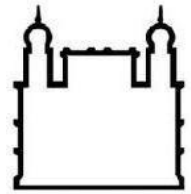




**UFBA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ



**FIOCRUZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**Dissertação de Mestrado**

**HEMOGLOBINA FETAL EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA  
FALCIFORME E PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA DA  
HEMOGLOBINA FETAL**

**NADJA DE JESUS GONÇALVES DOS SANTOS**

Salvador-Bahia-Brasil

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

HEMOGLOBINA FETAL EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA  
FALCIFORME E PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA DA  
HEMOGLOBINA FETAL

**NADJA DE JESUS GONÇALVES DOS SANTOS**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilda de Souza Gonçalves

Dissertação de Mestrado apresentada  
para obtenção do título de Mestre em  
Patologia, área de concentração em  
Patologia Experimental.

Salvador-Bahia-Brasil

2011

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S237a Santos, Nadja de Jesus Gonçalves dos  
Avaliação de marcadores associados à síntese de hemoglobina fetal em indivíduos com anemia falciforme e persistência hereditária da hemoglobina fetal [manuscrito] / Nadja de Jesus Gonçalves dos Santos. - 2011.  
128 f.: il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2011.  
Orientador: Prof. Dra. Marilda de Souza Gonçalves, Laboratório de Patologia Biologia Molecular.

1. Anemia Falciforme. 2. Hemoglobina Fetal. 3. Polimorfismo. I.Título.

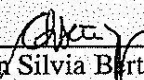
CDU 616.155.1


“Hemoglobina fetal em indivíduos com doença falciforme e persistência hereditária da hemoglobina fetal”

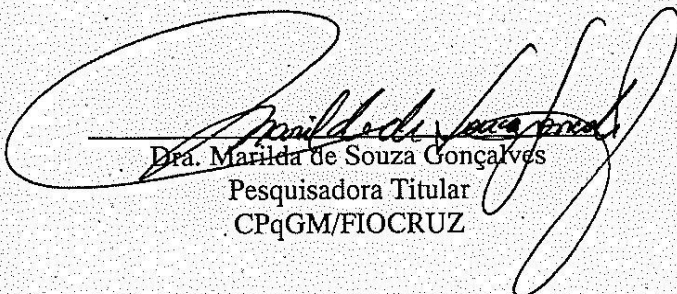
NADJA DE JESUS GONÇALVES DOS SANTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

  
Dra. Carmen Silvia Bertuzzo  
Professora  
UNICAMP

  
Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara  
Pesquisador  
CPqGM/FIOCRUZ

  
Dra. Marilda de Souza Gonçalves  
Pesquisadora Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

- CAPES — Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- FAPESB — Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
- DECIT/CNPq — Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

*“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos”.*

**(Charles Chaplin)**

## **AGRADECIMENTOS**

- A Deus, pelo dom da vida e por guiar meus passos em todos os momentos;
- A minha orientadora, Dra. Marilda, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação. Pelo exemplo de amor e dedicação no trabalho que realiza. Pelo apoio, carinho e incentivo incondicionais nos momentos descontração e, principalmente, nos momentos de maiores dificuldades. As palavras são poucas para mensurar o meu agradecimento;
- A toda minha família, que sempre acreditou e torceu muito por mim.
- A meu pai, Júlio, pelas palavras mais duras e pelo incentivo nos momentos em que mais precisei;
- A minha mãe, Nadir, por todo o carinho e amor dedicados;
- A minha irmã, Juliana, pela compreensão e cuidado em todos os momentos;
- Ao curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental, em especial aos professores e colegas de turma;
- A Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, pela colaboração dispensada como chefe do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM), proporcionando a realização dos experimentos;
- Aos colegas do LPBM pelo carinho e amizade compartilhados ao longo desses anos;
- Aos colegas de equipe: Silvana da Paz, Joelma Menezes, Cyntia Cajado, Elder Damasceno, Magda Seixas, Bruno Veloso, Elisângela Adorno, José Pereira, Rodrigo Cezar, Camylla, Ana Paula e Marcus Vinícius pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos. Um agradecimento especial a Augusto César e Luciano César pela ajuda na padronização e realização das técnicas;

- A Dra. Cynara Barbosa, Dr. Wendell Vilas Boas e Dra. Daniele Takahashi pelos ensinamentos e apoio ao longo desses quatro anos. Vocês foram fundamentais para minha formação;
- A Elson e a Jorge Eduardo pela ajuda logística que foi determinante para a realização desse trabalho;
- A todos os funcionários dos laboratórios de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, em especial a Mari Ney Tavares, Jean Tadeu e Nete, do Laboratório de Pesquisas em Anemia ATGC;
- A Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE), em especial a Dra. Tatiana Amorim, Dr. Ney Boa Sorte e a Dra. Taís Sena, pela disponibilização dos prontuários médicos e a equipe de enfermagem, pela coleta das amostras de sangue;
- A Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA) e ao Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), pela disponibilização dos prontuários médicos;
- A todos os amigos que torceram por mim;
- A todos os pacientes e seus familiares que abriram as portas das suas casas e aceitaram participar desse projeto, possibilitando a concretização desse sonho.



## RESUMO

O estudo de marcadores associados à síntese de hemoglobina fetal (HbF) é de grande interesse científico, pois contribui para o entendimento dos mecanismos regulatórios dos genes envolvidos na síntese das cadeias globínicas gama, uma vez que esta Hb é importante na modulação genética da anemia falciforme (HbSS). O objetivo desse estudo foi investigar a influência de alterações em genes envolvidos na síntese de HbF e suas associações com marcadores laboratoriais e clínicos na HbSS e caracterizar o fenótipo e o genótipo de indivíduos com o perfil sugestivo de persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF). Dessa forma, foi realizado um estudo de corte transversal, seguido de caso-controle com a casuística de 43 indivíduos HbSS com HbF > 3,0% e 3 indivíduos com perfil sugestivo de PHHF. O presente estudo foi aprovado pelo CEP-CpGM-Fiocruz. Os polimorfismos *HBG2* -396/-391del, *HBG2* SNP -369 C>G, *HBG2* -309 A>G, *HBG2* -157 T>C, *HBG1* -499 T>A, *HBG1* -369 C>G, *HBG1* -271 C>T e *HBG1*-225/-222del foram investigados por sequenciamento automático de DNA; os haplótipos ligados ao gene da globina beta foram investigados por *PCR-RFLP*; os polimorfismos *BCL11*Ars766432, *BCL11*Ars6732518, *OR51B5*/6rs4910756, *OR51B5*/6rs7483122, *HMIP*rs11759553, *HMIP*rs35959442 foram investigados por *PCR* em tempo real; a talassemia alfa  $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$  e as deleções PHHF-1, PHHF-2 e PHHF-4 por *PCR*. As análises hematológicas foram realizadas em contador automático de células, o perfil de hemoglobina foi confirmado por cromatografia líquida de alto desempenho e as dosagens bioquímicas foram investigadas por quimiluminescência. As concentrações de HbF foram associadas com HbS ( $p < 0,0001$ ), hematócrito ( $p = 0,035$ ), VCM ( $p = 0,010$ ), HCM ( $p = 0,045$ ), colesterol VLDL ( $p = 0,044$ ), ferro ( $p = 0,001$ ) e ferritina ( $p = 0,042$ ). Os polimorfismos estudados apresentaram associação com marcadores laboratoriais e clínicos no grupo estudado. O polimorfismo *HBG1* -271 C>T foi associado com a concentração de HbF ( $p = 0,027$ ; RP=4,45; IC95%= 1,14 – 17,41) e ferro ( $p = 0,0076$ ); o *HBG1* -499 T>A com as concentrações de glicose ( $p = 0,007$ ) e de alfa-1 antitripsina ( $p = 0,008$ ); o *HBG1* -225/-222del com as concentrações de colesterol LDL ( $p = 0,017$ ); o *HBG2* -396/-391del com as concentrações de HbS ( $p = 0,017$ ), creatinina ( $p = 0,042$ ) e bilirrubina  $p = 0,030$ ), sendo associado também ao quadro clínico mais grave da doença, com ocorrência frequente de crises vaso-oclusivas ( $p = 0,046$ ), litíase biliar ( $p = 0,021$ ) e o uso de hemoterápicos ( $p = 0,009$ ); o *BCL11A* rs766432 com a contagem de reticulócitos ( $p < 0,0001$ ) e a concentração de colesterol total ( $p = 0,033$ ); o *BCL11*Ars6736518 com concentração de glicose ( $p = 0,049$ ) e a contagem de eosinófilos ( $p = 0,012$ ); o *HMIP*rs35959442 com as concentrações de ferritina ( $p = 0,035$ ), creatinina ( $p = 0,008$ ) e VCM ( $p = 0,022$ ); o *HMIP*rs11759553 com as concentrações de ácido úrico ( $p = 0,033$ ) e ferritina ( $p = 0,020$ ); e os polimorfismos *OR51B5*/6rs7483122 e *OR51B5*/6 rs4910756 com as concentrações de creatinina ( $p = 0,001$ ). A análise multivariada mostrou associação do genótipo CAR/CAR com a concentração diminuída de HbF e o uso de hemoterápicos. A talassemia alfa  $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$  apresentou efeito protetor, sendo associada com as concentrações de ALT ( $p = 0,044$ ), AST ( $p = 0,039$ ) e com a contagem de linfócitos ( $p = 0,050$ ). Os três casos associados ao fenótipo de PHHF não apresentaram alterações clínicas e laboratoriais significativas, inclusive o caso 3, que apresentou o genótipo HbSF. É importante salientar que esses indivíduos não eram portadores de nenhuma das formas de PHHF investigadas. Estudos adicionais devem ser conduzidos com o objetivo de validar os resultados encontrados nesse estudo e de esclarecer os possíveis mecanismos pelos quais os marcadores moleculares investigados interferem na modulação da síntese de HbF e se esses biomarcadores podem apresentar mecanismos diferenciados daqueles comumente investigado, uma vez que foram descritas associações com marcadores importantes para o acompanhamento clínico de indivíduos HbSS.

## ABSTRACT

The study of markers associated with the fetal hemoglobin (HbF) synthesis is of great scientific interest, since it can contribute to understanding regulatory mechanisms of genes involved in the synthesis of globin chains, once that HbF participate in the genetic modulation of sickle cell anemia (HbSS). The aim of this study was to investigate the influence of changes in genes involved in the synthesis of HbF and their associations with clinical and laboratory markers in HbSS and characterize the phenotype and genotype of individuals with the profile suggestive of hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH). Thus, we performed a cross-sectional study, followed by a case-control, in a group of 43 HbSS individuals with HbF > 3.0% and 3 individuals with a suggestive profile of HPFH. Polymorphisms *HBG2* -396/-391del, the *HBG2* SNP -369 C > G, *HBG2* -309 A > G, *HBG2* -157 T > C, *HBG1* -499 T > A, *HBG1* -369 C > G *HBG1* the -271 C > T and *HBG1*-225/-222del were investigated by automated DNA sequencing; haplotypes linked to the beta globin gene were investigated by PCR-RFLP; single nucleotide polymorphisms of *BCL11*Ars766432, *BCL11*Ars6732518, *OR51B5*/6rs4910756, *OR51B5*/6rs7483122, *HMIP*rs11759553, *HMIP*rs35959442 were investigated by real-time PCR, alpha thalassemia 2 with 3.7 Kb deletion and HPFH-1, HPFH-2 and HPFH-4 deletions by PCR. Hematological tests were performed in automatic cell counter, the profile of hemoglobin was confirmed by high performance liquid chromatography and biochemical analysis were investigated by immunochemistry assay method. Levels of HbF were associated with HbS ( $p < 0.0001$ ), hematocrit ( $p = 0.035$ ), MVC ( $p = 0.010$ ), MHC ( $p = 0.045$ ), VLDL cholesterol ( $p = 0.044$ ), iron ( $p = 0.001$ ) and ferritin ( $p = 0.042$ ). Polymorphisms were associated with clinical and laboratory markers in the studied group. The polymorphism *HBG1* -271 C > T was associated with the concentration of HbF ( $p = 0.027$ , PR = 4.45, 95% CI 1.14 - 17.41) and iron ( $p = 0.0076$ ); the *HBG1* -499 T > A was associated with the level of glucose ( $p = 0.007$ ) and alpha-1 antitrypsin ( $p = 0.008$ ); the *HBG1* -225/-222del with LDL cholesterol concentrations ( $p = 0.017$ ); the *HBG2* -396/-391del with Hb concentrations ( $p = 0.017$ ), creatinine ( $p = 0.042$ ) and bilirubin ( $p = 0.030$ ), and also with a more severe clinical disease, with frequent occurrence of vaso-occlusive crises ( $p = 0.046$ ), gallstones ( $p = 0.021$ ) and the use of haemotherapeutic ( $p = 0.009$ ); the *BCL11A* rs766432 with the reticulocyte count ( $p < 0.0001$ ) and the concentration of total cholesterol ( $p = 0.033$ ) and *BCL11A*rs6736518 with the level of glucose ( $p = 0.049$ ) and eosinophil count ( $p = 0.012$ ); the *HMIP*rs35959442 with ferritin concentrations ( $p = 0.035$ ), creatinina ( $p = 0.008$ ) and MCV ( $p = 0.022$ ), the *HMIP*rs11759553 with concentrations of uric acid ( $p = 0.033$ ) and ferritin ( $p = 0.020$ ); and the polymorphisms *OR51B5*/6rs7483122 and the *OR51B5*/6rs4910756 with creatinine concentrations ( $p = 0.001$ ). Multivariate analysis pointed for the association of the genotype CAR / CAR with a decrease in HbF concentration with the use of blood therapy. The alpha thalassemia 2 with 3.7 Kb deletion showed a protective effect, being associated with concentrations of ALT ( $p = 0.044$ ), AST ( $p = 0.039$ ) and lymphocyte count ( $p = 0.050$ ). The three cases associated with HPFH phenotype did not show significant association with clinical and laboratory data, including the case 3, that showed the genotype HbSF. It is noteworthy that these individuals were not classified in any described HPFH type investigated. Further studies should be conducted in order to validate results found in this work and to clarify the possible mechanisms by which those investigated molecular markers can interfere with the modulation of the HbF synthesis and if they have mechanisms differentiate from the ones commonly investigated, once that the present study described association with important biomarkers that have been used for monitoring individuals with HbSS.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Molécula de hemoglobina. Estrutura quartenária da hemoglobina A1 ( $\alpha_2\beta_2$ ). Adaptado de LAYTON & NAGEL, 2010.

**Figura 2.** Controle gênico da síntese das hemoglobinas embrionárias, fetal e adulta, mostrando os mecanismos de substituição (*Switching*) das hemoglobinas. Adaptado de WEATHERALL, 2010.

**Figura 3.** Representação esquemática das regiões promotoras dos genes *HBG* e *HBB*. Adaptado de CAO & MAO, 2002.

**Figura 4.** Representação das regiões geográficas associadas aos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta, demonstrando os diferentes sítios de clivagem para endonucleases de restrição e suas localizações no cromossomo 11. Adaptado de STUART & NAGEL, 2004.

**Figura 5.** *Crossing-over* desigual entre as regiões homólogas Z e X localizadas no cromossomo 16 com geração das deleções  $\alpha_2^{3,7Kb}$  e  $\alpha_2^{4,2Kb}$ , respectivamente. Adaptado de HIGGS, 2009.

**Figura 6.** Representação esquemática das deleções que afetam grupo de genes da globina beta, localizados no cromossomo 11, e que ocasionam a persistência hereditária de hemoglobina fetal. Adaptado de JOLY et al., 2009.

**Figura 7.** Representação esquemática do desenho experimental do estudo.

**Figura 8.** Demonstração gráfica da análise estatística entre as variáveis hematológicas e bioquímicas em indivíduos HbSS com valores de hemoglobina fetal maiores e iguais ( $\geq$ ) e menores ( $<$ ) a média. A e B: análises das variáveis hematológicas e em C: análises das variáveis bioquímicas.

**Figura 9.** Eletroferograma mostrando a homozigose do polimorfismo -369 C>G, com localização na região promotora do gene *HBG1*.

**Figura 10.** Demonstração gráfica das análises estatísticas das variáveis hematológicas e bioquímicas em indivíduos HbSS com os alelos selvagem e mutante para os polimorfismos identificados nas regiões promotoras dos genes *HBG2* e *HBG1*. Em A: HbS e variáveis bioquímicas associadas com o polimorfismo *HBG2* -396/-391del; Em B: variáveis bioquímicas associadas ao polimorfismo *HBG1* -499 T>A; C: variáveis bioquímicas associadas aos polimorfismos *HBG1* -271 C>T e *HBG1* -225/-222del.

**Figura 11.** Demonstração gráfica da análise de variáveis hematológicas e bioquímicas em indivíduos HbSS com os alelos selvagem e mutante para os polimorfismos nos genes *BCL11A* e *HMIP*. Em A: Eosinófilos e glicose associados ao polimorfismo *BCL11A* rs6736518; em B: colesterol total e reticulócitos associados ao polimorfismo *BCL11A* rs766432; em C: ácido úrico e ferritina associados ao polimorfismo *HMIP* rs11759553; em D: creatinina, ferritina e VCM associados ao polimorfismo *HMIP* rs35959442.

**Figura 12.** Representação esquemática da distribuição da talassemia  $\alpha_2^{3,7Kb}$  em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

**Figura 13.** Demonstração gráfica da análise de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes HbSS com os alelos selvagem e mutante para talassemia  $\alpha 2^{3,7Kb}$

**Figura 14.** Representação gráfica da frequência (%) dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia .

**Figura 15.** Representação gráfica da frequência (%) dos genótipos ligados ao grupo de genes da globina beta nos em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

**Figura 16.** Heredograma da família do caso índice 01

**Figura 17.** Gel em agarose a 1% mostrando o produto da PCR para a PHHF-1 na família do caso índice 01 (**M**= marcador 250pb; **1**=Caso índice 01; **2**= Mãe; **3**= Irmão 1; **4**= Irmão 2; **5**= controle negativo).

**Figura 18.** Gel em agarose a 1% mostrando o produto da PCR para a PHHF-2 na família do caso índice 01 (**M**= marcador 250pb; **1**=Caso índice 01; **2**= Mãe; **3**= Irmão 1; **4**= Irmão 2; **5**= controle negativo).

**Figura 19.** Heredograma da família do caso índice 02

**Figura 20.** Gel em agarose a 1% mostrando o produto da PCR para a PHHF-1 no caso índice 02 e sua genitora (**M**= marcador 250pb; **1**=Caso índice 02; **2**= Mãe; **3**= controle negativo).

**Figura 21.** Gel em agarose a 1% mostrando o produto da PCR para a PHHF-2 no caso índice 02 e sua genitora (**M**= marcador 250pb; **1**=Caso índice 02; **2**= Mãe; **3**= controle negativo).

**Figura 22.** Heredograma da família do caso índice 03

**Figura 23.** Gel em agarose a 1% mostrando o produto da PCR para a PHHF-1 na família do caso índice 03 (**M**= marcador 250pb; **1**=Caso índice 03; **2**= Mãe; **3**= Pai 1; **4**= controle negativo).

**Figura 24.** Gel em agarose a 1% mostrando o produto da PCR para a PHHF-2 na família do caso índice 03 (**M**= marcador 250pb; **1**=Caso índice 03; **2**= Mãe; **3**= Pai; **4**= controle negativo).

**Figura 25.** Gel em agarose a 1% mostrando o produto da PCR para a PHHF-4 na família do caso índice 03 (**M**= marcador 250pb; **1**=Caso índice 03; **2**= Mãe; **3**= Pai 1; **4**= controle negativo).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Localização da região de amplificação e sequência dos *primers* utilizados para cada reação.

**Tabela 2.** Características demográficas e laboratoriais dos indivíduos HbSS em Salvador-Bahia.

**Tabela 3.** Associação entre os dados hematológicos e a concentração de HbF em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

**Tabela 4.** Associação entre os dados bioquímicos e a concentração de HbF em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

**Tabela 5.** Associação entre a concentração média de HbF e os dados clínicos em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia

**Tabela 6.** Frequência dos polimorfismos localizados na região promotora do gene *HBG2* em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

**Tabela 7.** Frequência dos polimorfismos encontrados na região promotora no gene *HBG1* em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

**Tabela 8.** Associação entre os polimorfismos identificados nas regiões promotoras dos genes *HBG2* e *HBG1* e a concentração de HbF em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

**Tabela 9.** Análise dos valores médios das variáveis hematológicas e bioquímicas na presença dos genótipos selvagem e mutante para os polimorfismos identificados nas regiões promotoras dos genes *HBG2* e *HBG1* em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

**Tabela 10.** Análise das manifestações clínicas mais frequentes na presença dos genótipos mutante e selvagem para o polimorfismo -396/-391del na região promotora do gene *HBG2* em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

**Tabela 11.** Frequência dos polimorfismos investigados nos genes *BCL11A*, *HIMP* e *OR51B5/6* em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

**Tabela 12.** Associação entre os SNPs nos genes *BCL11A*, *HMIP* e *OR51B5/6* e a concentração de HbF em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

**Tabela 13.** Análise dos valores médios das variáveis hematológicas e bioquímicas na presença dos alelos selvagem e mutante para os polimorfismos *BCL11A* rs6736518, *BCL11A* rs766432, *HMIP* rs35959442, *HMIP* rs11759553, *OR51B5/6* rs4910756 e *OR51B5/6* rs7483122 em indivíduos HbSS em Salvador-Bahia.

**Tabela 14.** Análises multivariadas em modelos específicos, associando o uso de hemoderivados com marcadores hematológicos, bioquímicos e moleculares em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia

**Tabela 15.** Análises multivariadas em modelos específicos, associando a concentração de HbF com marcadores hematológicos, bioquímicos e moleculares em indivíduos HbSS em Salvador-Bahia

**Tabela 16.** Análises multivariadas em modelos específicos, associando a ocorrência de pneumonia com marcadores hematológicos, bioquímicos e moleculares em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia

**Tabela 17.** Dados hematológicos e bioquímicos dos casos sugestivos de PHHF em Salvador-Bahia.

**Tabela 18.** Polimorfismos investigados na região promotora dos genes *HBG2* e *HBG1* e nos genes *BCL11A*, *HMIP*, *OR51B5/6* nos indivíduos com perfil sugestivo de PHHF

**Tabela 19.** Idade e perfil de hemoglobinas em indivíduos da família do caso índice 01

**Tabela 20.** Idade e perfil de hemoglobina em indivíduos da família do caso índice 02

**Tabela 21.** Idade e perfil de hemoglobina em indivíduos da família do caso índice 03

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ALT</b>	Alanina transferase
<b>AST</b>	Aspartato transferase
<b>AP1</b>	<i>Activator Protein 1</i>
<b>Atip</b>	Haplótipo atípico
<b>AVC</b>	Acidente vascular cerebral
<b>BCL11A</b>	<i>B-cell lymphoma/leukemia 11A</i>
<b>Ben</b>	Haplótipo Benin
<b>c-MYB</b>	Proto-oncogene membro da família de mieloblastoses ( <i>myeloblastosis</i> )
<b>Cam</b>	Haplótipo Camarões
<b>CAR</b>	Haplótipo República Centro Africana ou Bantu
<b>Células F</b>	Células fetais
<b>CHCM</b>	Concentração de hemoglobina corpuscular média
<b>DF</b>	Doença falciforme
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DRED</b>	<i>Direct Repeat Erythroid-Definitive</i>
<b>EKLF</b>	<i>Erythroid Kruppel-like factor</i>
<b>FOG-1</b>	<i>Friend of GATA 1 factor</i>
<b>GATA-1</b>	<i>Globin Transcription Factor 1</i>
<b>GGT</b>	Gama glutamil transferase
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HbH</b>	Hemoglobina H
<b>HbA1</b>	Hemoglobina 1 do adulto
<b>HbA2</b>	Hemoglobina 2 do adulto
<b>HbF</b>	Hemoglobina fetal
<b>HbAS</b>	Heterozigoto para hemoglobina S, traço falciforme
<b>HBA</b>	Genes alfa
<b>HBB</b>	Gene beta
<b>HBD</b>	Gene delta
<b>HBE1</b>	Gene épsilon
<b>HBG1</b>	Gene gama A
<b>HBG2</b>	Gene gama G
<b>HBZ</b>	Gene zeta
<b>HbS</b>	Hemoglobina S
<b>HBS1-L</b>	<i>Hsp70 subfamily B suppressor 1-like protein</i>
<b>HbSS</b>	Homozigoto para a hemoglobina S, anemia falciforme
<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular média
<b>Hm</b>	Hemácias
<b>Ht</b>	Hematócrito
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>ITRS</b>	Infecção do trato respiratório superior
<b>ITU</b>	Infecção do trato urinário
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>Kd</b>	Kilodáltons
<b>LCR</b>	<i>Locus Region Control</i>
<b>LDH</b>	Enzima desidrogenase láctica

<b>miR</b>	Micro-RNA
<b>NF-E2</b>	<i>Nuclear Factor Erythroid derived 2</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>OR51B5/6</b>	<i>Olfactory Receptor, Family 51, subfamily B</i>
<b>QTL</b>	<i>Quantitative Trait Loci</i>
<b>RP</b>	Razão de Prevalência
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>Sen</b>	Haplótipo Senegal
<b>SRY-6</b>	<i>Sex Determining Region Y-box 6</i>
<b>STA</b>	Síndrome Torácica Aguda
<b>SNP</b>	Polimorfismo de único nucleotídeo
<b>PHHF</b>	Persistência hereditária de hemoglobina fetal
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adesão à célula vascular-1
<b>VCM</b>	Volume corpuscular médio



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\delta$	Delta
$\varepsilon$	Epsilon
$\gamma$	Gama
$\gamma^A$	Gama A
$\gamma^G$	Gama G
$\gamma^{TA}$	Gama A com treonina na posição 75
$\gamma^{IA}$	Gama A com isoleucina na posição 75
$\zeta$	Zeta
$\psi\alpha$	Pseudo alfa
$\psi\beta$	Pseudo beta
$\psi\xi$	Pseudo zeta

## SUMÁRIO

### RESUMO

#### ABSTRACT

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE ABREVIATURAS

### LISTA DE SÍMBOLOS

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>1.1. A Hemoglobina</b> .....	21
<b>1.2. Regulação da expressão dos genes do complexo da globina beta</b> .....	24
<b>1.3. Regulação da expressão dos genes <i>HBG</i></b> .....	26
<b>1.4. As Hemoglobinopatias</b> .....	28
1.4.1. As hemoglobinopatias estruturais .....	28
1.4.1.1. A anemia falciforme .....	29
1.4.2. As hemoglobinopatias de síntese ou talassemia .....	33
1.4.2.1. A talassemia alfa .....	34
1.4.2.2. A persistência hereditária de hemoglobina fetal .....	36
A) Classificação hematológica .....	36
B) Classificação molecular .....	37
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	41
<b>3. OBJETIVO</b> .....	43
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	45
<b>3.2. Objetivos Específicos</b> .....	46
<b>4. CASUÍSTICA e MÉTODOS</b> .....	47
<b>4.1. CASUÍSTICA</b> .....	48
4.1.1. Desenho experimental .....	49
<b>4.2. MÉTODOS</b> .....	50
4.2.1. Coleta das amostras .....	50
4.2.2. Análises hematológicas e bioquímicas .....	50
4.2.3. Análises de biologia molecular .....	51
A) Extração de DNA genômico .....	51
B) Sequenciamento das regiões promotoras dos genes <i>HBG2</i> e <i>HBG1</i> .....	51

C) Investigação dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta .....	52
D) Investigação da talassemia alfa $\alpha 2^{3,7kb}$ .....	53
E) Investigação das PHHF por deleção (PHHF-1, PHHF-2 e PHHF-4) .....	54
F) Genotipagem por <i>PCR</i> em tempo real .....	54
4.2.4. Coleta dos dados clínicos .....	56
4.2.5. Análises estatísticas .....	57
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>91</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>104</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>106</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>117</b>

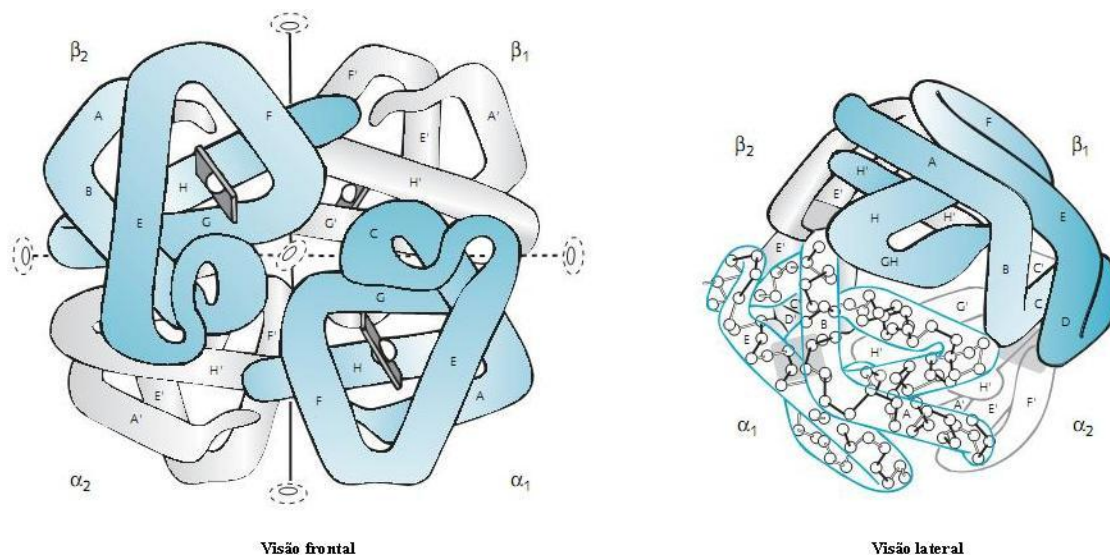


# 1. INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) é a principal proteína presente no interior dos eritrócitos dos mamíferos e tem como função principal o transporte de oxigênio ( $O_2$ ) e parte do dióxido de carbono ( $CO_2$ ). A Hb possui estrutura esferóide e globular, com aproximadamente 64 Kd, sendo formada por quatro subunidades, organizadas por cadeias polipeptídicas ou globinas, geralmente iguais duas a duas. Dessa forma, as cadeias de globina na molécula de Hb apresentam um par de cadeias do tipo alfa e outro de cadeias do tipo não-alfa (**Figura 1**). A estrutura da Hb é quimicamente unida ao grupamento heme, que é composto pelo átomo de ferro no estado ferroso ligado a protoporfirina IX. Esse grupamento possui sítios que facilitam a ligação e/ou liberação do oxigênio para os tecidos (PERUTZ *et al.*, 1960; BUNN & FORGET, 1986; PACE & ZEIN, 2006).



**Figura 1.** Molécula de hemoglobina. Estrutura quaternária da hemoglobina A1 ( $\alpha_2\beta_2$ ). Adaptado de LAYTON & NAGEL, 2010.

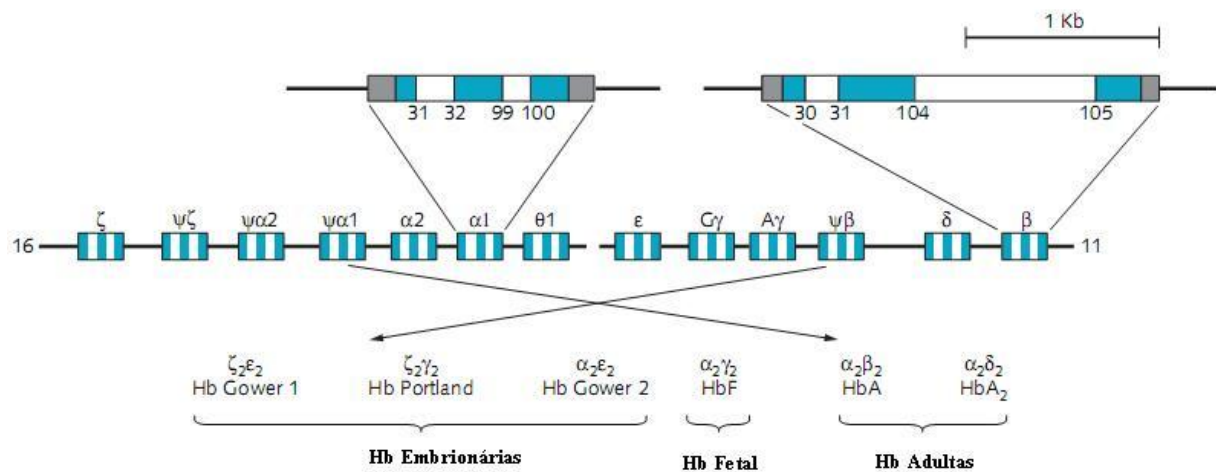
Cada cadeia de globina é composta por sequências de aminoácidos (aa), sendo que as cadeias alfa e não-alfa possuem 141 e 146 aa, respectivamente. As combinações entre as diversas cadeias polipeptídicas dão origem às diferentes hemoglobinas que caracterizam o período embrionário (intra-uterino), fetal e adulto, uma vez que são produzidas no decorrer de cada etapa do desenvolvimento ontogênico humano (BUNN & FORGET, 1986; KIEFER *et al.*, 2008).

A síntese das cadeias globínicas é regulada por genes específicos, localizados nos cromossomos 11 e 16 (**Figura 2**), na mesma ordem em que são expressos, ou seja, no sentido 5' → 3', com a presença de cadeias associadas ao período embrionário, fetal e adulto. Os quais diferentes grupos de genes são ativados ou reprimidos, com a ocorrência do fenômeno de substituição de hemoglobinas, onde as diferentes cadeias globínicas são sintetizadas independentemente (CAO & MOI, 2002). As combinações variadas das cadeias de globina possibilitam a formação de hemoglobinas distintas, sendo necessário o equilíbrio perfeito na sua complementação, de maneira a formar o tetrâmero funcional (PACE & ZEIN, 2006; KIEFER *et al.*, 2008).

O grupo de genes da globina alfa ( $\alpha$ ) está localizado no braço curto do cromossomo 16 em um segmento de DNA de 35kb, onde estão presentes o gene *zeta* (*HBZ*), dois pseudogenes,  $\psi\xi$  e  $\psi\alpha$ , e os genes *alfa* (*HBA*). Os genes *alfa* estão duplicados (*HBA1* e *HBA2*) no ser humano, provavelmente em decorrência do evento de duplicação gênica que ocorre durante o processo evolutivo. Esses genes duplicados são responsáveis pela codificação das cadeias globínicas  $\alpha$  (BUNN & FORGET, 1986; PACE & ZEIN, 2006).

O grupo de genes da globina beta ( $\beta$ ) está localizado no cromossomo 11, em um segmento de DNA superior a 60kb, onde estão presentes os genes *épsilon* (*HBE1*), *gama* (*HBG*), um pseudogene *beta* ( $\psi\beta$ ) e os genes *delta* (*HBD*) e *beta* (*HBB*). As cadeias

polipeptídicas decorrentes da expressão dos genes *HBG*, devido a mecanismos de duplicação e conversão gênica, diferem no aminoácido localizado na posição 136, com presença de glicina, sendo denominada gama G ( $\gamma^G$ ), ou de alanina, sendo denominada gama A ( $\gamma^A$ ). Além disso, a cadeia  $\gamma^A$  possui sítio polimórfico na posição 75, que pode apresentar isoleucina ( $\gamma^{IA}$ ) ou treonina ( $\gamma^{TA}$ ) (KIEFER *et al.*, 2008). Os genes *HBG* diferem ligeiramente nas suas regiões não codificantes, fato que é responsável pela expressão diferenciada dos dois genes durante o desenvolvimento fetal, apresentando a proporção  $\gamma^G/\gamma^A$  de 70/30 no período fetal e de 40/60 na vida adulta (ALTER, 1979; WEATHERALL & PROVAN, 2000; STAMATOYANNOPOULOS, 2005).



**Figura 2.** Controle gênico da síntese das hemoglobinas embrionárias, fetal e adulta, mostrando os mecanismos de substituição (*Switching*) das hemoglobinas. Adaptado de WEATHERALL, 2010.

No período embrionário, a hematopoese ocorre no saco vitelínico e os genes ativos são responsáveis pela síntese das cadeias zeta ( $\zeta$ ), que se combinam à cadeia épsilon ( $\epsilon$ ) para formar a hemoglobina Gower-1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ). Essa mesma cadeia zeta, quando se combina à cadeia gama forma a hemoglobina Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ); a síntese das cadeias  $\alpha$  ocorre ainda no período embrionário, onde se combinam com a cadeia épsilon e formam a hemoglobina Gower-2

( $\alpha_2\epsilon_2$ ). A síntese das hemoglobinas embrionárias ocorre nos três primeiros meses de gestação. A produção de hemoglobina fetal (HbF) ocorre durante o período fetal, sendo representada pela combinação das cadeias alfa e gama ( $\alpha_2\gamma_2$ ). A síntese dessa hemoglobina decai logo após os primeiros seis meses de vida, quando então predominam as hemoglobinas da vida adulta (STAMATOYANNOPOULOS & GROSVELD, 2001; STAMATOYANNOPOULOS, 2005).

O gene *HBB* é expresso com pouca intensidade nas seis primeiras semanas de vida fetal, mas a partir deste período ocorre a mudança no padrão de hemoglobinas (*Switching*), quando a síntese das cadeias  $\gamma$  é largamente substituída pela síntese das cadeias  $\beta$ , dando origem à produção da hemoglobina A<sub>1</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ ) (COLLINS & WEISSMAN, 1984; BACOLA *et al.*, 1995). O mecanismo pelo qual essa mudança ocorre ainda é desconhecido, sendo atribuído ao estado de metilação dos genes ou a outras condições que podem afetar ou influenciar na transcrição gênica. A síntese das cadeias delta ( $\delta$ ) tem início na 25ª semana de gestação, sendo produzidas em concentrações reduzidas, permanecendo nestes níveis durante toda a vida adulta (COLLINS & WEISSMAN, 1984; BACOLA *et al.*, 1995; KIEFER *et al.*, 2008).

## **1.2. REGULAÇÃO DOS GENES DO COMPLEXO DA GLOBINA BETA**

A expressão dos genes que formam o complexo da globina beta decorre de uma série de interações complexas envolvendo elementos *cis* e *trans* regulatórios que podem exercer atividade estimulante ou repressora no controle da expressão gênica (KOLLIAS *et al.*, 1987; PACE & ZEIN, 2006; LETTRE *et al.*, 2008; SANKARAN *et al.*, 2010).

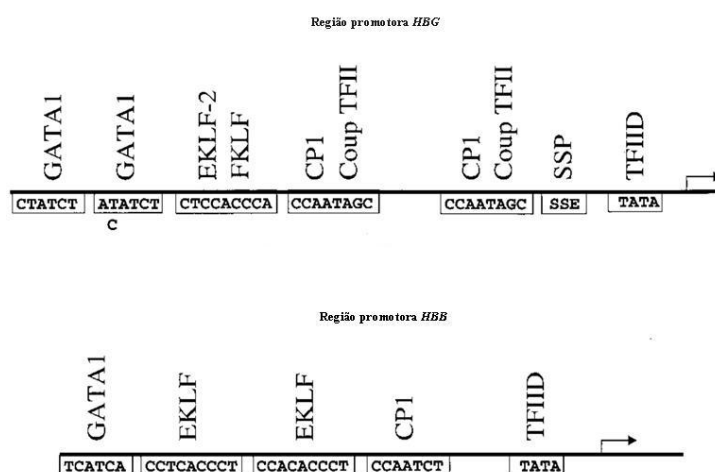
A região controladora do locus da globina beta ou *LCR* é o principal elemento regulatório da expressão diferenciada desse grupo de genes, sendo constituída por seis sítios



hipersensíveis à ação da DNase I (5'-HS1-HS5) dispostos ao longo de 6-22Kb, na região 5' do gene (FU *et al.*, 2002). Cada um desses sítios contém diferentes combinações de domínios conservados, onde ocorre a ligação de proteínas que influenciam o processo da transcrição gênica (STAMATOYANNOPOULUS, 2005; NOORDERMEER & DE LAAT, 2008)

As sequências conservadas TATA, CAAT, e CACCC *box* estão presentes na região promotora dos genes em geral e apresentam papel importante na regulação da expressão dos genes da globina beta (**Figura 3**). As diferenças existentes entre as regiões promotoras dos genes *HBG* e *HBB* têm sido alvo de muitos estudos, que visam elucidar os mecanismos envolvidos na substituição dos genes *HBG* pelo gene *HBB* (CAO & MAO, 2002; TESTA, 2009).

Os rearranjos conformacionais presentes na estrutura da cromatina têm papel importante no controle da regulação dos genes da globina beta (FORSBERG *et al.*, 2000). Essas alterações consistem em modificações covalentes de (1) metilação, importantes para o silenciamento de genes; e (2) acetilação no DNA e núcleo das histonas que alteram as propriedades físicas da cromatina e a torna mais acessível à interação com fatores transcricionais. Alguns estudos demonstram que genes ativos são altamente acetilados (LITT *et al.*, 2000; SCHÜBELER *et al.*, 2000; BULGER *et al.*, 2003; YIN *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Representação esquemática das regiões promotoras dos genes *HBG* e *HBB*. Adaptado de CAO & MAO, 2002.

Os fatores transcricionais GATA-1, EKFL e NF-E2 estão envolvidos na regulação da hematopoese e da expressão do complexo de genes da globina beta por interação com a *LCR* e as regiões promotoras (BANK, 2006; SANKARAN *et al.*, 2010 ).

### 1.3. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *HBG*

Da mesma forma que os demais genes que compõem o grupo de genes da globina beta, os genes *HBG2* e *HBG1* possuem a expressão controlada por mecanismos moleculares complexos que envolvem elementos *cis* e *trans* regulatórios que podem estimular ou reprimir a transcrição gênica (PACIE & ZEIN, 2006; TESTA, 2009). Entre os elementos *cis* regulatórios, destaca-se a *LCR*, especificamente os sítios HS-2 e HS-3 que estão envolvidos na ativação dos genes *HBG* durante o desenvolvimento fetal (ELLIS *et al.*, 1996).

As sequências conservadas TATA, CCAAT, CACCC *box*, os resíduos CpG, o elemento seletor (SSE) e o sítio de ligação do fator transcricional GATA, que estão presentes nas regiões promotoras dos genes *HBG*, representam sítios de ligação de fatores transcricionais importantes, como GATA-1, FOG-1 AP1, SYR-6, DRED e EKFLs (**Figura 3**). Dessa forma, a ocorrência de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) ao longo da região promotora dos genes *HBG* e de deleções ao longo do grupo de genes da globina beta tem sido associada ao fenótipo de produção continuada da HbF durante a vida adulta (CAO & MAO, 2002; NOORDERMEER & DE LAAT, 2008; SANKARAN *et al.*, 2010). Essas mutações se localizam basicamente nas posições -200, -175 e -115 da região promotora e estão associadas a mecanismos de bloqueio de ligação de repressores transcricionais e à criação de sítios alternativos para fatores transcricionais envolvidos no controle da expressão dos genes *HBG* (KOLLIAS *et al.*, 1987; BANK, 2006; TESTA, 2009). O polimorfismo

-117 C>T, localizado na região promotora do gene *HBG1*, é um exemplo clássico desse tipo de evento, uma vez que apresenta atividade repressora da transcrição pela alteração do sítio de ligação dos fatores transcricionais GATA-1 e NF-E3 com a sequência CCAAT *box* (GUMUCIO *et al.*, 1988; PACIE & ZEIN, 2006).

As deleções localizadas ao longo do grupo de genes da globina beta estão associadas à expressão continuada dos genes *HBG*. É importante salientar que deleções que envolvem a sequência intergênica entre os genes *HBG* e o gene *HBB* possuem papel preponderante na substituição ocorrida entre as cadeias  $\gamma$  pela cadeia  $\beta$ . A deleção denominada Corfu é um exemplo desse evento, uma vez que está localizada em parte dessa região, sendo associada a níveis de HbF de 80-90% durante a vida adulta (BANK *et al.*, 2006; TESTA, 2009).

Os estudos de genética têm demonstrado a influência de modificadores epigenéticos na regulação da expressão dos genes *HBG*; estes elementos estão localizados próximos ao traço do locus quantitativo (*QTL*) e são transcritos majoritariamente nos cromossomos 2p15, 6q23 e 11p15, onde se localizam o oncogene *BCL11A*, os genes *c-MYB-HBS1-L* e o polimorfismo -158 C>T (*XmnI*) e o conjunto de receptores olfatórios (*OR51B5* e *OR51B6*), respectivamente. Esses *QTLs* juntos detêm de 20 a 50% do controle da expressão dos genes *HBG* (GARNER *et al.*, 2002; WYSZYNSKI *et al.*, 2004; JIANG *et al.*, 2006; MENZEL *et al.*, 2007; MENZEL & THEIN, 2009).

Os rearranjos conformacionais na estrutura da cromatina têm papel importante no controle da regulação dos genes *HBG*. Essas alterações consistem em modificações covalentes de metilação e acetilação no núcleo das histonas e estão associadas à ativação e silenciamento do gene (SCHUBELER *et al.*, 2000; LITT *et al.*, 2001; LAVELLE *et al.*, 2005; YIN *et al.*, 2007).

Mais recentemente foi demonstrada a relevância dos micro-RNAs (miRs) nos mecanismos de controle da eritropoese e na expressão dos genes da globina beta (DORE *et*

*al.*, 2008; KOSAKA *et al.*, 2008). Bianchi e colaboradores (2009) sugerem que a super-expressão do miR-210 está associada a expressão continuada dos genes *HBG*.

Desta forma, fica evidente que a expressão dos genes *HBG* é regida por fatores moleculares complexos. Portanto, a elucidação dos mecanismos envolvidos na expressão dos genes *HBG* é de grande interesse, uma vez que a síntese continuada de HbF durante a vida adulta é um fator de prognóstico favorável em hemoglobinopatias graves, como a doença falciforme e talassemias (STAMATOYANNOPOULOS, 2005; BANK, 2006).

## **1.4. AS HEMOGLOBINOPATIAS**

As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças, com origem genética, onde existem alterações em genes responsáveis pela síntese das cadeias polipeptídicas da hemoglobina. Basicamente, podem ser divididas em dois grupos principais: as estruturais e as de síntese (ANGASTINIOTIS & MODELL, 1998; TRENT, 2006).

### **1.4.1. As Hemoglobinopatias estruturais**

As hemoglobinopatias estruturais são decorrentes de mutações que envolvem substituições simples, inserções ou deleções de nucleotídeos que podem alterar as regiões codificadoras dos genes e, conseqüentemente, contribuir para a substituição de aa na proteína. Essas alterações estruturais podem comprometer as propriedades físico-químicas e funcionais da Hb, com base no tipo da mutação e na sua localização (FRENETTE & ATWEH, 2007).

Nesse grupo, destaca-se a hemoglobina variante S (HbS) que é decorrente da mutação pontual (G**A**G→G**T**G) no sexto códon do gene *HBB*, que leva a substituição do ácido glutâmico por valina na cadeia polipeptídica  $\beta$  (PAULING *et al.*, 1949; FRENETTE &

ATWEH, 2007). Em condições de hipóxia, a HbS forma polímeros com modificação da forma das hemácias, tornando-as alongadas, ou em forma de foice, que são mais rígidas e participam da oclusão dos vasos sanguíneos onde a circulação é mais lenta. Essas deformações celulares alteram as trocas iônicas, afetam a permeabilidade celular e, como consequência, surgem lesões na membrana, o que também contribui para encurtar a meia-vida das hemácias (CHUI & DOVER, 2001; STUART & NAGEL, 2004). Esse processo pode ser reversível com o aumento do O<sub>2</sub>, contudo, depois de repetidos episódios de hipóxia, a hemácia torna-se irreversivelmente falcizada. Ainda, como consequência desse processo, os eritrócitos falcizados aderem com facilidade ao endotélio vascular, contribuindo para os episódios de vaso-oclusão, um dos principais eventos associados à fisiopatologia da doença falciforme (DF) (STUART & NAGEL, 2004; VEKILOV, 2007; STEINBERG, 2009).

#### **1.4.1.2. A anemia falciforme**

A anemia falciforme (HbSS) é uma doença monogênica mendeliana, de herança autossômica recessiva, onde ocorre a homozigose da mutação pontual GAG→ GTG no sexto códon da globina beta. Os indivíduos que possuem HbSS apresentam anemia hemolítica crônica, entretanto, os indivíduos heterozigotos para a hemoglobina S (HbAS) possuem hemácias com aproximadamente 20 a 45% de HbS e são assintomáticos (STEINBERG, 2008). A associação da hemoglobina S com outras hemoglobinas variantes, como as hemoglobinas C, D, E ou talassemias são denominadas doenças falciformes (DF), sendo consideradas de gravidade menor que a HbSS (WEATHERALL & PROVAN, 2000).

Os indivíduos com HbSS possuem quadro clínico heterogêneo, que varia com a presença de anemia hemolítica grave à ocorrência de crises dolorosas e ocorrência de fenômenos vaso-oclusivos variados (SONATI & COSTA, 2008). A anemia falciforme possui

morbidade e mortalidade elevadas, principalmente decorrentes de infecções, sendo necessário o desenvolvimento de estudos que possam vir a estabelecer marcadores de prognóstico para os quadros clínicos mais graves da doença (STEINBERG, 2001; STEINBERG, 2009).

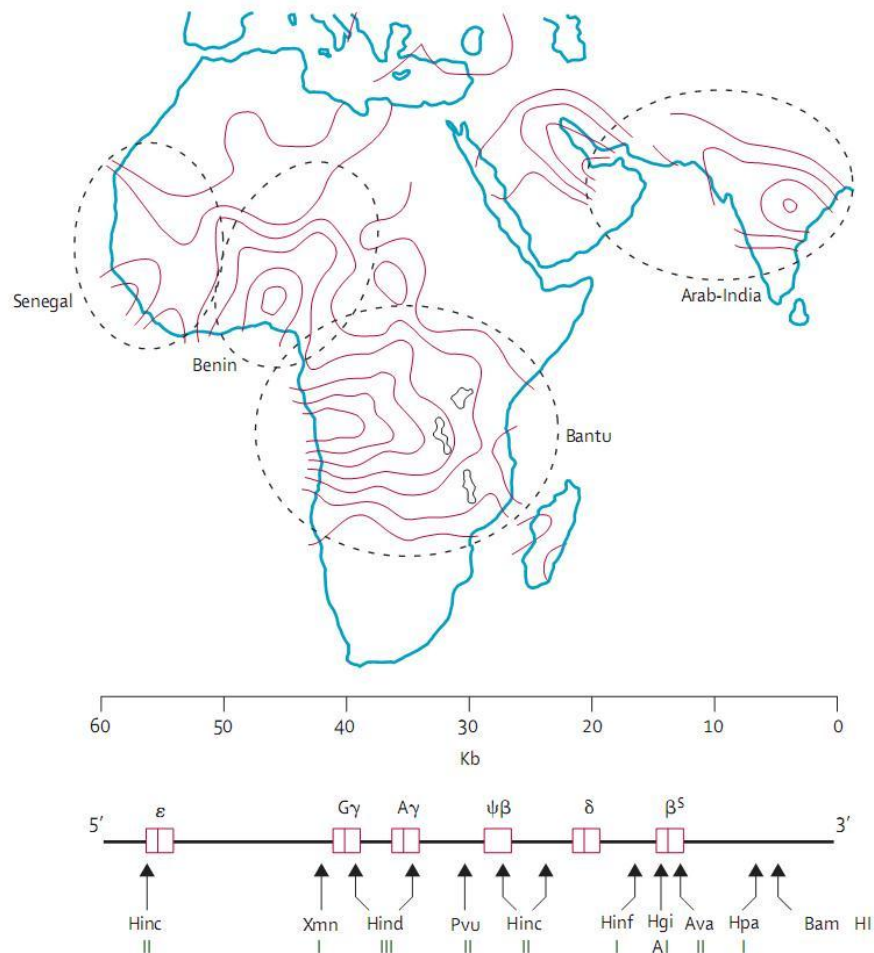
Diversos estudos têm demonstrado o papel da interação gênica na determinação do fenótipo dos pacientes com HbSS (TAYLOR *et al.*, 2002; FERTRIN *et al.*, 2003; KUTLAR *et al.*, 2004; ASHLEY-KOCH *et al.*, 2008; SEBASTIANI *et al.*, 2008). Os aspectos ambientais e sócio-econômicos contribuem em parte para essa variabilidade clínica, uma vez que as taxas de óbito em países em desenvolvimento, onde as pessoas têm menor acesso aos cuidados de saúde, são muito maiores (AKAR & ADEKILE, 2008). Contudo, mesmo em países desenvolvidos, a heterogeneidade clínica dos pacientes com HbSS é evidente (STEINBERG, 2008).

A hemoglobina fetal é o principal modulador da HbSS, sendo que a maioria dos determinantes genéticos que afeta o curso clínico da doença interfere nos níveis da HbS (WATSON *et al.*, 1948; DOVER & CHARACHE, 1987; CHANG *et al.*, 1995; OFORI-ACQUAH *et al.*, 2004; SEDGEWICK *et al.*, 2008). Os indivíduos com a associação HbS e persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF) são denominados HbSF e apresentam quadro clínico mais brando da doença, com manifestações clínicas mais leves e diferentes, em gravidade, daquelas observadas na HbSS. A hemoglobina fetal inibe a polimerização da HbS, com formação de híbrido assimétrico, composto por cadeias polipeptídicas das duas hemoglobinas ( $\alpha_2\beta^S\gamma$ ), que interage com os sítios envolvidos na estabilização dos polímeros formados pela HbS desoxigenada (BHAUMIK, 1994; STUART & NAGEL, 2004). Bhaumik (1994) demonstrou que o híbrido das hemoglobinas quando constituído pelas cadeias  $\gamma^G$ , apresenta maior estabilidade que o formado com a participação da cadeia  $\gamma^A$ . Os níveis elevados de HbF têm sido associados à redução dos episódios de crises de dor, incidência de Síndrome Torácica Aguda (STA), retinopatia proliferativa, úlceras de perna, sequestro

esplênico e das taxas de óbito perinatal (NAGEL & STUART, 2004; STEINBERG, 2008; STEINBERG, 2009).

Os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta são definidos como a associação não randômica de combinações de sítios de clivagem para endonucleases de restrição localizados ao longo desse grupo de genes (STUART & NAGEL, 2004) e têm sido associados a concentrações variadas de HbF. Cinco haplótipos principais são descritos e nomeados de acordo com a região geográfica onde foram primeiro identificados: o haplótipo Benin (Ben), associado à África Ocidental; o Bantu ou República Centro Africana (CAR) à África Oriental e Centro-Sul; o Senegal (Sen) à África Atlântico Ocidental; a Índia-Arábia Saudita (Saudi) à Índia e Península Arábica Oriental e o Camarões (Cam) à Costa Ocidental da África (**Figura 4**) (NAGEL & STUART, 2004; POWARS, 1991; GONÇALVES *et al.*, 1994).

Os pacientes com HbSS e o haplótipo Sen, que está associado a concentrações elevadas de HbF (>15%), apresentam o curso clínico menos grave da doença; o Ben a concentrações intermediárias de HbF (5 a 15%) e curso clínico intermediário, e o CAR à concentrações diminuídas de HbF (< 5%) e ao quadro clínico mais grave da doença. Os indivíduos com o haplótipo Saudi apresentam concentração elevada de HbF e curso clínico heterogêneo (NAGEL, 1984; POWARS, 1991; ADEKILE *et al.*, 2005). Em alguns estudos relacionados aos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta realizados no Brasil foram encontradas características bem peculiares na nossa população, tais como, indivíduos BEN/CAR e CAR/CAR com níveis elevados de HbF e a presença de haplótipos denominados como atípicos, devido ao fato de não se enquadrarem em nenhum dos tipos já descritos, e que foram descritos na frequência de 8% no total de indivíduos HbSS estudados (COSTA *et al.*, 1994; GONÇALVES *et al.*, 1994; LYRA *et al.*, 2005).



**Figura 4.** Representação das regiões geográficas associadas aos sítios polimórficos localizados no cromossomo 11, bem como o padrão de clivagem para diferentes endonucleases de restrição. Adaptado de STUART & NAGEL, 2004.

A interação entre a talassemia alfa e a HbSS tem sido associada ao fenótipo mais brando da doença, com redução do risco de falência de órgãos, de eventos hemolíticos, priapismo, colelitíase, síndrome torácica aguda (STA), acidente vascular cerebral (AVC) e úlceras em membros, principalmente em membros inferiores, caracterizados pela ocorrência de úlceras de perna. Cerca de um terço dos pacientes com HbSS apresenta concomitância da talassemia alfa, sendo que a deleção de 3,7Kb ( $\alpha_2^{3,7Kb}$ ), constitui-se na forma mais frequentemente descrita. Essa associação resulta na redução quantitativa de HbS intracelular e, conseqüentemente, na sua polimerização no interior dos eritrócitos. Dessa forma, ocorre



também o aumento do volume corpuscular médio (VCM), redução da contagem de reticulócitos e aumento da meia-vida dos eritrócitos. Esses efeitos são observados de maneira mais pronunciada nos homozigotos para deleção (STEINBERG & EMBURY, 1986; STEINBERG, 2009).

Estudos recentes têm sugerido possíveis candidatos a fatores moduladores da clínica da DF. Entre esses novos candidatos estão os mediadores inflamatórios, o estresse oxidativo, o óxido nítrico (NO), a vaso-regulação, a interação célula-célula, alguns fatores associados à coagulação sanguínea, fatores de crescimento e a expressão de algumas citocinas (STEINBERG, 2005; STEINBERG, 2009).

#### **1.4.2. As hemoglobinopatias de síntese ou talassemias**

As síndromes talassêmicas são desordens autossômicas recessivas que representam as alterações genéticas monogênicas mais prevalentes na população mundial. São caracterizadas pela redução quantitativa na síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina, com desequilíbrio entre essas subunidades, dificuldades no processo de eritropoese, com hemoglobinizacão deficiente dos eritroblastos. As talassemias mais prevalentes são a talassemia alfa e a beta. Nesse grupo também estão inseridas a PHHF (MUNCIE & CAMPBELL, 2009).

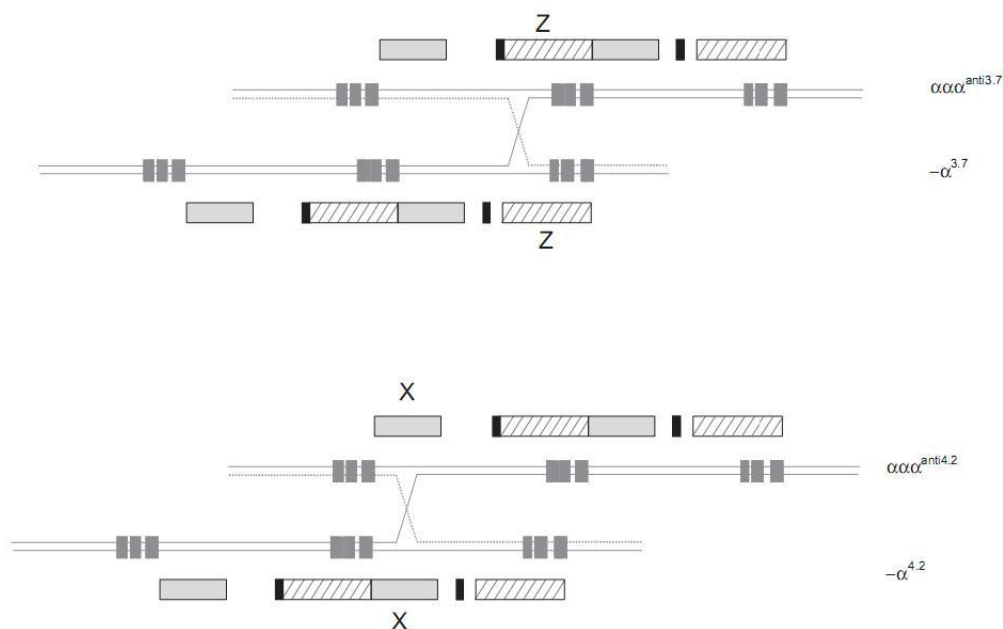
##### **1.4.2.1. A talassemia alfa**

A talassemia alfa é resultante da ausência ( $\alpha^0$ ) ou síntese deficiente ( $\alpha^+$ ) das cadeias globínicas alfa, com produção desequilibrada de cadeias globínicas e acúmulo das cadeias  $\beta$  no interior dos eritrócitos. Essas cadeias, quando em excesso, podem se ligar para formar tetrâmeros de caráter instável, como o tetrâmero  $\beta_4$ , denominado hemoglobina H (HbH) no

indivíduo adulto; o tetrâmero  $\gamma_4$ , denominado hemoglobina de Bart's (Hb Bart's), é encontrado no período fetal e alguns meses após o nascimento. De maneira geral, os indivíduos com talassemia  $\alpha$  apresentam anemia em graus variáveis, hipocromia, microcitose, poiquilocitose, redução da fragilidade osmótica e reticulocitose (OLIVEIRA *et al.*, 2006; HARTEVELD & HIGGS, 2010).

O indivíduo normal possui quatro genes *alfa* e seu genótipo é representado pela presença de dois genes *alfa* em cada cromossomo ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ). Os genes *HBA1* e *HBA2* são homólogos e codificam proteínas idênticas, divergindo em apenas 17% (EMBURY *et al.*, 1980; HIGGS *et al.*, 2009). Apesar dessa homologia, o gene *HBA2* apresenta expressão duas a três vezes maiores que o gene *HBA1*, sendo determinante para o estabelecimento do perfil de seus portadores, pois alterações no primeiro gene implicam em consequências no quadro clínico. Assim, a caracterização da talassemia alfa está relacionada a três fatores que incluem o número de genes afetados, o grau de decréscimo na expressão do gene e quanto o gene afetado contribui para a síntese da globina alfa (FERTRIN & COSTA 2010; HARTEVELD & HIGGS, 2010).

Os mecanismos moleculares envolvidos na talassemia  $\alpha$  podem ser causados por mutações pontuais ou deleções nos genes *HBA*, sendo as formas delecionais as mais frequentes (**Figura 5**). O grau elevado de homologia presente nos genes *HBA* favorece a ocorrência de eventos de recombinação gênica (*crossing-over* desigual) durante a meiose, resultando em deleção de um gene em um cromossomo ( $-\alpha$ ) e triplicação no outro ( $\alpha\alpha\alpha$ ). A talassemia  $\alpha_2$  é a mais freqüente, apresentando dois tipos de deleções, a de 3,7 Kilobases (Kb) ( $\alpha_2^{3,7\text{Kb}}$ ) e a de 4,2Kb ( $\alpha_2^{4,2\text{Kb}}$ ) (EMBURY *et al.*, 1980; HARTEVELD & HIGGS, 2010).



**Figura 5.** *Crossing-over* desigual entre as regiões homólogas Z e X no cromossomo 16, resultando nas deleções  $\alpha_2^{3.7\text{Kb}}$  e  $\alpha_2^{4.2\text{Kb}}$ , respectivamente. Adaptado de HIGGS, 2009.

A talassemia  $\alpha$  pode apresentar quatro fenótipos distintos: o de portador silencioso, o traço talassêmico alfa; a doença da Hb H e a hidropisia fetal representada pela presença da Hb Bart's. A talassemia  $\alpha$  possui incidência elevada entre os povos da Ásia, Oceania, Oriente Médio e Mediterrâneo, bem como em todo o continente africano (ADAMS *et al.*, 1994; HARTEVELD & HIGGS, 2010). O portador silencioso e o traço talassêmico alfa são as formas mais freqüentes no Brasil, sendo que o tipo  $\alpha_2^{3.7\text{Kb}}$  é a forma mais comum, com freqüência de 20 a 25% do traço heterozigoto em afrodescendentes do sudeste (SONATI *et al.*, 1991). Na Bahia foi demonstrada a freqüência de 19,7% e 2,5% para os heterozigotos e homozigotos em recém-nascidos, respectivamente (ADORNO *et al.*, 2005; FERTRIN & COSTA, 2010).

### **1.4.2.2 A Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal**

A denominação PHHF corresponde a um grupo de condições hereditárias, de herança autossômica dominante, com heterogeneidade genética e caracterizado pela produção de HbF em concentrações acima do normal durante a vida adulta, sem que haja distúrbio hematopoético. As formas de PHHF descritas apresentam fenótipos similares, mas que são resultantes de defeitos moleculares múltiplos e complexos. Dessa forma, as formas de PHHF são classificadas pela análise dos parâmetros hematológicos, avaliando o padrão de distribuição da HbF no interior dos eritrócitos, e com base nas alterações moleculares existentes (BUNN & FORGET, 1986; GONÇALVES *et al.*, 1995; FORGET, 1998).

#### **A) Classificação hematológica**

Os níveis relativos das cadeias  $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ,  $\beta$  e  $\delta$ , o percentual de HbF e seu padrão de distribuição nas hemácias são dados importantes nas PHHF's. Dessa forma, elas podem ser classificadas como pancelulares, quando estão presentes concentrações elevadas de HbF, com distribuição uniforme entre todos os eritrócitos; e heterocelulares, aquelas caracterizadas pela presença de concentrações moderadas de HbF com distribuição heterogênea nas hemácias (THEIN & CRAIG, 1998; THEIN *et al.*, 2009).

#### **B) Classificação molecular**

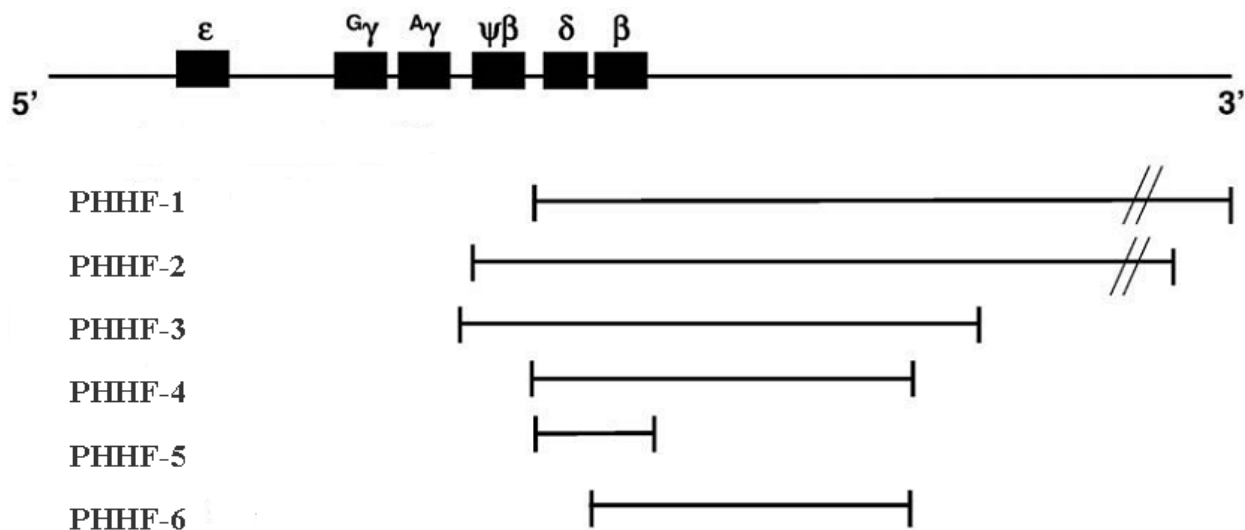
A gênese das PHHFs está associada a mutações de ponto nas regiões promotoras dos genes *HBG*, a deleções presentes em toda a extensão do grupo de genes da globina beta e,

mais recentemente, a mecanismos epigenéticos (FORGET, 1998; MENZEL & THEIN, 2009; SANKARAN *et al.*, 2010).

A ocorrência de mutações de ponto ou de deleções pequenas concentra-se na região promotora dos genes *HBG2* e *HBG1*, em torno das posições – 202 a -114. Nessa região ligam-se numerosos fatores de transcrição que têm efeito positivo ou negativo sobre a atividade do gene. Na maioria dos casos, o nível de HbF no heterozigoto varia entre 3 – 10%, contudo há três mutações de ponto associadas a concentrações mais elevadas de HbF, com variação entre 15-30%, a – 202 C>T, – 175 T>C, – 158 C>T na região promotora do gene *HBG2* e -175 T >C na região promotora do gene *HBG1* (CRAIG *et al.*, 1993; PISTIDDA *et al.*, 1997; FORGET, 1998). Nesse grupo, insere-se também a forma de PHHF descrita no Brasil, resultante da mutação – 195 C>G na região promotora do gene *HBG1* (COSTA, *et al.*, 1990).

As deleções associadas à PHHF são caracterizadas pela remoção dos genes *HBD* e *HBB* e não afetam os genes *HBG*. Como consequência, há expressão aumentada dos genes *HBG*, com produção de HbF nos heterozigotos, em cerca de 17 a 30% (FORGET, 1998). Os poucos homozigotos conhecidos apresentam 100% HbF na vida adulta, com associação a uma eritrocitose moderada, uma vez que esta hemoglobina tem afinidade aumentada pelo oxigênio, fato que contribui para o aumento da viscosidade sanguínea (BUNN & FORGET, 1986; SONATI & COSTA, 2008). Até pouco tempo, o total de seis tipos de deleções já foram descritas (**Figura 6**): PHHF-1 (COLLINS *et al.*, 1987) e PHHF-2 (COLLINS *et al.*, 1987), que são encontradas em afrodescendentes e possuem deleções grandes, de aproximadamente 105Kb, sendo que se diferenciam uma da outra em apenas 5-6 Kb; a PHHF-3 (KLUTAR *et al.*, 1984) que apresenta uma deleção de aproximadamente 40Kb, com descrições em indianos; a PHHF-4 (OTTOLENGHI *et al.*, 1982) e PHHF-5 (CAMASCHELLA *et al.*, 1990) que foram descritas em italianos e a PHHF-6 (WINICHAGOON *et al.*, 1990) descrita em

chineses. Cumpre ressaltar que as PHHF-1 e PHHF-2 já foram descritas na população brasileira (GONÇALVES *et al.*, 1995; ANDRADE *et al.*, 2003).



**Figura 6.** Representação esquemática das deleções que afetam grupo de genes da globina beta, localizados no cromossomo 11, e que ocasionam a persistência hereditária de hemoglobina fetal. Adaptado de JOLY *et al.*, 2009.

A utilização da biologia molecular, em especial a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polimerase Chain Reaction*) com fluorescência, o PCR em tempo real e MLPA (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*), um número grande de deleções novas foi identificado (ANDRADE *et al.*, 2003; BABASHAH *et al.*, 2009; JOLY *et al.*, 2005; GALLIENNE *et al.*, 2009; SO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010).

Os estudos de ligação têm demonstrado a influência de agentes moduladores localizados em vários cromossomos, como o 2p16.1, 6q23.3, 8q, 19p13.12-13 e Xp22.2 e seus envolvimento nos mecanismos de PHHF (DOVER *et al.*, 1992; GARNER *et al.*, 1998; GARNER *et al.*, 2002; MENZEL *et al.*, 2007; BORG *et al.*, 2010).

Mais recentemente foi demonstrada a importância do cromossomo 2p16.1 na regulação da síntese continuada de HbF, onde está localizado o sítio de transcrição do oncogene *BCL11A* (MENZEL *et al.*, 2007; LETTRE *et al.*, 2008; UDA *et al.*, 2008). Com a

utilização de abordagens variadas foi validado que o *BCL11A* é o principal agente repressor dos genes *HBG*, sendo demonstrado que eritrócitos adultos com níveis elevados de HbF apresentam redução da expressão de mRNA do *BCL11A* (SANKARAN *et al.*, 2008; SANKARAN *et al.*, 2010). Os mecanismos moleculares envolvidos nessa regulação ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, Chen e colaboradores (2009) sugeriram em experimentos com células *K562* que a proteína BCL11A se ligaria a um sítio específico (GGCCGG) localizado próximo a região promotora dos genes *HBG*, reprimindo sua expressão. Polimorfismos nesse gene têm sido associados a um fenótipo de síntese continuada de HbF em indivíduos normais e em portadores de hemoglobinopatias, como a HbSS (UDA *et al.*, 2008; GALARNEAU *et al.*, 2011)

Os genes *c-MYB-HBSIL* estão localizados no cromossomo 6q23.3 e também têm sido associados a concentrações diferenciadas de HbF (MENZEL *et al.*, 2007; LETTRE *et al.*, 2008; UDA *et al.*, 2008). A expressão elevada de mRNA dos genes *HBSIL* e *MYB* em precursores eritróides está associada ao aumento de HbF (THEIN *et al.*, 2007). Além disso, já foi comprovado que o gene *HBSIL* sozinho está relacionado com a expressão aumentada dos genes *HBG* e o aumento na contagem de eritrócitos, plaquetas e monócitos (MENZEL *et al.*, 2007; TESTA, 2009). Os polimorfismos na região intergênica dos genes *MYB-HBSIL* (*HMIP*) têm sido associados à síntese de HbF e à redução de crises vaso-oclusivas em indivíduos HbSS (LETTRE *et al.*, 2008; UDA *et al.*, 200; MAKANI *et al.*, 2011).

A ocorrência de polimorfismos no grupo de genes dos receptores olfatórios (*OR*) localizados no cromossomo 11 e *upstream* à *LCR*, tem sido associada à expressão continuada dos genes *HBG* durante a vida adulta e podem representar um novo modulador genético de hemoglobinopatias graves, como a HbSS e a beta-talassemia (LOOTS, 2008; SHERVA *et al.*, 2009; SOLOVIEFF *et al.*, 2010). A conexão biológica entre os genes *OR*, que interagem com as moléculas de odor no nariz para iniciar uma resposta neuronal que desencadeia a percepção

do olfato, e a gravidade destas hemoglobinopatias não é óbvia. No entanto, os polimorfismos que ocorrem nestes genes localizam-se basicamente em regiões reguladoras, podendo apresentar a função de elementos *cis*-regulatórios do grupo de genes da globina beta. Uma das hipóteses vigentes sugere que os genes *OR*, juntamente com a *LCR* e outros elementos regulatórios, podem atuar no remodelamento da cromatina, favorecendo a interação com fatores transcricionais que apresentam efeito positivo ou negativo na expressão do grupo de genes da globina beta. Dessa forma, polimorfismos nestes genes podem estar ocasionando conformações na cromatina que favorecem a interação de fatores transcricionais que estimulem a expressão dos genes *HBG* ou impossibilitem a interação dos elementos silenciadores destes genes (FEINGOLD *et al.*, 1999; DEAN, 2004; SOLOVIEFF *et al.*, 2010).

Estudos recentes demonstram a associação da haploinsuficiência do cromossomo 19p13.12-13 no fenótipo de PHHF. Esse cromossomo é responsável pela síntese do fator de transcrição eritróide KLF1. A mutação p.K288X foi associada à produção de uma proteína mutante com atividade regulatória diminuída e associada ao fenótipo de PHHF em uma família da ilha de Malta (BORG *et al.*, 2010). O fator transcricional KLF1 atua de maneira preferencial o gene *HBB* em detrimento da expressão gênica *HBG1/HBG2*, interagindo diretamente com elementos regulatórios na região promotora do gene *HBB*. De acordo com essa informação, foi também sugerido que o fator KLF1 possui papel indireto na expressão desses genes, uma vez que interaje com a região promotora do oncogene *BCL11A*, que é rica em sítios de ligação *CAAC box* (BORG *et al.*, 2010; BIEKER, 2010; ZHOU *et al.*, 2010).

De acordo com o exposto, torna-se evidente que os mecanismos envolvidos na regulação dos genes da globina beta são regidos por uma série de fatores. Assim sendo, a realização de estudo que tenha por objetivo identificar polimorfismos que possam estar envolvidos nos mecanismos de síntese de HbF e na reativação dos genes *HBG*, principalmente nos casos de hemoglobinopatias graves como a doença falciforme, pode



constituir para a identificação de elementos que influenciem no prognóstico e na evolução clínicas dos pacientes.

## ***2. JUSTIFICATIVA***

## 2. JUSTIFICATIVA

A população do estado da Bahia possui miscigenação racial elevada, principalmente devido à contribuição genética africana. Devido a isso, apresenta a incidência brasileira mais elevada para a DF, com a razão de 1:601 nascido vivos com a doença (AMORIM *et al.*, 2010).

A reativação da expressão de HbF em adultos tem sido utilizada como terapia em indivíduos com hemoglobinopatias graves, como a DF, uma vez que a HbF inibe a polimerização da HbS e está relacionada ao prognóstico melhor da doença (PLATT *et al.*, 1994). O estudo de marcadores associados à síntese de HbF é de grande interesse científico, visto que pode contribuir para o entendimento dos mecanismos regulatórios de genes envolvidos na síntese das cadeias globínicas, que até o presente momento não foram totalmente elucidados. A PHHF é uma condição hereditária, com herança autossômica dominante, sendo objeto de estudos variados, especialmente em familiares de indivíduos que apresentam níveis elevados de HbF durante a vida adulta (CLOSE *et al.*, 2004; THEIN *et al.*, 2007; BORG *et al.*, 2010; ZHENG *et al.*, 2010).

Os estudos brasileiros acerca da prevalência da PHHF são escassos. Costa e colaboradores (2002) descreveram prevalência de 0,1% para essa hemoglobinopatia em doadores de sangue de São Paulo, sendo encontrados dois indivíduos com concentrações bastante elevadas de HbF, onde um caso apresentou 17% de HbF e o outro 18%. É importante salientar que os dois indivíduos apresentaram padrão de eletroforese com ausência da cadeia  $\gamma^G$ . Entretanto, alguns grupos têm realizado estudos associados à expressão dos genes *HBG2* e *HBG1* (TAKAHASHI *et al.*, 2003; DUARTE *et al.*, 2004; da CUNHA *et al.*, 2009).

Diante do exposto e da ausência de estudos relacionados à PHHF no estado da Bahia e dos resultados, ainda controversos sobre os mecanismos associados às concentrações elevadas

de HbF em indivíduos com anemia falciforme, julgou-se importante a realização do presente estudo de maneira a pesquisar aspectos de biologia molecular, epidemiológicos e laboratoriais dos indivíduos com HbF elevada, alguns com suspeita de PHHF. Os resultados obtidos a partir desse estudo poderão fornecer dados sobre os marcadores possivelmente associados à síntese de HbF e à PHHF em Salvador-Bahia, bem como de possíveis mecanismos que possam estar envolvidos na sua gênese, abrindo perspectivas para estudos de expressão dos genes relacionados à produção de HbF, fato que poderá contribuir para o desenvolvimento de modalidades terapêuticas novas, que poderão futuramente ser utilizadas em indivíduos com hemoglobinopatias graves.

### ***3. OBJETIVOS***

### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar influência de marcadores genéticos associados à síntese de HbF em biomarcadores laboratoriais e na história clínica de indivíduos HbSS, além de caracterizar o fenótipo e o genótipo de indivíduos com perfil sugestivo de PHHF.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar as características demográficas, laboratoriais e clínicas dos pacientes HbSS incluídos no estudo;
- II. Avaliar a associação da HbF com os dados laboratoriais e clínicos dos pacientes HbSS incluídos no estudo;
- III. Identificar as variações responsáveis pela alteração na síntese das cadeias  $\gamma$  da HbF nas seqüências de nucleotídeos das regiões promotoras dos genes *HBG2* e *HBG1* e sua associação com os dados laboratoriais e clínicos dos pacientes HbSS incluídos no estudo;
- IV. Avaliar a influência de polimorfismos de um único nucleotídeo localizados nos genes *BCL11A*, *HMIP* e *OR51B5/6* com os dados laboratoriais e clínicos dos pacientes HbSS incluídos no estudo;
- V. Avaliar a influência dos haplótipos ligados aos genes da globina beta e da talassemia alfa 2 com deleção de 3.7Kb e suas associações com os dados laboratoriais e clínicos dos pacientes HbSS incluídos no estudo;
- VI. Avaliar as características demográficas e os marcadores estudados em modelos de análise multivariada;
- VII. Identificar a possível deleção genética nos casos sugestivos de PHHF.

## ***4. CASUÍSTICA E MÉTODOS***

## **4. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

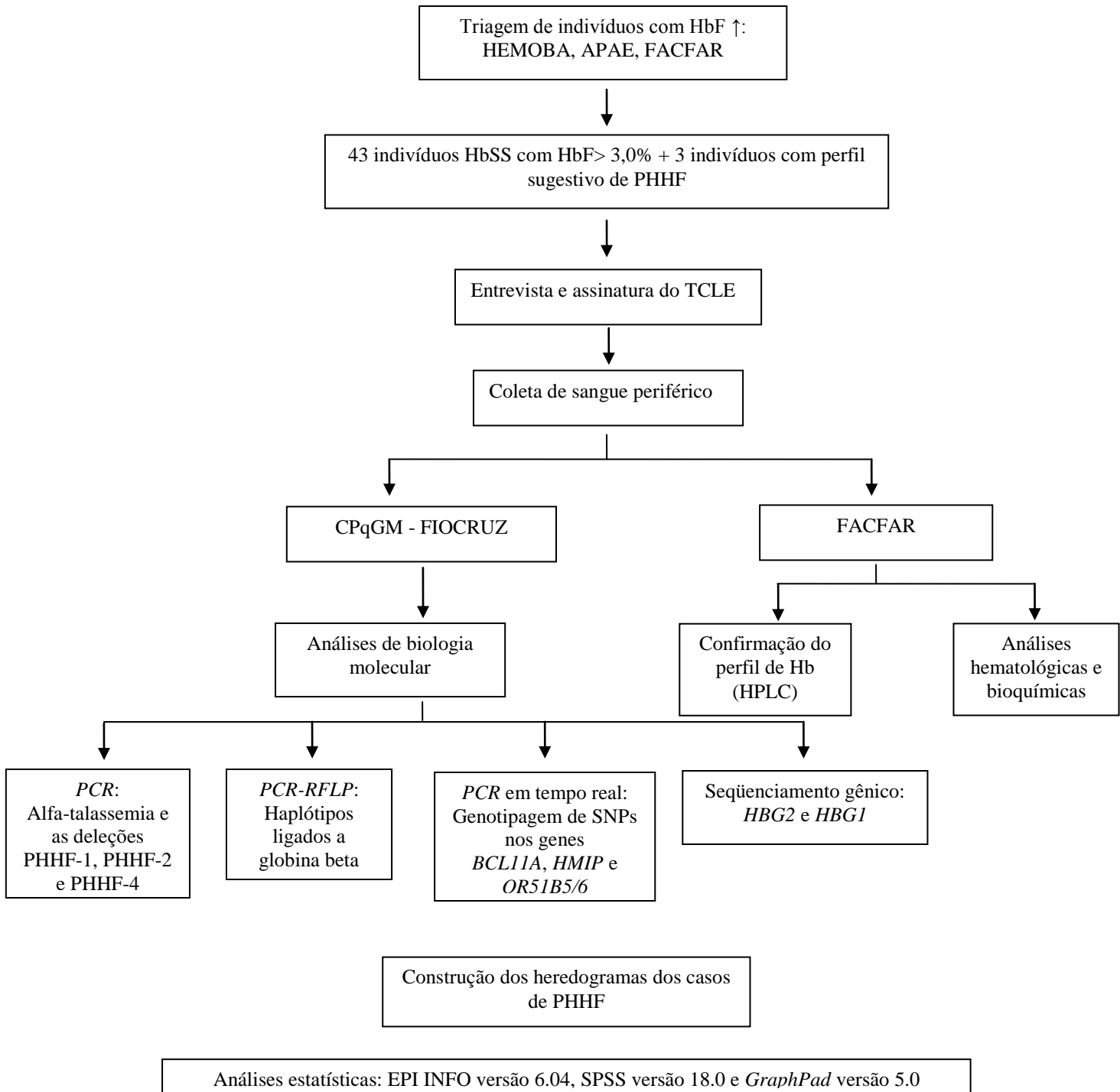
### **4.1. CASUÍSTICA**

Foi realizado um estudo de corte transversal, seguido de um caso-controle, cuja casuística foi constituída por uma amostra de conveniência composta por 43 indivíduos HbSS que apresentaram HbF > 3,0%. O ponto do corte de HbF foi determinado para que pudessem ser realizadas comparações relacionadas às variações nas seqüências gênicas identificadas como marcadores associados a concentração de HbF nos pacientes HbSS. É necessário salientar que nenhum destes indivíduos apresentava laços consangüíneos. No presente estudo foram também investigados 3 indivíduos com perfil sugestivo de PHHF deletional. A assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, Anexos I e II) pelo indivíduo ou pelos pais / responsável legal, em caso de menor idade foi considerado como critério de inclusão. Foram excluídos do estudo menores de 1 ano e gestantes. Todos os indivíduos incluídos no estudo foram selecionados no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Faculdade de Farmácia (FACFAR) da Universidade Federal da Bahia (UFBA); na Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA) e na Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais da Bahia (APAE-BA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ), CAAE 0012.0.225.00-09 (Anexo III).



#### 4.1.1. DESENHO EXPERIMENTAL

O delineamento do estudo está representado na **figura 7**.



**Figura 7.** Representação esquemática do desenho experimental do estudo.

## **4.2. MÉTODOS**

### **4.2.2. COLETA DE AMOSTRAS**

Foram coletados 5 mililitros (mL) de sangue venoso em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético sódico), na concentração de 1,5 mg/ml  $\pm$  0,25 (Dacie & Lewis, 2006) para as avaliações hematológicas, perfil de hemoglobina e análises de biologia molecular. Também foram coletados 5 mL de sangue venoso em tubo sem aditivo, destinados a obtenção de soro. As amostras foram encaminhadas imediatamente ao LAC/ FACFAR-UFBA para a realização das análises hematológicas e bioquímicas. As amostras com anticoagulante foram também analisadas no laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do CPqGM – FIOCRUZ, onde se realizou as análises de biologia molecular.

### **4.2.3. ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS**

Os valores hematológicos e índices hematimétricos foram determinados por método automatizado no equipamento ABX Pentra 80 (HORIBA DIAGNOSTICS, Montpellier, FR). A avaliação morfológica das hemácias foi realizada pela observação microscópica dos esfregaços sanguíneos corados pelo corante Wright. A contagem de reticulócitos foi determinada pelo método indireto, utilizando o corante supravital azul de cresil brilhante (DACIE & LEWIS, 2006). O perfil de hemoglobina foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), pelo princípio de troca iônica, utilizando o equipamento Bio-Rad, modelo VARIANT I (BIO-RAD, CA, USA).

As análises bioquímicas foram realizadas por método automatizado, onde se pesquisou o perfil lipídico (colesterol total e frações e triglicérides), bilirrubina total e frações, desidrogenase láctica (LDH), aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), perfil renal (uréia e creatinina) e dosagem do ferro, utilizando o equipamento A25 (BIOSYSTEMS AS, Barcelona, Spain). A ferritina foi dosada no equipamento Acess (BECKMAN COULTER, Inc, CA, USA) e a proteína C reativa no *Image* (BECKMAN COULTER, Inc, CA, USA).

#### **4.2.4. ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR**

##### **A) Extração de DNA genômico**

O DNA genômico foi extraído de leucócitos a partir de 200µL de sangue total, utilizando o *Kit QIAGEN® DNA Blood Mini Kit* (Uniscience do Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

##### **B) Sequenciamento das regiões promotoras dos genes *HBG2* e *HBG1***

As regiões promotoras dos genes *HBG1* e *HBG2* foram investigadas por sequenciamento gênico. As sequências alvo foram amplificadas pela técnica de PCR com oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) específicos (**Tabela 1**) em termociclador (*Eppendorff, Mastercycler® gradient, Thermo Scientific, EEUU*). A reação gerou um fragmento de 700pb para ambos os genes, sendo que a confirmação da amplificação foi realizada por corrida eletroforética das amostras coradas pelo azul de bromofenol/xilenocianol/sacarose

(0,25%/0,25%/40%) em gel de agarose a 1% em tampão tris-acetato - 0,04M; EDTA - 0,001M (TAE) 1X. O gel foi corado pelo brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Controles positivos e negativos foram incorporados a cada experimento com a finalidade de detectar a presença de possíveis contaminantes e a fidelidade da reação.

Após confirmação da amplificação, o produto da PCR foi precipitado por 30 minutos a  $-70^{\circ}\text{C}$  em solução contendo 3M de acetato de sódio pH 5,5 e em etanol absoluto gelado. A seguir, a solução foi centrifugada a 3.600 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes em etanol a 70% gelado e centrifugado a 3600 rpm por 30 segundos. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o excesso de álcool presente no precipitado foi evaporado a temperatura ambiente durante 30 minutos. Após esse período, o precipitado contendo o DNA foi ressuspensão em 12 uL de água estéril livre de DNase e RNase e a solução obtida foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

As amostras foram sequenciadas com o Kit *BigDye 03 Terminator™ Sequencing Standards* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com os oligonucleotídeos utilizados na reação inicial de PCR (**Tabela 1**). Os produtos obtidos das reações de PCR foram sequenciados em seqüenciador automático de DNA *ABI Prism 3100 DNA* (Applied Biosystems).

### **C) Análise dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta**

Os haplótipos do grupo de genes da globina  $\beta^S$  foram investigados pela técnica de *PCR*, sendo que as regiões de interesse foram amplificadas por *primers* específicos e os produtos obtidos foram digeridos pela técnica de corte com enzima de restrição (*RFLP*), visando a presença ou ausência de cada sítio de restrição. Foram estudados cinco sítios de restrição, o *XmnI* no gene *HBG2*, o *Hind III* nos genes *HBG2* e *HBG1*, o *Hinc II* no

pseudogene  $\psi\beta$  e na posição 3' do mesmo pseudogene (**Tabela 1**). A homozigose ou heterozigose para os sítios foram avaliadas pelo tamanho dos fragmentos gerados na migração eletroforética das amostras em gel de agarose a 2% em tampão TAE 1X, após coloração pelo brometo de etídio (0,002%) e visualização em transluminador sob luz ultravioleta. A cada reação foram adicionados controles negativos e positivos, visando testar a presença de possíveis contaminantes e a fidelidade da reação.

#### **D) Investigação da talassemia alfa $\alpha_2^{3,7\text{kb}}$**

A talassemia  $\alpha_2^{3,7\text{Kb}}$  foi investigada pela técnica de PCR (MULLIS & FALLONA, 1987; SAIKI *et al.*, 1988) em termociclador. A reação foi realizada utilizando 12,5pmol dos *primers* A + C e 12,5pmol dos *primers* A + B (**Tabela 1**) contendo 50mM de tampão Tris - HCl pH8,9; 1,7mM de cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ); mistura de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) (200 $\mu\text{M}$  de dCTP + dGTP e 100 $\mu\text{M}$  de dATP + dTTP); 10% de glicerol; 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase recombinante e, aproximadamente, 0,5 $\mu\text{g}$  de DNA, em volume final de 50 $\mu\text{L}$ . A reação foi composta por uma etapa inicial a 98°C por 3 minutos e 85°C por 3 minutos; 5 ciclos de 98°C por 30 segundos, 66°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 2 minutos; e 30 ciclos a 96°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, com uma etapa final de 72°C por 15 minutos (FOGLIETTA *et al.*, 1996).

A análise de fragmentos foi realizada pela corrida eletroforética das amostras coradas pelo azul de bromofenol/xilenocianol/sacarose (0,25%/0,25%/40%) em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X, corado pelo brometo de etídio (0,002%) e visualizado sob luz ultravioleta. Controles negativos e positivos foram incluídos a cada reação, visando testar a presença de contaminantes e a confirmação da qualidade da amostra, respectivamente.

As reações realizadas com os *primers* A + B e A + C amplificaram fragmentos de 1.700 pb,

tanto na presença como na ausência da deleção, sendo que as reações foram realizadas separadamente.

#### **E) Investigação das PHHF por deleção (PHHF-1, PHHF-2 e PHHF-4)**

As persistências PHH-1, PHHF-2 e PHHF-4 foram investigadas pela técnica de PCR, segundo o método proposto por Craig e colaboradores (1994). Para cada reação foram utilizados três *primers*, visando amplificar o produto específico na presença da deleção e o outro, de tamanho diferente, representando o alelo normal ou controle (**Tabela 1**). As reações de amplificação geraram fragmentos de 1.616pb e 1.193pb na presença do alelo selvagem e mutante para PHHF-1, respectivamente; de 2.206pb e 1.950pb na presença de alelo selvagem e mutante para PHHF-2, respectivamente; e de 1.616pb e 1.280pb na presença do alelo selvagem e mutante para PHHF-4, respectivamente. Os fragmentos obtidos foram analisados pela migração eletroforética das amostras em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X, corado pelo brometo de etídio e visualizado em transluminador sob luz ultravioleta.

#### **F) Genotipagem por PCR em Tempo Real**

A genotipagem dos genes *BCL11A*, *c-MYB-HBS1-L* e *OR51B5/6*, localizados nos cromossomo 2, 6 e 11, respectivamente, foi realizada pela técnica de TaqMan® PCR em tempo-real, utilizando termociclador (7500 *Fast Real Time PCR Systems*, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme orientação do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foram utilizados os *primers* pré-desenhados: C\_29308694\_10, C\_1025980\_10, C\_3119886\_10, C\_27440944\_10, C\_27946587\_10, C\_29039261\_10. Os *primers* utilizados eram marcados com VIC e FAM para a distinção dos alelos mutante e selvagem para o

polimorfismo de interesse. Controles negativos foram adicionados à reação, visando testar a presença de contaminantes e a fidelidade de cada reação, além da análise em duplicata de amostras escolhidas aleatoriamente.

**Tabela 01.** Localização da região de amplificação e sequência dos *primers* utilizados para cada reação.

Localização	<i>Primers</i> 5'→3'	Tamanho do Fragmento (pb)	Enzima de restrição
<b>Cromossomo 11 (gene)</b>	<b>Haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta</b>		
5' <i>HBG2</i>	<b>Sítio 1</b> AAC-TGT-TGC-TTT-ATA-GGA-TTT-T (Direto)	650	<i>Xmn</i> I
	AGG-AGC-TTA-TTG-ATA-ACT-CAG-AC (Reverso)		
<i>HBG2</i>	<b>Sítio 2</b> AAG-TGT-GGA-GTG-TGC-ACA-TGA (Direto)	780	<i>Hind</i> III
	TGC-TGC-TAA-TGC-TTC-ATT-ACA-A (Reverso)		
<i>HBG1</i>	<b>Sítio 3</b> GC-TGC-TAA-TGC-TTC-ATT-ACA-A (Direto)	760	<i>Hind</i> III
	TAA-ATG-AGG-AGC-ATG-CAC-ACA-C (Reverso)		
$\psi\beta$	<b>Sítio 4</b> GAA-CAG-AAG-TTG-AGA-TAG-AGA (Direto)	701	<i>Hinc</i> II
	ACT-CAG-TTG-TCT-TGT-GGG-CT (Reverso)		
3' $\psi\beta$	<b>Sítio 5</b> TCT-GCA-TTT-GAC-TCT-GTT-AGC (Direto)	590	<i>Hinc</i> II
	GGA-CCC-TAA-CTG-ATA-TAA-CTA (Reverso)		
<b>Cromossomo 11 (gene)</b>	<b>Região promotora dos genes <i>HBG2</i> e <i>HBG1</i></b>		
<i>HBG2</i>	GCA-CTG-AAA-CTG-AAA-CTG-TTG-CTT-TAT AGG AT (Direto)	700	—
<i>HBG1</i>	TGA-AAC-TGT-GGT-CTT-TAT-GAA-AAT-TG (Direto)		
<i>HBG1</i> e <i>HBG2</i>	GGC-GTC-TGG-ACT-AGG-AGC-TTA-TTG (Reverso)		
<b>Cromossomo 11 (gene)</b>	<b>Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal</b>		
<i>HBD-HBB</i>	<b>Sítio PHHF-1</b> AGA-ATG-TCA-CAC-TTA-GAA-TCT-G (Direto: mutante e selvagem)	1.616	—
	CAC-TTT-AAT-TCT-GGT-CTA-CCT-GAA (Reverso: selvagem)	1.193	
	ACT-GTG-ATG-TTG-GAA-ATG-GAC (Reverso: mutante)		

**Tabela 01 (continuação).** Localização da região de amplificação e sequência dos *primers* utilizados para cada reação.

Localização	<i>Primers</i> 5'→3'	Tamanho do Fragmento (pb)	Enzima de restrição
<b>Cromossomo 11 (gene)</b>	<b>Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal</b>		
	<b>Sítio PHHF-2</b>		
	GAC-ATG-GAC-TAT-TGT-TCA-ATG-A (Direto: mutante e selvagem )		
<i>HB<math>\psi</math>B -HBB</i>	TGC-TAT-GCC-AAC-TCA-CTA-CC (Reverso: selvagem)	2.206	—
	TTT-ATA-TAT-GAA-ATG-CTA-CTG-ATT(Reverso: mutante)	1.950	
	<b>Sítio PHHF-Espanhola</b>		
<i>HBD-HBB</i>	AGA-ATG-TCA-CAC-TTA-GAA-TCT-G (Direto: mutante e selvagem)	1.616	
	CAC-TTT-AAT-TCT-GGT-CTA-CCT-GAA (Reverso: selvagem)		
	AGC-CCG-CCA-CTG-CAC-TGT-G (Reverso: mutante)	1.280	
<b>Cromossomo 16 (gene)</b>	<b>Talassemia <math>\alpha_2</math> <sup>3.7Kb</sup></b>		
<i>5' Z box HBA2</i>	CCC-TCC-CCC-TCG-CCA-AGT-CCA-CCC-C (Direto:mutante e selvagem)		
	GGG-GGG-AGG-CCC-AAG-GGG-CAA-GAA (Reverso: mutante)	1700	—
	GGG-AGG-CCC-ATC-GGG-CAG-GAG-GAA-C (Reverso: selvagem)		

#### 4.2.5. COLETA DOS DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos foram obtidos em questionário epidemiológico aplicado aos pacientes ou aos pais/responsável legal, em caso de pacientes menores de 21 anos (Anexo IV). As informações adicionais referentes aos pacientes foram obtidas pela consulta aos prontuários médicos dos pacientes acompanhados na HEMOBA, na APAE e no HUPES.

#### 4.2.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise da normalidade da distribuição das variáveis quantitativas foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A partir dessa informação foram utilizados testes paramétricos



ANOVA ou não-paramétrico de Kruskal-Wallis. O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para a análise da distribuição de médias de variáveis quantitativas ou numéricas, com distribuição normal dentro de categorias. Além disso, verificando a provável diferença entre as médias de valores, foram realizadas comparações múltiplas das médias pelo teste de Bonferroni (ou post-hoc). O teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para as variáveis com distribuição não normal.

A análise de variáveis quantitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não-paramétrico de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ), devidamente corrigido pelos testes de Mantel-Haenzel e Yates. As análises de variáveis categóricas, com valores inferiores a 4, foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Os intervalos de confiança (IC) e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis.

Os testes de Mann-Whitney e o teste T independente foram utilizados para a análise de duas variáveis numéricas, na comparação de dois grupos de valores dentro de uma mesma variável, levando-se em consideração a distribuição de cada variável.

A análise multivariada foi realizada pelo teste de regressão logística com criação de modelos que incorporaram variáveis que foram significativas ou não na análise univariada, com avaliação do coeficiente beta, desvio-padrão, valor do teste de Wald, significância de  $p$ , como apresentação da razão de prevalência e intervalo de confiança (IC).

As análises estatísticas foram realizadas nos programas EPI INFO versão 6.04, SPSS versão 18.0 e *GraphPad* versão 5.0. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos para as análises realizadas.

As sequências gênicas obtidas a partir do estudo da região promotora dos genes *HBG1* e *HBG2* foram editadas com a finalidade de se obter sequências com fidedignidade máxima, não inserindo ou excluindo nucleotídeos. Dessa forma, o seqüenciamento dos produtos de uma mesma amostra foram realizados nas direções direta e reversa, confirmando a fidelidade

da reação. Essas sequências foram montadas e alinhadas com as de referência no programa *Bioedit* versão 7.0.9 para determinação genotípica.

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi calculado para cada polimorfismo identificado pelo programa on-line da *Tufts University, USA* ([www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls](http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls)), considerando-se em desequilíbrio aqueles genes que apresentaram associação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados as frequências esperadas para cada genótipo.

## ***5. RESULTADOS***

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ANÁLISE DOS DADOS DEMOGRÁFICOS E DO PERFIL DE HEMOGLOBINAS NOS PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

O presente estudo investigou 43 indivíduos HbSS, sendo 22 (51,2%) do sexo feminino. A análise da distribuição de idade demonstrou que a idade média dos pacientes era de  $20,07 \pm 13,18$  anos, sendo 26/43 (60,5%) com idade menor que a média.

### 5.2. ANÁLISE DAS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E DOS DADOS CLÍNICOS NOS PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

O grupo de pacientes que compôs a casuística deste estudo foi avaliado quanto ao perfil de variáveis hematológicas e de moléculas relacionadas às vias metabólicas importantes no curso clínico da HbSS, como as associadas ao metabolismo lipídico, renal, hepático, à hemólise e inflamação. Desta forma, os dados referentes às variáveis investigadas no total de pacientes com HbSS estão sumarizados na **tabela 2**. Os indivíduos estudados apresentaram índices hematológicos compatíveis com o estado estável da doença, com média de hemoglobina de  $8,89 \pm 1,63$ g/dL e de HbF de  $12,88 \pm 6,96\%$ , associadas à reticulocitose com ou sem leucocitose significativa. As determinações bioquímicas apresentaram perfil clássico associado à HbSS com marcadores de hemólise em concentrações elevadas, como a LDH ( $826,72 \pm 401,50$ U/L) e bilirrubina total ( $2,16 \pm 1,18$ mg/dL).

**Tabela 2.** Características demográficas e laboratoriais de indivíduos HbSS em Salvador-Bahia.

Características	N	Média ± Desvio-padrão	Percentil (25%)	Mediana	Percentil (75%)
Idade	43	20,07 ±13,18	11,00	16,00	28,00
<b>Sexo</b>					
Masculino	21				
Feminino	22				
<b>Perfil de Hemoglobinas</b>					
HbS, (%)	43	83,47 ±7,05	78,60	84,60	89,60
HbA2, (%)	43	3,25 ±0,67	2,90	3,00	3,70
HbF, (%)	43	12,88 ±6,96	7,40	11,20	15,70
<b>Dados Hematológicos</b>					
Hemácias, milhões/mL	43	2,94 ±0,57	2,59	2,87	3,22
Hemoglobina, g/dL	43	8,89 ±1,63	7,70	8,50	9,90
Hematócrito, %	43	26,24 ±4,66	23,20	26,20	27,90
VCM, fL	43	89,83 ±12,13	80,30	90,00	98,50
HCM, pg	43	3,48 ±4,57	27,44	30,60	30,90
Reticulócitos %	43	6,84 ±3,47	4,00	6,00	8,50
Leucócitos, X10 <sup>9</sup> /L	43	10651,16 ±2850,26	8800,00	10700,00	12400,00
Segmentados, X10 <sup>9</sup> /L	43	4884,93 ±2005,70	3312,00	4485,00	6322,00
Eosinófilos, X10 <sup>9</sup> /L	43	560,56 ±456,84	180,00	465,50	749,00
Basófilos, X10 <sup>9</sup> /L	43	59,96 ±71,56	0,00	0,00	104,00
Linfócitos, X10 <sup>9</sup> /L	43	4349,01 ±1529,43	2889,00	4150,00	5546,00
Monócitos, X10 <sup>9</sup> /L	43	745,65 ±345,22	516,00	636,00	960,00
Plaquetas, X10 <sup>9</sup> /L	43	418,02 ±133,34	322,00	391,00	504,00
<b>Perfil Bioquímico</b>					
Glicose, mg/dL	43	79,98±11,24	75,00	79,00	85,00
Colesterol Total, mg/dL	43	131,77 ±34,21	107,00	120,00	157,00
HDL-colesterol, mg/dL	43	32,23 ±9,77	25,00	30,00	38,00
LDL- colesterol, mg/dL	43	76,21 ±28,20	53,00	74,00	94,00
VLDL-colesterol, mg/dL	43	23,33 ±11,29	16,00	21,00	27,00
Triglicérides, mg/dL	43	116,88 ±59,28	76,00	106,00	138,00
LDH, U/L	43	826,72 ±401,50	573,00	738,00	1082,00
BILT, mg/dL	43	2,16 ±1,18	1,25	2,10	2,54
BILD, mg/dL	43	0,65 ±0,36	0,36	0,60	0,80
AST, U/L	43	45,30 ±20,99	30,00	39,00	52,00
ALT, U/L	43	28,4 ±15,89	17,00	25,00	35,00
GGT, U/L	36	58,31 ±79,97	22,50	30,50	56,25
Uréia, mg/dL	43	18,14 ±7,61	13,00	16,00	21,00
Creatinina, mg/dL	43	0,67 ±0,33	0,50	0,60	0,70
Ácido úrico, mg/dL	36	4,92 ±1,40	3,72	4,75	5,78
Ferro, mcg/dL	41	80,03 ±35,04	54,00	86,00	104,00
Ferritina, ng/dL	43	216,75 ±166,01	76,00	214,50	300,10
PCR, mg/dL	32	4,98 ±3,97	1,29	3,78	10,82
ALFA-1 antitripsina, mg/L	36	146,68 ±33,92	134,75	149,50	167,25

As principais características clínicas observadas nos pacientes HbSS foram as internações que estiveram presentes em 41/43 (95,3%); seguida de crises vaso-oclusivas em 32/43 (74,4%); pneumonia em 24/43 (55,81%); esplenomegalia em 16/43(37,2%); priapismo em 7/21 (33,3%); litíase biliar em 8/43 (18,6%); STA em 7/43 (16,3%); sequestro esplênico em 6/43 (13,9%); infecção do trato urinário em 9/43 (20,9%); litíase biliar em 6/43 (13,9%); úlcera maleolar 5/43 (11,6%); retinopatia em 3/43 (7,0%) e AVC em 2/43 (4,6%). De acordo com o levantamento de dados, 34/43 (79,1%) indivíduos já haviam feito uso de hemoderivados e 11/43 (25,6%) estavam em tratamento com hidroxiuréia (HU).

## **5.2. ASSOCIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL COM OS DADOS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E CLÍNICOS NOS INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME**

As análises realizadas de acordo com os valores  $\geq$  e  $<$  a média HbF (12,88%) demonstraram associação estatisticamente significativa para as concentrações de HbS, com valores maiores para os pacientes do grupo com HbF  $<$  a média; sendo que para as concentrações de hematócrito, VCM e HCM, as concentrações mais elevadas estiveram entre os indivíduos do grupo com HbF  $\geq$  a média. Os pacientes com HbF  $\geq$  a média apresentaram níveis elevados de VLDL colesterol, ferro e ferritina; entretanto, esses valores não se encontram acima dos valores de referência. Essas análises são mostradas nas **tabelas 3 e 4** e na **figura 8**.

**Tabela 3.** Associação entre os dados hematológicos e a concentração de HbF em indivíduos HbSS.

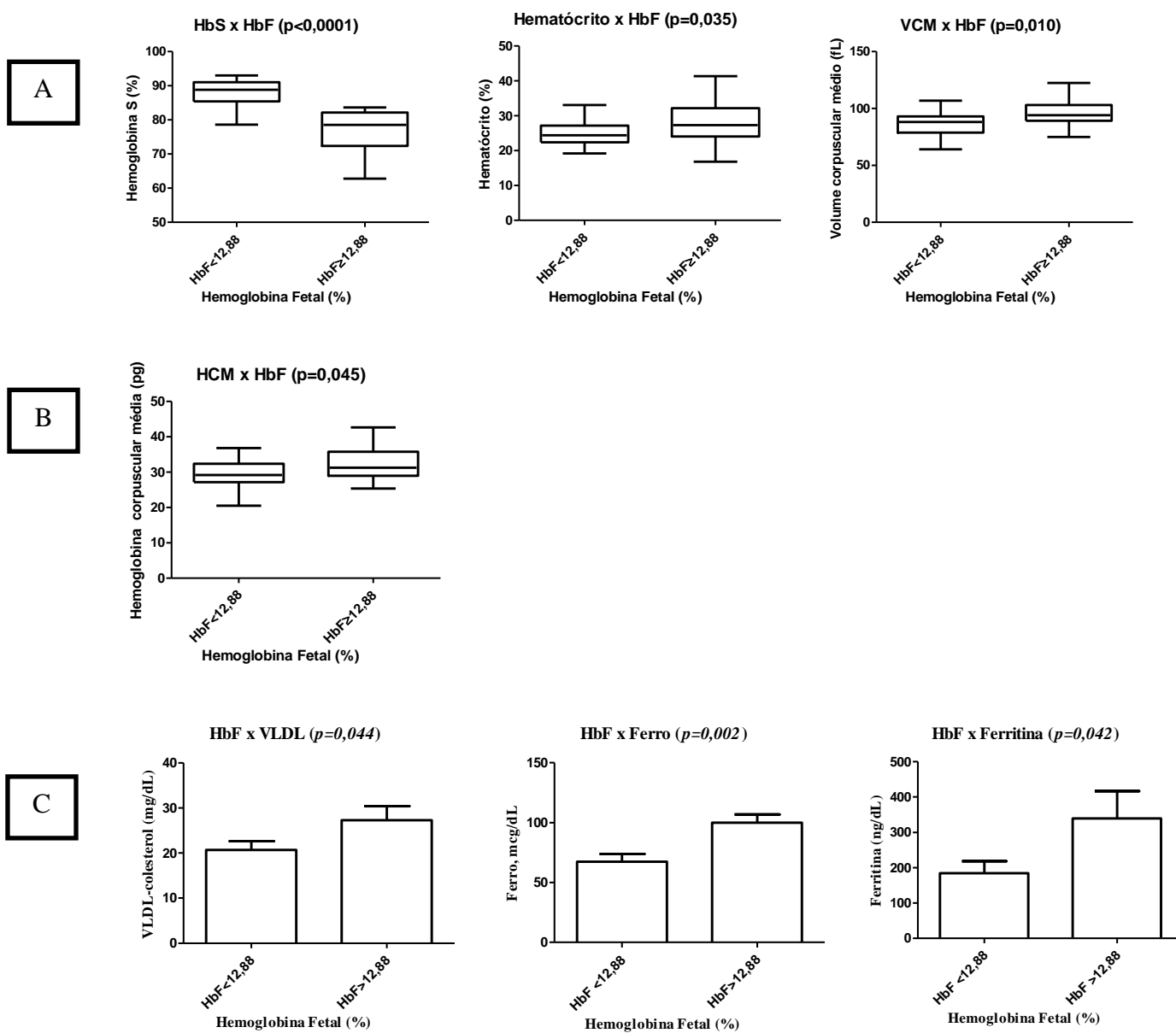
Dados hematológicos	HbF<12,88%	HbF≥ 12,88%	p
HbS(%)	88,02 (±5,61)	77,16 (±3,65)	<0,0001*
Hm, milhões/mL	2,94 (±0,46)	2,95 (±0,71)	0,943*
Hb, g/dL	8,50 (±1,15)	9,44 (±2,04)	0,089*
Ht, %	24,98 (±3,49)	27,99 (±5,56)	<b>0,035*</b>
VCM, fL	85,88 (±11,24)	93,31 (±11,44)	<b>0,010*</b>
HCM, pg	29,30 (±4,34)	32,12 (±4,49)	<b>0,045*</b>
Reticulócitos, %	7,56 (±3,32)	5,84 (±3,50)	0,111*
Leucócitos, X10 <sup>9</sup> /L	10996,00 (±2620,35)	10172,22 (±3155,91)	0,356*
Segmentados, X10 <sup>9</sup> /L	5020,44 (±1954,13)	4696,71 (±2117,37)	0,608*
Eosinófilos, X10 <sup>9</sup> /L	636,23 (±506,90)	455,45 (±364,34)	0,332‡
Linfócitos, X10 <sup>9</sup> /L	4386,83 (±1591,49)	4296,47 (±1482,68)	0,851*
Linfócitos atípicos, X10 <sup>9</sup> /L	32,20 (±13,50)	16,20 (±11,20)	0,407‡
Monócitos, X10 <sup>9</sup> /L	824,31 (±372,57)	636,39 (±277,03)	0,089‡
Basófilos, X10 <sup>9</sup> /L	41,65 (±12,02)	44,97 (±14,83)	0,863*
Plaquetas, X10 <sup>9</sup> /L	446,28 (±153,59)	378,78 (±88,39)	0,077*

\* Teste t, ‡ Mann-Whitney

**Tabela 4.** Associação entre os dados bioquímicos e a concentração de HbF em indivíduos HbSS.

Dados bioquímicos	HbF<12,88%	HbF≥ 12,88%	p
Glicose, mg/dL	79,20 ±11,36	81,06 ±11,31	0,599*
Colesterol total, mg/dL	130,08 ±33,57	134,11 ±35,92	0,786‡
HDL-colesterol, mg/dL	31,60 ±10,11	33,11 ±9,50	0,623*
LDL-colesterol, mg/dL	77,76 ±26,62	74,06 ±30,92	0,676*
VLDL-colesterol, mg/dL	20,72 ±9,87	26,94 ±12,38	<b>0,044‡</b>
Triglicerídes, mg/dL	103,24 ±46,17	135,83 ±7,84	0,118‡
LDH, U/L	866,00 ±363,93	772,17 ±453,72	0,168‡
Bilirrubina total, mg/L	2,41 ±1,32	1,83 ±0,88	0,106‡
Bilirrubina direta, mg/L	0,66 ±0,28	0,64 ±0,46	0,848*
AST, U/L	50,20 ±24,17	38,50 ±13,39	0,107‡
ALT, U/L	31,16 ±13,99	25,39 ±18,08	0,245*
GGT, U/L	38,70 ±31,08	36,0 ± 21,82	0,884*
Creatinina, mg/dL	0,64 ±0,29	0,71 ±0,38	0,462‡
Uréia, mg/dL	17,80 ±8,07	18,61 ±7,14	0,604‡
Ferro, mcg/dL	65,76 ±33,53	100,18 ±26,76	<b>0,001*</b>
Ferritina, ng/dL	184,00 ±33,89	339,50 ±77,23	<b>0,044‡</b>
PCR, mg/dL	5,07 ±3,95	20,04 ±37,57	0,481‡
Ácido úrico, mg/dL	4,68 ±1,14	5,33 ±1,74	0,185*
ALFA-1 antitripsina, mg/dL	150,68 ±24,56	141,68 ±43,26	0,437*

\* Teste t, ‡ Mann-Whitney



**Figura 8.** Demonstração gráfica da análise estatística entre as variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes HbSS com valores de hemoglobina fetal maiores e iguais ( $\geq$ ) e menores ( $<$ ) a média (12,88%). A e B: análises das variáveis hematológicas e em C: análises das variáveis bioquímicas.

As análises estatísticas entre os grupos de HbSS com concentrações diferenciadas de HbF e a história clínica não mostraram associações significativas. É importante salientar que as análises não evidenciaram alterações na concentração de HbF nos indivíduos em uso de



hidroxiuréia, que aparentemente não apresentou influência na concentração de HbF do grupo estudado. Esses resultados estão sumarizados na **tabela 5**.

**Tabela 5.** Associação entre a concentração média de HbF e os dados clínicos em indivíduos HbSS.

Dados clínicos	HbF<12,88%	HbF≥ 12,88%	P
<b>Internação</b>			
Sim	24	17	1,000 †
Não	1	1	
<b>Pneumonia</b>			
Sim	14	18	0,977*
Não	11	8	
<b>Infecção do Trato Urinário</b>			
Sim	5	4	0,972†
Não	20	14	
<b>Osteonecrose</b>			
Sim	1	0	1,000†
Não	24	18	
<b>Esplenomegalia</b>			
Sim	15	1	0,655†
Não	10	17	
<b>Seqüestro esplênico</b>			
Sim	5	1	0,375†
Não	20	17	
<b>Acidente vascular cerebral</b>			
Sim	2	0	1,000†
Não	23	18	
<b>Crises de dor</b>			
Sim	18	14	0,668†
Não	7	4	
<b>Retinopatia</b>			
Sim	2	1	1,000†
Não	23	17	
<b>Úlcera maleolar</b>			
Sim	2	3	0,634†
Não	23	15	
<b>Síndrome torácica aguda</b>			
Sim	4	3	1,000†
Não	21	15	
<b>Litíase biliar</b>			
Sim	5	3	1,000†
Não	20	15	
<b>Colecistectomia</b>			
Sim	5	1	0,375†
Não	20	17	
<b>Uso de hidroxiuréia</b>			
Sim	5	6	0,323*
Não	20	12	
<b>Uso de hemodeivados</b>			
Sim	21	13	0,856†
Não	4	5	

\*Qui-quadrado, †Fisher

### 5.3. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS NAS REGIÕES PROMOTORAS DOS GENES *HBG2* E *HBG1* E SUAS ASSOCIAÇÕES COM A CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL

A presença de polimorfismos nas regiões promotoras dos genes *HBG2* e *HBG1* foi associada a uma possível ação no controle da síntese de HbF. Os polimorfismos identificados foram a deleção -396/-391del, o polimorfismo -369 C>G, o -309 A>G e o -157 T>C no gene *HBG2*; e o polimorfismo -499 T>A, o -369 C>G, o -271 C>T e a deleção -225/-222del no gene *HBG1*. Com exceção do polimorfismo -271 C>T no gene *HBG1*, todas as frequências alélicas e genótípicas para os polimorfismos estudados estiveram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Não foi possível calcular o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para o polimorfismo -369 C>G no gene *HBG1*, uma vez que houve o encontro de somente indivíduos com o genótipo homocigoto para o alelo mutante entre os pacientes estudados (**Figura 9**). As análises referentes à frequência desses polimorfismos estão mostradas nas **tabelas 6 e 7**.

**Tabela 6.** Frequência dos polimorfismos localizados na região promotora do gene *HBG2* em indivíduos HbSS de Salvador.

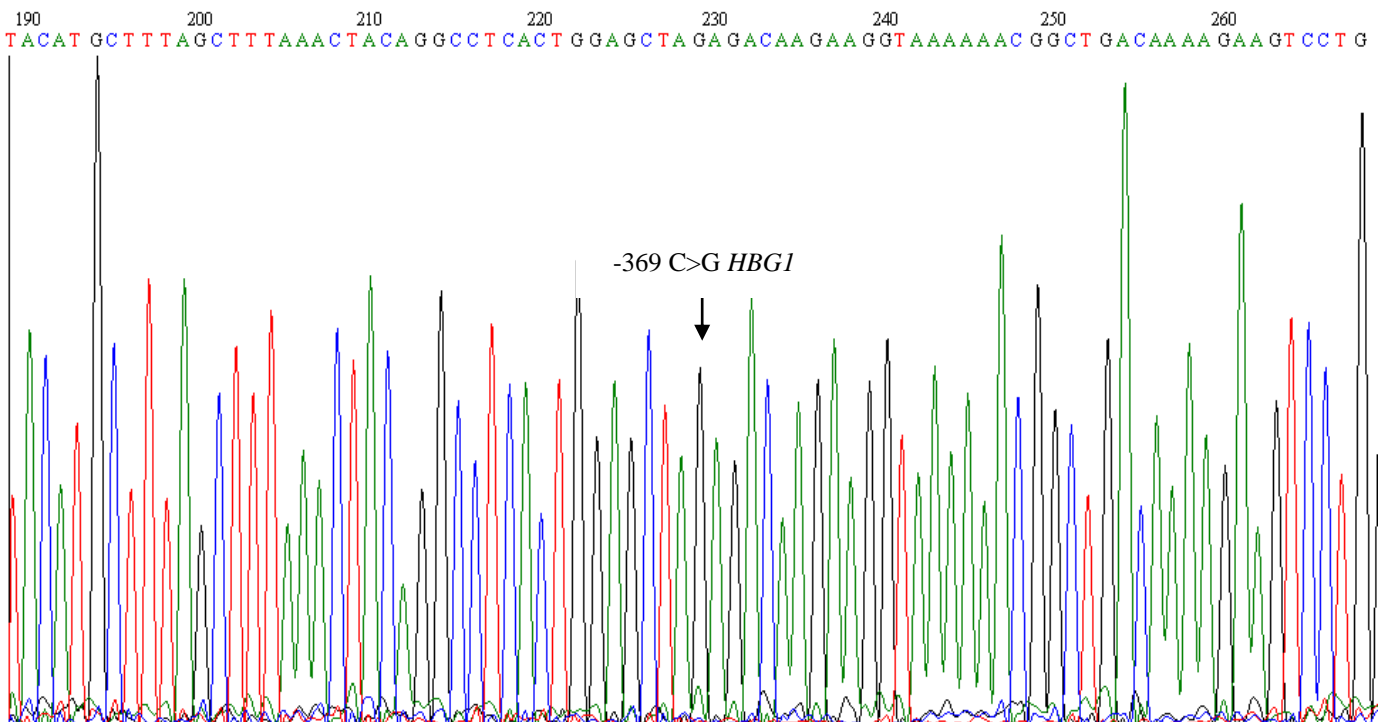
Localização	N (%)
<b><i>HBG2</i> -396/-391del</b>	
SD/SD	21 (48,8)
SD/D	17 (39,5)
D/D	5 (11,6)
<b><i>HBG2</i> -369 C&gt;G</b>	
C/C	11 (25,6)
C/G	19 (44,2)
G/G	13 (30,2)
<b><i>HBG2</i> -309 A&gt;G</b>	
A/A	8 (18,6)
A/G	22 (51,2)
G/G	13 (30,2)
<b><i>HBG2</i> -157 T&gt;C</b>	
T/T	-----
T/C	1 (2,3)
C/C	42 (97,7)

D = deleção; SD = sem deleção

**Tabela 7.** Frequência dos polimorfismos encontrados na região promotora no gene *HBG1* em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

Localização	N (%)
<b><i>HBG1</i> -499 T&gt;A</b>	
T/T	13 (30,2)
T/A	16 (37,2)
A/A	14 (32,6)
<b><i>HBG1</i> -369 C&gt;G</b>	
C/C	-----
C/G	-----
G/G	43 (100)
<b><i>HBG1</i> -271 C&gt;T</b>	
C/C	25 (58,1)
C/T	10 (23,3)
T/T	8 (18,6)
<b><i>HBG1</i> -225/-222del</b>	
SD/SD	39 (90,7)
SD/D	4 (9,3)
D/D	-----

D = deleção; SD = sem deleção



**Figura 9.** Eletroferograma mostrando a homozigose do polimorfismo -369 C>G, com localização na região promotora do gene *HBG1*.

As análises estatísticas dos polimorfismos investigados e suas associações com as concentrações de HbF com valores  $\geq$  e  $<$  a média demonstraram que o polimorfismo -271 C>T no gene *HBG1* apresentou associação de 4,45 vezes maior para os valores de HbF menores que a média (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Associação entre os polimorfismos identificados nas regiões promotoras dos genes *HBG2* e *HBG1* e a concentração de hemoglobina fetal em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia

Localização	HbF <12,88%	HbF >12,88%	<i>p</i>	RP (IC95%)
<b><i>HBG2</i> -396/-391del</b>				
SD/SD	10	11		
SD/D+ D/D	15	7	0,172*	2,36 (0,68 – 8,15)
<b><i>HBG2</i> -369 C&gt;G</b>				
CC	8	3		
CG+GG	17	15	0,309**	0,42 (0,10 – 1,90)
<b><i>HBG2</i> -309 A&gt;G</b>				
AA	6	2		
AG+GG	19	16	0,434**	0,40 (0,70 – 2,24)
<b><i>HBG2</i> -157 T&gt;C</b>				
TT	0	0	—————	—————
TC+CC	25	18		
<b><i>HBG1</i> -499 T&gt;A</b>				
TT	7	6		
TA+AA	18	12	0,707*	1,29 (0,35 – 4,78)
<b><i>HBG1</i> -369 C&gt;G</b>				
CC	0	0	—————	—————
CG+GG	25	18		
<b><i>HBG1</i> -271 C&gt;T</b>				
CC	11	14		
CT+TT	14	4	<b>0,027*</b>	<b>4,45 (1,14 – 17,41)</b>
<b><i>HBG1</i> -225/-222del</b>				
<b><i>HBG1</i></b>				
SD/SD	24	15		
SD/D+D/D	1	3	0,293**	0,21 (0,02 – 2,19)

\*Qui-quadrado, \*\* Teste de Fisher (RP= razão de prevalência; IC95%= intervalo com 95% de confiança; SD=sem deleção; D=deleção).

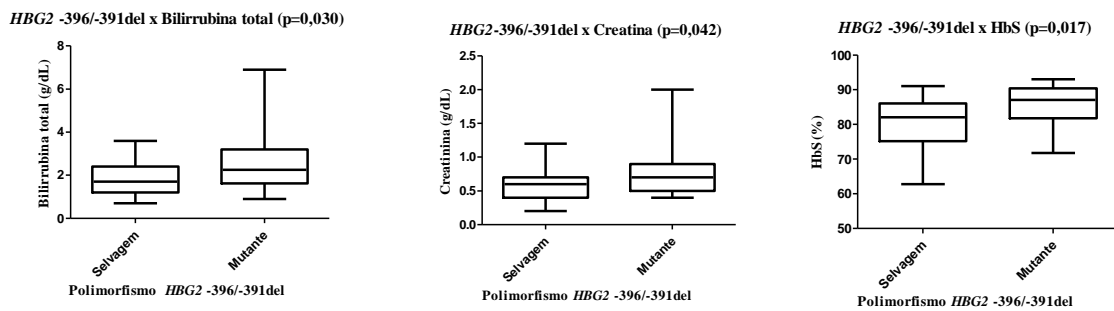
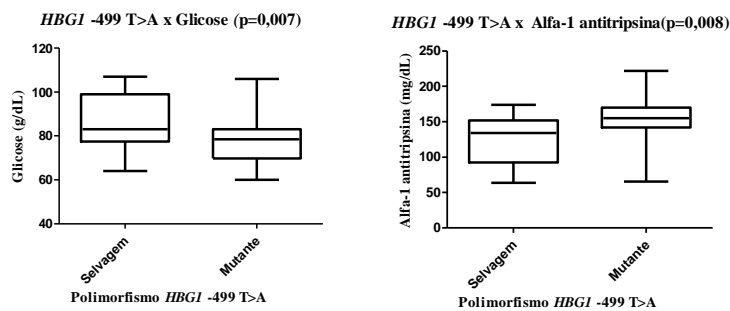
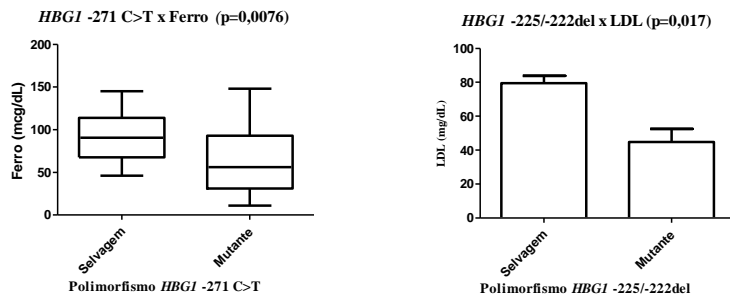
#### 5.4. ANÁLISE DOS DADOS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E CLÍNICOS COM OS POLIMORFISMOS LOCALIZADOS NA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES *HBG2* E *HBG1*.

As análises dos dados hematológicos, bioquímicos e clínicos na presença dos genótipos selvagem ou mutante para os polimorfismos localizados na região promotora dos genes *HBG2* e *HBG1* revelaram associações estatisticamente significativa com os polimorfismos *HBG2* -396/-391del; *HBG1* -499 T>A; *HBG2* -271 T>C e *HBG2* -225/-222del. Esses dados são mostrados na **tabela 9** e na **figura 10**. Além disso, o polimorfismo *HBG2* -396/-391del esteve associado à ocorrência maior de crises vaso-oclusivas, litíase biliar e uso de hemoderivados (**Tabela 10**).

**Tabela 9.** Análise dos valores médios das variáveis hematológicas e bioquímicas de indivíduos HbSS na presença dos alelos selvagem e mutante para os polimorfismos identificados nas regiões promotoras dos genes *HBG2* e *HBG1*.

POLIMORFISMOS, alelos			
Marcadores Hematológicos e Bioquímicos	<i>HBG2</i> -396/-391 del	<i>HBG2</i> -396/-391 del	<i>P</i>
	Selvagem	Mutante	
HbS (%)	80,90 ±1,66	85,93 ±1,20	0,017*
Creatinina, mg/dL	0,56 ±0,05	0,76 ±0,8	0,042†
Bilirrubina total, mg/dL	1,78 ±0,17	2,54 ±0,30	0,030†
	<i>HBG1</i> -499 T>A	<i>HBG1</i> -499 T>A	<i>P</i>
	Selvagem	Mutante	
Glicose, mg/dL	86,77 ±3,48	77,03 ±1,17	0,007*
Alfa-1 antitripsina, mg/L	124,80 ±10,45	156,30 ±5,87	0,008*
	<i>HBG1</i> -271 T>C	<i>HBG1</i> -271 T>C	<i>P</i>
	Selvagem	Mutante	
Ferro, mcg/dL	92,00 ±5,75	63,14 ±9,10	0,0076*
	<i>HBG1</i> -225/-222del	<i>HBG1</i> -225/-222del	<i>P</i>
	Selvagem	Mutante	
LDL-colesterol, mg/dL	79,44 ±4,37	44,75 ±7,69	0,017†

\*Teste t, † Mann-Whitney; Mutante: heterozigoto + homozigoto

**A****B****C**

**Figura 10.** Demonstração gráfica das análises estatísticas das variáveis hematológicas e bioquímicas em indivíduos HbSS com genótipos selvagem e mutante para os polimorfismos identificados nas regiões promotoras dos genes *HBG2* e *HBG1*. Em A: HbS e variáveis bioquímicas associadas com o polimorfismo *HBG2* -396/-391del; Em B: variáveis bioquímicas associadas ao polimorfismo *HBG1* -499 T>A; C: variáveis bioquímicas associadas aos polimorfismos *HBG1* -271 C>T e *HBG1* -225/-222del.

**Tabela 10.** Análise das manifestações clínicas mais frequentes em indivíduos HbSS na presença dos alelos mutante e selvagem para o polimorfismo -396/-391del na região promotora do gene *HBG2*

<b>Dados Clínicos</b>	<b><i>HBG2</i> -396/-391del Selvagem</b>	<b><i>HBG2</i> -396/-391del Mutante</b>	<b><i>P</i></b>
<b>Crises vaso-oclusivas</b>			
SIM	16/21	22/22	0,046†
NÃO	5/21	0/22	
<b>Litíase biliar</b>			
SIM	1/21	7/22	0,021†
NÃO	20/21	15/22	
<b>Uso de hemoderivados</b>			
SIM	13/21	21/22	0,009†
NÃO	8/21	1/22	

† Fisher

**5.5. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *BCL11A*, *HMIP* E *OR51B5/6* E SUA ASSOCIAÇÃO COM A CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL, DADOS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS NOS PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.**

No presente estudo foram investigados os polimorfismos: rs766432 e o rs6732518, ambos localizados no gene *BCL11A*; o rs11759553 e rs35959442, com localização no gene *HMIP*; e o rs4910756 e o rs7483122 no gene *OR51B5/6*. Apenas os alelos do gene *OR51B5/6* não estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Esses dados são mostrados na **tabela 11**.

**Tabela 11.** Frequência dos polimorfismos investigados nos genes *BCL11A*, *HMIP* e *OR51B5/6* em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

Localização	SNP	N(%)
<b>Cromossomo 2</b>		
<i>BCL11A</i>	<b>rs766432</b>	
	AA	20 (47,6)
	AC	17 (40,5)
	CC	5 (11,9)
<i>BCL11A</i>	<b>rs6732518</b>	
	CC	5 (11,9)
	CT	21 (50,0)
	TT	16 (38,1)
<b>Cromossomo 6</b>		
<i>HMIP</i>	<b>rs11759553</b>	
	AA	22 (52,4)
	AT	19 (44,2)
	TT	1 (2,4)
<i>HMIP</i>	<b>rs35959442</b>	
	CC	3 (7,1)
	CG	20 (47,6)
	GG	19 (45,2)
<b>Cromossomo 11</b>		
<i>OR51B5/6*</i>	<b>rs4910756</b>	
	AA	40 (95,2)
	AC	1(2,4)
	CC	1 (2,4)
<i>OR51B5/6*</i>	<b>rs7483122</b>	
	TT	40 (95,2)
	TC	1(2,4)
	CC	1 (2,4)

\*SNPs que não estiveram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.



A presença dos genótipos selvagem e mutante para os polimorfismos investigados não esteve associada à concentração de HbF e dados clínicos. Entretanto, foram observadas associações significativas com os valores de VCM, contagem de reticulócitos e eosinófilos e concentração de glicose, colesterol total, ferritina, creatinina e ácido úrico. Esses resultados estão sumarizados nas **tabelas 12 e, 13** e na **figura 11**.

**Tabela 12.** Associação entre os polimorfismos nos genes *BCL11A*, *HMIP* e *OR1B56* e a concentração de HbF em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

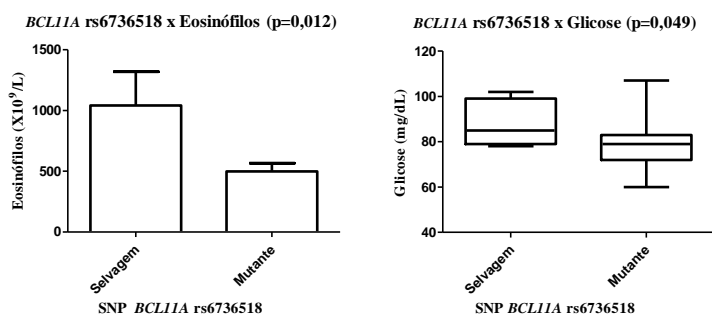
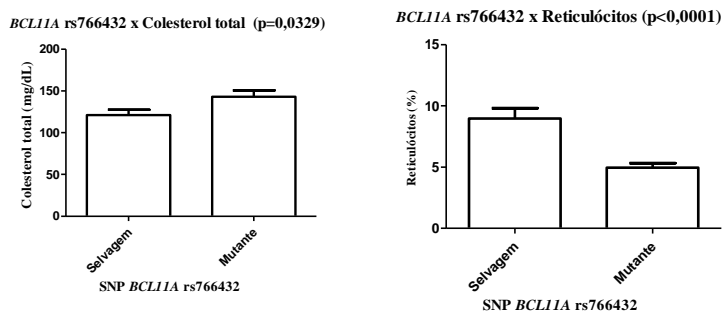
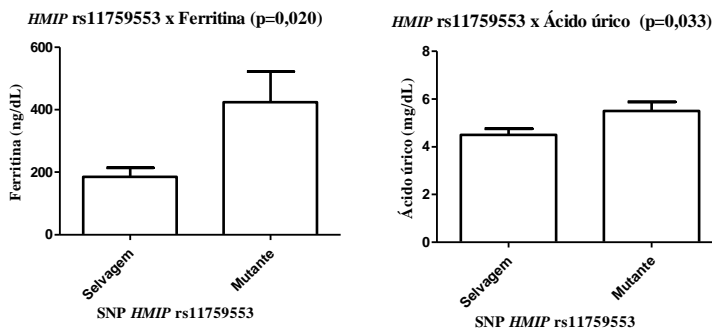
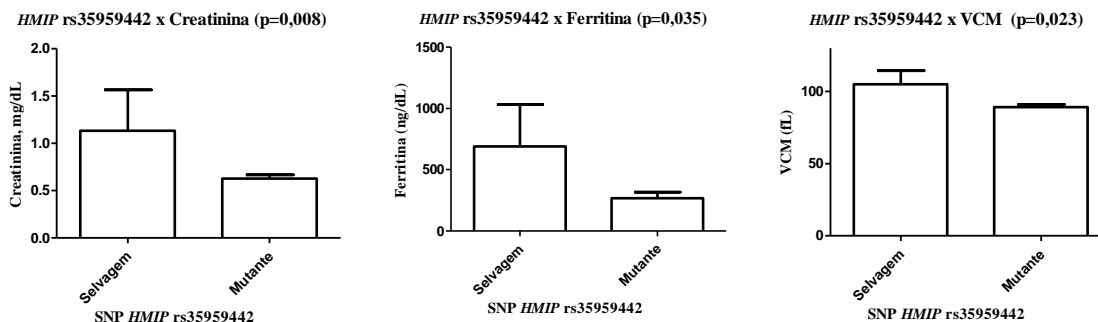
Localização	SNP	HbF <12,88%	HbF ≥12,88%	P	RP (IC95%)
<b>Cromossomo 2</b>					
<i>BCL11A</i>	<b>rs766432</b>				
	AA	14	6		
	AC+CC	10	12	0,108*	0,36 (0,11-1,28)
<i>BCL11A</i>	<b>rs6732518</b>				
	CC	3	2		
	CT+TT	21	16	1,000**	0,88 (0,13-5,87)
<b>Cromossomo 6</b>					
<i>HMIP</i>	<b>rs11759553</b>				
	AA	14	8		
	AT+TT	10	10	0,372*	0,58 (0,17-1,96)
<i>HMIP</i>	<b>rs3595944</b>				
	CC	0	3		
	CG+GG	24	15	0,071**	_____
<b>Cromossomo 11</b>					
<i>OR51B5/6</i>	<b>rs4910756</b>				
	AA	24	16		
	AC+CC	0	2	0,178**	_____
<i>OR51B5/6</i>	<b>rs7483122</b>				
	TT	24	16		
	TC+CC	0	2	0,178**	_____

\*Qui-quadrado, \*\* Teste de Fisher

**Tabela 13.** Análise dos valores médios das variáveis hematológicas e bioquímicas na presença dos alelos selvagem e mutante para os polimorfismos *BCL11A* rs6736518, o *BCL11A* rs766432, o *HMIP* rs35959442, o *HMIP* rs11759553, o *OR51B5/6* rs4910756 e o *OR51B5/6* rs7483122 em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia

Marcadores hematológicos e bioquímicos	Polimorfismos, alelos		
	<i>BCL11A</i> rs6736518 Selvagem	<i>BCL11A</i> rs6736518 Mutante	<i>P</i>
Glicose, g/dL	88,20 ±10,40	78,22 ±10,33	0,049*
Eosinófilos, x10 <sup>9</sup>	1041,16 ±625,74	498,76 ±404,47	0,012†
	<i>BCL11A</i> rs766432 Selvagem	<i>BCL11A</i> rs766432 Mutante	<i>P</i>
Reticulócitos (%)	8,97 ±3,83	4,96 ±1,66	<0,0001*
Colesterol total, mg/dL	122,60 ±31,86	142,00 ±33,90	0,033†
	<i>HMIP</i> rs35959442 Selvagem	<i>HMIP</i> rs35959442 Mutante	<i>P</i>
Ferritina, mg/dL	691,13 ±341,20	210,20 ±27,57	0,035†
Creatinina, mg/dL	1,13 ±0,75	0,63 ±0,26	0,008†
VCM, fL	105,00 ±9,32	89,26 ±1,72	0,022*
	<i>HMIP</i> rs11759553 Selvagem	<i>HMIP</i> rs11759553 Mutante	<i>P</i>
Ácido úrico, mg/dL	4,49 ±1,14	5,49 ±1,52	0,033
Ferritina, mg/dL	185,12 ±142,24	424,09 ±439,42	0,020†
	<i>OR51B5/6</i> rs4910756 Selvagem	<i>OR51B5/6</i> rs4910756 Mutante	<i>P</i>
Creatinina, mg/dL	0,63 ±0,26	1,35 ±0,92	0,001†
	<i>OR51B5/6</i> rs7483122 Selvagem	<i>OR51B5/6</i> rs7483122 Mutante	<i>P</i>
Creatinina, mg/dL	0,63 ±0,26	1,35 ±0,92	0,001†

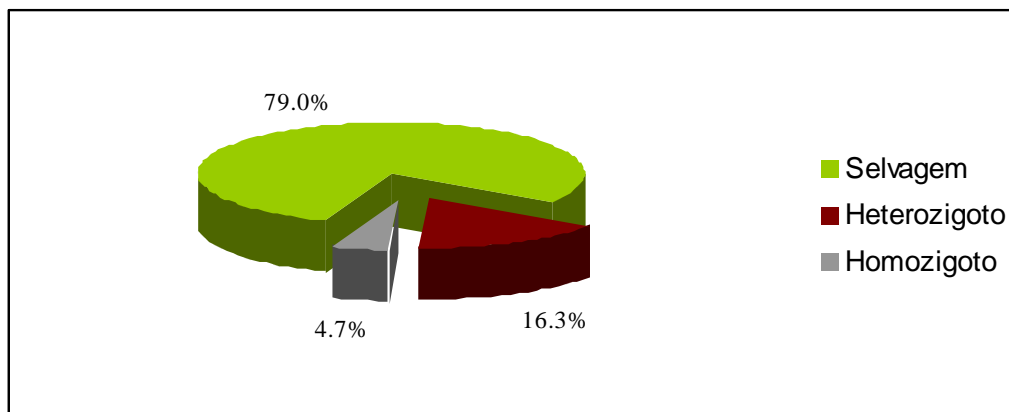
\* Teste t, †Mann-Whitney; Mutante: heterozigoto + homozigoto

**A****B****C****D**

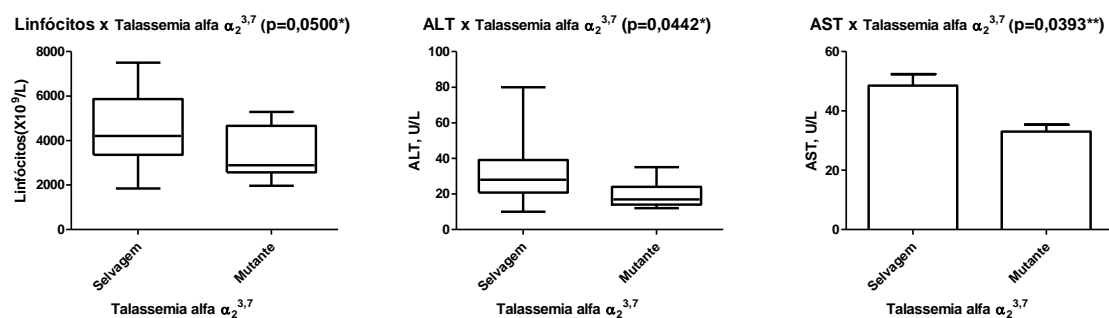
**Figura 11.** Demonstração gráfica da análise de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes HbSS portadores dos genótipos selvagem e mutante para os polimorfismos nos genes *BCL11A* e *HMIP*. Em A: Eosinófilos e glicose associada ao polimorfismo *BCL11A* rs6736518; em B: colesterol total e reticulócitos associados ao SNP *BCL11A* rs766432; em C: ácido úrico e ferritina associados ao polimorfismo *HMIP* rs11759553; em D: creatinina, ferritina e VCM associados ao polimorfismo *HMIP* rs35959442.

**5.6. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DA TALASSEMIA ALFA E DOS HAPLÓTIPOS LIGADOS AO GENE DA GLOBINA BETA E SUA ASSOCIAÇÃO COM A CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL, DADOS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E CLÍNICOS NOS INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME EM SALVADOR-BAHIA.**

A distribuição genotípica da talassemia  $\alpha 2^{3,7Kb}$  nos indivíduos com HbSS e os resultados relacionados aos genótipos selvagem e mutante são mostrados na **figura 12** e na **figura 13**. Foram observadas associações significativas com as concentrações de AST e ALT e a contagem de linfócitos.

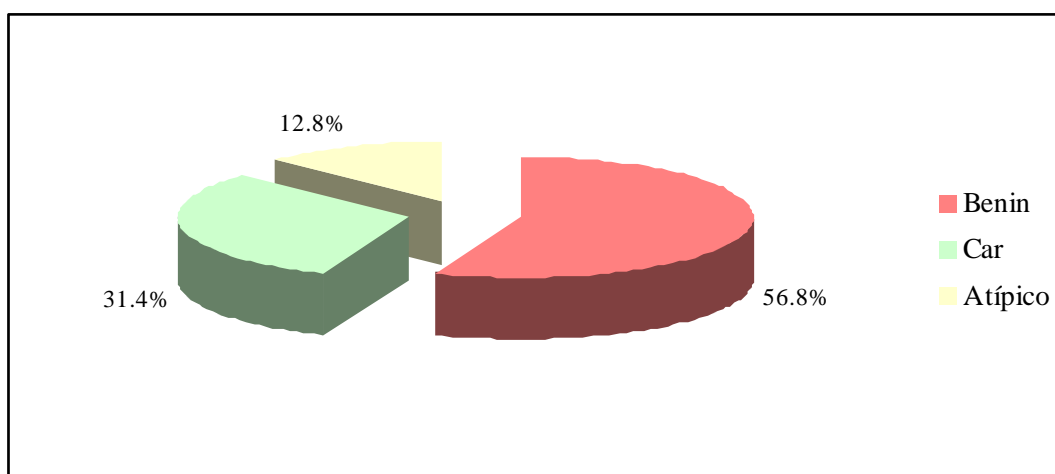


**Figura 12.** Representação esquemática da distribuição da talassemia  $\alpha 2^{3,7Kb}$  em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

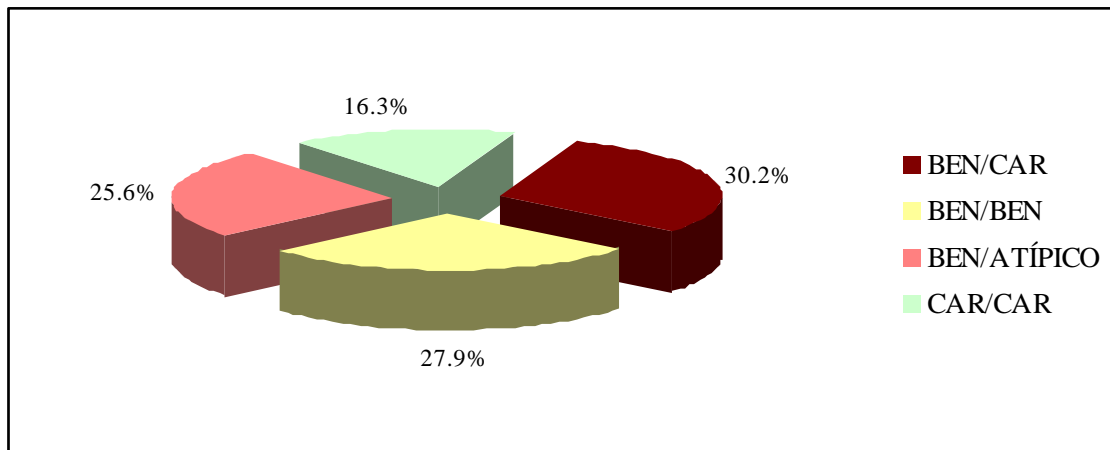


**Figura 13.** Demonstração gráfica da análise de variáveis hematológicas e bioquímicas com os genótipos selvagem e mutante para talassemia  $\alpha_2^{3,7Kb}$  em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

Os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta foram investigados em 43 pares de cromossomos, sendo que o haplótipo mais frequente entre esses pacientes foi o Benin, presente em 48/86 (53,8%), seguido pelo CAR em 27/86 (42,8%) e pelo Atípico em 11/86 (12,8%). O genótipo mais frequente foi o BEN/CAR, seguido do BEN/BEN. Esses resultados são apresentados nas **figuras 14 e 15**. Na análise univariada, os haplótipos não estiveram associados com as concentrações diferenciadas de HbF e aos outros parâmetros laboratoriais investigados.



**Figura 14.** Representação gráfica da frequência (%) dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia



**Figura 15.** Representação gráfica da frequência (%) dos genótipos ligados ao grupo de genes da globina beta em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

Foram observadas associações significativas entre os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina  $\beta$  e os polimorfismos identificados na região promotora dos genes *HBG2* e *HBG1*. Os pacientes HbSS com o haplótipo CAR tiveram mais alelos mutantes para o polimorfismo -396/-391del no gene *HBG2*.

### **5.7. MODELOS DE ANÁLISE MULTIVARIADA COM AS VARIÁVEIS DEPENDENTES O USO DE HEMODERIVADOS, CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL E A OCORRÊNCIA DE PNEUMONIA.**

As análises multivariadas dos dados possibilitaram avaliar o de variáveis características associadas aos pacientes HbSS, permitindo o estabelecimento de modelos que contemplaram variáveis significantes ou não nas análises univariadas, mas que poderiam de determinada maneira influenciar a ocorrência da variável dependente. Os modelos de análise multivariada foram aplicados e avaliados por regressão logística, onde a concentração de

HbF, pneumonia e o uso de hemoderivados foram considerados como variáveis dependentes nos modelos formulados.

As análises que tiveram o uso de hemoderivados como variável dependente foram realizadas em apenas 1 modelo, que demonstrou a influência do haplótipo CAR/CAR como fator de risco para necessidade de uso de hemoderivados (**Tabela 14**).

As análises que tiveram a concentração de HbF como variável dependente foram distribuídas em 4 modelos, que demonstraram a influência do haplótipo CAR/CAR como fator de risco para a concentração mais baixa de HbF na presença de diferentes polimorfismos (**Tabela 15**).

As análises que tiveram a ocorrência de pneumonia como variável dependente foram distribuídas em 4 modelos, que demonstraram que a idade é um fator de risco para a ocorrência de pneumonia na HbSS (**Tabela 16**).

**Tabela 14.** Análises multivariadas em modelo específico, associando o uso de hemoderivados com marcadores hematológicos, bioquímicos e moleculares em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

Variáveis	Coefficiente	Erro-padrão	Valor de P	RP (IC)	Wald teste	R
<b>Modelo 1</b>						
HbF	1,1424	1,0427	0,2733	3,13 (0,41 – 24,20)	1,2003	0,0000
IDADE	0,5636	1,1102	0,6117	1,76 (0,20 – 15,48)	0,2577	0,0000
HAPLO	<b>2,6726</b>	<b>1,2714</b>	<b>0,0355</b>	<b>14,48 (1,20 – 174,96)</b>	<b>4,4188</b>	<b>0,2341</b>
FERRITINA	2,3655	1,4851	0,1112	10,65 (0,58 – 195,63)	2,5373	0,1104
HBG1 -271	-1,4217	1,1009	0,1966	0,24 (0,03 – 2,09)	1,6677	0,0000

HbF: < média (12,88%)

Ferritina: ≥ média (296,22 ng/dL)

Polimorfismo HBG1-271 C>T: alelo mutante (heterozigoto + mutante)

Haplo: CAR

**Tabela 15.** Análises multivariadas em modelos específicos, associando a concentração de HbF com marcadores hematológicos, bioquímicos e moleculares em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

Variáveis	Coefficiente	Erro-padrão	Valor de P	RP (IC)	Wald teste	R
<b>Modelo 1</b>						
TALA	0,7767	0,9348	0,4060	2,17 (0,35 – 13,58)	0,6904	0,0000
IDADE	-0,9487	0,8121	0,2427	0,39 (0,08 – 1,90)	1,3649	0,0000
GENERO	-0,3336	0,7707	0,6651	0,72 (0,16 – 3,24)	0,1874	0,0000
Hb	0,5158	0,7581	0,4962	1,68 (0,38 – 7,40)	0,4630	0,0000
HAPLO	<b>1,7421</b>	<b>0,8832</b>	<b>0,0486</b>	<b>5,71 (1,01 – 32,24)</b>	<b>3,8908</b>	<b>0,1798</b>
<i>HBG2 -369</i>	-0,5669	0,8884	0,5234	0,57 (0,10 – 3,24)	0,4072	0,0000
<b>Modelo 2</b>						
TALA	0,3664	1,0438	0,7255	1,44 (0,19 – 11,16)	0,1232	0,0000
IDADE	-1,0688	0,8717	0,2202	0,34 (0,06 – 1,90)	1,5032	0,0000
GENERO	-0,9637	0,8654	0,2655	0,38 (0,07 – 2,08)	1,2400	0,0000
Hb	0,4978	0,7828	0,5248	1,64 (0,35 – 7,63)	0,4045	0,0000
HAPLO	<b>2,3379</b>	<b>0,9970</b>	<b>0,0190</b>	<b>10,36 (1,47 – 73,11)</b>	<b>5,4980</b>	<b>0,2469</b>
<i>OR51B5/6rs4910756</i>	-10,0401	37,0936	0,7866	0,00 (0,00 – 1,64. 10 <sup>27</sup> )	0,0733	0,0000
<b>Modelo 3</b>						
TALA	0,9062	0,9767	0,3535	2,47 (0,36 – 16,79)	0,8607	0,0000
IDADE	-0,7835	0,8070	0,3316	0,46 (0,09 – 2,22)	0,9426	0,0000
GENERO	-0,4872	0,7631	0,5232	0,61 (0,14 – 2,74)	0,4077	0,0000
Hb	0,5332	0,7705	0,4889	1,70 (0,38 – 7,72)	0,4790	0,0000
HAPLO	<b>1,8420</b>	<b>0,8422</b>	<b>0,0287</b>	<b>6,31 (1,21 – 32,87)</b>	<b>4,7838</b>	<b>0,2203</b>
<i>HMIPrs11759553</i>	0,6885	0,7108	0,3328	0,50 (0,12 – 2,02)	0,9381	0,0000
<b>Modelo 4</b>						
TALA	0,6198	1,1333	0,5844	1,86 (0,21 – 17,13)	0,2991	0,0000
IDADE	-1,1960	0,9606	0,2131	0,30 (0,05 – 1,99)	1,5501	0,0000
GENERO	-1,6949	1,0205	0,0968	0,18 (0,03 – 1,36)	2,7582	-0,1150
Hb	0,1915	0,8384	0,8193	1,21 (0,23 – 6,26)	0,0522	0,0000
HAPLO	<b>3,1840</b>	<b>1,2278</b>	<b>0,0095</b>	<b>24,14 (2,18 – 267, 85)</b>	<b>6,7248</b>	<b>0,2870</b>
<i>HMIPrs35959442</i>	10,8063	31,0482	0,7278	49328, 65 (0,00 – 10 <sup>31</sup> )	0,1211	0,0000

TALA: alelo selvagem

IDADE: < média (20,07 anos)

GÊNERO: feminino

Hb: < média (8,86g/dL)

Polimorfismo *HBG2 -369C>G*: alelo mutante (heterozigoto + homozigoto)

Polimorfismo *HMIPrs4910756*: alelo mutante (heterozigoto + homozigoto)

Polimorfismos *HMIPrs35959442*: alelo mutante (heterozigoto + homozigoto)

HAPLO: haplótipo ligado ao gene da globina beta CAR/CAR



**Tabela 16.** Análises multivariadas em modelos de estudo específico, associando a ocorrência de pneumonia com marcadores hematológicos, bioquímicos e moleculares em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

Variáveis	Coefficiente	Erro-padrão	Valor de P	RP (IC)	Wald teste	R
<b>Modelo 1</b>						
HbF	-0,0203	0,7979	0,9797	0,98 (0,21 – 4,68)	0,0006	0,0000
HAPLO	2,2228	1,5462	0,1505	9,23 (0,45 – 191,20)	2,0667	0,0336
FERRITINA	1,1977	1,0634	0,2600	3,31 (0,41 – 26,62)	1,2686	0,0000
HBG2 -396/-391del	-1,8716	1,4071	0,1835	0,15 (0,01 – 2,43)	1,7681	0,0000
GENERO	-0,2121	0,8824	0,8188	0,82 (0,14 – 4,61)	0,0525	0,0000
IDADE	<b>2,1873</b>	<b>0,9194</b>	<b>0,0174</b>	<b>8,91 (1,47 – 54,02)</b>	<b>5,6598</b>	<b>0,2490</b>
<b>Modelo 2</b>						
HbF	0,0321	0,8841	0,9711	1,03 (0,18 – 5,84)	0,0013	0,0000
HAPLO	0,8035	0,9037	0,3740	2,23 (0,38 – 13,13)	0,7905	0,0000
FERRITINA	1,7188	1,2192	0,1586	5,58 (0,51 – 60,85)	1,9876	0,0000
GENERO	0,2615	0,8273	0,7519	1,30 (0,26 – 6,57)	0,0999	0,0000
IDADE	<b>2,4854</b>	<b>0,9120</b>	<b>0,0064</b>	<b>12,01 (2,01 – 71,73)</b>	<b>7,4272</b>	<b>0,3032</b>
HBG1-271	0,1599	0,8736	0,8548	1,17 (0,21 – 6,50)	0,0335	0,0000
CREATININA	-0,6022	0,8529	0,4801	0,55 (0,10 – 2,91)	0,4986	0,0000
<b>Modelo 3</b>						
HbF	0,7437	0,9352	0,4265	2,10 (0,34 – 13,15)	0,6323	0,0000
HAPLO	1,3317	0,9703	0,1699	3,79 (0,57 – 25,37)	1,8836	0,0000
FERRITINA	0,8885	1,1294	0,4314	2,43 (0,27 – 22,24)	0,6190	0,0000
GENERO	0,1204	0,9135	0,8591	1,13 (0,19 – 6,76)	0,0174	0,0000
IDADE	<b>3,3473</b>	<b>1,1113</b>	<b>0,0026</b>	<b>28,43 (3,22 – 250,97)</b>	<b>9,0728</b>	<b>0,3462</b>
HBG1 -271	0,3392	0,9303	0,7154	1,40 (0,23 – 8,69)	0,1329	0,0000
VLDL	<b>0,1251</b>	<b>0,0583</b>	<b>0,0319</b>	<b>1,13 (1,01 – 1,27)</b>	<b>4,6062</b>	<b>0,2101</b>
<b>Modelo 4</b>						
HbF	0,2223	0,8698	0,7983	1,25 (0,23 – 6,87)	0,0653	0,0000
HAPLO	0,4572	0,8460	0,5889	1,58 (0,30 – 8,29)	0,2921	0,0000
FERRITINA	1,2907	1,1173	0,2480	3,64 (0,41 – 32,48)	1,3346	0,0000
GENERO	0,1452	0,8350	0,8619	1,16 (0,23 – 5,94)	0,0302	0,0000
IDADE	<b>2,3410</b>	<b>0,8750</b>	<b>0,0075</b>	<b>10,39 (1,87 – 57,74)</b>	<b>7,1576</b>	<b>0,2956</b>
HBG1 -271	0,3421	0,8675	0,6933	1,41 (0,26 – 7,71)	0,1555	0,0000
HDL	0,8529	0,7665	0,2658	2,35 (0,52 – 10,54)	1,2380	0,0000
<b>Modelo 5</b>						
HbF	0,1067	0,8680	0,9022	1,11 (0,20 – 6,10)	0,0151	0,0000
HAPLO	0,5847	0,8278	0,4800	1,79 (0,35 – 9,09)	0,4989	0,0000
FERRITINA	1,4648	1,1110	0,1874	4,33 (0,49 – 38,18)	1,7382	0,0000
GENERO	0,2524	0,8409	0,7641	1,29 (0,25 – 6,69)	0,0901	0,0000
IDADE	<b>2,3572</b>	<b>0,8964</b>	<b>0,0086</b>	<b>10,56 (1,82 – 61,20)</b>	<b>6,9143</b>	<b>0,2885</b>
HBG1 -271	0,0849	0,8437	0,9198	1,09 (0,21 – 5,69)	0,0101	0,0000
Hb	0,2090	0,8141	0,7974	1,23 (0,25 – 6,08)	0,0659	0,0000

**Tabela 16 (continuação).** Análises multivariadas em modelos específicos, associando a ocorrência de pneumonia com marcadores hematológicos, bioquímicos e moleculares em indivíduos HbSS de Salvador-Bahia.

Variáveis	Coefficiente	Erro-padrão	Valor de P	RP (IC)	Wald teste	R
<b>Modelo 6</b>						
HbF	0,1671	0,8412	0,8426	1,18 (0,23 – 6,15)	0,0394	0,0000
HAPLO	2,0746	1,6018	0,1953	7,96 (0,34 – 183,84)	1,6773	0,0000
FERRITINA	1,1829	1,0779	0,2725	3,26 (0,39 – 26,99)	1,2043	0,0000
GENERO	-0,2014	0,8941	0,8218	0,82 (0,14 – 4,72)	0,0507	0,0000
IDADE	<b>2,1576</b>	<b>0,9182</b>	<b>0,0188</b>	<b>8,65 (1,43 – 52,31)</b>	<b>5,5219</b>	<b>0,2443</b>
HDL	0,6763	0,7567	0,3715	1,97 (0,45 – 8,67)	0,7987	0,0000
<i>HBG2</i> -369	-1,7829	1,4534	0,2199	0,17 (0,01 – 2,90)	1,5048	0,0000

HbF: < média (12,88%)

IDADE: < média (20,07 anos)

GÊNERO: feminino

Hb: < média (8,86g/dL)

Ferritina: ≥ média (296,22 ng/dL)

HDL colesterol:< média (32,23 mg/dL)

VLDL colesterol: ≥ média (23,33 mg/dL)

CREATININA: ≥ média (0,67 mg/dL)

Polimorfismo *HBG2* -396/-391del: alelo mutante (heterozigoto + homozigoto)

Polimorfismo *HBG2* -369 C>G *HBG2*: alelo mutante (heterozigoto + homozigoto)

Polimorfismo *HBG1*-271 C>T: alelo mutante (heterozigoto + homozigoto)

HAPLO: haplótipo ligado ao gene da globina beta CAR/CAR

## 5.8. ANÁLISE DOS HEREDOGRAMAS DOS CASOS DE PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA DE HEMOGLOBINA FETAL IDENTIFICADOS EM SALVADOR- BAHIA

Identificamos no presente estudo três casos sugestivos de PHHF, com HbF acima 30%, sendo esses dados confirmados pela análise do perfil de hemoglobinas das famílias. O caso índice 3 apresentava o genótipo HbSF e os demais não apresentaram hemoglobina variante. O indivíduo caso 01 apresentou microcitose discreta, entretanto, não foram observadas associações significativas ao se analisar os dados hematológicos, bioquímicos e aqueles relacionados aos polimorfismos investigados nos indivíduos com perfil de Hb sugestivo de PHHF. Esses dados são mostrados nas **tabelas 17 e 18**.

**Tabela 17.** Dados hematológicos e bioquímicos dos casos sugestivos de PHHF em Salvador-Bahia.

	CASO 01	CASO 02	CASO 03
<b>Perfil de hemoglobinas</b>			
HbA1 %	64,80	64,90	0,00
HbS %	0,00	0,00	59,20
HbF %	32,80	33,00	38,00
HbA2 %	2,40	2,10	2,80
<b>Dados Hematológicos</b>			
Hemácias, milhões/mL	5,10	5,70	4,70
Hemoglobina g/dL	12,90	15,10	13,10
Hematócrito %	38,80	45,9	38,6
VCM, fL	75,60	80,10	81,00
HCM, pg	25,10	26,40	27,8
Reticulócitos %	1,70	0,60	0,80
Leucócitos, /L	7000,00	8200	9000,00
Segmentados, /L	2870,00	5248,00	7020,00
Eosinófilos, /L	420,00	246	90,00
Basófilos, /L	0,00	0,00	0,00
Linfócitos, /L	3360,00	2296,00	1710,00
Monócitos, /L	350,00	410,00	180,00
Plaquetas, /L	287,00	167,00	339,00
<b>Perfil Bioquímico</b>			
Glicose, mg/dL	83,00	80,00	107,00
Colesterol total, mg/dL	116,00	122,00	169,00
HDL-colesterol, mg/dL	47,00	45,00	54,00
LDL- colesterol, mg/dL	58,00	56,00	88,00
VLDL-colesterol, mg/dL	11,00	21,00	27,00
Triglicérides, mg/dL	55,00	105,00	136,00
LDH U/L	282,00	150,00	271,00
BILT mg/dL	1,30	0,30	1,50

**Tabela 17 (cont.).** Dados hematológicos e bioquímicos dos casos sugestivos de PHHF em Salvador-Bahia.

<b>Perfil Bioquímico (cont.)</b>	<b>CASO 01</b>	<b>CASO 02</b>	<b>CASO 03</b>
BILD, mg/dL	0,40	0,20	0,50
AST, U/L	24,00	20,00	20,00
ALT, U/L	7,00	19,00	18,00
GGT, U/L	28,00	25,00	28,00
Uréia, mg/dL	21,00	32,00	12,00
Creatinina, mg/dL	1,10	0,50	1,30
Ácido Úrico, mg/dL	3,80	4,60	5,00
Ferro, mcg/dL	55,00	130,00	127,00
Ferritina, ng/dL	24,20	67,00	45,60
PCR, mg/dL	3,31	1,00	ND
ALFA-1 antitripsina, mg/L	135,00	53,00	ND

ND= não determinada

**Tabela 18.** Polimorfismos investigados na região promotora dos genes *HBG* e nos genes *BCL11A*, *HMIP*, *OR51B5/6* nos indivíduos com perfil sugestivo de PHHF

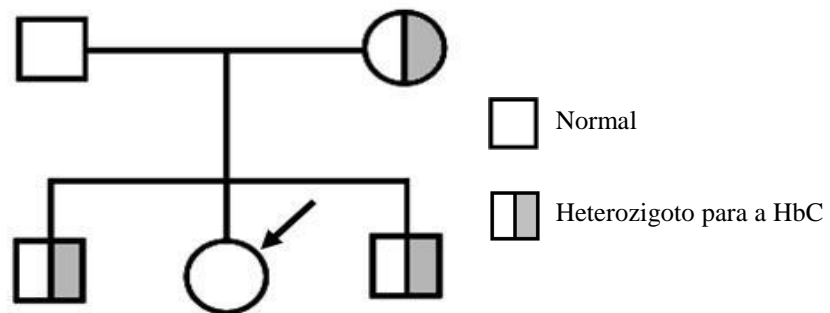
<b>Polimorfismos, Gene</b>	<b>Caso 01</b>	<b>Caso 02</b>	<b>Caso 03</b>
<i>HBG2</i> -396/-391del	+	+	+
<i>HBG2</i> -369 C>G	-	+	-
<i>HBG2</i> -309 A>G	+	-	+
<i>HBG2</i> -157 T>C	-	+	+
<i>HBG1</i> -499 T>A	+	-	+
<i>HBG1</i> -369 C>G	+	-	+
<i>HBG1</i> -271 C>T	-	-	-
<i>HBG1</i> -225/-222del	-	-	+
<i>BCL11A</i> rs6736518	+	+	+
<i>BCL11A</i> rs766432	+	+	+
<i>HMIP</i> rs11759553	-	-	-
<i>HMIP</i> rs35959442	+	+	+
<i>OR51B5/6</i> rs4910756	+	+	-
<i>OR51B5/6</i> rs748312	-	-	-

+: alelo mutante (heterozigoto + homozigoto)

-: alelo selvagem

## CASO 1

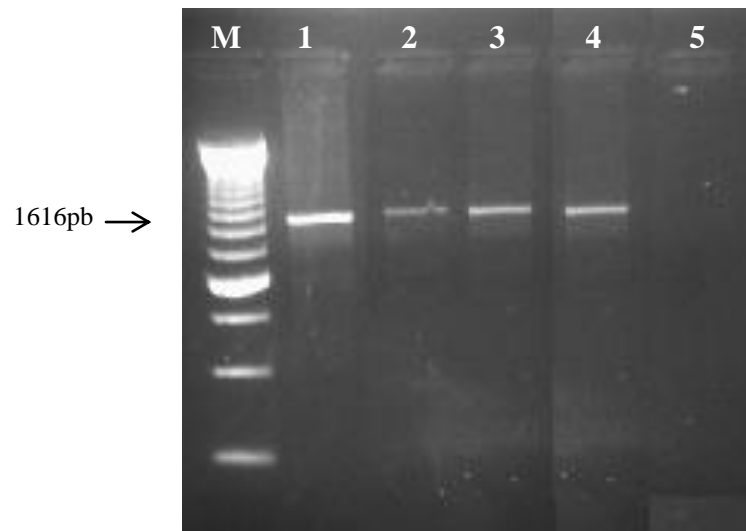
Indivíduo do sexo feminino, 11 anos, caucasóide, com perfil de Hb sem hemoglobina variante e sem alterações clínicas significativas. Dois membros da família (mãe e caso índice) apresentaram concentrações de HbF elevadas. O heredograma e o perfil de hemoglobinas do caso índice e dos membros da família que se disponibilizaram a realizar a coleta são apresentados na **figura 16** e na **tabela 19**. As deleções PHHF-1 e PHHF-2 não foram identificadas na família estudada (**Figuras 17 e 18**).



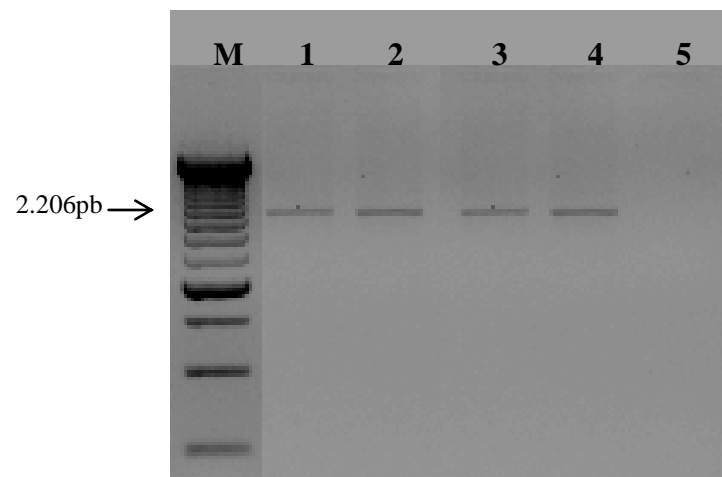
**Figura 16.** Heredograma da família do caso índice 01

**Tabela 19.** Idade e perfil de hemoglobinas em indivíduos da família caso índice 01

	Caso 1	Mãe	Irmão (1)	Irmão (2)
<b>Idade, anos</b>	11	33	02	10
<b>HbA1 (%)</b>	64,8	0,0	59,9	61,5
<b>HbC (%)</b>	0,0	65,2	36,1	35,0
<b>HbF (%)</b>	32,8	33,1	0,5	0,2
<b>HbA2 (%)</b>	2,4	1,7	3,5	3,3



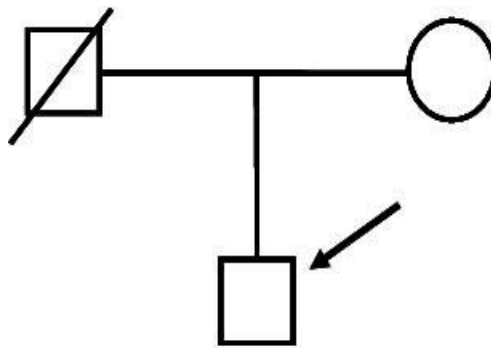
**Figura 17.** Gel em agarose a 1% mostrando o produto da PCR para a PHHF-1 no caso índice 01 e sua família (M= marcador 250pb; 1=Caso índice 01; 2= Mãe; 3= Irmão 1; 4= Irmão 2; 5= controle negativo).



**Figura 18.** Gel em agarose a 1% mostrando o produto da PCR para a PHHF-2 no caso índice 01 e sua família (M= marcador 250pb; 1=Caso índice 01; 2= Mãe; 3= Irmão 1; 4= Irmão 2; 5= controle negativo).

## CASO 02

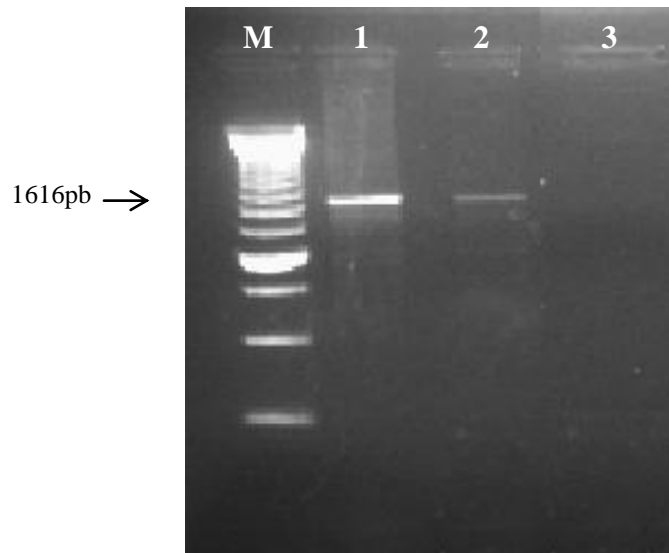
Indivíduo do sexo masculino, 32 anos, afrodescendente, sem Hb variantes e alterações clínicas significativas. Dois membros da família (mãe e caso índice) apresentaram concentrações elevadas de HbF. O heredograma e o perfil de hemoglobinas do caso índice e dos membros da família que se disponibilizaram a realizar a coleta são apresentados na **figura 19** e na **tabela 20**. As deleções PHHF-1 e PHHF-2 não foram identificadas na família estudada (**Figuras 20 e 21**).



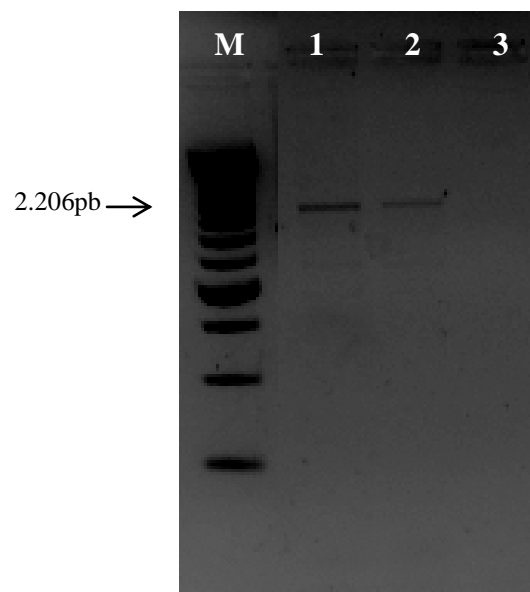
**Figura 19.** Heredograma da família caso índice 02

**Tabela 20.** Idade e perfil de hemoglobina da família caso índice 02

	<b>Caso 02</b>	<b>Mãe</b>
<b>Idade, (anos)</b>	32	58
<b>HbA1 (%)</b>	64,9	65,2
<b>HbF (%)</b>	33,0	33,1
<b>HbA2 (%)</b>	2,1	1,7



**Figura 20.** Gel em agarose a 1% mostrando o produto da PCR para a PHHF-1 no caso índice 02 e na sua genitora (M= marcador 250pb; 1=Caso índice 02; 2= Mãe; 3= controle negativo).

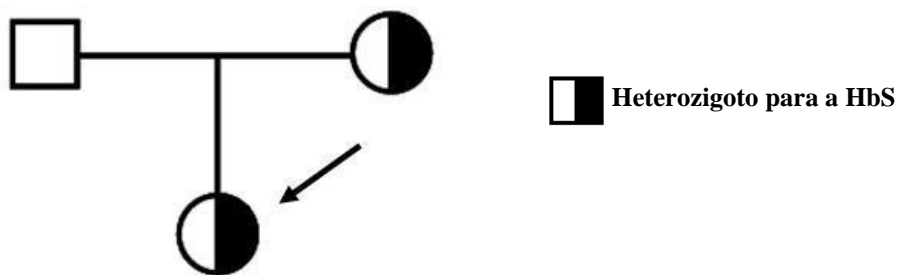


**Figura 21.** Gel em agarose a 1% mostrando o produto da PCR para a PHHF-2 no caso índice 02 e sua genitora (M= marcador 250pb; 1=Caso índice 02; 2= Mãe; 3= controle negativo).



### CASO 03

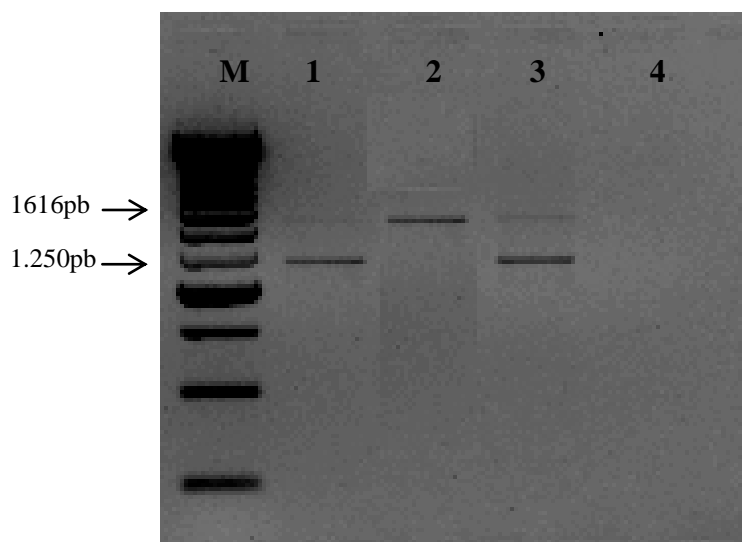
Indivíduo do sexo feminino, 15 anos, caucasóide, com perfil de hemoglobina HbSF e sem alterações clínicas significativas. Dois membros da família (pai e caso índice) apresentaram HbF em concentrações elevadas. O heredograma e o perfil de hemoglobinas da família são apresentados na **figura 22** e na **tabela 21**. As deleções PHHF-1, PHHF-2 não foram identificadas no grupo estudado, além disso, a PCR para a deleção PHHF-1 gerou um fragmento (caso índice e pai) de aproximadamente 1.250pb que não era compatível com o fragmento mutante para essa deleção, levando-nos a supor que pudesse se tratar da PHHF-4, suspeita que não foi confirmada com a PCR para essa deleção (**Figuras 23, 24 e 25**).



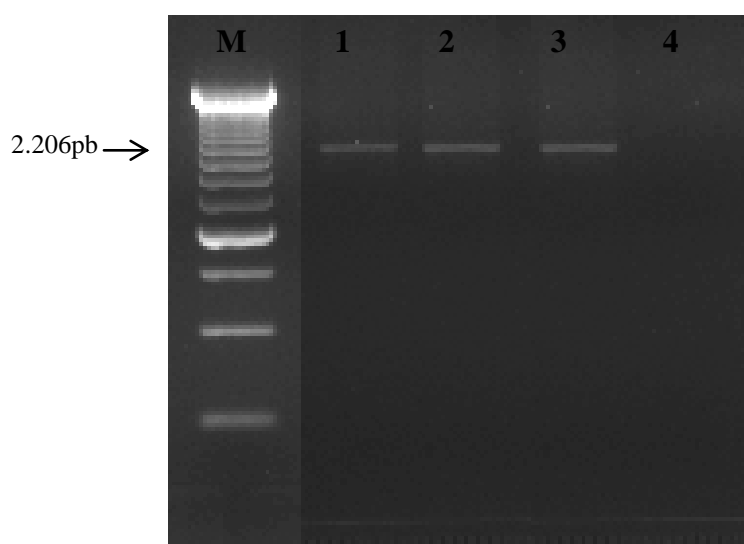
**Figura 22.** Heredograma da família caso índice 03

**Tabela 21.** Parâmetros hematológicos e perfil de hemoglobina do caso índice 03

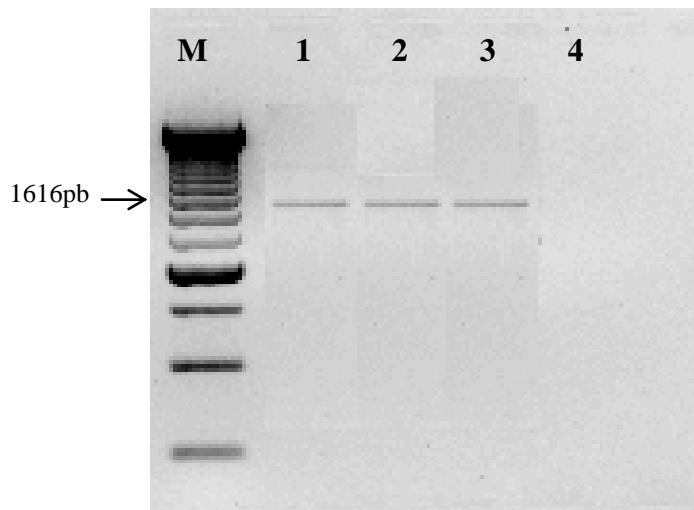
	Caso 03	Mãe	Pai
<b>Idade, (anos)</b>	15	33	38
<b>HbA1 (%)</b>	0,0	40,0	63,4
<b>HbS (%)</b>	59,2	56,4	0,0
<b>HbF (%)</b>	38,0	0,4	34,3
<b>HbA2 (%)</b>	2,8	3,2	2,3



**Figura 23.** Gel em agarose a 1% demonstrando o produto de PCR para a PHHF-1 na família do caso índice 03 (M= marcador 250pb; 1=Caso índice 03; 2= Mãe; 3= Pai 1; 4= controle negativo).



**Figura 24.** Gel em agarose a 1% demonstrando o produto de PCR para a PHHF-2 na família do caso índice 03 (M= marcador 250pb; 1=Caso índice 03; 2= Mãe; 3= Pai; 4= controle negativo).



**Figura 25.** Gel em agarose a 1% demonstrando o produto da PCR para a PHHF-4 na família do caso índice 03 (M= marcador 250pb; 1=Caso índice 03; 2= Mãe; 3= Pai 1; 4= controle negativo).

## ***6. DISCUSSÃO***

## 6. DISCUSSÃO

Os pacientes HbSS apresentam heterogeneidade clínica, com sintomas de gravidade intermediária a gravidade bastante acentuada, com taxas elevadas de mortalidade e morbidade. As variações das condições climáticas, sociais, econômicas e de cuidados médicos contribuem para essa diversidade, mas não explicam a diversidade de formas clínicas com a qual se apresenta a doença (NAGEL & FABRY, 1985; STEINBERG, 2009).

As avaliações hematológicas e bioquímicas têm sido consideradas como marcadores importantes para o acompanhamento dos indivíduos HbSS. No presente estudo, os parâmetros hematológicos dos pacientes demonstram perfil clássico associado à HbSS, que é caracterizada pela presença de anemia do tipo normocítica/normocrômica com reticulocitose. A média encontrada para os níveis de Hb foi compatível com a fase estável da doença, como descrito por Steinberg (2009). As determinações bioquímicas revelaram alterações significativas de marcadores de hemólise como LDH, bilirrubina, AST, ALT e GGT. Os marcadores de inflamação, como PCR, alfa-1 antitripsina e ferritina também estiveram aumentados no grupo de pacientes. O processo de hemólise presente na DF tem sido associado a diferenças importantes em variáveis relacionadas ao comprometimento hepático, tais como a ALT, AST e bilirrubinas e LDH, que estão interligadas em algoritmos associados à evolução clínica e ao óbito nos pacientes com DF, em especial com HbSS. A dosagem de LDH foi referida recentemente como um marcador essencial na avaliação de quadros hemolíticos associados a diferentes manifestações clínicas da DF, incluindo aqueles com participação da resistência ao NO. Esses achados confirmam os resultados obtidos na análise dos pacientes que compuseram a casuística do presente estudo (KATO *et al.*, 2006; OPARINDE *et al.*, 2006; KATO *et al.*, 2007; TAYLOR VI *et al.*, 2008)

No presente estudo, quando se comparou valores hematológicos e bioquímicos nos grupos de pacientes com a HbF acima e abaixo da média, sendo que os valores de VCM, HCM e Ht foram maiores no grupo de pacientes com HbF acima da média; entretanto, a concentração elevada de HbS foi maior no grupo de pacientes com HbF inferior a média. A HbF é considerada modulador clássico do quadro clínico presente na HbSS, apesar dos estudos relacionados a expressão da HbF na DF ainda gerem controvérsias. Os efeitos benéficos da HbF são mais evidentes nos fenótipos associados à viscosidade sanguínea e de falcização, em detrimento aos fenótipos hemolíticos (KATO, 2007). As concentrações elevadas dessa hemoglobina têm sido associadas a manifestações clínicas mais brandas da doença, com redução dos episódios de crises vaso-oclusivas, STA, retinopatia proliferativa, úlceras de perna, sequestro esplênico e as taxas de óbito perinatal (WATSON *et al.*, 1948; SEDGEWICK *et al.*, 2008). Os dados descritos no presente estudo corroboram com os relatos prévios que correlacionam as concentrações elevadas de HbF ao prognóstico clínico melhor da doença, apesar de não terem sido observadas associações significativas na amostra deste estudo entre os dados do histórico clínico e as quantidades diferenciadas de HbF (PLATT *et al.*, 1994; KATO *et al.*, 2006; STEINBERG, 2009; *in* STEINBERG *et al.*, 2009). Além disso, os níveis séricos de ferro, ferritina e VLDL colesterol foram elevados no grupo de pacientes com HbF maior que a média, sugerindo que o simples aumento da HbF não deve ser considerado como marcador de bom prognóstico para a HbSS, uma vez que este parâmetro não mostrou relação com o histórico clínico desses pacientes.

Cumprе ressaltar que o aumento de ferro e ferritina sérica têm sido associados à geração exacerbada de espécies reativas de oxigênio nesses pacientes, fato que pode elevar as concentrações de radicais livres e de certa maneira acentuar danos ao endotélio pelo aumento de oxidantes; auto-oxidação da HbS; aumento da hemólise intravascular com liberação de hemoglobina e ferro livre no vaso, além da participação de moléculas como a haptoglobina e

a hemeoxigenase (REITER *et al.*, 2002; WALTER *et al.*, 2006; FRENETTE & ATWEH, 2007; ASLAN & FREEMAN, 2007). O aumento do VLDL colesterol tem sido proposto como participante da oxidação lipídica em pacientes HbSS, além de estar associado ao desenvolvimento de aterosclerose. Outra hipótese é a relacionada ao aumento de triglicerídeos, provavelmente, pelo aumento da produção hepática de VLDL colesterol, com o aumento do número de receptores para o LDL colesterol, que é extensivamente metabolizado, diminuindo seus níveis séricos. No entanto, o papel do colesterol e dos triglicerídeos e dos seus mecanismos de regulação e produção ainda não estão bem esclarecidos, necessitando de estudos adicionais nesta área. De maneira geral, o consumo de colesterol tem sido associado à inflamação e ao prognóstico desfavorável na DF (PRINSEN *et al.*, 2003; ZORCA *et al.*, 2010).

Diversos estudos têm demonstrado o papel da interação gênica na determinação do fenótipo dos pacientes HbSS, sendo que a expressão de HbF é alvo importante de pesquisas relacionadas a modulação genética da doença, inclusive com o objetivo de se identificar e estudar os mecanismos envolvidos na síntese dessa hemoglobina. Dessa forma, alterações nas sequências e/ou polimorfismos (mutações de um único nucleotídeo, deleções, inserções) nos genes relacionados à síntese das cadeias  $\gamma$  da HbF, nos genes *HBG1* e *HBG2*, podem constituir elementos potenciais que afetam, em *cis*, a interação dessas sequências gênicas e determinados fatores transcricionais, nesse caso, os eritróides (FERTRIN *et al.*, 2003; KUTLAR *et al.*, 2004; ASHLEY-KOCH *et al.*, 2008; SEBASTIANI *et al.*, 2008).

No presente estudo foram investigados os polimorfismos nos genes *HBG2* e *HBG1*, incluindo a deleção -396/-391del, o polimorfismo -369 C>G, o -309 A>G e o -157 T>C no gene *HBG2*; e o polimorfismo -499 T>A, o -369 C>G, o -271 C>T e a deleção -225/-222del no gene *HBG1*. Dessa forma, foram identificados oito polimorfismos nas regiões promotoras dos genes *HBG1* e *HBG2* e observou-se que somente o polimorfismo *HBG1* -271 C>T não

estava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, sugerindo uma possível seleção do alelo mutante no grupo de pacientes HbSS, que apresentaram 4,45 vezes mais a ocorrência de concentrações mais baixas de HbF, corroborando com Barbosa e colaboradores (2010). O alelo variante para o polimorfismo *HBG1* -499 T>A, que apresenta ancestralidade africana, principalmente da África Centro-Sul (PATRINOS *et al.*, 2005), foi pouco descrito no Brasil e, neste estudo, não esteve associado à concentração de HbF. Além disso, o alelo variante para o polimorfismo -369 C>G, localizado no mesmo gene, foi observado em homozigose em todos os indivíduos estudados. As diferenças nas distribuições alélicas desses polimorfismos, nos indivíduos HbSS, podem ser explicadas pela ocorrência de desequilíbrio de ligação, que em genética de populações corresponde a associações não-aleatórias em um ou mais *loci*, podendo estar ou não localizados em um mesmo cromossomo.

O alelo variante para o polimorfismo *HBG2* -157 T>C foi encontrado em todos os indivíduos HbSS estudados, mas não esteve associado à concentração de HbF. Esse dado vai de encontro aos achados de Adorno e colaboradores (2008) que sugeriram a relação entre o alelo mutante e a síntese elevada de cadeias globina  $\gamma$ , principalmente por ele estar localizado próximo ao polimorfismo *HBG2* -158 C>T, que é, reconhecidamente, um polimorfismo associado à expressão elevada do gene *HBG2*. Os dados encontrados contradizem essa suposição e corroboram com os dados de Barbosa e colaboradores (2010) que demonstraram que esse polimorfismo é uma variante comum na nossa população, sendo de origem, provavelmente, africana, uma vez que foi um achado unânime entre os quilombolas originários desse continente (GILMAN *et al.*, 1985; GONÇALVES *et al.*, 1994; FERTRIN & COSTA, 2010).

Os alelos variantes para os polimorfismos -271 C>T e -225/-222del localizados no gene *HBG1* parecem ter implicações clínicas e hematológicas para os pacientes HbSS, com provável efeito protetor; uma vez que foram encontradas associações do alelo mutante com



concentrações diminuídas de ferro e LDL colesterol para os polimorfismos -271 C>T e -225/-222del, respectivamente. Cumpre ressaltar que esses marcadores bioquímicos têm sido associados ao estresse oxidativo e inflamação (NOFER, 2002; FRENETTE & ATWEH, 2007; ASLAN & FREEMAN, 2007).

Com relação ao polimorfismo *HBG1*- 499 T>A, o seu alelo selvagem esteve associado a níveis elevados de glicose, mas o alelo mutante a concentrações elevadas da alfa-1 antitripsina, evidenciando desta forma as interações complexas desses marcadores nesse grupo de pacientes. Diferente dos outros polimorfismos que puderam ser associados como fator protetor, a deleção *HBG2* -396/-391del esteve associada a valores elevados de HbS, creatinina e bilirrubina total, sugerindo uma associação com a gravidade da doença para o alelo mutante. A confirmação deste estado de gravidade foi obtida quando se encontrou uma associação significativa do alelo mutante para essa deleção e a ocorrência de crises vasculares, litíase biliar e uso de hemoderivados. Cumpre ressaltar, que são escassos os estudos que associam esses polimorfismos a alterações em marcadores bioquímicos, sendo necessária a realização de estudos semelhantes, visando à confirmação desses achados (BARBOSA, 2009).

Os polimorfismos de único nucleotídeo analisados no presente estudo foram o *BCL11*Ars766432, *BCL11*Ars6732518, *HMIP*rs11759553, *HMIP*rs35959442, *OR51B5*/6rs4910756 e o *OR51B5*/6rs7483122. Apenas os alelos do gene *OR51B5*/6 não estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, fato que pode estar associado à seleção natural do alelo selvagem na população estudada ou a associações não-aleatórias entre polimorfismos em *loci* diferentes. Solovieff e colaboradores (2010) descreveram a influência dos genes *OR* na regulação da síntese de HbF em indivíduos com HbSS e associando-os a ocorrência de desequilíbrio de ligação elevado entre os alelos mutantes para os polimorfismos *OR51B5*/6rs4910756 e o *OR51B5*/6rs7483122.

A associação de concentrações de HbF acima e abaixo da média e os polimorfismos estudados não mostrou significância estatística, fato que pode estar relacionado diretamente com o n amostral que compôs este estudo. Apesar dos resultados descritos, são vários os estudos de acerca da influência de polimorfismos nos cromossomos 2, 6 e 11 na regulação da síntese de HbF e na distribuição de células F. Na literatura é descrito que estes genes juntos são responsáveis por 20 a 50% do controle da síntese de HbF em indivíduos normais e portadores de hemoglobinopatias (MENZEL *et al.*, 2007; SEDGEWICK *et al.*, 2008; FERTRIN & COSTA, 2010; SANKARAN *et al.*, 2010; SOLOVIEFF, *et al.*, 2010; AKINSHEYE *et al.*, 2011).

O presente estudo mostrou associações entre o alelo selvagem do polimorfismo *BCL11*Ars6732518 e o aumento nas concentrações de glicose e no número de eosinófilos; do alelo selvagem para o polimorfismo *BCL11*Ars766432 e contagens elevadas de reticulócitos e diminuição nas concentrações de colesterol total; do alelo selvagem para o polimorfismo *HMIP*rs35959442 e concentrações elevadas de ferritina, creatinina e de VCM. O alelo mutante para o polimorfismo *HMIP*rs11759553 esteve associado as concentrações elevadas de ácido úrico e de ferritina; os alelos mutantes dos polimorfismo *OR51B5*/6rs4910756 e *OR51B5*/6rs7483122 a concentrações mais elevadas de creatinina. Os estudos de associação entre os polimorfismos acima referidos têm sido realizados, invariavelmente, com foco no potencial desses genes em contribuir para a modulação da síntese de HbF, sendo escassos aqueles que trazem dados relacionados a influência desses polimorfismo com parâmetros diferentes dos dados hematológicos. Lettre e colaboradores (2008) descreveram a influência de polimorfismos nestes genes na contagem de plaquetas em indivíduos HbSS brasileiros ao serem comparados com indivíduos HbSS americanos. Os dados descritos neste estudo indicam uma provável influência desses polimorfismos em mecanismos específicos que

podem, de alguma maneira, estar contribuindo para o estabelecimento de subfenótipos específicos dos pacientes HbSS.

A associação do polimorfismo *BCL11*Ars6732518 com a contagem de eosinófilos suscitam o possível envolvimento com a participação da ativação deste tipo celular e envolvimento nos eventos de vaso-oclusão frequentemente descritos na HbSS (CANALLI *et al.*, 2004).

A relação do polimorfismo *BCL11*Ars766432 com contagens elevadas de reticulócitos sugere a ligação com quadros hemolíticos mais graves nos pacientes HbSS, fato que foi reforçado pelos níveis diminuídos de colesterol, uma vez que estes têm sido diretamente associados a quadros clínicos mais graves nos pacientes HbSS (ZORCA *et al.*, 2010). Além disso, Seixas e colaboradores (2010) relataram o possível envolvimento do metabolismo lipídico e a identificação de subfenótipo relacionado a distúrbios metabólicos na HbSS.

A associação do alelo selvagem para o polimorfismo *HMIP*rs35959442 e concentrações elevadas de ferritina e de VCM sugere a ocorrência de quadro clínico mais grave para os pacientes HbSS com este alelo, uma vez que, estes biomarcadores têm sido associados a geração de espécies reativas de oxigênio e a estados inflamatórios e ao process hemolítico na HbSS (FRENETTE & ATWEH, 2007; ASLAN & FREEMAN, 2007; STEINBERG, 2008); a associação das concentrações mais elevadas de creatinina com o alelo selvagem para este polimorfismo sugere um possível comprometimento renal, levando-se em conta que os rins de pacientes HbSS apresentam hiperfiltração, fato que está associado a valores normais para creatinina (ATAGA & ORRINGER, 2000). O alelo mutante para o polimorfismo *HMIP*rs11759553 esteve associado às concentrações elevadas de ácido úrico e de ferritina, sugerindo a participação desse alelo no disparo do complexo inflamossoma, no qual a molécula de ácido úrico desempenha papel como precipitante da cascata de ativação de mediadores associados a este fenômeno (MARTINON *et al.*, 2009). O aumento da creatinina

nos indivíduos HbSS com os polimorfismos *OR51B5/6rs4910756* e *OR51B5/6rs7483122* pode estar relacionado a um possível comprometimento renal, a semelhança do descrito para o polimorfismo *HMIPrs35959442*.

A talassemia  $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$  foi descrita na frequência de 21,7% no grupo de indivíduos HbSS. Esse resultado é concordante com o trabalho de Lyra e colaboradores (2005) que relataram a frequência de 21,6% em pacientes HbSS, desta mesma população, que apresentavam concomitantemente esta talassemia. A coexistência dessas alterações promove aumento da relação membrana/citoplasma eritrocitário, com diminuição da perda de eletrólitos e desidratação celular, diminuição da hemólise, aumento na concentração de hemoglobina e do hematócrito, redução dos índices hematimétricos (VCM e HCM), da contagem de reticulócitos e redução de úlceras em membros inferiores (STEINBERG, 2005). No presente estudo, demonstrou-se a associação das concentrações mais baixas de AST, ALT e linfócitos com genótipo mutante para a  $\alpha$ -talassemia, corroborando com o efeito protetor dessa comorbidade.

Com relação aos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina  $\beta^S$ , os resultados deste estudo mostraram distribuição heterogênea dos haplótipos, com predomínio dos genótipos CAR/Ben e Ben/Ben, seguidos dos genótipos Ben/Atípico e CAR/CAR, sem descrição dos haplótipos Camarões e Senegal. Esses resultados estão de acordo com os estudos prévios realizados na mesma população (GONÇALVES *et al.*, 2003; ADORNO *et al.*, 2004; ADORNO *et al.*, 2008).

No presente estudo foi observada associação do polimorfismo *HBG2-396/-391del* com a presença do haplótipo CAR. Dessa forma, apesar de não terem sido descritas associações dos haplótipos com as manifestações clínicas dos pacientes HbSS estudados, a presença do alelo mutante da referida deleção foi também associado ao aumento de crises vaso-oclusivas,

litíase biliar e uso de hemoderivados, quando se avaliou a história clínica desses indivíduos (BOUHASSIRA *et al.*, 1990; LANCLOS *et al.*, 1991; BARBOSA *et al.*, 2010).

No presente estudo, o genótipo CAR/CAR não esteve associado às concentrações de HbF e manifestações clínicas graves nos pacientes HbSS, quando realizadas análises univariadas. Entretanto, a realização de modelos estruturados de análises multivariadas por regressão logística indicaram que a presença do genótipo CAR/CAR foi associado a a 14,48 vezes mais ao uso de hemoderivados em modelo que incluía concentrações baixas de HbF, idade elevada, ferritina elevada e o polimorfismo *HBG1-271 T>C*. As concentrações diminuídas de HbF estiveram associadas a presença do genótipo CAR/CAR com RP de 5,71; 10,36; 6,31 e 24,14 em modelos que incluíram os polimorfismos *HBG2-396C>G*, *ORIB5/6rs4910756*; *HMIPrs11759553*; *HMIPrs35959442*, respectivamente. O haplótipo CAR tem sido associado a concentrações diminuídas de HbF e ao quadro clínico mais grave da doença (POWARS, 1991; STEINBERG *et al.*, In: HOFFMAN *et al.*, 1995; GONÇALVES *et al.*, 2003).

A ocorrência de pneumonia esteve associada à idade menor com RP de 9,91; 12,01; 28,43; 10,39 e 10,56 em modelos que que incluíram os polimorfismos *HBG2-396/391del*; *HBG2-271C>T*; e *HBG2-396C>G*, respectivamente. É importante ressaltar que a idade de 5 anos é considerada como risco para a ocorrência de pneumonia nos pacientes HbSS (STEINBERG *et al.* 2009).

No presente trabalho foram relatados três casos associados ao fenótipo de PHHF do tipo deletional, com valores de HbF > 30%, sem manifestações clínicas significativas e com parâmetros hematológicos e bioquímicos dentro dos valores de referência. Ainda nesse grupo, foi identificado um caso com o genótipo HbSF que não apresentou alterações laboratoriais significativas e sem relatos de crises vaso-oclusivas ou anemia hemolítica, característicos do

quadro de HbSS, concordando com relatos prévios (THEIN & WOOD (*in* Steinberg, 2009; AKINSHEYE *et al.*, 2011).

Aproximadamente, o total de 8 tipos de PHHF com deleção superior a 80 Kb foi descrito nos últimos anos. Essas deleções são associadas à síntese elevada de HbF e distribuição pancelular desta hemoglobina nos eritrócitos. Três mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito das deleções nas concentrações de HbF: (1) sugere que ocorra a deleção de elementos repressores dos genes *HBG*; (2) há a ocorrência de justaposição de elementos ativadores (*enhancers*), normalmente localizados *downstream* dos genes *HBG*; (3) ocorre uma maior interação da *LCR* com os genes *HBG*, uma vez que os genes *HBB* estão deletados (WEATHERALL *et al.*, 2001).

A PHHF-1 e a PHHF-2 são as formas mais frequentemente observadas em afrodescentes americanos e no Brasil (GONÇALVES, *et al.*, 1995; AKINSHEYE *et al.*, 2011). Entretanto, os indivíduos estudados não eram portadores das deleções mais frequentemente descritas no Brasil, sendo, portanto, necessária a investigação futura para identificar as deleções envolvidas nos casos estudados. A deleção envolvida no caso índice 3, que apresentou fragmento diferente do convencional quando o DNA foi amplificado com primers para a PHHF-1, pode corresponder a um novo ponto de quebra relacionado ao fenótipo PHHF, uma vez que não foram registrados fragmentos que indicassem a presença da PHHF-2 ou PHHF-4.

De acordo com o exposto, tendo como base os resultados descritos no presente estudo, ressalta-se que é imprescindível a realização de investigações adicionais das interações desses polimorfismos e marcadores hematológicos, bioquímicos e genéticos clássicos. Enfatizamos que a inclusão de análises de haplótipos e de desequilíbrio de ligação, além da avaliação dos mecanismos funcionais poderão contribuir para a elucidação desta rede complexa que

interliga marcadores genéticos e a anemia falciforme, uma vez que as vias associadas a essas interações ainda permanecem, na sua maioria, ainda obscuras.

## ***7. CONCLUSÕES***



## 7. CONCLUSÕES

- I. No presente estudo, os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos indivíduos HbSS foram compatíveis com o estado estável da doença, que é caracterizado pela presença de anemia do tipo normocítica/normocrômica associada à reticulocitose e concentrações elevadas de biomarcadores de hemólise. A ocorrência de crises vaso-oclusivas, pneumonia e esplenomegalia foram as manifestações clínicas mais frequentes no grupo estudado;
- II. No presente estudo, a HbF foi associada a índices hematimétricos melhores, todavia, esta Hb foi também relacionada às concentrações elevadas de biomarcadores associados ao de prognóstico desfavorável da HbSS. Não foram identificadas associações significativas com o quadro clínico da doença, demonstrando que a HbF não deve ser considerada de maneira isolada como marcador de prognóstico favorável.
- III. No presente estudo, o alelo variante para o polimorfismo *HBG1* -271 C>T foi associado com as concentrações menores de HbF. De maneira geral, os alelos variantes para os polimorfismos estudados foram associados a marcadores hematológicos e bioquímicos melhores. Entretanto, o alelo mutante para a deleção *HBG2* -396/-391del foi associado aos marcadores laboratoriais e prognóstico mais graves da HbSS
- IV. No presente estudo, não foram observadas associações de polimorfismos nos genes *BCL11A*, *HMIP* e *OR51B5/6* com as concentrações de HbF. Entretanto, os alelos variantes para estes polimorfismos foram associados a marcadores hematológicos e bioquímicos melhores, de maneira geral;

- V. A comorbidade HbSS/talassemia alfa  $\alpha$ 23,7Kb foi associada a ALT, AST e linfócitos, apresentando efeito protetor. A distribuição dos haplótipos foi bastante heterogênea, concordando com relatos anteriores. Entretanto, na análise univariada, os haplótipos não foram associados às concentrações diferenciadas de HbF e ao histórico clínico dos indivíduos HbSS estudados.
- VI. No presente estudo, a análise multivariada em modelos específicos mostrou que o genótipo CAR/CAR está associado com as concentrações menores de HbF e ao uso de hemoterápicos, concordando com os relatos prévios que o associam ao prognóstico mais grave da doença. Além disso, a idade menor e concentrações diminuídas de HbF foram associados como fator de risco para a ocorrência de pneumonia nos indivíduos estudados;
- VII. Os casos sugestivos de PHHF não apresentam alterações laboratoriais e clínicas significativas, incluindo o caso 3 que apresentou o genótipo HbSF e não estiveram associados a ocorrência de crises vaso-oclusivas e anemia hemolítica, corroborando com relatos anteriores que associam esse genótipo a ausência de manifestações clínicas características da HbSS. Além disso, nenhuma das formas deletoriais de PHHF investigadas foi confirmada nesses pacientes, sendo necessária a realização de estudos futuros para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nesses casos.

## ***8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS RJ, KUTLAR A, MCKIE V. *et al.* Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. **Am J Hematol.** v.45, n.4, p.279-82, 1994;

ADEKILE, A.D. Anthropology of the beta S gene-flow from West Africa to north Africa, the Mediterranean, and southern Europe. **Hemoglobin.** v.16, p.105-21, 1992;

ADORNO, E.V.; COUTO, F.D.; MOURA NETO, J.P. *et al.* Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cad Saude Publica.**, v.1, p.292-8, 2005;

ADORNO, E.V.; MOURA-NETO, J.P.; LYRA, I. *et al.* Sequence change in the HS2-LCR and Ggamma-globin gene promoter region of sickle cell anemia patients. **Braz J Med Biol Res.** v.41, n.2, p.95-8, 2008;

AKAR, N.A.; ADEKILE, A. Ten-year review of hospital admissions among children with sickle cell disease in Kuwait. **Med Princ Pract.** v.17, n.5, p.404-8, 2008;

AKINSHEYE ,I.; ALSULTAN, A.; SOLOVIEFF, N. *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood.** v.118, n.1, p.19-27, 2011;

ALTER, B.P. The G gamma: A gamma composition of fetal hemoglobin in fetuses and newborns. **Blood.**, v.54, n.5, p.1158-63, 1979;

AMORIM, T.; PIMENTEL, H.; FONTES, M.I.M.M. *et al.* Avaliação do Programa de Triagem Neonatal da Bahia entre 2007 – 2009 – As Lições da Doença Falciforme. **Gazeta Médica da Bahia.** v.80, n.3, p. 10-13, 2010;

ANGASTINIOTIS, M.; MODELL, B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. **Ann N Y Acad Sci.** v.30, n.850, p.251-69, 1998;

AKAR, N.A.; ADEKILE, A. Ten-year review of hospital admissions among children with sickle cell disease in Kuwait. **Med Princ Pract.** v.17, n.5, p.404-8, 2008;

ALTER, B.P. The G gamma: A gamma composition of fetal hemoglobin in fetuses and newborns. **Blood.**, v.54, n.5, p.1158-63, 1979;

ASHLEY-KOCH, A. E.; ELLIOTT, L.; KAIL, M. E. *et al.* Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Blood.** v.15, n. 111, p. 5721-5726, 2008;

ASLAN, M.; FREEMAN, BA. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. **Free Radic Biol Med.** v.43, n.11, p.1469-83, 2007;

ATAGA, K.I.; ORRINGER, E.P. Renal abnormalities in sickle cell disease. **Am J Hematol.** v.63, n.4, p.205-11, 2000;

BABASHAH, S.; JAMALI, S.; MAHDIAN, R. *et al.* Detection of unknown deletions in beta-globin gene cluster using relative quantitative PCR methods. **Eur J Haematol.** v.83, n.3, p.261-9, 2009

BACOLLA, A.; ULRICH, M.J.; LARSON, J.E. *et al.* An intramolecular triplex in the human gamma-globin 5'-flanking region is altered by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. **J Biol Chem.**, v. 270, n. 41, p. 24556-63, 1995;

BANK, A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. **Blood.** v.15, n.107(2) p.:435-43, 2006;

BARBOSA, C.G. Variações na região promotora dos genes da globina gama: investigação em pacientes com anemia falciforme e indivíduos afro-descendentes. 2009, 115f. Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental). Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, 2009;

BARBOSA, C.G.; GONCALVES-SANTOS, N.J.; SOUZA-RIBEIRO, S.B. *et al.* Promoter region sequence differences in the A and G gamma globin genes of Brazilian sickle cell anemia patients. **Braz J Med Biol Res.** v.43, n.8, p.705-11, 2010;

BHAUMIK, K. Fetal hemoglobin synthesis in sickle cell anemia: some molecular considerations. **Am. J. Hematol.** v. 46, p. 101-106, 1994;

BIANCHI, N.; ZUCCATO, C.; LAMPRONTI, I. Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of gamma-globin gene expression. **BMB Rep.** v. 42, n.8, p. 493-9, 2009

BIEKER, J.J. Putting a finger on the switch. **Nat Genet.** v.42, n.9, p 733-4, 2010.

BIRGENS, H.; LJUNG, R. The thalassaemia syndromes. **Scand J Clin Lab Invest.**, v.67, n.1, p.11-25, 2007.

BORG, J.; PAPADOPOULOS, P.; GEORGITSI, M *et al.* Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Nat Genet.**, v.42, n.9, p.801-5, 2010;

BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R. L. A 6-bp deletion 5' to the G gamma globin gene in beta S chromosomes bearing the Bantu haplotype. **Am J Hum Genet.** v. 47, n. 1, p. 161-163, 1990;

BULGER, M.; SCHÜBELER, D.; BENDER, M.A. *et al.* A complex chromatin landscape revealed by patterns of nuclease sensitivity and histone modification within the mouse beta-globin locus. **Mol Cell Biol.**, v. 23, n. 15, p.5234-44, 2003;

BUNN, H.F.; FORGET, B.G.: Sickle cell disease-molecular and cellular pathogenesis; In BUNN, H.F.; FORGET, B.G. (eds.). **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects.** Philadelphia, PA, USA, p. 453-501 1986;

CANALLI, A.A.; CONRAN, N.; FATTORI, A. *et al* Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. **Exp Hematol.** v.32, n.8, p.728-34, 2004;

CAMASCHELLA, C.; SERRA, A.; GOTTARDI, E. *et al.* A new hereditary persistence of fetal hemoglobin deletion has the breakpoint within the 3' beta-globin gene enhancer. **Blood**. v.15, n.75(4), p.1000-5, 1990;

CAO, A.; MOI, P. Regulation of the globin genes. **Pediatr Res.**, v. 51, n. 4, p. 415-21, 2002;

CLOSE, J.; GAME, L.; CLARK, B. *et al.* Genome annotation of a 1.5 Mb region of human chromosome 6q23 encompassing a quantitative trait locus for fetal hemoglobin expression in adults. **BMC Genomics**. v.31, n.5(1), p.33, 2004

COLLINS, F.S.; WEISSMAN, S.M. The molecular genetics of human hemoglobin. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.**, v.31, p.315-462, 1984;

COLLINS, F.S.; COLE, J.L.; LOCKWOOD, W.K. *et al.* The deletion in both common types of hereditary persistence of fetal hemoglobin is approximately 105 kilobases. **Blood.**, v.70, n.6, p.1797-803, 1987;

COSTA, F. F.; ZAGO, M. A; CHENG, G. *et al.* The Brazilian type of nondeletional Ag-fetal hemoglobin has a C>G substitution at nucleotide -195 of the Ag -globin gene. **Blood** **76**:1896, 1990;

COSTA, F.F.; ARRUDA, V.R.; GONÇALVES, M.G. *et al.* Beta S-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from two regions of Brazil. **Am J Hematol**. v.45, n.1, p.96-7, 1994;

COSTA, V.A.; ACEDO, M.J.; POLIMENO, N.C.; BERTUZZO, C.S. Estimation of the frequency of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin in Brazil. **Cad Saude Publica**. v.18, n.5, p.1469-71, 2002;

CHANG, Y. C.; SMITH, K. D.; MOORE, R. D. *et al.* An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, beta-globin haplotypes, alpha-globin gene number, gender, and age. **Blood**. v. 85, n. 4, p. 1111-1117, 1995.

CHUI, D.H.; DOVER, G.J. Sickle cell disease: no longer a single gene disorder. **Curr Opin Pediatr**. v.13, n.1, p.22-7, 2001;

DA CUNHA, A.F.; BRUGNEROTTO, A.F.; CORAT, M.A. *et al.* High levels of human gamma-globin are expressed in adult mice carrying a transgene of the Brazilian type of hereditary persistence of fetal hemoglobin ((A)gamma -195). **Hemoglobin**.v.33, n.6, p.439-47, 2009;

DEAN, A. Chromatin remodelling and the interaction between enhancers and promoters in the beta-globin locus. **Brief Funct Genomic Proteomic** . 2004;2(4):344-354

DE ANDRADE, T.G.; SAAD, S.T.; SONATI, MDE. F.; COSTA, F.F. Simple fluorescent PCR method for detection of large deletions in the beta-globin gene cluster. **Am J Hematol**. v.72, n3, p.225-7, 2003;

- DORE, L. C.; AMIGO, J.D.; DOS SANTOS, C.O. *et al.* A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.4, n.105(9), p. 3333-8, 2008;
- DOVER, G. J.; CHARACHE, S. Increasing fetal hemoglobin production in sickle cell disease: results of clinical trials. **Prog Clin Biol Res.** v. 251, p. 455-466, 1987;
- DUARTE, D.F; KIMURA, E.M.; ALBUQUERQUE, D.M. *et al.* Structural alterations of the gamma-globin genes in a Brazilian population. **Hemoglobin.** v.28, n.1, p.73-7, 2004;
- ELLIS, J.; TAN-UN, K.C.; HARPER, A. *et al.* A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human beta-globin locus control region. **EMBO J.**, v. 15, n.3, p.562-8, 1996;
- FEINGOLD, E. A.; PENNY, L. A.; NIENHUIS, A.W.; FORGET, B. G. An olfactory receptor gene is located in the extended human beta-globin gene cluster and is expressed in erythroid cells. **Genomics.** v.61(1), p.15-23, 1999;
- FERTRIN, K.Y.; MELO, M.B.; ASSIS, A.M. *et al.* UDP-glucuronosyltransferase 1 gene promoter polymorphism is associated with increased serum bilirubin levels and cholecystectomy in patients with sickle cell anemia. **Clin Genet.** v.64, n.2, p.160-2, 2003.
- FERTRIN, K.Y.; COSTA, F.F. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Rev Hematol.**, v.4, p. 443-58, 2010;
- FORGET BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Ann N Y Acad Sci.**, v.30, p.38-44, 1998;
- FORSBERG, E.C.; DOWNS, K.M.; CHRISTENSEN, H.M. *et al.* Developmentally dynamic histone acetylation pattern of a tissue-specific chromatin domain. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.97, n. 26, p.14494-9, 2000;
- FRENETTE, P.S.; ATWEH GF Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest.** v.117, n.4, p.850-8, 2007;
- FU, X.H.; LIU, D.P.; LIANG, C.C. Chromatin structure and transcriptional regulation of the beta-globin locus. **Exp Cell Res.**, v.278, n.1, p.1-11, 2002;
- GALANELLO, R.; ORIGA, R. Beta-thalassemia. **Orphanet J Rare Dis.** pP. 5:11, 2010;
- GALLIENNE, A.E.; DRÉAU, H.M.; MCCARTHY, J. *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification identification of 17 different beta-globin gene deletions (including four novel mutations) in the UK population. **Hemoglobin.** v.33, n.6, p.406-16, 2009;
- GARNER, C.; MITCHELL, J.; HATZIS. T. *et al.* Haplotype mapping of a major quantitative-trait locus for fetal hemoglobin production, on chromosome 6q23. **Am J Hum Genet.** v.62, n.6, p.1468-74, 1998;
- GARNER, C.P., TATU, T., BEST, S. *et al.* Evidence of genetic interaction between the beta-globin complex and chromosome 8q in the expression of fetal hemoglobin. **Am J Hum Genet.** v. 70, n.3, p.793-9, 2002;

- GILMAN, J. G.; HUISMAN, T. H. DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. **Blood**. v. 66, n. 4, p. 783-787, 1985;
- GONÇALVES, M.S.; NECHTMAN, J.F.; FIGUEIREDO, M.S. *et al* Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the beta s haplotypes. **Hum Hered**. v.6, p.322-7, 1994;
- GONÇALVES, M.S.; FAHEL, S.; FIGUEIREDO, M.S. *et al*. Molecular identification of hereditary persistence of fetal hemoglobin type 2 (HPFH type 2) in patients from Brazil. **Ann Hematol**. v.70, n.3, p.159-61, 1995
- GUMUCIO, D.L.; ROOD, K.L.; GRAY, T.A. *et al*. Nuclear proteins that bind the human gamma globin gene promoter: alterations in binding produced by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Mol Cell Biol**., v. 8, p. 5310-5322, 1988;
- HARTEVELD, C.L.; HIGGS, D.R. Alpha-thalassaemia. **Orphanet J Rare Dis**. p.5:13, 2010;
- HIGGS, D.R.; BUCKLE, V.; GIBBONS, R.; STEENSMA, D.: Unusual Types of Alpha Thalassaemia. *In Disorders of Hemoglobin* second edition. Cambridge University Press; 2009;
- JIANG J, BEST S, MENZEL S, SILVER N *et al*. cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults. **Blood**. v.108, n.3, p.1077-83, 2006;
- JOLY, P.; LACAN, C.; GARCIA, C. Identification and molecular characterization of four new large deletions in the  $\beta$  -globin gene cluster. **Blood Cells Mol Dis**. v.43, p.53-57, 2009;
- KATO, G. J.; MCGOWAN, V.; MACHADO, R. F. *et al*. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**. v. 15, n. 107, p. 2279-2285, 2006;
- KIEFER, C.M.; HOU, C.; LITTLE, J.A.; DEAN, A. Epigenetics of beta-globin gene regulation. **Mutat Res.**, v.1, n. 647, p. 68-76, 2008;
- KUTLAR, A.; GARDINER, M.B.; HEADLEE, M.G. *et al*. Heterogeneity in the molecular basis of three types of hereditary persistence of fetal hemoglobin and the relative synthesis of the G gamma and A gamma types of gamma chain. **Biochem Genet**. v.22, n.1-2, p.21-35, 1984;
- KOLLIAS G, HURST J, DEBOER E, GROSVELD F. The human beta-globin gene contains a downstream developmental specific enhancer. **Nucleic Acids Res.**, v.15, n.14, p.5739-47, 1987;
- KOSAKA, N.; SUGIURA, K.; YAMAMOTO, Y. *et al*. Identification of erythropoietin-induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation. **Br J Haematol**. v.142, n.2, p. 293-300, 2008;



LANCLOS, K. D.; ÖNER, C.; DIMOVSKI, A. J. *et al.* Sequence variations in the 5' flanking and IVS-II regions of the G  $\gamma$ - and A  $\gamma$  – globin genes of  $\beta$  S chromosomes with five different haplotypes. **Blood**. v. 77, p. 2488-2496, 1991

LAVELLE, D.E. The molecular mechanism of fetal hemoglobin reactivation. **Semin Hematol**. v.41, n.4, Suppl 6, p. 3-10. 2005;

LEE ST, YOO EH, KIM JY *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification screening of isolated increased HbF levels revealed three cases of novel rearrangements/deletions in the beta-globin gene cluster. **Br J Haematol**. v.148, n.1, p.154-60, 2010.

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

LITT, M.D.; SIMPSON, M.; GASZNER, M. *et al.* Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. **Science.**, v. 293, n.5539, p.2453-5, 2000;

LOOTS, G. G. Genomic identification of regulatory elements by evolutionary sequence comparison and functional analysis. **Adv Genet** , v.61, p.269-293, 2008.

LYRA, I.M.; GONÇALVES, M.S.; BRAGA, J.A. *et al.* Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Cad Saude Publica.**, v.4, p.1287-90, 2005;

MAKANI, J.; MENZEL, S.; NKYA, S. *et al.* Genetics of fetal hemoglobin in Tanzanian and British patients with sickle cell anemia. **Blood**. v.27, n.117(4), p.1390-2, 2010;

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol**.v.27, p.229-65, 2009;

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

MENZEL, S.; THEIN, S.L. Genetic architecture of hemoglobin F control. **Curr Opin Hematol**. v.16, n.3, p.179-186, 2009;

MUNCIE HL JR, CAMPBELL J. Alpha and beta thalassemia. **Am Fam Physician.**, v.80, n.4, p.339-44, 2009;

NAGEL, R. L.; FABRY, M. E. The many pathophysiologies of sickle cell anemia. **Am J Hematol**. v. 20, n. 2, p. 195-199, 1985;

NAGEL RL, RANNEY HM. Genetic epidemiology of structural mutations of the beta-globin gene. **Semin Hematol**. v.27, n.4, p.342-59, 1990;

NOFER, J.R.; KEHREL, B.; FOBKER, M. *et al.* HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. **Atherosclerosis**. v.161, n.1, p.1-16, 2002

NOORDERMEER, D.; DE LAAT, W. Joining the loops: beta-globin gene regulation. **IUBMB Life.**, v. 60, n.12, p.824-33, 2008;

OFORI-ACQUAH, S. F.; LALLOZ, M .R.; SERJEANT, G.; LAYTON, D. M. Dominant influence of gamma-globin promoter polymorphisms on fetal haemoglobin expression in sickle cell disease. **Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)**. v. 50, p. 35-42, 2004;

OLD JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. **Scand J Clin Lab Invest.**, v.67, n.1, p.71-86, 2007;

OLIVEIRA, G.L.V.; MENDIBURU, C.F.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Avaliação do perfil hematológico de portadores de talassemia alfa provenientes das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v.28, n.2, p.105-109, 2006;

OPARINDE, D.P.; OGHAGBON, E.K.; OKESINA, A.B. *et al.* Role of hepatic enzymes in the biochemical assessment of the severity of sickle cell anemia. **Trop Gastroenterol.**v.27, n.3, p.118-2, 2006;

OTTOLENGHI, S.; GLIGLIONI, B.; TARAMELLI, R. *et al.* Molecular comparison  $\delta\beta$ -Thalassemia and HPFH DNAs: Evidence of regulatory area? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.79, p. 2347-51, 1982;

PACE, B.S.; ZEIN, S. Understanding mechanisms of gamma-globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. **Dev Dyn.** v. 235, n. 7, p. 1727-1737, 2006;

PALIS J. Ontogeny of erythropoiesis. **Curr Opin Hematol.**, v.15, n.3, p.155-61, 2008;

PAULING, L.; ITANO, H.A. *et al.* Sickle cell anemia a molecular disease. **Science.** v.110, p.543-8, 1949;

PERUTZ, M.F.; ROSSMANN, M.G.; CULLIS, A.F. *et al.* Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. **Nature**, v.13, n.185 (4711), p. 416-22, 1960;

PISTIDDA, P.; FROGHERI, L.; OGGIANO, L. *et al.* Fetal hemoglobin expression in compound heterozygotes for -117 (G-->A)A gamma HPFH and beta zero 39 nonsense thalassemia. **Am J Hematol.** v.49, n.4, p.267-70, 1995;

PLATT, O.S.; BRAMBILLA, D.J.; ROSSE, W.F. *et al.* Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N Engl J Med.** v.330, n.23, p.1639-44, 1994

POWARS, D. R. Beta S-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.** v. 5, p. 475-493, 1991;

PRINSEN, B.H.; ROMIJN, J.A.; BISSCHOP, P.H. *et al.* Endogenous cholesterol synthesis is associated with VLDL-2 apoB-100 production in healthy humans. **J Lipid Res.** v.44, n.7, p.1341-8, 2003;

REITER, C.D.; WANG, X.; TANUS-SANTOS, J.E. *et al.* Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nat Med.** v.8, n.12, p.1383-9, 2002;

OLD JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. **Scand J Clin Lab Invest.**, v.67, n.1, p.71-86, 2007;

SANKARAN, V.G.; MENNE, T.F.; XU, J. *et al.* Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. **Science.** v.19, n.322, Suppl.5909, p.1839-42, 2008;

SANKARAN, V.G.; LETTRE, G.; ORKIN, S.H.; HIRSCHHORN, J.N. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of hemoglobin disorders. **Ann N Y Acad Sci.**, doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05821.x., 2010;

SCHÜBELER, D.; LORINCZ, M.C.; CIMBORA, D.M. *et al.* Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation. **Mol Cell Biol.**, v. 20, n.24, p.9103-12, 2000;

SEBASTIANI, P.; TIMOFEEV, N.; DWORKIS, D.A. *et al.* Genome-wide association studies and the genetic dissection of complex traits. **Am J Hematol.** v.84, n.8, p.504-15, 2008;

SEDGEWICK, A .E.; TIMOFEEV, N.; SEBASTIANI, P. *et al.* H. BCL11A is a major HbF quantitative trait locus in three different populations with beta-hemoglobinopathies. **Blood Cells Mol Dis.** v. 41, n. 3, p. 255-258, 2008;

SHERVA, R.; MA, Q.; ABEL, K *et al.* Genetic modifiers of HbE/ $\beta$ - thalassemia identified by a two-stage genome-wide association study. **BMC Med Genet**

SOLOVIEFF, N.; MILTON, J.N.; HARTLEY, S.W. *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5' olfactory receptor gene cluster. **Blood.** v.4, n.115(9), p. 1815-22, 2010;

SONATI, M.F.; FARAH, S.B.; RAMALHO, A.S.; COSTA, F.F. High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil. **Hemoglobin.** v.15, n.4:309-11, 1991;

SONATI, F.; COSTA, F.F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **Jornal de Pediatria,** v.84, n.4, 60-68, 2008;

STAMATOYANNOPOULOS, G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. **Exp Hematol.**, v.33, n.3, p.259-71, 2005;

STEINBERG, M.H.; EMBURY, S.H Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **Blood.** v.68, n.5, p. 985-90, 1986;

STEINBERG, M.H. Modulation of fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Hemoglobin.** v.25, n.2, p.195-211, 2001;

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol.** v. 129, n. 4, p. 465-481, 2005;

STEINBERG, M.H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **ScientificWorldJournal**. v.25, n.8, p.1295-324, 2008;

STEINBERG, M.H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **ScientificWorldJournal**. v.18, n.9, p.46-67, 2009;

STEINBERG, M.H. Disorders of hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management. 2a. ed., 2009;

STUART, M.J.; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. **Lancet**. v.364, n.9442, p.1343-60, 2004;

TAYLOR, J. G. 6TH; TANG, D. C.; SAVAGE, S. A.; LEITMAN, S. F.; HELLER, S. I.; SERJEANT, G. R.; RODGERS, G. P.; CHANOCK, S. J. Variants in the VCAM1 gene and risk for symptomatic stroke in sickle cell disease. **Blood**. v. 100, n. 13, p. 4303-4309, 2002;

TAKAHASHI, T.; SCHREIBER, R.; KRIEGER, J.E. *et al.* Analysis of the mechanism of action of the Brazilian type (Agamma-195 C --> G) of hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Eur J Haematol**. v.71, n.6, p.418-24, 2003;

TESTA, U. Fetal hemoglobin chemical inducers for treatment of hemoglobinopathies. **Ann Hematol.**, v.88, n.6, p.505-28, 2009;

THEIN, S.L.; CRAIG, J.E. Genetics of Hb F/F cell variance in adults and heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Hemoglobin**. v.22, n.5, p.401-14, 1998;

THEIN, S.L.; MENZEL, S.; LATHROP, M. *et al.* Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. **Hum Mol Genet**. v.15, n.18, p.216-23, 2007;

THEIN, S.L.; MENZEL, S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. **Br J Haematol**. v.145, n.4, p.455-67, 2009;

TRENT, R.J. Diagnosis of the haemoglobinopathies. **Clin Biochem Rev**. v. 27, n.1, p.27-38, 2006;

VEKILOV, P.G. Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? **Br J Haematol**. v.139, n.2, p.173-84, 2007;

ZORCA, S.; FREEMAN, L.; HILDESHEIM, M.; ALLEN, D. *et al.* Lipid levels in sickle-cell disease associated with haemolytic severity, vascular dysfunction and pulmonary hypertension. **Br J Haematol**. v.149, n.3, p.436-45, 2010;

YIN, W.; BARKESS, G.; FANG, X. *et al.* Histone acetylation at the human beta-globin locus changes with developmental age. **Blood**., v.110, n.12, p. 4101-7, 2007;

WALTER, P.B.; FUNG, E.B.; KILLILEA, D.W. *et al.* Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. **Br J Haematol.** v.135, n.2, p.254-63, 2006

WATSON J. A study of sickling of young erythrocytes in sickle cell anemia. **Blood.** v.4, p.465-9, 1948;

WEATHERALL, D.J.; PROVAN, A.B. Red cells In: inherited anaemias. **Lancet.** v. 355, p. 1169-1175, 2000;

WINICHAGOON, P.; FUCHAROEN, S.; THOGLAIROAN, V.; WASI, P.; Thay Gy ( $A\gamma\delta\beta$ )<sup>o</sup> thalassemia and its interaction with a single g-globin gene on a chromosome carryng  $\beta$ <sup>o</sup> thalassemia. **Hemoglobin.** v.14, p. 185-97, 1990;

WYSZYNSKI, DF; BALDWIN, CT; CLEVES MA *et al.* Polymorphisms near a chromosome 6q QTL area are associated with modulation of fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)** v. 50, n.1, p. 23-33, 2004;

ZHENG, W.; LIU, Y.; CHEN, D. *et al.* Complex interaction of Hb Q-Thailand and Hb E with alpha(0)-thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin in a Chinese family. **Ann Hematol.** 2010 v.89, n.9, p.883-8, 2010;

ZHOU, D.; LIU, K; SUN, C.W. *et al.* KLF1 regulates *BCL11A* expression and gamma- to beta-globin gene switching. **Nat Genet.**, v. 42, n.9, p. 742-4, 2010;

## ***9. ANEXOS***

## **9. ANEXOS**

### **ANEXO I**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

##### **PARA MENORES DE 18 ANOS**

Você está sendo convidado a consentir com a participação do menor, uma vez que é seu representante legal, no estudo chamado: “Avaliação de marcadores associados à síntese de hemoglobina fetal em indivíduos com anemia falciforme e persistência hereditária de hemoglobina fetal”, que será realizado no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ-BA.

A sua participação é totalmente voluntária e a sua permissão para participar do estudo pode ser retirada a qualquer momento, não resultando em punições.

O objetivo deste trabalho é investigar o conteúdo genético de indivíduos com anemia falciforme, doença genética decorrente da presença de uma hemoglobina anormal, denominada de S, que possuem concentração elevada de hemoglobina fetal e de indivíduos com perfil sugestivo de PHHF, uma alteração onde a hemoglobina fetal, que possui uma maior quantidade na vida uterina, continua a ser produzida, sendo considerada como um fator que diminui a sintomatologia clínica apresentada por indivíduos com alterações herdadas na hemoglobina, que é um constituinte do sangue responsável pela distribuição do oxigênio no nosso organismo. Também serão realizadas análises bioquímicas e hematológicas, visando identificar marcadores de prognóstico, principalmente quando encontrada juntamente com a anemia falciforme.

Tendo em vista os motivos apresentados, estamos convidando-o a participar na presente pesquisa. Os registros da participação do menor no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento apenas da equipe participante do projeto e do médico que o acompanha. As amostras coletadas serão identificadas por código, bem como os dados individuais dos exames e testes e de prontuário, que serão do conhecimento somente dos pesquisadores envolvidos na pesquisa. Desta forma, a identidade do menor será mantida em

segredo e nenhum outro grupo terá acesso às informações coletadas, tais como seguradoras, empregadores ou superiores, de acordo com a resolução CNS 340/2004, item V.1.e.

A sua anuência sobre a participação do menor no estudo implica na permissão para a retirada de 5 mL de sangue, quantidade igual a uma colher de sopa cheia, para que possamos realizar as dosagens e o estudo do DNA. Também queremos que você concorde ou não que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em estudos futuros, desde que estes estudos adicionais sejam analisados por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde, além de contribuir para conhecimentos novos relacionados à doença.

Comunicamos que o sangue será colhido do braço e poderá acarretar em riscos e desconfortos, como formação de hematomas, sangramento e dor. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoal habilitado e especializado, com experiência na coleta de sangue em crianças, visando diminuir estes riscos. A realização de coletas adicionais dependerá do médico e estará relacionada, simplesmente, ao acompanhamento clínico do menor e a sua avaliação periódica.

A participação do menor no estudo trará o benefício imediato relacionado a dosagens bioquímicas e hematológicas, que serão disponibilizadas no prontuário médico. Além disso, poderá trazer benefícios futuros no que se refere à identificação de marcadores que possam acrescentar informações referentes à PHHF e à doença falciforme, obtendo dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento de pacientes com a doença e na implantação de políticas de saúde.

Caso consinta com a participação do menor no estudo e diante da sua concordância, você deverá assinar uma cópia do presente termo.

Você teve todas as explicações sobre o projeto e receberá uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido.

Esse estudo será desenvolvido na FIOCRUZ e HEMOBA, Instituições públicas brasileiras

Assinatura do responsável \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_



Nome do responsável (letra de forma) \_\_\_\_\_



Endereço \_\_\_\_\_

Testemunha 1 \_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_

Testemunha 2 \_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos:

Dr<sup>a</sup> Marilda de Souza Gonçalves - Coordenadora do projeto - Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2226.

Nadja de Jesus Gonçalves dos Santos - Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2265.

Marcelo Ramos- Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos- Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz- FIOCRUZ-BA. Fone (71) 3176-2285.

## **ANEXO II**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

#### **PARA MAIORES DE 18 ANOS**

Você está sendo convidado a participar do estudo chamado: “Avaliação de marcadores associados à síntese de hemoglobina fetal em indivíduos com anemia falciforme e persistência hereditária de hemoglobina fetal”, que será realizado no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ-BA.

A sua participação é totalmente voluntária e a sua permissão para participar do estudo pode ser retirada a qualquer momento, não resultando em punições.

O objetivo deste trabalho é investigar o conteúdo genético de indivíduos com anemia falciforme, doença genética decorrente da presença de uma hemoglobina anormal, denominada de S, que possuem concentração elevada de hemoglobina fetal e de indivíduos com perfil sugestivo de PHHF, uma alteração onde a hemoglobina fetal, que possui uma maior quantidade na vida uterina, continua a ser produzida, sendo considerada como um fator que diminui a sintomatologia clínica apresentada por indivíduos com alterações herdadas na hemoglobina, que é um constituinte do sangue responsável pela distribuição do oxigênio no nosso organismo. Também serão realizadas análises bioquímicas e hematológicas, visando identificar marcadores de prognóstico, principalmente quando encontrada juntamente com a anemia falciforme. Tendo em vista os motivos apresentados, estamos convidando-o a participar na presente pesquisa.

Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento apenas da equipe participante do projeto e do médico que o acompanha. As amostras coletadas serão identificadas por código, bem como os dados individuais dos exames e testes e de prontuário, que serão do conhecimento somente dos pesquisadores envolvidos na pesquisa. Desta forma, a sua identidade será mantida em segredo e nenhum outro grupo terá acesso às informações coletadas, tais como seguradoras, empregadores ou superiores, de acordo com a resolução CNS 340/2004, item V.1.e.

A sua anuência sobre a participação no estudo implica na permissão para a retirada de 5 mL de sangue, quantidade igual a uma colher de sopa cheia, para que possamos realizar as dosagens e o estudo do DNA. Também queremos que você concorde ou não que as amostras

colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em estudos futuros, desde que estes estudos adicionais sejam analisados por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde, além de contribuir para conhecimentos novos relacionados à doença.

Comunicamos que o sangue será colhido do braço e poderá acarretar em riscos e desconfortos, como formação de hematomas, sangramento e dor. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoal habilitado e especializado, com experiência na coleta de sangue em crianças, visando diminuir estes riscos. A realização de coletas adicionais dependerá do seu médico e estará relacionada, simplesmente, ao seu acompanhamento clínico e a sua avaliação periódica.

A sua participação no estudo trará o benefício imediato relacionado a dosagens bioquímicas e hematológicas, que serão disponibilizadas no prontuário médico. Além disso, poderá trazer benefícios futuros no que se refere à identificação de marcadores que possam acrescentar informações referentes à PHHF e à anemia falciforme, obtendo dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento de pacientes com a doença e na implantação de políticas de saúde.

Caso consinta participar do estudo e diante da sua concordância, você deverá assinar uma cópia do presente termo.

Você teve todas as explicações sobre o projeto e receberá uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido.

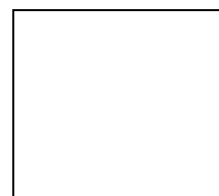
Esse estudo será desenvolvido na FIOCRUZ e HEMOBA, Instituições públicas brasileiras

Assinatura \_\_\_\_\_

Data

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_



Nome (letra de forma) \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

Testemunha 1 \_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_

Testemunha 2 \_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos:

Dr<sup>a</sup> Marilda de Souza Gonçalves - Coordenadora do projeto - Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2226.

Nadja de Jesus Gonçalves dos Santos - Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2265.

Marcelo Ramos- Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos- Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz- FIOCRUZ-BA. Fone (71) 3176-2285.

## **ANEXO III**

## ANEXO IV



### Avaliação de marcadores associados à síntese de hemoglobina fetal em indivíduos com anemia falciforme e persistência hereditária de hemoglobina fetal



#### Questionário Epidemiológico

Nome: {NOME} \_\_\_\_\_ Sigla: {sig} \_\_\_\_\_ Telefone: ( ) \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Registro: {REG} \_\_\_\_\_ Nº Pront. HEMOBA: {PRON} \_\_\_\_\_ Data de Nasc.: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Idade: {I} \_\_\_\_\_ Gênero: {GENER} ( ) Masculino [0] ( ) Feminino [1]

01. Qual a sua cor? {cor} ( ) Branca[0] ( ) Negra[1] ( ) Parda[2] ( ) Amarela[3] ( ) Indígena[4]
02. Você estuda? {EST} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
03. Nível de escolaridade: {NESC} ( ) Alfabetiz.[0] ( ) Até 4 FM[1] ( ) Até 8 FM[2] ( ) Até 3 MD[3]  
( ) Técnico [4] ( ) Superior incompleto [5] ( ) Superior completo [6]
04. Número de irmãos: {NIRM} ( ) 0 [0] ( ) 1 [1] ( ) 2 [2] ( ) 3 [3] ( ) 4 ou + [4]
05. Familiares com DF? {FDFALC} ( ) Nenhum[0] ( ) Pai [1] ( ) Mãe [2] ( ) Irmão [3]
06. Idade primeira menstruação: {IPM} ( ) Não menst.[0] ( ) 09-11[1] ( ) 12-14 [2] ( ) 15-17 [3]
07. Já engravidou? {ENGRA} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
08. Está grávida? {GRA} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
09. Usa anticoncepcional? {ANTICO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
10. Menstruação é regular? {MREG} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
11. 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]
12. Eletroforese de Hb {EHB} ( ) AA[0] ( ) SS[1] ( ) SC[2] ( ) SB+[3] ( ) SB<sub>0</sub>[4]  
( ) SD[5]
13. Haplótipo {HAPL} ( ) Sen[0] ( ) Car[1] ( ) Ben[2] ( ) Cam[3] ( ) Sau-Ara [4]  
( ) Atip[5] ( ) I[6] ( ) II[7] ( ) III[8]
14. Talassemia {TAL} ( ) Negativo[0] ( ) Hetero 3.7[1] ( ) Homo 3.7[2]  
( ) Hetero 4.2[3] ( ) Homo 4.2[4]
15. 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]
16. 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}

17. 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} \_\_\_\_\_

18. 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]

19. Já teve AVC? {AVC} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Se SIM, quantas vezes? {QAVC} ( ) 1 [0] ( ) 2 [1] ( ) 3 [2] ( ) 4 ou + [3]

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]

20. Espletomizado? {ESPECTO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Esplenectomia: {TIPOESPECTO} ( ) Total [0] ( ) Parcial [1]

21. 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} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

22. Tem crises de dor? {CRISDOR} ( ) NÃO [0] ( ) 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? {ULTRISDOR} ( ) <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 hidroxiuréia? {HIDROXI} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

23. Faz uso de alguma medicação? {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]

24. Vaso-Oclusão: {VO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1] Quantas vezes? {QVO} \_\_\_\_\_

Fez uso de alguma medicação? {MVO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

25. Retinopatia: {RETIN} ( ) NÃO [1] ( ) SIM [2]

Se SIM, fez uso de alguma medicação? {MRETIN} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Faz consultas periódicas com oftalmo? {CONSOFTAL} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

26. Infecções: {INFEC} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]





Tipo de profissão: {QTRAB} \_\_\_\_\_

Se SIM, manipula alguma substância química? {SUBQUIM}      ( ) NÃO [0]      ( ) SIM [1]

Qual? {QSUBQUIM} \_\_\_\_\_      Frequência ? {FREQSUBQUI} \_\_\_\_\_

Manipula diretamente esta subst? {MANIDIRE}      ( ) NÃO [0]      ( ) SIM [1]

44. Pratica esportes? {ESPOR}      ( ) NÃO [0]      ( ) SIM [1]

45. Faz uso de bebida alcoólica? {BEBE}      ( ) NÃO [0]      ( ) SIM [1]

Se SIM, que frequência? {FREQBEBE} \_\_\_\_\_

46. Você fuma? {FUMA}      ( ) NÃO [0]      ( ) SIM [1]

Se SIM, que frequência? {FREQFUMA} \_\_\_\_\_

47. Faz uso de alguma droga? {DROGA}      ( ) NÃO [0]      ( ) SIM [1]

Em caso de SIM, que frequência? {FREQDROGA} \_\_\_\_\_

48. Nome do pai: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Nome irmã(o): \_\_\_\_\_

50. Local de atendimento: \_\_\_\_\_