *et al.*, 2011).

No Brasil, a AF é a doença hereditária monogênica mais prevalente e constitui um importante problema de saúde pública (CALDAS *et al.*, 2010; RAMALHO *et al.*, 2008). Segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal do Ministério da Saúde brasileiro, nascem anualmente no Brasil aproximadamente 3.500 crianças com AF (SILVA-PINTO *et al.*, 2013) e 200.000 heterozigotos para o alelo β^S (HbAS) (FELIX *et al.*, 2010). As regiões sudeste e nordeste apresentam as maiores frequências de indivíduos heterozigotos HbAS, bem como incidência elevada da DF (BANDEIRA *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2010). A população do estado da Bahia, possui a incidência mais elevada da DF no Brasil, apresentando a razão de 1:650 nascidos vivos com a doença, principalmente devido à grande contribuição genética africana (BRASIL. Ministério da Saúde. 2012; JESUS *et al.*, 2010). Em Salvador, a frequência de nascidos vivos que apresentam algum tipo de hemoglobina variante é de 17,4%, sendo descrito que aproximadamente 9,8% desses possuem o genótipo HbAS, 0,9% possuem heterozigose dupla para as hemoglobinas S e C, constituindo os indivíduos HbSC e 0,2% possuem a AF (CALDAS *et al.*, 2010).

1.5 FATORES MODIFICADORES DA EXPRESSÃO FENOTÍPICA DA ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme é uma das doenças monogênicas humanas mais bem caracterizadas. Apesar de ser uma doença genética mendeliana típica, existe uma heterogeneidade fenotípica substancial entre os pacientes com AF (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; REES *et al.*, 2010; STEINBERG, 2009), fazendo com que a expressão clínica se assemelhe a um traço multigênico. Isto sugere que variações em outros genes, assim como influências ambientais (SERJEANT, 1997), sejam capazes de modular o fenótipo da anemia falciforme.

O desenvolvimento da biologia molecular permitiu a identificação de vários polimorfismos genéticos que estão relacionados com a diversidade clínica na AF. A descrição de moduladores genéticos, como a co-herança de talassemia alfa, as variações nos níveis de HbF (SILVA *et al.*, 2013; STEINBERG, 2009) e os haplótipos do gene da globina β^S (PAGNIER *et al.*, 1984; SHIMAUTI *et al.*, 2015), foi seguida por estudos envolvendo polimorfismos em um único nucleotídeo (SNP do termo inglês *single nucleotide polymorphism*) com risco variável para manifestações tais como hiperbilirrubinemia, AVC, úlcera de pernas, hipertensão pulmonar, priapismo, osteonecrose, entre outros, e com diferenças nos níveis de HbF, resposta à hidroxíureia, e variabilidade na ocorrência de dor.

1.5.1 A co-herança da talassemia alfa

A heterogeneidade clínica notável característica da AF pode ser em parte o resultado de suas interações com a talassemia alfa.

No genoma humano há dois loci alfa em cada cromossomo 16, sendo um total de quatro alelos alfa, codificando para a cadeia alfa das globinas. A talassemia alfa é um distúrbio genético da hemoglobina no qual ocorre a deleção de um ou mais alelos do gene que codifica a globina alfa (GONÇALVES, 2014). Os genótipos podem ser $\alpha\text{-}\alpha\alpha$ (portador silencioso), $\alpha\text{-}/\alpha\text{-}$ (traço α -talassêmico *in trans*) ou: $\alpha\alpha\text{-}/\text{-}$ (traço α -talassêmico *in cis*), ou $\alpha\text{-}/\text{-}$ (Hb H). A deleção dos quatro alelos alfa ($\text{-}/\text{-}/\text{-}/\text{-}$) ou Hb Bart, é letal desde do estágio fetal ou pouco depois do nascimento; a cadeia alfa é obrigatoriamente necessária para a formação de todas as hemoglobinas humanas. Foram descritos dois tipos de deleções, a deleção -3,7kb que é a mais comum no Brasil (Wagner *et al.*, 2010) e a deleção -4,2kb. A consequência é um defeito quantitativo na produção da cadeia, com subsequentes quantidades menores de hemoglobinas, diminuição da concentração de hemoglobina corpuscular média (CMHC) e do volume corpuscular médio (VCM) dos eritrócitos, caracterizando uma microcitose e uma hipocromia respectivamente.

Tanto a Hb β^S quanto a talassemia alfa são muito comuns em áreas tropicais. Cerca de um terço dos pacientes com AF tem herança concomitante da talassemia alfa, sendo a maioria a homozigose ou heterozigose para a deleção $\text{-}\alpha^{3,7\text{kb}}$ (DAMANHOURI *et al.*, 2015; STEINBERG; EMBURY, 1986). A talassemia alfa reduz a concentração de hemoglobina em cada eritrócito, diminuído assim a quantidade de HbS e as probabilidades de polimerização, o que resulta em uma diminuição da taxa de hemólise e um aumento da Hb total. A redução do tamanho celular e da concentração de HbS são suscetíveis de alterar a dinâmica do processo de

falcização, permitindo que células deformadas, porém menores, atravessassem melhor a microcirculação. Os efeitos da talassemia alfa são variáveis nos indivíduos com AF, mas de forma geral benéficos, com redução da ocorrência de AVC (BERNAUDIN *et al.*, 2009), litíase biliar (VASVADA *et al.*, 2007), úlcera de perna (HIGGS *et al.*, 1982), priapismo (NOLAN *et al.*, 2005). No entanto, foi observada uma tendência ao aumento da frequência de episódios de dor, provavelmente devido à viscosidade e ao hematócrito elevados associados à talassemia alfa (GILL *et al.*, 1995; GONÇALVES, 2014; STEINBERG *et al.* 1984). Foi também descrito um aumento da ocorrência de osteonecrose (MILNER *et al.*, 1993). Em indivíduos com o haplótipo Bantu, a talassemia alfa foi associada a uma diminuição do risco de falência de órgãos (POWARS, 1991; 1994). Essas alterações ligadas a herança concomitante de talassemia alfa são mais pronunciadas em homozigotos para a talassemia alfa do que em heterozigotos (STEINBERG, 2009).

1.5.2 Níveis de hemoglobina fetal

A hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$), cuja cadeia γ é codificada pelos genes *HBG2* e *HBG1*, é a forma de hemoglobina predominante durante a vida fetal e durante os seis primeiros meses após o nascimento. A HbF difere da hemoglobina adulta por ter maior afinidade com o oxigênio, proporcionando assim ao feto em crescimento um melhor acesso ao oxigênio da corrente sanguínea da mãe (DAMANHOURI *et al.*, 2015). Após o sexto mês, acontece uma troca na expressão das globinas e a expressão da cadeia γ começa a diminuir e ser gradualmente substituída pela cadeia β . Na idade adulta, em indivíduos saudáveis, a hemoglobina fetal (HbF) existe apenas sob forma de traço, com uma porcentagem variando entre 1 e 3% do total das hemoglobinas, enquanto a hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$) é a hemoglobina predominante, com mais de 96% do total. As manifestações clínicas da AF aparecem principalmente após os seis primeiros meses de vida, quando a concentração de hemoglobina fetal (HbF) começa a diminuir para aproximar-se aos níveis normais do adulto ($\leq 2,0\%$) (CHARACHE, 1990; DAVIS, 1976; POWARS, 1984).

A produção da HbF está limitada a uma certa categoria de células da linhagem eritrocitária, as células F. A taxa de HbF na AF é o resultado da porcentagem de células F, da quantidade de HbF por célula F, e da sobrevivência preferencial das células F em comparação com as células não-F (CHARACHE, 1990; LABIE *et al.*, 1991).

Existem dados que relacionaram os níveis de HbF ao gênero, devido ao controle da porcentagem de células F por um determinante genético que estaria localizado no cromossomo X (DOVER *et al.*, 1992; LABIE *et al.*, 1991; STEINBERG, 1995).

A concentração de HbF e a sua distribuição nos eritrócitos é o maior fator genético modulador da AF (STEINBERG, 2009). Concentrações intracelulares importantes de HbF não apenas diluem a quantidade de HbS, mas também, de forma importante, inibem a polimerização da HbS. A HbF se incorpora ao polímero SS, e inibe a polimerização por meio da formação de um híbrido assimétrico entre a cadeia γ da HbF e a cadeia β^S da HbS ($\alpha 2\gamma\beta^S$) que apresenta afinidade elevada pelo oxigênio. Assim, concentrações elevadas de HbF em indivíduos com AF estão relacionadas a melhores parâmetros clínicos e laboratoriais, com redução significativa da ocorrência de eventos vasooclusivos dolorosos, de episódios de síndrome torácica aguda e redução da mortalidade precoce (WARE, 2002). Essa propriedade da HbF não é compartilhada pelas HbA, HbC, HbE, HbO árabes, que modificam a gravidade da AF apenas pela diluição da quantidade intracelular de HbS. No entanto, o nível de HbF é geneticamente modulado e varia consideravelmente entre os indivíduos com AF. A expressão de HbF é regulada por interações complexas entre fatores genéticos e epigenéticos, proporcionando assim oportunidades para a modulação do nível de HbF na anemia falciforme (STEINBERG, 2009).

1.5.3 Haplótipos do gene da globina β^S

Demonstrou-se que o nível de produção de HbF na mutação β^S pode estar ligado aos haplótipos do gene da globina β^S . Há cinco haplótipos distintos, conhecidos até agora, associados à mutação β^S : Benin (BEN), Bantu ou República Centro Africana (CAR), Senegal (SEN), Camarões (CAM) e Árabe-indian. Esta denominação foi feita de acordo com a região geográfica em que foram identificados pela primeira vez e origem étnica dos indivíduos investigados (ADORNO *et al.*, 2008; SHIMAUTI *et al.*, 2015). O haplótipo do tipo Benin (BEN) teve sua origem na região Centro-Oeste da África, o do tipo Bantu (CAR) na África Oriental e Centro-Sul, o tipo Senegal (SEN) na África Ocidental, o tipo Arábia Saudita e Índia no subcontinente indiano e na península árabe oriental, e o tipo Camarões foi descrito ao longo da costa oeste da África (GONÇALVES *et al.*, 2003). Os haplótipos SEN e Árabe-indian foram associados a um nível de HbF acima de 15%, evolução clínica menos grave da doença e poucos danos aos órgãos. Os níveis elevados de HbF nesse haplótipo têm sido associados com o polimorfismo C>T na posição -158 XmnI da região promotora do gene da HBG2 (STEINBERG, 2009). No entanto, há uma considerável variabilidade nos níveis de HbF nos

portadores deste SNP, sugerindo que estão presentes elementos moduladores adicionais. O haplótipo CAR, associado a concentrações baixas de HbF (<5%), é descrito com um curso clínico mais grave da doença e uma elevada incidência de danos a órgãos. O haplótipo BEN, com concentrações de HbF entre 5% e 15% foi associado com uma gravidade intermediária (SHIMAUTI *et al.*, 2015). Muitos estudos têm sido realizados para tentar estabelecer uma relação entre os haplótipos do gene β^S e o fenótipo da doença. Estas associações haplótipo-fenótipo não são definitivamente estabelecidas, porque existe uma heterogeneidade considerável dentro de qualquer haplótipo, e nenhuma correlação clara emergiu até a presente data.

1.5.4 Polimorfismos no gene *BCL11A*

Os polimorfismos no gene *B-cell lymphoma/leukemia 11A* (*BCL11A*), localizado no cromossomo 2 humano, são conhecidos por influenciar os níveis de HbF. O gene *BCL11A* codifica um fator de transcrição cuja função não foi ainda completamente esclarecida. Esse fator de transcrição que foi primeiramente descrito em associação com neoplasias linfoides, é hoje também conhecido como um modificador genético da produção de HbF. O *BCL11A* interage com outros fatores de transcrição da linhagem eritróide, silenciando a expressão do gene da globina gama (CHAOUH *et al.*, 2016; UPADHYE *et al.*, 2015). Estudos demonstraram que o *BCL11A* é um importante repressor da expressão da HbF (JAWAID *et al.*, 2010; SANKARAN *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2010), e que a expressão do gene *BCL11A* está inversamente correlacionada à expressão do gene da globina gama nas células eritróides em diferentes estágios de desenvolvimento (SANKARAN *et al.*, 2008). A diminuição transitória ou persistente da expressão do *BCL11A* foi associada a uma importante indução da expressão do gene da globina gama e a níveis aumentados de HbF em precursores eritróides de adultos (SANKARAN *et al.*, 2008). Ademais, estudos *Genome Wide Association Studies* (GWAS) mostraram uma associação significativa entre o gene *BCL11A* e a persistência hereditária da HbF (GALARNEAU *et al.*, 2010; MENZEL *et al.*, 2007; UDA *et al.*, 2008). Os polimorfismos no gene *BCL11A* são associados a variações nos níveis de HbF e podem determinar a taxa basal de HbF sem qualquer estimulação farmacológica, além de afetar a resposta à terapia. A variante mutante do polimorfismo rs1427407 em *BCL11A* foi associada a níveis aumentados de HbF (BAUER *et al.*, 2013), redução da hemólise (SHEEHAN *et al.*, 2013), e melhora das complicações relacionadas à AF (LETTRE *et al.*, 2008). Outro polimorfismo de interesse é o rs7606173. Existem poucos relatos sobre seus efeitos, porém Bhatnagar *et al.* (2011) mostraram

que o rs7606173 estava fortemente associado à regulação de células F, o alelo ancestral G estando associado a uma maior proporção de células F.

1.5.5 Polimorfismos no promotor do gene *UGT1A1*

Os polimorfismos no gene que codifica a enzima hepática uridina difosfoglucuronosiltransferase 1 família A1 (*UGT1A1*) também podem afetar a expressão fenotípica da AF. A enzima *UGT1A1* é a principal responsável pela conjugação da bilirrubina livre ou indireta (RITTER *et al.*, 1992). Esta enzima foi também associada com metabolismo de drogas e resposta a tratamento com algumas drogas (MACKENZIE *et al.*, 2000). Variações genéticas em *UGT1A1* são conhecidas por causar condições tais como a síndrome de Gilbert e hiperbilirrubinemia. Durante a hemólise, o heme é transformado em biliverdina, e depois em bilirrubina. A função da enzima *UGT1A1* é a adição de um radical diglucuronosil à bilirrubina indireta, transformando-a em bilirrubina direta ou conjugada, o que a torna hidrossolúvel, possibilitando a sua devida depuração. A bilirrubina assim conjugada, ou bilirrubina direta, entra no intestino, onde, sob a ação de enzimas bacterianas, é transformada em estercobilinogênio e urobilinogênio. O urobilinogênio faz um ciclo entero-hepático antes de ser excretado na urina sob a forma de urobilina. Já o estercobilinogênio é excretado nas fezes sob forma de estercobilina, que as colore. Em casos de diminuição da atividade enzimática, há uma falha na glucuroconjugação, o que leva ao acúmulo de bilirrubina indireta, favorecendo a aparição ou a persistência de icterícia. A síndrome de Gilbert foi descrita como uma icterícia associada à deficiência na atividade da enzima *UGT1A1*, devido geralmente a uma mutação de tipo inserção de um par de bases timina-adenina (TA) no elemento *TATA-box* do promotor do gene *UGT1A1*. O promotor normal de *UGT1A1* apresenta a sequência A(TA)_nTAA com seis repetições do tandem (TA). Em caso de polimorfismo, um número variável de repetições altera o comprimento da sequência do elemento *TATA-box*, sitio de ligação para o fator de transcrição IID (MONAGHAN *et al.*, 1996). Foram descritos casos de sete e oito repetições TA, e também casos de cinco repetições TA, e uma relação inversa foi proposta entre o número de repetições no promotor do gene *UGT1A1* e a eficiência transcricional (BEUTLER *et al.*, 1998).

A destruição exagerada dos eritrócitos na AF leva a uma hiperbilirrubinemia. Assim, os indivíduos com um número de repetições maior do que seis têm uma atividade enzimática reduzida, com tendência a níveis mais elevados de bilirrubina indireta, icterícia e maior propensão à formação de litíases biliares em pacientes falciformes que já são acometidos por hemólise exacerbada e altas taxas de bilirrubina indireta. Já os pacientes com menos de seis

repetições foram descritos como tendo níveis de bilirrubina mais baixos, devido à expressão aumentada do gene e à maior atividade da enzima, com menor risco de litíase biliar. Chaar *et al.* (2005) classificaram os pacientes com AF em três grupos de risco para a litíase biliar de acordo com o seu genótipo de *UGT1A1*, sendo os seguintes: grupo 1 [homozigoto (TA)_{6/6} e heterozigoto com pelo menos um alelo (TA)₅], grupo 2 [heterozigoto (TA)_{6/7} e (TA)_{6/8}], e grupo 3 [homozigotos (TA)_{7/7} e heterozigotos (TA)_{7/8}], respetivamente associados a níveis baixos, intermediários e altos de bilirrubina não conjugada.

A litíase biliar pode causar dor abdominal às vezes confundida com evento vasooclusivo, e dependendo da gravidade, podem levar o paciente à colecistectomia (SCHUBERT *et al.*, 1986). Steinberg *et al.* (2009) demonstraram que as crianças com DF tiveram um nível médio mais elevado de bilirrubina se possuíam o genótipo (TA)_{7/7} de *UGT1A1*, em comparação com os genótipos (TA)_{6/6} ou (TA)_{6/7}. Além disso os pacientes com o genótipo (TA)_{7/7} foram descritos como mais propensos a realizar colecistectomia, sugerindo que a litíase biliar sintomática é mais comum em portadores deste genótipo (FERTRIN *et al.*, 2003, PASSON *et al.*, 2001). Estudos mostraram que este polimorfismo de *UGT1A1* supera o efeito da talassemia alfa sobre a gênese de litíase biliar, embora a talassemia alfa esteja associada a uma redução modesta da hemólise (ADEKILE *et al.*, 2005; CHAAR *et al.*, 2006; EMBURY *et al.*, 1982; HAIDER *et al.*, 1998; HIGGS *et al.*, 1982; PASSON *et al.*, 2001).

1.6 TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME

Os objetivos do tratamento na AF são o controle dos sintomas e o manejo das complicações da doença. As estratégias de tratamento incluem a gestão da crise vasooclusiva, o tratamento das síndromes de dor crônica, o manejo da anemia hemolítica crônica, a prevenção e o tratamento das infecções, das complicações e das diversas síndromes de danos a órgãos associadas, a prevenção do AVC, a detecção e tratamento da hipertensão pulmonar. O tratamento pode combinar abordagens variadas.

1.6.1 Terapia não farmacológica

A terapia não-farmacológica inclui entre outros as transfusões de concentrado de hemácias, com ou sem troca transfusional, para casos de anemia súbita e grave, devido a sequestro esplênico agudo, infecção por Parvovírus B19 ou crises hiperhemolíticas. O uso de transfusão permite a correção da anemia, a redução da concentração em HbS e portanto da

hemólise (REES *et al.*, 2010). As transfusões crônicas podem acarretar sobrecarga de ferro, necessitando o uso de quelantes do ferro (VICHINSKY *et al.*, 2007; WOOD *et al.*, 2004).

A possibilidade de curar os pacientes com apresentação clínica grave por transplante de células-tronco hematopoéticas surgiu a partir do trabalho de Johnson *et al.* (1984). Em alguns casos, o transplante de células-tronco hematopoéticas foi curativo (BERNAUDIN *et al.*, 2007; VERMYLEN *et al.*, 1998). No entanto, o uso deste tratamento é limitado pela falta de doadores compatíveis, pelo risco de complicações a curto e longo prazo e pela falta de infraestrutura adequada para a realização e o acompanhamento do processo, especialmente nos países em desenvolvimento, que são justamente os que possuem prevalência elevada da AF (WALTERS, 2015).

A terapia gênica está sendo desenvolvida, sendo que Ribeil *et al.* (2017) descreveram seu primeiro caso de paciente com AF tratado com adição mediada por vetor lentiviral de um gene anti-falcizante de β -globina em células-tronco hematopoéticas autólogas. O nível desta β -globina anti-falcizante terapêutica permaneceu elevado 15 meses após tratamento, sem recorrência de crises de falcização e com correção das características biológicas da doença.

1.6.2 Farmacoterapia

O tratamento preventivo e das complicações pode ser feito com os seguintes medicamentos: antimetabólitos (Hidroxiureia), analgésicos opióides ou não-opióides, antibióticos, vacinas, vitamina B9 ou ácido fólico, e tratamentos mais específicos.

1.6.3 Hidroxiureia

Muitas drogas citotóxicas são capazes de aumentar a HbF e portanto, teriam um benefício potencial para os indivíduos com AF. A hidroxiureia, droga aprovada para o tratamento da AF, é capaz de reduzir a morbidade e mortalidade na DF, sem ocasionar muitos efeitos tóxicos, além de ter a facilidade da administração por via oral (PLATT *et al.*, 1984). Sugere-se atualmente que um conjunto de mecanismos de ação ocasionem não somente o aumento dos níveis de HbF, mas também outros efeitos benéficos em pacientes com AF tais como o aumento da concentração de Hb, diminuição da contagem dos leucócitos e das plaquetas, modificação da expressão de moléculas de adesão, geração de óxido nítrico (AGRAWAL *et al.*, 2014; CARTRON; ELION, 2008). A hidroxiureia (HU) altera a cinética da proliferação eritrocítica, aumentando a produção de células com maior conteúdo de HbF

através da ativação da expressão dos genes da globina gama e aumenta a produção de óxido nítrico (LOU *et al.*, 2009). Estes efeitos levam à diminuição da vasooclusão e dos sintomas, menor gravidade da hemólise e portanto, menor mortalidade (PLATT *et al.*, 2008). Charache *et al.* (1995) realizaram na década 90 o primeiro estudo randomizado multicêntrico (MSH), que comprovou a eficácia da terapia com HU em pacientes com AF, com redução do número de episódios vasooclusivos dolorosos, da ocorrência de STA, do número de internações, da necessidade de transfusão de hemoderivados. Eles mostraram também que as doses máximas toleradas podem não ser necessárias para conseguir um efeito terapêutico. Vários outros estudos foram realizados tanto em adultos quanto em crianças, com achados similares (LANKRON *et al.*, 2008; STROUSE *et al.*, 2008). Foi evidenciada uma notável melhoria clínica e hematológica durante a terapia com HU, com aumento da HbF e redução do número de infecções (SILVA-PINTO *et al.*, 2013). A HU teria também um benefício na ocorrência de doença cerebrovascular, redução da hipoxemia e da proteinúria (FITZHUGH *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2008; ZIMMERMAN *et al.*, 2007). No entanto, dependendo da presença ou ausência de uma talassemia, os resultados biológicos do tratamento com HU devem ser interpretados de forma diferente, conforme sugerido no estudo de Neves *et al.* (2012), levando em conta a microcitose e a hipocromia presentes na talassemia.

A HU é bem tolerada em geral, e seu principal efeito colateral a curto prazo é a indução de mielossupressão dose dependente. Os efeitos ao longo prazo, incluem a granulocitopenia e anemia, fadiga, dor de cabeça, náuseas, entre outros (LATAGLIATA *et al.*, 2012). Existem indícios de ocorrência de hepatotoxicidade e de hepatite (GRIGORIAN; O'BRIEN, 2014, HEDDLE; CALVERT, 1980), além de lesão ao DNA (HANFT *et al.*, 2000). Também foi sugerido que a HU reduz a quantidade de espermatozoides, assim como altera a mobilidade e a morfologia dos espermatozoides (KOVACIC, 2011). Ghasemi *et al.* (2014) relataram efeitos colaterais dermatológicos, neurológicos, gastrointestinais e hematológicos em pacientes com DF, em uso de HU. Essa droga é excretada pelos rins e podem ser observados aumentos discretos nas concentrações de creatinina, sugerindo possível lesão renal (GHASEMI *et al.*, 2014).

A dose máxima tolerada varia com os pacientes. As doses administradas variam entre 15 e 35 mg/kg/dia. Quando ocorre uma mielotoxicidade com neutrófilos menores que $2.000/\text{mm}^3$, e/ou plaquetas menores que $80.000/\text{mm}^3$, e/ou hemoglobina menor que 4,5g/dl e/ou reticulócitos menores que $80.000/\text{mm}^3$, o tratamento deve ser suspenso e medidas adequadas devem ser tomadas, até o paciente poder reiniciar eventualmente o tratamento com HU (BRASIL. Ministério da Saúde, 2014). Assim, o tratamento com HU deve ser rigorosamente

monitorado. Devido aos efeitos tóxicos, o uso geralmente é limitado aos pacientes com um curso clínico grave.

1.6.4 L-Glutamina

A glutamina é o precursor da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). Em pacientes com AF, a NAD é deficiente como resultado de um aumento do transporte ativo eritrocitário do glutamato, produto da glutamina, nos eritrócitos falcizados (NIIHARA *et al.*, 1997).

A suplementação oral com L-glutamina é capaz de promover um aumento da síntese do NAD, que por sua vez exerce uma função antioxidante, inibindo o efeito do estresse oxidativo na fisiopatologia da AF. O uso clínico da L-glutamina foi liberado em julho de 2017 pela *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos da América após estudos de fase 3 que demonstraram a eficiência dessa droga em reduzir o número de internações e de ocorrência de episódios vasooclusivos dolorosos, em relação ao placebo (NIIHARA *et al.*, 2016).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A AF é caracterizada por uma anemia hemolítica crônica, que leva à produção elevada de metabolitos da hemoglobina, como a bilirrubina, cuja elevação pode chegar a níveis tóxicos e causar icterícia. Fatores que afetem o metabolismo da bilirrubina, como alterações da enzima UGT1A1 que conjuga a bilirrubina para permitir sua depuração, podem incrementar os níveis séricos de bilirrubina e favorecer a ocorrência de litíases biliares, agravando ainda mais o quadro clínico dos pacientes com AF. Um desses fatores pode ser a presença de repetições adicionais na região promotora do gene *UGT1A1*, que levam a menor expressão do mesmo, com conseqüente redução da atividade da enzima UGT1A1. Como resultado, ocorre acúmulo de bilirrubina não-conjugada (indireta) no plasma, devido a menor depuração da mesma.

Um dos determinantes da grande variabilidade fenotípica da AF ocorre em função dos níveis de HbF que, por sua vez, possui como moduladores genéticos os haplótipos do gene da globina β^S e os polimorfismos em *BCL11A*, entre outros. Níveis elevados de HbF e a presença de talassemia alfa estão associados a menor hemólise, e conseqüentemente a menores níveis séricos de bilirrubina em pacientes com AF. Desta forma, é interessante buscar associações entre a distribuição desses moduladores e a ocorrência de polimorfismos em *UGT1A1* e *BCL11A*.

Até a presente data, não foi estudada de maneira específica a influência dos polimorfismos no promotor do gene *UGT1A1* e de *BCL11A* de forma conjunta e em associação com os parâmetros clínicos e laboratoriais, em pacientes pediátricos atendidos no Hospital Universitário Professor Edgard Santos, em Salvador. A faixa etária pediátrica é especialmente importante pois, sem tratamento adequado, as chances de chegar à idade adulta são reduzidas.

Assim, julgou-se importante a realização deste estudo, em busca de fatores que possam ajudar a explicar a variabilidade da expressão fenotípica entre pacientes, principalmente os níveis séricos de bilirrubina. Os resultados obtidos a partir desse estudo poderão fornecer mais informações sobre os pacientes e melhorar o acompanhamento e o monitoramento da evolução dos mesmos, contribuindo para a uma terapia personalizada.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a associação entre os níveis séricos de bilirrubina e diferentes fatores genéticos e hematológicos, bem como a influência da presença de polimorfismos em *UGT1A1* e *BCL11A* e da terapia com HU, em pacientes pediátricos com anemia falciforme.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes;
- Avaliar a influência da idade e do gênero sobre os níveis de bilirrubina;
- Avaliar a influência dos parâmetros laboratoriais sobre os níveis de bilirrubina;
- Determinar as frequências dos polimorfismos no promotor de *UGT1A1*;
- Estudar a influência conjunta do polimorfismo na região promotora de *UGT1A1*, de dois polimorfismos de *BCL11A*, do status do gene da globina, dos níveis da HbF e dos haplótipos do gene da globina β^S sobre os níveis de bilirrubina;
- Determinar a influência dos polimorfismos em *UGT1A1* e *BCL11A* sobre a resposta à terapia com hidroxiureia.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

4.1.1 Dados utilizados

Foi realizado um estudo observacional, de corte transversal, com uma abordagem quantitativa, a partir da base de dados do Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional, que foi coletada entre julho de 2014 e julho 2016, no Ambulatório de Hematologia e no Ambulatório de Doppler Transcraniano do Centro Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira do Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia.

Os critérios de inclusão no momento da coleta dessa base de dados foram idade de dois a menos de 18 anos, com diagnóstico prévio de anemia falciforme (homozigotos HbSS), e posteriormente confirmado por determinação do perfil das hemoglobinas pelo método automatizado de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC do termo inglês *High performance Liquid Chromatography*) utilizando o equipamento Variant II - Bio-rad (Hercúles, CA, EUA). Todos os pacientes incluídos e seus pais ou responsáveis legais foram devidamente esclarecidos sobre sua participação no estudo, tanto verbalmente quanto por escrito. Os pais ou responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento livre e Esclarecido (TCLE) do estudo, e os menores alfabetizados e com capacidade cognitiva de entender autorizaram sua participação através da assinatura do termo de assentimento relativo ao presente estudo.

Não foram incluídos os pacientes em estado não estável (episódios de dor, anemia aguda, sequestro esplênico, síndrome torácica aguda ou algum evento infeccioso agudo que levasse à internação do paciente). Também foram excluídos do estudo os pacientes sob regime de hiper-transfusão, que receberam transfusão de hemoderivados nos três meses anteriores à entrevista e à coleta de dados, ou que apresentaram sorologia positiva para as infecções virais por HIV, HCV, HTLV1 e 2 e HBV. Pacientes gestantes, fumantes, ou em consumo crônico de álcool e/ou drogas, assim como os heterozigotos compostos pela talassemia β também foram excluídos.

4.1.1.1 Dados clínicos

Foram coletados por meio de entrevistas e questionários padronizados, os dados clínicos relacionados ao histórico do paciente, tais como número e motivos de internações, intercorrências, uso de hidroxiureia e outras medicações, história de esplenectomia ou colecistectomia, estilo de vida, entre outros (questionário em anexo).

4.1.1.2 Coleta de material biológico

Amostras de sangue total e soro foram coletadas no momento do atendimento clínico, para a avaliação dos parâmetros laboratoriais de interesse.

4.1.1.3 Análises hematológicas e bioquímicas

A avaliação hematológica e bioquímica foi feita no laboratório de Análises Clínicas e de Pesquisa em Anemias da Universidade Federal da Bahia (LactFar-UFBA).

Com as amostras de sangue total coletadas, foram realizados o hemograma completo de forma automatizada, a contagem dos reticulócitos, e a determinação do perfil das hemoglobinas foi feita por cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC do inglês *High Performance Liquid Chromatography*).

O soro foi separado do sangue periférico foi coletado em tubo seco (sem aditivos) para as dosagens bioquímicas. As análises bioquímicas de interesse foram realizadas no equipamento A25 (Biosystems SA, Barcelona, Espanha), e incluíram, entre outros, as dosagens da bilirrubina total e frações (bilirrubina direta e indireta).

4.1.1.4 Extração de DNA

Para a extração de DNA, 5 ml de sangue total foram coletados em anticoagulante EDTA, e em seguida centrifugados por 5 minutos a 3.500 rpm para separar a camada de células brancas (*buffy coat*) dos demais constituintes sanguíneos. O DNA genômico foi extraído a partir deste *buffy coat* utilizando o kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Germany), conforme orientações no protocolo do fabricante.

4.1.1.5 Detecção da talassemia alfa

A pesquisa de deleção de 3,7 kb no gene da globina alfa, que é mais comum no Brasil, foi analisada por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando três primers sintéticos específicos, em combinações diferentes, de acordo com a otimização realizada previamente no LHGB. A sequência dos primers é a seguinte: primer A, CCC-TCC-CCC-TCG-CCA-AGT-CCA-CCC-C (direto, para as reações mutante e normal); primer B, GGG-GGG-AGG-CCC-AAG-GGG-CAA-GAA (reverso mutante); primer C, GGG-AGG-CCC-ATC-GGG-CAG-GAG-GAA-C (reverso normal). As análises de PCR foram feitas com os primers A+B e A+C, ambas combinações resultando na amplificação de fragmentos de 1.700 pb, mas a combinação A+B amplifica somente no caso de haver a deleção, enquanto a combinação A+C gera amplicon

somente nos casos em que não há a deleção. Quando os indivíduos são heterozigotos, ambos fragmentos são amplificados.

4.1.1.6 Determinações dos haplótipos do gene da globina β^S

Os haplótipos foram determinados por PCR-RFLP, conforme protocolo descrito no Anexo 2.

4.1.2 Seleção dos pacientes

Para a realização do presente estudo, selecionamos nessa base pacientes de 2 a 17 anos, com dados clínicos e de hemograma completos, contagem dos reticulócitos, perfil das hemoglobinas, dados bioquímicos de interesse (bilirrubina total e frações, LDH, ferritina), haplótipos da globina β^S e talassemia alfa realizados e completos.

4.1.3 Determinação de polimorfismo no promotor do gene *UGT1A1* e no gene *BCL11A*

Um fragmento de 510 pares de bases contendo o elemento TATA-*box* do gene *UGT1A1* foi amplificado por PCR utilizando um par de primers. Para o *BCL11A*, foram estudados o polimorfismo rs1427407 (G>T) e o polimorfismo rs7606173 (G>C), com pares de primers específicos (Tabela 1). A descrição da composição do mix e das condições de termociclagem é apresentada na tabela 2. A termociclagem foi realizada no equipamento Veriti (Applied Biosystems). A quantidade e qualidade de DNA amplificado foi avaliada por espectrofotometria (NanoDrop, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Após o fragmento contendo o elemento TATA-*box* do gene *UGT1A1* ser amplificado por PCR como descrito acima, o fragmento resultante foi analisado em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Sci) e subsequentemente exposto à luz ultravioleta para análise.

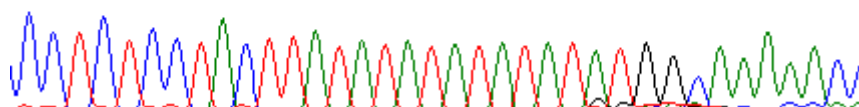
As reações de sequenciamento do elemento TATA-*box* no promotor do gene *UGT1A1* foram realizadas com o primer reverso, de acordo com a padronização da plataforma de sequenciamento local. Um exemplo dos resultados encontrados está apresentado na figura 2.

Tabela 1. Descrição dos polimorfismos investigados e métodos utilizados

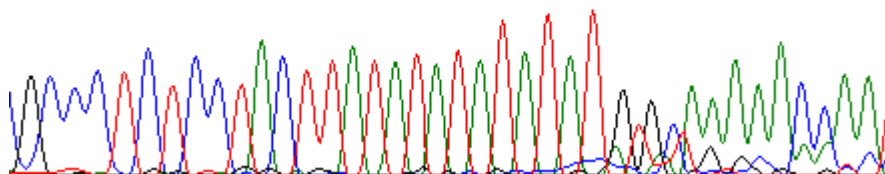
Gene	Polimorfismo	Efeitos	Método de determinação	Primers
<i>UGT1A1</i>	rs8175347 (TA) _{5/6/7/8}	Alteração da expressão do gene	PCR/Sequenciamento	(D):5'-CACGTGACACAGTCAAACATTAAC-3' (R): GAGCTCCTTGTTGTGCAGTAAGT-3'
<i>BCL11A</i>	rs1427407 G>T	Variação na expressão do gene <i>HBG</i>	PCR/Sequenciamento	(D):5'- ACAGGGACTCTTTCTCCTAC -3' (R):CGTAGTTGGGCTTCACATATAG -3'
	rs7606173 G>C			(D):5'- AGTGGTGCGTGGAGATAA-3' (R):5'-GGTACCAGGATGATGCAATG-3'.

Tabela 2. Condições das reações de PCR

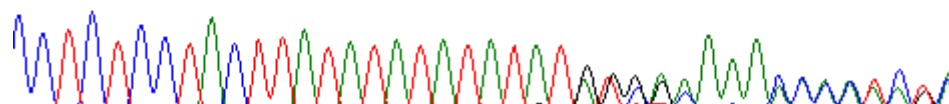
Reagentes PCR		<i>UGT1A1</i> rs8175347	<i>BCL11A</i> rs1427407	<i>BCL11A</i> rs7606173
Tampão 10x		2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
MgCl ₂ 50 mM		1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
dNTPS 10 mM		1 µL	1 µL	1 µL
Primers 10 mM	rs8175347 D/R	0,3 µL		
	rs1427407 D/R		0,3 µL	
	rs7606173 D/R			0,3 µL
Taq polimerase 5U/µL		0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL
DNA 100mg/µL		1 µL	1 µL	1 µL
H ₂ O qsp para 25 µL		18,1 µL	18,1 µL	18,1 µL
Termociclagem		94°C-5 min 94°C-45 s 58°C-45 s 72°C-1min 72°C- 5min 4°C-∞ } 35x	94°C-5 min 94°C-45 s 56°C-45 s 72°C-1min 72°C- 5min 4°C-∞ } 35x	94°C-5 min 94°C-45 s 56°C-45 s 72°C-1min 72°C- 5min 4°C-∞ } 35x



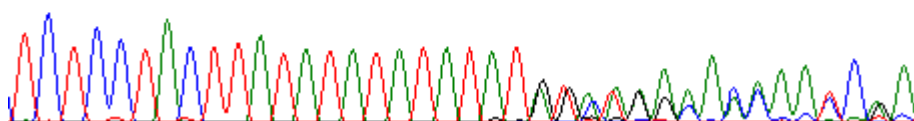
A: Homozigoto selvagem (TA)_{6/6}



B: Homozigoto (TA)_{5/5}



C: Heterozigoto (TA)_{5/6}



D: Heterozigoto (TA)_{5/7}

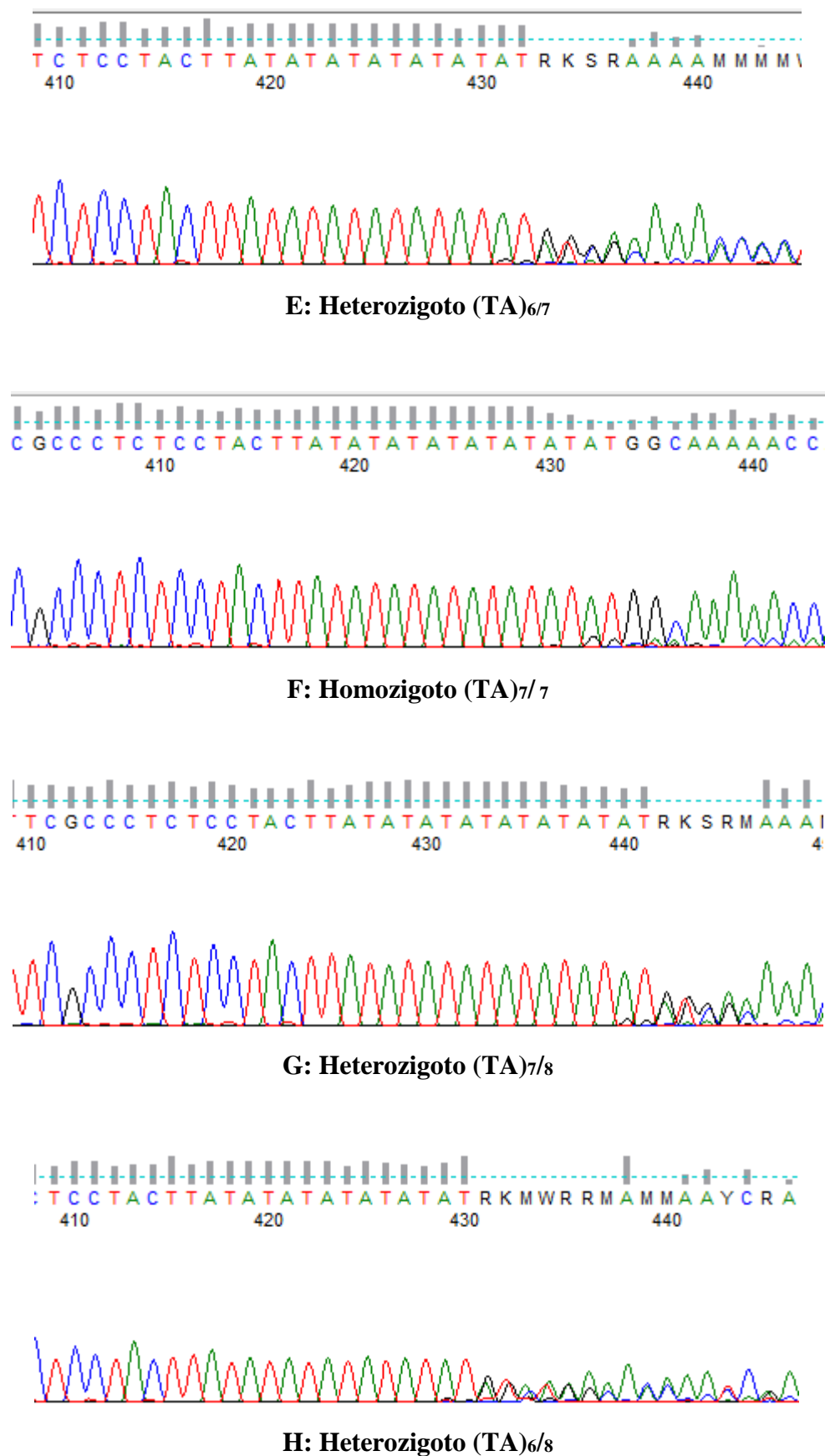


Figura 2. Exemplos dos perfis do polimorfismo no promotor do gene UGT1A1 no sequenciamento.

4.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares Graph Pad Prism versão 6, SPSS versão 20, e Excel versão 2013.

O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar a distribuição gaussiana das variáveis quantitativas estudadas tais como a idade e os parâmetros laboratoriais.

O teste t não pareado de Student e o teste de Mann Whitney foram utilizados para a comparação dos valores médios das variáveis contínuas tais como a idade e os parâmetros laboratoriais entre dois grupos, conforme à distribuição das variáveis. O teste do Qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram devidamente utilizados para a comparação das frequências das variáveis categóricas tais como o gênero, os eventos clínicos, os polimorfismos genéticos, os haplótipos da globina β^S , a talassemia alfa, entre dois ou mais grupos. A razão de chance (OR: *Odds ratio*) e seu intervalo de confiança a 95% (IC_{95%}OR) foram calculados. O teste paramétrico de análise de variação (teste ANOVA) e o teste não-paramétrico de Kruskal Wallis foram utilizados para comparar os valores médios das variáveis contínuas entre três grupos, de acordo com a distribuição das variáveis.

Para avaliar a correlação das diferentes variáveis com os níveis de bilirrubina, o coeficiente de correlação de Spearman foi computado entre as diferentes variáveis de interesse. Aquelas variáveis que mostraram correlação significativa na análise univariada foram analisadas conjuntamente, em regressão linear múltipla para avaliar as contribuições das diferentes variáveis para o nível sérico de bilirrubina.

O nível de significância foi fixado a um valor p menor que 0,05.

4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O TCLE foi assinado pelos pais ou responsáveis legais dos pacientes participantes do estudo. A confidencialidade dos dados coletados foi garantida.

O projeto foi formulado de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde-CNS 466/12 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar da Universidade Federal da Bahia sob o número 287.768/2013.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

5.1.1 Características clínicas e laboratoriais

Nesse estudo, 97 indivíduos foram avaliados, sendo 57 de sexo masculino (57,76%), e a razão do sexo masculino/feminino foi de 1,425. A idade variou entre 2 e 17 anos, com uma média de $7,433 \pm 4,075$ anos e uma mediana de 6 anos. O valor médio da hemoglobina nos indivíduos estudados foi de $8,990\text{g/dl} \pm 1,537$, com uma mediana de 8,9.

Na população estudada, havia pacientes em uso de hidroxiureia e outros sem uso desta droga. Vinte e quatro indivíduos (24,74%) estavam sob tratamento com hidroxiureia por um período de tempo e dose variáveis (15 até 28 mg/kg/dia).

A idade média dos pacientes no grupo sob tratamento com HU (HU+) foi de $9,708 \pm 4,349$, e a idade média no grupo de pacientes sem uso de HU (HU-) foi de $6,685 \pm 3,715$.

A idade e a ocorrência de internações foram significativamente maiores no grupo HU+ em relação ao grupo HU-, com $p=0,0024$ e $p<0,0001$, respectivamente. Dez indivíduos (10,31%) tiveram relato de ocorrência de litíase biliar; a diferença foi significativa entre os tratados com HU e não tratados, com $p=0,019$.

Na análise dos parâmetros laboratoriais, os pacientes HU+ apresentaram HbF e VCM significativamente maiores do que os pacientes HU-, e valores médios significativamente menores de LDH e da contagem de neutrófilos (Tabela 3).

Tabela 3. Características laboratoriais dos pacientes de acordo com o uso de hidroxiureia

	HU+ (n=24)	HU- (n=73)	Valor de p
Hb (g/dl)	9,067 ± 1,455	8,964 ± 1,572	0,5846 ^a
Ht (%)	26,30 ± 4,661	26,26 ± 4,475	0,9289 ^a
VCM (fl)	99,46 ± 9,210	87,03 ± 7,523	p<0,0001^b
CHCM (%)	34,58 ± 1,260	34,18 ± 1,707	0,2959 ^b
HbF (%)	11,85 ± 6,612	9,496 ± 6,662	0,0454^a
HbS (%)	80,23 ± 9,808	78,97 ± 15,69	0,4555 ^a
Retics (%)	6,850 ± 2,086	7,679 ± 2,815	0,1880 ^b
Leucócitos (/mm³)	10254 ± 3823	12836 ± 3985	0,0066 ^b
Neutrófilos (/mm³)	4868 ± 2423	5361 ± 2335	0,3762 ^b
Plaquetas (10³/mm³)	366,9 ± 118,6	367,5 ± 130,9	0,9553 ^a
BT (mg/dl)	2,616 ± 1,644	2,203 ± 1,299	0,4785 ^a
BI (mg/dl)	2,142 ± 1,535	1,771 ± 1,223	0,5154 ^a
LDH (U/L)	957,9 ± 256,2	1280 ± 486,8	0,0028^b
Ferritina (hg/ml)	321 ± 249,3	281,8 ± 310,3	0,2490 ^a

Dados apresentados como média ± desvio padrão. ^a Teste de Mann Whitney, ^b Teste t não pareado de Student. BI: Bilirrubina indireta, BT: Bilirrubina total, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média Hb: Hemoglobina, HbF: Hemoglobina fetal, HbS: Hemoglobina S, Ht: Hematócrito, LDH: Desidrogenase láctica, Retics: Reticulócitos, VCM: Volume corpuscular médio.

Em seguida, foi analisada a distribuição de parâmetros clínicos e laboratoriais de acordo com o gênero e a idade, sendo ela categorizada em duas faixas etárias: menor do que dez anos e com dez anos ou mais. Os valores dos níveis da bilirrubina total e da bilirrubina indireta foram significativamente menores em indivíduos menores do que dez anos quando comparados aos maiores de dez anos (Tabela 4). Não foi encontrada diferença significativa de acordo com o gênero entre os parâmetros avaliados.

Tabela 4. Distribuição dos parâmetros de acordo com a faixa etária

	<10 anos (n=68)	≥ 10 anos (n=29)	Valor de p	Total (n=97)
Idade (anos)	5,162 ± 2,012	12,76 ± 2,309	<0,0001^a	7,433 ± 4,075
Hb (g/dl)	9,150 ± 1,662	8,614 ± 1,133	0,1537 ^a	8,990 ± 1,537
Retics (%)	7,712 ± 2,802	6,915 ± 2,270	0,1793 ^b	7,474 ± 2,668
HbF (%)	10,82 ± 6,961	8,345 ± 5,764	0,1095 ^a	10,08 ± 6,693
BT (mg/dl)	2,005 ± 1,093	3,008 ± 1,756	0,0121^a	2,305 ± 1,395
BI (mg/dl)	1,589 ± 1,016	2,506 ± 1,669	0,0131^a	1,863 ± 1,308
LDH (U/L)	1157 ± 431,4	1302 ± 519,3	0,1576 ^b	1200 ± 461,1

Dados apresentados como média ± desvio padrão. ^a Teste de Mann Whitney, ^b Teste t não pareado de Student. BI: Bilirrubina indireta, BT: Bilirrubina total, Hb: Hemoglobina, HbF: Hemoglobina fetal, LDH: Desidrogenase láctica, Retics: Reticulócitos

5.1.2 Haplótipos do gene da globina β^S

Os alelos dos haplótipos do gene da globina β^S encontrados no presente estudo são o alelo Benin (BEN), o alelo Bantu (CAR) e o alelo atípico (AT). Foram encontrados 29 pacientes homozigotos para o haplótipo BEN (28,9%), e 28 pacientes homozigotos para o haplótipo CAR. Quatro pacientes apresentaram um genótipo heterozigoto atípico (CAR/at), a bilirrubina média nesse grupo foi de 10,75 ± 6,746 mg/dl, e nenhum desses pacientes estava sendo tratado com HU. Eles não foram levados em consideração para as análises subsequentes em relação ao haplótipos. Na figura 3, estão apresentadas as frequências dos genótipos dos haplótipos do gene da globina β^S .

A tabela 5 apresenta as médias e os desvios-padrão dos parâmetros clínicos e laboratoriais de acordo com os maiores grupos de haplótipos encontrados no presente estudo. A contagem de reticulócitos diferiu significativamente entre os homozigotos BEN/BEN e os heterozigotos CAR/BEN (p=0,0325).

Em relação com o tratamento com HU, o valor médio da HbF no grupo de homozigotos CAR/CAR foi significativamente diferente ($p=0,0234$) entre os pacientes HU+ e HU-, com valores médios de $14,5 \pm 5,116$ e $8,374 \pm 5,826$, respectivamente (Tabela 6).

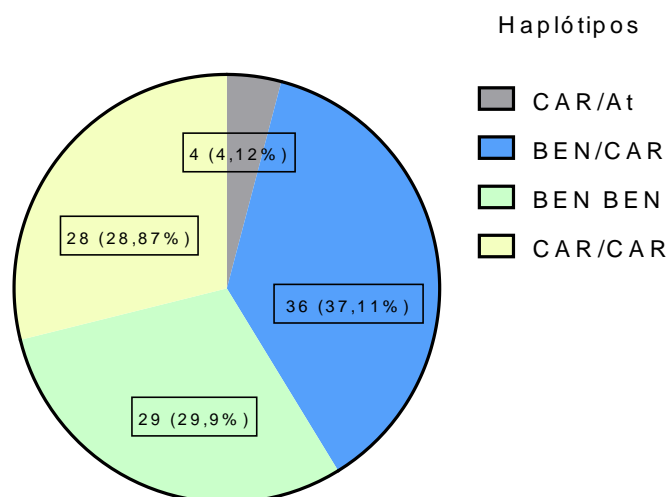


Figura 3. Frequência dos genótipos dos haplótipos do gene da globina β^S

Tabela 5. Distribuição dos parâmetros de acordo com os haplótipos do gene da globina β^S

	BEN/BEN (n=29)	CAR/BEN (n= 36)	CAR/CAR (n= 28)	Valor de p^a
Idade (anos)	8,621 \pm 4,648	6,861 \pm 3,833	7,036 \pm 3,626	0,1813
Hb (g/dl)	9,083 \pm 1,574	8,819 \pm 1,177	8,925 \pm 1,739	0,7926
Retics (%)	6,855 \pm 2,419	8,101 \pm 2,167	7,466 \pm 3,084	0,1516
HbF (%)	11,16 \pm 8,523	9,611 \pm 5,531	9,468 \pm 6,103	0,8512
BT (mg/dl)	2,521 \pm 1,491	2,346 \pm 1,469	2,038 \pm 0,9891	0,5094
BI (mg/dl)	2,038 \pm 1,354	1,923 \pm 1,421	1,589 \pm 0,8935	0,5374
LDH (U/L)	1156 \pm 444,6	1127 \pm 449,3	1152 \pm 412,1	0,7340

Dados apresentados como média \pm desvio padrão ^a Teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA no caso das variáveis Reticulócitos e LDH. BI: Bilirrubina indireta, BT: Bilirrubina total, Hb: Hemoglobina, HbF: Hemoglobina fetal, LDH: Desidrogenase láctica, Retics: Reticulócitos.

Tabela 6. Distribuição dos parâmetros nos haplótipos do gene da globina β^S de acordo com o tratamento com HU

		Idade (anos)	Hb (g/dl)	Retics (%)	HbF (%)	BT (mg/dl)	BI (mg/dl)
BEN/BEM	HU+	9,091 \pm 5,147	9,2 \pm 1,347	7,427 \pm 2,082	11,85 \pm 7,246	2,753 \pm 1,812	2,253 \pm 1,691
	HU -	8,333 \pm 4,446	9,011 \pm 1,732	6,506 \pm 2,598	10,73 \pm 9,395	2,379 \pm 1,293	1,907 \pm 1,135
Valor de p^a		0,7646	0,4181	0,3284	0,3568	0,9558	0,9407
CAR/ BEN	HU+	11,63 \pm 3,378	8,663 \pm 1,506	6,788 \pm 2,066	10,19 \pm 6,746	2,885 \pm 1,773	2,421 \pm 1,649
	HU-	5,50 \pm 2,728	8,864 \pm 1,094	8,476 \pm 2,079	9,446 \pm 5,266	2,191 \pm 1,368	1,781 \pm 1,349
Valor de p^a		0,0002	0,6752	0,0504	0,7020	0,4376	0,4645
CAR/CAR	HU+	8,0 \pm 3,24	9,420 \pm 1,773	5,680 \pm 2,020	14,5 \pm 5,116	1,884 \pm 0,984	1,450 \pm 0,9282
	HU-	6,826 \pm 3,737	8,817 \pm 1,753	7,854 \pm 3,17	8,374 \pm 5,826	2,071 \pm 1,009	1,620 \pm 0,9043
Valor de p^a		0,3237	0,4747	0,1568	0,0234	0,7357	0,6502

Dados apresentados como média \pm desvio padrão. ^a Teste de Mann Whitney ou Teste t não pareado de Student no caso da variável Reticulócitos. BI: Bilirrubina indireta, BT: Bilirrubina total, Hb: Hemoglobina, HbF: Hemoglobina fetal, LDH: Desidrogenase láctica, Retics: Reticulócitos.

5.1.3 Talassemia alfa

Foram encontradas diferenças significativas para os valores da CHCM e do VCM entre os grupos de diferentes status para talassemia alfa, com valores $p = 0,0004$ e $p = 0,0021$, respectivamente. Os valores médios do VCM e da CHCM foram significativamente maiores no grupo sem talassemia alfa em comparação ao grupo com traço alfa-talassêmico ($p = 0,0005$ e $p = 0,0010$, respectivamente para o VCM e a CHCM).

Foram encontrados três pacientes (3,1%) heterozigotos para a $del^{3,7kb}$, que não foram considerados nas análises subsequentes em relação à talassemia alfa. A repartição dos parâmetros estudados na talassemia alfa estão apresentados na tabela 7.

De acordo com o uso de HU, no grupo dos pacientes sem talassemia alfa, foi encontrada uma diferença significativa ($p < 0,0001$) em relação ao VCM, com valores de $102,4 \pm 7,134$ e $88,39 \pm 8,153$ respectivamente para o grupo HU+ e o grupo HU-. A HbF também apresentou diferença significativa ($p = 0,0025$) entre os grupos HU+ e HU-, com valores de $13,69 \% \pm 6,062$ e $9,596 \% \pm 6,821$, respectivamente. Já no grupo com traço um traço alfa-talassêmico e com uso de HU, o valor médio do VCM foi maior, porém esse aumento não significativo. Entretanto, apesar de não significativo, os pacientes HU+ e com traço alfa-talassêmico apresentaram HbF média menor do que os não tratados (Tabela 8).

Tabela 7. Distribuição dos parâmetros de acordo dos pacientes com o número de deleções $\alpha_2^{\text{del}3,7\text{kb}}$

	Sem Tal (n=70)	Traço (n=24)	Tal (n=3)	p ^a	p ^b
Idade (anos)	7,543 ± 4,113	6,708 ± 4,016	10,67 ± 2,309	0,1721	0,3370
Hb (g/dl)	8,964 ± 1,605	9,079 ± 1,346	8,867 ± 1,901	0,9135	0,6743
Retics (%)	7,574 ± 2,886	7,204 ± 2,015	7,303 ± 2,523	0,8399	0,5635
CHCM (%)	34,66 ± 1,505	33,39 ± 1,391	32,5 ± 2,234	0,0004	0,0005
VCM (fl)	92,18 ± 10,03	84,88 ± 5,554	83,57 ± 6,326	0,0021	0,0010
HbF (%)	10,71 ± 6,831	8,725 ± 6,170	6,233 ± 6,676	0,1676	0,1337
Ht (%)	25,94 ± 4,947	27,20 ± 3,821	27,20 ± 3,821	0,2371	0,0913
BT (mg/dl)	2,336 ± 1,441	2,075 ± 1,268	27,33 ± 6,526	0,3881	0,2444
BI (mg/dl)	1,921 ± 1,345	1,677 ± 1,238	1,987 ± 1,263	0,5033	0,2718
LDH (U/L)	1227 ± 489,6	1104 ± 389,8	1360 ± 179,9	0,3409	0,3661

Dados apresentados como média ± desvio padrão. ^a Teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA no caso das variáveis Reticulócitos, CHCM, VCM, e LDH. ^b Teste de Mann Whitney entre o grupo sem Tal e o grupo Traço ou Teste t não pareado de Student no caso das variáveis Reticulócitos, CHCM, VCM e LDH. BI: Bilirrubina indireta, BT: Bilirrubina total, CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média, Hb: Hemoglobina, HbF: Hemoglobina fetal, Ht: Hematócrito, LDH: Desidrogenase láctica, Retics: Reticulócitos, Sem Tal: sem talassemia alfa, Traço: traço alfa-talassêmico, VCM: Volume corpuscular médio.

Tabela 8. Distribuição dos parâmetros de acordo com o número de deleções $\alpha_2^{\text{del}3,7\text{kb}}$ em pacientes sem uso e com uso de HU

	Sem Tal/HU+	Sem Tal/ HU-	Valor de p ^a	Traço/HU+	Traço/HU-	Valor de p ^a
Idade (anos)	8,895 ± 4,396	7,039 ± 3,929	0,1067	12,80 ± 2,588	5,105 ± 2,470	0,0001
Hb (mg/dl)	9,084 ± 1,543	8,920 ± 1,640	0,5397	9,0 ± 1,208	9,1 ± 1,410	0,9320
VCM (fl)	102,4 ± 7,134	88,39 ± 8,153	<0,0001	88,46 ± 8,219	83,93 ± 4,460	0,2595
CHCM (%)	34,73 ± 1,226	34,63 ± 1,607	0,9139	34,0 ± 1,355	33,23 ± 1,390	0,4562
Retics (%)	6,842 ± 2,227	7,846 ± 3,070	0,1976	6,880 ± 1,645	7,289 ± 2,133	0,7698
HbF (%)	13,69 ± 6,062	9,596 ± 6,821	0,0025	4,860 ± 2,976	9,742 ± 6,437	0,0731
BT (%)	2,562 ± 1,622	2,292 ± 1,377	0,7758	2,820 ± 1,910	1,879 ± 1,024	0,271
BI (%)	1,860 ± 1,302	2,084 ± 1,477	0,8213	1,497 ± 0,9905	2,360 ± 1,912	0,4463
LDH (U/L)	949,5 ± 231,3	1065 ± 382,3	0,0032	989,6 ± 367,2	1134 ± 399,5	0,4729

Dados apresentados como média ± desvio padrão. ^a Teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA no caso das variáveis Reticulócitos, CHCM, VCM, e LDH. ^b Teste de Mann Whitney entre o grupo sem Tal e o grupo Traço ou Teste t não pareado de Student no caso das variáveis Reticulócitos, CHCM, VCM e LDH. BI: Bilirrubina indireta, BT: Bilirrubina total, CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média, Hb: Hemoglobina, HbF: Hemoglobina fetal, Ht: Hematócrito, LDH: Desidrogenase láctica, Retics: Reticulócitos, Sem Tal: sem talassemia alfa, Traço: traço alfa-talassêmico, VCM: Volume corpuscular médio.

5.2 ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM *UGT1A1*

5.2.1 Genótipos e alelos dos polimorfismos no promotor do gene *UGT1A1*

A população estudada apresentou de cinco até oito repetições do tandem nucleotídico TA. Foram encontrados os genótipos (TA)_{5/6}, (TA)_{5/7}, (TA)_{6/6}, (TA)_{6/7}, (TA)_{6/8}, (TA)_{7/7} e (TA)_{7/8}, e sua distribuição esta apresentada na tabela 9. A frequência do genótipo homocigoto selvagem (TA)_{6/6} foi de 41,24%. A frequência do alelo selvagem (TA)₆ foi de 60,31% (Tabela 10).

Tabela 9. Frequência dos genótipos do polimorfismo no promotor do gene *UGT1A1*

Genótipo <i>UGT1A1</i>	Número de observações (n)	Frequência (%)
(TA) _{5/6}	3	3,09
(TA) _{5/7}	5	5,15
(TA) _{6/6}	40	41,24
(TA) _{6/7}	33	34,02
(TA) _{6/8}	1	1,03
(TA) _{7/7}	13	13,40
(TA) _{7/8}	2	2,06
Total	97	100

Tabela 10. Frequências alélicas do polimorfismo no promotor do gene *UGT1A1*

Alelo	Número de observações (n)	Frequência (%)
(TA) ₅	8	4,12
(TA) ₆	117	60,31
(TA) ₇	66	34,02
(TA) ₈	3	1,55
Total	194	100

Os pacientes foram classificados em 3 grupos de risco para o desenvolvimento de litíase biliar, de acordo com seu genótipo (CHAAR *et al.*, 2005), sendo os grupos seguintes: grupo 1 (baixo risco) = (TA)_{5/6} ou (TA)_{5/7} ou (TA)_{6/6}; grupo 2 (risco intermediário) = (TA)_{6/7}, (TA)_{6/8} e grupo 3 (risco elevado) = (TA)_{7/7} e (TA)_{7/8}.

A figura 4 apresenta a frequência dos grupos genotípicos.

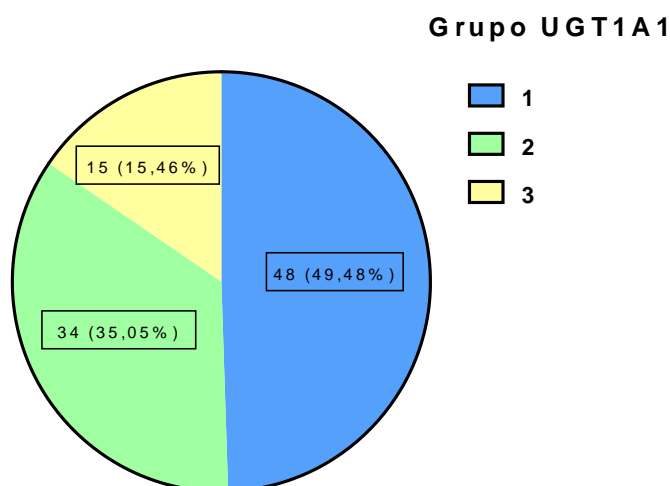


Figura 4. Frequência dos grupos genotípicos do polimorfismo no promotor do gene *UGT1A1*

Grupo 1 = (TA)_{5/6} ou (TA)_{5/7} ou (TA)_{6/6}; Grupo 2 = (TA)_{6/7} ou (TA)_{6/8} e Grupo 3 = (TA)_{7/7} ou (TA)_{7/8} (CHAAR et al., 2005).

5.2.2 Distribuição dos genótipos de *UGT1A1* de acordo com o uso de HU

Oito pacientes dos pacientes do grupo 1 (16,67%) estavam sob tratamento com HU, e 46,67 % dos pacientes do grupo 3 pertenceram ao grupo HU+. A tabela 11 apresenta a distribuição dos pacientes dos diferentes grupos genotípicos em função do tratamento com HU.

Tabela 11. Grupos genotípicos e alélicos do polimorfismo no promotor do gene *UGT1A1* de acordo com o uso de HU

	HU+ n (%)	HU- n (%)	Total	Valor de p
Grupo de genótipo				
Grupo 1	8 (16,67)	40 (83,33)	48	0,0681 ^a
Grupo 2	9 (24,47)	25 (73,53)	34	
Grupo 3	7 (46,67)	8 (53,33)	15	
Total	24	73	97	
Alelo				
(TA) ₅	1(12,5)	7 (87,5)	8	0,0394^b
(TA) ₆	24 (20,51)	93 (79,49)	117	
(TA) ₇	22 (33,33)	44 (66,67)	66	
(TA) ₈	1(33,33)	2(66,67)	3	
Total	48	146	194	

^a Teste de Qui-quadrado, valor de p computado entre o grupo 1 e o grupo 2+3. ^b Teste de Qui-quadrado, valor de p computado entre o grupo de alelos (TA)₅ e o grupo (TA)₆ (TA)₇ e (TA)₈.

No grupo de alelos (TA)₇ e (TA)₈, 33,33% (23/69) estavam sob tratamento com HU. A diferença com o grupo de alelos (TA)₅ e (TA)₆, no qual 80,0% dos pacientes (100/125) estavam sem em uso de HU, foi significativa ($p=0,0394$).

5.2.3 Distribuição dos parâmetros clínicos e laboratoriais de acordo com o grupo genotípico de *UGT1A1*

Na avaliação da distribuição dos parâmetros clínicos e laboratoriais entre os grupos de genótipos em *UGT1A1*, foi encontrada uma diferença significativa nos níveis de bilirrubina total e de bilirrubina indireta na análise dos três grupos ($p = 0,0175$ e $p = 0,0125$, respectivamente), e na análise entre o grupo 1 e o grupo 3 ($p = 0,0056$ e $p = 0,0059$, respectivamente). A contagem de reticulócitos e os níveis de LDH foram significativamente maiores no grupo 1 em relação ao grupo 3, $p = 0,0259$ e $p = 0,0308$, respectivamente (Figura 5). As demais variáveis tais como a idade, os níveis de hemoglobina e os níveis de HbF não foram significativamente diferentes entre os três grupos genotípicos de risco.

Foi avaliada em seguida a distribuição dos parâmetros clínicos e laboratoriais nos diferentes grupos genotípicos, de acordo com o tratamento com HU (Tabela 12 e Tabela 13). A idade foi significativamente maior nos pacientes com uso de HU no grupo genotípico 1 ($p=0,0028$).

As variações dos níveis séricos de bilirrubina em pacientes em uso de HU não foram significativamente diferentes entre os diferentes grupos genotípicos, tanto para a bilirrubina total quanto para a bilirrubina indireta (Figura 6).

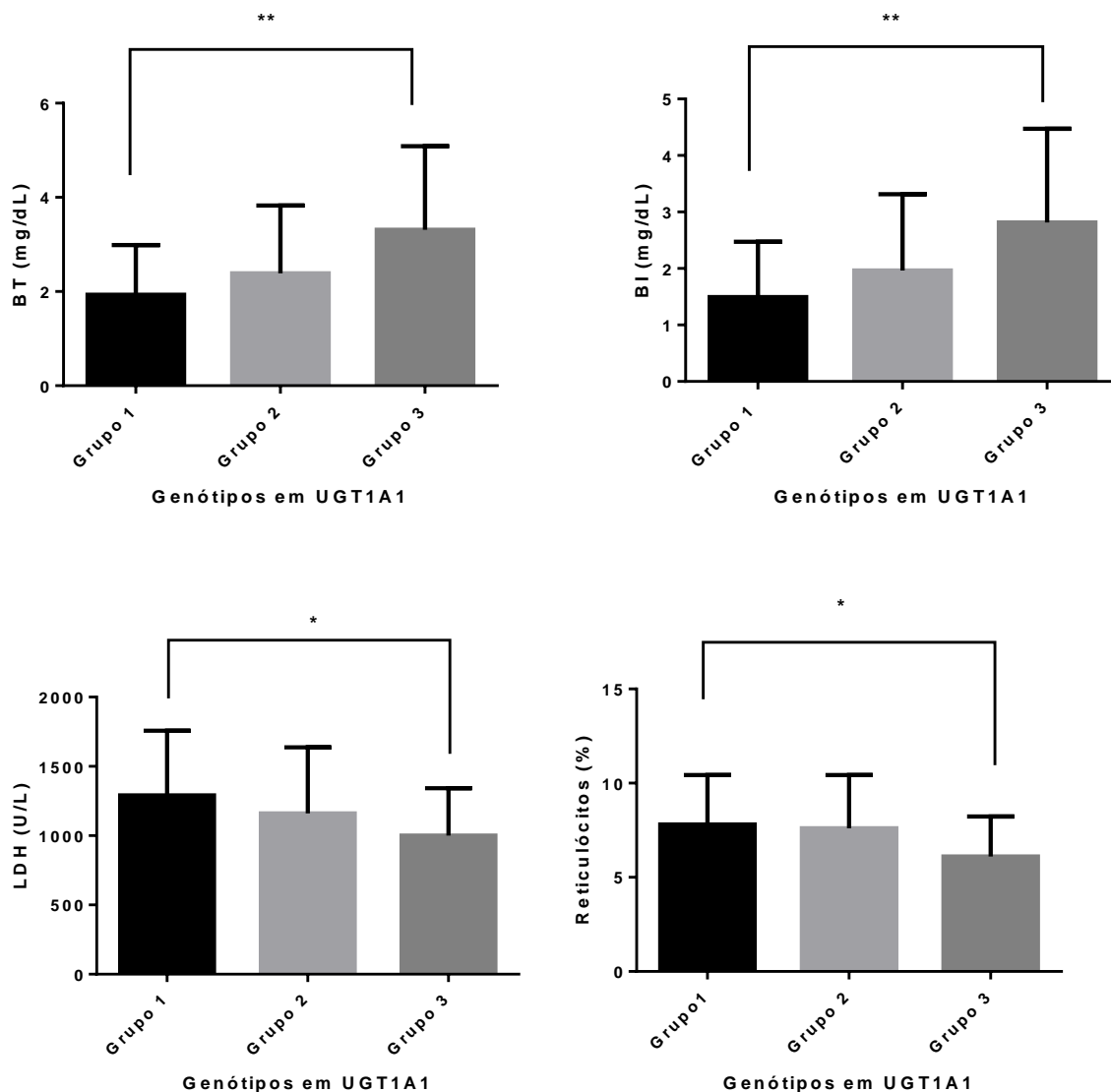


Figura 5. Distribuição dos parâmetros laboratoriais nos diferentes grupos genotípicos de *UGT1A1*

Teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA no caso das variáveis Reticulócitos e LDH, teste de Mann Whitney entre o grupo 1 e o grupo 2 ou teste t não pareado de Student no caso das variáveis Reticulócitos e LDH, teste de Mann Whitney entre o grupo 1 e o grupo 3 ou teste t não pareado de Student no caso das variáveis Reticulócitos e LDH, teste de Mann Whitney entre o grupo 2 e o grupo 3 ou teste t não pareado de Student no caso das variáveis Reticulócitos e LDH. BI: Bilirrubina indireta, BT: Bilirrubina total, LDH: Desidrogenase láctica, Retics: Reticulócitos.

Tabela 12. Distribuição dos parâmetros nos diferentes grupos genotípicos de *UGT1A1* de acordo com uso de HU (1)

	Grupo HU	Idade (anos)	Hb (g/dL)	Retics (%)
Grupo 1	HU+ (n = 8)	10,63 ± 3,543	8,625 ± 1,772	6,963 ± 1,460
	HU- (n= 40)	6,25 ± 3,160	8,795 ± 1,241	7,977 ± 2,780
	Valor de p^a	0,0028	0,4413	0,3233
	Total	6,979 ± 3,588	8,767 ± 1,323	7,808 ± 2,622
Grupo 2	HU+ (n = 9)	9,444 ± 4,720	9,344 ± 1,126	7,367 ± 2,796
	HU- (n = 25)	7,000 ± 4,682	9,044 ± 1,577	7,692 ± 2,883
	Valor de p^a	0,1895	0,2667	0,7718
	Total	7,647 ± 4,747	9,124 ± 1,461	7,606 ± 2,821
Grupo 3	HU+	9 ± 5,132	9,214 ± 1,538	6,057 ± 1,622
	HU-	7,875 ± 2,850	9,563 ± 2,776	6,151 ± 2,609
	Valor de p^a	0,7024	0,8023	0,5930
	Total	8,4 ± 3,961	9,4 ± 2,214	6,107 ± 2,129

Dados apresentados com média ± desvio padrão. ^a Teste de Mann Whitney ou Teste t de Student no caso da variável Reticulócitos. Hb: Hemoglobina, Retics: Reticulócitos.

Tabela 13. Distribuição dos parâmetros nos diferentes grupos genotípicos de *UGT1A1* de acordo com uso de HU (2)

	Grupo HU	HbF (%)	BT (mg/dl)	BI (mg/dl)	LDH (U/L)
Grupo 1	HU+ (n = 8)	10,94 ± 4,816	1,725 ± 0,9047	1,290 ± 0,7990	1070 ± 347,1
	HU- (n= 40)	9,638 ± 5,716	1,974 ± 1,085	1,535 ± 1,016	1334 ± 479,8
	Valor de p^a	0,2711	0,5820	0,5272	0,1472
	Total	9,845 ± 5,550	1,993 ± 1,053	1,494 ± 0,9801	1290 ± 467,8
Grupo 2	HU+ (n = 9)	13,26 ± 7,558	2,343 ± 1,351	1,953 ± 1,197	899,2 ± 200,3
	HU- (n = 25)	10,03 ± 8,118	2,369 ± 1,498	1,967 ± 1,426	1256 ± 513,3
	Valor de p^a	0,1912	0,8406	0,7810	0,0524
	Total	10,88 ± 7,992	2,386 ± 1,440	1,963 ± 1,351	1162 ± 476,3
Grupo 3	HU+	11,09 ± 7,721	3,867 ± 2,011	3,357 ± 1,907	904,9 ± 179,4
	HU-	7,125 ± 6,397	2,828 ± 1,502	2,339 ± 1,351	1085 ± 435,2
	Valor de p^a	0,2785	0,4563	0,3916	0,3271
	Total	8,973 ± 7,085	3,313 ± 1,775	2,814 ± 1,657	1001 ± 342,2

Dados apresentados com média ± desvio padrão. ^a Teste de Mann Whitney ou Teste t de Student no caso da variável LDH. BI: bilirrubina indireta, BT: Bilirrubina total, HbF: Hemoglobina fetal, LDH: Desidrogenase láctica

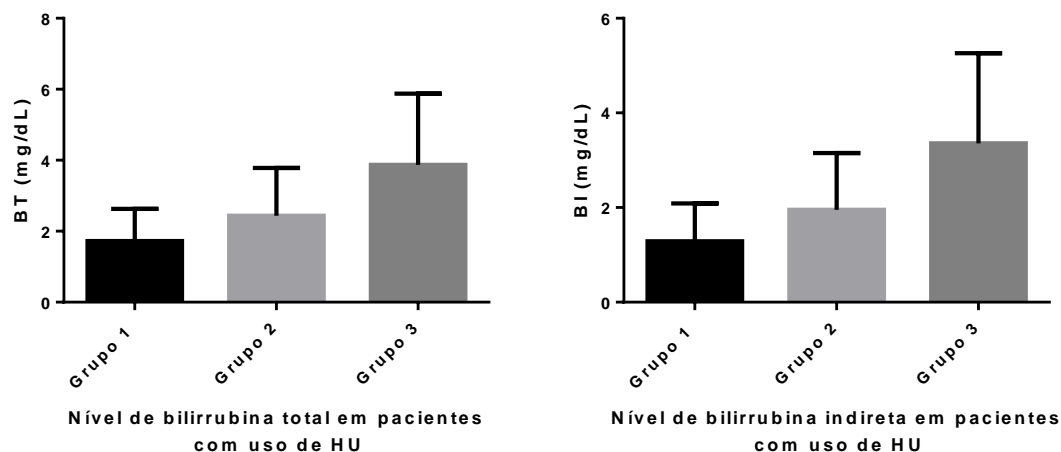


Figura 6. Níveis de bilirrubina nos diferentes grupos genóticos em *UGT1A1* em indivíduos em uso de HU

5.2.4 Distribuição do polimorfismo no promotor do gene *UGT1A1* de acordo com os níveis de bilirrubina

Primeiramente foi feita uma análise dos genótipos em *UGT1A1* em função dos quartis de níveis de bilirrubina total. O número de pacientes do grupo 2 e 3 é maior no quartil superior (18/24=75%), enquanto no quartil inferior, o número de pacientes do grupo 1 foi maior (16/24=66,67%); A diferença foi significativa, com o valor $p = 0,0038$, $OR = 6,000$ e $IC_{95\%}OR = [1,711; 21,04]$. Na análise dos níveis de bilirrubina indireta, essa proporção passa a 17/23 (73,91%) no quartil superior para os pacientes do grupo 2 e 3, e a 17/24 (70,83%) no quartil inferior para os pacientes do grupo 1. A diferença foi também significativa, $p = 0,0022$, $OR = 6,881$ e $IC_{95\%}OR = [1,911; 24,78]$ (Tabela 14).

Tabela 14. Distribuição dos genótipos do polimorfismo no promotor de *UGT1A1* de acordo com os quartis de níveis de bilirrubina

	Quartil superior n (%)	Quartil inferior n (%)	Total	Valor de p
Bilirrubina total*				
Grupo 3	9 (37,5)	2 (8,33)	11	0,0038^a
Grupo 2	9 (37,5)	6 (25,0)	15	
Grupo 1	6 (25,0)	16 (66,67)	22	
Total	24	24	48	
Bilirrubina indireta**				
Grupo 3	9 (39,13)	2 (8,33)	11	0,0022^b
Grupo 2	8 (34,78)	5 (20,83)	13	
Grupo 1	6 (26,09)	17 (70,83)	23	
Total	23	24	47	

*Quartil inferior: 0,33-1,31 mg/dl; Quartil superior: 2,921-7,45 mg/dl. ** Quartil inferior: 0,2-0,96 mg/dl; Quartil superior: 2,461-7,030 mg/dl. ^a Teste de Qui-quadrado, valor de p computado entre o grupo 2+3 e o grupo 1, para a bilirrubina total. OR = 6,000 [1,711; 21,04]. ^b Teste de Qui-quadrado, valor de p computado entre o grupo 2+3 e o grupo 1, para a bilirrubina indireta. OR = 6,881 (1,911; 24,78].

Os alelos (TA)₅ e (TA)₆ constituíram 75% (36/48) dos alelos no quartil inferior de bilirrubina total, e os alelos (TA)₇ e (TA)₈ constituíram 58,33% (28/48) dos alelos no quartil superior, e essa diferença foi significativa (p=0,0009, OR=4,200 IC_{95%}OR= [1,76; 10,02]).

Os alelos (TA)₅ e (TA)₆ constituíram 75% (36/48) dos alelos no quartil inferior de bilirrubina indireta, e os alelos (TA)₇ e (TA)₈ constituíram 58,69% (27/46) dos alelos no quartil superior, e essa diferença foi significativa (p=0,0019, OR=4,269 IC_{95%}OR = [1,771; 10,26]).

A distribuição dos alelos entre os quartis dos níveis de bilirrubina sérica esta apresentada na tabela 15.

Tabela 15. Distribuição dos alelos do polimorfismo no promotor do gene *UGT1A1* em função dos quartis dos níveis de bilirrubina sérica

Alelos	Quartil superior n (%)	Quartil inferior n (%)	Total	Valor de p
Bilirrubina total*				
(TA) ₅	2 (4,17)	3 (6,25)	5	0,0009^a
(TA) ₆	18 (37,5)	33 (68,75)	51	
(TA) ₇	27 (56,25)	11 (22,92)	38	
(TA) ₈	1 (2,08)	1 (2,08)	2	
Total	48	48	96	
Bilirrubina indireta**				
(TA) ₅	2 (4,35)	4 (8,33)	6	0,0019^b
(TA) ₆	17 (36,96)	32 (66,67)	49	
(TA) ₇	26 (56,52)	11 (22,92)	37	
(TA) ₈	1 (2,17)	1 (2,08)	2	
Total	46	48	94	

*Quartil inferior: 0,33-1,31 mg/dl; quartil superior: 2,921-7,45 mg/dl. ** Quartil inferior: 0,2-0,96 mg/dl; quartil superior: 2,461-7,030 mg/dl. ^aTeste de Qui-quadrado, valor de p computado entre o grupo (TA)₈ + (TA)₇ e o grupo (TA)₆ + (TA)₅, para a bilirrubina total, OR=4,200 [1,76; 10,02]. ^b Teste de Qui-quadrado, valor de p computado entre o grupo (TA)₈ + (TA)₇ e o grupo (TA)₆ + (TA)₅, OR=4,269 [1,771; 10,26].

5.2.5 Distribuição dos haplótipos do gene da globina β^S de acordo com níveis de bilirrubina nos grupos de genótipos de *UGT1A1*

Na análise da distribuição dos genótipos e alelos dos haplótipos do gene da globina β^S , nenhuma associação significativa foi encontrada em relação com os quartis de bilirrubina (Tabela 16 e Tabela 17). A ausência de associação significativa também foi observada na análise da distribuição dos haplótipos entre os grupos genotípicos de *UGT1A1* (Tabela 18).

Tabela 16. Distribuição dos genótipos dos haplótipos do gene da globina β^S acordo com os quartis dos valores da bilirrubina

	Quartil superior n (%)	Quartil inferior n (%)	Total	Valor de p
Bilirrubina total*				
CAR/CAR	6 (26,09)	9 (37,5)	15	0,3477 ^a
CAR/BEN	9 (39,13)	11 (45,83)	20	
BEN/BEN	8 (34,78)	4 (16,67)	12	
Total	23	24	47	
Bilirrubina indireta**				
CAR/CAR	5 (22,73)	8 (34,78)	13	0,4927 ^b
CAR/BEN	9 (40,91)	10 (43,48)	19	
BEN/BEN	8 (36,36)	5 (21,74)	13	
Total	22	23	45	

*Quartil inferior: 0,33-1,33 mg/dl; quartil superior: 2,921-7,45 mg/dl. **Quartil inferior: 0,2-0,985 mg/dl; quartil superior: 2,461-7,030 mg/dl. ^a Test de Qui quadrado, valor p computado entre o primeiro e o quarto quartil, para a bilirrubina total. ^b Test de Qui-quadrado, valor p computado entre o primeiro e o quarto quartil, para a bilirrubina indireta.

Tabela 17. Distribuição dos alelos dos haplótipos do gene da globina β^S acordo com os quartis dos valores da bilirrubina

	Quartil superior n (%)	Quartil inferior n (%)	Total	Valor de p
Bilirrubina total*				
CAR	21 (45,65)	29 (60,42)	50	0,1516 ^a
BEN	25 (54,35)	19 (36,58)	44	
Total	46	48	94	
Bilirrubina indireta**				
CAR	19 (43,18)	26 (56,52)	45	0,2058 ^b
BEN	25 (56,82)	20 (43,48)	45	
Total	44	46	90	

*Quartil inferior: 0,33-1,33 mg/dl; quartil superior: 2,921-7,45 mg/dl. **Quartil inferior: 0,2-0,985 mg/dL; quartil superior: 2,461-7,030 mg/dl. ^a Test de Qui-quadrado, valor p computado entre o primeiro e o quarto quartil, para a bilirrubina total. ^b Test de Qui-quadrado, valor p computado entre o primeiro e o quarto quartil, para a bilirrubina indireta.

Tabela 18. Associação entre os níveis de bilirrubina e os haplótipos do gene da globina β^S nos grupos genotípicos de risco

Bilirrubina total				
	BENBEN	BEN/CAR	CAR/CAR	Valor de p*
Grupo 1	2,246 ± 1,229	1,802 ± 0,7889	1,801 ± 0,8664	0,6714
Grupo 2	2,355 ± 1,343	2,625 ± 1,901	2,118 ± 0,9142	0,9297
Grupo 3	3,151 ± 2,007	4,430 ± 0,9160	3,167 ± 1,365	
Bilirrubina indireta				
	BENBEN	BEN/CAR	CAR/CAR	Valor de p*
Grupo 1	1,734 ± 1,086	1,372 ± 0,7182	1,366 ± 0,7818	0,7085
Grupo 2	1,893 ± 1,149	2,248 ± 1,866	1,703 ± 0,8822	0,9088
Grupo 3	2,653 ± 1,921	3,923 ± 0,8267	2,553 ± 1,138	0,3938

*Teste de Kruskal Wallis

5.2.6 Associação entre a talassemia alfa e os níveis de bilirrubina nos grupos de genótipos de *UGT1A1*

A análise da associação com os quartis dos níveis de bilirrubina não mostrou diferença significativa entre os indivíduos sem talassemia e os portadores de traço alfa-talassêmico (Tabela 19).

Tabela 19. Associação da talassemia alfa com os níveis da bilirrubina

	Quartil superior	Quartil inferior	Total	Valor de p
	n (%)	n (%)		
Bilirrubina total*				
Sem Tal	18 (72,26)	13 (56,52)	31	0,1158 ^a
Traço	5 (21,4)	10 (43,48)	15	
Total	23	23	46	
Bilirrubina indireta**				
Sem Tal	14 (60,87)	19 (79,17)	33	0,1702 ^b
Traço	9 (39,13)	5 (20,83)	14	
Total	23	24	47	

*Quartil inferior: 0,33-1,285 mg/dL; quartil superior: 2,905-7,45 mg/dL. ** Quartil inferior: 0,2-0,94 mg/dL; quartil superior: 2,460-7,030 mg/dL. ^a Test Qui-quadrado, valor p computado entre o primeiro e o quarto quartil, para os indivíduos sem Tal ou com traço, para a bilirrubina total. ^b Test de Qui-quadrado, valor p computado entre o primeiro e o quarto quartil, para os indivíduos selvagens Tal ou com traço, para a bilirrubina indireta. Sem Tal: sem talassemia alfa, Traço: traço alfa-talassêmico.

A diferença não foi significativa entre o quartil superior e o quartil inferior em relação com o status da talassemia alfa, respectivamente para a bilirrubina total e bilirrubina indireta, considerando somente os indivíduos sem talassemia ou com traço.

Além disso, foi avaliada a associação entre os níveis de bilirrubina e o número de deleções $\alpha_2^{3,7kb}$ nos grupos genotípicos de risco (Tabela 20). Os maiores níveis de bilirrubina foram encontrados nos pacientes sem deleções $\alpha_2^{3,7kb}$ no grupo 1, quando comparados aos com o traço.

Tabela 20. Associação entre os níveis de bilirrubina e o número de deleções $\alpha_2^{3,7kb}$ nos grupos genotípicos de risco

Bilirrubina total			
	Sem Tal	Traço	Valor de p*
Grupo 1	2,1709 ± 1,091	1,238 ± 0,5351	0,0146
Grupo 2	2,431 ± 1,576	2,278 ± 1,181	0,8195
Grupo 3	3,390 ± 2,104	3,028 ± 1,510	0,8112
Bilirrubina indireta			
	Sem Tal	Traço	Valor de p*
Grupo 1	1,657 ± 1,007	0,8633 ± 0,5863	0,0087
Grupo 2	2,101 ± 1,477	1,904 ± 1,112	0,9602
Grupo 3	2,935 ± 1,929	2,555 ± 1,520	0,7193

Dados apresentados como média ± desvio-padrão. *Teste de Mann Whitney. Sem Tal: sem talassemia alfa, Traço: traço alfa-talassêmico.

5.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE ACORDO COM A OCORRÊNCIA DE LITÍASES

5.3.1 Análise dos parâmetros laboratoriais de acordo com a ocorrência de litíases

Os parâmetros que mostraram associação significativa com o relato de litíase foram os níveis de bilirrubina e os níveis de HbF (Tabela 21).

Tabela 21. Distribuição dos parâmetros laboratoriais de acordo com a ocorrência de litíase biliar

	Com litíase biliar	Sem litíase biliar	Valor de p*
Bilirrubina total	3,860 ± 2,089	2,16 ± 1,184	0,0042
Bilirrubina indireta	3,370 ± 2,103	1,689 ± 1,074	0,0055
Hemoglobina	8,570 ± 1,255	9,038 ± 1,565	0,3521
Hemoglobina fetal	5,520 ± 3,272	10,40 ± 6,797	0,0103

*Teste de Mann Whitney

5.3.2 Distribuição do polimorfismo de *UGT1A1* de acordo com a ocorrência de litíases

A frequência de ocorrência de litíase biliar foi significativamente maior no grupo genotípico 3 de *UGT1A1*, em relação ao grupo 1 (Tabela 22).

Tabela 22. Distribuição dos grupos genotípicos e dos alelos em *UGT1A1* de acordo com a ocorrência de litíase

	Com litíase biliar n (%)	Sem litíase biliar n (%)	Total	Valor de p
Grupos genotípicos				
Grupo 3	4 (40,0)	11 (12,64)	15	0,0492 ^{a*}
Grupo 2	3 (30,0)	31 (35,63)	34	0,6883 ^b
Grupo 1	3 (30,0)	45 (51,73)	48	0,3173 ^c
Total	10	87	97	
Alelos				
(TA)₅	0 (0,0)	8 (4,6)	8	0,0552 ^d
(TA)₆	9 (45,0)	108 (62,07)	117	
(TA)₇	10 (50,0)	56 (32,18)	66	
(TA)₈	1 (5,0)	2 (1,15)	3	
Total	20	174	194	

^{a*} Teste exato de Fisher, valor de p computado entre o grupo 1 e o grupo 3, OR=5,455 IC 95% = 1,602; 28,01]. ^b Teste exato de Fisher, valor de p computado entre o grupo 1 e o grupo 2. ^c Teste exato de Fisher, valor de p computado entre o grupo 1 e o grupo 2 + 3. ^d Teste de Qui-quadrado, valores de p computados entre o grupo (TA)₈ + (TA)₇ e o grupo (TA)₆ + (TA)₅.

5.4 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO E DE REGRESSÃO

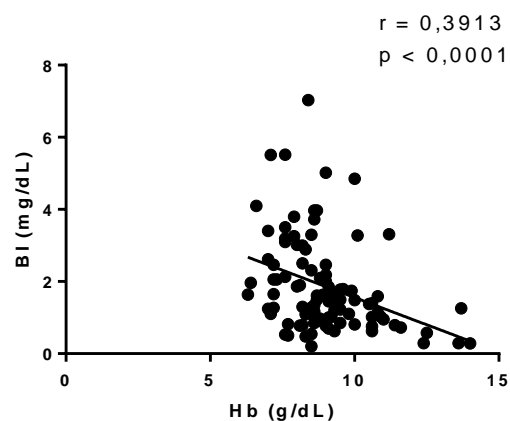
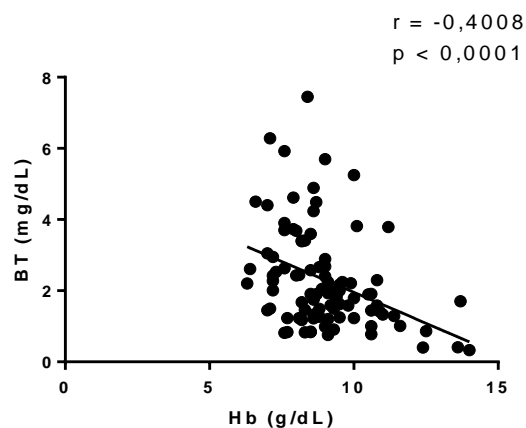
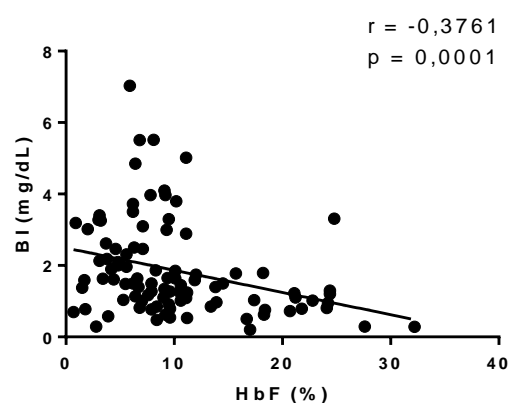
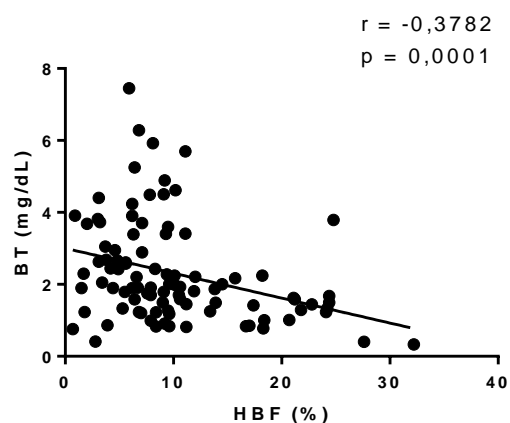
5.4.1 Análises de correlação entre os níveis de bilirrubina sérica e os parâmetros clínicos e laboratoriais

Foi avaliada a correlação entre os níveis de bilirrubina, total e indireta, e diferentes parâmetros clínicos e laboratoriais (Tabela 23).

As variáveis com correlação significativa com o nível de bilirrubina total foram a idade, a hemoglobina, a HbF e a LDH. O valor de reticulócitos não mostrou correlação significativa com o nível de bilirrubina sérica. Achados semelhantes foram encontrados com o nível de bilirrubina indireta. A figura 7 apresenta a correlação entre os níveis de bilirrubina e os de Hb, HbF e LDH.

Tabela 23. Correlação dos níveis de bilirrubina total e de bilirrubina indireta com os parâmetros clínicos e laboratoriais

Parâmetros	Bilirrubina total		Bilirrubina indireta	
	Coefficiente de Spearman	Valor de p	Coefficiente de Spearman	Valor de p
Idade (anos)	0,3509	0,0004	0,3312	0,0009
Hb (mg/dL)	-0,4008	<0,0001	-0,3913	0,0004
Reticulócitos (%)	0,1549	0,1298	0,1653	0,1055
HbF (%)	-0,3782	0,0001	-0,3761	0,0015
LDH (U/L)	0,392	0,00007	0,410	0,00003



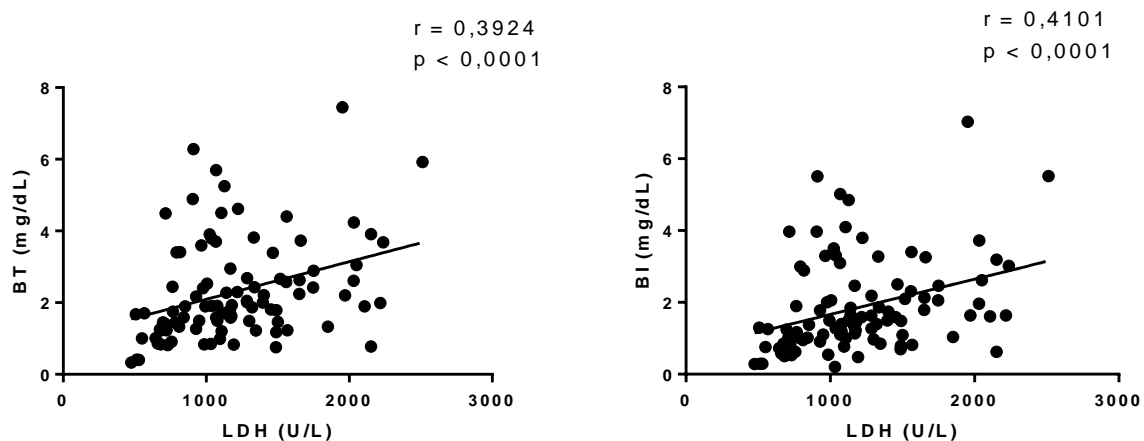


Figura 7. Correlação dos níveis séricos de bilirrubina com Hb, HbF, e LDH.

BI: Bilirrubina indireta, BT: Bilirrubina total, Hb: Hemoglobina, HbF: Hemoglobina fetal.

Ao considerar os diferentes grupos de genótipos dos polimorfismos no promotor do gene *UGT1A1*, foi encontrada correlação negativa entre os níveis de bilirrubina e a HbF tanto no grupo de menor risco (grupo 1), quanto no grupo de risco intermediário (grupo 2). No entanto, apesar de a correlação não grupo 3 apresentar uma tendência a ser positiva, não foi significativa (Tabela 24). A correlação foi positiva entre os níveis de bilirrubina e os de LDH, nos três grupos de risco (Tabela 25).

Tabela 24. Correlação dentro dos grupos de polimorfismos no promotor do gene *UGT1A1* entre os níveis de HbF e de bilirrubina.

		Coefficiente de Spearman	Valor de p
Bilirrubina total			
Grupo 3		0,1286	0,6482
Grupo 2	HbF	-0,6251	<0,0001
Grupo 1		-0,3497	0,0148
Bilirrubina indireta			
Grupo 3		0,1714	0,5406
Grupo 2	HbF	-0,5679	0,0005
Grupo 1		-0,3926	0,0058

Tabela 25. Correlação dentro dos grupos de polimorfismos no promotor do gene *UGT1A1* entre os níveis de HbF e de LDH.

		Coefficiente de Spearman	Valor de p
Bilirrubina total			
Grupo 3		0,5659	0,0297
Grupo 2	LDH	0,4603	0,0062
Grupo 1		0,4306	0,0023
Bilirrubina indireta			
Grupo 3		0,5500	0,0362
Grupo 2	LDH	0,4629	0,0058
Grupo 1		0,4840	0,0005

Com base na correlação encontrada entre os níveis de HbF e os de bilirrubina, analisamos a correlação dentro dos grupos de haplótipos do gene da globina β^S . Foi encontrada uma correlação significativa entre os níveis de HbF e os de bilirrubina no grupo de homozigotos BEN/BEN (Tabela 26).

Tabela 26. Correlação dentro dos grupos de haplótipos do gene da globina β^S entre níveis de HbF e os de bilirrubina.

		Coefficiente de Spearman	Valor de p
Genótipo haplotípico		Bilirrubina total	
BEN/BEN		-0,5915	0,0007
BEN/CAR	HbF	-0,2557	0,1322
CAR/CAR		-0,2791	0,1519
Genótipo haplotípico		Bilirrubina indireta	
BEN/BEN		-0,5809	0,0010
BEN/CAR	HbF	-0,2345	0,1687
CAR/CAR		-0,3000	0,1209

Dada essa correlação encontrada entre o grupo de homozigotos pelo haplótipo BEN/BEN, analisamos dentro do mesmo grupo a distribuição dos polimorfismos no promotor do gene *UGT1A1*. Nos 29 pacientes com o haplótipo BEN/BEN, foram encontrados 7 (24,14%) do grupo 1, 15 (52,72%) do grupo 2 e 7 (24,14%) do grupo 3. Os valores médios da bilirrubina total, da bilirrubina indireta e da HbF são apresentados na tabela 27. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de bilirrubina ou de HbF entre os grupos de genótipos em *UGT1A1*. No entanto, houve correlação negativa no grupo genotípico 2, entre os níveis de bilirrubina e os níveis de HbF ($p < 0,0001$) (Tabela 28).

Tabela 27. Distribuição dos valores da bilirrubina e da hemoglobina fetal de acordo com os grupos de genótipos em *UGT1A1* no homozigotos BEN/BEN

Haplótipo BEN/BEN	Grupo1 (n=7)	Grupo 2 (n=15)	Grupo3 (n=7)	Valor do p ^a
BT	2,246 ± 1,229	2,355 ± 1,343	3,151 ± 2,007	0,8007
BI	1,734 ± 1,086	1,893 ± 1,149	2,659 ± 1,921	0,7015
HbF	8,757 ± 5,023	13,43 ± 9,939	8,671 ± 7,513	0,4653

Valores apresentados como média ± desvio padrão. ^a Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 28. Correlação entre os níveis de HbF e de bilirrubina nos diferentes grupos de genótipos em *UGT1A1* nos homozigotos BEN/BEN

		Coefficiente de Spearman	Valor de p
Bilirrubina total			
Grupo 1		-0,6071	0,1667
Grupo 2	HbF	-0,8821	<0,0001
Grupo 3		0,1071	0,8397
Bilirrubina indireta			
Grupo 1	HbF	-0,6429	0,1389
Grupo 2		-0,8607	<0,0001
Grupo 3		0,1071	0,8397

5.4.2 Análise de regressão linear multivariada entre os níveis de bilirrubina sérica e os parâmetros clínicos e laboratoriais

Com base nos resultados da associação entre os níveis séricos de bilirrubina e os demais parâmetros clínicos e laboratoriais, analisamos a influência das variáveis idade, Hb total, HbF e grupo genotípico em UGT1A1, em conjunto numa análise de regressão multivariada. A correlação da HbF deixou de ser significativa (Tabela 29).

Tabela 29. Análise de regressão linear multivariada entre os níveis de bilirrubina e os parâmetros clínicos e laboratoriais

Variável dependente	Variável independente	β	Valor de p	R ²	Valor de p do modelo
BT	Idade	0,268	0,003	0,387	0,000
	Hb	-0,347	0,000		
	HbF	-0,090	0,345		
	Grupo UGT1A1	0,353	0,000		
Variável dependente	Variável independente	β	Valor de p	R ²	Valor de p do modelo
BI	Idade	0,242	0,010	0,335	0,000
	Hb	-0,323	0,001		
	HbF	-0,091	0,359		
	Grupo UGT1A1	0,328	0,000		

^a: ANOVA; β : coeficiente de regressão; R²: coeficiente de determinação.

A partir dos resultados dos diferentes valores da correlação num modelo univariado e da regressão multivariada da HbF com os níveis séricos de bilirrubina, analisamos alguns polimorfismos em *BCL11A*, fator genético modificador do nível de HbF.

5.5 POLIMORFISMOS EM *BCL11A*

5.5.1 Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos em *BCL11A*

Os polimorfismos estudados no gene *BCL11A* foram o rs1427407 G>T e o rs7606173 G>C, e os genótipos encontrados foram GG, GT e TT, e GG, GC e TT respectivamente. Para o polimorfismo rs1427407, a frequência do genótipo selvagem GG foi de 61,86% e para o polimorfismo rs7606173, o genótipo heterozigoto GC teve uma frequência de 49,48% (Tabela 30). Quanto à frequência dos alelos, o alelo selvagem G no rs1427407 apresentou uma

frequência de 78,35%, enquanto a frequência do alelo selvagem G no rs7606173 foi de 56,7% (Tabela 31).

Tabela 30. Frequência dos genótipos nos polimorfismos em *BCL11A*

	Número de observações (n)	Frequência (%)
rs1427407		
GG	60	61,86
GT	32	32,99
TT	5	5,15
Total	97	100
rs7606173		
GG	31	31,96
GC	48	49,48
CC	18	18,56
Total	97	100

Tabela 31. Frequência alélica dos polimorfismos em *BCL11A*

	Número de observações (n)	Frequência (%)
rs 1427407		
G	152	78,35
T	42	21,65
Total	194	100
rs 7606173		
G	110	56,7
C	84	43,3
Total	94	100

5.5.2 Associação entre os níveis de hemoglobina fetal e os polimorfismos em *BCL11A*

Os níveis de HbF encontraram-se mais elevados nos indivíduos homocigotos TT para o alelo mutante T do polimorfismo rs1427407, enquanto para o polimorfismo rs7606173, esses níveis foram maiores nos homocigotos selvagens GG. Porém, essas diferenças observadas entre os diferentes grupos genotípicos de cada polimorfismo não foram significativas (Figura 8).

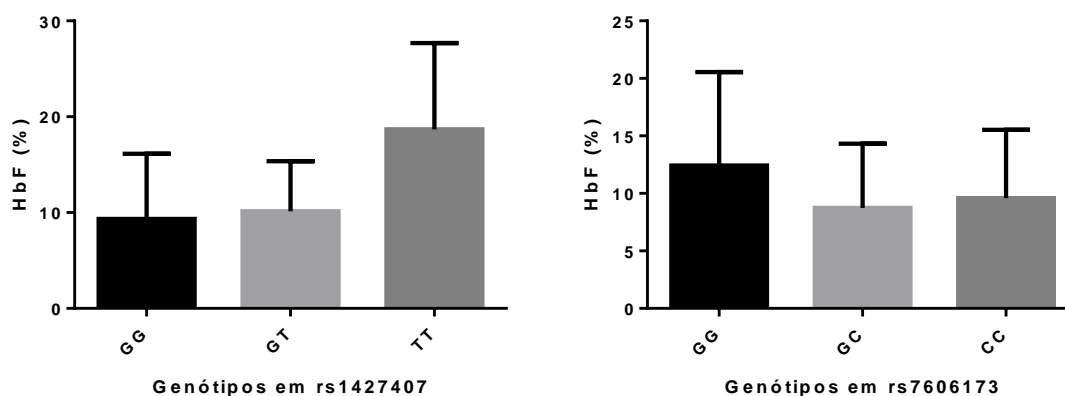


Figura 8. Diferença dos níveis de HbF entre os genótipos dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173

HbF: hemoglobina fetal. GG, GT, TT de rs1427407: genótipo selvagem, heterocigoto e mutante, respectivamente. GG, GC, CC de rs7606173: genótipo selvagem, heterocigoto e mutante, respectivamente.

5.5.3 Associação entre os níveis séricos de bilirrubina e os polimorfismos em *BCL11A*

Na análise das diferenças entre os níveis de bilirrubina total e de bilirrubina indireta de acordo com os diferentes genótipos, houve uma redução significativa no genótipo homocigoto selvagem GG do polimorfismo rs1427407 em comparação ao genótipo heterocigoto GT ($p=0,0106$ e $p=0,0103$, respectivamente para a bilirrubina total e a bilirrubina indireta). Para o polimorfismo rs7606173, não houve diferença significativa nos níveis de bilirrubina. Porém, os indivíduos homocigotos para o alelo selvagem GG tiveram níveis menores de bilirrubina (Figura 9).

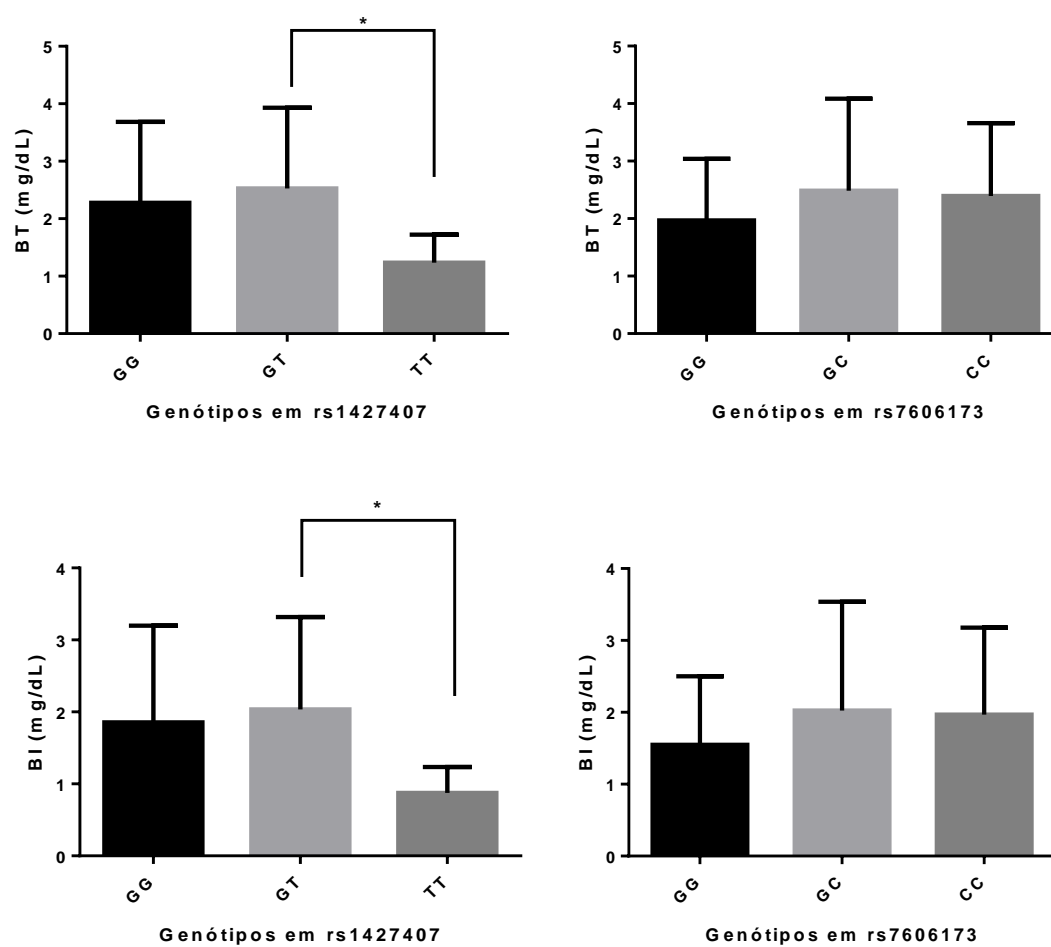


Figura 9. Níveis séricos de bilirrubina total e bilirrubina indireta nos genótipos dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173

BI: bilirrubina indireta, BT: bilirrubina total. GG, GT, TT de rs1427407: genótipo selvagem, heterozigoto e mutante, respectivamente. GG, GC, CC de rs7606173: genótipo selvagem, heterozigoto e mutante, respectivamente.

5.5.4 Associação entre os níveis de hemoglobina fetal e os polimorfismos em *BCL11A* nos haplótipos do gene da globina β^S

A análise dos níveis de HbF nos genótipos dos polimorfismos em *BCL11A*, de acordo com os haplótipos mostrou no grupo BEN/BEN um aumento significativo dos níveis de HbF nos indivíduos TT em comparação aos indivíduos GT para o polimorfismo rs1427407 ($p=0,0364$), apesar do número reduzido de pacientes com este genótipo. Já para o polimorfismo rs7606173, houve nível de HbF significativamente maior nos homozigotos selvagens GG em comparação aos heterozigotos GC ($p=0,0452$).

No grupo CAR/CAR, não foram encontrados pacientes homozigotos mutantes TT para o rs1427407. Ademais, não houve diferenças significativas nos genótipos dos dois polimorfismos estudados em relação ao nível de HbF.

No grupo de heterozigotos CAR/BEN, a diferença entre os níveis de HbF foi significativa entre os três grupos genotípicos para o polimorfismo rs1427407 ($p=0,008$). Mais especificamente, os níveis de HbF foram significativamente maiores no grupo de heterozigotos GT em comparação aos homozigotos selvagens GG ($p=0,0223$), e significativamente maiores no grupo de homozigotos mutantes TT em comparação aos homozigotos selvagens GG ($p=0,0079$). No polimorfismo rs7606173, não foi encontrada diferença significativa. No entanto, os níveis de HbF foram mais elevados nos indivíduos homozigotos selvagens GG (Figura 10).

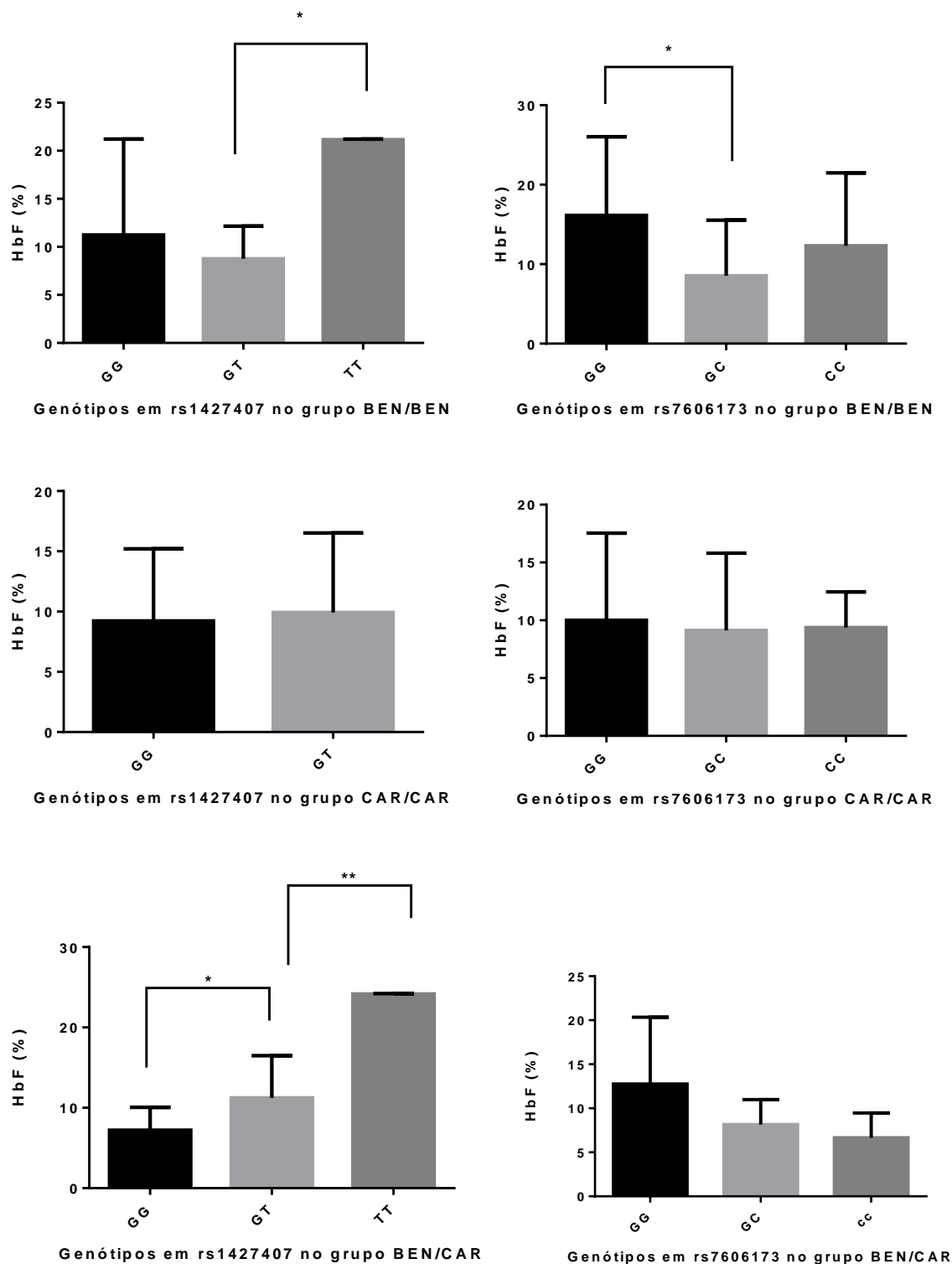


Figura 10. Diferenças dos níveis de HbF entre os genótipos dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173 nos diferentes grupos de haplótipos do gene da globina β^S

HbF: hemoglobina fetal. GG, GT, TT em rs1427407: genótipo selvagem, heterozigoto e mutante, respectivamente. GG, GC, CC em rs7606173: genótipo selvagem, heterozigoto e mutante, respectivamente

5.5.5 Distribuição dos polimorfismos de *BCL11A* de acordo com o uso de HU

Em vista desses resultados, e do fato de que o tratamento com HU foi significativamente associado a um aumento de HbF nos precedentes resultados, analisamos os parâmetros separando os indivíduos tratados com HU dos não tratados. As tabelas 32 e 33 apresentam a distribuição dos genótipos e alelos dos polimorfismos de *BCL11A* estudados, de acordo com o uso de HU. Não foram encontrados pacientes com o genótipo TT do polimorfismo rs1427407 sob tratamento com HU.

Tabela 32. Distribuição dos genótipos dos rs1427407 e rs7606173 de acordo com o uso de HU

	HU- (n=73)		HU+ (n=24)	
	Número de observações (n)	Frequência (%)	Número de observações (n)	Frequência (%)
rs1427407				
GG	44	60,27	16	66,67
GT	24	32,88	8	33,33
TT	5	6,85	0	0
Total	73	100	24	100
rs7606173				
GG	22	30,14	9	37,5
GC	39	53,42	9	37,5
CC	12	16,44	6	25,0
Total	73	100	24	100

Tabela 33. Distribuição dos alelos dos rs1427407 e rs7606173 de acordo com o uso de HU

	HU- (n=73)		HU+ (n=24)	
	Número de observações (n)	Frequência (%)	Número de observações (n)	Frequência (%)
rs1427407				
G	112	76,71	40	83,33
T	34	23,29	8	16,67
Total	146	100	48	100
rs7606173				
G	83	56,85	27	56,25
C	63	43,15	21	43,75
Total	146	100	48	100

5.5.6 Associação entre os níveis de hemoglobina fetal e os polimorfismos em *BCL11A* de acordo com o uso de HU

De modo contrário ao que foi observado na análise juntando os pacientes tratados e os não tratados, houve uma diferença significativa nos níveis de HbF entre os três genótipos em rs1427407 nos pacientes sem uso de HU ($p=0,0382$), sendo o maior nível de HbF encontrado no genótipo TT. Quanto ao polimorfismo rs7606173, não houve diferença na análise entre os três grupos, apesar de um nível maior de HbF ser observado nos indivíduos selvagens GG. Já nos pacientes com uso de HU, não foram encontradas diferenças significativas (Figura 11).

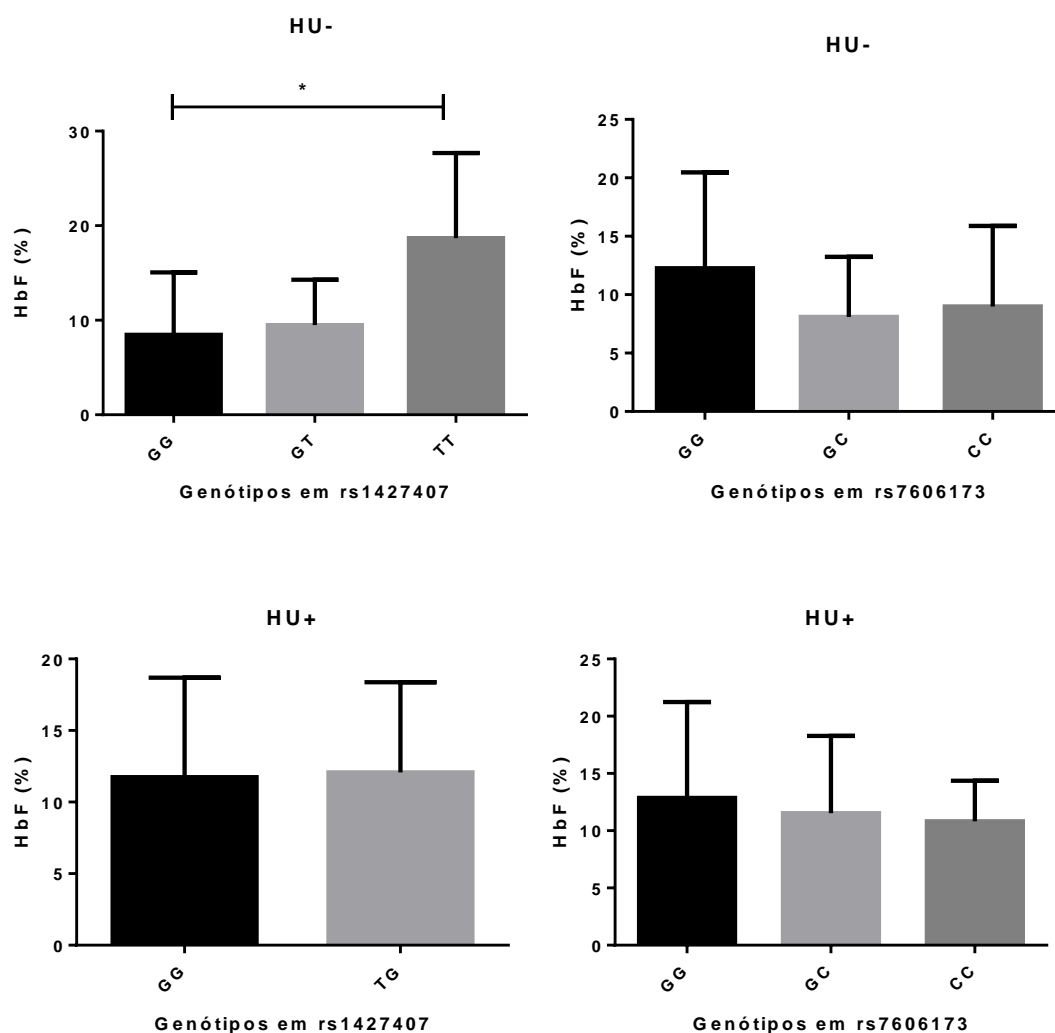


Figura 11. Níveis de HbF entre os genótipos dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173 de acordo com o uso de HU

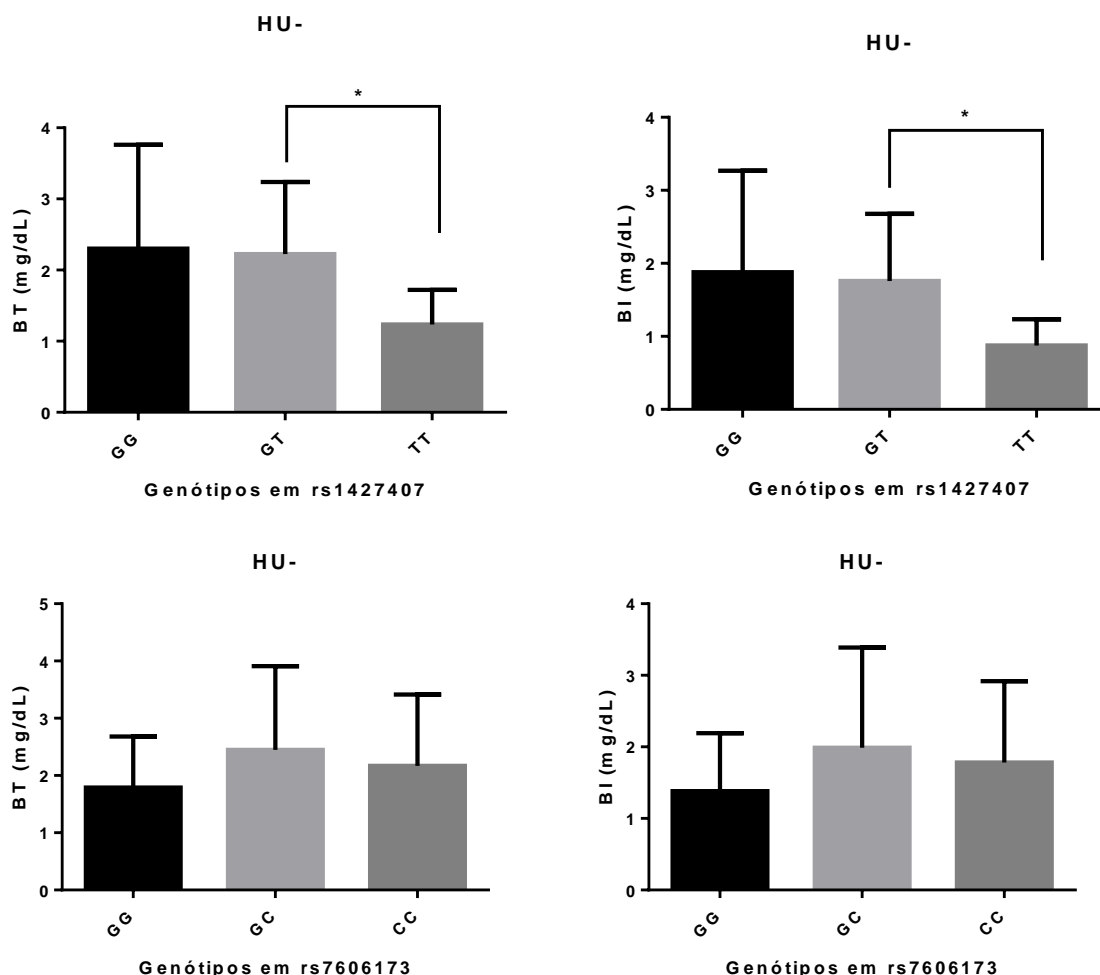
HbF: hemoglobina fetal. GG, GT, TT em rs1427407: genótipo selvagem, heterozigoto e mutante, respectivamente. GG, GC, CC em rs7606173: genótipo selvagem, heterozigoto e mutante, respectivamente.

5.5.7 Associação entre os níveis séricos de bilirrubina e os polimorfismos em *BCL11A* de acordo com o uso de HU

Semelhante aos achados na análise feita sem levar em conta o uso de HU, os níveis séricos de bilirrubina foram significativamente menores no genótipo TT do polimorfismo rs1427407 quando comparados aos heterozigotos GT, tanto para a bilirrubina total quanto para a bilirrubina indireta nos pacientes com uso de HU ($p=0,0102$ e $p=0,0108$, respectivamente). Para o polimorfismo rs7606173, os níveis de bilirrubina foram menores no genótipo GG. No entanto, essa diferença não foi significativa.

Nos pacientes em uso de HU, não foi observada diferença significativa entre os níveis de bilirrubina nos diferentes genótipos de cada polimorfismo estudado.

A figura 12 apresenta a distribuição dos níveis de bilirrubina total e bilirrubina indireta nos diferentes genótipos de cada polimorfismo estudado, de acordo com o uso de HU.



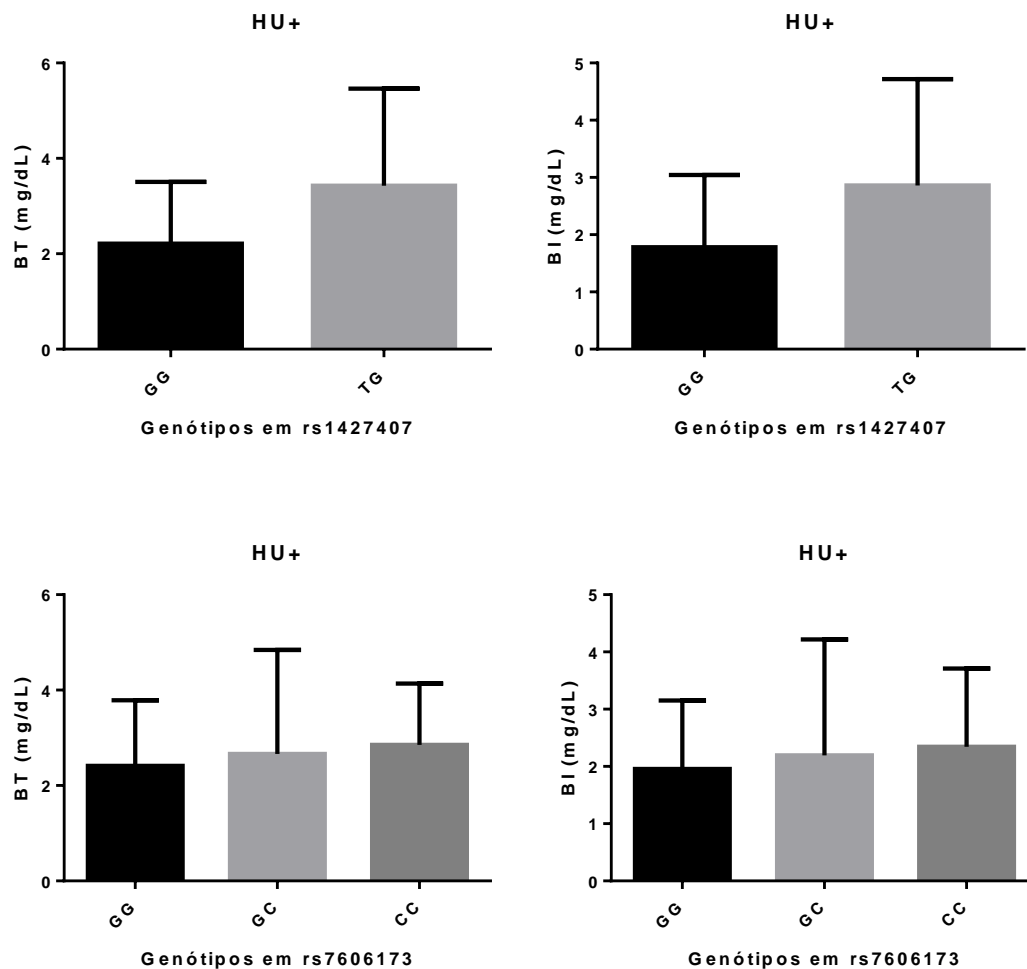


Figura 12. Níveis de bilirrubina total e bilirrubina indireta dos genótipos dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173 de acordo com o uso de HU.

BI: bilirrubina indireta. BT: bilirrubina total GG, GT, TT em rs1427407: genótipo selvagem, heterozigoto e mutante, respectivamente. GG, GC, CC em rs7606173: genótipo selvagem, heterozigoto e mutante, respectivamente.

5.5.8 Níveis de bilirrubina nos genótipos dos rs1427407 e rs7606173 do grupo (TA)_{7/7} + (TA)_{7/8} em *UGT1A1* nos pacientes sem uso de HU

Os níveis de bilirrubina do grupo de maior risco para o desenvolvimento de litíase biliar (grupo 3 em *UGT1A1* = (TA)_{7/7} + (TA)_{7/8}) foram avaliados em função do genótipo em *BCL11A*. Os menores níveis de bilirrubina foram encontrados no genótipo TT do rs1427407 e no genótipo GG do rs7606173 (Figura 13).

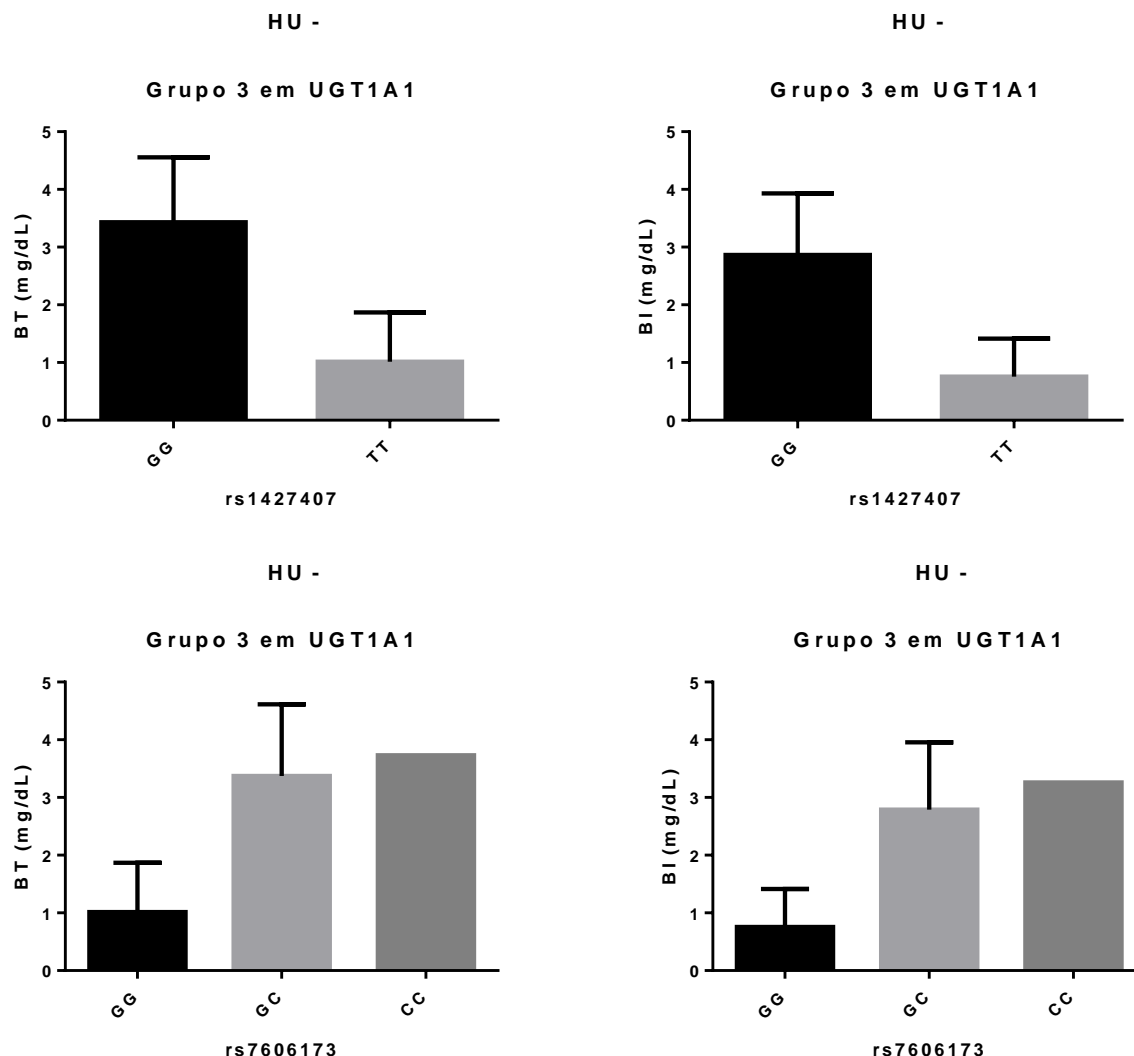


Figura 13. Níveis de bilirrubina de bilirrubina nos genótipos dos rs1427407 e rs7606173 do grupo (TA)_{7/7} + (TA)_{7/8} em UGT1A1 nos pacientes sem uso de HU

BI: bilirrubina indireta. BT: bilirrubina total GG, GT, TT em rs1427407: genótipo selvagem, heterozigoto e mutante, respectivamente. GG, GC, CC em rs7606173: genótipo selvagem, heterozigoto e mutante, respectivamente.

5.5.9 Associação entre os níveis de HbF e os genótipos dos polimorfismos em *BCL11A* nos diferentes haplótipos do gene da globina β^S em indivíduos sem uso de HU

A Figura 14 apresenta a distribuição dos níveis de HbF entre os genótipos dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173 para os indivíduos sem uso de HU. Não houve diferença significativa no grupo BEN/BEN e no grupo CAR/CAR. No grupo de heterozigotos BEN/CAR, houve uma diferença significativa entre os três genótipos ($p=0,0077$). O nível de HbF foi significativamente maior no grupo genótipo GG em comparação aos genótipos GT e TT ($p=0,0238$ e $p=0,0131$, respectivamente), e no genótipo TG em comparação ao genótipo TT

($p=0,0303$). No SNP rs7606173, houve também uma diferença significativa entre os três genótipos ($p=0,0233$). O nível de HbF foi significativamente maior no grupo genótipo GG em comparação aos genótipos GT e TT ($p=0,0111$ e $p=0,0451$, respectivamente).

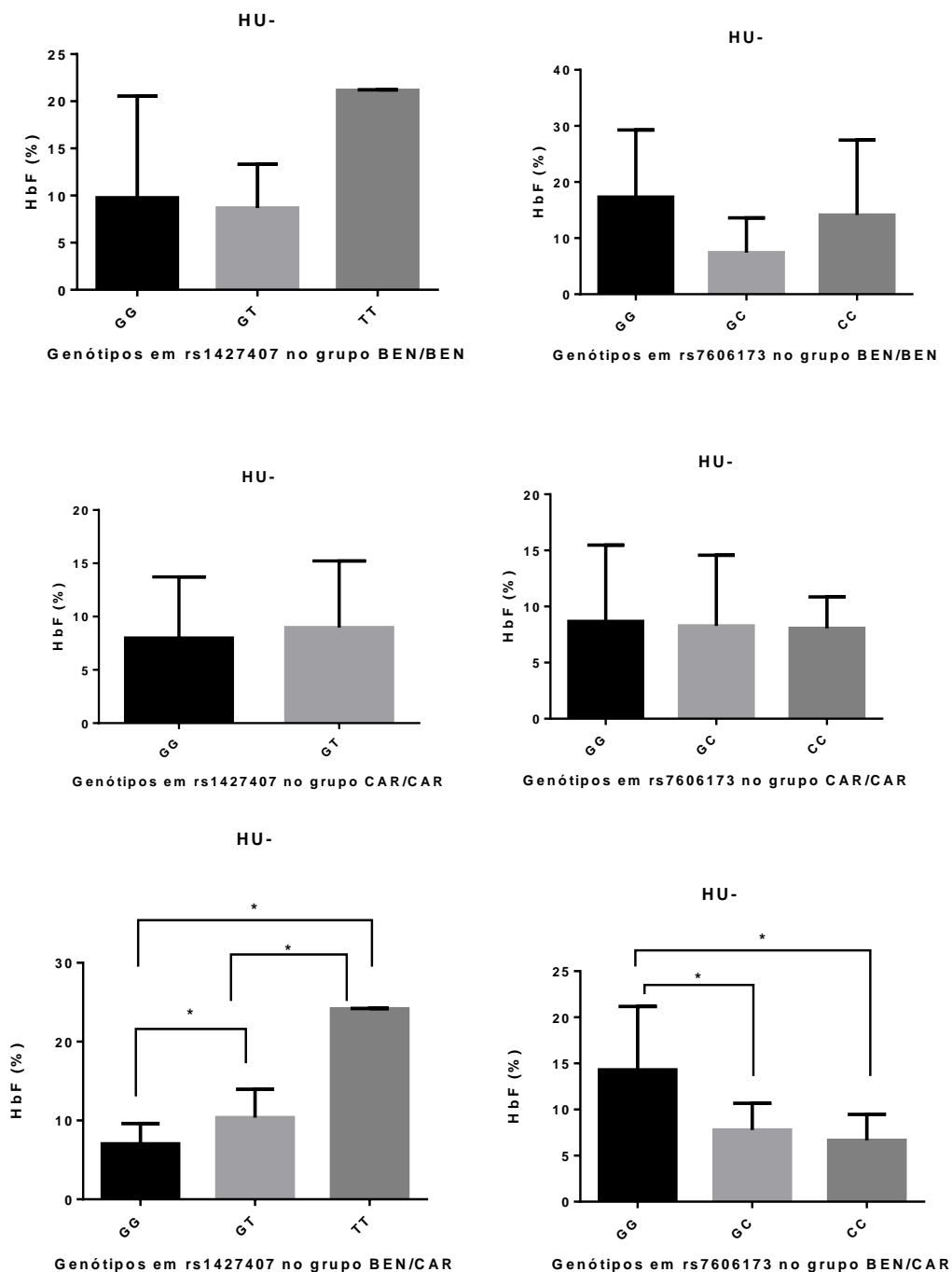


Figura 14. Níveis de HbF dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173 nos diferentes haplótipos do gene da globina β^S em indivíduos sem uso de HU

HbF: hemoglobina fetal. GG, GT, TT em rs1427407: genótipo selvagem, heterozigoto e mutante, respectivamente. GG, GC, CC em rs7606173: genótipo selvagem, heterozigoto e mutante, respectivamente.

5.5.10 Distribuição dos polimorfismos em *BCL11A* de acordo com os níveis séricos de bilirrubina nos diferentes grupos de haplótipos do gene da globina β^S

Foi avaliada a distribuição dos genótipos dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173 no quartil inferior (0,33-1,28 mg/dl) e no quartil superior (2,671-7,45 mg/dl) de bilirrubina total. Nenhum homocigoto mutante TT para o rs1427407 foi encontrado no quartil superior de bilirrubina total (Figura 15).

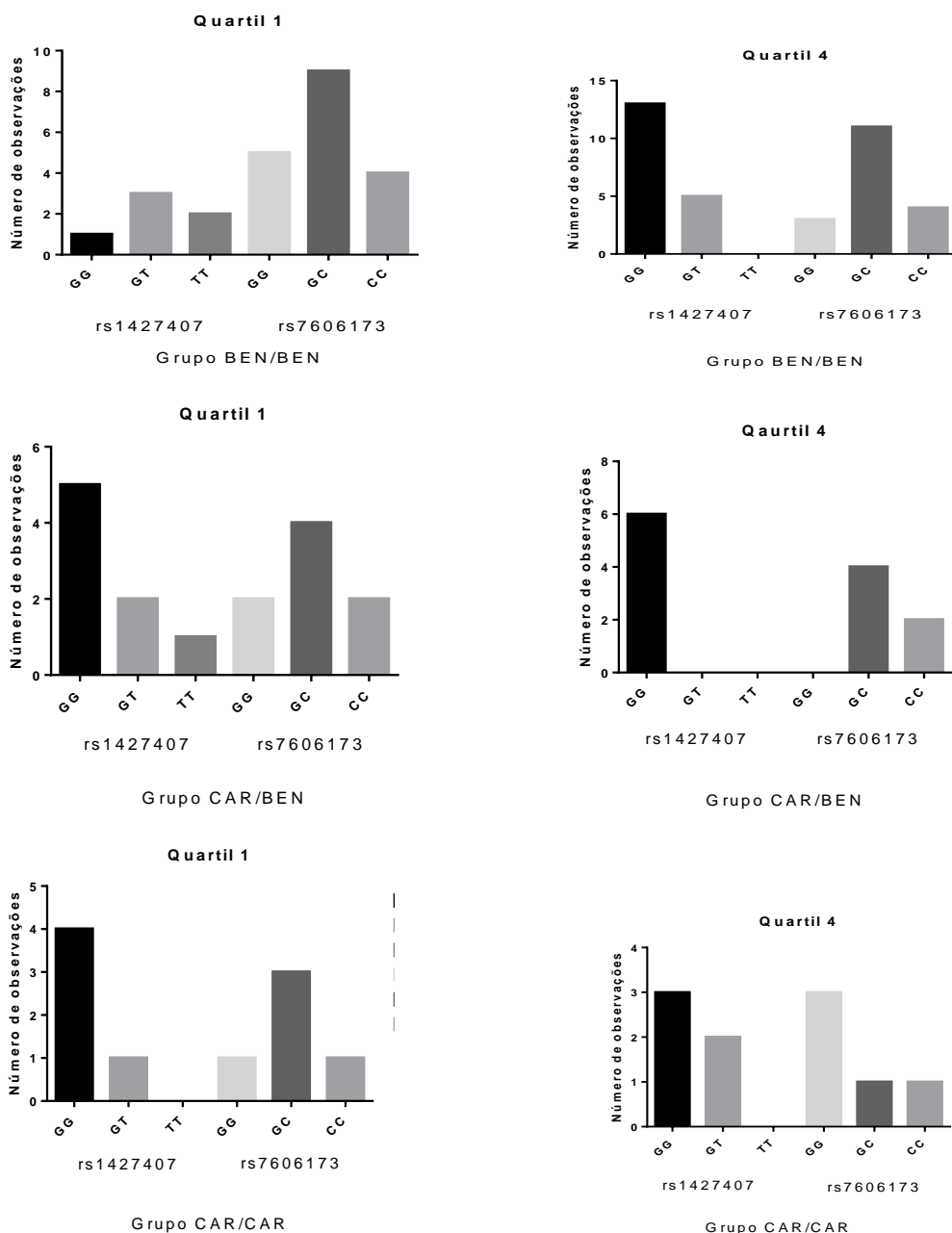


Figura 15. Distribuição dos genótipos nos polimorfismos rs1427407 e 7606173 de acordo com os níveis de bilirrubina total nos diferentes haplótipos nos indivíduos sem uso de HU.

BT: bilirrubina total. Quartil inferior = 0,33-1,28 mg/dL. Quartil superior = 2,671-7,45 mg/dL

Quanto à distribuição dos alelos dos polimorfismos em *BCL11A* de acordo com os quartis de bilirrubina (Tabela 34), foi encontrada uma frequência significativamente maior do alelo T no quartil inferior (12/38=31,58%) comparativamente ao quartil superior (7/58=12,07%) para o polimorfismo rs1427407 ($p=0,019$, $OR= 3,363$ $IC_{95}OR= [1,182; 9,564]$).

Tabela 34. Distribuição dos alelos dos polimorfismos no gene *BCL11A* de acordo com os níveis de bilirrubina total nos pacientes sem uso de HU

Alelo	Quartil superior** (n)	Quartil inferior* (n)	Total	Valor de p
rs1427407				
G	51	26	77	0,0190 ^{a*}
T	7	12	19	
Total	58	38	96	
rs7606173				
G	28	32	60	0,7148 ^a
C	30	30	60	
Total	58	62	120	

Quartil inferior = 0,33-1,28 mg/dL, Quartil superior = 2,671-7,45 mg/dL, ^a Teste de Qui-quadrado, * $OR= 3,363$ $IC_{95}OR= [1,182; 9,564]$.

5.5.11 Distribuição dos alelos dos polimorfismos no gene *BCL11A* de acordo com os níveis de HbF nos pacientes sem uso de HU

A avaliação da distribuição dos alelos dos polimorfismos rs1427407 e rs7606173 de acordo com os quartis de HbF nos pacientes sem uso de HU mostrou uma frequência significativamente maior do alelo T no quartil superior (14/34=41,18%) comparativamente ao quartil inferior (4/36=11,11%) para o polimorfismo rs1427407 ($p=0,0058$, $OR= 5,600$ $IC_{95}OR= [1,614; 19,43]$). Esses achados são apresentados na tabela 35.

Tabela 35. Distribuição dos alelos dos polimorfismos no gene *BCL11A* de acordo com os níveis de HbF nos pacientes sem uso de HU

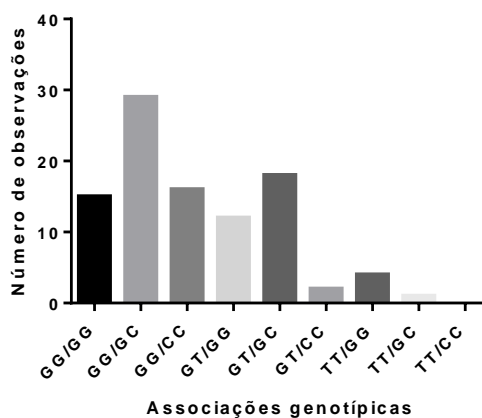
Alelo	Quartil superior** (n)	Quartil inferior* (n)	Total	Valor de p
rs1427407				
G	20	32	52	0,0058 ^{b*}
T	14	4	18	
Total	34	36	70	
rs7606173				
G	24	20	44	0,1933 ^a
C	10	16	26	
Total	34	36	70	

* Quartil inferior = 0,7-4,85mg/dL, **Quartil superior = 11,11-32,2 mg/dL, ^a Teste de Qui-quadrado, ^b Teste exato de Fisher, * $OR = 5,600$ $IC_{95}OR = [1,614; 19,43]$.

5.5.12 Associações genóticas entre os polimorfismos em *BCL11A*

As frequências e as distribuições das associações entre os genótipos dos rs1427407 e rs7606173 são apresentadas nas figuras 16 A e B. Nenhuma associação TT/CC foi encontrada. Os indivíduos do grupo haplotípico BEN/BEN apresentaram 2 e 3 associações genóticas a mais do que os indivíduos CAR/BEN e CAR/CAR, respectivamente (Figura 17).

A: Associações genóticas nos indivíduos independentemente do uso de HU



B: Associações genóticas nos indivíduos sem uso de HU

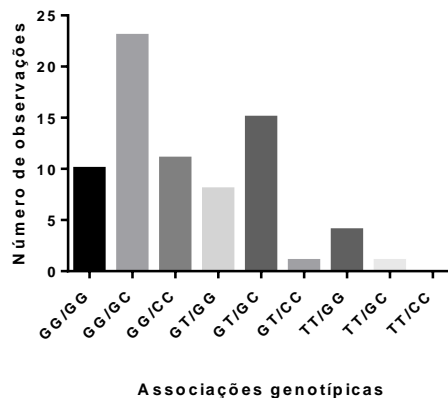


Figura 16. Associações genóticas entre o SNP rs1427407 e o SNP rs7606173

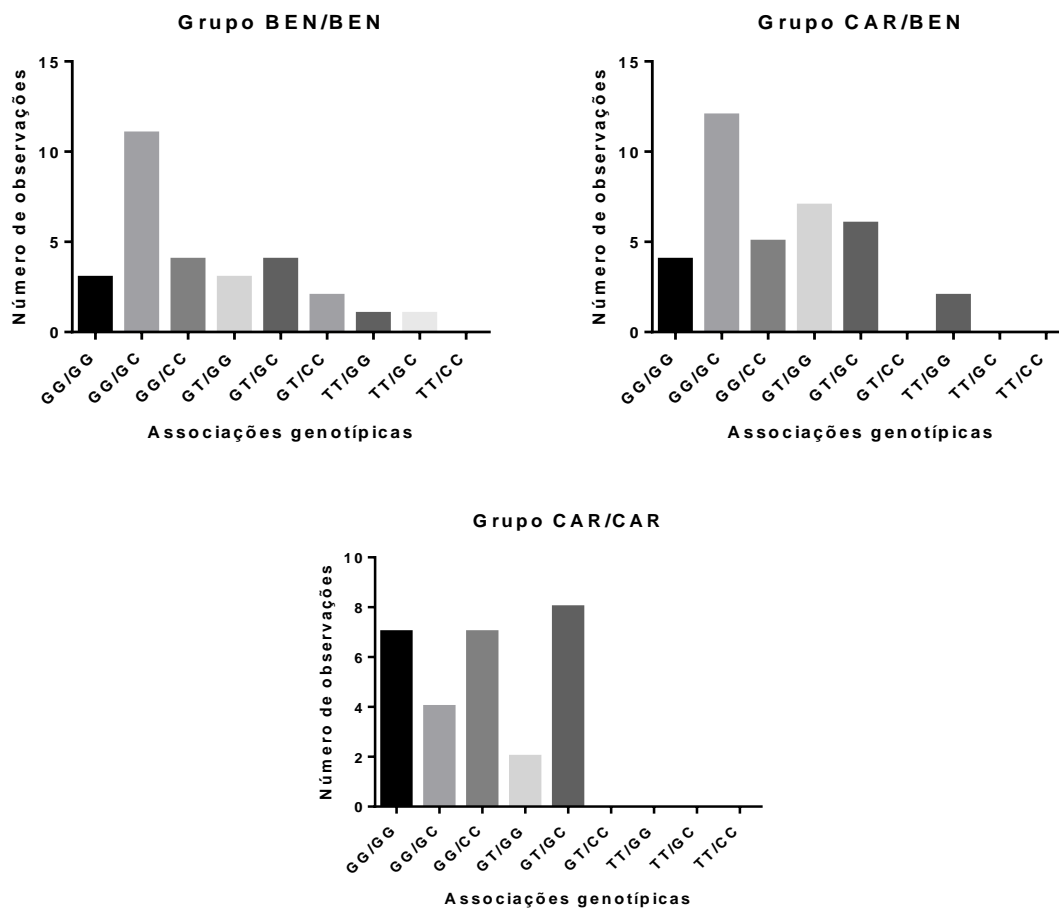


Figura 17. Distribuição das associações genotípicas nos diferentes grupos de haplótipos do gene da globina β^S

A associação genotípica relacionada a maior nível de HbF e conseqüente menor nível de bilirrubina foi TT/GG. As associações genotípicas com os menores níveis de HbF foram GG/GC, GG/CC, e GT/GC. A associação genotípica com menor nível de HbF e maior nível de bilirrubina foi a GG/GC (figura 18).

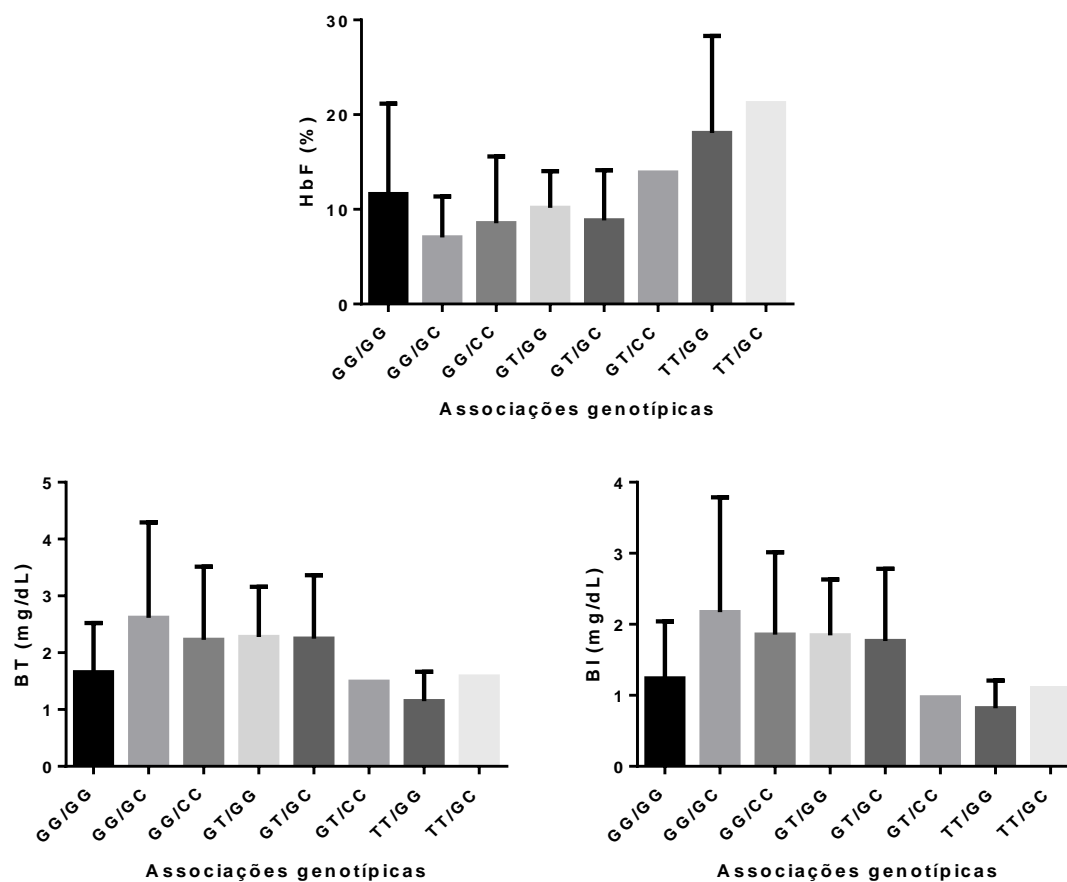


Figura 18. Níveis de HbF e de bilirrubina das diferentes associações genóticas em indivíduos sem uso de HU.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Observações gerais

A anemia falciforme é uma doença de apresentação fenotípica muito heterogênea, dependente de vários fatores socioeconômicos, genéticos e epigenéticos interligados. Os maiores modificadores genéticos da AF descritos são os níveis de HbF, os haplótipos do gene da globina β^S e a co-herança da talassemia alfa (STEINBERG, 2009).

A grande variabilidade observada nos parâmetros genéticos e biológicos dos pacientes acometidos por AF, e a gravidade a ela associada, demonstram a necessidade de um monitoramento personalizado dos pacientes.

Devido à hemólise exacerbada que ocorre nesses pacientes, os níveis séricos de bilirrubina, metabolito da degradação da hemoglobina, costumam ser elevados na AF. Assim, hiperbilirrubinemia e a icterícia são achados comumente encontrados em indivíduos com AF. No entanto, existe uma grande variabilidade nos níveis e estudos já tem demonstrado associação com polimorfismos genéticos, especialmente no gene da enzima UGT1A1, que é a principal responsável pela conjugação da bilirrubina, que a hidrossolúvel e fácil de ser excretada (BOSMA *et al.*, 1995).

A hidroxiureia, droga cuja eficiência foi comprovada na melhoria do quadro clínico de pacientes graves, é capaz de reduzir a morbidade e a mortalidade da AF. Embora seja um mecanismo indireto, o efeito observado pelo uso de HU deve-se ao aumento da HbF, entre outros. Níveis aumentados de HbF, por comprometer a polimerização da HbS, são associados a menor hemólise e portanto a níveis reduzidos de bilirrubina sérica. No entanto, foi observada uma grande variabilidade na resposta ao tratamento com HU (WARE 2002; 2010). Assim, acredita-se que fatores genéticos possam explicar essas diferenças encontradas nos pacientes com AF tratados com HU.

No presente trabalho, estudamos um grupo de pacientes no qual um quarto estava sob tratamento com HU, e com idade média inferior a 10 anos, fatores que podem indicar a gravidade do quadro clínico. Quanto aos eventos clínicos, foi encontrada uma diferença significativa na ocorrência de internações entre os pacientes tratados com HU e os não-tratados, com uma proporção maior de internação nos pacientes HU+. Do mesmo modo, houve uma porcentagem do relato da ocorrência de litíase biliar entre os pacientes tratados com HU quase sete vezes maior do que os não tratados com HU. Apesar da aparente contradição nestas observações, estes dados são esperados, pois refletem a maior gravidade clínica destes pacientes, cuja terapia com HU é recomendada seguindo as diretrizes de uso da HU no Brasil

(BRASIL. Ministério da Saúde, 2014). Esta observação poderia ser comprovada por meio do monitoramento da ocorrência dos eventos clínicos e internações antes e depois do início da terapia com HU, que costuma acarretar melhoria clínica dos pacientes, com redução do número de internações e dos demais eventos clínicos.

Em relação aos dados laboratoriais analisados, os indivíduos em uso de HU apresentaram níveis de HbF significativamente elevados. Esse achado é esperado, já que o mecanismo mais descrito para o benefício da HU na melhoria clínica dos pacientes com AF ocorre justamente devido ao aumento dos níveis de HbF, entre outros fatores. A HbF interfere na polimerização da HbS, o que reduz a falcização das hemácias e os demais eventos subsequentes. Esse resultado é semelhante aos de outros estudos (GREEN; BARRAL, 2011; TORRES *et al.*, 2012).

Os indivíduos com AF costumam ter contagens elevadas de leucócitos, e o recrutamento contínuo de leucócitos aderentes é um fator importante da fisiopatologia dos eventos vasooclusivos (CHIANG e FRENETTE, 2005; FRENETTE e ATWEH, 2007; ODIÈVRE *et al.*, 2011). Foi demonstrado que o uso de HU reduz a contagem de leucócitos (ZHU *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2013). O presente estudo está em conformidade com esta observação, pois também ocorreu uma redução significativa da contagem de leucócitos nos indivíduos com uso de HU em comparação sem uso. Apesar de não ser significativa, também houve uma redução na contagem de neutrófilos, sendo que a contagem elevada de neutrófilos é um fator associado à maior gravidade na AF (PLATT *et al.*, 1994).

A hemólise crônica leva à elevação dos níveis de LDH, que é um marcador de citólise. No presente estudo, o uso de HU reduziu significativamente os níveis de LDH, o que sugere uma melhoria do quadro de hemólise nos indivíduos em uso de HU. No entanto, houve um aumento dos níveis de bilirrubina total e indireta nos pacientes com uso de HU, mas não foi significativo. Um efeito do uso de HU é o aumento do VCM, que foi descrito como fortemente correlacionado à redução dos sintomas (CHARACHE *et al.*, 1995; SILVA-PINTO *et al.*, 2013), e que serve como parâmetro de monitoramento da eficácia do tratamento. Em concordância, os indivíduos sob tratamento com HU do presente estudo apresentaram valores significativamente maiores do VCM.

Neste estudo, a HbF não foi significativamente maior nos pacientes menores de dez anos em relação aos maiores de 10 anos. Esses resultados são diferentes do relatados por ADEKILE *et al.* (2005) que encontraram níveis significativamente maiores de HbF em pacientes menores de 10 anos e de sexo feminino. A diferença poderia ser explicada pelo fato de que o estudo deles envolveu tanto crianças quanto adultos, ao contrário dos pacientes deste estudo que

limitou-se à faixa etária pediátrica. Outros estudos também demonstraram que na infância, os níveis de HbF são maiores e diminuem progressivamente (ADEKILE & HUISMAN, 1993). Essa mudança na expressão dos genes das globinas é controlada por diversos fatores genéticos, o mais conhecido sendo a região de controle do locus do gene da globina β^S e o promotor do gene da globina G^γ (NAGEL, 1991). Separando os pacientes pelo gênero, nenhuma diferença significativa foi encontrada nos parâmetros estudados. Estudos descreveram um fator genético ligado ao cromossomo X que contribuiria para a determinação do nível de HbF, e os pacientes de sexo feminino teriam maiores níveis de HbF (DOVER, 1992; LABIE *et al.*, 1991; STEINBERG, 1995). No presente estudo, não foi encontrada diferença dos níveis de HbF entre os pacientes de acordo com o gênero, em desacordo com o estudo de Adekile *et al.* (2005). A grande complexidade da fisiopatologia da AF e as interações entre os fatores genéticos e epigenéticos envolvidos na determinação do fenótipo da AF podem explicar essa aparente discrepância.

Os níveis de bilirrubina total e de bilirrubina indireta foram significativamente menores nos indivíduos menores de dez anos quando comparados aos maiores, em concordância com os dados de Adekile *et al.* (2005). Pelo fato da HbF diminuir significativamente com a idade, (ADEKILE & HUISMAN 1993), a hemólise tende a ser maior nos pacientes de maior idade e portanto, são esperados níveis maiores de bilirrubina nestes pacientes. No entanto, no presente estudo, apesar da HbF ser maior nos indivíduos com menos de dez anos, essa diferença não foi significativa. Ademais, os níveis de LDH foram menores nos indivíduos menores que dez anos de idade, e, da mesma forma que a HbF, a diferença não foi significativa na comparação com os indivíduos mais velhos.

Entre os fatores genéticos que podem determinar a taxa de HbF, os haplótipos do gene da globina β^S tem uma influência importante (POWARS,1991). O alelo BEN é associado a níveis de HbF entre 5 e 15%, e o alelo CAR é associado a níveis menores, com maior gravidade clínica associada (FLEURY, 2007; SHIMAUTI *et al.*, 2015). Neste estudo, o nível de HbF foi maior no grupo BEN/BEN em comparação com o grupo BEN/CAR e o grupo CAR/CAR, mas não foi significativo. Da mesma forma, os níveis de bilirrubina não mostraram diferença significativa entre os grupos de haplótipos. Ao analisar a influência do tratamento com HU sobre os níveis de HbF e de bilirrubina nos diferentes grupos haplotípicos, o tratamento com HU foi associado a um aumento significativo de quase duas vezes no nível de HbF no grupo CAR/CAR. Porém, não houve diferença significativa nos níveis de bilirrubina, sugerindo a influência de outros polimorfismos genéticos.

A talassemia alfa é um dos fatores genéticos modificadores na gravidade da AF, independentemente dos níveis de HbF. Os indivíduos com um traço alfa-talassêmico tendem a apresentar um melhor quadro hemolítico, devido à microcitose e à diminuição da concentração corpuscular média de HbS que ocorre na talassemia alfa (ADAMS *et al.*, 1994; ADEKILE *et al.*, 1996; NAGEL, 1991; STEINBERG, 1984). No presente estudo, 24% dos pacientes eram portadores de um traço talassêmico, e mostraram VCM e CHCM significativamente menores quando comparados a pacientes sem talassemia, conforme o esperado. Essas células menores fluem com mais facilidade na circulação sanguínea dos pacientes com AF frequentemente acometida por vários fenômenos de inflamação, ativação e adesão celular. Portanto, os pacientes com um traço alfa-talassêmico tendem a apresentar menor hemólise. Entretanto, neste estudo, não foi encontrada diferença entre os marcadores de hemólise estudados, especialmente a bilirrubina e o LDH, de acordo com o número de deleções $\alpha_2^{\text{del}3,7\text{kb}}$. Ao separar os indivíduos de acordo com o uso ou não da HU, o nível de HbF se mostrou significativamente maior no grupo sem talassemia alfa e com uso de HU, e os níveis de LDH foram significativamente menores. Neste mesmo grupo, o VCM foi significativamente maior, como esperado. Esses achados reforçam o benefício do uso da HU nos pacientes com AF, especialmente para aqueles que não possuem a vantagem da co-herança do traço alfa-talassêmico. Já no grupo com traço talassêmico, apesar de não haver diferença significativa, foram observados níveis reduzidos de HbF nos indivíduos com uso de HU. Esses pacientes poderiam ter quadro clínico grave, por terem níveis basais reduzidos de HbF, que justificaram o início da terapia com HU.

Associação dos polimorfismos no promotor do gene *UGT1A1* com os dados clínicos e laboratoriais

Em relação com os fatores genéticos que alteram o metabolismo da bilirrubina, produto tóxico do metabolismo do heme, os polimorfismos no promotor do gene *UGT1A1* foram bem caracterizados por alterar a eficiência transcricional do gene *UGT1A1* e conseqüentemente a atividade da enzima por ele codificada. Essa enzima é responsável por transformar a bilirrubina indireta em bilirrubina direta que é um metabolito menos tóxico, hidrossolúvel e capaz de ser facilmente depurado. O alelo selvagem denominado (TA)₆ consiste de seis repetições do tandem TA no promotor do gene. A depender de número de repetições na variantes, a relação é inversa entre o número de repetições (TA)_n e a eficiência transcricional da enzima UGT1A1. No presente estudo, a frequência do alelo (TA)₇ foi menor do que o alelo selvagem (35,57% e 60,31%, respectivamente). Fertrin *et al.* (2002), no seu estudo em diferentes grupos étnicos da

população brasileira mostraram que a distribuição dos alelos dos polimorfismos no promotor do gene *UGT1A1* variava de acordo com a etnia, e que, em afrodescendentes a frequência do alelo (TA)₇ era de 40,7%. Beutler *et al.* (1998) relataram uma frequência de 42,6% do alelo (TA)₇ em pacientes com graus variados de ancestralidade africana. No seu estudo em crianças afrodescendentes com AF, Passon *et al.* (2001) descreveram uma frequência de 46,1% do alelo (TA)₇. No entanto, Adekile *et al.* (2005) encontraram uma frequência bem maior, de 56% do alelo (TA)₇. Portanto, existem diferenças étnicas na distribuição deste polimorfismo. O presente estudo contribui para a confirmação desta observação, pois envolveu uma maioria de indivíduos afrodescendentes.

A menor frequência dos alelos de risco no presente estudo é condizente com a relativa menor frequência de ocorrência de litíase biliar nos indivíduos estudados (10,31%). A frequência do alelo (TA)₇ em pacientes com litíase biliar foi de 50% (10/20). Porém, não foi encontrada associação significativa entre os alelos de risco e a ocorrência de litíase biliar. No seu estudo com pacientes tunisianos (África do Norte), Chaouch *et al.* (2013) encontraram uma frequência de 58,6% do alelo (TA)₇, que estava significativamente associado à ocorrência de litíase biliar em pacientes com AF. A diferença que encontramos neste estudo poderia ser explicada pelo número menor de relato de litíase biliar no grupo estudado, em comparação com o grupo desses autores. No entanto, quando analisamos o grupo de genótipos (TA)_{7/7} e (TA)_{7/8} (grupo 3), encontramos um risco significativamente maior de litíase biliar, em comparação ao grupo (TA)_{5/6} e (TA)_{6/6} (grupo 2). Esses achados são semelhantes aos de Chaouch *et al.* (2013), que relataram que os genótipos (TA)_{7/7} e (TA)_{7/8} estavam significativamente associados à ocorrência de litíase biliar em pacientes tunisianos com AF, enquanto essa associação não foi encontrada no grupo sem AF do seu estudo.

Os valores de bilirrubina total e indireta diferiram significativamente entre os grupos de genótipos de *UGT1A1*, com a maior diferença encontrada entre o grupo de menor risco (grupo 2) e o grupo de maior risco (grupo 3). Esses achados são condizentes com o que foi descrito em relação à atividade da enzima *UGT1A1*, com os alelos com maior repetição do tandem TA sendo associados a níveis maiores de bilirrubina indireta. Os resultados neste estudo são semelhantes aos relatados por Adekile *et al.* (2005), que encontraram níveis significativamente elevados de bilirrubina nos homocigotos (TA)₇, tanto em adultos quanto em crianças, e aos que foram descritos em crianças com AF no estudo de Passon *et al.* (2001).

Os níveis de LDH e de bilirrubina indireta aumentam de acordo com o grau de hemólise dos pacientes, sendo assim usados conjuntamente como marcadores do grau de hemólise. No entanto, essa observação deve ser interpretada de forma diferente quando se consideram os

diferentes genótipos de UGT1A1. Isso é corroborado no presente trabalho, no qual os níveis de LDH encontravam-se menores no grupo 3, que compreende pacientes com níveis elevados de bilirrubina, em comparação com o grupo 1, que apresentam níveis menores de bilirrubina. O significado disso é que quando ocorre a menor atividade de UGT1A1, a bilirrubina deixa de ser um marcador de hemólise. Assim, a determinação dos genótipos de *UGT1A1* modifica a análise dos parâmetros laboratoriais de hemólise.

Em relação ao tratamento com HU, foi encontrada diferença significativa, com apenas um quinto dos alelos com menor risco no grupo tratado com HU, enquanto um terço dos alelos com risco intermediário a maior (alelos (TA)₇ e (TA)₈) se encontrou no grupo tratado.

Na análise geral, ao contrário do esperado, os níveis séricos de bilirrubina estavam maiores em pacientes tratados com HU. Porém os reticulócitos estavam menores, a HbF estava maior, a LDH estava menor, o que é esperado nos pacientes tratados com HU. Isso sugere que, talvez por apresentarem maior gravidade clínica, o tratamento com HU tenha sido mais indicado nesses pacientes. Nosso resultado é diferente dos achados de Sheehan *et al.* (2013), que em estudo com crianças entre nove e 18 meses de idade, encontraram valores significativamente reduzidos de bilirrubina após um ano de tratamento com HU. Este estudo envolveu pacientes muito jovens. Nessa idade, os níveis de HbF são elevados e conseqüentemente, é esperado menor hemólise nesses pacientes. No presente estudo, analisando os dados por grupo de genótipo de risco apenas em pacientes com uso de HU, apesar da diferença não ser significativa, os níveis de bilirrubina total e indireta foram maiores no grupo (TA)_{7/7} ou (TA)_{7/8} (grupo 3). Adekile *et al.* (2005) também relataram que os seus pacientes sob tratamento com HU mostraram níveis maiores de bilirrubina dentro do grupo (TA)_{7/7}. Heeney *et al.* (2003) mostraram que os níveis de bilirrubina nos pacientes com AF e com o genótipo (TA)_{6/6} se estabilizaram sob tratamento com HU, enquanto nos pacientes com o genótipo (TA)_{7/7}, os níveis permaneceram elevados. Italia *et al.* (2010) relataram que o tratamento com HU não foi capaz de reduzir a valores normais os níveis de bilirrubina em pacientes com o genótipo (TA)_{7/7}, sugerindo que este efeito genético poderia ser um alvo terapêutico para esses pacientes. É preciso acompanhar esses pacientes para poder entender por que mesmo sob tratamento com HU, esses níveis seus de bilirrubina continuam sendo altos.

Os demais parâmetros laboratoriais não variaram nos grupos genotípicos para *UGT1A1* tanto na análise geral quanto na análise somente em pacientes com uso de HU. Isso sugere que as variações nos níveis de bilirrubina encontradas nos diferentes grupos genotípicos estejam mais relacionadas aos próprios polimorfismos em *UGT1A1* do que aos outros parâmetros laboratoriais.

Ao analisar a distribuição dos grupos genotípicos de acordo com os quartis dos níveis séricos da bilirrubina, houve uma diferença significativa entre os quartis inferior e superior, os genótipos associados a risco intermediário (grupo 2) e risco elevado (grupo 3) apresentando maior frequência no quarto superior. Associação semelhante é encontrada com a distribuição dos alelos. Os resultados do presente estudo são semelhantes aos de Chaouch *et al.* (2013), que mostraram que as crianças com AF portadores de genótipos contendo o alelo (TA)₇ e o alelo (TA)₈ apresentavam maiores níveis de bilirrubina.

Todos esses achados reforçam o fato de que os indivíduos que possuem um número de repetições do tandem nucleotídico TA maior do que seis apresentam níveis de bilirrubina elevados. No contexto da AF no qual a hemólise é exacerbada, a depuração mais lenta da bilirrubina devido à diminuição da atividade enzimática pode ser ainda mais prejudicial ao quadro clínico desses pacientes, com propensão à formação de litíases biliares.

Com base no fato que maiores níveis de HbF estão associados a menor hemólise e, portanto, a níveis menores de bilirrubina, foi analisada a influência do haplótipos do gene da globina β^S nos níveis de bilirrubina. Da mesma forma como ocorreu no presente estudo em relação à HbF, não foi encontrada diferença entre os quartis inferior e superior de bilirrubina, com relação à distribuição dos haplótipos.

A melhoria clínica dos pacientes com traço alfa-talassêmico acontece, entre outros, por meio da redução do volume e do conteúdo das hemácias que resulta em maior grau de deformabilidade e circulação facilitada, com risco menor de fenômenos de adesão, de hemólise e menores níveis de bilirrubina a ser depurada. No presente estudo, apesar da talassemia alfa ter se mostrado na análise geral em associação com células microcíticas, não foi encontrada diferença entre os quartis inferior e superior dos níveis de bilirrubina em relação com o número de deleções $\alpha_2^{\text{del}3,7\text{kb}}$, sugerindo a influência de outros fatores na determinação dos níveis de bilirrubina encontrados. Essa observação pode ser explicada, pelo menos em parte, pelos diferentes genótipos de UGT1A1. Dessa maneira, no presente estudo, foi observado que os níveis de bilirrubina foram significativamente menores no grupo 1 (grupo de menor risco) em pacientes com traço alfa-talassêmico quando comparados aos pacientes sem talassemia alfa. Este achado é semelhante ao de Chaar *et al.* (2006) que observaram que o efeito do traço talassêmico sobre os níveis de bilirrubina indireta era evidente apenas no grupo genotípico 1 de UGT1A1. Nos demais grupos, a maquinaria da conjugação hepática da bilirrubina é tão lenta que não se poderia observar qualquer efeito da talassemia alfa sobre os níveis de bilirrubina.

Os níveis de bilirrubina elevados estavam significativamente associados à ocorrência de litíase nos achados deste estudo. De forma esperada, níveis menores de HbF foram também

associados à ocorrência de litíase. Quanto à análise da ocorrência de litíase biliar nos grupos genotípicos de risco, foi encontrada uma frequência significativamente maior no grupo 1 em relação ao grupo 3, achados condizentes com a literatura (CHAAR *et al.*, 2005). Os pacientes pertencentes ao grupo 2 encontraram-se com risco intermediário.

Os parâmetros que mostraram correlação significativa com os níveis de bilirrubina foram a idade, os níveis de hemoglobina, os níveis de hemoglobina fetal, os níveis de LDH e os grupos genotípicos em *UGT1A1*.

A correlação entre a idade e os níveis de bilirrubina foi positiva e isso é consistente com a correlação negativa que existe entre a idade e os níveis de HbF.

Analisando a correlação dentro de cada grupo genotípico, os níveis de bilirrubina se mostraram correlacionados negativamente aos níveis de HbF no grupo de menor risco (grupo 1) e no grupo de risco intermediário (grupo 2). No entanto, essa correlação se perdeu no grupo 3, ou seja, teve uma tendência positiva, apesar de não ser significativa. Isso sugere que a correlação entre a HbF e a bilirrubina tem o mesmo significado nos grupos de risco menor e intermediário. Já no grupo de maior risco, não se pode prever os valores de bilirrubina sérica a partir dos valores de HbF, sugerindo novamente que a forte redução na atividade enzimática leva a níveis de bilirrubina elevados, mesmo sem hemólise exacerbada.

Os níveis de LDH, marcador de hemólise, tiveram uma forte correlação positiva com os níveis de bilirrubina dentro de cada grupo genotípico. Entretanto, foi possível observar que o valor dessa correlação diminuiu no grupo de maior risco, de forma semelhante e corroborando o resultado analisado acima. No grupo de maior risco, os níveis de bilirrubina sérica seriam independentes da hemólise em si, e sim da redução na atividade enzimática.

Para avaliar os fatores que poderiam influenciar a correlação dos níveis de HbF aos de bilirrubina, foram analisados cada grupo de haplótipos separadamente. Somente no grupo de homozigotos BEN/BEN, a correlação negativa foi fortemente significativa. Dentre deste grupo, não houve diferença significativa nos níveis de bilirrubina e de HbF dos diferentes genótipos de risco. No entanto, uma correlação negativa foi encontrada entre a HbF e a bilirrubina nos grupos 1 e 2, sendo significativa apenas para o grupo 2. O contrário acontece em relação ao grupo de maior risco. Apesar de uma grande variação nos níveis de HbF dos pacientes com AF, o genótipo BEN/BEN é associado a níveis elevados de HbF e curso clínico de gravidade intermediária da doença (SHIMAUTI *et al.*, 2015). O resultado neste estudo sugere que os pacientes BEN/BEN com um número de repetições do tandem TA igual ou maior que sete podem apresentar menor benefício da proteção conferida pelo seu haplótipo de globina β^S em

relação aos níveis de bilirrubina. No entanto, seria necessário avaliar um número maior de pacientes para confirmar essa hipótese.

As variáveis independentes tais como idade, níveis de Hb, de HbF e grupos de genótipos de *UGT1A1*, que mostraram correlação significativa, foram analisadas juntamente num modelo de regressão linear multivariada, para avaliar a influência de cada uma delas sobre os níveis séricos de bilirrubina. Enquanto as demais variáveis continuaram significativamente associadas, os níveis de HbF deixaram de sê-lo.

É importante lembrar também que níveis elevados de bilirrubina podem estar relacionados a outros fatores, como por exemplo distúrbios intra-hepáticos secundários à falcização intra-hepática (JOHNSON *et al.*, 1986).

Associação dos polimorfismos de *BCL11A* como os parâmetros hematológicos e genéticos

Na última década, avanços tecnológicos permitiram, por meio de estudos de GWAS, identificar polimorfismos susceptíveis de explicar a modulação genética dos níveis de HbF em diferentes populações. Os polimorfismos em *BCL11A* são associados aos níveis de HbF, porém a importância dos seus efeitos é bastante variável na literatura (GALARNEAU *et al.*, 2010; MENZEL *et al.*, 2007; UDA *et al.*, 2008; SOLOVIEFF *et al.*, 2010).

Em relação ao polimorfismo rs1427407, a maioria dos indivíduos era portadora do genótipo selvagem GG (61,86%), e a frequência do alelo ancestral G (78,35%) estava quase quatro vezes maior do que a frequência do alelo mutante T. Já no rs7606173, a maioria dos indivíduos era heterozigoto GC (49,48%) e a frequência do alelo mutante C chegou a 43,3%. Sebastiani *et al.* (2015) mostraram que o rs1427407 parecia ser independente do rs7606173. No presente estudo, em análise geral, apesar de haver diferença entre os níveis de HbF dos diferentes grupos genotípicos de cada polimorfismo, foi possível reparar que os indivíduos homozigotos para o alelo mutante (TT) no rs1427407 apresentaram níveis maiores de HbF, enquanto para o rs7606173, os indivíduos homozigotos para o alelo selvagem (GG) apresentaram os maiores níveis de HbF, sugerindo uma tendência inversa dos efeitos dos genótipos desses polimorfismos sobre os níveis de HbF. O resultado no presente estudo em relação ao rs1427407 é semelhante ao de Bhanushali *et al.* (2015) que, em Índios com AF, mostraram que o genótipo TT estava associado aos maiores níveis de HbF. Friedrisch *et al.* (2016), em pacientes brasileiros têm mostrado que o genótipo TT estava associado tanto a maiores níveis basais de HbF, quanto a maiores níveis após uso de HU. Bauer *et al.* (2013) relataram a maior associação do rs1427407 com os níveis de HbF, em comparação ao rs7606173. No entanto, Bhatnagar *et al.* (2011) demonstraram que o polimorfismo rs7606173

teve um efeito significativo e independente sobre a regulação do nível das células F, e que o alelo ancestral G está associado à maior taxa de células F. O fato deste estudo não encontrar associação significativa do rs7606173 com os níveis de HbF pode ser devido ao menor tamanho amostral. Subsequentemente, foi observado que os níveis de bilirrubina estavam significativamente menores nos indivíduos TT para o rs1427407, em comparação aos heterozigotos. Os níveis de bilirrubina não diferiram significativamente entre os genótipos do rs7606173, porém foi observado o nível menor de bilirrubina em homozigotos GG.

No grupo haplotípico BEN/BEN, o nível de HbF foi significativamente mais elevado nos mutantes TT em comparação com os heterozigotos GT, e mais elevados nos selvagens GG em comparação com os heterozigotos GC, mantendo essa tendência inversa dos efeitos dos polimorfismos. Porém, parece que os heterozigotos para os polimorfismos rs1427407 e rs7606173 do grupo BEN/BEN tendem a ter níveis ainda menores de HbF.

No grupo haplotípico CAR/CAR, não houve diferença significativa entre os níveis de HbF nos diferentes genótipos. Nesse grupo, não foi encontrado nenhum mutante TT para os rs1427407. Apesar da população estudada no presente trabalho ser muito pequena, este achado é interessante e pode ajudar a explicar o fato que o haplótipo CAR/CAR seja associado a níveis baixos de HbF (POWARS *et al.*, 1991; STEINBERG, 2009).

Já no grupo de heterozigotos BEN/CAR, os genótipos nos polimorfismos mostraram relação nitidamente inversa com os níveis de HbF, apesar de ser apenas significativa para o polimorfismo rs1427407.

Separando os pacientes de acordo com o uso de HU, não foi encontrado nenhum indivíduo com o genótipo TT no grupo de pacientes tratados. Isto sugere que os níveis elevados de HbF associados a esse genótipo lhes confere uma certa vantagem na melhoria do quadro clínico. Nos demais genótipos desse polimorfismo, o nível de HbF foi parecido. No estudo de Sheehan *et al.* (2013), em pacientes entre nove e 18 meses submetidos ao tratamento com HU, não houve diferença na indução de HbF entre os três genótipos do rs1427407. Em outro estudo em pacientes mais velhos, não foi encontrada associação significativa entre os genótipos no polimorfismo rs1427407 e os níveis finais de HbF sob tratamento com HU (SHEEHAN *et al.*, 2014). Em relação ao polimorfismo rs7606173, a tendência encontrada nos indivíduos não-tratados foi a mesma do que na análise geral, com os maiores níveis de HbF associados aos homozigotos para o alelo ancestral G.

Ao contrário do que foi observado na análise sem levar em conta o tratamento com HU, foi observada uma diferença significativa nos níveis de HbF para o polimorfismo rs1427407 no grupo dos pacientes não-tratados. Isso poderia ser explicado pelo fato de que, como relatado

acima, os níveis de HbF eram semelhantes nos pacientes tratados. Foi observado um nível maior de HbF nos indivíduos TG e TT para o rs1427407. Esses resultados são semelhantes aos de Sheehan *et al.* (2013), que mostraram que os pacientes sem uso de HU e portadores do alelo T do SNP rs1427407 tiveram maiores níveis de HbF em comparação aos portadores do alelo selvagem. Além disso, de acordo como esperado, os níveis de bilirrubina continuam sendo significativamente menores para o genótipo TT. Quanto ao polimorfismo rs7606173, os resultados para a HbF e a bilirrubina continuam semelhantes aos da análise geral, com ausência de diferença significativa.

Condizente com resultados da primeira parte deste trabalho e achados de outros autores, os pacientes sob tratamento com HU tiveram níveis de bilirrubina aumentados, nos heterozigotos GT. No polimorfismo rs7606173, não foi possível observar diferenças significativas nos indivíduos tratados.

A análise dos níveis de bilirrubina do grupo 3 em *UGT1A1* (níveis elevados de bilirrubina e maior risco para o desenvolvimento de litíase biliar) mostrou que os menores níveis de bilirrubina nesse grupo foram encontrados nos pacientes portadores do genótipo TT do SNP rs1427407 e nos portadores do genótipo GG SNP rs7606173, em indivíduos sem uso de HU. Esse achado sugere que o efeito do polimorfismo em *BCL11A* sobre os níveis de bilirrubina supere o efeito do polimorfismo em *UGT1A1* nesse grupo.

Separando os genótipos e alelos pelos quartis de bilirrubina nos indivíduos sem uso de HU, foi possível observar que no quartil superior de bilirrubina, não foi encontrado nenhum indivíduo com o genótipo TT, corroborando os achados do que este genótipo esteja associado à melhora clínica e a níveis reduzidos de bilirrubina, devido por sua vez a um nível aumentado de HbF. Ademais, a diferença na repartição alélica entre os quartis inferior e superior de bilirrubina foi significativa, com apenas 36,84% do alelo T no quartil superior de bilirrubina. Esses achados são condizentes aos encontrados nos níveis de HbF, com 77,78% dos alelos T no quartil superior.

Quanto às associações entre os genótipos dos diferentes polimorfismos, a associação mais frequente foi a GG/GC, ou seja, homozigoto para o alelo ancestral do rs1427407 e heterozigoto para o polimorfismo rs7606173. As associações com menor frequência foram os heterozigotos para o rs1427407 e homozigoto mutante para rs7606173 (GT/CC), e homozigoto mutante para rs1427407 e heterozigoto para rs760673 (TT/GC). Não foi encontrada associação de mutantes TT/CC, sugerindo que não haja co-ocorrência das mutações, apesar de não ser possível afirmar isso devido ao número baixo de indivíduos analisados.

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que os polimorfismos rs1427407 e rs7606173 têm um efeito oposto na regulação do nível de HbF. A diferença dos efeitos dos haplótipos em *BCL11A* sugere que a variação da combinação dos alelos, em combinação com outros fatores, resulta na variação dos níveis de HbF.

As associações genótípicas relacionadas a maiores níveis de HbF e consequente menores níveis de bilirrubina foram TT/GG e TT/GC. As associações genótípicas com os menores níveis de HbF foram GG/GC, GG/CC, e GT/GC. A associação genotípica com o menor nível de HbF e maior nível de bilirrubina foi a GG/GC. O resultado neste estudo é semelhante ao de Bauer *et al.* (2013) que relataram que o menor nível de HbF foi encontrado no haplótipo rs1427407–rs7606173 G–C em indivíduos afro-americanos. Sebastiani *et al.* (2015) encontraram resultados semelhantes nos diferentes haplótipos em *BCL11A* no seu estudo. Eles mostraram que o maior nível de HbF nos indivíduos com AF estava associado ao haplótipo TCAG, no qual o TG representa o alelo mutante e o alelo selvagem, respectivamente do rs1427407 e do rs7606173. Os portadores do haplótipo GCAG (portadores dos alelos selvagens G e G) tiveram um menor nível de HbF comparativamente ao haplótipo TCAG. Os haplótipos GTAC e GTGC, correspondentes à combinação GG/CC do presente estudo estavam associados aos menores níveis de HbF, e estavam menos frequentes em indivíduos árabes-indian.

Sebastiani *et al.* (2015), encontraram em indivíduos Árabes-indian um haplótipo adicional quando foram comparados a indivíduos afro-americanos com haplótipo BEN/BEN. No presente estudo, foram encontradas 2 e 3 associações genótípicas adicionais nos indivíduos BEN/BEN em comparação aos CAR/BEN e CAR/CAR, respectivamente.

Limitações

Nosso estudo foi limitado pelo fato de que os dados clínicos foram coletados de forma retrospectiva. No momento da coleta de dados, não realizamos ultrassom hepatobiliar em pacientes assintomáticos para conferir a verdadeira prevalência da litíase biliar. Apesar dessas limitações, o estudo demonstrou a associação entre os polimorfismos no promotor do gene *UGT1A1* com níveis elevados de bilirrubina, fator de risco para o desenvolvimento de litíases biliares. Estudos prospectivos de larga escala contribuirão a validar os achados, os polimorfismos no promotor do gene *UGT1A1* representando um importante modificador genético da expressão fenotípica da anemia falciforme não ligado aos genes da hemoglobina. A genotipagem dos polimorfismos em *UGT1A1* poderá servir também à identificação de pacientes com risco elevado de hiperbilirrubinemia e litíase biliar.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

No grupo de pacientes estudados, a frequência do alelo UGT1A1 (TA)₇ foi menor em comparação à relatada em outros estudos, mas foi coerente com a menor frequência de ocorrência de litíase biliar. Os níveis elevados de bilirrubina nos genótipos (TA)_{7/7} e (TA)_{7/8} não se correlacionaram com os níveis de HbF, nem com outros marcadores de hemólise. Além disso, não houve influência do traço alfa-talassêmico sobre os níveis de bilirrubina. Quanto aos polimorfismos em BCL11A, os alelos selvagens do rs1427407 e do rs7606173 apresentaram tendência a efeitos opostos sobre os níveis de HbF. Os genótipos mutantes TT e selvagem GG desses dois polimorfismos foram associados a maiores níveis de HbF e menores níveis de bilirrubina.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.J. et al. Alpha thalassaemia and stroke risk in sickle cell anaemia. **American Journal of Hematology**, v. 45, n. 4, p. 279-282, 1994.
- ADEKILE, A. et al. The influence of uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A promoter polymorphisms, bS-globin gene haplotype, co-inherited a-thalassemia trait and Hb F on steady-state serum bilirubin levels in sickle cell anemia. **European Journal of Haematology**, v. 75, n.2, p. 150-155, 2005.
- ADEKILE, A.D.; HUISMAN, T.H.J. Hb F in sickle cell anemia. **Experientia**, v. 49, n. 1, p. 16-27, 1993.
- ADEKILE, A.D. et al. Influence of a-Thal trait on spleen function in sickle cell anaemia patients with high Hb F. **American Journal of Hematology**, v. 53, n. 1, p. 1-5, 1996.
- AGRAWAL, R.K. et al. Hydroxyurea in Sickle Cell Disease: Drug Review. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 30, n. 2, p. 91-96. doi 10.1007/s12288-013-0261-4.
- ALMEIDA, C.B. et al. Hydroxyurea reduces leukocyte interactions with the vessel wall in a haemolytic mouse model via a possible NO/cGMP-mediated effect. **BMC Pharmacology & Toxicology**, v. 14, Supl. 1, p. 2, 2013. Disponível em <doi:10.1186/2050-6511-14-S1-P2>.
- BALKARAN, B. et al. Stroke in a cohort study of patients with homozygous sickle cell disease. **The Journal of Pediatrics**, v.120, n. 3, p. 360-366, 1992.
- BANDEIRA, F.M.G.C. et al. Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina S. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2007.
- BAUER, D.E. et al. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. **Science**, v. 342, n. 6155, p. 253-257, 2013. doi: 10.1126/science.1242088.
- BERNAUDIN, F. et al. Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. **Blood**, v. 110; p.2749-2756, 2007.
- BERNAUDIN, F. et al. G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 114, p.742-743, 2009.
- BEUTLER, E.; GELBART, T.; DEMINA, A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p.8170-8174, 1998.
- BHANUSHALI, A.A. et al. Genetic variant in the BCL11A (rs1427407), but not HBS1LMYB (rs6934903) loci associate with fetal hemoglobin levels in Indian sickle cell disease patients. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 54, p. 4-8, 2015.
- BHATNAGAR, P. et al. Genome-wide association study identifies genetic variants influencing F-cell levels in sickle-cell patients. **Journal of Human Genetics**, v. 56, p. 316-323, 2011.
- BOOTH, C.; INUSA, B.; OBARO, S.K. Infection in sickle cell disease: A review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. e2-e12, 2010.
- BOSMA, P.J. et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 333, p. 1171-1175, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Doença falciforme: saiba o que é e onde encontrar tratamento**. Brasília, 2012. 28 p.: il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. **Doença falciforme: Hidroxiureia: uso e acesso**. Brasília, 2014. 56 p.: il.

BRITTAİN, H.A. et al. Thrombospondin from activated platelets promotes sickle erythrocyte adherence to human microvascular endothelium under physiologic flow: a potential role for platelet activation in sickle cell vaso-occlusion. **Blood**, v. 81, p. 2137-2143, 1993.

BRITTENHAM, G.M.; SCHECHTER, A.N.; NOGUCHI, C.T. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. **Blood**, v. 65, p. 183-189, 1985.

BRODERICK, G.A. Priapism and sickle-cell anemia: diagnosis and nonsurgical therapy. **Journal of Sexual Medicine**, v. 9, n. 1, p. 88-103, 2012.

BUNN, H.F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 762-769, 1997.

CALDAS, P. et al. Clinical outcomes and associated in a cohort of children with sickle cell disease. **Gazeta Médica da Bahia.**, v. 80, n. 3, p. 14-19, 2010.

CARTRON, J-P.; ELION, J. Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 15, p. 39-50, 2008.

CHAAR, V. et al. Association of UGT1A1 polymorphism with prevalence and age at onset of cholelithiasis in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 90, p. 188-199, 2005.

CHAAR, V. et al. UGT1A1 Polymorphism Outweighs the Modest Effect of Deletional (-3.7 Kb) α -Thalassemia on Cholelithogenesis in Sickle Cell Anemia. **American Journal of Hematology**, v. 81, p. 377-379, 2006.

CHAOUCH, L. et al. rs11886868 and rs4671393 of BCL11A associated with HbF level variation and modulate clinical events among sickle cell anemia patients. **Hematology**, v. 3, p. 1-5, 2016.

CHAOUCH, L. et al. Early Complication in Sickle Cell Anemia Children due to $A(TA)_nTAA$ Polymorphism at the Promoter of *UGT1A1* Gene. **Disease markers**, v. 35, n. 6, p. 67-72, 2013. doi:10.1155/2013/173474.

CHARACHE, S. Fetal hemoglobin, sickling and sickle cell disease. **Advance Pediatrics**, v.37, p. 1-3, 1990.

CHARACHE, S. et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 1317-1322, 1995.

CHAVES, M.A.F.; LEONART, M.S.S; NASCIMENTO, A.J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. **Hematology**, v. 13, p. 187-192, 2008.

CHIANG, E.Y.; FRENETTE, P.S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 19, p. 771-784, 2005.

CHIKEZIE, P.C.; CHIKEZIE, C.M.; AMARAGBULEM, P.I. Polymerization of human sickle cell haemoglobin (HbS) in the presence of three antimalarial drugs. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 5, p. 39-42, 2011.

DAMANHOURI, G.A. et al. Clinical biomarkers in sickle cell disease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, p. 24-31, 2015.

DAVIS, L. R. Changing blood picture in sickle cell anemia from shortly after birth to adolescence. **Journal of Clinical Pathology**, v. 29, p. 81-90, 1976.

- DOVER, G.J. et al. Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are partially controlled by an X-linked gene located at Xp22.2. **Blood**, v. 80, p. 816-84, 1992.
- ELION, J. et al. Vaso-occlusion in sickle cell anemia: role of interactions between blood cells and endothelium. **Hematology Journal**, v. 5, p. S195-S198, 2004.
- EMBURY, S.H. et al. Concurrent sickle-cell anemia and alpha-thalassemia: effect on severity of anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 306, n. 5, p. 270-274, 1982.
- EMOND, A.M. et al. Acute splenic sequestration in homozygous sickle cell disease: natural history and management. **Journal of Pediatrics**, v. 107, p. 201-206, 1985.
- FELIX, A.A.; SOUZA, H.M.; RIBEIRO, S.B.F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme: Epidemiologic and social aspects of sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 3, p. 203-208, 2010.
- FERNANDES, A.P. et al. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. **Jornal de Pediatria**, v. 86, p. 279-284, 2010.
- FERTRIN, K.Y. et al. Frequencies of UDP-Glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) gene promoter polymorphisms among distinct ethnic groups from Brazil. **American Journal of Medical Genetics**, v. 108, p. 117-119, 2002.
- FERTRIN, K.Y. et al. UDP-glucuronosyltransferase 1 gene promoter polymorphism is associated with increased serum bilirubin levels and cholecystectomy in patients with sickle cell anemia. **Clinical Genetics**, v. 64, p. 160-162, 2003.
- FIGUEIREDO, M.S. Modifiers factors of clinical severity in sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 215-217, 2007.
- FITZHUGH, C.D.; WIGFALL, D.R.; WARE, R.E. Enalapril and hydroxyurea therapy for children with sickle nephropathy. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 45, p. 982-985, 2005.
- FLEURY, M.K. Beta globin haplotypes in sickle cell anemia in patients from Rio de Janeiro: Clinical and laboratory aspects. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 2, p. 89-93, 2007.
- FOLASHADE, K.O.; OMOREGIE, E.H. Chemical constituents and biological activity of medicinal plants used for the management of sickle cell disease. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, p. 3452-3476, 2013.
- FRANCESCHI, L.; CAPPELLINI, M.; OLIVEIRA, O. Thrombosis and Sickle Cell Disease. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 37, n. 3, p. 226-236, 2011.
- FRENETTE, P.S.; ATWEH, G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 850-858, 2007. doi:10.1172/JCI30920.
- FRENETTE, P.S. Sickle cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion. **Microcirculation**, v. 1, p. 164-177, 2004.
- FRENETTE, P.S. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. **Current Opinion in Hematology**, v. 9, p. 101-106, 2002.
- FRIEDRISCH, J.R. 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, Molecules and Diseases**, v. 62, p. 32-37, 2016.
- GALARNEAU, G. et al. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. **Nature Genetics**, v. 42, p. 1049-1051, 2010.

- GHASEMI, A.; KEIKHAEI, B.; GHODSI, R. Side effects of hydroxyurea in patients with Thalassemia major and thalassemia intermedia and sickle cell anemia. **Iranian Journal of Pediatric Hematology Oncology**, v. 14, p. 114-117, 2014.
- GILL, F.M. et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. **Blood**, v. 86, p. 776-783, 1995.
- GLADWIN, M.T.; VICHINSKY, E. Pulmonary complications of sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 359, p. 2254-2265, 2008.
- GONÇALVES, M.S. et al. β S-Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 10, p. 1283-1288, 2003.
- GONÇALVES, M.S. Comment on “Molecular analysis and association with clinical and laboratory manifestations in children with sickle cell anemia”. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 36, p. 315-318, 2014.
- GREEN, N.S.; BARRAL, S. Genetic modifiers of HbF and response to hydroxyurea in sickle cell disease. **Pediatric Blood Cancer**, v. 56, n. 2, p. 177-181, 2011.
- GRIGORIAN, A.; O'BRIEN, C.B. Hepatotoxicity Secondary to Chemotherapy. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 2, n. 2, p. 95-102, 2014. doi:10.14218/JCTH.2014.00011.
- HAIDER, M.Z. et al. Influence of alpha-thalassemia on cholelithiasis in SS patients with elevated Hb F. **Acta Haematologica**, v. 100, n. 3, p. 147-150, 1998.
- HANFT, V.N. et al. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. **Blood**, v. 95, p. 3589-3593, 2000.
- HEBBEL, R.P. Adhesion of sickle red cells to endothelium: Myths and future directions. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 15, p. 14-18, 2008.
- HEBBEL, R.P. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. S83-86, 1997.
- HEBBEL, R.P. Reconstructing sickle cell disease: a data-based analysis of the “hyperhemolysis paradigm” for pulmonary hypertension from the perspective of evidence-based medicine. **American Journal of Hematology**, v. 86, n. 2, p. 123-154, 2011.
- HEDDLE, R.; CALVERT, A.F. Hydroxyurea induced hepatitis. **Medical Journal of Australia**, v. 1, p. 121, 1980.
- HEENEY, M.M. et al. UGT1A promoter polymorphisms influence bilirubin response to hydroxyurea therapy in sickle cell anemia. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 141, p. 279-282, 2003.
- HERRICK, J.B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 74, n. 3, p. 179-184, 2001.
- HIGGS, D.R. et al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 4, p. 1441-1446, 1982.
- ITALIA, K.Y. et al. The effect of UGT1A1 promoter polymorphism on bilirubin response to hydroxyurea therapy in hemoglobinopathies. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 16-17, p. 1329-1332, 2010.
- JAWAID, K. et al. Best S. Binding patterns of BCL11A in the globin and GATA1 loci and characterization of the BCL11A fetal hemoglobin locus. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 45, n. 2, p. 140-146, 2010.

- JESUS, J.A. Doença falciforme no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 80, p. 8-9, 2010.
- JOHNSON, F.L. et al. Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 311, p. 780-783, 1984.
- JONECKIS, C.J. et al. Integrin alpha4beta1 and glycoprotein IV (CD36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia. **Blood**, v. 82, p. 3548-3555, 1993.
- KATO, G.J.; GLADWIN, M.T.; STEINBERG, M.H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Reviews**, v. 21, p. 37-47, 2007.
- KAUL, D.K. et al. Platelet-activating factor enhances adhesion of sickle erythrocytes to vascular endothelium: the role of vascular integrin $\alpha\beta 3$ and von Willebrand factor. In: BEUZARD, Y. et al., editors. **Sickle cell disease and thalassemias: New trends in therapy (INSERM Symposium)**. INSERM/John Libbey Eurotext; Montrouge, France: 1995. p. 497-500.
- KOVACIC, P. Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): Metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. **Medical Hypotheses**, v. 76, p. 24-31, 2011.
- LABIE, D.; ELION, J.; GIROT, R. Contrôle génétique lié à l’X de la production d’hémoglobine fœtale. **Médecine/Sciences**, v. 7, p. 386-387, 1991.
- LANKRON, S. et al. Systematic review: hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 48, p. 939-955, 2008.
- LEE, K. et al. The nonexpression of CD36 on reticulocytes and mature red blood cells does not modify the clinical course of patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 98, n. 4, p. 966-971, 2001.
- LETTRE, G. 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 33, p. 11869-11874, 2008.
- LOU, T.F. et al. Hydroxyurea generates nitric oxide in human erythroid cells: mechanisms for gamma-globin gene activation. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, p. 1374-1382, 2009.
- MENZEL, S. et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. **Nature Genetics**, v. 39, n. 10, p. 1197-1199, 2007.
- MILLER, S.T. et al. Priapism in children with sickle cell disease. **Journal of Urology**, v. 154, p. 844-847, 1995.
- MILNER, P.F. et al. Osteonecrosis of the humeral head in sickle cell disease. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 289, p. 136-143, 1993.
- MODELL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bulletin World Health Organization**, v. 86, n. 6, p. 480-487, 2008.
- MOHANDAS, N.; EVANS, E. Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial cells: requirement for both cell membrane changes and plasma factors. **Blood**, v. 64, p. 282-287, 1984.
- MONAGHAN, G. et al. Genetic variation in bilirubin UDP glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert’s syndrome. **Lancet**, v. 347, p. 578-581, 1996.
- MORRIS, C.R. et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension and mortality in sickle cell disease. **Journal of the American Medical Association**, v. 294, p. 81-90, 2005.
- NAGEL, R.L. Severity pathobiology, epistatic effect and genetic markers in sickle cell anaemia. **Seminars in Hematology**, v. 2, p. 180-201, 1991.

- NEVES, F. et al. Hematological differences between patients with different subtypes of sickle cell disease on hydroxyurea treatment. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 6, p. 426-429, 2012.
- NIIHARA, Y. et al. Phase 3 Study of L-Glutamine Therapy in Sickle Cell Anemia and Sickle β -Thalassemia Subgroup Analyses Show Consistent Clinical Improvement. **Blood**, v. 128, n. 22, p. 1318, 2016.
- NIIHARA, Y. et al. Increased red cell glutamine availability in sickle cell anemia: demonstration of increased active transport, affinity, and increased glutamate level in intact red cells. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 130, n. 1, p. 83-90, 1997.
- NOLAN, V.G. et al. Hemolysis associated priapism in sickle cell disease. **Blood**, v. 106, p. 3264-3267, 2005.
- ODIÈVRE, M-H. et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **Indian Journal of Medical Research**, v. 134, n. 4, p. 532-557, 2011.
- OHENE-FREMPONG, K.; STEINBERG, M.H. Clinical Aspects of Sickle Cell Anemia in Adults and Children. In: STEINBERG, M.H.; FORGET, B.G.; HIGGS, D.R.; NAGEL, R.L. (Eds.). **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management**. Cambridge University Press, New York, USA, 2001. p. 611-670.
- OKPALA, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. **Current Opinion in Hematology**, v. 13, p. 40-44, 2006.
- PAGNIER, J. et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 6, p.1771-1773, 1984.
- PASSON, R.G. et al. Influence of bilirubin uridine diphosphate- glucuronosyltransferase 1A promoter polymorphisms on serum bilirubin and cholelithiasis in children with sickle cell anemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 23, p. 448-451, 2001.
- PLATT, O.S. et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **New England Journal of Medicine**, v. 330, p. 1639-1644, 1994.
- PLATT, O.S. et al. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anaemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 74, p. 652-656, 1984.
- PLATT, O.S. et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. **New England Journal of Medicine**, v. 325, p. 11-16, 1991.
- PLATT, O.S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 13, p. 1362-1369, 2008. doi: 10.1056/NEJMct0708272.
- POWARS, D.R. et al. Chronic Renal Failure in Sickle Cell Disease: Risk Factors, Clinical Course, and Mortality. **Annals of Internal Medicine**, v. 115, n. 8, p. 614-620, 1991.
- POWARS, D.R. et al. Beta-S gene cluster haplotypes modulate hematologic and hemorheologic expression in sickle cell anemia. Use in predicting clinical severity. **The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 16, n. 1, p. 55-61, 1994.
- POWARS, D.R. et al. Is there a threshold level of fetal hemoglobin that ameliorates morbidity in sickle cell disease? **Blood**, v. 63, p. 921-926, 1984.
- POWARS, D.R. Sickle cell anemia: β S-globin gene cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ damage. **Seminars in Hematology**, v. 28, p. 202-208, 1991.
- PROENÇA-FERREIRA, R. et al. Endothelial Activation by Platelets from Sickle Cell Anemia Patients. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89012, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089012>

- RAMALHO, A.S.; GIRALDI, T.; MAGNA, L.A. Genetic-epidemiological study of hemoglobin S in a population from Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 2, p. 89-94, 2008.
- REES, D.C.; WILLIAMS, T.N.; GLADWIN, M.T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, p. 2018-2031, 2010.
- REITER, C.D.; GLADWIN, M.T. An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. **Current Opinion in Hematology**, v. 10, p. 99-107, 2003.
- RIBEIL, J.A. et al. Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, p. 848, 855, 2017. doi: 10.1056/NEJMoa1609677
- RITTER, J.K. et al. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 3257-3261, 1992.
- SANKARAN, V.G. et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. **Science**, v. 322, n. 5909, p. 139-143, 2008.
- SCHMID-SCHONBEIN, G.W. The damaging potential of leukocyte activation in the microcirculation. **Angiology**, v. 44, p. 45-56, 1993.
- SCHUBERT, T.T. Hepatobiliary system in sickle cell disease. **Gastroenterology**, v. 90, n. 6, p. 2013-2021, 1986.
- SEBASTIANI, P. et al. BCL11A Enhancer Haplotypes and Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia: BCL11A Enhancers and HbF. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 54, n. 3, p. 224-230, 2015. doi:10.1016/j.bcmed.2015.01.001.
- SERJEANT, G.R. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 350, p. 725-730, 1997.
- SHEEHAN, V.A. et al. Whole Exome Sequencing Identifies Novel Genes for Fetal Hemoglobin Response to Hydroxyurea in Children with Sickle Cell Anemia. Lam W, ed. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110740, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0110740.
- SHEEHAN, V.A. et al.; for the BABY HUG Investigators. Genetic modifiers of sickle cell anemia in the BABY HUG cohort: influence on laboratory and clinical phenotypes. **American Journal of Hematology**, v. 88, n. 7, p. 571-576, 2013. doi: 10.1002/ajh.23457.
- SHIMAUTI, E.L. et al. Prevalence of β S-globin gene haplotypes, α -thalassemia (3.7 kb deletion) and redox status in patients with sickle cell anemia in the state of Paraná, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 3, p. 316-323, 2015.
- SILVA, D.G.H.; et al. Genetic and biochemical markers of hydroxyurea therapeutic response in sickle cell anemia. **BMC Medical Genetics**, v. 14, p. 108, 2013.
- SILVA, W.S. et al. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 12, p. 2561-2566, 2006.
- SILVA-PINTO, A.C. et al. Clinical and hematological effects of hydroxyurea therapy in sickle cell patients: a single-center experience in Brazil. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 131, p. 238-243, 2013.
- SINGH, S.A.; KOUMBOURLIS, A.C.; AYGUN, B. Resolution of chronic hypoxemia in pediatric sickle cell patients after treatment with hydroxyurea. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 50, p. 1258-1260, 2008.
- SOLOVEY, A. et al. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 1584-1590, 1997.

- SOLOVIEFF, N. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5 α olfactory receptor gene cluster. **Blood**, v. 115, p. 1815-1822, 2010.
- STEINBERG, M.H.; EMBURY, S.H. Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **Blood**, v. 68, p. 985-990, 1986.
- STEINBERG, M.H. et al. Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 48, p. 175-181, 1995.
- STEINBERG, M.H. et al. Effects of thalassemia and microcytosis upon the hematological and vasoocclusive severity of sickle cell anemia. **Blood**, v. 63, p. 1353-1360, 1984.
- STEINBERG, M.H. Genetic Etiologies for Phenotypic Diversity in Sickle Cell Anemia. **The Scientific World Journal**, v. 9, p.46-67, 2009.
- STROUSE, J.J. et al. Hydroxyurea for sickle cell disease: a systematic review for efficacy and toxicity in children. **Pediatrics**, v. 122, p. 1332-1342, 2008.
- SWERLICK, R.A. et al. Alpha 4 beta 1-integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. **Blood**, v. 82, n. 6, p. 1891-1899, 1993.
- TEWARI, S. et al. Environmental determinants of severity in sickle cell disease. **Haematologica**, v. 100, n. 9, p. 1108-1116, 2015. doi:10.3324/haematol.2014.120030.
- TORRES, L.S. et al. The influence of hydroxyurea on oxidative stress in sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 6, p. 421-425, 2012. doi:10.5581/1516-8484.20120106.
- UDA, M. et al. Genome wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of β -thalassemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 1620-1625, 2008.
- UPADHYE, D. et al. Influence of single nucleotide polymorphisms in the BCL11A and HBS1L-MYB gene on the HbF levels and clinical severity of sickle cell anaemia patients. **Annals of Hematology**, v. 95, n. 7, 1201-1203, 2016. doi:10.1007/s00277-016-2675-1.
- VASAVDA, N. et al. The linear effects of alpha-thalassaemia, the UGT1A1 and HMOX1 polymorphisms on cholelithiasis in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 138, 9. 263-270, 2007.
- VERMYLEN, C. et al. Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell anaemia: the first 50 patients transplanted in Belgium. **Bone Marrow Transplant**, v. 22, n. 1, p. 1-6, 1998.
- VICHINSKY, E. et al. A randomised comparison of deferasirox versus deferoxamine for the treatment of transfusional iron overload in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 136, p. 501-508, 2007.
- VILLAGRA, J. et al. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. **Blood**, v. 100, p. 2166-2172, 2007.
- WAGNER, S.C. et al. Prevalence of common alpha-thalassemia determinants in south Brazil: Importance for the diagnosis of microcytic anemia. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 641-645, 2010.
- WALTERS, M.C. Update of hematopoietic cell transplantation for sickle cell disease. **Current Opinion in Hematology**, v. 22, n. 3, p. 227-233, 2015.
- WARE, R.E. et al. Predictors of fetal hemoglobin response in children with sickle cell anemia receiving hydroxyurea therapy. **Blood**, v. 99, n. 1, p. 10-14, 2002. doi:10.1182/blood.V99.1.10.

WARE, R.E. Hydroxycarbamide: Clinical aspects. **Comptes Rendus Biologies**, v. 336, n. 3, p. 177-182, 2013. doi:10.1016/j.crv.2012.09.006.

WOOD, J.C. et al. Myocardial iron loading in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease. **Blood**, v. 103, p. 1934-1936, 2004.

XU, J. et al. Transcriptional silencing of gamma-globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. **Genes and Development**, v. 24, n. 8, p. 783-798, 2010.

ZHU, G. et al. Reduction of Leukocyte Counts by Hydroxyurea Improves Cardiac Function in Rats with Acute Myocardial Infarction. **Medical Science Monitor**, v. 21, p. 3941-3947, 2015. doi:10.12659/MSM.893744.

ZIMMERMAN, S.A. et al. Hydroxyurea therapy lowers transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 110, p. 1043-1047, 2007.

8 ANEXOS

Anexo 1

POLIMORFISMOS NOS GENES UGT1A1 E BCL11A: RELAÇÃO COM FATORES LABORATORIAIS E COM A RESPOSTA À HIDROXIUREIA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

9
10 QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES E CONTROLES
11
12

Nome: {NOME} _____ Sigla: {sig} _____ Telefone: () _____

Endereço: _____

Registro: {REG} _____ Nº Pront. HEMOBA: {PRON} _____ Data de Nasc.: ____/____/____

Idade: {I} _____ Gênero: {GENER} () Masculino [0] () Feminino [1]

01. Idade do 1º diagnóstico de Doença Falciforme: {ID} () <6 m [0] () 6m - 4anos [1] () 5 - 9anos [2]
() 10 - 14anos [3] () 15 - 17anos [4] () > 17 anos [5]

02. Eletroforese de Hb {EHB} () AA[0] () SS[1] () SC[2] () SB+[3] () SB₀[4]
() SD[5]

03. Haplótipo {HAPL} () Sen[0] () Car[1] II[6] () Ben[2] () Cam[3] III[8] () Sau-Ara [4]
() Atip[5] () II[7] ()

04. Talassemia {TAL} () Negativo[0] () Hetero 3.7[1] () Homo 3.7[2]
() Hetero 4.2[3] () Homo 4.2[4]

Mieloperoxidase {MPO} () GG[0] () AG[1] () AA[2]

Alelo mutante Mieloperoxidase? {MUTMPO} () NÃO [0] () SIM [1]

Alfa 1 antitripsina {A1ATP} () MM[0] () MZ[1] () MS[2]
() SZ[3] () SS[4] () ZZ[5]

05. Já esteve internado? {INTER} () NÃO [0] () SIM [1]

Se SIM, quantas vezes? {QINTER} () 1 [0] () 2-5 [1] () 6-10 [2] () 11 ou + [3]

Qual especialidade? {ESPEC} () Cardiologia [0] () Oftalmologia [1] () Neurologia [2]
() Infectologia [3] () Pneumologia [4] () Cirurgia [5]
() Angiologia [6] () Nefrologia [7] () Clínica da Dor [8]
() Outras [9]

06. Já teve pneumonia? {PNEU} () NÃO [0] () SIM [1]

Se SIM, quantas vezes? {QPNEU} () 1[0] () 2-3[1] () 4-6[2] () 7 ou + [3]

- Se SIM, teve febre? {FEBRE} () NÃO [0] () SIM [1]
- Anormalidade no RX? {ARX} () NÃO [0] () SIM [1]
- Quando internado, usou medicação? {MPNEU} () NÃO [0] () SIM [1]
- Quais? {DESCMPNEU} _____
07. Teve ou tem esplenomegalia? {ESPLE} () NÃO [0] () SIM [1]
- Em que período? {PERIOESPLE} () <6m [0] () 6m-1ano [1] () 2-3a [2] () 4-5a [3] () >6a [4]
- Teve crise de seqüestro esplênico? {SEQESPLE} () NÃO [0] () SIM [1]
- Se SIM, quantas vezes? {QSEQESPLE} _____
08. Faz uso profilático de Penicilina? {PROP} () NÃO [0] () SIM [1]
- Se SIM, qual? {QPEN} () Penicilina V oral [0] () Penicilina benzatina [1]
- Se Sim, há quanto tempo? {QTPEN} () até 1 ano [0] () + de 1 ano a 3 anos [1]
- () + 3 anos a 5 anos [2] () + 5 anos a 7 anos [3]
- () + de 7 anos [4]
09. Já teve AVC? {AVC} () NÃO [0] () SIM [1]
- Se SIM, quantas vezes? {QAVC} _____
- Se SIM, seqüelas do AVC? {SEQAVC} () NÃO [0] () SIM [1]
- Já fez ressonância magnética? {RESSOMAG} () NÃO [0] () SIM [1]
- Alguma alteração? {ALTRESSOMAG} () NÃO [0] () SIM [1]
- Já fez Doppler Transcraniano? {dtc} () NÃO [0] () SIM [1]
- Se, SIM, qual resultado? {dtcres} () Normal [0] () Alterado [1]
10. Esplenectomizado? {ESPECTO} () NÃO [0] () SIM [1]
- Esplenectomia: {TIPOESPECTO} () Total [0] () Parcial [1]
11. Apresenta asma? {ASMA} () NÃO [0] () SIM [1]
- Se SIM, quantas crises nos últimos 06 meses? {QASMA} () 0 [0] () 1-3 [1] () 4-7 [2] () 8 ou + [3]
- Faz uso regular de nebulização? {NEBU} () [0] NÃO () SIM [1]
12. Tem crises de dor? {CRISDOR} () [0] NÃO () SIM [1]
- Se SIM, quantas crises nos últimos 06 meses? {QCRISDOR} () 0 [0] () 1-3 [1] () 4-7 [2] () 8 ou + [3]
- Quando foi a última crise? {ULTCRISDOR} () <1 mês [0] () 1-3m [1] () 4m ou + [2]
- Usa medicação para a dor? {MDOR} () NÃO [0] () SIM [1]
- Prescrita por um médico? {PRESMDOR} () NÃO [0] () SIM [1]
- Assistido por especialista em dor? {ESPECMDOR} () NÃO [0] () SIM [1]
- Faz tratamento com hidroxiureia? {HYDREIA} () NÃO [0] () SIM [1]

13. Faz uso regular de medicamentos? {MEDIC} NÃO [0] SIM [1]
 Se SIM, qual? {DESCMEDIC} _____
 Com que frequência? {FREQMEDIC} Diário [0] Dias alternados[1] Semanal[2]
 Quinzenal[3] Mensal [4] Bimestral[5] Semestral [6]
14. Vaso-Oclusão: {VO} NÃO [0] SIM [1] Quantas vezes? {QVO} _____
 Fez uso de alguma medicação? {MVO} NÃO [0] SIM [1]
15. Retinopatia: {RETIN} NÃO [0] SIM [1]
 Faz consultas periódicas com oftalmo? {CONSOFTAL} NÃO [0] SIM [1]
16. Infecções: {INFEC} NÃO[0] SIM [1]
 Quais? {DESCINFEC} Rinite [0] Sinusite [1] Otite [2]
 Faringite [3] Amigdalite [4] Vias aéreas sup. [5]
 ITU [6] Bronquite [7] ITR [8]
 Outros [9]
 Fez uso de alguma medicação? {MINFEC} NÃO [0] SIM [1]
17. Priapismo: {PRIAP} NÃO [0] SIM [1] NÃO SE APLICA [9]
 N° de vezes: {QPRIAP} Até 4 [0] 05-09 [1] 10 ou +[2]
 Fez uso de alguma medicação? {MPRIAP} NÃO [0] SIM [1]
18. Úlcera maleolar: {ULCMALEO} NÃO [0] SIM [1] Quantas vezes? {QULCMALEO} _____
 Idade da primeira úlcera: {IDULC} Até 4 anos [0] 5 - 9 [1] 10 - 17 [2]
 > 17 [3]
 Tratou a úlcera? {TRATULC} NÃO [0] SIM [1]
 Qual tratamento? {QUALTRAT} _____
19. Síndrome torácica aguda: {SDTOR} NÃO [0] SIM [1]
 Quantas vezes? {QSATOR} Até 2 [0] 03-05 [1] 06 ou + [2]
20. Alterações ósseas: {ALTOSSEA} NÃO [0] SIM [1]
 Quais? {DESCALTOSSEA} _____
21. Insuficiência Renal Aguda: {INSRENAG} NÃO [0] SIM [1]
 Quantas vezes? {QINSRENAG} Até 2 [0] 03-05 [1] 06 ou + [2]
22. Insuficiência Renal Crônica: {INSRENCRO} NÃO [0] SIM[1]
 Idade diagnóstico: {IDINSRENCRO} Até 5 anos [0] 06-11[1] 12 ou + [2]
33. Alterações cardíacas: {INSCARD} NÃO [0] SIM[1]
 Qual alteração? {QUALALTCA} _____

- Idade diagnóstico: {IDINSCARD} () Até 5 anos [0] () 06-11 [1] () 12 ou + [2]
- Fez eletrocardiograma? {ELETRO} () NÃO [0] () SIM [1]
- Fez ecocardiograma? {ECOCARD} () NÃO [0] () SIM [1]
24. Seqüestro hepático: {SEQHEP} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QSEQHEP} _____
25. Insuficiência respiratória: {INSRESP} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QINSRESP} _____
26. Distúrbio do sono? {DISTSONO} () NÃO [0] () SIM [1]
27. Litíase biliar: {LITIBILI} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QLITIBILI} _____
28. Cirurgia: {CIRURG} () NÃO [0] () SIM [1]
- Quais? {QUALCIRURG} _____
29. Se SIM, fez uso de profilaxia antibiótica? {PROFANTIB} () NÃO [0] () SIM [1]
30. Completou o calendário vacinal? {CALVAC} () NÃO [0] () SIM [1]
- Fez uso das seguintes vacinas? {USOVAC} () 7 valente [0] () 23 valente [1]
- () Meningo [2] () Haemophilus [3]
31. Fez uso de hemoderivados? {HEMODER} () NÃO [0] () SIM [1]
- Se SIM, quantas vezes? {QHEMODER} _____
32. Possui outra patologia? {PATOLOG} () NÃO [0] () SIM [1]
- Quais? {DESCPATOLOG} () Hipertensão [0] () Diabetes [1] () Obesidade [2]
- () Febre Reumática [3] () Hipertensão pulmonar [4] () D. de Chagas [5]
- () Osteoporose [6] () Trombose Venosa Profunda [7] () Nefrolitíase [8]
- () Outros [9]. Qual (is)?

Anexo 2: Protocolo para determinação dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta

ETAPA 1 PCR:

Tampão 10x: 5,0 mL

MgCl₂ 50Mm: 2,5 mL

dNTP 2 mM 5,0 mL

Primers (3 ou 5 ou 6 ou 8 ou 10 ou 12) a 25 pmol/mL - 0,5 mL

Primers (4 ou 6 ou 7 ou 9 ou 11 ou 13) a 25 pmol/mL - 0,5 mL

Taq DNA Polimerase: 0,25 mL

DNA Aprox. 1,5 mL

Água Qsp. 50 uL (34,75 uL)

Condições de termociclagem:

94°C - 10 min.

35 ciclos:

94°C - 45 seg.

T° Variável Tabela 2 - 45 seg.

72°C, 1min 30 seg.

72°C, 10 min

ETAPA 2 – RFLP

Tabela 1.

Reagentes	Quantidade por amostra
Produto de PCR	20 mL
BSA*	0,3 mL
Tampão	3 mL
Enzima de restrição de acordo com tab. 1	
Xmn I	0,2 mL
Hinc II	0,1 mL
Hind III ou Hinf I	0,2 mL
H ₂ O	Qsp 30 mL

Incubar overnight à 37°C.

Analisar os produtos da digestão por eletroforese em gel de agarose à 2%.

Interpretar o resultado de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2.

Gene	Primer	Fragmento (pb)	Após digestão	Temp. de pareamento	Enzima
5'g ^G	3 e 4	650	450+200	57°C	Xmn I *
g ^G /g ^A	5 e 6	780	440+340	60°C	Hind III
g ^G /g ^A	6 e 7	760	360+400	62°C	Hind III
Yb	8 e 9	700	360+340	60°C	Hinc II
3'Yb	10 e 11	590	470+120	57°C	Hinc II
5'b	12 e 13	380	240+140	57°C	Hinf I
3'b	14 e 15	620	460+160	Sem padronização	Hpa I