



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Jéssika Viviani Okumura

Perfil fenotípico de gravidade na doença falciforme: interação gênica e/ou características intrínsecas da manifestação clínica?

Jéssika Viviani Okumura

Perfil fenotípico de gravidade na doença falciforme: interação gênica e/ou características intrínsecas da manifestação clínica?

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, área de concentração Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto-SP.

Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

Okumura, Jéssika Viviani.

Perfil fenotípico de gravidade na doença falciforme : interação gênica e/ou características intrínsecas da manifestação clínica? / Jéssika Viviani Okumura. -- São José do Rio Preto, 2017

176 : il., tabs.

Orientador: Claudia Regina Bonini Domingos

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética molecular humana. 2. Anemia falciforme - Aspectos genéticos. 3. Polimorfismo (Genética) 4. Arteriopatias oclusivas. 5. Marcadores genéticos. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
II. Título.

CDU – 575.1

Jéssika Viviani Okumura

Perfil fenotípico de gravidade na doença falciforme: interação gênica e/ou características intrínsecas da manifestação clínica?

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, área de concentração Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto-SP.

Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Ana Elizabete Silva
UNESP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza
FAMERP – São José do Rio Preto

Dra. Joice Matos Biselli Périco
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Octávio Ricci Júnior
FAMERP e HEMOCENTRO – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto – SP
23 de fevereiro de 2017

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro da FAPERP, apoio do HEMORIO e bolsa de estudo CAPES.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ailton e Jovilhana por sempre me apoiarem e por estarem ao meu lado em todos os momentos. Dedico à minhas irmãs, Gisella e Karina por serem minhas confidentes, amigas e os anjos na minha vida, em especial à Karina que estará eternamente em meu coração. Dedico ao meu noivo Matheus pela compreensão, companheirismo e respeito durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter me proporcionado conhecer e conviver com pessoas maravilhosas durante todos estes anos de graduação e pós-graduação.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos**, por ter me acolhido com muito amor e carinho em seu grupo de alunos sem nem me conhecer direito. Por ter confiado em mim desde o início, pelos maravilhosos ensinamentos tanto na vida profissional, quanto na pessoal. Obrigada pelas inúmeras oportunidades que me ofereceu, pelos caminhos que abriu para eu trilhar e pela confiança que sempre depositou em mim. Sou muito grata por tudo.

Ao meu amigo, **Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva (Kexu)**, por me aguentar desde os tempos da UFMS; por ter me guiado desde a iniciação científica, passando pelo mestrado e agora no doutorado; por ser essa pessoa maravilhosa que sempre está pronta para ajudar os amigos; por ser essa pessoa inteligente que sempre encontra uma saída no fim do túnel das pesquisas; por ser guerreiro, batalhador e o principal de tudo, por estar sempre de bem com a vida. Sou sua fã.

À minha amiga, **Dra. Lidiane de Souza Torres (Lidi)**, pela amizade que construímos durante estes anos, pela troca de experiências, pelas conversas sobre assuntos profissionais e não profissionais, pelo companheirismo no laboratório e nas idas à academia, por ser dedicada, organizada sendo um espelho para eu seguir. Obrigada pelos ensinamentos sobre estatística! Você é brilhante!!!

À minha amiga, **Ma. Nathalia Rossigalli Alves (Mini)**, pela amizade sincera durante todos estes anos, e mesmo não trabalhando na mesma área, pela troca de conhecimentos (obs: suas perguntas são demais, queimam os miolos). Obrigada pelas altas risadas, por ser engraçadíssima sem perceber, por ser minha confidente ... Você é demais.

Ao meu amigo **Dr. Edis Belini Junior**, pelos inúmeros ensinamentos, pelas inúmeras dúvidas esclarecidas, por me auxiliar e me ensinar a se portar no HEMORIO, por ser divertido, por resolver os problemas que sempre apareciam, e por continuar resolvendo mesmo de longe. Obrigada chefinho!!!

Aos meus amigos de laboratório (LHGDH) **Tiago, Gisele, Larissa, Vinícius (Pei), Willian, Renan, Isabela, Luis Felipe (Coxinha), Vanessa (Urbis), Vanessa (Japa), Jéssica, Bárbara**, os quais já terminaram as atividades que realizavam no lab, mas que são eternos e sempre lembrados por todos, principalmente por mim. Foram altas aventuras em congressos e confraternizações, melhores horários de almoço em família, as melhores conversas e risadas. Sinto muita saudade de todos.

Aos amigos que continuam conosco **Paty, Mariana, Gabi, Camila**, pelo companheirismo na salinha dos pós-graduandos, pelas conversas trocadas, pelas risadas e por serem alto astral. À **Nayara, Letícia (Japa) e Izabella** por serem dedicadas, organizadas e pela ajuda nas atividades do lab.

Aos meus amigos de graduação **Regiane, Bianca, Andréia, José Guilherme e Isabela**, que foram e são como meus irmãos. Obrigada por sempre estarem ao meu lado até nas horas mais difíceis, mesmo estando longe. Obrigada pela amizade verdadeira, sincera e que vou levar por toda a minha vida.

Aos amigos do **CDA Laboratórios** prlos ensinamentos e aprendizados nos últimos dois anos, em especial ao **Leandro** pela amizade.

À minha família de São José do Rio Preto **Tio Toshi, Tia Sandra, Tia Tieko, Tia Helena, Tia Kinthan e Batian (in memoriam)** que me acolheram desde o mestrado, vibrando comigo a cada conquista e por torcer pela minha vitória. Agradeço principalmente a tia **Mitia (in memoriam)**, por ter cuidado de mim como uma filha. Serei grata eternamente.

*Aos meus avós paternos **Yukio e Mioko** e maternos **João e Aparecida**, por todo o ensinamento de vida. Ao meus tios e primos paternos (**Shigueo, Zizi, Sueli, Vanderlei, Shoite, Heid, Mara, Silvia, Fião, Amanda, Andressa, Adriano, Bruna, Brenda, Beatriz, Lohanna, Ricardo, Mirela, Thiago e Enzo**) e maternos (**Meire, Valdir, Mara, Edinaldo, Job, Celinha, Matheus, Elder, Érica, João e Júlia**) por sempre torcerem por mim. Aos meus afilhados **Maria Eduarda e Gustavo**, por serem muito especiais em minha vida.*

Aos professores que passaram por minha vida e que a marcaram para sempre. Meu muito obrigado pelos ensinamentos. Certamente estou onde estou por ter me espelhado em muitos de vocês.

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de doutorado concedida e à **Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto (FAPERP)** pelo auxílio à pesquisa (processo nº 147/2014).*

Obrigada do fundo do meu coração à todas estas pessoas que fizeram parte da minha vida nesses últimos anos. Foram anos de aprendizagem, de crescimento pessoal e profissional, de experiências que sempre levarei comigo. É um sentimento de orgulho que não cabe em meu peito. Meu muito obrigada a todos.

Ah! Se Deus me ouvisse e mandasse pra mim
Aquele que eu amo e um dia partiu
Deixando a tristeza junto de mim
Ah! Voltaria pra mim toda a felicidade
Sairia do peito a dor da saudade
Renascia uma vida a caminho do fim

Ah! Eu lhe peço senhor
Ah! Traz de volta este amor
Senhor está perto o meu fim
Eu lhe peço meu Deus
Tenha pena de mim

(Música “Se Deus me ouvisse”, Compositor: Almir Rogério)

“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Os indivíduos com Doença Falciforme (DF) apresentam manifestações clínicas variáveis que podem ser decorrentes de fatores genéticos e ambientais. O presente trabalho teve como objetivo investigar se os marcadores genéticos relacionados à vasoatividade e coagulação modulam a gravidade clínica em pessoas com DF em quatro faixas etárias. Para isso, dois grupos longitudinais foram formados, o prospectivo, que avaliou 59 crianças com DF nascidas no período de maio de 2012 a dezembro de 2013, e o retrospectivo, que avaliou 392 pessoas com DF no ano de 2011. Estes dois grupos foram divididos em quatro subgrupos de estudo, de acordo com a faixa etária, em: Crianças I (de 0 a 4 anos de idade, N=59), Crianças II (de 5 a 10 anos, N=53), Adolescentes (11 a 19 anos, N=127) e Adultos (acima de 20 anos de idade, N=212). Todos os indivíduos foram genotipados para a DF, para os haplótipos da globina beta-S, e para os polimorfismos genéticos nos genes da cistationina beta-sintase (*CBS*, 844ins68), enzima conversora de angiotensina I (*ECA1*, I/D 287 pb), enzima conversora de angiotensina II (*ECA2*, A1075G), inibidor do ativador do plasminogênio tipo I (*PAII*, -675pb 4G/5G) e adenosina deaminase (*ADA*, G22A). A classificação do perfil fenotípico de gravidade do subgrupo Crianças I foi realizado pelo hematologista do HEMORIO (RJ), e dos subgrupos Crianças II, Adolescentes e Adultos pela calculadora *online* “Sickle Cell Disease Severity Calculator”. Com excessão do genótipo SC que foi mais frequente no subgrupo Crianças I, as frequências genotípicas e alélicas para os marcadores genéticos avaliados não diferiram entre os quatro subgrupos amostrais, porém foi verificada elevada frequência de: genótipo SS (anemia falciforme - AF), haplótipo Bantu, alelo Ins- para a *CBS*, alelo 5G para o *PAII*, alelo D para *ECA1*, alelo G para *ECA2* e o alelo G para *ADA*. Quanto aos perfis fenotípicos de gravidade clínica, no subgrupo Crianças I, Crianças II e Adolescentes, as formas leve e moderado se destacaram. No subgrupo Adultos, perfis moderado e grave estiveram presentes em aproximadamente 90% dos indivíduos. Na avaliação dos marcadores genéticos como interferentes na gravidade clínica dos indivíduos, foi verificado para o grupo prospectivo que o genótipo SS contribui com aproximadamente 22 vezes mais risco de ocorrência de clínica moderada e grave. Quando avaliados somente os indivíduos com AF do grupo prospectivo, o genótipo GG para o polimorfismo A1075G da *ECA2* apresentou efeito protetor, por diminuir a ocorrência das manifestações moderadas e graves. Para o grupo retrospectivo, a presença do genótipo SS aumentou a chance de ocorrência de clínica moderada e grave em aproximadamente oito vezes e só grave um aumento de quatro vezes.

Com esses resultados foi possível concluir que o genótipo SS interfere diretamente na gravidade clínica dos indivíduos com DF, e o genótipo GG do gene *ECA2*, apresentou efeito protetor contra perfis moderado e grave nas crianças com AF.

Palavras-chave: vaso-oclusão, polimorfismos genéticos, gravidade clínica, doença falciforme.

ABSTRACT

Sickle Cell Disease (SCD) is characterized to several clinical manifestations that vary among subjects and this clinical diversified can be caused by genetic and environmental factors. The study aim was to investigate whether genetic markers related to vaso-activity modulate clinical severity in SCD people in four age groups. Then, two longitudinal groups were formed: the prospective groups that evaluated 59 SCD children born in May 2012 to December 2013, and the retrospective group that evaluated 392 people with SCD in 2011. These groups were separated in four study subgroups according to age in: Children I (of 0 at 4 years-old, N=59), Children II (of 5 at 10 years-old, N=53), Adolescents (of 11 at 19 years-old, N=127) and Adults (above of 20 years-old, N=212). All the subjects were genotyped SCD presence, beta-S haplotypes and genetics polymorphisms in cystathionine beta-synthase (*CBS*, 844ins68), angiotensin converting enzyme I (*ACE1*, I/D 287 pb), angiotensin converting enzyme II (*ACE2*, A1075G), plasminogen-activator inhibitor type 1 (*PAII*, -675pb 4G/5G) and adenosine deaminase (*ADA*, G22A) genes. The clinical severity profile classification of Children I subgroup was accomplished by Hematologist of HEMORIO, and to Children II, Adolescents and Adults subgroups was used the software online named "Sickle Cell Disease Severity Calculator". Except for the SC genotype that was more frequent in the Children I subgroup, the genotypic and allelic frequencies for the genetic markers evaluated did not differ between the four sample subgroups, but was verified high frequency of SS genotype (Sickle Cell Anemia - SCA), Bantu haplotype, Ins-allele to *CBS* gene, 5G allele to *PAII* gene, D allele to *ECA1* gene, G allele to *ECA2* gene and G allele to *ADA* gene. Regarding to clinical severity profile in the Children I, Children II and Adolescents subgroups, the severity more frequent were light and moderate, and the Adults subgroup the moderate and severe classification were present in approximately 90% of subjects. In the evaluation of genetic markers as interfering in the clinical severity of subjects, was verifield to prospective group that the SS genotype contributes with approximately 22 times more the risk of moderate and severe clinical. When evaluated just the SCA patients of the prospective group, the GG genotype to A1075G of *ECA2* polymorphism, presented a protective effect by reducing the occurrence of moderate and severe clinical. For the retrospective group, the presence of SS genotype increased the occurrence chance the moderate and severe clinical in approximately eight times, and, just severe clinical the presence of SS genotype increased the occurrence chance to four times. These results showed that the SS genotype directly interferes in the

clinical severity of SCD individuals, and the GG genotype of the *ECA2* gene had a protective effect against moderate and severe profiles in children with SCA.

Key-words: vaso-occlusion, genetics polymorphisms, clinical severity, sickle cell disease

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos processos fisiopatológicos na anemia falciforme.....	27
Figura 2. Reações de Fenton e Haber-Weiss	28
Figura 3. Localização geográfica de origem dos haplótipos da globina beta-S.....	32
Figura 4. Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona.....	35
Figura 5. Ação da Enzima Conversora de Angiotensina I e II.....	35
Figura 6. Metabolismo das purinas.....	37
Figura 7. Metabolismo da homocisteína.....	39
Figura 8. Processo de fibrinólise.....	39
Figura 9. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para HbS.....	55
Figura 10. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para HbC.....	56
Figura 11. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para HbD.....	58
Figura 12. Representação esquemática do resultado da PCR-AE para as mutações de beta-talassemia.....	60
Figura 13. Representação esquemática dos sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S	61
Figura 14. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para os sítios polimórficos de haplótipo avaliados.....	63
Figura 15. Representação esquemática da PCR para <i>CBS</i>	65
Figura 16. Representação esquemática da primeira PCR para <i>ECA1</i>	66
Figura 17. Representação esquemática da segunda PCR para <i>ECA1</i>	67
Figura 18. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para <i>ECA2</i>	69
Figura 19. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para <i>ADA</i>	70
Figura 20. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para <i>PAII</i>	72
Figura 21. Comparação entre as frequências dos genótipos SS e SC nos subgrupos amostrais avaliados.....	81

Figura 22. Frequência genotípica dos haplótipos da globina beta-S	82
Figura 23. Análise de sobrevida das crianças do subgrupo Crianças I.....	92
Figura 24. Frequência das manifestações clínicas com diferença estatística significativa entre os subgrupos do estudo retrospectivo.....	96
Figura 25. Comparação da gravidade clínica entre os subgrupos amostrais.....	98
Figura 26. Curva de sobrevida do grupo de estudo retrospectivo.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Itens para classificação segundo índice de gravidade.....	47
Tabela 2. Protocolo de amplificação para a PCR de Hb S.....	54
Tabela 3. Protocolo de digestão para a RFLP de Hb S.....	54
Tabela 4. Protocolo de amplificação para a PCR de Hb C.....	55
Tabela 5. Protocolo de digestão para a RFLP de Hb C.....	56
Tabela 6. Protocolo de amplificação para a PCR de Hb D.....	57
Tabela 7. Protocolo de digestão para a RFLP de Hb D.....	57
Tabela 8. Protocolo de amplificação para o alelo selvagem da PCR-AE das mutações de beta-talassemia.....	59
Tabela 9. Protocolo de amplificação para o alelo mutante da PCR-AE das mutações de beta-talassemia.....	59
Tabela 10. Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da beta-talassemia	60
Tabela 11. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de regiões da família β	61
Tabela 12. Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família da globina β	62
Tabela 13. Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família da globina β	62
Tabela 14. Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.....	63
Tabela 15. Protocolo de amplificação para <i>CBS</i> por PCR.....	64
Tabela 16. Protocolo da primeira amplificação para <i>ECA1</i> por PCR.....	65
Tabela 17. Protocolo da segunda amplificação para <i>ECA1</i> por PCR.....	66
Tabela 18. Protocolo da amplificação para <i>ECA2</i> por PCR.....	67
Tabela 19. Protocolo de digestão para a RFLP de <i>ECA2</i>	68
Tabela 20. Protocolo de amplificação para a PCR-HotStart de <i>ADA</i> : mix 1.....	69
Tabela 21. Protocolo de amplificação para a PCR-HotStart de <i>ADA</i> : mix 2.....	70
Tabela 22. Protocolo de amplificação para a PCR-RFLP de <i>PAII</i>	71
Tabela 23. Especificações da investigação molecular para as hemoglobinopatias.....	73
Tabela 24. Especificações da investigação molecular para os sítios polimórficos que caracterizam os haplótipos da globina beta.....	75

Tabela 25. Especificações para a investigação molecular dos polimorfismos genéticos envolvidos na vaso-oclusão.....	76
Tabela 26. Frequência genotípica de DF entre os subgrupos amostrais.....	80
Tabela 27. Frequência genotípica dos haplótipos da globina beta-S.....	82
Tabela 28. Frequência alélica dos haplótipos da globina beta-S no grupo de estudo.....	83
Tabela 29. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo 844ins68 no gene <i>CBS</i>	84
Tabela 30. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo -675pb 4G/5G do gene <i>PAII</i> ...84	84
Tabela 31. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo I/D 287pb do gene <i>ECA1</i>	85
Tabela 32. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo A1075G no gene <i>ECA2</i>	86
Tabela 33. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo G22A no gene <i>ADA</i>	86
Tabela 34. Ocorrência de manifestações clínicas nos DF do grupo de estudo prospectivo (Crianças I).....	89
Tabela 35. Perfil de gravidade clínico do subgrupo Crianças I de acordo com as metodologias de classificação.....	90
Tabela 36. Perfil de gravidade clínica do subgrupo Crianças I.....	91
Tabela 37. Informações genotípicas das crianças que evoluíram para óbito do subgrupo Crianças I.....	92
Tabela 38. Ocorrência de manifestações clínicas nos DF do grupo de estudo retrospectivo..	94
Tabela 39. Comparação das ocorrências das manifestações clínicas entre os subgrupos amostrais.....	95
Tabela 40. Classificação do perfil fenotípico dos indivíduos do grupo de estudo retrospectivo.....	97
Tabela 41. Comparação entre o perfil fenotípico nos quatro subgrupos amostrais.....	97
Tabela 42. Características genéticas do grupo de adultos com idade acima de 60 anos.....	98
Tabela 43. Informações genotípicas e clínicas dos óbitos nos subgrupos Adolescentes e Adultos.....	101
Tabela 44. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo prospectivo).....	103
Tabela 45. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo prospectivo).....	104
Tabela 46. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo prospectivo).....	104
Tabela 47. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo prospectivo).....	105

Tabela 48. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo prospectivo).....	106
Tabela 49. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo prospectivo).....	106
Tabela 50. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo prospectivo).....	107
Tabela 51. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo prospectivo).....	107
Tabela 52. Comparação do uso de HU em relação a gravidade clínica.....	108
Tabela 53. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo retrospectivo).....	109
Tabela 54. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo retrospectivo).....	109
Tabela 55. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo retrospectivo).....	110
Tabela 56. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo retrospectivo).....	110
Tabela 57. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo retrospectivo).....	111
Tabela 58. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo retrospectivo).....	111
Tabela 59. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo retrospectivo).....	112
Tabela 60. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo retrospectivo).....	112
Tabela 61. Resultado do teste GLM realizado nos indivíduos com AF do grupo retrospectivo.....	113
Tabela 62. Risco de morte de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com DF (Grupo prospectivo).....	114
Tabela 63. Risco de morte de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com DF (Grupo prospectivo).....	114
Tabela 64. Chance de ocorrência de morte de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com DF (Grupo retrospectivo).....	115
Tabela 65. Chance de ocorrência de morte de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com DF (Grupo retrospectivo).....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Adenosina deaminase
ADH	Hormônio antidiurético
ADP	Adenosina difosfato
AE	Alelo específico
AF	Anemia Falciforme
AMP	Adenosina monofosfato
Ang	Angiotensina
ATP	Adenosina trifosfato
AVE	Acidente vascular encefálico
BT	Bilirrubina total
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CD39	Mutação no códon 39 do gene beta
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CSSCD	Estudo Cooperativo da Doença Falciforme
C β S	Cistationina beta-sintase
D	Deleção de 287 pb do polimorfismo I/D no gene <i>ECA1</i>
DF	Doença Falciforme
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTC	<i>Doppler</i> transcraniano
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GLM	<i>General Linear Model</i> (teste estatístico)
GLN	Glutamina
GLU	Ácido glutâmico
Haplótipos β^S	Haplótipos da globina beta-S
Hb A	Hemoglobina adulta ou hemoglobina A
Hb A ₂	Hemoglobina A ₂
Hb AS	Traço falciforme
Hb C	Hemoglobina C
Hb D	Hemoglobina D-Los Angeles

Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb S	Hemoglobina S
Hb SC	Interação entre as hemoglobinas S e C
Hb S β -tal	Interação entre hemoglobina S e beta-talassemia
Hb	Hemoglobina
Hb	Hemoglobina
<i>HBA1</i>	Gene Alfa 1
<i>HBB</i>	Gene beta
<i>HBB</i>	Gene beta-globina
<i>HBBP</i>	Pseudogene beta
<i>HBD</i>	Gene delta
<i>HBE</i>	Gene épsilon
<i>HBG1</i>	Gene gama alanina
<i>HBG2</i>	Gene gama glicina
<i>HBZ</i>	Gene zeta
<i>HBZP</i>	Pseudogene zeta
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HU	Hidroxiureia
I	Inserção de 287 pb do polimorfismo I/D no gene <i>ECA1</i>
Ins-	Ausência da inserção de 68pb para o polimorfismo (844ins68) no gene da <i>CBS</i>
<i>Ins+</i>	Presença da inserção de 68pb para o polimorfismo (844ins68) no gene da <i>CBS</i>
IVSI-1	Mutação no intron 1 do gene beta com alteração no 1º nucleotídeo
IVSI-110	Mutação no intron 1 do gene beta com alteração no 110º nucleotídeo
IVSI-6	Mutação no intron 1 do gene beta com alteração no 6º nucleotídeo
LDH	Lactato desidrogenase
LYS	Lisina
NO	Óxido nítrico
OMA	Otite média aguda
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo-1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogênio
PNM	Pneumonia

PPP	Programa Primeiros Passos
RFLP	Restrição de polimorfismo de fragmento único
RLM	Regressão Logística Múltipla (teste estatístico)
SASH	Sistema de Gestão para Hematologia
Saudi	Índia-Arábia Saudita
SE	Sequestro esplênico
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
STA	Síndrome torácica aguda
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEB	Tris EDTA-Borato
t-PA	Ativador de plasminogênio tecidual
VAL	Valina
VCM	Volume corpuscular médio
β^+	Beta mais
β^0	Beta zero

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), do Departamento de Biologia, sediado na UNESP/IBILCE, sob orientação da Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos. O estudo contou com a colaboração da Médica hematologista, responsável pelo Instituto de Hematologia “Arthur de Siqueira Cavalcanti” (HEMORIO), Dra. Clarisse Lopes de Castro Lobo.

A ideia inicial para a elaboração do projeto surgiu de colaborações com a Dra. Clarisse, que sugeriu entender o porquê da taxa de morte de crianças com Doença Falciforme (DF) no HEMORIO ser alta. A partir dessa pergunta, elaboramos o presente estudo para a análise de polimorfismos genéticos que influenciariam na vasoatividade, e conseqüentemente, na gravidade clínica, podendo levar à morte. Para isso, trabalhamos com recém-nascidos a partir de 2012, os quais compuseram o grupo de estudo prospectivo. A fim de confrontar os achados do subgrupo pediátrico, mais três outros subgrupos foram formados por crianças, adolescentes e adultos, compondo o grupo de estudo retrospectivo.

Durante o decorrer dos anos, nos deparamos com dificuldades, principalmente relacionadas ao grupo prospectivo. Merece destaque a descentralização de atendimento, pelo Programa de Triagem Neonatal, o que comprometeu nossa amostragem, aliada à crise financeira do Estado, interrompendo alguns atendimentos e os deslocando para unidades de atendimento mais próximas à sua moradia. Assim, algumas crianças que já haviam sido incluídas no grupo de estudo, foram retiradas devido a falta de informações.

Quanto as atividades acadêmicas, durante o período de 2013 a 2017, publicamos um artigo vinculado ao projeto de mestrado no *Journal of Human Genetics*, intitulado “Inheritance of the Bantu/Benin haplotype causes less severe hemolytic and oxidative stress in sickle cell anemia patients treated with hydroxycarbamide”. Posterior a isso, publicamos um relato de caso de Hb variante rara, diagnosticada em nosso laboratório, no *Genetics and Molecular Research*, intitulado “Hemoglobin (Hb) Val de Marne (Hb Footscray) in Brazil: the first case report”. No ano de 2015, juntamente com a minha orientadora, escrevemos o capítulo de livro “A importância de identificar os haplótipos da globina beta-S na Doença Falciforme” que fez parte do livro *Interdisciplinaridade na Saúde: Doença Falciforme*, o qual foi lançado no final de 2016 pela editora UFMS. A qualificação do doutorado resultou no artigo “Atypical beta-S haplotypes: classification and genetic modulation in patients with sickle cell anemia” o qual foi submetido à revista *Journal of Medical Genetics* (Apêndice I).

No ano de 2017, outros artigos relacionados a presente tese serão redigidos com o intuito de contribuir com a pesquisa da doença falciforme no Brasil e no mundo e divulgar os resultados aqui obtidos.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Hemoglobinopatias Hereditárias: Beta hemoglobinopatias.....	25
1.2. Doença Falciforme.....	26
1.3. Fisiopatologia da Doença Falciforme.....	27
1.4. Manifestações clínicas na Doença Falciforme: das crianças para o adulto.....	29
1.5. Moduladores genéticos do perfil fenotípico.....	31
2. OBJETIVO GERAL.....	42
2.1. Objetivos Específicos.....	42
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1. Casuística.....	44
3.2. Considerações Éticas.....	47
3.3. Métodos.....	48
3.4. Análises Estatísticas.....	78
4. RESULTADOS.....	80
4.1. Frequência alélica e genotípica dos marcadores genéticos avaliados.....	80
4.2. Perfil fenotípico dos subgrupos amostrais.....	87
4.3. Avaliação dos marcadores genéticos em relação ao perfil fenotípico de gravidade.....	102
5. DISCUSSÃO.....	117
5.1. Marcadores genéticos avaliados.....	117
5.2. Perfil fenotípico e gravidade clínica nas pessoas com DF.....	120
5.3. Influência dos marcadores genéticos no perfil fenotípico de gravidade clínica.....	124
6. CONCLUSÃO.....	127
7. REFERÊNCIAS.....	129
8. APÊNDICES	140
8.1. APÊNDICE I: Artigo científico relacionado com o projeto de doutorado.....	140
8.2. APÊNDICE II: Questionário do projeto de Pesquisa.....	169
9. ANEXO	172
9.1. ANEXO I: Parecer CEP da UNESP/IBILCE.....	172

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO**1.1. Hemoglobinopatias Hereditárias: Beta hemoglobinopatias**

As hemoglobinopatias hereditárias caracterizam o grupo de doenças monogênicas, mais comuns no mundo, que alteram a função das hemoglobinas (Hb) como resultado de mutações, geralmente pontuais, nos genes que compõem a família beta e alfa globina. São divididas em dois principais grupos: as Hb variantes e as talassemias (FORGET; BUNN, 2013; WEATHERALL; CLEGG, 2001a). As últimas são consequência do desequilíbrio no conteúdo quantitativo das cadeias globínicas, pela ausência parcial (⁺) ou total (⁰) na síntese de uma ou mais globinas, e são classificadas, de acordo com a cadeia afetada, como talassemias-alfa, beta e beta/delta. Apesar da grande variedade de manifestação genotípica, as talassemias-alfa e beta são as formas com maior frequência nas populações mundiais (FORGET; BUNN, 2013; LUZ et al., 2006; WEATHERALL; CLEGG, 2001b). Como consequência da diminuição na produção de uma das cadeias, a globina complementar precipita e se acumula, interferindo na eritropoese e causando a hemólise (MUNCIE; CAMPBELL, 2009). Na talassemia-beta o excesso de cadeias alfa precipita nos precursores eritróides prejudicando a eritropoese, e nas células maduras causando danos na membrana com consequente hemólise (HIGGS; ENGEL; STAMATOYANNOPOULOS, 2012). A gravidade na talassemia-beta depende da quantidade de cadeias beta sintetizadas e consequentemente da quantidade de Hb A formada (SERJEANT, 2013), quanto mais cadeia beta, maior é a quantidade de Hb A, o que diminui o efeito deletério das cadeias alfa excedentes.

As hemoglobinas variantes resultam em Hb com estrutura alterada, e com características bioquímicas diferentes. As variantes mais frequentes são a Hb S, Hb C e Hb D (WEATHERALL; CLEGG, 2001a). A Hb S é resultado de uma mutação com troca do vigésimo nucleotídeo, uma adenina por uma timina (GAG → GTG), no gene da beta-globina (*HBB*:c.20-A>T – rs334) e resulta na substituição do sexto aminoácido, o ácido glutâmico (com características hidrofílicas) por uma valina (com características hidrofóbicas) (*HBB*^{GLU⁶VAL}) (FRANKLIN BUNN, 1997; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Durante a passagem pela microcirculação, no eritrócito desoxigenado, com alteração no pH e com a desidratação, a molécula de Hb S tende a formar polímeros os quais causam danos à membrana, rompendo o citoesqueleto e originando a célula em formato de foice (BRITTENHAM; SCHECHTER; NOGUCHI, 1985; FRANKLIN BUNN, 1997; FRENETTE; ATWEH, 2007; LABIE; ELION, 1999; ODIÈVRE et al., 2011; REES;

1. INTRODUÇÃO

WILLIAMS; GLADWIN, 2010; ZAGO; PINTO, 2007).

A Hb C é caracterizada por uma mutação (*HBB*:c.19G>A – rs33930165) com substituição do décimo nono nucleotídeo no gene da beta-globina, glicina por adenina (GAG → AAG), resultando na troca do sexto aminoácido, o ácido glutâmico por uma lisina (*HBB*^{GLU6LYS}) (ITANO; NEEL, 1950; PIEL et al., 2013). A alteração de aminoácidos favorece a precipitação da Hb alterada formando cristais intra-eritrocitários e conferindo à célula aparência de alvo “célula em alvo”, os quais distorcem a membrana celular ocasionando à hemólise e à retirada prematura da célula pelo baço (DIGGS; BELL, 1965).

A Hb D, sendo a citada aqui a Hb D-Los Angeles, (*HBB*:c.364G>C – rs33946267), foi a terceira hemoglobina variante a ser descrita (STURGEON; ITANO; BERGREN, 1955). É caracterizada por mutação pontual com troca de uma glicina por citosina (GAA → CAA) que produz uma substituição do 121º aminoácido, o ácido glutâmico por uma glutamina na cadeia da beta globina (*HBB*^{GLU121GLN}) (TORRES et al., 2014; VELLA; LEHMANN, 1974). Esta alteração confere à Hb D mobilidade eletroforética semelhante à Hb S em pH alcalino. A Hb D apresenta estabilidade normal não havendo alteração conformacional no eritrócito e pode aumentar a afinidade com o oxigênio (TORRES et al., 2014; VELLA; LEHMANN, 1974).

1.2. Doença Falciforme

Doença falciforme (DF) é um termo utilizado para determinar o grupo de hemoglobinopatias caracterizadas pela presença da Hb S, seja em homozigose (Hb SS), denominada de anemia falciforme (AF), ou associada a outras alterações de hemoglobinas, formando heterozigotos compostos como Hb SC e Hb SD, e as formas interativas com talassemias como Hb S/ β^0 talassemia, Hb S/ β^+ talassemia dentre outros (MARCUS et al., 1997; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; SERJEANT, 2013). A AF é a forma clínica mais grave da DF (FRENETTE; ATWEH, 2007) e a mais comum em todo o mundo. A cada ano nascem aproximadamente 3.500 crianças com Hb SS no Brasil (CANÇADO; JESUS, 2007). A diversidade clínica e a frequência elevada a coloca como um problema de saúde pública em vários países. A outra alteração genética que se assemelha em gravidade clínica com a Hb SS, é a herança de Hb S/ β^0 talassemia (SERJEANT, 2013), pois um gene β^0 não sintetiza cadeia beta, sendo expresso somente o gene β^S . As Hb SC e Hb SD conferem manifestações clínicas mais brandas, devido a produção de Hb C e Hb D as quais diminuem a polimerização da Hb S. Porém há relatos que descrevem pacientes com Hb SC e Hb SD semelhantes ou piores clinicamente quando comparados com Hb SS (SERJEANT, 2013; TORRES et al., 2014, 2016).

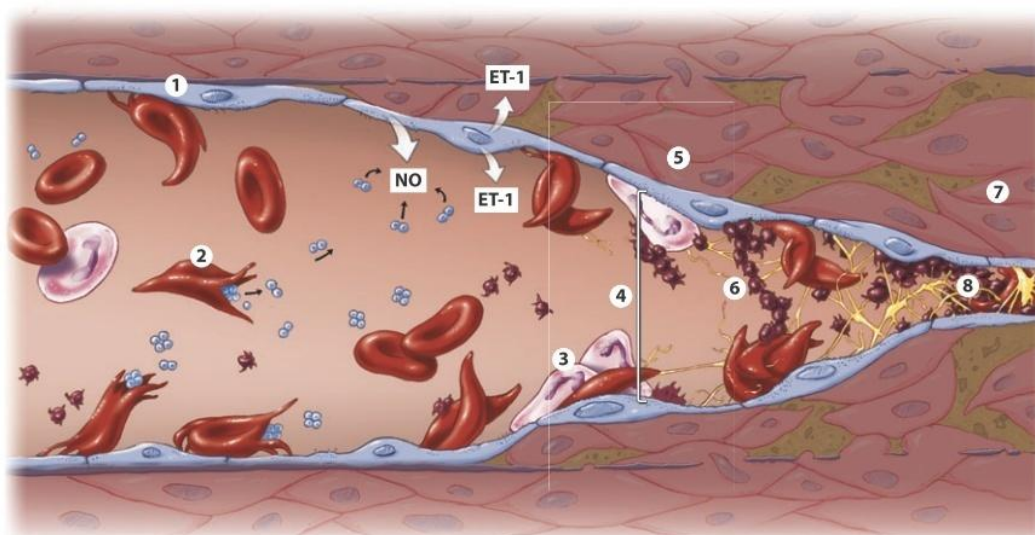
1. INTRODUÇÃO

1.3. Fisiopatologia da Doença Falciforme

Dois processos fisiopatológicos decorrentes da polimerização da Hb S estão presentes na AF, sendo eles: a vaso-occlusão, com ciclos de isquemia e reperfusão, e a anemia hemolítica (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; STEINBERG, 2008).

A vaso-occlusão é a obstrução da microcirculação, desencadeada por um processo complexo que envolve a interação e adesão de células e moléculas ao endotélio vascular, como os eritrócitos falcizados, os leucócitos, algumas células endoteliais, plaquetas, fatores de coagulação e proteínas plasmáticas (Figura 1). Esta interação dinâmica, entre eritrócitos e o endotélio vascular, resulta em episódios de oclusão e isquemia, seguidos de restauração do fluxo sanguíneo, o que aumenta a lesão tecidual mediada por danos inflamatórios com consequente estresse oxidativo (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Com a microcirculação obstruída, a polimerização tende a aumentar causando danos à membrana do eritrócito com consequente hemólise (CHIANG; FRENETTE, 2005). Esses dois eventos estão envolvidos na AF formando um ciclo: a vaso-occlusão aumenta a taxa de hemólise, a qual está envolvida na diminuição do tônus vascular e no aumento da obstrução na microcirculação.

Figura 1. Representação esquemática dos processos fisiopatológicos na anemia falciforme



(1) Adesão de hemácias ao endotélio. (2) Hemólise. (3) Adesão leucocitária. (4) Diminuição do calibre vascular. (5) Proliferação neointimal. (6) Agregação plaquetária. (7) Vasculopatia. (8) Vaso-occlusão. ET-1: endotelina 1; NO: óxido nítrico. Fonte: (BARABINO; PLATT; KAUL, 2010).

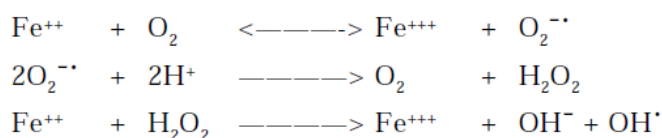
A hemólise é caracterizada pela destruição do eritrócito. A maior parte (2/3) ocorre no espaço extravascular (hemólise extravascular) em que as células do retículo endotelial, principalmente do baço, destroem os eritrócitos velhos e danificados. Já a hemólise intravascular é menos frequente (1/3) e ocorre por alterações nos eritrócitos, os quais se

1. INTRODUÇÃO

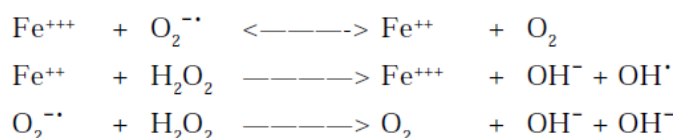
rompem no espaço vascular (BENSINGER; GILLETTE, 1974; HEBBEL, 2011). A hemólise intravascular libera a Hb, molécula depletora de óxido nítrico (NO), e reduz a biodisponibilidade desse que é um importante vasodilatador, facilitando assim, a vasoconstrição e a ativação de moléculas de adesão. Além disso, o processo de hemólise facilita a liberação de arginase, uma enzima que degrada a L-arginina, substrato enzimático para a produção de NO, ocorrendo então a redução na síntese do NO, pela destruição do seu precursor (ODIÈVRE et al., 2011) (Figura 1). Esse mecanismo também contribui com o estresse oxidativo, pois a Hb livre se degrada e libera o grupo heme e o ferro, uma das substâncias tóxicas ao organismo (ROTHER; BELL; HILLMEN, 2005) e que participa de vias de formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), como nas reações de Fenton e Haber-Weiss (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997; KRUSZEWSKI, 2003), representadas na figura 2.

Figura 2. Reações de Fenton e Haber-Weiss

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



Estas reações exemplificam a participação do ferro na produção de espécies reativas de oxigênio. Fonte: (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997).

A fisiopatologia da AF desencadeia processos inflamatórios e, conseqüentemente, subfenótipos clínicos. Os episódios de dor aguda são os eventos clínicos de maior ocorrência nesses pacientes e a principal razão para a admissão hospitalar, seguida pela Síndrome Torácica Aguda (STA). Certas complicações são predominantes em diferentes estágios da vida. Por exemplo, nos dez primeiros anos, os mais comuns são: episódios de dor, iniciados com a síndrome mão-pé, em conseqüência da inflamação da região do metacarpo e metatarso; STA e Acidente Vascular Encefálico (AVE). No entanto, não estão restritas a essa faixa etária, podendo ocorrer por toda a vida do indivíduo com AF (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; STEINBERG, 2008).

1. INTRODUÇÃO

1.4. Manifestações clínicas na Doença Falciforme: da criança ao adulto

Por se tratar de uma alteração que ocorre no gene responsável por produzir a cadeia beta-globina, os primeiros sintomas em crianças com a presença da Hb S em homozigose ou em associação com outra Hb alterada, começam a aparecer após o sexto mês de vida, quando há a troca na expressão da cadeia gama pela beta, e conseqüentemente, a diminuição da hemoglobina fetal (Hb F) e aumento na produção da Hb alterada (Hb S).

Devido a necessidade de diminuir as complicações clínicas, a morbidade em crianças com DF e melhorar o diagnóstico e acompanhamento clínico, em 2001, o Ministério da Saúde incluiu no Programa Nacional de Triagem Neonatal, por meio da portaria nº 822/01 (Acesso em 10/01/2017 > http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2001/prt0822_06_06_2001.html), a pesquisa para as hemoglobinopatias em recém-nascidos de todo o país.

As manifestações clínicas na DF são decorrentes da fisiopatologia com interferência de fatores ambientais e genéticos. Nos primeiros anos de vida as principais manifestações que acometem às crianças são o sequestro esplênico (SE) e agravamento das infecções, principalmente as pulmonares. O SE é caracterizado pela retirada do eritrócito danificado pelo baço, acarretando ao aumento deste, com sintomas de dor abdominal, taquicardia, fraqueza e diminuição no nível de Hb. Muitas vezes o SE é associado a infecções bacterianas e suas complicações comprometem a vida da criança. Como tratamento, há a transfusão sanguínea, e muitas vezes opta-se pela retirada do baço (esplenectomia) (BALLAS et al., 2012).

A dor é um sintoma característico da DF com início na infância, sendo menos frequente nos primeiros meses, devido aos níveis elevados de Hb F, e permanecendo por toda a vida. O primeiro episódio de dor geralmente decorre de obstrução de vasos nos ossículos das mãos e dos pés, caracterizando a dactilite. A frequência, gravidade e intensidade da dor variam, tanto em crianças, quanto em adultos (BALLAS et al., 2010; MEIER; MILLER, 2012).

A STA está associada à alta morbidade e mortalidade em pacientes com DF, caracterizada por febre, tosse e dores torácicas. Na presença de hipóxia, os eritrócitos falcizados se aderem à microvasculatura pulmonar podendo agravar os sintomas (DESAI; ATAGA, 2013). Aproximadamente 30% dos indivíduos com DF apresentam ao menos um episódio de STA, sendo mais frequente em crianças e em pacientes com o genótipo Hb SS e Hb S/ β^0 talassemia, quando comparados com Hb SC e Hb S/ β^+ talassemia (BALLAS et al., 2010; MEIER; MILLER, 2012). São três as principais causas de STA em pacientes com DF, sendo a mais comum a infecção pulmonar (pneumonia - PNM) seguida pela embolização por

1. INTRODUÇÃO

gordura da medula óssea, e sequestro pulmonar intravascular de eritrócitos falcizados, resultando em danos ao pulmão e infarto (GLADWIN; VICHINSKY, 2008).

A oclusão de uma artéria ou o seu rompimento, principalmente no polígono de Willis, podem acarretar em síndrome neurológica secundária, e AVE. O AVE pode ser identificado e seu risco estimado pela presença de ataque isquêmico transitório, aumento da pressão sanguínea sistólica, e alta velocidade do fluxo sanguíneo, visualizados por *doppler* transcraniano (DTC) (WEBB; KWIATKOWSKI, 2013). Antes do início do uso do DTC, o AVE ocorria em 10% dos pacientes com DF antes dos 20 anos de idade. Após a implantação desse método na rotina clínica, a frequência de AVE caiu para 1% devido às medidas terapêuticas implantadas precocemente em casos de risco aumentado (BALLAS et al., 2010; MEIER; MILLER, 2012).

A vasculatura ocular também é comprometida na DF, principalmente no paciente com genótipo Hb SC, devido ao aumento da viscosidade do sangue. A complicação oftálmica mais comum é a retinopatia, sendo menos frequente em crianças, e com pico de ocorrência entre 15 e 24 anos (BALLAS et al., 2010; MEIER; MILLER, 2012).

Complicações ósseas em pacientes com DF são a osteonecrose e a osteoartrite (BALLAS et al., 2010). A osteonecrose é caracterizada por necrose avascular da cabeça do fêmur decorre de crises de dores ósseas consecutivas com oclusão e que resultam em necrose da medula óssea. Devido à sustentação do peso na caminhada, pode causar dano secundário na superfície articular da cabeça do fêmur (osteoartrite) (SERJEANT, 2013).

Outra complicação, também decorrente da obstrução da vasculatura, é o priapismo, caracterizado por uma ereção involuntária, dolorosa e prolongada sem estímulo sexual. Por se tratar de um órgão sexual, muitos pacientes não relatam o acontecimento, retardando o tratamento e causando danos irreversíveis. Esta manifestação ocorre em crianças e adultos dos 5 aos 50 anos. A ocorrência de priapismo pode ser explicada pela diminuição da tensão de oxigênio nos corpos cavernosos predispondo à falcização dos eritrócitos, os quais obstruem os capilares dificultando o fluxo sanguíneo (Begliomini, 2001; Levey; Kutlu; Bivalacqua, 2012).

A maioria dessas complicações leva pessoas com DF a buscarem por tratamentos em centros de referência. Os tratamentos convencionais são a internação, seguida, ou não, de transfusão sanguínea. Outro tratamento para amenizar as complicações causadas pela DF é o uso de hidroxíureia (HU), um medicamento que, a princípio, era utilizado para aumentar as concentrações de Hb F, e conseqüentemente, eluir a Hb S nos eritrócitos. Porém, hoje já se sabe que a HU atua em outras vias, como na síntese do NO, contribuindo ainda mais para uma

1. INTRODUÇÃO

melhora da morbidade da DF (ALMEIDA et al., 2012; COKIC et al., 2003). Entretanto, não são todos os indivíduos que respondem positivamente aos tratamentos existentes, e acredita-se que marcadores genéticos possam ser os responsáveis pela boa ou má resposta. Segue abaixo a descrição de alguns marcadores genéticos que serão estudados neste trabalho.

1.5. Moduladores genéticos do perfil fenotípico em DF

Haplótipos da globina beta-S

Os haplótipos são combinações específicas de sítios polimórficos em uma única cromátide. Os haplótipos da globina beta-S (haplótipos β^S) são fundamentados na análise de um conjunto de polimorfismos, localizados na família gênica da beta globina, no cromossomo 11, reconhecidos por endonucleases específicas (ORKIN et al., 1982). O padrão de haplótipos é um fator que influencia na característica fenotípica dos pacientes com DF. Os mais estudados e correlacionados com as manifestações clínicas são os da globina beta-S.

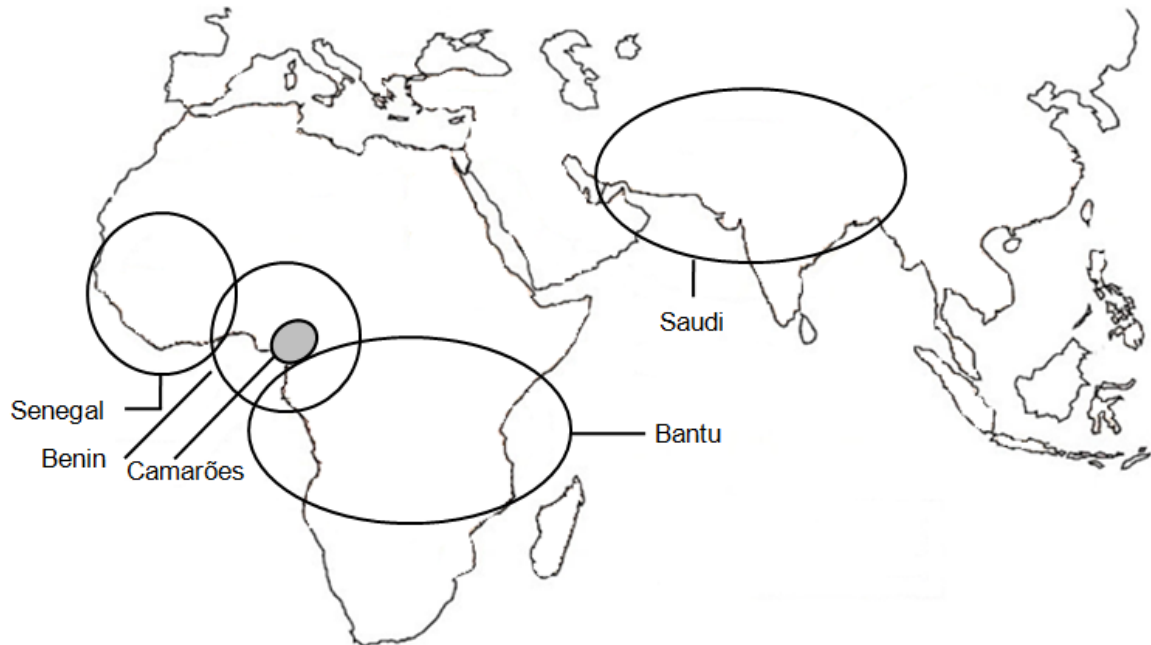
A descoberta dos haplótipos β^S foi importante para a detecção de riscos clínicos em pacientes com AF. Cinco haplótipos têm sido associados a diferentes grupos étnicos, de acordo com a região de origem e predomínio geográfico: o haplótipo Benin à África Ocidental; o Bantu à África Oriental Centro-Sul; o Senegal à África Atlântico Ocidental; o Índia-Arábia Saudita (Saudi) à Índia e Península Arábica Oriental e, o Camarões, restrito à África, mais especificamente, ao grupo étnico Eton na Costa Ocidental Africana (Figura 3) (NAGEL, 1984). A análise dos haplótipos β^S e a correlação com achados clínicos revelaram que os pacientes com haplótipo Senegal apresentam curso clínico mais brando, os com Benin têm clínica intermediária, e os Bantu, curso clínico mais grave (POWARS; HITI, 1993; POWARS, 1991). Segundo Nagel (1984), essa variação pode ser explicada pela evidência de que indivíduos com o haplótipo Bantu, sem tratamento, possuem níveis menores de Hb F (< 5%) em relação aos pacientes portadores de outros haplótipos β^S , nas mesmas condições. Os três haplótipos β^S mais comuns entre os brasileiros, com DF, são o Bantu, Benin e Senegal. Porém, o Bantu é o mais predominante e, essa herança, reforça a etnia da maioria dos Africanos que vieram para o Brasil, originários da África Oriental e Centro-Sul (OKUMURA; LOBO; BONINI-DOMINGOS, 2013; SILVA; GONÇALVES; RABENHORST, 2009; ZAGO; FIGUEIREDO; OGO, 1992).

Alguns pacientes, no entanto, apresentam haplótipos β^S incomuns, com padrões de digestão enzimática diferentes dos sítios que caracterizam os anteriormente descritos, e são denominados de atípicos. Os padrões diferenciados de haplótipos são gerados por diversos

1. INTRODUÇÃO

mecanismos genéticos envolvendo os cromossomos β^S como: mutação pontual dos haplótipos típicos; recombinação dupla ou simples entre os cromossomos com um haplótipo β^S comum; e conversão gênica (ZAGO et al., 2000).

Figura 3. Localização geográfica de origem dos haplótipos da globina beta-S



O haplótipo Benin à África Ocidental; o Bantu à África Oriental Centro-Sul; o Senegal à África Atlântico Ocidental; o Índia-Arábia Saudita (Saudi) à Índia e Península Arábica Oriental e, o Camarões, que é restrito à África, mais especificamente, ao grupo étnico Eton na Costa Ocidental Africana. Fonte: (NAGEL, 1984; OKUMURA; BONINI-DOMINGOS, 2016).

Polimorfismos genéticos ligados a vaso-atividade e coagulação

Como os eventos vaso-oclusivos são o ponto de partida para as crises de dor e, conseqüentemente, sequelas decorrentes dos danos celular e tecidual, compreender a ação na DF e a pré-disposição a essas manifestações clínicas pode levar a intervenções precoces com melhor sobrevida. Em decorrência desses fatos e de resultados de estudos de genomas amplos, destaca-se a importância de investigar alguns polimorfismos relacionados às vias metabólicas envolvidas com essa fisiopatologia. Nesse trabalho, os polimorfismos genéticos que iremos estudar estão envolvidos na via do Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona (SRAA), na via das purinas e inflamação que regula a vaso-atividade, e na coagulação sanguínea.

1. INTRODUÇÃO

Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona e Enzimas Conversoras de Angiotensinas

O SRAA tem como principal função a manutenção da homeostase da pressão sanguínea arterial, principalmente durante condições de baixo volume sanguíneo ou na presença de estímulos hipotensivos (SANCHO et al., 1976). Possui ação nos rins, mas suas enzimas podem modular vários outros tecidos, como os vasos sanguíneos e o coração. O SRAA é ativado com a diminuição da pressão sanguínea, e então, ocorre a síntese de renina pelos rins, a qual converte o angiotensinogênio em Angiotensina I (ou Ang 1-10, decapeptídeo inativo) (SAYED-TABATABAEI et al., 2006). Pela ação da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) I, ocorre a clivagem da Ang I, retirando dois aminoácidos e favorecendo a conversão em Ang II (ou Ang 1-8, octapeptídeo ativo). A Ang II é um hormônio importante para o SRAA. É por meio dele que ocorre o aumento da pressão arterial, por aumentar a atividade simpática dos rins; promover a síntese de aldosterona pela glândula supra-renal proporcionando a reabsorção de Na^+ e Cl^- e excreção de K^+ , com consequente retenção de água pelo túbulo distal; causar vasoconstrição das arteríolas e aumentar a secreção de hormônio antidiurético (ADH), a vasopressina, com ação na retenção de água pelo túbulo distal coletor (BREWSTER; PERAZELLA, 2004) (Figura 4). O resultado de todo o processo é o aumento no volume sanguíneo, e consequentemente da pressão arterial com equilíbrio dessa e inibição na produção de renina pelos rins. Além de regular a pressão arterial, esse sistema contribui para a ocorrência de cardiopatias, em casos de mau funcionamento de suas partes, e também modula a função renal (ZHUO et al., 2013).

As duas enzimas mais estudadas e atuantes no SRAA são a ECA I e a ECA II (Figura 5). A ECA I hidrolisa dipeptídeos e a ECA II hidrolisa mono-peptídeos. A ECA I age em dois sistemas. No Sistema Cinina Caliceína a ECA I inativa o vasodilatador bradicinina (1-9) (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) clivando o dipeptídeo do C-terminal (Phe-Arg) formando a bradicinina (1-7) e, em outra clivagem, a bradicinina (1-5) (SIVIERI et al., 2007). No SRAA a ECA I hidroliza a Ang I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) clivando o dipeptídeo do C-terminal (His-Leu) formando a Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) e também converte a Ang 1-9 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His) em Ang 1-7 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro). A ECA II converte Ang I em Ang 1-9 e a Ang II em Ang 1-7 (DANILCZYK et al., 2003; FLEMING; KOHLSTEDT; BUSSE, 2006). Estudo *in vitro* mostrou que a eficiência catalítica da ECA II na Ang II é 400 vezes maior que na Ang I (VICKERS et al., 2002). Portanto, na presença de ECA II há maior conversão de Ang II em Ang 1-7.

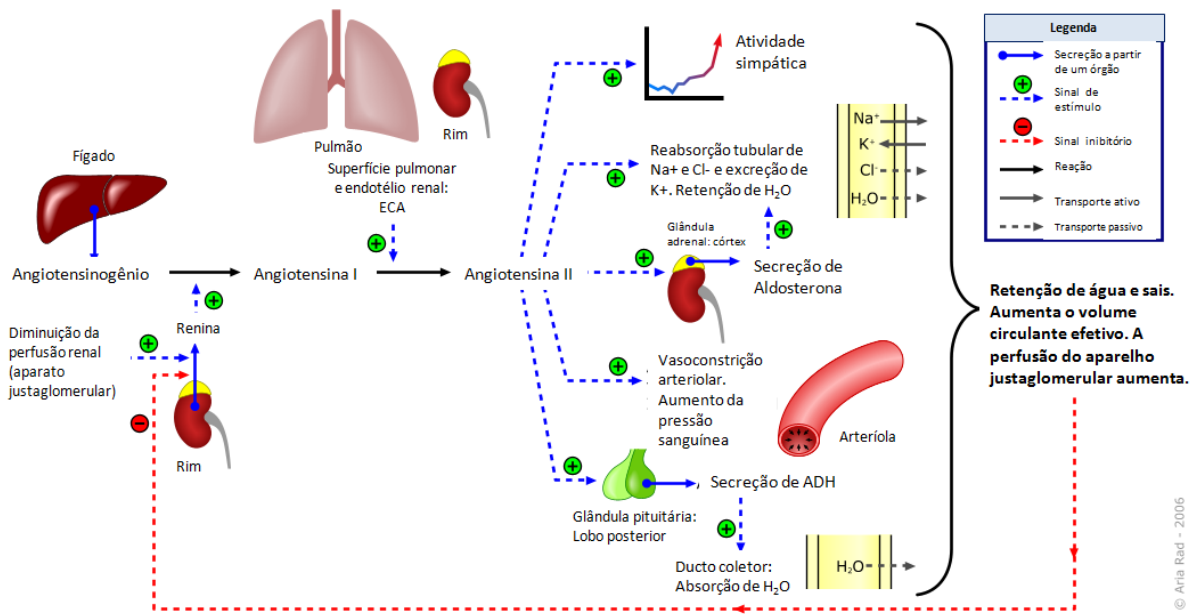
1. INTRODUÇÃO

Os efeitos vasoconstritores e vasodilatadores da Ang II e Ang 1-7, respectivamente, ocorrem quando se ligam aos seus receptores de membranas que se encontram ligados nas proteínas G. O receptor da Ang II é o AT1 e o complexo formado (Ang II/AT1) causa disfunção endotelial, proliferação celular, hipertrofia, fibrose, aterosclerose e morte celular. Já o complexo formado entre Ang 1-7 e o receptor MAS (Ang 1-7/MAS) possui a função de contrabalancear os efeitos causados por AngII/AT1. Portanto, causa vasodilatação com a diminuição da proliferação celular, da hipertrofia, da fibrose e da trombose (SANTOS et al., 2003, 2013).

Os níveis de ECA I são modulados por polimorfismo de inserção (I) /deleção (D) de 287 pb (rs1799752) (I/D 287pb) no gene *ECA1* localizado no cromossomo 17q23.3. Indivíduos portadores do genótipo DD, apresentam cerca de duas vezes mais ECA I do que indivíduos com genótipo II e a herança dessa mutação em homozigose predispõem a complicações cardiovasculares (RIGAT et al., 1990; SAYED-TABATABAEI et al., 2006). O polimorfismo da ECA II, A1075G do gene da *ECA2* (rs1978124) localizado no cromossomo Xp22, não possui relação com os níveis da enzima. Benjafield e colaboradores (2004) não encontraram relação do polimorfismo com a hipertensão, sugerindo modulação benéfica na presença do alelo mutante, sendo assim um efeito protetor para a herança (BENJAFIELD; WANG; MORRIS, 2004).

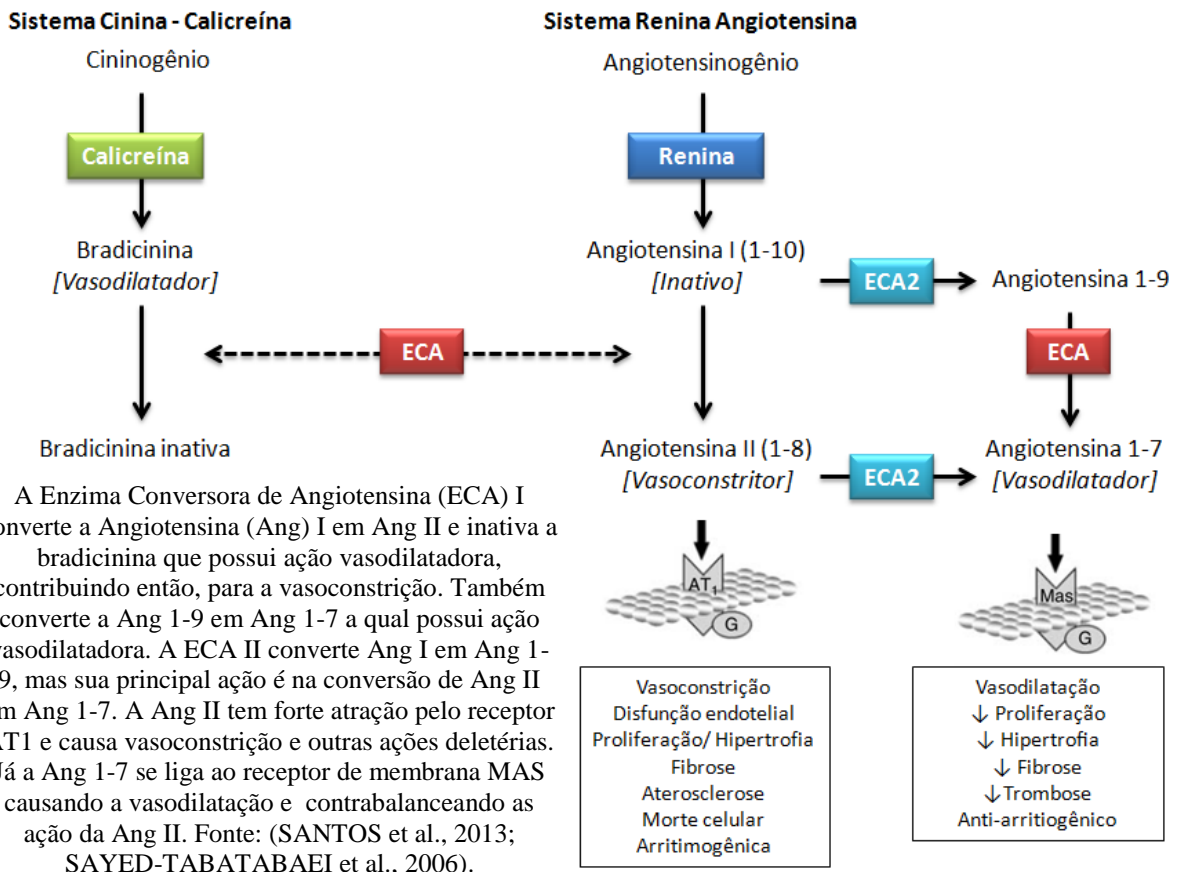
1. INTRODUÇÃO

Figura 4. Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona



Para aumentar a pressão arterial, a Renina produzida pelos rins, converte o Angiotensinogênio em Angiotensina I (Ang I). Esta por sua vez, é convertida em Angiotensina II (Ang II) pela Enzima Conversora de Angiotensina I (ECAI). A Ang II causa o aumento da atividade simpática dos rins, promove a síntese de Aldosterona, o qual, facilita a reabsorção de Na^+ e Cl^- e excreção de K^+ no túbulo distal promovendo a retenção de água aumentando o volume sanguíneo, causa vasoconstrição e aumenta a secreção de hormônio antidiurético (ADH), a vasopressina, que promove a diminuição da excreção de água pelo túbulo distal. Toda esta ação contribui para aumentar a pressão sanguínea arterial. Fonte: (ARIA-RAD, 2006).

Figura 5. Ação da Enzima Conversora de Angiotensina I e II



A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) I converte a Angiotensina (Ang) I em Ang II e inativa a bradicina que possui ação vasodilatadora, contribuindo então, para a vasoconstrição. Também converte a Ang 1-9 em Ang 1-7 a qual possui ação vasodilatadora. A ECA II converte Ang I em Ang 1-9, mas sua principal ação é na conversão de Ang II em Ang 1-7. A Ang II tem forte atração pelo receptor AT1 e causa vasoconstrição e outras ações deletérias. Já a Ang 1-7 se liga ao receptor de membrana MAS causando a vasodilatação e contrabalaneando as ação da Ang II. Fonte: (SANTOS et al., 2013; SAYED-TABATABAEI et al., 2006).

1. INTRODUÇÃO

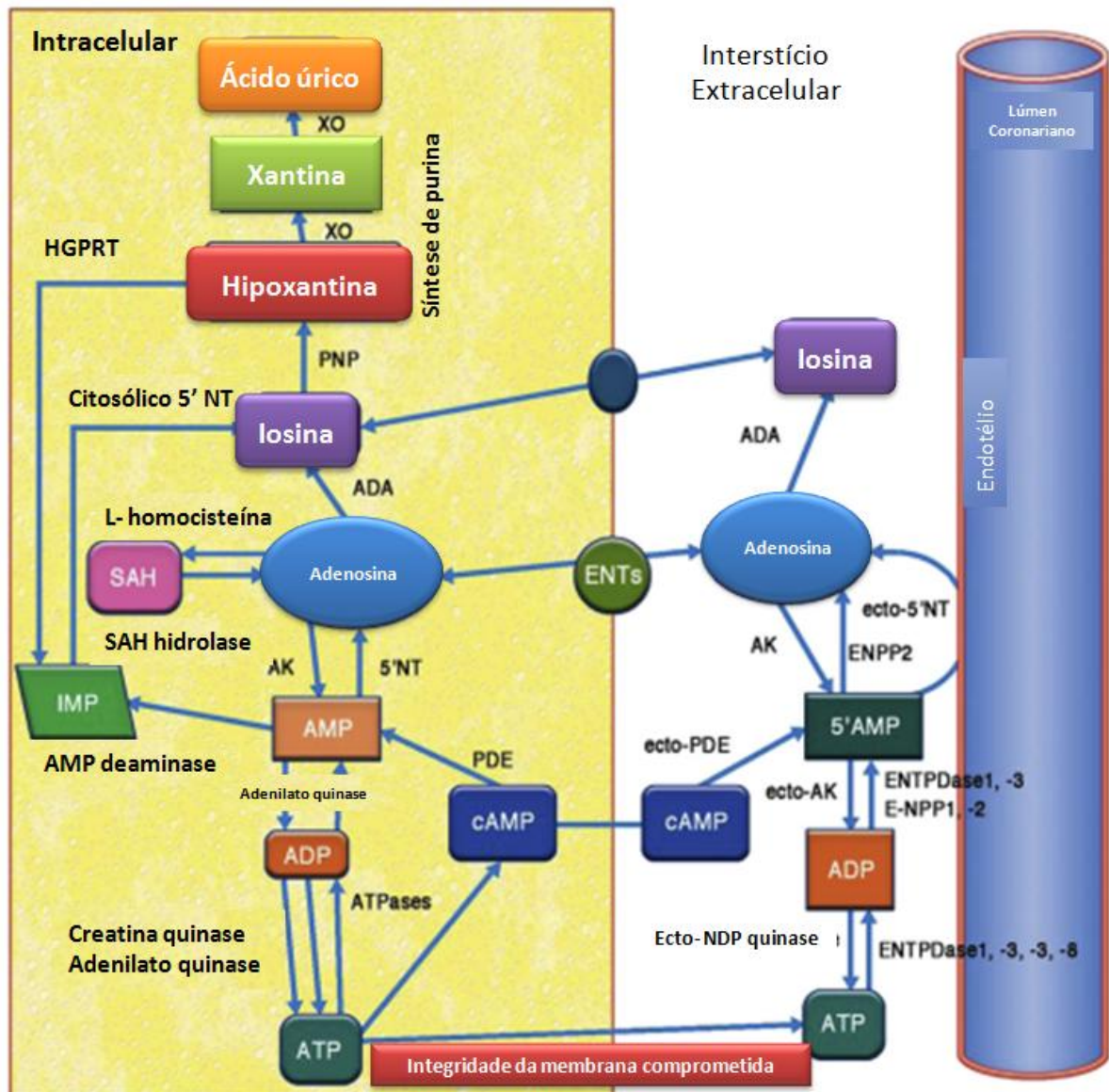
Adenosina Deaminase

A adenosina é um nucleosídeo com potente ação na vasoatividade e nos processos inflamatórios. Na vasoatividade, seus níveis estão relacionados com a inibição da Ang II, com a liberação do NO e conseqüentemente, ação como vasodilatador (SMITS et al., 1995), sendo encontrada em linfócitos, monócitos e macrófagos (CELIK et al., 2010). Em períodos de hipóxia celular ou estresse, a adenosina é liberada para as células na forma de ATP, ADP e AMP que são convertidas em adenosina por ectonucleotidases.

Na DF, durante períodos de oclusão microvascular e isquemia tecidual, os níveis de adenosina induz a produção de 2,3 difosfoglicerato o qual diminui a afinidade de ligação da Hb S ao oxigênio aumentando a falcização, hemólise e danos teciduais (ZHANG et al., 2011). Os níveis de adenosina são modulados pela adenosina deaminase (ADA), uma enzima que participa do metabolismo das purinas e está relacionada à proliferação dos linfócitos durante a resposta celular (MORISSON; NEVES, 2008). A ADA possui a função de desaminar a adenosina em inosina e a desoxiadenosina em desoxinosina (Figura 6). Quando seus níveis estão diminuídos, pode causar a Síndrome da Imunodeficiência Combinada Grave, caracterizada pelo acúmulo de metabólitos tóxicos no organismo (PACHECO et al., 2005).

A ação catalítica da ADA é modulada por polimorfismo genético com troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 22 no exon 1 do gene da ADA (G22A - rs73598374) localizado em 20q13.12. A enzima modulada pelo alelo A22 (mutante) possui 35% menos ação catalítica que a modulada pelo alelo G22 (selvagem) (BATTISTUZZI et al., 1981). Portanto, na presença do alelo A22 são esperados níveis elevados de adenosina circulante.

Figura 6. Metabolismo das purinas



A adenosina, intracelular e extracelular, é formada pela degradação da adenosina trifosfato (ATP) e, por mecanismo inverso, pode formar a ATP. A adenosina intracelular, por um processo de hidrólise e desaminação, é convertida pela adenosina deaminase (ADA) em inosina, participando então do metabolismo das purinas que tem como principal produto o ácido úrico, o qual é excretado pelos rins. Fonte: (LAYLAND et al., 2014).

Coagulação e Fibrinólise

O sistema de coagulação sanguínea caracteriza-se por uma sequência de reações químicas, representadas por uma cascata com fatores de coagulação, que resultam na formação do coágulo de fibrina. Após danos em células endoteliais, para que ocorra a restauração do tecido lesionado e, posteriormente, do fluxo sanguíneo, ocorre a coagulação, a qual é dividida em dois processos: a hemostasia primária e a secundária. A hemostasia primária tem a função de formar o tampão plaquetário. Quando um vaso é lesionado, ocorre a

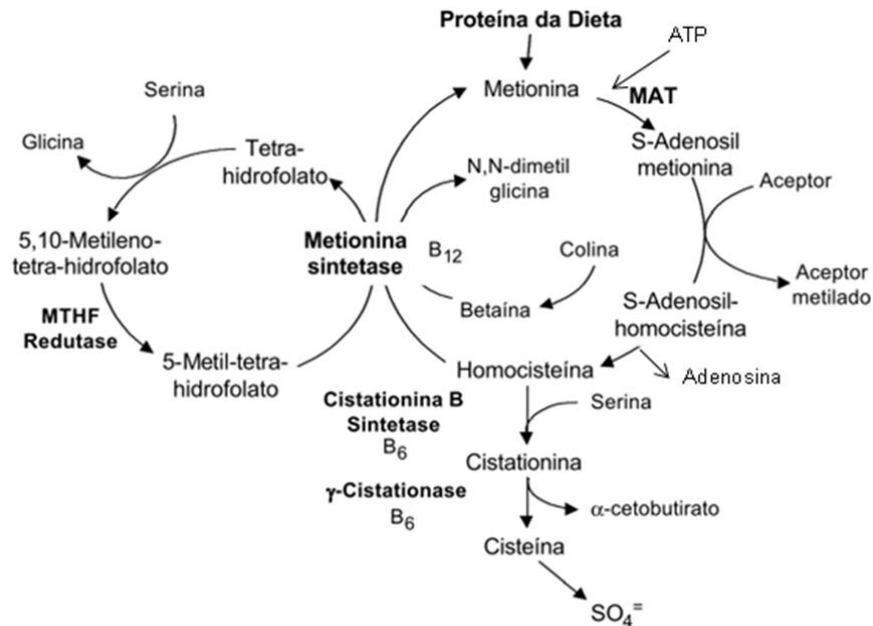
1. INTRODUÇÃO

vasoconstrição para diminuir o fluxo sanguíneo do local. Logo após as plaquetas se aderem ao colágeno exposto no endotélio lesionado, se ativam e se agregam formando um trombo plaquetário. Na hemostasia secundária há o estímulo da cascata de coagulação, em que fatores de coagulação agem para formar a fibrina. Para a restauração do vaso lesionado, o coágulo de fibrina deve ser degradado por um processo chamado fibrinólise. Por meio do ativador de plasminogênio tecidual (t-PA), ocorre a ativação do plasminogênio para formar a plasmina, a qual degrada a fibrina, e o fluxo sanguíneo é restaurado. Se o coágulo de fibrina não for degradado, partes dele (trombos) podem cair na corrente sanguínea e obstruir vasos, levando a eventos tromboembólicos (SILVERTHORN, 2010).

Polimorfismos em genes específicos podem modular eventos tromboembólicos por meio da coagulação e fibrinólise. Algumas das enzimas relacionadas são a cistationina-beta sintase (C β S) e o inibidor do ativador do plasminogênio tipo-1 (PAI-1), os quais estão envolvidos na via da homocisteína e da fibrinólise, respectivamente (KOHLENER; GRANT, 2000). A C β S, na via de transulfuração, degrada a homocisteína em cistationina, diminuindo os níveis plasmáticos de homocisteína, um aminoácido que em excesso provoca lesões ao endotélio vascular, prejudica a regulação vasomotora e acarreta trombose (TSAI et al., 1996) (Figura 7). A mutação de inserção de 68 pb (844ins68) no gene da *CBS* (21q22.3) contribui com altos níveis plasmáticos de homocisteína. Nos pacientes com DF, a presença da mutação no gene da *CBS*, é um fator de risco para episódios de vaso-oclusão (JACOB; BASTOS; BONINI-DOMINGOS, 2011).

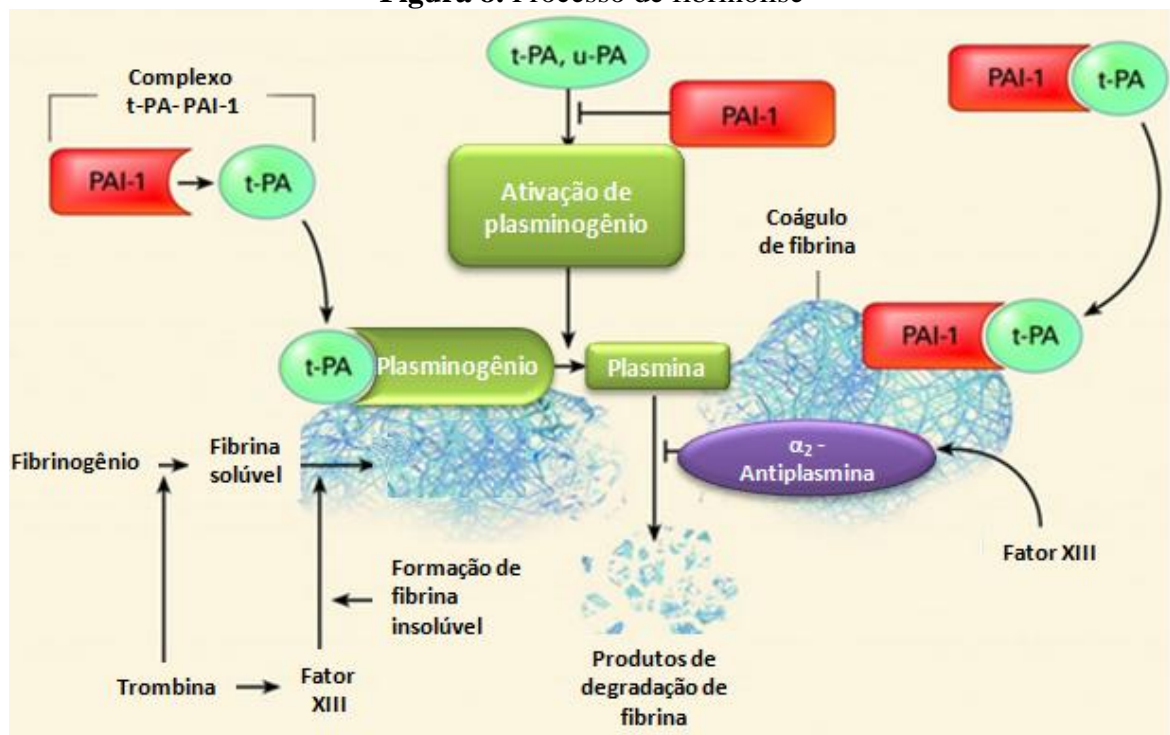
O PAI-1 possui a função de regular negativamente a via fibrinolítica, pois inibe o t-PA com diminuição na fibrinólise e aumento de coágulos de fibrina, com risco de ocorrência de doenças cardiovasculares (LIMA et al., 2011; NAUCK; WIELAND; MÄRZ, 1999; ZORIO et al., 2008). Assim, o coágulo de fibrina não é degradado (Figura 8). Níveis elevados de PAI-1 são modulados pelo polimorfismo 4G na região promotora do gene *PAI1* (-675 pb 4G/5G no cromossomo 7q22.1 - rs1799889) (ERIKSSON et al., 1995).

Figura 7. Metabolismo da homocisteína



A homocisteína é formada a partir da metionina proveniente da dieta. Esta se liga a adenosina da adenosina trifosfato (ATP) formando a S-adenosil-metionina a qual é convertida em S-adenosil-homocisteína, que perde a adenosina formando a homocisteína. A homocisteína pode ser convertida novamente em metionina pela via da remetilação com ação da metionina sintetase, ou pode ser degradada pela via da transsulfuração com ação da cistationina beta-sintetase. Fonte: (BYDŁOWSKI; MAGNANELLI; F, 1998).

Figura 8. Processo de fibrinólise



O ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) se liga ao plasminogênio ativando-o e formando a plasmina, a qual degrada o coágulo de fibrina. O inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) forma um complexo com o t-PA (t-PA/PAI-1) e inativa o t-PA consequentemente, inativa o plasminogênio, não há a formação de plasmina e não ocorre a degradação do coágulo de fibrina. Fonte: (KOHLER; GRANT, 2000).

1. INTRODUÇÃO

As manifestações clínicas na DF são complexas e diversificadas. Variam entre os genótipos e ainda entre indivíduos com o mesmo genótipo. Polimorfismos genéticos estão envolvidos na resposta diferencial e individual na DF, assim como a presença do haplótipo Bantu, do alelo D para o gene da *ECA1*, do 4G para o *PAII* e da inserção de 68 pb no gene *CBS*. Assim hipotetizamos que esses polimorfismos podem estar relacionados com o aumento dos processos vasculares danosos aos pacientes com DF, conduzindo a alta morbidade e mortalidade e a presença do alelo G para *ECA2* e do A22 para *ADA*, tornam os eventos vaso-oclusivos menos frequentes, devido ao seu efeito vasodilatador, conferindo proteção à manifestação desta intercorrência clínica. Entender a DF desde seu início, com o estudo em recém-nascidos, comparando a característica genética com a evolução clínica de pacientes de diferentes idades, poderá contribuir com o prognóstico e a indicação do melhor e mais eficiente tratamento em cada caso, tanto para crianças quanto para adultos, diminuindo, conseqüentemente, a morbidade e a mortalidade desses indivíduos com DF.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de alguns marcadores genéticos, como, os genótipos da DF, os haplótipos da globina beta-S e os polimorfismos que regulam a vasoatividade - *ADA* (G22A), *ECAI* (I/D 287pb), *ECAII* (A1075G) - e a coagulação - *CBS* (844ins68) e *PAII* (-675pb 4G/5G) - como moduladores do perfil fenotípico nas pessoas com doença falciforme.

2.1. Objetivos Específicos

- Comparar a frequência genotípica e alélica dos haplótipos da globina beta-S e dos polimorfismos nos genes *ADA* (G22A), *ECAI* (I/D 287pb), *ECAII* (A1075G), *CBS* (844ins68) e *PAII* (-675pb 4G/5G) entre as pessoas dos subgrupos Crianças I, Crianças II, Adolescentes e Adultos com DF;
- Caracterizar o perfil fenotípico das pessoas com DF, em cada subgrupo, de acordo com as informações clínicas, em leve, moderado ou grave;
- Avaliar a associação do genótipo da DF, dos haplótipos da globina beta-S e dos polimorfismos genéticos *ADA* (G22A), *ECAI* (I/D 287pb), *ECA2* (A1075G), *CBS* (844ins68) e *PAII* (-675pb 4G/5G) com o perfil fenotípico, em cada subgrupo amostral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS**3.1. Casuística**

O grupo amostral foi composto por 451 pacientes com DF, provenientes do Instituto Estadual de Hematologia “Arthur de Siqueira Cavalcanti”- HEMORIO, Rio de Janeiro-RJ. O projeto de pesquisa caracterizou-se por ser observacional longitudinal do tipo coorte. Este estudo possuiu quatro subgrupos amostrais que foram divididos de acordo com o estudo longitudinal em: um estudo de coorte prospectivo para avaliar o grupo, denominado Crianças I, de 0 a 4 anos de idade (N=59); um estudo de coorte retrospectivo para avaliar grupos denominados Crianças II (5 a 10 anos; N=53), Adolescentes (11 a 19 anos; N=127) e Adultos (acima de 20; N=212) todos portadores de DF. Todas as amostras de sangue foram coletadas por punção venosa(4 ml), pela equipe do HEMORIO, em tubos contendo EDTA a 5%, para uso nos testes de triagem básica de Hb e investigação molecular quanto ao perfil hemoglobínico e presença dos polimorfismos, objeto desse estudo.

- **Estudo de coorte prospectivo**

No período de maio de 2012 a dezembro de 2013 foram coletadas 106 amostras biológicas de recém-nascidos, identificadas pelos testes de triagem neonatal como portadores de DF, e acompanhados no HEMORIO pelo Programa de Triagem Neonatal, “Programa Primeiros Passos” (PPP). A coleta ocorreu após a autorização dos pais, ou responsável, e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), conforme normas da Resolução CNS 466/12. O termo de consentimento foi obtido pela médica pediatra que acompanha as crianças e/ou pesquisadora responsável pelo projeto, e somente após treinamento específico. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), sediada na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas Campus de São José do Rio Preto. A coleta de amostras foi realizada por profissionais da área específica, no Hospital do HEMORIO. O levantamento clínico se baseou na investigação de cada consulta médica por meio da verificação dos prontuários, do banco de dados do HEMORIO (Sistema de Gestão para Hematologia - SASH), sob supervisão da pediatra responsável. Foram verificadas ocorrência das manifestações clínicas como: febre, sequestro esplênico (SE), esplenomegalia, pneumonia (PNM), STA, dactilite, crises álgicas entre outras. Avaliou-se também número de internações e de transfusões, que são reflexos da gravidade clínica. Além

3. MATERIAL E MÉTODOS

disso, foram contabilizados o número de consultas realizadas, presenças e faltas, informações que, ajudaram a excluir pacientes que não compareceram a pelo menos 30% das consultas, caracterizando descontinuidade de tratamento (perda de 30% de seguimento). O último levantamento de informações ocorreu de 11 a 15 de abril de 2016.

Das 106 amostras iniciais, somente 59 crianças, com média de idade de $40,5 \pm 4,5$ meses (mediana 41 meses, mínimo de 32 e máximo de 47 meses de idade), compõem o subgrupo amostral, pois durante o tempo de avaliação, muitas crianças foram direcionadas para tratamentos em outras unidades e, por isso excluídas desse estudo. Outro motivo de exclusão foi o pequeno volume de amostra sanguínea coletada dos recém-nascidos, que muitas vezes não foi o suficiente para a realização dos testes, principalmente da extração de DNA. A coleta de amostras ficou inviabilizada devido a problemas poéticos e/ou econômicos. Três crianças vieram a óbito e foram retiradas das análises por não ser possível classificá-las quanto à gravidade clínica. As suas características foram relatadas no tópico “Óbito no subgrupo Crianças I” dos resultados.

- **Estudo de coorte retrospectivo**

Fazem parte do estudo 392 pacientes com DF que são acompanhados no HEMORIO e estão cadastrados no banco de dados de nosso laboratório desde 2011 devido a participação em um amplo estudo, desenvolvido em colaboração entre o LHGDH (UNESP) e o HEMORIO intitulado: “*Estudo de Polimorfismos em Pacientes portadores de Doença Falciforme e sua associação com complicações clínicas*”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HEMORIO, sob o número 151/08 em 2009 e vigente até a presente data. As informações foram repassadas pelos médicos responsáveis pelos pacientes. A média de idade desses pacientes foi de $25 \pm 14,4$ (mediana 20 anos de idade, mínimo de cinco e máximo de 65 anos) anos na coleta das amostras. As manifestações clínicas relacionadas a esses indivíduos foram levantadas em 2011, com base em ficha informativa (Apêndice II). Como se trata de um estudo retrospectivo, os indivíduos foram avaliados em 2011 e a partir desta data, retrospectivamente até o seu cadastro no HEMORIO, e as manifestações clínicas foram relacionadas. Como esse grupo é amplo e possui variação de idade, os pacientes foram separados por faixa etária, para não haver influência da idade na gravidade das manifestações aqui avaliadas. O grupo foi dividido em Crianças II (5 a 10 anos, N=53), Adolescentes (11 a 19 anos, N=127) e Adultos (acima de 20, N=212) segundo a classificação de faixa etária da Organização Mundial da Saúde, e levando em conta as manifestações clínicas da DF.

3. MATERIAL E MÉTODOS

- **Avaliação das manifestações clínicas, internações e transfusão sanguínea**

O método de levantamento das manifestações clínicas foi semelhante para ambos os grupos amostrais, com o intuito de minimizar vieses, quando considerados os resultados finais. Para algumas manifestações somente a ocorrência já era um bom indicativo para a avaliação, como STA, AVE e priapismo. Osteonecrose, retinopatia e crises de dor, são manifestações crônicas. Se o paciente apresentar em alguma fase da vida, provavelmente continuará com ela. Estas manifestações foram relatadas como presentes ou ausentes. Para verificarmos se são mais graves ou não, avaliamos o número de vezes e o tempo das internações, e se realizam transfusão sanguínea regularmente.

- **Classificação do perfil fenotípico**

Todos os sujeitos da pesquisa foram classificados, de acordo com a gravidade das manifestações clínicas, em leve, moderado e grave. Para o grupo de estudo retrospectivo, foi utilizada a ferramenta *online* “Sickle Cell Disease Severity Calculator” (disponível em: <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects>). Essa ferramenta foi desenvolvida por meio de uma modelagem de rede Bayesiana, usando 25 variáveis clínicas e laboratoriais, para estimar a gravidade da DF, em um estudo envolvendo 3.380 pacientes acompanhados pelo Estudo Cooperativo da Doença Falciforme (CSSCD). O modelo de rede calcula o risco de morte dentro de cinco anos, e considera esse risco como um escore de gravidade da doença, que varia de 0 (menos grave) a 1 (mais grave). O valor preditivo (ou seja, a precisão e previsão da morte, com base nos perfis clínicos e laboratoriais) do modelo, foi validado em dois conjuntos independentes de pacientes e apresentou alta especificidade e sensibilidade (SEBASTIANI et al., 2007). Escores de gravidade calculados para este estudo incluíram as variáveis recomendadas pela calculadora: idade, STA, bilirrubina total no soro (BT), transfusão de sangue, lactato desidrogenase (LDH), volume corpuscular médio (VCM), crises de dor, priapismo, reticulócitos absolutos, sexo, AVE, leucócitos totais, genótipo da DF e osteonecrose avascular. A utilização dessa ferramenta foi padronizada e validada para pessoas com DF no Brasil por nosso grupo de estudo utilizando os mesmos pacientes do presente estudo (BELINI JUNIOR et al., 2015).

Para os sujeitos do estudo prospectivo, foi utilizado um método de classificação de gravidade descrito por Van Den Tweel e colaboradores 2010 (VAN DEN TWEEL et al., 2010). Esse instrumento foi baseado no preenchimento de uma tabela contendo 12 itens, sendo seis referentes aos danos cumulativos aos órgãos, dois itens relacionados ao número de

3. MATERIAL E MÉTODOS

ocorrência de complicações no período de dois anos e quatro itens relacionados aos dados laboratoriais (Tabela 1). A somatória dos escores proporciona a classificação de gravidade das crianças do subgrupo Crianças I. De 0 a 20 pontos clínica leve, de 21 a 60 pontos clínica moderada e acima de 60 clínica grave.

Tabela 1. Itens para classificação segundo índice de gravidade

Itens	Classificação	Escore (ponto máximo 280)
Danos cumulativos a órgãos		
1. Necrose vascular	Se presente	10
2. Infarto cerebral	Se presente	50
3. Sequestro hepático	Se presente	50
4. Septicemia	Se presente	50
5. Priapismo	Se presente	10
6. Sequestro esplênico	Se presente	50
Complicações em dois anos		
1. Síndrome torácica aguda	Ausente, presente ou ocorrência ≥ 2	0; 10; 20
2. Crises de dor	Ausente, presente ou ocorrência ≥ 2	0; 10; 20
Valores laboratoriais		
1. Hemoglobina (g/dL)	Se $\leq 6,6$ (g/dL)	5
2. Hb F (%)	Se $\leq 3,0\%$	5
3. LDH	Se $> 700,0$ U	5
4. Leucócitos ($10^9/L$)	Se $\geq 15,2$	5

Fonte:(VAN DEN TWEEL et al., 2010)

Por ser uma ferramenta ainda não utilizada em pacientes no Brasil, o pediatra do HEMORIO classificou o perfil fenotípico das Crianças I sem o conhecimento prévio da classificação realizada pelo método de Van Den Tweel et al (2010). De acordo com o acompanhamento dos pacientes e da experiência rotineira, os indivíduos foram classificados em clínica leve, moderada e grave. Por fim, as classificações foram comparadas para validar, ou não, a utilização do método descrito por Van Den Tweel e colaboradores (2010).

3.2. Considerações Éticas

A população do estudo foi composta por portadores da DF, independente do gênero e da etnia, provenientes do HEMORIO, Rio de Janeiro – RJ. Os sujeitos da pesquisa foram expostos somente a risco considerado mínimo, caracterizado pela possibilidade de hematoma no local da punção venosa para a coleta de sangue. Todas as informações fornecidas pelos sujeitos da pesquisa, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), e os resultados obtidos nos exames laboratoriais são mantidos em sigilo, e de responsabilidade do pesquisador. Os resultados, em conjunto, são utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Os resultados dos testes laboratoriais serão informados aos clínicos

3. MATERIAL E MÉTODOS

responsáveis pelos pacientes, por meio de laudo específico o qual ficará fixado no prontuário clínico. Os médicos hematologistas do HEMORIO acompanharam a consulta aos prontuários para a obtenção dos dados clínicos. Todas as análises moleculares foram realizadas na UNESP. As publicações resultantes desse estudo deverão conter o nome das duas instituições envolvidas. O presente trabalho foi aprovado para a utilização de amostras biológicas pelos sujeitos da pesquisa pelo CEP/IBILCE com o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética número (CAAE) 26806914.6.0000.5466 (Anexo I).

3.3. MÉTODOS

Os testes laboratoriais foram realizados no LHGDH, do Departamento de Biologia, sediado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE) Câmpus de São José do Rio Preto, SP, conforme protocolo padrão para:

3.3.1. Caracterização do perfil hemoglobínico dos pacientes

As amostras coletadas passaram por testes clássicos da investigação de anemias hereditárias a fim de confirmar a presença da Hb S e quantificar as Hb presentes no adulto (Hb A, Hb A₂, Hb F e possíveis Hb variantes), pelos métodos a seguir:

- *Análise, a fresco, da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006)*

Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados na forma de “esfregaço italiano” padronizado no LHGDH, no qual os eritrócitos são facilmente visualizados. Estes foram analisados ao microscópio óptico aumento de 40x, quanto ao tamanho (microcitose, macrocitose e anisocitose), forma (poiquilicitose) e quantidade de Hb (hipocromia e hiperchromia). Os resultados foram expressos para cada um dos parâmetros avaliados em:

- | | |
|--------------------------------|------------------------------|
| - alterações discretas: (+) | - alterações moderadas: (++) |
| - alterações acentuadas: (+++) | - células normais: (N) |

3. MATERIAL E MÉTODOS

- *Preparação de hemolisados:*

Princípio

Por meio de uma reação de lise da membrana dos eritrócitos, liberou-se as Hb presentes, as quais foram submetidas a procedimentos eletroforéticos. Os reagentes utilizados foram:

Reagentes

Hemolisado Rápido - com saponina (NAOUM, 1990).

Reativo hemolisante:

- Saponina P.A.	1 g
- Água destilada	100 mL

Procedimento:

- Em placa de Kline foi colocado 50 μ L de sangue com 100 μ L de reativo hemolisante (1 volume de amostra para 2 volume de reagente), com posterior homogeneização até a hemólise completa;

- O hemolisado pode ser utilizado após cinco minutos e, no máximo, até quatro horas após sua preparação, em temperatura ambiente (25° C).

- *Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino 8,6 (MARENGO-ROWE, 1965)*

Princípio:

Técnica qualitativa utilizada para detecção de Hb normais e anormais, principalmente para as variantes. A leitura se baseia nas diferentes cargas elétricas das Hb, que acarretam em mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais.

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB), pH 8,6

- Tris hidroximetil aminometano	10,2 g
- Ácido etilenodiaminotetracético	0,6 g
- Ácido Bórico	3,2 g

3. MATERIAL E MÉTODOS

- | | |
|------------------------|---------|
| - Água destilada q.s.p | 1000 mL |
| Conservado em 4° C. | |

Procedimento:

- As fitas de acetato de celulose foram embebidas em tampão TEB por 15 minutos, no mínimo, e seis horas, no máximo, antes da aplicação do hemolisado;
- Após serem secas em folhas de papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão utilizado para embeber as fitas, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos por tecido absorvente (pano multi-uso);
- A solução de Hb foi aplicada a 1,0 cm da extremidade da fita em contato com o pólo negativo.
- Passaram-se 300 volts por aproximadamente 30 minutos do pólo negativo para positivo;
- As frações de Hb foram analisadas de acordo com o posicionamento na fita, e seguindo mapa de migração com padrão conhecido. No sentido da mais eletronegativa para a mais eletropositiva temos: Hb A₂ mais eletronegativa, seguida das Hb S, Hb F e a Hb A como a mais eletropositiva.

- *Eletroforese de hemoglobinas em pH ácido 6,2 (VELLA, 1968)*

Princípio:

Na eletroforese de Hb em pH alcalino, a Hb C migra na mesma posição que a Hb A₂, e a Hb D na mesma posição que a Hb S. Assim, a eletroforese de Hb em pH ácido é utilizada para diferenciar alguns desses tipos de Hb que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino.

Reagentes:

Tampão Fosfato pH 6,2 - Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel:

- | | |
|--|---------|
| - Na ₂ HPO ₄ | 2,02 g |
| - NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | 7,66 g |
| - Água destilada q.s.p | 1000 mL |
| Conservar em 4° C. | |

3. MATERIAL E MÉTODOS

Gel de Ágar-Fosfato

- Ágar-agar	500 mg
- Tampão fosfato pH 6,2	25 mL

Procedimento:

- Os componentes do gel de ágar-fosfato foram adicionados a um erlenmeyer de 250 mL e levados ao forno micro-ondas por um minuto ou até completa dissolução, sendo o tempo interrompido de 10 em 10 segundos para evitar fervura e evaporação;

- Foram pipetados 5,0 mL do gel, em lâminas de microscopia, para gelificarem em temperatura ambiente;

- As amostras foram aplicadas na porção média da lâmina, inserindo o aplicador com cuidado para não partir totalmente o gel;

- Para conexão, do gel com os compartimentos eletrolíticos, foi utilizado tecido absorvente (pano multi-uso);

- Passaram-se 100 volts por 45 minutos no sentido do pólo positivo para o negativo;

As frações de Hb foram analisadas de acordo com o posicionamento no gel segundo mapa de migração e padrão conhecido. No sentido da mais eletropositiva para a mais eletronegativa temos: Hb C, Hb S, Hb A e Hb F mais eletronegativa.

- *Perfil hemoglobínico e Quantificação das frações por Cromatografia líquida de Alta Performance*

Princípio:

O equipamento utilizado foi o ULTRA 2 (Trinity Biotech) com o Kit *Resolution 2*. As análises consistem na cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo realizam a mistura de tampões de diluição com controles de gradientes pré-programados, que são submetidos à coluna na qual são detectadas as alterações de absorbância que são específicas e variáveis de acordo com o equipamento utilizado. As diferentes absorbâncias são monitoradas e exibidas como um cromatograma de absorbância versus tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da

3. MATERIAL E MÉTODOS

Hb. Cada Hb tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

Procedimento:

Para o procedimento as amostras foram inseridas no equipamento: 1) em tubo no qual a amostra foi coletada (tubo de EDTA – sangue total) quando nas condições exigidas pelo manual e/ou 2) amostras hemolisadas utilizando aproximadamente 5 µL de amostra em 995 µL de solução hemolisante (presente no kit), em recipiente fornecido do fabricante.

Interpretação:

A quantificação das diferentes frações de Hb em uma amostra foi realizada a partir dos valores percentuais e do tempo de retenção, fornecidos pela calibração específica (FASC, Controle I e Controle II), e emitidos em modelo próprio, que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico. Os valores de Hb A₂ considerados normais foram de 2,5 a 3,5% e os de Hb F até 1,3%, previamente estabelecidos.

3.3.2. Análises moleculares para caracterização do grupo amostral

- *Extração do DNA (SAMBROOK; FRITSCH; MANATIS, 1989)*

Princípio:

Técnica utilizada para extrair DNA genômico a partir de sangue total. Os tampões de lise rompem os eritrócito e glóbulos brancos. O fenol é utilizado para a remoção de proteínas e enzimas contaminantes. O DNA é precipitado com etanol.

Reagentes:

1. Solução de lise 1 para extração de sangue (tampão utilizado na lise de células vermelhas)

- Sacarose 0,32 M	10,95 g
- Tris HCl 10 mM	1 mL
- MgCl ₂ 5 mM	0,5 mL
- Triton 1% 100x	1 mL
- Água mili-Q autoclavada q.s.p.	100 mL

2. Solução de lise 2 para extração de sangue (tampão utilizado na lise de células brancas)

- 0,075 M de NaCl	2,19 g
- 0,02 M de EDTA	20 mL

3. MATERIAL E MÉTODOS

- Água mili-Q q. s. p.	500 mL
3. Proteinase K (20 mg/mL)	
- Proteinase K	20 mg
- Água mili-Q q.s.p.	1 mL
Conservado em freezer.	
4. Fenol	
5. Clorofórmio: álcool isoamílico (24:1)	
6. Etanol 70%	
7. KCl 2M	

Procedimento:

Amostras de sangue periférico (800 μ L), colhidas com EDTA, foram colocadas em microtubos e o volume completado para 1,5 mL com solução de lise 1. Após 10 minutos de agitação, foi centrifugado por cinco minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foram acrescentados 1,0 mL de solução de lise 1, esse passo foi repetido por duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 450 μ L de solução de lise 2; 25 μ L de SDS à 10% e 5 μ L de proteinase K 20 mg/mL para lise de proteínas restantes. Após homogeneização, o microtubo foi colocado em banho-maria por três horas a 42°C.

Posteriormente, foram adicionados 500 μ L de fenol. O material foi homogeneizado e centrifugado por cinco minutos a 7000 rpm. Após centrifugação, a fase superior foi transferida para outro microtubo, e adicionados 500 μ L da solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1 para a purificação da solução. O material foi homogeneizado e, novamente, centrifugado por cinco minutos a 7000 rpm. Esse último passo foi repetido por mais uma vez.

O sobrenadante foi colocado em tubo cotendo 50 μ L de solução de KCl 2M gelada e acrescentado 500 μ L etanol 100% bem gelado para facilitar a precipitação do DNA. O tubo foi invertido várias vezes até a precipitação do DNA.

O material foi novamente centrifugado por 30 segundos a 13000 rpm e o sobrenadante desprezado. O DNA no fundo do tubo foi lavado com 200 μ L etanol 70% (gelado), para iniciar a hidratação, o sobrenadante, após centrifugação, foi desprezado. Após a evaporação do etanol, o DNA foi solubilizado com 50 μ L de água ultra pura e conservado em freezer – 20°C.

3. MATERIAL E MÉTODOS

- *Análise molecular para Hb S por PCR-RFLP (SAIKI et al., 1985- modificado)*

A detecção da mutação (*HBB*:c.20A>T – rs334) que altera o sexto códon da proteína (GAG > GTG - GLUβ6VAL) foi realizada por reação em cadeia da polimerase seguida de análise de restrição de polimorfismo de fragmento único (PCR-RFLP). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação que envolve o sexto códon foram: o P 277 (*sense*): 5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA 3' e o P 278 (*antisense*): 5' ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC 3'. O protocolo de amplificação esta especificado na tabela 2.

Tabela 2. Protocolo de amplificação para a PCR de Hb S

Mix	Concentração inicial	Volume (μL)
H ₂ O	----	14,0
Tampão sem MgCl ₂	10X	2,5
MgCl ₂	50 mM	2,5
dNTP	1,25 mM cada	1,0
Primer P277	10,0 μM	1,5
Primer P278	10,0 μM	1,5
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ μL	0,2
DNA	150 ng/μL	2,0
Volume final da reação		25,0

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; μM: micromolar; μL: microlitros; ng: nanogramas.

Fonte: modificado por LHGDH de (SAIKI et al., 1985).

A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: 94°C a cinco minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 35 repetições de 30 segundos a 94°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 30 segundos a 55°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 10 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 36 ciclos de repetições. Após a amplificação, o fragmento de 382 pb foi digerido a 37 °C por cinco minutos. A enzima utilizada foi a *Dde* I (C↓TNAG). O protocolo de digestão esta especificado na tabela 3.

Tabela 3. Protocolo de digestão para a RFLP de Hb S

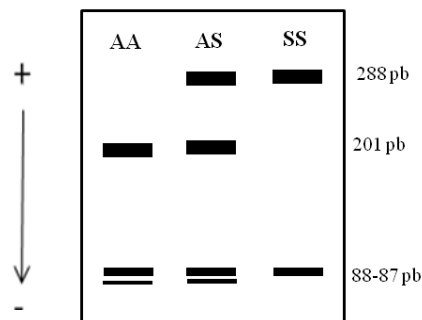
Mix	Concentração inicial	Volume (μL)
H ₂ O	----	8,5
Tampão <i>FastDigest</i>	10X	1,0
<i>Dde</i> I	1U/μL	0,5
PCR	----	5,0
Volume final da reação		15,0

μL: microlitros. Fonte: LHGDH

3. MATERIAL E MÉTODOS

A mutação no códon 6 ($\text{GAG} \rightarrow \text{GTG}$) elimina um sítio de restrição para a enzima *Dde* I; assim após a digestão o alelo normal gerou 3 fragmentos de 201 pb, 88 pb e 87 pb e o alelo mutante gerou dois, um de 288 pb e outro de 88 pb. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 9).

Figura 9. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para HbS



AA: homozigoto selvagem; AS: heterozigoto para Hb S; SS: homozigoto para Hb S; pb : pares de bases. Fonte: LHGDH

- *Análise molecular para Hb C por PCR-RFLP*

A detecção da mutação (*HBB:c.19G>A* – rs33930165) que altera o sexto códon da proteína ($\text{GAG} > \text{AAG}$ - $\text{GLU}\beta 6\text{LYS}$) foi realizada por PCR - RFLP. Os *primers* utilizados para a amplificação que envolve o sexto códon foram: o *primer* P 277 (sense): 5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA 3' e o *primer* P 278 (antisense): 5' ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC 3'. O protocolo de amplificação esta especificado na tabela 4.

Tabela 4. Protocolo de amplificação para a PCR de Hb C

Mix	Concentração inicial	Volume (μL)
H ₂ O	----	14,0
Tampão sem MgCl ₂	10X	2,5
MgCl ₂	50 mM	2,5
dNTP	1,25 mM cada	1,0
Primer P277	10,0 μM	1,5
Primer P278	10,0 μM	1,5
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ μL	0,2
DNA	150 ng/ μL	2,0
Volume final da reação		25,0

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; μM : micromolar; μL : microlitros; ng: nanogramas.

Fonte: LHGDH

3. MATERIAL E MÉTODOS

A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: 94°C a cinco minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 35 repetições de 30 segundos a 94°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 30 segundos a 55°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 10 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 36 ciclos de repetições. Após a amplificação, o fragmento de 382 pb foi digerido a 37 °C por três horas. A enzima utilizada foi a *Bse*RI (C↓TNAG). O protocolo de digestão esta especificado na tabela 5.

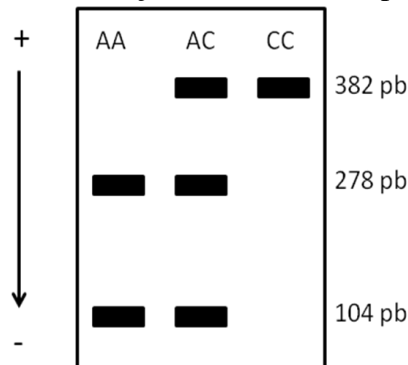
Tabela 5. Protocolo de digestão para a RFLP de Hb C

Mix	Concentração inicial	Volume (µL)
H ₂ O	----	5,0
Tampão <i>Bse</i> RI	10X	1,0
<i>Bse</i> RI	10.000U/mL	1,5
PCR	----	3,0
Volume final da reação		10,5

U: unidade; mL: mililitros; µL: microlitros. Fonte: LHGDH

A mutação no códon 6 (GAG → AAG) elimina um sítio de restrição para a enzima *Bse*RI. Assim após a digestão o alelo normal gera dois fragmentos (278 e 104 pb) e o alelo mutante gera um fragmento (382 pb). A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 10).

Figura 10. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para HbC



AA: homozigoto selvagem; AC: heterozigoto para Hb C; CC: homozigoto para Hb C; pb : pares de bases. Fonte: LHGDH

3. MATERIAL E MÉTODOS

- *Análise molecular para Hb D-Los Angeles por PCR-RFLP*

A detecção da mutação (*HBB*:c.364G>C – rs33946267) que altera o 121º códon da proteína (GAA > CAA - GLUβ121GLN) foi realizada por PCR - RFLP. Os *primers* utilizados para a amplificação foram: o CD1 (sense) 5' TGC CTC TTT GCA CCA TTC TA 3' e o CD2 (antisense) 5' GAC CTC CCA CAT TCC CTT TT 3'. O protocolo de amplificação esta especificado na tabela 6.

Tabela 6. Protocolo de amplificação para a PCR de Hb D

Mix	Concentração inicial	Volume (µL)
H ₂ O	----	15,3
Tampão sem MgCl ₂	10X	2,5
MgCl ₂	50 mM	2,0
Dntp	1,25 mM cada	1,0
Primer CD1	10,0 µM	1,0
Primer CD2	10,0 µM	1,0
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ µL	0,2
DNA	150 ng/µL	2,0
Volume final da reação		25,0

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; µM: micromolar; µL: microlitros; ng: nanogramas.

Fonte: LHGDH

A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: 94°C a cinco minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 35 repetições de 30 segundos a 94°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 30 segundos a 55°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 10 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 36 ciclos de repetições. Após a amplificação, o fragmento de 564 pb foi digerido a 37 °C por 3 horas pela enzima *EcoR I*. O protocolo de digestão esta especificado na tabela 7.

Tabela 7. Protocolo de digestão para a RFLP de Hb D

Mix	Concentração inicial	Volume (µL)
Tampão <i>EcoR I</i>	1X	5,0
<i>EcoR I</i>	20.000U/mL	1,0
PCR	----	5,0
Volume final da reação		11,0

U: unidade; mL: mililitros; µL: microlitros. Fonte: LHGDH

A mutação no códon 121 elimina um sítio de restrição da enzima *EcoR I*. Assim após a digestão o alelo normal gera dois fragmentos (296 e 268 pb) e o alelo mutante gera um fragmento (564 pb). A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 11).

Figura 11. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para HbD



AA: homozigoto selvagem; AD: heterozigoto para Hb D; DD: homozigoto para Hb D; pb : pares de bases. Fonte: LHGDH.

- *Análise molecular para Beta-Talassemia por PCR-AE*

Foi determinadas quatro mutações referentes à beta-talassemia por PCR alelo específico com *primers* específicos para cada mutação. As mutações são: CD 39 (*HBB*:c.118C>T – rs11549407), IVSI-110 (*HBB*:c.93-21G>A – rs35004220), IVSI-6 (*HBB*:c.92+6T>C – rs35724775) e IVSI-1 (*HBB*:c.92+1G>A – rs33971440) (BERTHOLO, 2005). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para análise dos polimorfismos da beta-talassemia são o mesmo: B5a (sense) 5' GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC A 3' e B5b (antisense) 5' GGG TGG GAA AAT AGA CT 3'. Mudam os oligonucleotídeos específicos para cada mutação: CD39 (PS39W - selvagem) 5' GAC TCA AAG AAC CTC TG 3' e (PS39M – mutante) 5' GAC TCA AAG AAC CTC TA 3'; IVSI-110 (TB110W – selvagem) 5' GGG TGG GAA AAT AGA CC 3' e (TB110M – mutante) GGG TGG GAA AAT AGA CT 3'; IVSI-6 (IVSI6W – selvagem) 5' GTC TTG TAA CCT TGA TA 3' e (IVSI6M - mutante) 5' GTC TTG TAA CCT TGA TG 3'; IVSI-1 (IVSI1W – selvagem) 5' GTG ACC TTG ATA CCA AC 3' e (IVSI1M – mutante) 5' GTG ACC TTG ATA CCA AA 3'. O protocolo de amplificação do alelo selvagem e mutante estão especificados na tabela 8 e 9.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 8. Protocolo de amplificação para o alelo selvagem da PCR-AE das mutações de beta-talassemia

Mix	Concentração inicial	Volume (µL)			
		(CD39)	(IVSI-110)	(IVSI-6)	(IVSI-1)
H ₂ O	----	8,0	9,0	7,85	8,0
Tampão sem MgCl ₂	10X	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂	50 mM	0,75	1,5	0,75	0,75
DMSO	*	1,0	1,0	1,0	1,0
dNTP	1,25 mM cada	4,0	3,5	4,0	4,0
Primer B5a	10,0 µM	2,5	2,0	2,5	2,5
Primer B5b	10,0 µM	2,5	2,0	2,5	2,5
Primer W	10,0 µM	2,5	2,0	2,5	2,5
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ µL	0,25	0,1	0,4	0,25
DNA	150 ng/µL	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume final da reação		25,0	25,0	25,0	25,0

*A concentração de DMSO é 100% para CD39, IVSI-6 e IVSI-1. Para o IVSI-110 a concentração é de 30%.
MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; µM: micromolar; µL: microlitros; ng: nanogramas. Fonte: LHGDH.

Tabela 9. Protocolo de amplificação para o alelo mutante da PCR-AE das mutações de beta-talassemia

Mix	Concentração inicial	Volume (µL)			
		(CD39)	(IVSI-110)	(IVSI-6)	(IVSI-1)
H ₂ O	----	8,0	9,0	7,85	8,0
Tampão sem MgCl ₂	10X	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂	50 mM	0,75	1,5	0,75	0,75
DMSO	*	1,0	1,0	1,0	1,0
dNTP	1,25 mM cada	4,0	3,5	4,0	4,0
Primer B5a	10,0 µM	2,5	2,0	2,5	2,5
Primer B5b	10,0 µM	2,5	2,0	2,5	2,5
Primer M	10,0 µM	2,5	2,0	2,5	2,5
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ µL	0,25	0,1	0,4	0,25
DNA	150 ng/µL	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume final da reação		25,0	25,0	25,0	25,0

*A concentração de DMSO é 100% para CD39, IVSI-6 e IVSI-1. Para o IVSI-110 a concentração é de 30%.
MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; µM: micromolar; µL: microlitros; ng: nanogramas. Fonte: LHGDH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições descritas na tabela 10.

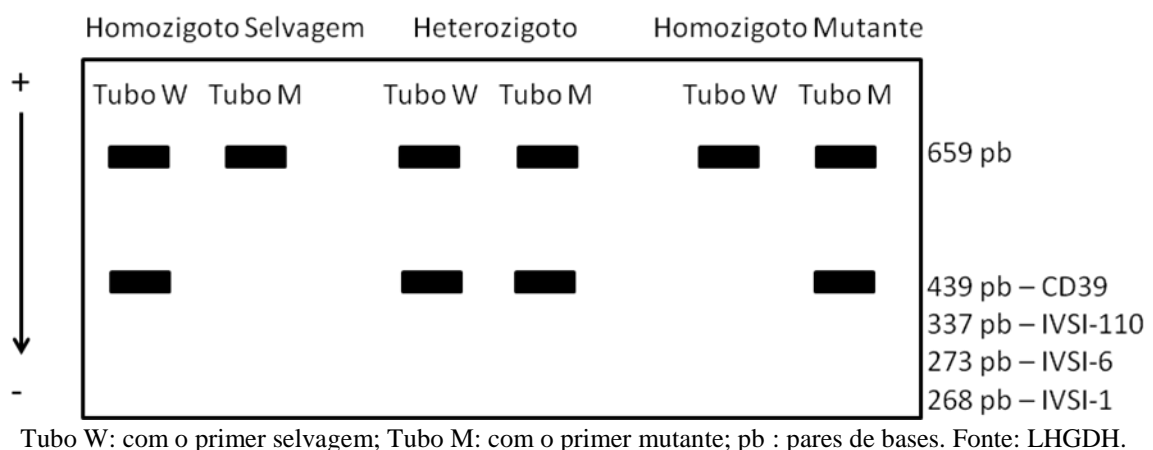
Tabela 10. Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da beta-talassemia

Região	Desnaturação Inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão Final	
	32 ciclos									
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
CD39	95	7'	94	50''	54	50''	72	50''	72	7'
IVSI-110	95	7'	94	50''	58	1'	72	50''	72	7'
IVSI-6	95	7'	94	50''	54	50''	72	50''	72	7'
IVSI-1	95	7'	94	50''	54	50''	72	1'	72	7'

Fonte: LHGDH

O amplificado de 659 pb foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio. Dependendo da mutação avaliada, a banda mutada correspondente ao alelo com o mutante de beta-talassemia apresenta uma quantidade de pb. Para a mutação CD 39 a banda alterada apresenta 439 pb, para IVSI-110 337 pb, para IVSI-6 273 pb e para IVSI-1 268 pb (Figura 12).

Figura 12. Representação esquemática do resultado da PCR-AE para as mutações de beta-talassemia

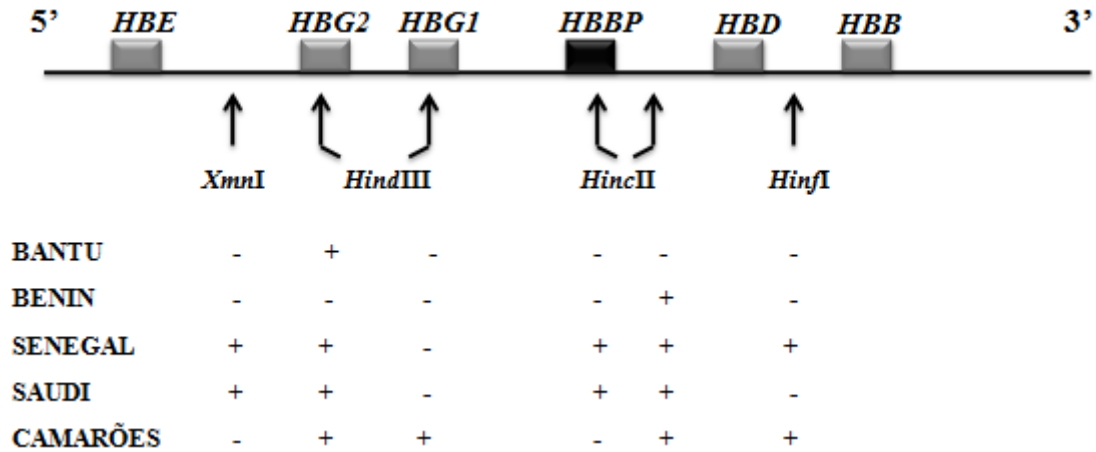


- *Análise dos Haplótipos β^s* (SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989)

A determinação dos haplótipos foi realizada por PCR-RFLP, por meio da análise de seis sítios polimórficos, e a classificação segundo Sutton e colaboradores (1989) (Figura 13).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 13. Representação esquemática dos sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S



(+) indica presença do sítio polimórfico; (-) indica ausência do sítio polimórfico. Fonte: (OKUMURA; BONINI-DOMINGOS, 2016).

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores para análise dos polimorfismos da família β estão listadas na tabela 11.

Tabela 11. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de regiões da família β

Oligonucleotídeo iniciador	Seqüência do oligonucleotídeo iniciador (5' – 3')	Direção	Região
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	→	5' γ^G
H1	AGGAGCTTATTGATAACTCAGAC	←	
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	←	γ^G
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	γ^A
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	←	
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	→	$\Psi\beta$
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	←	
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	→	3' $\Psi\beta$
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	←	
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	→	5' β
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	←	

→: sense ; ← anti-sense. Fonte: (SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989)

Os reagentes, as concentrações utilizadas para a montagem da solução de reação e as condições de amplificação estão representadas nas tabelas 12 e 13, respectivamente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 12. Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família da globina β

Componentes	Volumes (μL)			
	<i>XmnI</i> I 5' γ^G	<i>Hind</i> III γ^G e γ^A	<i>Hinc</i> II $\Psi\beta$ e 3' $\psi\beta$	<i>Hinf</i> I 5' β
H ₂ O	17,125	18,55	17,55	16,6
Tampão (10X)	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂ (50 mM)	1,25	1,0	1,0	1,25
dNTP's (2 mM)	2,5	-	-	2,5
dNTP's (10 mM)	-	0,75	0,75	-
Oligonucleotídeo iniciador 5' (10 μM)	-	0,5	0,5	0,5
Oligonucleotídeo iniciador 3' (10 μM)	-	0,5	0,5	0,5
Oligonucleotídeo iniciador 5' (25 μM)	0,25	-	-	-
Oligonucleotídeo iniciador 3' (25 μM)	0,25	-	-	-
Taq Polimerase (5U/ μL)	0,125	0,20	0,20	0,20
DNA (100 ng/ μL)	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume Final (μL)	25,0	25,0	25,0	25,0

Fonte: LHGDH.

Tabela 13. Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família da globina β

Região	Desnaturação Inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão Final	
	35 ciclos									
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
5' γ^G	94	5'	94	45''	60	45''	72	1'30''	72	7'
γ^G	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
γ^A	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
$\Psi\beta$	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
3' $\psi\beta$	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
5' β	94	5'	94	45''	57	45''	72	1'30''	72	7'

Fonte: LHGDH.

O produto da PCR foi digerido, a 37°C durante 3 horas, para a região 5' γ^G e para as demais foi digerido por cinco minutos a 37°C com endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico. O tamanho dos produtos de amplificação e após clivagem, podem ser observados na Tabela 14.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 14. Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição

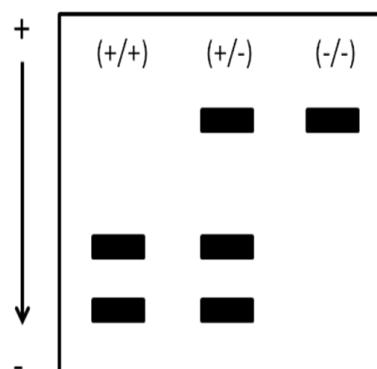
Oligonucleotídeo iniciador	Enzima	Região	Tamanho do fragmento amplificado	Tamanho dos fragmentos após a clivagem
H0 e H1	<i>Xmn</i> I	5'γ ^G	657 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>Hind</i> III	γ ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>Hind</i> III	γ ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>Hinc</i> II	Ψβ	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>Hinc</i> II	3'ψβ	590 p b	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>Hinf</i> I	5' β	380 pb	240 pb + 140 pb

Fonte: LHGDH.

A identificação dos padrões de restrição que determinam os haplótipos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição. De acordo com perfil de restrição para as seis regiões polimórficas da família da β-globina, foi possível definir os haplótipos β^S. O padrão de digestão para todos os sítios polimórficos analisados é especificado na figura 14.

Figura 14. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para os sítios polimórficos de haplótipo avaliados



(+/-): homocigoto para a presença do sítio de restrição para a enzima;
 (+/-): heterocigoto para a presença do sítio de restrição para a enzima
 e (-/-): homocigoto para a ausência do sítio de restrição para a enzima.

Fonte: LHGDH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.3. Análise molecular para os polimorfismos genéticos

- *Cistationina Beta Sintase (C β S)* (TSAI et al., 1996)

A detecção do polimorfismo de inserção de 68 pb (844ins68) no gene da *CBS* (21q22.3) foi realizada por PCR com a utilização de dois *primers*: o *primer* Cys A (sense) 5'CTG GCC TTG AGC CCT GAA3' e o *primer* Cys B (antisense) 5' GGC CGG GCT CTG GAC TC 3'. O protocolo de amplificação para verificar a inserção ou a deleção de 68 pb esta especificado na tabela 15.

Tabela 15. Protocolo de amplificação para *CBS* por PCR

Mix	Concentração inicial	Volume (μ L)
H ₂ O	----	18,0
Tampão sem MgCl ₂	10X	2,5
MgCl ₂	50 mM	0,8
dNTP	1,25 mM cada	1,0
Primer Cys A	10,0 μ M	0,3
Primer Cys B	10,0 μ M	0,3
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ μ L	0,2
DNA	150 ng/ μ L	2,0
Volume final da reação		25,0

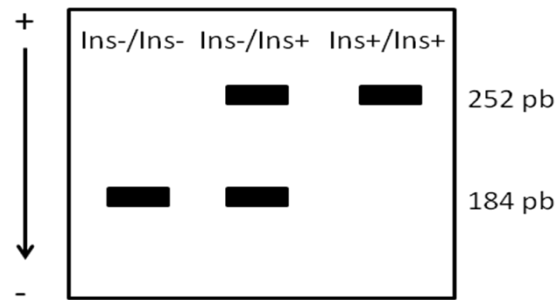
MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; μ M: micromolar; μ L: microlitros; ng: nanogramas. Fonte: LHGDH modificado de (TSAI et al., 1996).

A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: 94°C a cinco minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 30 repetições de 1 minuto a 94°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 1 minuto a 60°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 7 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 31 ciclos de repetições.

O tamanho do fragmento sem a inserção é de 184 pb. Assim, após a amplificação o alelo normal gera um fragmento 184 pb e o alelo mutante gera um fragmento de 252 pb (TSAI et al., 1996). A amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 15).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 15. Representação esquemática da PCR para *CBS*



Ins-/Ins-: homocigoto sem a inserção de 68 pb; Ins-/Ins+: heterocigoto para a inserção de 68 pb e Ins+/Ins+: homocigoto para a inserção de 68 pb; pb : pares de bases. Fonte: LHGDH.

- *Enzima Conversora de Angiotensina I (ECAI)* (RIGAT et al., 1990)

A detecção do polimorfismo de inserção/deleção de 287 pb (I/D 287pb - rs1799752) no gene *ECAI* (17q23.3) é baseado em duas ampliações com *primers* diferentes. A primeira amplificação utiliza-se o *primer* ECA 1 (sense) 5' CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3' e ECA 2 (antisense) 5' GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 3'. O protocolo da primeira amplificação está especificado na tabela 16.

Tabela 16. Protocolo da primeira amplificação para *ECAI* por PCR

Mix	Concentração inicial	Volume (µL)
H ₂ O	----	15,3
Tampão sem MgCl ₂	10X	2,5
MgCl ₂	50 mM	1,5
dNTP	1,25 mM cada	2,5
Primer 1	10,0 µM	0,5
Primer 2	10,0 µM	0,5
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ µL	0,2
DNA	150 ng/µL	2,0
Volume final da reação		25,0

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; µM: micromolar; µL: microlitros; ng: nanogramas. Fonte: LHGDH modificado de (RIGAT et al., 1990).

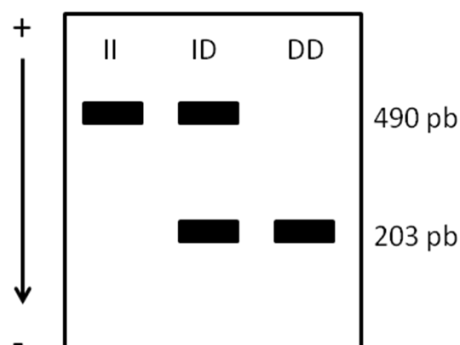
A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: 95°C a cinco minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 30 repetições de 30 segundos a 95°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 30 segundos a 58°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 5 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 31 ciclos de repetições.

O tamanho do fragmento com a inserção é de 490 pb. Assim, após a amplificação o alelo normal gera um fragmento 490 pb e o alelo mutante gera um fragmento de 203 pb

3. MATERIAL E MÉTODOS

(RIGAT et al., 1990). A amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 16).

Figura 16. Representação esquemática da primeira PCR para *ECAI*



II: homocigoto para a inserção de 287 pb; ID: heterocigoto para a inserção de 287 pb e DD: homocigoto para a deleção de 287 pb. pb : pares de bases. Fonte: LHGDH.

Nesta primeira amplificação, há uma preferência do alelo com inserção amplificar como deleção. Assim, aquelas amostras homocigotas para a deleção passaram por uma segunda amplificação para a separação do heterocigoto do homocigoto para a deleção. Os *primers* utilizados nesta segunda amplificação são: ECA 3 (sense) 5' TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC 3' E ECA 4 (antisense) 5' TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA T 3'. O protocolo da segunda amplificação esta especificado na tabela 17.

Tabela 17. Protocolo da segunda amplificação para *ECAI* por PCR

Mix	Concentração inicial	Volume (µL)
H ₂ O	----	15,8
Tampão sem MgCl ₂	10X	2,5
MgCl ₂	50 mM	1,5
Dntp	1,25 mM cada	2,0
Primer 3	10,0 µM	0,5
Primer 4	10,0 µM	0,5
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ µL	0,2
DNA	150 ng/µL	2,0
Volume final da reação		25,0

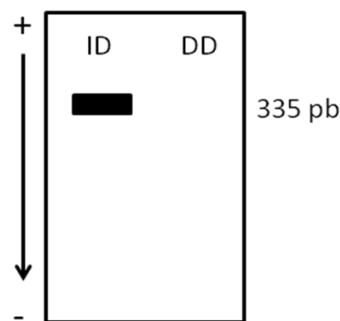
MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; µM: micromolar; µL: microlitros; ng: nanogramas. Fonte: LHGDH modificado de (RIGAT et al., 1990).

A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: 95°C a cinco minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 35 repetições de 30 segundos a 95°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 30 segundos a 66°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C

3. MATERIAL E MÉTODOS

para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 5 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 36 ciclos de repetições. Após a amplificação, o alelo heterozigoto para a inserção apresenta uma banda em 335 pb e o homozigoto para a deleção não amplifica. A amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 17).

Figura 17. Representação esquemática da segunda PCR para *ECAI*



ID: heterozigoto para a inserção e DD: homozigoto para a deleção. pb: pares de bases. Fonte: LHGDH.

- *Enzima Conversora de Angiotensina II (ECAII)* (BENJAFIELD; WANG; MORRIS, 2004)

A detecção do polimorfismo no intron I (A1075G - rs1978124) do gene *ECA2* (Xp22) foi avaliado por PCR-RFLP. O par de *primers* utilizados são: P1 5' TAA CAA GTG CAA GGA TTT AGG 3' e P2 5' AAG CTG CAA TGA ATC ATG AT 3'. O protocolo da amplificação esta especificado na tabela 18.

Tabela 18. Protocolo da amplificação para *ECA2* por PCR

Mix	Concentração inicial	Volume (µL)
H ₂ O	----	8,8
Tampão sem MgCl ₂	10X	2,5
MgCl ₂	50 mM	1,0
dNTP	1,25 mM cada	2,0
DMSO	100%	2,5
Primer 1	10,0 µM	3,0
Primer 2	10,0 µM	3,0
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ µL	0,2
DNA	150 ng/µL	2,0
Volume final da reação		25,0

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; µM: micromolar; µL: microlitros; ng: nanogramas. Fonte: LHGDH modificado de (BENJAFIELD; WANG; MORRIS, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A reação de amplificação obedece as seguintes condições: 94°C a dez minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 10 repetições de 1 minuto a 94°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 1 minuto a 65°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; um ciclo com 15 repetições de 1 minuto a 94°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 1 minuto a 60°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; um ciclo de 20 repetições a 1 minuto a 94°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 1 minuto a 58°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; um ciclo final a 20 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 36 ciclos de repetições.

Após a amplificação, o fragmento de 471 pb foi digerido a 37 °C por cinco minutos pela enzima *AvaII*. O protocolo de digestão esta especificado na tabela 19.

Tabela 19. Protocolo de digestão para a RFLP de *ECA2*

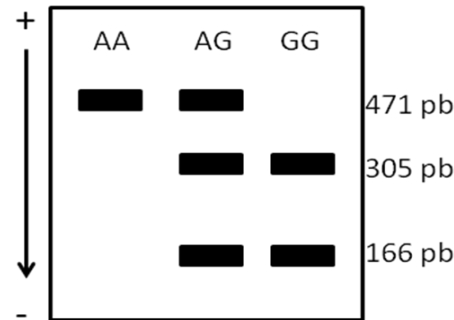
Mix	Concentração inicial	Volume (µL)
H ₂ O	----	8,5
Tampão <i>AvaII</i>	10X	1,0
<i>AvaII</i>	1 FDU/µL	0,5
PCR	----	5,0
Volume final da reação		15,0

µL: microlitros. Fonte: LHGDH.

A mutação no intron I (A1075G) gera um sítio de restrição para a enzima *AvaII* e então, o alelo normal terá um fragmento de 471 pb e o mutante gerará dois fragmentos de 305 pb e 166 pb (BENJAFIELD et al., 2004). A amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 18).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 18. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para *ECA2*



AA: homozigoto selvagem; AG: heterozigoto para *ECAII*; GG: homozigoto para *ECAII*; pb: pares de bases. Fonte: LHGDH.

- *Adenosina Deaminase (ADA)* (SAFRANOW *et al.*, 2007)

A análise do polimorfismo (G22A exon 1 - rs73598374) do gene *ADA* (20q13.12) foi feita por PCR-HotStart seguida de RFLP, em que o DNA genômico é submetido a uma amplificação e uma digestão. Na amplificação, o par de primers utilizados são: A22 (sense): 5' GCC CGG CCC GTT AAG AAG AGC 3' e G22 (antisense): 5' GGT CAA GTC AGG GGC AGA AGC AGA 3'. A amplificação foi separada em duas etapas, pois a desnaturação inicial poderia degradar a Taq DNA polimerase utilizada. Primeiramente foi adicionado ao microtubo os reagentes especificados na tabela 20 e adicionados no termociclador.

Tabela 20. Protocolo de amplificação para a PCR-HotStart de *ADA*: mix 1

Mix 1	Concentração inicial	Volume (μ L)
H ₂ O	----	12,0
DMSO	100X	2,1
B-mercaptoetanol	200mM	1,0
dNTP	1,25 mM cada	4,0
Primer ADA 1	10,0 μ M	0,2
Primer ADA 2	10,0 μ M	0,2
DNA	150 ng/ μ L	2,0
Volume final da reação		21,5

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; μ M: micromolar; μ L: microlitros; ng: nanogramas. Fonte: LHGDH modificado de (SAFRANOW *et al.*, 2007).

Após a etapa de 15 minutos a 95°C de desnaturação inicial, abrimos o termociclador e os tubos de reações e adicionamos os reagentes, especificados na tabela 21, referentes a Taq DNA polimerase.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 21. Protocolo de amplificação para a PCR-HotStart de *ADA*: mix 2

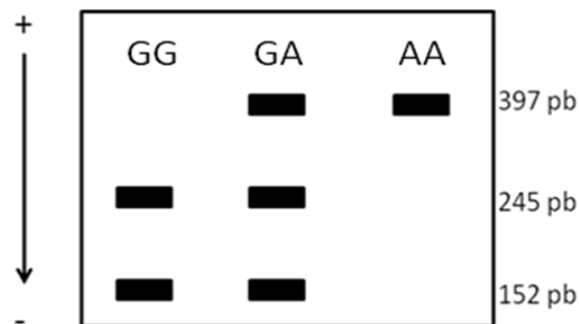
Mix 1	Concentração inicial	Volume (μL)
Tampão sem MgCl_2	10X	2,5
MgCl_2	50 mM	0,8
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ μL	0,2
Volume final da reação		3,5

MgCl_2 : cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; μM : micromolar; μL : microlitros; ng: nanogramas. Fonte: LHGDH modificado de (SAFRANOW et al., 2007)

Após a etapa de desnaturação inicial, a reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: um ciclo com 36 repetições de 40 segundos a 94°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 80 segundos a 68°C para anelamento dos primers e 80 segundos a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 8 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 37 ciclos de repetições.

O amplificado de 397 pares de bases é então digerido com a enzima de restrição *TaqI* a 65°C por três horas. A mutação elimina o sítio de restrição para a enzima, portanto o indivíduo normal (GG) gera dois fragmentos (245 e 152 pb) e o mutante (AA) um fragmento (397 pb) (SAFRANOW et al., 2007). A amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 19).

Figura 19. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para *ADA*.



A22/A22: homocigoto selvagem; A22/G22: heterocigoto para *ADA*; G22/G22: homocigoto para *ADA*; pb: pares de bases. Fonte: LHGDH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

- *Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1 (PAI1) (MARGAGLIONE et al., 1998)*

O polimorfismo de inserção/deleção de 4G/5G (*rs* 1799889) na região promotora (-675 pb) do gene *PAI1* (7q22.1) foi avaliado por PCR- RFLP. Os pares de primers utilizados são: PAI 1 (sense) 5' CAC AGA GAG AGT CTG GCC ACG T 3', PAI 2 (antisense) 5'CCA ACA GAG GAC TCT TGG TCT 3'. O primer sense possui a alteração de uma base nitrogenada, a adenina (A) por citosina (C) para criar na região amplificada, o sítio de restrição para a enzima *BseI* (CCNNNNN ^ NNGG). O protocolo de amplificação esta especificado na tabela 22.

Tabela 22. Protocolo de amplificação para a PCR-RFLP de PAI-1

Mix	Concentração inicial	Volume (µL)
H ₂ O	----	15,55
Tampão sem MgCl ₂	10X	2,5
MgCl ₂	50 mM	0,75
Dntp	1,25 mM cada	2,0
Primer PAI1-1	10,0 µM	1,0
Primer PAI1-2	10,0 µM	1,0
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ µL	0,2
DNA	150 ng/µL	2,0
Volume final da reação		25,0

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados;

mM: milimolar; µM: micromolar; µL: microlitros; ng: nanogramas.

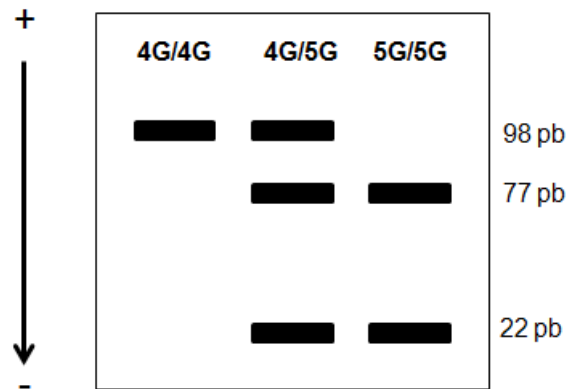
Fonte: LHGDH modificado de (MARGAGLIONE et al., 1998).

A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: 95°C a cinco minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 35 repetições de 60 segundos a 95°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 60 segundos a 62°C para anelamento dos primers e 60 segundos a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 5 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 36 ciclos de repetições.

O amplificado de 98 pares de bases foi então digerido com a enzima de restrição *BseI* a 37°C por 5 minutos. A mutação cria o sítio de restrição para a enzima, portanto o indivíduo normal (4G/4G) gera um fragmento (98 pb) e o mutante (5G/5G) gera dois fragmento (77 e 22 pb) (MARGAGLIONE et al., 1998). A amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 4%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 20).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 20. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para *PAII*



4G/4G: homozigoto selvagem; 4G/5G: heterozigoto para PAI-1;
5G/5G: homozigoto para PAI-1; pb: pares de bases. Fonte: LHGDH.

As tabelas 23, 24 e 25 detalham as investigações moleculares para a caracterização dos grupos amostrais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 23. Especificações da investigação molecular para as hemoglobinopatias

Polimorfismo	Primer	Desnaturação inicial	Ciclagem (ciclos)	Desnaturação	Annealing	Extensão final	Ciclo final	Restrição enzimática	Fragmento (pb)	Eletroforese	Genótipos
Hb S HBB:c.2A>T (rs334)	P1: 5'GGCAGA GCCATCTATT GCTTA3' P2: 5'ACCTTA GGGTTGCC ATAAC3'	94°C/5min	35	94°C/30seg	55°C/30seg	72°C/60 seg	72°C/10min	DdeI- 37°C/ 5min	201,88,87	Gel agarose 2% 80V, 30 min	A/A
									288,201,88,87		A/S
									288,88		S/S
Hb C HBB:c.19G>A (rs33930165)	P1: 5'GGCAGA GCCATCTATT GCTTA3' P2: 5'ACCTTA GGGTTGCC ATAAC3'	94°C/5min	35	94°C/30seg	55°C/30seg	72°C/60 seg	72°C/10min	BseI- 37°C/ 5min	278,104	Gel agarose 2% 80V, 30 min	A/A
									382,278,104		A/C
									382		C/C
Hb D HBB:c.364G>C (rs33946267)	P1: 5'TGCCTC TTTGCACCAT TCTA3' P2: 5'GACCTC CCACATTCCC TTTT3'	94°C/5min	35	94°C/30seg	56°C/30seg	72°C/60 seg	72°C/10min	EcoRI 37°C/ 3h	296,268	Gel agarose 2% 80V, 30 min	A/A
									564.296,268		A/D
									564		D/D
CD39 HBB:c.118C>T (rs11549407)	B5a: 5'GGCTG TCATCACTTA GACCTCA3' B5b: 5'AGAAG GGGAAAGAA AACATCAA3' W: 5'GACTCA AAGAACCTC TG3' M: 5'GACTCA AAGAACCTC TA3'	95°C/7min	32	94°C/50seg	54°C/50seg	72°C/50 seg	72°C/7min	Não possui	W:659,439; M:659	Gel agarose 2% 80V, 30 min	Normal
									W:659,439; M:659,439		Heterozigoto
									W:659 M:659,439		Mutante
IVSI-110 HBB:c.93-21G>A (rs35004220)	B5a: 5'GGCTG TCATCACTTA GACCTCA3' B5b: 5'AGAAG GGGAAAGAA	95°C/7min	32	94°C/50seg	58°C/60seg	72°C/50 seg	72°C/7min	Não possui	W:659,337; M:659	Gel agarose 2% 80V, 30 min	Normal
											Heterozigoto

3. MATERIAL E MÉTODOS

	AACATCAA3' W:5'GGGTGG GAAAATAGA CC3' M:GGGTGGG AAAATAGAC T3'									W:659,337; M:659,337 W:659 M:659,337		<i>Mutante</i>
IVSI-6 HBB:c.92+6T> C (rs35724775)	B5a: 5'GGCTG TCATCACTTA GACCTCA3' B5b: 5'AGAAG GGGAAAGAA AACATCAA3' W:5'GTCTTGT AACCTTGATA 3' M:5'GTCTTGT AACCTTGATG 3'	95°C/7min	32	94°C/50seg	54°C/50seg	72°C/50 seg	72°C/7min	Não possui	W:659,273; M:659 W:659,273; M:659,273 W:659 M:659,273	Gel agarose 2% 80V, 30 min	<i>Normal</i> <i>Heterozigoto</i> <i>Mutante</i>	
IVS-I-1 HBB:c.92+1G> A (rs33971440)	B5a: 5'GGCTG TCATCACTTA GACCTCA3' B5b: 5'AGAAG GGGAAAGAA AACATCAA3' W:5'GTGACC TTGATACCAA C3' M:5'GTGACC TTGATACCAA A3'	95°C/7min	32	94°C/50seg	54°C/50seg	72°C/60 seg	72°C/7min	Não possui	W:659,268; M:659 W:659,268; M:659,268 W:659 M:659,268	Gel agarose 2% 80V, 30 min	<i>Normal</i> <i>Heterozigoto</i> <i>Mutante</i>	

HBB: gene da beta globina; c. região codificante; > troca de nucleotídeos; c.92+6T>C e c.92+1G>A indicam mutações intrônicas em que, se a mutação for no início do intron descrever o último nucleotídeo do exon precedente, o sinal de + e o nucleotídeo do intron mutado; c.93-21G>A indicam mutações intrônicas em que, se a mutação for no fim do intron descrever a posição do nucleotídeo do exon seguinte, o sinal de – e o nucleotídeo do intron mutado. P1 e B5a: primer sense; P2 e B5b: primer anti-sense; W: selvagem; M: mutante. Fonte: LHGDH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 24. Especificações da investigação molecular para os sítios polimórficos que caracterizam os haplótipos da beta globina

Polimorfismo	Primer	Desnaturação inicial	Ciclagem (ciclos)	Desnaturação	Annealing	Extensão final	Ciclo final	Restrição enzimática	Fragmento (pb)	Eletroforese	Genótipos
5 γ ^G (HBG1)	H0:5'AACTGT TGCTTTATAG GATTTT 3'	94°C/5min	35	94°C/45seg	60°C/45seg	72°C/90seg	72°C/7min	Xmn I 37°C/5min	657	Gel agarose 2% 80V, 30 min	-/-
	657,450,200								-/+		
	450,200								+/+		
γ ^G (HBG1)	H2:5'AAGTGT GGAGTGTGC ACATGA 3'	94°C/5min	35	94°C/30seg	55°C/60seg	72°C/60 seg	72°C/7min	Hind III 37°C/5min	780	Gel agarose 2% 80V, 30 min	-/-
	780,430,340								-/+		
	430,340								+/+		
γ ^A (HBG2)	H3:5'TGCTGC TAATGCTTCA TTACAA 3'	94°C/5min	35	94°C/30seg	55°C/60seg	72°C/60 seg	72°C/7min	Hind III 37°C/5min	760	Gel agarose 2% 80V, 30 min	-/-
	760,400,360								-/+		
	400,360								+/+		
$\psi\beta$	H5:5'GAACA GAAGTTGAG ATAGAGA 3'	94°C/5min	35	94°C/30seg	55°C/60seg	72°C/60 seg	72°C/7min	Hinc II 37°C/5min	701	Gel agarose 2% 80V, 30 min	-/-
	701,360,340								-/+		
	360,340								+/+		
3' $\psi\beta$	H7:5'TCTGCA TTTGA CTCTG TTAGC 3'	94°C/5min	35	94°C/30seg	55°C/60seg	72°C/60 seg	72°C/7min	Hinc II 37°C/5min	590	Gel agarose 2% 80V, 30 min	-/-
	590,470,120								-/+		
	470,120								+/+		
5' β (HBB)	H9:5'CTACGC TGACCTCAT AAATG 3'	94°C/5min	35	94°C/45seg	57°C/45seg	72°C/90seg	72°C/7min	Hinf I 37°C/5min	380	Gel agarose 2% 80V, 30 min	-/-
	380,240,140								-/+		
	240,140								+/+		

3. MATERIAL E MÉTODOS

TGTCT 3'

HBB: gene da beta-globina; HBG1: gene da gama glicina; HBG2: gene da gama alanina; ψ : pseudo; +: presença do sítio de restrição para a enzima; -: ausência do sítio de restrição para a enzima. -----: ciclagem a ser padronizada. Fonte: LHGDH.

Tabela 25. Especificações para a investigação molecular dos polimorfismos genéticos envolvidos na vaso-oclusão

Polimorfismo	Primer	Desnaturação inicial	Ciclagem (ciclos)	Desnaturação	Annealing	Extensão final	Ciclo final	Restrição enzimática	Fragmento (pb)	Eletroforese	Genótipos
<i>ECA1</i> I/D 287pb (rs1799752)	1ª Amplificação P1:5'CTGGAGA CCACTCCCATC CTTTCT3' P2:5'GATGTGG CCATCACATTC GTCAGAT3'	95°C/5min	30	95°C/30seg	58°C/30seg	72°C/60seg	72°C/5min	Não possui	490	Gel agarose 2% 80V, 30 min	I/I
									490,190		I/D
	2ª Amplificação P1:5'TGGGACC ACAGCGCCCG CCACTAC3' P2:5'TCGCCAG CCCTCCCATGC CCATAAT3'	95°C/5min	35	95°C/30seg	66°C/30seg	72°C/60seg	72°C/5min	Não possui	355	Gel adarose 2% 80V, 30min	I/D
									0		D/D
<i>ECA2</i> A1075G (rs1978124)	P1:5'TAACAAG TGCAAGGATT TAGG3' P2:5'AGCTGCA ATGAATCATG AT3'	94°C/10min	10	94°C/60seg	65°C/60seg	72°C/60seg	72°C/20min	AvaII- 37°C/ 5min	471	Gel agarose 2% 80V, 30 min	A/A
			15		60°C/60seg				471, 305,166		A/G
			20		58°C/60seg				305, 166		G/G
<i>CBS</i> 844ins68	P1:5'CTGGCCT TGAGCCCTGA A3' P2:5'GGCCGGG CTCTGGACTC3 ,	94°C/5min	30	94°C/60seg	60°C/60seg	72°C/60seg	72°C/7min	Não possui	252	Gel agarose 2% 80V, 30 min	Ins ⁺ /Ins ⁺
252,184	184	Ins ⁺ /Ins-									
<i>PAII</i> 4G/5G (rs1799889)	P1:5'CAC AGA GAG AGT CTG GCC ACG T 3'	95°C/5min	35	95°C/60seg	62°C/60seg	72°C/60seg	72°C/5min	BseII	98	Gel agarose 4% 80V, 40 min	4G/4G
98,77,22	4G/5G										

3. MATERIAL E MÉTODOS

	P2:5'CCA ACA GAG GAC TCT TGG TCT3'									77, 22		5G/5G
ADA G22A (rs73598374)	P1:5'GCCCCGGC CCGTTAAGAA GAGC3'									245, 152		G/G
	P2:5'GGTCAAG TCAGGGGCAG AAGCAGA3'	94°C/15min	36	94°C/40seg	68°C/80seg	72°C/80seg	72°C/8min	TaqI- 37°C/5min	397, 245,152		Gel agarose 2% 80V, 30 min	G/A
									397			A/A

> troca de nucleotídeos; P1: primer sense; P2: primer anti-sense. ----: ciclagem a ser padronizada. Fonte: LHGDH.

3.4. Análises Estatísticas

A comparação entre as frequências dos polimorfismos genéticos avaliados, de acordo com os subgrupos amostrais e com a gravidade clínica, foi analisado pelo teste de qui-quadrado no *software Statistica 9.0* (Statsoft Inc.). Para a análise de sobrevida foi utilizado o teste de *Kaplan-Meier* no *software GraphPad Prism 5*. Para avaliar o risco (grupo prospectivo) e a chance (grupo retrospectivo) de ocorrência das manifestações clínicas moderada e grave a partir do perfil genotípico dos indivíduos do estudo foi realizado a regressão logística múltipla (RLM) no *software BioEstat.Ink 5.0* o qual apresenta o resultado em *odds-ratio* a partir de uma análise binominal (0=insucesso; 1=sucesso). O teste RLM também foi utilizado para verificar o risco e a chance de óbito de acordo com o perfil genotípico dos indivíduos. No subgrupo retrospectivo, a influência dos marcadores genéticos sobre o escore de gravidade (dados quantitativos) foi realizado pelo teste de *General Linear Models* (GLM) no *software Statistica 9.0* (Statsoft Inc.). As informações de como as análises foram realizadas encontra-se nos resultados. Os gráficos foram realizados no *GraphPad Prism 5*. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Frequência alélica e genotípica dos marcadores genéticos avaliados

4.1.1. Genótipos da doença falciforme

Nos 451 indivíduos avaliados, foram encontrados quatro genótipos da DF, sendo o mais frequente o SS com 85,4%, seguido do SC com 12,2%. Os genótipos S β -talassemia e SD apresentaram frequência semelhante com 1,3% e 1,1% respectivamente (Tabela 26). As mutações que causam a S β -talassemia foram investigadas e, das quatro crianças do subgrupo Crianças I, duas apresentam a combinação da Hb S com a mutação CD39, uma com a IVSI-6 e uma não apresentou nenhuma das quatro mutações investigadas. O único indivíduo com S β -talassemia do subgrupo Adolescentes, também não apresentou nenhuma das quatro mutações investigadas e o único S β -talassemia do subgrupo de Adultos apresentou a mutação IVSI-6.

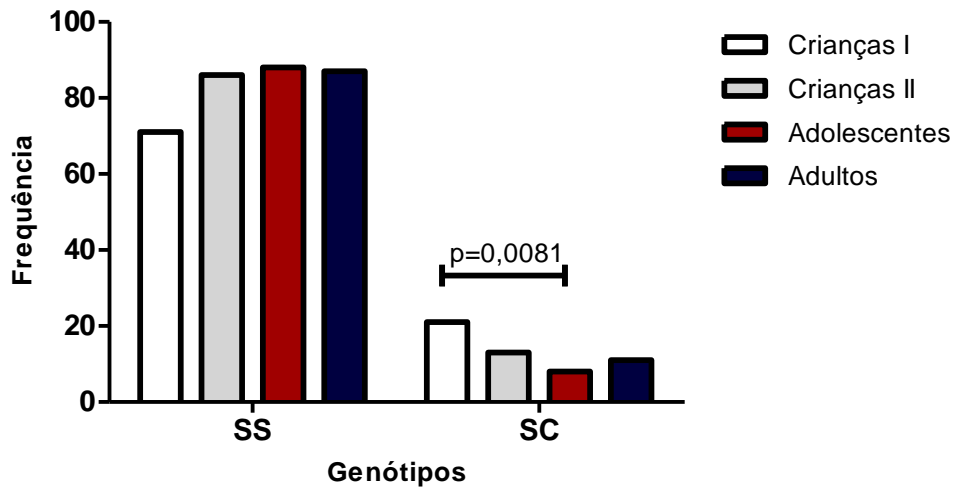
Na comparação entre as frequências genotípicas, devido ao número amostral de alguns genótipos, somente os indivíduos com genótipos SS e SC foram analisados. Para o genótipo SS a frequência foi semelhante entre os quatro subgrupos amostrais. Para o SC, a frequência mais elevada foi verificada no subgrupo Crianças I em comparação com Adolescentes ($p=0,0081$; teste Exato de Fisher) (Figura 21).

Tabela 26. Frequência genotípica de DF entre os subgrupos amostrais

Genótipos da Doença Falciforme	Subgrupos de estudo								Total	
	Crianças I		Crianças II		Adolescentes		Adultos		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
SS	42	71,2	46	86,8	112	88,2	185	87,2	385	85,4
SC	13	22,0	7	13,2	10	7,8	25	11,8	55	12,2
SD	0	0	0	0	4	3,2	1	0,5	5	1,1
S β	4	6,8	0	0	1	0,8	1	0,5	6	1,3
Total	59	100	53	100	127	100	212	100	451	100
Valor de p	SS x SC (p=0,04)*									
	Crianças I x Adolescentes (p<0,001)**									

*: Teste realizado: qui-Quadrado. Comparação realizada apenas entre SS e SC. **: Teste realizado: Exato de Fisher. Valor estatístico significativo: $p < 0,05$. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 21. Comparação entre as frequências dos genótipos SS e SC nos subgrupos amostrais avaliados



Teste realizado: Exato de Fisher. Valor estatístico significativo: $p < 0,05$. Fonte: elaborado pelo autor.

4.1.2. Haplótipos da globina beta-S nos indivíduos com anemia falciforme

A investigação dos haplótipos da globina beta-S foi realizada somente para aqueles indivíduos com a AF sendo, portanto, 42 indivíduos do subgrupo Crianças I, 46 do Crianças II, 112 Adolescentes e 185 do subgrupo Adultos (Tabela 27).

Os genótipos mais frequentes foram o Bantu/Bantu, seguido do Bantu/Benin para os quatro subgrupos amostrais. Mesmo sendo raros em nossa população de estudo, encontramos os haplótipos Saudí, Senegal e Camarões. Os haplótipos atípicos também foram observados, formando o terceiro grupo mais frequente em combinação com o Bantu. Além disso, três indivíduos, sendo um do subgrupo Crianças I e dois do subgrupo Adultos apresentaram os haplótipos atípicos em homozigose. Os haplótipos Atípicos não serão detalhados de acordo com seu padrão de digestão enzimática, para não acrescentarmos outros subgrupos. Portanto, serão classificados somente como “Atípico”. Mesmo não sendo relacionados no presente trabalho, nós avaliamos a presença dos principais atípicos com os níveis de Hb F, perfil hematológico e hemolítico e gravidade clínica na AF. Essa avaliação gerou o artigo “Atypical beta-S haplotypes: classification and genetic modulation in patients with sickle cell anemia” submetido para a revista *Journal of Medical Genetics* (Apêndice I).

A comparação genotípica dos haplótipos entre os subgrupos amostrais foi realizada somente entre os genótipos mais frequentes, sendo Bantu/Bantu (54,6%), Bantu/Benin

4. RESULTADOS

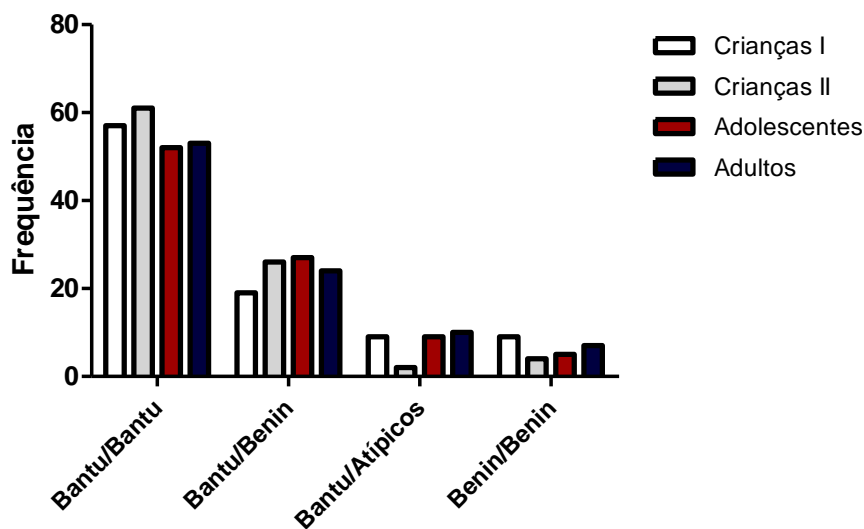
(24,4%), Benin/Benin (6,8%) e Bantu/Atípico (8,6%) (Tabela 27 e Figura 22). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a frequência dos haplótipos entre os subgrupos amostrais ($p = 0,79$).

Tabela 27. Frequência genotípica dos haplótipos da globina beta-S somente para SS

Haplótipos da globina beta-S	Grupos de estudo									
	Crianças I		Crianças II		Adolescentes		Adultos		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Bantu/Bantu	24	57,2	28	60,9	59	52,7	99	53,5	210	54,6
Bantu/Benin	8	19,0	12	26,3	30	26,8	44	23,8	94	24,4
Bantu/Saudí	1	2,4	1	2,1	0	0	2	1,1	4	1,0
Bantu/Senegal	0	0	0	0	2	1,8	0	0	2	0,5
Bantu/Camarões	0	0	0	0	1	0,9	1	0,5	2	0,5
Bantu/Atípicos	4	9,5	1	2,1	10	8,9	18	9,7	33	8,6
Benin/Benin	4	9,5	2	4,3	6	5,3	14	7,6	26	6,8
Benin/Camarões	0	0	0	0	1	0,9	2	1,1	3	0,7
Benin/Atípicos	0	0	2	4,3	3	2,7	3	1,6	8	2,1
Atípicos/Atípicos	1	2,4	0	0	0	0	2	1,1	3	0,8
Total (SS)	42	100	46	100	112	100	185	100	385	100
Valor de p	0,79*									

*Comparação realizada somente entre os haplótipos Bantu/Bantu, Bantu/Benin, Bantu/Atípicos, Benin/Benin. Teste realizado: qui-quadrado. Valor estatístico significativo: $p < 0,05$. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 22. Frequência genotípica dos haplótipos da globina beta-S



Frequência apresentada somente para os quatro grupos de haplótipos mais frequentes. Não houve diferença estatística significativa da frequência dos haplótipos entre os subgrupos amostrais. Teste realizado: qui-quadrado. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

Quanto à frequência alélica, o alelo Bantu (72,1%) foi o mais encontrado, seguido do Benin (20,4%) e Atípicos (6,1%). A comparação entre os três haplótipos mais frequentes nos subgrupos amostrais foi realizada e não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,91$) (Tabela 28).

Tabela 28. Frequência alélica dos haplótipos da globina beta-S no grupo de estudo

Haplótipos (Hb S)	Grupos de estudo									
	Crianças I		Crianças II		Adolescentes		Adultos		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Bantu	61	72,6	70	76,1	161	71,9	263	71,1	555	72,1
Benin	16	19,1	18	19,6	46	20,5	77	20,8	157	20,4
Camarões	0	0	0	0	2	0,9	3	0,8	5	0,6
Senegal	0	0	0	0	2	0,9	0	0	2	0,3
Saudi	1	1,2	1	1,1	0	0	2	0,5	4	0,5
Atípico	6	7,1	3	3,2	13	5,8	25	6,8	47	6,1
Total	84	100	92	100	224	100	370	100	770	100
Valor de p	0,91*									

*Comparação realizada somente entre os haplótipos Bantu, Benin e Atípicos. N= número amostral; %: porcentagem. Teste realizado: qui-quadrado. Valor estatístico significativo: $p < 0,05$. Fonte: elaborado pelo autor.

4.1.3. Polimorfismos genéticos da vasoatividade

A investigação dos polimorfismos genéticos para os genes *CBS* (844ins68), *ECA1* (I/D 287 pb), *ECA2* (A1075G), *PAII* (-675pb 4G/5G) *ADA* (G22A) foi realizada para as 451 pessoas do grupo amostral independente do genótipo para a DF. Para o polimorfismo *ECA2* (A1075G), a análise foi separada entre os gêneros devido a localização desse polimorfismo no cromossomo X (Xp22). Portanto a frequência genotípica foi apresentada somente para as pessoas do gênero feminino. As pessoas do gênero masculino terão somente a frequência alélica.

Na comparação entre a frequência genotípica e alélica para os subgrupos amostrais, não foi verificada diferença estatística significativa. Porém, foi possível observar que, para o polimorfismo da *CBS* o genótipo Ins-/Ins- apresentou-se de duas a três vezes mais frequente do que o genótipo heterozigoto (Ins-/Ins+), e o genótipo Ins+/Ins+ o de menor frequência. O alelo Ins- foi o mais frequente para os quatro subgrupos amostrais (Tabela 29).

4. RESULTADOS

Tabela 29. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo 844ins68 no gene *CBS*

<i>CBS (844ins68)</i>												
Grupos de estudo	Ins-/Ins-		Ins-/Ins+		Ins+/Ins+		Total	Ins-		Ins+		Total
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	
Crianças I	45	76,3	13	22,0	1	1,7	59	103	87,3	15	12,7	118
Crianças II	34	64,1	17	32,1	2	3,8	53	85	80,2	21	19,8	106
Adolescentes	83	65,4	40	31,5	4	3,1	127	206	81,1	48	18,9	254
Adultos	146	68,9	58	27,3	8	3,8	212	350	82,6	74	17,4	424
Valor de p	0,76					0,42						

CBS: gene da Cistationina beta-sintase; Ins-: ausência da inserção de 68 pares de bases (pb); Ins+: presença da inserção de 68 pb. N= número amostral; %: porcentagem. Teste realizado: qui-quadrado. Valor estatístico significativo: $p < 0,05$. Fonte: elaborado pelo autor.

Para o polimorfismo -675 pb 4G/5G no gene *PAII*, o genótipo selvagem apresentou-se com a menor frequência em relação aos genótipos heterozigoto e homozigoto mutante. Com exceção do subgrupo Crianças I, o genótipo com maior frequência foi o 5G/5G. Para todos os grupos amostrais, o alelo 5G apresentou-se até duas vezes mais frequente que o 4G (Tabela 30).

Tabela 30. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo -675pb 4G/5G do gene *PAII*

<i>PAII (-675pb 4G/5G)</i>												
Grupos de estudo	4G/4G		4G/5G		5G/5G		Total	4G		5G		Total
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	
Crianças I	7	11,9	30	50,8	22	37,3	59	44	37,3	74	62,7	118
Crianças II	8	15,1	17	32,1	28	52,8	53	33	31,1	73	68,9	106
Adolescentes	13	10,2	49	38,6	65	51,2	127	75	29,5	179	70,5	254
Adultos	35	16,5	76	35,8	101	47,7	212	146	34,5	278	65,5	424
Valor de p	0,28					0,32						

PAII: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. N= número amostral; %: porcentagem. Teste realizado: qui-quadrado. Valor estatístico significativo: $p < 0,05$. Fonte: elaborado pelo autor.

Para o gene *ECAI*, o genótipo ID foi o mais frequente em todos os subgrupos amostrais, seguido do DD e o menos frequente foi o genótipo II. Quanto aos alelos, o alelo D apresentou-se mais frequente em todos os grupos (Tabela 31).

4. RESULTADOS

Tabela 31. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo I/D 287pb do gene *ECA1*

<i>ECA1 (I/D 287 pb)</i>												
Grupos de estudo	II		ID		DD		Total	I		D		Total
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	
Crianças I	9	15,3	36	61,0	14	23,7	59	54	45,7	64	54,3	118
Crianças II	10	18,9	26	49,0	17	32,1	53	46	43,4	60	56,6	106
Adolescentes	29	22,8	53	41,8	45	35,4	127	111	43,7	143	56,3	254
Adultos	34	16,0	105	49,5	73	34,5	212	173	40,8	251	59,2	424
Valor de p	0,31				0,67							

ECA1: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; I: inserção de 287 pb; D: deleção de 287 pb. N= número amostral; %: porcentagem. Teste realizado: qui-quadrado. Valor estatístico significativo: $p < 0,05$. Fonte: elaborado pelo autor.

Para o polimorfismo no gene *ECA2*, separado por gênero, o genótipo AG foi o mais frequente nos subgrupos Crianças I e II, e o genótipo GG o mais frequente no subgrupo Adolescentes. No subgrupo Adultos, os genótipos AG e GG praticamente apresentaram a mesma frequência. Quanto a frequência alélica, o alelo G foi o mais frequente, sendo duas vezes mais frequente para o subgrupo Adolescentes (Tabela 32).

A frequência alélica do polimorfismo no gene *ECA2* para os indivíduos do gênero masculino, com exceção do subgrupo Crianças I, o alelo G foi o mais frequente (Tabela 32). Interessantemente, foi observada a presença de três indivíduos com o genótipo heterozigoto, sendo um do subgrupo Crianças I, um do Adolescentes e um do Adultos.

4. RESULTADOS

Tabela 32. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo A1075G no gene *ECA2*

<i>ECA2 (Feminino) A1075G</i>												
Grupos de estudo	AA		AG		GG		Total	A		G		Total
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	
Crianças I	4	15,4	13	50,0	9	34,6	26	21	40,4	31	59,6	52
Crianças II	4	14,8	16	59,3	7	25,9	27	24	44,4	30	55,6	54
Adolescentes	7	12,3	20	35,1	30	52,6	57	34	29,8	80	70,2	114
Adultos	22	17,0	53	41,1	54	41,9	129	97	37,6	161	62,4	258
Valor de p	0,31					0,25						
<i>ECA2 (Masculino) A1075G</i>												
Grupos de estudo	A		G		Total	AG						
	N	%	N	%		N	%					
Crianças I	17	53,1	15	46,9	32	1	-					
Crianças II	12	46,1	14	53,9	26	0	-					
Adolescentes	25	36,2	44	63,8	69	1	-					
Adultos	33	40,3	49	59,7	82	1	-					
Valor de p	0,48					-						

ECA2: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2. Teste realizado: qui-quadrado. N= número amostral; %: porcentagem. Valor estatístico significativo: $p < 0,05$. Fonte: elaborado pelo autor.

Para o polimorfismo no gene *ADA*, o genótipo mais frequente foi o selvagem (GG) com quase 90,0% de frequência nos quatro subgrupos amostrais. O genótipo GA não foi frequente, e o AA foi verificado somente em um indivíduo do subgrupo Crianças I. Quanto a frequência alélica, o alelo G apresentou-se mais de 10X superior ao alelo A (Tabela 33).

Tabela 33. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo G22A no gene *ADA*

<i>ADA (G22A)</i>												
Grupos de estudo	GG		GA		AA		Total	G		A		Total
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	
Crianças I	50	84,7	8	13,6	1	1,7	59	108	91,5	10	8,5	118
Crianças II	47	88,7	6	11,3	0	0	53	100	94,4	6	5,6	106
Adolescentes	116	91,3	11	8,7	0	0	127	243	95,6	11	4,4	254
Adultos	188	88,7	24	11,3	0	0	212	400	94,3	24	5,7	424
Valor de p	0,63*					0,48						

ADA: gene da Adenosina Deaminase. N= número amostral; %: porcentagem. Teste realizado: qui-quadrado. Valor estatístico significativo: $p < 0,05$. *O indivíduo AA foi incluído com o GA no subgrupo Crianças I. Fonte: elaborado pelo autor.

4.2. Perfil fenotípico dos subgrupos amostrais

Como as manifestações clínicas observadas para os indivíduos classificados como Crianças I são diferentes daquelas elencadas nos outros subgrupos amostrais, a caracterização do perfil de gravidade foi realizada separadamente. Somente após a caracterização, os dados foram utilizados para as comparações entre os subgrupos.

4.2.1. Grupo Prospectivo

- Manifestações clínicas nos indivíduos do subgrupo Crianças I

Entre os anos de 2013 e 2016 foram realizados cinco levantamentos de prontuários para as informações clínicas, no subgrupo Crianças I. Por ser um estudo prospectivo, o levantamento das manifestações clínicas foi descritivo. Para cada criança foi possível relatar a quantidade de internações, transfusões sanguíneas, febres, PNM entre outras. Quatro crianças foram retiradas do estudo por não fazerem mais acompanhamento no HEMORIO, por mais de um ano. Portanto, o subgrupo Crianças I, a partir dessa análise, será composto por 55 indivíduos. A tabela 34 mostra a ocorrência das manifestações clínicas e os procedimentos de rotina adotados para o tratamento das crianças.

Observamos que todas as complicações clínicas elencadas foram encontradas em pelo menos uma criança com o genótipo SS. As ocorrências de dactilite, esplenomegalia, otite média aguda (OMA) e STA foram observadas somente nos indivíduos com o genótipo SS, sendo 10 com dactilite, três com esplenomegalia, seis com OMA e três com STA. Dessas ocorrências, a mais grave é a STA, que não foi observada nos genótipos SC e S β . Quanto aos procedimentos para tratamento dessas crianças, como a internação e a transfusão sanguínea, mais de 70,0% das crianças com AF foram submetidas à esses procedimentos. Além disso, seis crianças passaram por outros tipos de procedimentos com a finalidade de melhorar a sobrevivência. Duas iniciaram o tratamento com HU, sendo uma menina com início a partir dos três anos de idade e um menino à partir dos quatro anos de idade. Quatro iniciaram regime de hipertransfusão, devido às ocorrências de SE: dois meninos com início aos dois anos de idade, um menino com início aos três anos de idade, que foi submetido à esplenectomia com a mesma idade, e uma menina com início também aos três anos de idade e também com esplenectomia.

4. RESULTADOS

Avaliando as ocorrências clínicas das crianças desse subgrupo amostral, foi verificado que, independente do genótipo da DF, as crianças foram mais suscetíveis a infecções, principalmente às pulmonares, resultando em PNM. A segunda ocorrência mais frequente foi a crise de dor, e aqui, pode ser incluída a dactilite, a qual foi verificada somente nos indivíduos com genótipo SS. A terceira ocorrência mais frequente foi o SE, principalmente nas crianças com AF. A ocorrência de febre também foi uma manifestação muito frequente em todos os genótipos, pois refletiu as manifestações clínicas como PNM e SE.

4. RESULTADOS

Tabela 34. Ocorrência de manifestações clínicas nos DF do grupo de estudo prospectivo (Crianças I)

<i>Genótipos</i>	<i>SS (N=38)</i>				<i>SC (N=13)</i>				<i>Sβ (N=4)</i>				<i>Total (55)</i>			
	NI	NO	Média Ocor.	Freq. (%)	NI	NO	Média Ocor.	Freq. (%)	NI	NO	Média Ocor.	Freq. (%)	NI	NO	Média Ocor.	Freq. (%)
Manifestações clínicas e procedimentos																
Febre	24	43	1,8	63,1	3	4	1,3	23,1	3	6	2,0	75,0	30	53	1,7	54,5
PNM	25	76	3,0	65,7	7	10	1,4	53,8	3	5	1,6	75,0	35	91	2,6	63,6
Crises de dor	23	51	2,2	60,5	2	4	2,0	15,4	3	6	2,0	75,0	28	61	2,1	50,9
IVAS	23	34	1,5	65,8	7	11	1,6	53,8	2	3	1,5	50,0	32	47	1,5	58,2
SE	15	27	1,8	39,5	1	3	3,0	7,7	-	-	-	-	16	30	1,9	29,1
Dactilite	10	17	1,7	26,3	-	-	-	-	-	-	-	-	10	17	1,7	18,2
Broncoespasmos	7	11	1,6	18,4	1	1	1,0	7,7	1	1	1,0	25,0	9	13	1,4	16,3
Esplenomegalia	3	3	1,0	7,9	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	1,0	5,4
GEA	7	7	1,0	18,4	1	3	3,0	7,7	1	1	1,0	25,0	9	11	1,2	16,3
OMA	6	6	1,0	15,8	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	1,0	10,9
Bronquiolite	1	1	1,0	2,6	1	1	1,0	7,7	-	-	-	-	2	2	1,0	3,6
STA	3	3	1,0	7,9	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	1,0	5,4
Internação	28	98	3,5	73,7	5	8	1,6	38,4	2	3	1,5	50,0	35	109	3,1	63,6
Transfusão	30	106	3,5	78,9	1	3	3,0	7,7	1	1	1,0	25,0	32	110	3,4	58,2

IVAS: infecção das vias aéreas superiores; PNM: pneumonia; SE: sequestro esplênico; STA: síndrome torácica aguda; OMA: otite média aguda; GEA: gastro enterite aguda; N: número total; NI: número de indivíduos; NO: número de ocorrências; Média Ocor.: Média de ocorrência por indivíduo (NO/NI); Freq.: frequência do NI em relação ao N. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

- Perfil de gravidade clínica do subgrupo Crianças I

De acordo com o apresentado na metodologia, todas as crianças foram classificadas quanto ao perfil de gravidade clínica por dois métodos: 1) cálculo do escore de gravidade, conforme descrito por Van Den Tweel et al. (2010), e 2) validação dos dados segundo observação clínica do hematologista. A tabela 35 mostra a comparação dos perfis de gravidade realizados.

Tabela 35. Perfil de gravidade clínico do subgrupo Crianças I de acordo com as metodologias de classificação

Métodos de classificação		Ocorrência		Classificação			
Perfil de gravidade clínico	Van DenTweel et al., 2010	Hematologista (Pediatra) HEMORIO	N = 55	%	Sem. (%)	Diver. (%)	
	<i>Classificações Semelhantes</i>						
	Leve	Leve	24	43,7			
	Moderado	Moderado	2	3,6	61,8	-	
	Grave	Grave	8	14,5			
	<i>Classificações Divergentes</i>						
	Grave	Moderado	10	18,2			
	Leve	Moderado	7	12,8			
	Moderado	Grave	2	3,6	-	38,2	
	Leve	Grave	1	1,8			
Grave	Leve	1	1,8				

N: número amostral; %: porcentagem; Sem.: semelhante; Diver.: divergente Fonte: elaborado pelo autor.

De acordo com os dois métodos de classificação do perfil fenotípico de gravidade, foi possível verificar que ocorreu similaridade na classificação em 61,8% dos indivíduos e divergência em 38,2%. Avaliando as divergências, verificamos que àqueles indivíduos com o fenótipo moderado, foram os mais difíceis de serem classificados pelos dois testes.

A classificação como “grave” por Van Den Tweel et al. (2010), em 10 indivíduos do grupo amostral que divergiram quanto à classificação, ocorreu devido ao evento SE. Apresentar SE para os autores é considerado grave e por isso, esse evento quando presente soma 50 pontos no índice de gravidade. O mesmo não foi observado pelos critérios de acompanhamento clínico do HEMORIO, e portanto, o hematologista as classificou com clínica moderada. A classificação dos sete indivíduos como “leve” ocorreu, pois a tabela de classificação de Tweel et al. (2010) não contabiliza a ocorrência de PNM. Pelo hematologista,

4. RESULTADOS

essas sete crianças foram classificadas como moderadas, pois seis apresentaram ocorrência de PNM e uma apresentou quatro ocorrências de IVAS.

Os outros perfis que divergiram foram duas crianças classificadas com gravidade moderada segundo Van Den Tweel et al. (2010), e consideradas com perfil grave segundo o hematologista. Foram consideradas graves, pois ambas apresentam dactilite persistente, parâmetro não avaliado pelo método de Van Den Tweel et al. (2010). Uma criança foi classificada com clínica leve pelo método de Van Den Tweel et al. (2010) e para o hematologista trata-se de uma clínica grave por apresentar a ocorrência de dactilite e velocidade condicional alto para DTC. Uma última criança foi considerada com perfil fenotípico grave por Van Den Tweel et al. (2010) devido a ocorrência de SE, enquanto o hematologista a classificou com clínica leve, por apresentar com dois anos de idade uma ocorrência de SE, PNM com internação e uma transfusão.

Devido às divergências nas classificações, para o presente trabalho optamos pela classificação realizada pelo hematologista do HEMORIO, por retratar mais a realidade brasileira e seguir os protocolos e orientações brasileiros. Assim, a classificação final se baseou em 25 (45,5%) crianças classificadas como leve, 19 (34,5%) como moderada e 11 (20,0%) como grave (Tabela 36).

Tabela 36. Perfil de gravidade clínica do subgrupo Crianças I

Gravidade	Feminino		Masculino		Total		Mediana de idade (meses) Mín-Máx
	N	%	N	%	N	%	
Leve	12	50,0	13	41,9	25	45,5*	40 (32 - 47)
Moderado	8	33,3	11	35,5	19	34,5	42 (32- 47)
Grave	4	16,7	7	22,6	11	20,0	43 (34 - 47)
Total	24	100,0	31	100,0	55	100,0	41 (32 - 47)

N: número amostral; %: porcentagem; Mín.: mínimo; Máx.: máximo. *Comparação realizada por qui-quadrado com diferença estatística significativa (p=0,001). Fonte: elaborado pelo autor.

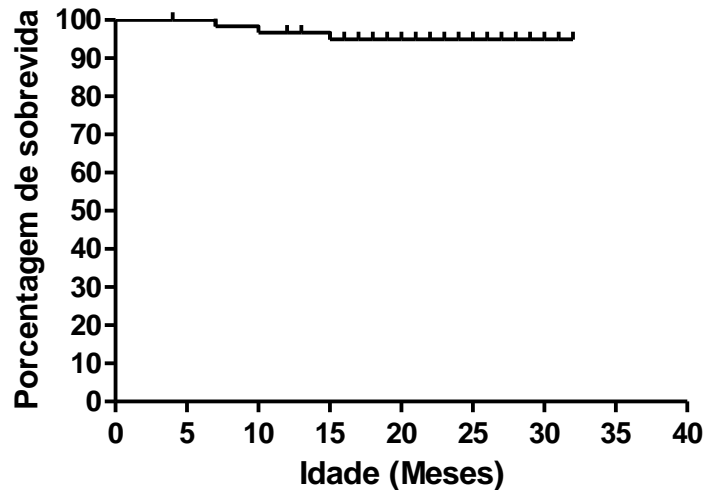
- Óbitos no subgrupo Crianças I

Durante o período de acompanhamento dos indivíduos do subgrupo Crianças I, três crianças vieram a óbito, sendo duas meninas, uma com sete meses de idade (óbito por broncoaspiração) e outra com 15 meses (óbito por PNM e inflamação); e um menino com 10 meses de idade (óbito por causa desconhecida).

4. RESULTADOS

A ocorrência de óbito no subgrupo Crianças I foi de 5,0%, mostrando que a sobrevivência destas crianças está na faixa de 95,0% (Figura 23). Analisando a curva de sobrevivência, o risco de óbito nas crianças com DF é maior até os 15 meses de idade. O perfil genotípico dessas crianças está apresentado na tabela 37.

Figura 23. Análise de sobrevivência das crianças do subgrupo Crianças I



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 37. Informações genotípicas das crianças que evoluíram para óbito do subgrupo Crianças I

Criança	Gênero	Idade (meses)	DF	Haplótipo	Genótipos				
					<i>CBS</i>	<i>PAII</i>	<i>ECA1</i>	<i>ECA2</i>	<i>ADA</i>
1	F	7	SS	Bantu/Benin	Ins-/Ins-	5G/5G	DD	AG	Não
2	M	10	SS	Bantu/Bantu	Ins-/Ins-	4G/5G	II	GG	GG
3	F	15	SS	Bantu/Bantu	Ins-/Ins+	5G/5G	ID	Não	GG

F: feminino; M: masculino; DF: Doença Falciforme; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; Ins-: ausência da inserção de 68 pares de bases (pb); Ins+: presença da inserção de 68 pb. *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; I: inserção de 287 pb; D: deleção de 287 pb. *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2. *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; Não: não amplificou para o teste. Fonte: elaborado pelo autor.

As três crianças apresentavam AF e duas eram homocigotas para o haplótipo Bantu. Quanto aos polimorfismos de vasoatividade avaliados, não foi possível traçar um perfil que pudesse estar relacionado à causa de óbito das crianças. Porém, foi possível verificar que a criança 1 apresentava a homocigose para o alelo D (deleção de 287pb) para a *ECA1*; a criança 2, um alelo 4G para o *PAII*; a criança 3, um alelo D para *ECA1*.

4. RESULTADOS

4.2.2. Grupo retrospectivo

- Manifestações clínicas nos subgrupos Crianças II, Adolescentes e Adultos

O levantamento das manifestações clínicas das pessoas com DF do grupo de estudo retrospectivo foi concluído em 2011. Todas as ocorrências clínicas foram levantadas e classificadas como “Sim”, quando o indivíduo apresentou a ocorrência, e “Não”, quando não apresentou a ocorrência. As manifestações clínicas elencadas foram àquelas que apresentam relação com a vasoatividade sendo AVE, retinopatia, STA, osteonecrose, crises de dor e priapismo. Quanto à retinopatia e ao priapismo, houve uma classificação de “Não se aplica” para aquelas que nunca foram a uma consulta com o especialista, e portanto, não há um diagnóstico que caracterize ter ou não estas manifestações. As classificadas como “Não se aplica” no priapismo são para as pessoas do gênero feminino. A classificação das crises de dor foi separada por ocorrência de crises no último ano antes da coleta da amostra sanguínea para o estudo. De 0 a 2 crises foi considerado brando, de 3 a 5 moderado e acima de 6 grave.

Na tabela 38 elencamos as manifestações clínicas observadas nos indivíduos dos subgrupos Crianças II, Adolescentes e Adultos. De acordo com os dados, podemos verificar que nenhum indivíduo do subgrupo Crianças II apresentou osteonecrose e priapismo. No subgrupo Adolescentes todas as manifestações foram observadas nos indivíduos com genótipo SS e, no subgrupo Adultos, as manifestações foram observadas em pelo menos um indivíduo com genótipos SS e SC.

A fim de verificarmos qual manifestação clínica foi mais frequente entre os subgrupos amostrais, comparamos as ocorrências somente entre os genótipos SS e SC, devido ao número amostral reduzido para os outros genótipos. A tabela 39 resume os resultados.

Os indivíduos com genótipo SS do subgrupo Adolescentes apresentaram quase duas vezes mais ocorrência de AVE (26,8%) em relação aos indivíduos do subgrupo Adultos (15,7%). Já os indivíduos com AF do subgrupo Adultos apresentaram aproximadamente, quatro vezes mais ocorrência de osteonecrose (15,1%) em relação aos indivíduos do subgrupo Adolescentes (3,6%). Quanto aos indivíduos com genótipo SC, foi encontrado somente diferença estatística significativa para a retinopatia, sendo esta mais frequente no subgrupo Adultos (44,0%) em relação ao de Adolescentes (10,0%). A Figura 24 apresenta as diferenças estatísticas encontradas por genótipo em relação aos subgrupos amostrais.

4. RESULTADOS

Tabela 38. Ocorrência de manifestações clínicas nos DF do grupo de estudo retrospectivo

Sub. Am.	Genótipos		Manifestações clínicas												
			AVE		Retinopatia		STA		Osteonecrose		Priapismo		Crises de Dor		
			N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	Ocor.	N	%
Crianças II (N=53)	SS (N=46)	Sim	8	17,4	1	2,2	25	54,3	0	0	0	0	0-2	31	67,4
		Não	38	82,6	29	63,0	21	45,7	46	100,0	22	100,0	3-5	13	28,2
		NA	-	-	16	34,8	-	-	-	-	24	-	>6	2	4,4
	SC (N=7)	Sim	0	0	1	14,3	3	42,8	0	0	0	0	0-2	4	57,1
		Não	7	100,0	4	57,1	4	57,2	8	100,0	5	71,4	3-5	3	42,9
		NA	-	-	2	28,6	-	-	-	-	2	28,6	>6	0	0
Adolescentes (N=127)	SS (N=112)	Sim	30	26,8	10	8,9	65	58,0	4	3,6	12	10,7	0-2	81	72,3
		Não	82	73,2	67	59,8	47	42,0	108	96,4	43	38,4	3-5	23	20,5
		NA	-	-	35	31,3	-	-	-	-	57	50,9	>6	8	7,2
	SC (N=10)	Sim	0	0	1	10,0	2	20,0	0	0	0	0	0-2	7	70,0
		Não	10	100,0	8	80,0	8	80,0	10	100,0	7	70,0	3-5	3	30,0
		NA	-	-	1	10,0	-	-	-	-	3	30,0	>6	0	0,0
	SD (N=4)	Sim	1	25,0	0	0	2	50,0	0	0	0	0	0-2	3	75,0
		Não	3	75,0	3	75,0	2	50,0	4	100,0	3	75,0	3-5	1	25,0
		NA	-	-	1	25,0	-	-	-	-	1	25,0	>6	0	0
	Sβ (N=1)	Sim	0	0	0	0	1	100,0	0	0	0	0	0-2	1	100,0
		Não	1	100,0	1	100,0	0	0	1	100,0	1	100,0	3-5	0	0
		NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>6	-	-
Adultos (N=212)	SS (N=185)	Sim	29	15,7	16	8,6	115	62,2	28	15,1	22	11,9	0-2	116	62,7
		Não	156	84,3	99	53,6	70	37,8	157	84,9	46	24,9	3-5	43	23,2
		NA	-	-	70	37,8	-	-	-	-	117	63,2	>6	26	14,1
	SC (N=25)	Sim	1	4,0	11	44,0	6	24,0	5	20,0	2	8,0	0-2	9	36,0
		Não	24	96,0	10	40,0	19	76,0	20	80,0	11	44,0	3-5	14	56,0
		NA	-	-	4	16,0	-	-	-	-	12	48,0	>6	2	8,0
	SD (N=1)	Sim	0	0	1	100,0	1	100,0	0	0	1	100,0	0-2	1	100,0
		Não	1	100,0	0	0	0	0	1	100,0	0	0	3-5	0	0
		NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>6	0	0
	Sβ (N=1)	Sim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0-2	1	100,0
		Não	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	3-5	0	0
		NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>6	0	0

Sub. Am.: subgrupo amostral; AVE: acidente vascular encefálico; STA: síndrome torácica aguda; 0-2: de zero a duas crises de dor por ano; 3-5: de três a cinco crises de dor por ano; >6: acima de seis crises de dor por ano; NA: não avaliado; N: número amostral; %: porcentagem; Ocor.: ocorrência no último ano. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

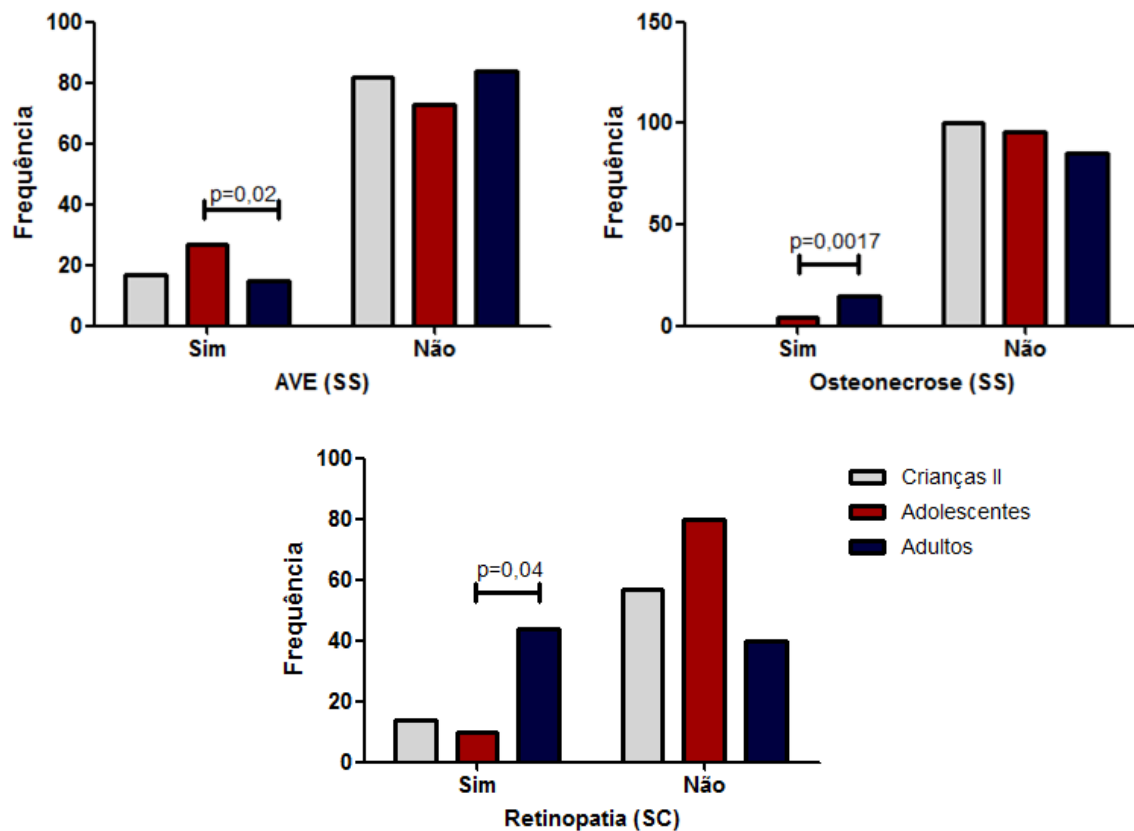
Tabela 39. Comparação das ocorrências das manifestações clínicas entre os subgrupos amostrais

Genótipos	Manifestações clínicas	Comparações (valor de p)		
		Crianças II X Adolescentes	Adolescentes X Adultos	Crianças II X Adultos
SS	AVE	0,22	0,02*	0,82
	Retinopatia	0,17	1,0	0,19
	STA	0,72	0,54	0,39
	Osteonecrose	-	<0,01	-
	Priapismo	-	0,22	-
	Dor (0-2)	0,56	0,10	0,61
	Dor (3-5)	0,41	0,66	0,57
	Dor (>6)	0,72	0,09	0,08
SC	AVE	-	-	-
	Retinopatia	1,0	0,04*	0,33
	STA	0,59	1,0	1,0
	Osteonecrose	-	-	-
	Priapismo	-	-	-
	Dor (0-2)	0,64	0,13	0,40
	Dor (3-5)	0,64	0,26	0,67
	Dor (>6)	-	-	-

AVE: acidente vascular encefálico; STA: síndrome torácica aguda; 0-2: de zero a duas crises de dor por ano; 3-5: de três a cinco crises de dor por ano; >6: acima de seis crises de dor por ano; Teste realizado: qui-quadrado; * valor de p significativo <0,05. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

Figura 24. Frequência das manifestações clínicas com diferença estatística significativa entre os subgrupos do estudo retrospectivo



A. Frequência de AVE nos indivíduos com AF do subgrupo Adolescentes foi maior em relação aos indivíduos do subgrupo Adultos; **B.** Frequência de osteonecrose nos indivíduos com AF do subgrupo Adultos foi maior em relação aos indivíduos do subgrupo Adolescentes; **C.** Frequência de retinopatia nos indivíduos com SC do subgrupo Adultos foi maior em relação aos indivíduos do subgrupo Adolescentes. Teste realizado: qui-quadrado; valor de p significativo <0,05. Fonte: elaborado pelo autor.

- Perfil fenotípico de gravidade do grupo retrospectivo

O perfil fenotípico do grupo de estudo retrospectivo foi classificado utilizando a ferramenta *online* “Sickle Cell Disease Severity Calculator”, como descrito no item “Classificação do perfil fenotípico”. A tabela 40 apresenta a classificação para os três subgrupos amostrais.

4. RESULTADOS

Tabela 40. Classificação do perfil fenotípico dos indivíduos do grupo de estudo retrospectivo

Perfil fenotípico	Gênero	Crianças II (N=53)		Adolescentes (N=127)		Adultos (N=212)	
		N	%	N	%	N	%
		Leve	F	25	55,5	30	41,6
M	20		44,5	42	58,4	7	38,9
Total	45		84,9	72	56,7	18	8,5
Moderado	F	2	25,0	16	44,4	53	56,4
	M	6	75,0	20	55,6	41	43,6
	Total	8	15,1	36	28,3	94	44,4
Grave	F	0	0	11	57,9	65	65,0
	M	0	0	8	42,1	35	35,0
	Total	0	0	19	15,0	100	47,1

N: número amostral; %: frequência; F: feminino; M: masculino; *comparação realizada somente entre os indivíduos do subgrupo Adolescentes e Adultos. Fonte: elaborado pelo autor.

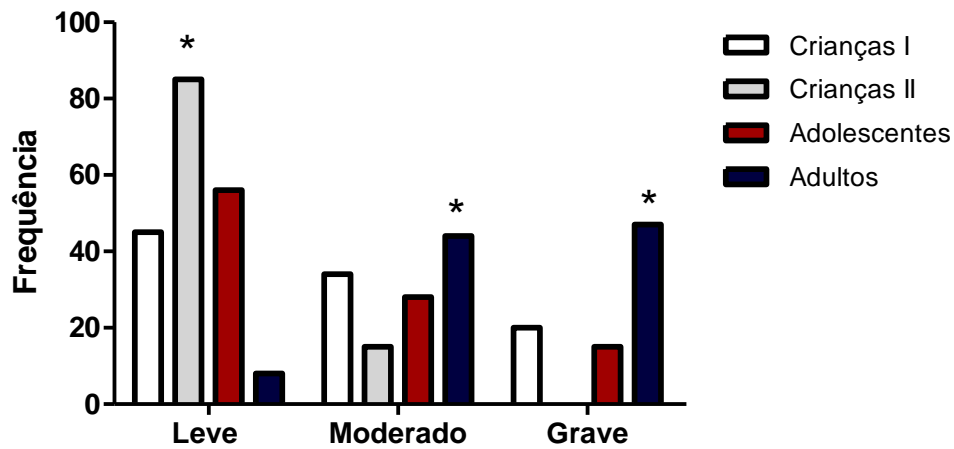
O perfil fenotípico leve e moderado foi verificado nos três subgrupos amostrais. Já o Perfil “grave” não foi verificado no subgrupo Crianças II. Na comparação da gravidade clínica entre os quatro subgrupos amostrais, como apresentado na tabela 41 e figura 25, os indivíduos do subgrupo Crianças II, apresentaram a maior frequência para o perfil fenotípico “leve”, e os perfis “moderado” e “grave” foram frequentes no subgrupo adultos. Para os subgrupos Crianças I e Adolescentes, a maioria dos indivíduos cursa com a clínica leve e moderada.

Tabela 41. Comparação entre o perfil fenotípico nos quatro subgrupos amostrais

Perfil fenotípico	Crianças I (N=55)		Crianças II (N=53)		Adolescentes (N=127)		Adultos (N=212)		Valor de p
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Leve	25	45,5	45	84,9	72	56,7	18	8,5	<0,0001
Moderado	19	34,5	8	15,1	36	28,3	94	44,4	
Grave	11	20,0	0	0	19	15,0	100	47,1	

N: número amostral; %: frequência. Teste realizado: qui-quadrado; valo de p significativo <0,05. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

Figura 25. Comparação da gravidade clínica entre os subgrupos amostrais

Os “*” indicam o subgrupo com maior ocorrência da clínica leve, moderado e grave. Fonte: elaborado pelo autor.

Interessante destacar que, dentro do subgrupo Adultos, há seis indivíduos com idade acima de 60 anos (média de idade de $62 \pm 2,07$), destes cinco com AF (Hb SS) e um com Hb SC. Provavelmente, a expectativa de vida dessas pessoas se deva à boa aderência ao tratamento, e/ou interação de alguns polimorfismos genéticos que os beneficiam melhorando a sobrevida. Assim, elencamos as características genéticas desses pacientes observadas nesse estudo (Tabela 42).

Tabela 42. Características genéticas do grupo de adultos com idade acima de 60 anos

Idade	Gênero	Genótipo	Haplótipo	<i>ECA1</i>	<i>ECA2</i>	<i>CBS</i>	<i>ADA</i>	<i>PAII</i>	Gravidade clínica
65	F	SS	Bantu/Bantu	ID	AG	Ins-/Ins-	GG	4G/4G	Moderado
64	F	SS	Bantu/Bantu	II	AG	Ins+/Ins+	GG	5G/5G	Moderado
63	M	SS	Bantu/Bantu	DD	A	Ins-/Ins-	GG	4G/5G	Moderado
62	M	SS	Bantu/Bantu	ID	G	Ins-/Ins-	GG	4G/5G	Moderado
60	F	SS	Benin/Camarões	ID	AG	Ins-/Ins-	GG	4G/4G	Grave
60	F	SC	----	II	AG	Ins-/Ins-	GA	5G/5G	Grave

F: feminino, M: masculino; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (Obs.: Os indivíduos do gênero masculino só apresentam um alelo, pois o polimorfismo encontra-se no cromossomo X); *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Ins-: ausência da inserção de 68 pares de bases (pb); Ins+: presença da inserção de 68 pb; I: inserção de 287 pb; D: deleção de 287 pb.

Fonte: elaborado pelo autor.

Dentre os seis indivíduos, quatro apresentaram gravidade clínica moderada e dois graves. Destes, somente um apresentou o genótipo SC para a DF, o restante apresentaram a forma mais grave (AF). Quanto aos haplótipos, a maioria apresentou homocigose para o Bantu e um a combinação Benin/Camarões. Para o indivíduo SC o haplótipo não foi

4. RESULTADOS

realizado. Quanto aos polimorfismos genéticos, para *ECA1* o alelo mais frequente foi o I (58,3%), para *ECA2* os alelos apresentaram a mesma frequência (50,0%), para *CBS* o alelo Ins- foi o mais frequente (83,3%), para o *ADA* foi o G (91,6%) foi o mais frequente e para o *PAII* os alelos apresentaram a mesma frequência (50,0%).

- Óbito no grupo de estudo retrospectivo: Crianças II, Adolescentes e Adultos

Durante a última ida ao HEMORIO em abril de 2016, foi possível acessar o registro de óbitos que ocorrem dentro do hospital. Assim, verificamos se algum dos indivíduos que compõem o grupo retrospectivo havia falecido depois de 2011 (ano da coleta de amostra).

No subgrupo Crianças II não verificamos nenhum óbito dos indivíduos. No subgrupo Adolescentes cinco indivíduos (3,9%) vieram a óbito e no subgrupo Adultos 18 indivíduos (8,5%) vieram a óbito. Os dados dos indivíduos, a característica genética e a causa do óbito encontram-se na tabela 43.

Dos cinco indivíduos que vieram a óbito do subgrupo Adolescentes, quatro eram do gênero feminino e um, masculino. A média de idade foi de $18,6 \pm 0,9$ anos (mediana de 18, mínimo 18 anos de máximo de 20 anos de idade). Todos os indivíduos apresentavam a homozigose para a Hb S e para os haplótipos da globina beta-S, somente um apresentava a homozigose para o haplótipo Bantu. De acordo com os polimorfismos avaliados, para a *CBS* e *ADA* não foi verificada a presença do alelo que poderia agravar a clínica do indivíduo (Ins+ e A22, respectivamente); para a *ECA1* foi equilibrada a frequência do alelo I e D e para o *PAII* foi verificado 40,0% da presença do alelo 4G. Quanto a gravidade clínica, somente um apresentava a clínica grave.

No subgrupo Adultos dos 18 indivíduos que vieram a óbito, 13 (72,2%) eram femininos, e cinco (27,8%) masculinos. A média de idade era de $45,7 \pm 12,0$ anos (mediana de 45, mínimo de 21 e máximo de 62 anos). Todos os indivíduos apresentavam AF, sendo nove (50,0%) com homozigose para o haplótipo Bantu, seis (33,3%) com haplótipo Bantu/Benin e três (16,7%) com haplótipo Bantu/Atípico. Quanto aos polimorfismos avaliados, para a *CBS* o alelo mais frequente foi o Ins- com 91,6% (N=33). Para *ECA1*, a frequência do alelo I foi de 44,4% (N=16) e do alelo D de 55,6% (N=20). Para a *ECA2*, dos cinco homens do grupo, três apresentavam o alelo G (60,0%) e dois o alelo A (40,0%). Quanto as mulheres o alelo G apresentou uma frequência de 57,7% (N=15) e o alelo A de 43,3% (N=11). Para o *PAII*, o alelo 4G apresentava uma frequência de 33,3% (N=12) e o 5G de 66,7% (N=24). Para o polimorfismo da *ADA*, foi verificado somente a presença de um

4. RESULTADOS

alelo A (2,7%). Quanto a gravidade clínica a maioria dos indivíduos haviam sido classificados com clínica grave (72,2%).

No subgrupo Adolescentes a maior causa de óbito foi a septicemia responsável por 60,0% dos casos. Um indivíduo veio à óbito por STA e um não foi possível saber a causa correta. No subgrupo Adultos, a STA foi responsável pela maioria dos óbitos com 44,4% dos casos. Problemas cardíacos foram responsáveis por 16,6%; septicemia e insuficiência hepática aguda apresentaram a mesma frequência de ocorrência com 11,1% cada e, menos frequente, a ocorrência de AVE, morte súbita e morte durante crise algica.

4. RESULTADOS

Tabela 43. Informações genótípicas e clínicas dos óbitos nos subgrupos Adolescentes e Adultos

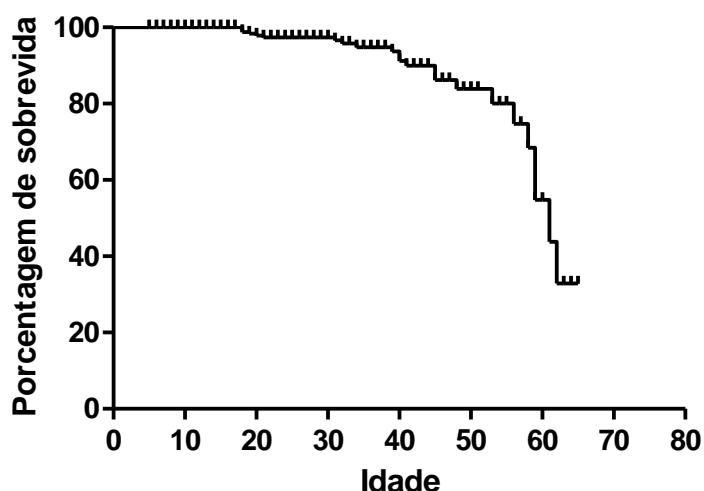
Adolescentes											
ID	Gênero	Idade	Genótipo	Haplótipo	CBS	ECA1	ECA2	PAII	ADA	Grav. Clin.	Causa do óbito
1	F	18	SS	Benin/Benin	Ins-/Ins-	II	GG	4G/5G	GG	Leve	Septicemia
2	M	20	SS	Bantu/Bantu	Ins-/Ins-	DD	G	5G/5G	GG	Mod.	-
3	F	18	SS	Bantu/Atp	Ins-/Ins-	II	GG	4G/5G	GG	Leve	STA
4	F	18	SS	Bantu/Benin	Ins-/Ins-	DD	AG	4G/5G	GG	Grave	Septicemia
5	F	19	SS	Bantu/Benin	Ins-/Ins-	ID	GG	4G/5G	GG	Leve	Septicemia
Adultos											
ID	Gênero	Idade	Genótipo	Haplótipo	CBS	ECA1	ECA2	PAII	ADA	Grav. Clin.	Causa do óbito
1	F	61	SS	Bantu/Atp	Ins-/Ins-	DD	GG	4G/4G	GG	Grave	Septicemia
2	F	59	SS	Bantu/Benin	Ins-/Ins-	ID	GG	5G/5G	GG	Mod.	STA
3	F	56	SS	Bantu/Bantu	Ins-/Ins-	II	AA	4G/5G	GG	Grave	Arritmia cardíaca
4	M	62	SS	Bantu/Bantu	Ins-/Ins-	ID	G	4G/5G	GG	Mod.	STA
5	F	39	SS	Bantu/Bantu	Ins-/Ins-	ID	AG	4G/5G	GG	Grave	Insuficiência cardíaca congestiva
6	F	48	SS	Bantu/Bantu	Ins-/Ins-	ID	AA	4G/5G	GG	Mod.	Morte súbita
7	F	40	SS	Bantu/Bantu	Ins-/Ins+	DD	GG	5G/5G	GG	Grave	STA
8	M	21	SS	Bantu/Benin	Ins-/Ins-	DD	G	4G/5G	GG	Grave	AVE
9	F	31	SS	Bantu/Bantu	Ins-/Ins+	ID	GG	5G/5G	GG	Grave	STA
10	F	32	SS	Bantu/Bantu	Ins-/Ins+	ID	GG	4G/4G	GG	Grave	Morte durante crise algica
11	M	45	SS	Bantu/Bantu	Ins-/Ins-	II	A	5G/5G	GG	Grave	STA
12	F	45	SS	Bantu/Atp	Ins-/Ins-	ID	AG	4G/5G	GG	Mod.	STA
13	F	34	SS	Bantu/Benin	Ins-/Ins-	DD	AG	5G/5G	GG	Mod.	STA
14	F	53	SS	Bantu/Bantu	Ins-/Ins-	ID	AG	5G/5G	GG	Grave	STA
15	F	41	SS	Bantu/Atp	Ins-/Ins-	ID	AA	4G/5G	GG	Grave	Insuficiência hepática aguda
16	M	40	SS	Bantu/Benin	Ins-/Ins-	DD	G	5G/5G	GA	Grave	Insuficiência hepática aguda
17	F	59	SS	Bantu/Benin	Ins-/Ins-	II	AG	4G/5G	GG	Grave	Choque cardiogênico
18	M	58	SS	Bantu/Benin	Ins-/Ins-	ID	A	5G/5G	GG	Grave	Septicemia

ID: identificação; F: feminino; M: masculino; Atp.: Atípico; CBS: gene da Cistationina beta-sintase; ECA1: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; ECA2: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (Obs.: Os indivíduos do gênero masculino só apresentam um alelo, pois o polimorfismo encontra-se no cromossomo X); ADA: gene da Adenosina Deaminase; PAII: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Ins-: ausência da inserção de 68 pares de bases (pb); Ins+: presença da inserção de 68 pb; I: inserção de 287 pb; D: deleção de 287 pb. Grav. Clin.: gravidade clínica; Mod.: Moderado; - causa desconhecida. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

No gráfico de sobrevida (Figura 26) desenhado a partir dos três subgrupos amostrais do estudo retrospectivo foi possível verificar que até os 20 anos de idade, os indivíduos com DF apresentam uma taxa de sobrevida de quase 100,0 %. Após os 20 anos até aos 40 anos de idade, esta taxa decai um pouco, mas fica ao redor de 90,0% de sobrevida. Entre os 40 anos até os 60 anos de idade, a sobrevida diminui muito variando de 50,0 a 80,0%. Após os 60 anos de idade, a sobrevida dos indivíduos com DF fica abaixo de 40,0%.

Figura 26. Curva de sobrevida do grupo de estudo retrospectivo



A porcentagem de sobrevida mostra que o risco de morte aumenta depois dos 40 anos de idade. Fonte: elaborado pelo autor.

4.3. Avaliação dos marcadores genéticos em relação ao perfil fenotípico de gravidade

A fim de verificar a influência dos polimorfismos genéticos no perfil de gravidade clínica dos subgrupos amostrais, foi utilizado o teste de RLM, o qual verifica a probabilidade de um evento ocorrer em função de outros fatores, por meio de dados qualitativos. As análises foram realizadas separadas, de acordo com o estudo prospectivo e retrospectivo, pois o resultado dado em *odds ratio* (OR) é interpretado como risco de ocorrência para o grupo prospectivo, e chance de ocorrência para o grupo retrospectivo.

Todas as análises de RLM foram padronizadas para gênero (0= feminino; 1= masculino); genótipo da DF (0= genótipo não SS; 1= genótipo SS) e haplótipo da globina beta-S (0= haplótipo não Bantu/Bantu; 1= haplótipo Bantu/Bantu). A idade foi inserida como variável contínua, e o teste considera a idade para corrigir os resultados obtidos. Foram realizados dois tipos de análise de acordo com o modelo recessivo de herança dos

4. RESULTADOS

polimorfismos genéticos (homozigoto mutante *versus* homozigoto selvagem + heterozigoto) e modelo dominante de herança (homozigoto mutante + heterozigoto *versus* homozigoto selvagem). Para os indivíduos do gênero masculino o polimorfismo do gene *ECA2* (A1075G) foi considerado sendo no modelo recessivo e dominante o alelo A como 0 e o alelo G como 1. Quanto a gravidade clínica, foram consideradas duas combinações para as análises de RLM: 1ª combinação: 0 = leve, 1 = moderado + grave; 2ª combinação: 0 = leve + moderado, 1 = grave.

4.3.1. Marcadores genéticos e perfil de gravidade no grupo prospectivo

Na primeira análise de RLM realizada para o grupo prospectivo, considerando o modelo recessivo de herança dos polimorfismos genéticos e a gravidade clínica leve como insucesso e moderada e grave como sucesso, foi possível verificar que a única variável independente que interferiu foi o genótipo da DF (Tabela 44). Com este resultado podemos inferir que o risco de uma criança com DF apresentar clínica moderada ou grave é cerca de 17 vezes maior quando possui o genótipo SS, ou seja a AF. Na segunda análise de RLM considerando a gravidade clínica leve e moderada como insucesso e grave como sucesso, não foi possível verificar a influência dos polimorfismos genéticos como moduladores do perfil fenotípico das crianças (Tabela 45).

Tabela 44. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo prospectivo)

Modelo Recessivo (Gravidade: 0= leve; 1= moderado + grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,78	1,21	0,30 - 4,87
Idade	0,63	1,32	0,42 - 4,24
Genótipos da DF	0,005	16,90	2,28 - 125,07
Haplótipo	0,43	0,50	0,09 - 2,84
<i>CBS</i>	0,95	13332,67	0,00 - infinito
<i>PAII</i>	0,21	2,43	0,59 - 10,03
<i>ECA1</i>	0,66	1,38	0,32 - 5,95
<i>ECA2</i>	0,05	0,22	0,05 - 1,01
<i>ADA</i>	0,95	0,0001	0,00 - infinito

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

Tabela 45. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo prospectivo)

Modelo Recessivo (Gravidade: 0= leve + moderado; 1= grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,26	3,19	0,42 - 24,27
Idade	0,08	0,16	0,02 - 1,27
Genótipos da DF	0,72	265250,95	0,00 - infinito
Haplótipo	0,11	0,16	0,02 - 1,53
<i>CBS</i>	0,93	0,000	0,00 - infinito
<i>PAII</i>	0,21	0,25	0,03 - 2,19
<i>ECA1</i>	0,18	0,21	0,02 - 2,09
<i>ECA2</i>	0,05	0,12	0,01 - 1,02
<i>ADA</i>	0,98	0,11	0,00 - infinito

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

Nas análises realizadas com o modelo dominante de herança dos polimorfismos genéticos, foram verificadas a influência do genótipo da DF com um risco de aproximadamente 23 vezes de uma criança com DF apresentar clínica moderada ou grave quando possui o genótipo SS (Tabela 46). Porém, este risco não ocorreu quando considerado o perfil leve e moderado como insucesso e grave como sucesso (Tabela 47).

Tabela 46. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo prospectivo)

Modelo Dominante (Gravidade: 0= leve; 1= moderado + grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,86	0,86	0,17 - 4,50
Idade	0,33	1,84	0,53 - 6,38
Genótipos da DF	0,008	22,81	2,22 - 234,84
Haplótipo	0,40	0,43	0,06 - 3,14
<i>CBS</i>	0,27	0,34	0,05 - 2,32
<i>PAII</i>	0,33	2,71	0,36 - 20,26
<i>ECA1</i>	0,07	6,06	0,86 - 42,85
<i>ECA2</i>	0,06	0,17	0,003 - 1,11
<i>ADA</i>	0,70	1,47	0,20 - 10,61

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

Tabela 47. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo prospectivo)

Modelo Dominante (Gravidade: 0= leve + moderado; 1= grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,85	1,19	0,18 - 7,85
Idade	0,36	0,45	0,08 - 2,53
Genótipos da DF	0,77	33349,44	0,00 - infinito
Haplótipo	0,47	0,52	0,09 - 3,01
<i>CBS</i>	0,33	0,32	0,03 - 3,22
<i>PAII</i>	0,62	0,60	0,08 - 4,51
<i>ECA1</i>	0,94	0,91	0,06 - 14,50
<i>ECA2</i>	0,18	0,29	0,05 - 1,82
<i>ADA</i>	0,85	0,0002	0,00 - infinito

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

Devido a influência do genótipo SS como modulador do perfil fenotípico das crianças com DF, fizemos as mesmas análises considerando somente os indivíduos com AF para verificar se os polimorfismos genéticos estudados apresentariam alguma influência no perfil fenotípico de gravidade destes indivíduos.

De acordo com as análises apresentadas nas tabelas 48, 49, 50 e 51, foi possível verificar somente um resultado significativo para o polimorfismo da *ECA2* ($p=0,03$; $OR=0,11$; $IC\ 95\% = 0,02 - 0,87$). Este resultado pode sugerir que este polimorfismo apresenta um efeito protetor para a criança com AF, pois o risco de uma criança com AF apresentar clínica moderada ou grave é menor quando possui o alelo G em homozigose (GG) para o polimorfismo A1075G da *ECA2* (Tabela 48).

4. RESULTADOS

Tabela 48. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo prospectivo)

Modelo Recessivo (Gravidade: 0= leve; 1= moderado + grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,77	1,31	0,20 - 8,44
Idade	0,74	1,30	0,26 - 6,51
Haplótipo	0,34	0,38	0,05 - 2,81
<i>CBS</i>	0,64	0,43	0,01 - 15,26
<i>PAII</i>	0,24	3,23	0,45 - 23,19
<i>ECA1</i>	0,44	2,23	0,28 - 17,64
<i>ECA2</i>	0,03	0,11	0,02 - 0,87
<i>ADA</i>	1,0	1,42	0,00 - infinito

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 49. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo prospectivo)

Modelo Recessivo (Gravidade: 0= leve + moderado; 1= grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,26	3,17	0,42 - 24,18
Idade	0,08	0,16	0,02 - 1,28
Haplótipo	0,11	0,17	0,02 - 1,55
<i>CBS</i>	0,89	0,000	0,00 - infinito
<i>PAII</i>	0,21	0,25	0,03 - 2,19
<i>ECA1</i>	0,19	0,21	0,02 - 2,14
<i>ECA2</i>	0,05	0,12	0,01 - 1,04
<i>ADA</i>	1,0	557466,71	0,00 - infinito

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

Tabela 50. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo prospectivo)

Modelo Dominante (Gravidade: 0= leve; 1= moderado + grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,88	0,86	0,12 - 6,28
Idade	0,54	1,62	0,33 - 7,92
Haplótipo	0,43	0,44	0,06 - 3,40
<i>CBS</i>	0,92	0,89	0,09 - 9,06
<i>PAII</i>	0,30	2,89	0,38 - 22,2
<i>ECA1</i>	0,22	4,06	0,41 - 39,84
<i>ECA2</i>	0,17	0,24	0,03 - 1,87
<i>ADA</i>	0,72	1,67	0,10 - 28,46

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 51. Risco de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo prospectivo)

Modelo Dominante (Gravidade: 0= leve + moderado; 1= grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,85	1,19	0,18 - 7,85
Idade	0,36	0,45	0,08 - 2,53
Haplótipo	0,47	0,52	0,09 - 3,01
<i>CBS</i>	0,33	0,32	0,03 - 3,22
<i>PAII</i>	0,62	0,60	0,08 - 4,51
<i>ECA1</i>	0,94	0,91	0,06 - 14,51
<i>ECA2</i>	0,8	0,29	0,05 - 1,82
<i>ADA</i>	0,90	0,00	0,00 - infinito

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

4.3.2. Marcadores genéticos e perfil de gravidade clínica no grupo retrospectivo

Antes de iniciar as análises de RLM no grupo retrospectivo, foi verificado se o uso de HU interferiria na evolução clínica das pessoas com DF e o resultado foi negativo (Tabela 52). Devido a isso, as análises de RLM foram realizadas não considerando essa variável.

Tabela 52. Comparação do uso de HU em relação a gravidade clínica

Gravidade Clínica	HU+		HU-		p-valor
	N	%	N	%	
Leve	60	35,3	75	33,9	0,92
Moderado	60	35,3	77	34,8	
Grave	50	29,4	69	31,3	
Total	170	100,0	221	100,0	

HU+: em uso de HU; HU-: sem uso de HU; N: número amostral; %: porcentagem. Fonte: elaborado pelo autor.

Nas análises de RLM realizadas para o grupo retrospectivo, independente do modelo recessivo ou dominante de herança dos polimorfismos genéticos, foi possível verificar que o genótipo SS, ou seja, a AF influencia na gravidade clínica dos indivíduos, sendo que a chance de ocorrência de clínica moderada ou grave é cerca de nove vezes maior no modelo recessivo (Tabela 53) e sete vezes maior no modelo dominante de herança (Tabela 55) e a chance de ocorrência de clínica grave é cerca de quatro vezes maior tanto para modelo o recessivo (Tabela 54) quanto para o de dominância de herança dos polimorfismos genéticos (Tabela 56).

4. RESULTADOS

Tabela 53. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo retrospectivo)

Modelo Recessivo (Gravidade: 0= leve; 1= moderado + grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,38	1,27	0,74 - 2,21
Idade	<0,0001	1,23	1,18 - 1,29
Genótipos da DF	0,0001	8,97	2,90 - 27,73
Haplótipo	0,95	1,01	0,58 - 1,77
<i>CBS</i>	0,90	0,92	0,25 - 3,38
<i>PAII</i>	0,63	0,88	0,52 - 1,50
<i>ECA1</i>	0,78	1,08	0,61 - 1,90
<i>ECA2</i>	0,65	1,13	0,66 - 1,95
<i>ADA</i>	1,0	23,25	0,00 - infinito

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 54. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo retrospectivo)

Modelo Recessivo (Gravidade: 0= leve + moderado; 1= grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,31	0,77	0,47 - 1,28
Idade	<0,0001	1,06	1,04 - 1,08
Genótipos da DF	0,003	3,94	1,56 - 9,94
Haplótipo	0,97	0,99	0,60 - 1,63
<i>CBS</i>	0,53	1,47	0,43 - 5,08
<i>PAII</i>	0,41	1,21	0,76 - 1,96
<i>ECA1</i>	0,26	1,32	0,81 - 2,17
<i>ECA2</i>	0,88	1,03	0,64 - 1,67
<i>ADA</i>	1,0	5,67	0,00 - infinito

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

Tabela 55. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo retrospectivo)

Modelo Dominante (Gravidade: 0= leve; 1= moderado + grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,29	1,36	0,77 - 2,42
Idade	<0,0001	1,19	1,15 - 1,25
Genótipos da DF	0,0002	7,60	2,60 - 22,23
Haplótipo	0,88	1,04	0,58 - 1,86
<i>CBS</i>	0,27	0,72	0,41 - 1,29
<i>PAII</i>	0,66	0,83	0,38 - 1,84
<i>ECA1</i>	0,92	1,03	0,53 - 2,02
<i>ECA2</i>	0,66	1,15	0,60 - 2,20
<i>ADA</i>	0,57	1,31	0,51 - 3,34

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 56. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos (Grupo retrospectivo)

Modelo Dominante (Gravidade: 0= leve + moderado; 1= grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,55	0,85	0,51 - 1,43
Idade	<0,0001	1,06	1,04 - 1,08
Genótipos da DF	0,0049	3,85	1,51 - 9,79
Haplótipo	0,96	1,01	0,61 - 1,66
<i>CBS</i>	0,63	1,13	0,68 - 1,89
<i>PAII</i>	0,80	1,09	0,55 - 2,16
<i>ECA1</i>	0,89	0,95	0,52 - 1,76
<i>ECA2</i>	0,26	1,38	0,78 - 2,46
<i>ADA</i>	0,09	1,86	0,91 - 3,82

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

Tendo em vista a influência do genótipo SS como modulador do perfil fenotípico de gravidade dos indivíduos do grupo retrospectivo, as mesmas análises foram realizadas somente para os indivíduos com AF, e não foi possível verificar a influência dos marcadores genéticos na gravidade clínica (Tabelas 57, 58, 59 e 60).

Tabela 57. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo retrospectivo)

Modelo Recessivo (Gravidade: 0= leve; 1= moderado + grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,31	1,38	0,73 - 2,60
Idade	<0,0001	1,27	1,20 - 1,36
Haplótipo	0,76	1,09	0,59 - 2,04
<i>CBS</i>	0,59	0,66	0,15 - 3,03
<i>PAII</i>	0,60	0,85	0,46 - 1,57
<i>ECA1</i>	0,79	1,09	0,57 - 2,09
<i>ECA2</i>	0,85	1,05	0,57 - 1,97
<i>ADA</i>	1,0	44,30	0,00 - infinito

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 58. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo retrospectivo)

Modelo Recessivo (Gravidade: 0= leve + moderado; 1= grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,52	0,84	0,49 - 1,43
Idade	<0,0001	1,07	1,05 - 1,09
Haplótipo	0,98	1,00	0,60 - 1,67
<i>CBS</i>	0,99	1,00	0,26 - 3,85
<i>PAII</i>	0,42	1,22	0,74 - 2,04
<i>ECA1</i>	0,15	1,46	0,87 - 2,48
<i>ECA2</i>	0,79	1,07	0,64 - 1,78
<i>ADA</i>	1,00	8,86	0,00 - infinito

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

Tabela 59. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo retrospectivo)

Modelo Dominante (Gravidade: 0= leve; 1= moderado + grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,22	1,49	0,78 - 2,86
Idade	<0,0001	1,27	1,20 - 1,36
Haplótipo	0,77	1,09	0,58 - 2,07
<i>CBS</i>	0,25	0,68	0,36 - 1,32
<i>PAII</i>	0,90	0,94	0,38 - 2,36
<i>ECA1</i>	0,95	1,01	0,49 - 2,13
<i>ECA2</i>	0,45	1,32	0,64 - 2,74
<i>ADA</i>	0,55	1,37	0,49 - 3,89

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 60. Chance de ocorrência da gravidade clínica de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com AF (Grupo retrospectivo)

Modelo Dominante (Gravidade: 0= leve + moderado; 1= grave)			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,86	0,95	0,55 - 1,65
Idade	<0,0001	1,07	1,05 - 1,09
Haplótipo	0,90	1,03	0,65 - 1,72
<i>CBS</i>	0,63	1,14	0,66 - 1,96
<i>PAII</i>	0,90	1,04	0,51 - 2,12
<i>ECA1</i>	0,95	1,01	0,53 - 1,94
<i>ECA2</i>	0,18	1,50	0,82 - 2,78
<i>ADA</i>	0,08	1,93	0,91 - 4,13

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

A gravidade clínica leve, moderada e grave dos indivíduos do grupo retrospectivo, apresenta também um escore de gravidade apresentado como variável quantitativa (como informado na metodologia). Devido a isso, foi possível realizar o teste de GLM o qual verifica a influência de dados qualitativos em relação aos dados quantitativos. O teste foi realizado somente para os indivíduos com AF e foi corrigido para gênero, idade e uso de HU. Além da influência dos polimorfismos genéticos, foi possível verificar a interação entre eles os quais

4. RESULTADOS

foram agrupados de acordo com a via de ação sendo *CBS + PAII*, *ECA1+ECA2* e *ADA*. Os resultados obtidos não apresentaram influência dos polimorfismos genéticos quanto os escores de gravidade clínico nos indivíduos com AF (Tabela 61).

Tabela 61. Resultado do teste GLM realizado nos indivíduos com AF do grupo retrospectivo

<i>CBS + PAII</i>		<i>ECA1 + ECA2</i>		<i>ADA</i>	
	p-valor		p-valor		p-valor
Gênero	0,85	Gênero	0,44	Gênero	0,95
Idade	0,000	Idade	0,000	Idade	0,000
HU	0,15	HU	0,09	HU	0,09
<i>CBS</i>	0,76	<i>ECA1</i>	0,19	<i>ADA</i>	0,39
<i>PAI</i>	0,06	<i>ECA2</i>	0,29		
<i>CBS+PAII</i>	0,29	<i>ECA1+ECA2</i>	0,33		

CBS: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

4.3.3. Marcadores genéticos e óbito nos grupos prospectivo e retrospectivo

A fim de verificar se os marcadores genéticos influenciaram nos óbitos dos indivíduos do grupo prospectivo e retrospectivo, a análise de RLM foi realizada tomando como sucesso os indivíduos que evoluíram para o óbito. Tanto no modelo recessivo, quanto no modelo dominante, para os dois grupos de estudo, não foi verificada a influência dos marcadores genéticos em relação ao óbito nos indivíduos com DF (Tabela 62, 63, 64 e 65).

4. RESULTADOS

Tabela 62. Risco de morte de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com DF (Grupo prospectivo)

Modelo Recessivo			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,47	0,35	0,02 - 6,09
Idade	0,66	4119,36	0,00 - infinito
Genótipo da DF	0,63	10029035,91	0,00 - infinito
Haplótipo	0,49	0,41	0,03 - 5,20
<i>CBS</i>	0,95	0,0001	0,00 - infinito
<i>PAII</i>	0,22	9,93	0,24 - 406,53
<i>ECA1</i>	0,70	0,000	0,00 - infinito
<i>ECA2</i>	0,76	0,61	0,02 - 15,29
<i>ADA</i>	0,94	1594,13	0,00 - infinito

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 63. Risco de morte de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com DF (Grupo prospectivo)

Modelo Dominante			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,77	0,65	0,04 - 11,84
Idade	0,49	757450,86	0,00 - infinito
Genótipo da DF	0,47	496945,83	0,00 - infinito
Haplótipo	0,49	0,37	0,02 - 6,37
<i>CBS</i>	0,55	0,000	0,00 - infinito
<i>PAII</i>	0,84	3821,88	0,00 - infinito
<i>ECA1</i>	0,69	696874,39	0,00 - infinito
<i>ECA2</i>	0,74	4354,33	0,00 - infinito
<i>ADA</i>	0,56	2644,92	0,00 - infinito

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS

Tabela 64. Chance de ocorrência de morte de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com DF (Grupo retrospectivo)

Modelo Recessivo			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,33	0,60	0,22 - 1,67
Idade	<0,0001	1,06	1,03 - 1,10
Genótipo da DF	0,67	8467,26	0,00 - infinito
Haplótipo	0,33	0,64	0,26 - 1,57
<i>CBS</i>	0,83	0,0002	0,00 - infinito
<i>PAII</i>	0,64	0,80	0,32 - 2,01
<i>ECA1</i>	0,80	0,88	0,33 - 2,35
<i>ECA2</i>	0,54	1,32	0,54 - 3,26
<i>ADA</i>	1,00	741135,76	0,00 - infinito

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 65. Chance de ocorrência de morte de acordo com marcadores genéticos para os indivíduos com DF (Grupo retrospectivo)

Modelo Dominante			
Variáveis independentes	p-valor	OR	IC 95%
Gênero	0,49	0,68	0,23 - 2,02
Idade	<0,0001	1,06	1,03 - 1,10
Genótipo da DF	0,67	8150,43	0,00 - infinito
Haplótipo	0,36	0,65	0,27 - 1,63
<i>CBS</i>	0,12	0,36	0,10 - 1,31
<i>PAII</i>	0,21	2,71	0,56 - 13,22
<i>ECA1</i>	0,97	1,01	0,34 - 3,07
<i>ECA2</i>	0,83	1,2	0,36 - 3,53
<i>ADA</i>	0,45	0,45	0,06 - 3,65

OR: *odds ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *CBS*: gene da Cistationina beta-sintase; *ECA1*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina - 1; *ECA2*: gene da Enzima Conversora de Angiotensina 2; *ADA*: gene da Adenosina Deaminase; *PAII*: gene do Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1. Fonte: elaborado pelo autor.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O foco principal do presente trabalho foi verificar a influência de marcadores genéticos no perfil fenotípico de gravidade clínica nos indivíduos com DF, e como essa modulação se apresenta e evolui de acordo com as fases de desenvolvimento. Os marcadores genéticos avaliados neste estudo foram selecionados por estarem envolvidos diretamente ou indiretamente em vias metabólicas importantes que controlam a vasoatividade, como a *ECA1* e *ECA2* presentes no SRAA que regula a pressão sanguínea por ações vasodilatadoras e vasoconstritoras; a *CBS* com ação no metabolismo da homocisteína e o *PAII* com ação na fibrinólise, sendo que ambos modulam a coagulação; e a *ADA* que age no metabolismo das purinas, e apresenta importante papel como vasodilatadora e no sistema imune. A ação destes polimorfismos genéticos juntamente com os genótipos da DF e os haplótipos da globina beta-S podem modular a vasoatividade dos indivíduos com DF.

Mesmo não obtendo resultados significativos para os marcadores avaliados, este trabalho tem importância para a rede pública de saúde, por apresentar dados epidemiológicos dos indivíduos com DF em quatro períodos da vida e contribui também para o entendimento da complexidade genética envolvida nessa doença. A discussão abaixo será apresentada em tópicos, cada um referente aos objetivos específicos.

5.1. Marcadores genéticos avaliados

O estudo foi composto por quatro subgrupos amostrais organizados de acordo com a idade sendo: de 0 a 4 anos (Crianças I), de 5 a 10 anos (Crianças II), de 11 a 19 anos (Adolescentes) e acima de 20 anos (Adultos). Para todos os subgrupos amostrais foi verificado que o genótipo mais frequente da DF foi o SS seguido do SC. Interessantemente no subgrupo Crianças I, o genótipo SC foi mais frequente que nos outros subgrupos amostrais, com diferença estatística entre os indivíduos que compunham o subgrupo Adolescentes. Provavelmente, a clínica branda que a Hb C proporciona nesses indivíduos acarreta na não-necessidade de tratamento e acompanhamento clínico quando atingem a adolescência. Estudo mostra que os indivíduos com o genótipo SC apresentam as complicações da doença em época mais tardia do que os indivíduos com o genótipo SS (NAGEL; FABRY; STEINBERG, 2003). Portanto, quando adultos, esses indivíduos sem tratamento, sofrem as consequências da

5. DISCUSSÃO

doença, e buscam novamente os cuidados médicos, como é observado no aumento da frequência do genótipo SC no subgrupo Adultos.

Na avaliação da frequência dos haplótipos da globina beta-S para os indivíduos com AF, foi verificado que a combinação mais frequente foi a Bantu/Bantu seguida do Bantu/Benin para os quatro subgrupos amostrais. A elevada frequência do haplótipo Bantu na população de estudo, retrata a migração dos povos africanos durante a formação da população brasileira, principalmente no estado do Rio de Janeiro. Essa herança reforça a etnia da maioria dos africanos que vieram para o Brasil, originários da África Oriental e Centro-Sul (SILVA; GONÇALVES; RABENHORST, 2009; ZAGO; FIGUEIREDO; OGO, 1992). Dependendo da região do Brasil, essa frequência haplotípica varia. Na região Nordeste, o haplótipo Benin ultrapassa a frequência do haplótipo Bantu, segundo estudos realizados em populações de Salvador (BA) (ADORNO et al., 2004, 2008) e Fortaleza (CE) (GALIZA NETO et al., 2005). No presente trabalho foi observado a frequência de outros haplótipos típicos como Senegal, Saudi e Camarões, porém com menor frequência, e os haplótipos atípicos foram o terceiro haplótipo mais frequente com 6.1%.

A origem dos haplótipos atípicos ocorre por vários mecanismos genéticos envolvendo haplótipos beta-S comuns como Bantu e Benin (ZAGO et al., 2000). Além disso, estudos mostram que o *cluster* da beta-S globina compreende uma região “*hot spot*” localizada desde a região promotora do gene *HBBP*, até o final do gene *HBB* e essa região é caracterizada por ocorrência de mutações até 100 vezes superior ao normal (CHAKRAVARTI et al., 1984; HANCHARD et al., 2007), o que contribuiria para a formação de haplótipos atípicos da globina beta-S. Segundo Zago e colaboradores (2000), cerca de 5% a 10% dos cromossomos com a mutação para a globina beta-S possuem um haplótipo β^S atípico.

Quanto aos polimorfismos ligados à vasoatividade, não foi observada diferença nas frequências genótípicas e alélicas entre os subgrupos amostrais. A frequência encontrada para o polimorfismo 844ins68 da *CBS* foi semelhante aos relatados de outros pesquisadores brasileiros. Em 2010, Jacob e colaboradores avaliaram o polimorfismo da *CBS* (844ins68) e do gene metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR* - C677) em indivíduos com DF do estado de Goiás e encontraram a maior frequência do genótipo selvagem (Ins-/Ins-) da *CBS*, seguido do heterozigoto (Ins-/Ins+) e o menos frequente o homozigoto mutante (Ins+/Ins+) (JACOB; BASTOS; BONINI-DOMINGOS, 2011). Frequência semelhante foi observada em mulheres com história de aborto, em Salvador (BA) (BOAS et al., 2015) e em uma população de Vitória (ES) de pacientes com câncer oral (BARBOSA et al., 2016). Também no México a

5. DISCUSSÃO

frequência foi semelhante entre as pessoas com câncer de mama e o grupo controle (GALLEGOS-ARREOLA et al., 2014).

Para o polimorfismo do *PAII* (-675pb 4G/5G) geralmente o genótipo 4G/5G está presente em aproximadamente 50.0% das populações estudadas e o 5G/5G em 25.0% (LIGUORI et al., 2014) como foi observado em crianças com OMA e um grupo controle da Holanda (EMONTS et al., 2007), e em pessoas com infarto do miocárdio da Espanha (MARTINEZ-QUINTANA et al., 2014). No presente trabalho, o relatado acima não foi verificado para os subgrupos Crianças II, Adolescentes e Adultos, e sim a elevada frequência do genótipo 5G/5G. A provável explicação estaria na relação do alelo 5G, principalmente em homozigose, com os níveis diminuídos de PAI-1 circulante. Menores níveis de PAI-1 proporcionam aumento na ação do sistema fibrinolítico devido a ativação do plaminogênio, formação da plasmina e degradação do coágulo de fibrina (LIMA et al., 2011; SILVERTHORN, 2010). Um sistema fibrinolítico ativado e eficiente para as pessoas com DF, pode contribuir para a melhora das patologias, principalmente às relacionadas com reparo tecidual. Com isso, pode-se inferir que a frequência elevada do genótipo 5G/5G ocorreu devido a uma seleção positiva nos indivíduos com DF, por ser observado principalmente naqueles com idade acima de cinco anos.

Para o polimorfismo *ECAI* (I/D 287pb) a frequência do presente trabalho foi semelhante ao encontrado na população Sudanense com AF e sem AF (MAHJOUB et al., 2016) e na Espanha em pessoas com infarto do miocárdio (MARTINEZ-QUINTANA et al., 2014) em que o genótipo mais frequente foi o ID, seguido do DD e o menos frequente o II. O presente resultado diferiu da população chinesa em que o genótipo mais frequente foi o heterozigoto, porém, o intermediário foi o selvagem (II) e o menos frequente o homozigoto mutante (DD) em pessoas com doença renal e no grupo controle (YANG et al., 2015). A elevada frequência do alelo I na Ásia e do alelo D na África, Europa e América, pode ser explicada devido a evolução do alelo D e sua disseminação para o mundo à partir do continente Africano. A presença do alelo D proporciona ao indivíduo propensão a reter sais e água, consequentemente aumentando a pressão sanguínea. Antes da expansão “*out-of-Africa*” os indivíduos com alelo D apresentavam vantagens na adaptação por habitarem um ambiente quente e seco. Depois do “*out-of-Africa*”, algumas regiões do mundo apresentavam climas frios e úmidos, e a característica de reter sais e água já não era mais vantajosa. Assim, o alelo D passou a ser deletério por estar relacionado com a hipertensão e outras doenças cardiovasculares (LI et al., 2011). Portanto, o alelo D é mais frequente em países com clima quente e seco, do que em países frios e úmidos. O presente resultado corrobora essa hipótese.

5. DISCUSSÃO

Quanto ao polimorfismo A1075G da *ECA2* a avaliação da frequência ocorreu separado por gênero, devido a este gene estar localizado no cromossomo X. Mesmo assim, independente do gênero, este polimorfismo apresentou variação quanto a sua frequência, e em todos os subgrupos amostrais, o genótipo AA ou o alelo A apresentaram menor frequência. Essas divergem das encontradas em chineses com alta pressão arterial (ZHONG et al., 2006) e com doenças renais (YANG et al., 2015), os quais apresentam elevada frequência dos genótipo AA e AG, sendo o alelo A o mais frequente. A população de estudo apresenta frequência semelhante a encontrada por Palmer e colaboradores 2008 em pessoas com síndrome coronariana de origem europeia (PALMER et al., 2008). Um achado interessante nos indivíduos masculinos dos subgrupos Crianças I, Adolescentes e Adultos, foi que um indivíduo de cada subgrupo apresentou a heterozigose para o polimorfismo A1075G. Não foi possível informar se eles apresentam a Síndrome de Klinefelter.

Para o polimorfismo G22A no gene *ADA*, as frequências relatadas foram muito semelhantes às encontradas na população de São José do Rio Preto com espondilite anquilosante (CAMARGO et al., 2012) e em uma população do Irã com ovário policístico (SALEHABADI et al., 2016). O genótipo menos frequente foi o homozigoto mutante (AA), e no estudo de Camargo e colaboradores 2012, este nem foi encontrado. Indivíduos com alelo A apresentam baixa expressão de ADA em relação aos indivíduos com alelo G. Níveis diminuídos de ADA estão relacionados com a Síndrome da Imunodeficiência Combinada, e devido a isso, provavelmente os indivíduos homozigotos para o alelo A são mais propensos à infecções (DA CUNHA, 1991; LAWRENCE EDWARDS, 1985) e, provavelmente durante a evolução humana, este genótipo pode ter sido marcado como deletério.

Devido as frequências genótípicas e alélicas dos marcadores genéticos avaliados não diferirem entre os subgrupos amostrais do presente trabalho, pode-se sugerir uma ação semelhante destes nas quatro fases de desenvolvimento dos indivíduos com DF.

5.2. Perfil fenotípico e gravidade clínica nas pessoas com DF

As manifestações clínicas nos indivíduos com DF são ocasionadas por eventos vaso-oclusivos e hemolíticos que causam danos a vários órgãos, e muitas vezes esses danos são irreversíveis (BENDER; SEIBEL, 2014). As primeiras ocorrências iniciam por volta dos três meses de idade, e perduram por toda a vida (FERNANDES; AVENDANHA; VIANA, 2016).

No presente estudo foi possível verificar que as principais manifestações que ocorreram nas crianças que compunham o subgrupo Crianças I foram relacionadas com

5. DISCUSSÃO

infecções, como PNM e IVAS; crises de dor, incluindo a dactilite; e o SE. Essas manifestações resultaram em internações e necessidades transfusional em mais de 50% das crianças, sendo que aproximadamente 70% eram de indivíduos com AF (Hb SS). As crianças que não apresentavam melhora com a transfusão sanguínea e sempre procuravam a emergência, tiveram outros tipos de intervenções no tratamento como o uso de HU, regime de hipertransfusão e, nos casos de SE, a esplenectomia. A transfusão sanguínea e o uso de HU são os dois tratamentos para a DF, e o transplante da medula óssea é a única chance de cura (SHETH; LICURSI; BHATIA, 2013). Porém, o regime de transfusão sanguínea a longo prazo, pode trazer complicações como a sobrecarga de ferro (PORTER; GARBOWSKI, 2013). Mesmo após 20 anos de uso da HU como tratamento para a DF, seu uso ainda é restrito, principalmente nas crianças. Um estudo de 2013 com pacientes pediátricos do HEMORIO mostrou a eficácia do tratamento com a HU em crianças, principalmente na diminuição do risco de óbito e, com estes resultados, os autores tentam encorajar os hematologistas a prescreverem a HU para crianças com menos de três anos de idade, ou mesmo, para aqueles sujeitos que não apresentam complicações graves da DF (LOBO et al., 2013). Prevenir a ocorrência de manifestações clínicas graves pode ser a melhor maneira de aumentar a sobrevida das pessoas com DF.

A partir dos dados hematológicos e clínicos coletados nos indivíduos do subgrupo Crianças I, foi possível classificá-los quanto ao perfil de gravidade clínica em leve, moderado e grave. O método de classificação descrito por Van Den Tweel et al. (2010), não foi validado para a população de estudo por não apresentar uma semelhança robusta com a classificação realizada pelo hematologista do HEMORIO. No início do delineamento do presente estudo (2013), o índice de gravidade de Van Den Tweel et al. (2010) apresentava requisitos importantes por considerar, além dos dados clínicos, também dados laboratoriais, e por ser uma classificação relativamente recente. Os próprios autores concluem o trabalho sugerindo que, para a validação do índice, é necessário utilizá-lo em um estudo de coorte prospectivo de pacientes diagnosticados com DF na triagem neonatal. Porém, após a finalização da classificação e a comparação com a classificação do hematologista responsável, o índice não refletiu a realidade das crianças do subgrupo Crianças I no Brasil. Os vieses que podem ter interferido nessa incongruência seria a criação do índice de Van Den Tweel et al. (2010) em uma população pediátrica, que eles consideraram sendo de 0 a 18 anos de idade na Holanda, um país Europeu, com características diferentes no Brasil. Outros interferentes foram que o índice de Van Den Tweel et al. (2010) não considera a ocorrência de PNM e dactilite, as quais estiveram presentes em 63,6% e 18,2% das crianças avaliadas, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

Também não avaliam o resultado do DTC. Já a ocorrência de SE para eles foi considerada como grave, sendo que, o SE apresenta eventos menores, como crescimento do baço sem a redução drástica da Hb, não sendo considerada como grave (MEIER; MILLER, 2012). Devido a esses fatores, foi utilizada para a caracterização da gravidade clínica das crianças do subgrupo Crianças I, a classificação apresentada pelo hematologista. A gravidade clínica leve foi a mais frequente nesse subgrupo amostral seguida da moderada e grave.

Três crianças vieram a óbito durante o estudo prospectivo, sendo uma por broncoaspiração, uma por PNM e inflamação e uma por causa desconhecida. As infecções em crianças com DF são as principais causas de morte no estado de Minas Gerais (FERNANDES; AVENDANHA; VIANA, 2016; SABARENSE et al., 2015), e no Rio de Janeiro, a principal causa de morte até os cinco anos de idade é por STA (LOBO et al., 2014). A ocorrência de óbito nesse grupo foi de 5% e de sobrevivida 95%. Um estudo com uma coorte de recém-nascidos de Dallas, estimou que 95% das crianças com AF sobrevivem até a primeira década de vida (QUINN; ROGERS; BUCHANAN, 2004). No *clinical trials* de 2010 (QUINN et al., 2010) os autores acompanharam a mesma coorte de 2004 e verificaram a incidência de morte de 5.2%, sendo a causa mais comum a STA. Além disso, afirmaram que o risco de morte aumenta quando ocorre a mudança no tratamento pediátrico para o adulto.

No estudo retrospectivo foi possível observar que a ocorrência de STA começa a aumentar no subgrupo Crianças II, quando apresentam idade de cinco anos e, continua frequente, até a idade adulta. A ocorrência de AVE foi maior nos indivíduos com AF do subgrupo Adolescentes do que em Adultos, e os Adultos com AF apresentaram mais osteonecrose do que Adolescentes. Já os Adultos com o genótipo SC apresentaram mais retinopatia do que os Adolescentes. As complicações pulmonares são muito comuns na DF (MILLER; GLADWIN, 2012), provavelmente, por haver várias etiologias para a STA como infecções pulmonares, crises vaso-oclusivas, causando inflamação vascular e obstrução por células falcizadas, e trombos (BALLAS et al., 2010; MEIER; MILLER, 2012; MILLER; GLADWIN, 2012).

A DF é caracterizada por manifestações clínicas que causam danos cumulativos aos órgãos. Assim, com o aumento da idade, as complicações clínicas se acumulam, e cada vez mais graves, como pode ser observado pelas ocorrências de AVE e osteonecrose nos indivíduos do subgrupo Adulto. É estimado que aproximadamente 50% dos indivíduos com DF apresentam alguma manifestação neurológica até os 14 anos de idade, sendo mais frequente em crianças e idosos (BERNAUDIN et al., 2011). Tanto o AVE quanto a osteonecrose são complicações da DF que prejudicam muito a sobrevivida dos indivíduos. O

5. DISCUSSÃO

AVE pode danificar o sistema neurológico, como a fala e os movimentos, como o andar. A osteonecrose causa uma dor crônica, que ocorre principalmente na cabeça do fêmur, e também prejudica o caminhar (PACE, 2007; STEINBERG, 2008). Já a retinopatia é mais comum nos indivíduos com genótipo SC, pois a Hb C em combinação com a Hb S causa aumento na viscosidade sanguínea agravando os efeitos oclusivos. Além disso, a retina, especialmente a porção temporal, é altamente suscetível aos efeitos intravasculares dos eritrócitos falcizados por apresentar uma variação do diâmetro vascular, predispondo a oclusão. Pode ocorrer o bloqueio permanente das veias ou a sua recanalização, gerando ou não uma hemorragia. O tampão de eritrócitos pode deixar o local em até 12 horas, mas a reconstrução vascular leva meses ou anos para ocorrer (BALLAS et al., 2010; BONANOMI; LAVEZZO, 2013).

A classificação da gravidade clínica do grupo retrospectivo ocorreu por meio da calculadora *online* “Sickle Cell Disease Severity Calculator” descrito por Sebastiani et al., 2007. Essa calculadora foi validada por nosso grupo de estudo em 2015 em pessoas com DF do HEMORIO (BELINI JUNIOR et al., 2015). De acordo com a classificação, foi verificado que a clínica leve foi observada em maior frequência no subgrupo Crianças II. Já as clínicas moderada e grave foram mais frequentes no subgrupo Adultos. A clínica grave nos adultos com DF já era esperada, pois esses indivíduos quando chegam a idade adulta apresentam manifestações clínicas que aumentam a sua comorbidade (PACE, 2007). Em 1960, a DF foi considerada uma doença que requer principalmete cuidados pediátricos, pois poucas crianças sobreviviam até a idade adulta. Como resultado disso, os cuidados e tratamentos com os adultos não tem evoluído muito e devido a comorbidades que a doença proporciona ao indivíduo, faz-se necessário um acompanhamento com psicólogo e assistente social (PACE, 2007).

Mesmo com as complicações que as DF causam, a sobrevida dos pacientes aumentou, sendo em média de 55 a 60 anos de idade (WIERENGA; HAMBLETON; LEWIS, 2001). No presente estudo, seis indivíduos apresentaram idade igual ou superior a 60 anos. Devido ao número amostral reduzido, não foi possível confirmar se os marcadores genéticos podem ter influenciado a sobrevida elevada, mas foi observado uma maior frequência do alelo I para a *ECAI*, do alelo Ins- para *CBS* e do alelo G para *ADA* nesses indivíduos, e a presença desses alelos estão relacionados com uma melhora na vasoatividade.

Quanto ao óbito não foi observado nenhum caso no subgrupo Crianças II. A taxa de óbito no subgrupo Adolescentes foi de 3.9% sendo a maioria por septicemia (60%), e no subgrupo Adultos a taxa de ocorrência de óbito foi de 8.5% com STA sendo a causa maior

5. DISCUSSÃO

(44.4%). De acordo com a análise de sobrevivência, após os 60 anos de idade a taxa cai para aproximadamente 40.0%. Desde a descoberta da DF em 1910 (HERRICK, 2001), a expectativa de vida desses paciente vem aumentando. Na década de 80, com o início da penicilina profilática, a expectativa de vida era de aproximadamente 25 anos de idade. Na década de 90 a HU foi aprovada para o uso no tratamento da DF e a expectativa de vida passou a ser de 35 anos. No final da década de 90, a terapia com transfusão sanguínea foi utilizada na prevenção de AVE, e a média de idade aumentou para 45 anos. No século 21, o transplante de células tronco foi um sucesso para a cura do indivíduo, e também iniciou os estudos com a terapia gênica (THEIN; IGBINEWEKA; THEIN, 2017). Adultos com DF com sete décadas de vida foram relatados em 1995 (STEINBERG et al., 1995). Devido a várias intervenções como diagnóstico precoce, educação dos pacientes e terapia moderna (MCKERRELL; COHEN; BILLET, 2004), muitos indivíduos com DF estão chegando a idade adulta e passando a ser idosos. Mesmo assim, faz-se necessário estudos nesses indivíduos para melhorar a gestão e encontrar terapias mais eficazes para esses pacientes (THEIN; IGBINEWEKA; THEIN, 2017).

5.3. Influência dos marcadores genéticos no perfil fenotípico de gravidade clínica

A presença da Hb S em homozigose aumenta a formação de polímeros dentro dos eritrócitos, os quais são deformados causando a vaso-oclusão e hemólise, e esses eventos agravam a clínica dos indivíduos com AF (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; STEINBERG, 2008). No presente estudo foi verificado que o genótipo SS contribuiu para a ocorrência das clínicas moderada e grave tanto para o grupo prospectivo, quanto para o grupo retrospectivo.

Devido a isso foram avaliados somente os indivíduos com AF, com o intuito de verificar a interferência dos marcadores genéticos na gravidade clínica. Para o grupo retrospectivo, os marcadores genéticos não apresentaram relação com a gravidade clínica. Porém, para o grupo prospectivo foi observado que o genótipo GG da *ECA2* apresentou efeito protetor para a ocorrência de clínica moderada e grave. Até o presente momento, nenhum estudo relacionou o polimorfismo A1075G da *ECA2* com as manifestações clínicas de indivíduos com DF. Poucos são os trabalhos que investigaram esse polimorfismo, e os resultados são controversos. Na população chinesa, o genótipo GG apresentou relação com a hipertensão em mulheres com síndrome metabólica (ZHONG et al., 2006) e em homens no estágio 2 de hipertensão (NIU et al., 2007). Já na população européia, o alelo A apresentou

5. DISCUSSÃO

associação com a mortalidade em pessoas com síndrome coronariana aguda (PALMER et al., 2008).

A interação entre os marcadores genéticos foi avaliada nos indivíduos do grupo retrospectivo e não foi verificada a influência dos polimorfismos, quando em conjunto, na gravidade clínica desses indivíduos. Estudos genéticos e de associação de genoma tem explicado a pequena fração dessa variabilidade fenotípica encontrada entre os indivíduos com DF (SEBASTIANI et al., 2010; SERJEANT, 2013; STEINBERG, 2005). Talvez isso se deva a outros fatores que podem modular a característica fenotípica da doença, como os ambientais (PIEL et al., 2016). Piel et al, (2006) avaliaram por cinco anos pessoas com DF (genótipos SS e SC) que eram admitidos nos hospitais de Londres e Paris, e fizeram relação com variáveis climáticas. Preceberam que a precipitação, velocidade do vento e pressão atmosférica são os principais fatores ambientais que influenciam na admissão hospitalar. Como o Brasil é um país tropical, caracterizado pela maior parte do ano sendo seco e quente, as pessoas com DF precisam tomar alguns cuidados, principalmente com a desidratação.

Quanto ao óbito nesses indivíduos, também não foi verificada a interferência dos marcadores genéticos, nem mesmo do genótipo SS. O resultado da influência dos marcadores genéticos na gravidade clínica das pessoas com DF mostrou que esses indivíduos apresentam semelhança na presença desses polimorfismos genéticos nas fases de desenvolvimento, como verificado na comparação entre as frequências genotípicas e alélicas. Provavelmente, relacionar esses polimorfismos genéticos com algumas manifestações clínicas da DF podem gerar resultados interessantes. Embora esse não tenha sido o foco do presente estudo, essas avaliações serão realizadas para a redação de artigos futuros.

Podemos concluir que o perfil fenotípico de gravidade da DF é muito complexo por apresentar envolvimento de muitos fatores genéticos e ambientais. Entretanto, estudos que buscam entender essa complexidade em diversas fases da vida, podem ser úteis para prevenir eventos graves que ocorrem de acordo com o desenvolvimento do indivíduo.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

6. Conclusão

Este foi o primeiro trabalho que relacionou os marcadores genéticos com a gravidade clínica da DF, e as conclusões são as seguintes:

1. O genótipo SS é o mais frequente em todos os subgrupos amostrais, porém o genótipo SC é mais frequente em crianças de até quatro anos de idade do que nos adolescentes (11 a 19 anos), em ambiente hospitalar, refletindo a baixa adesão ao tratamento da DF entre os adolescentes. O haplótipo mais frequente é o Bantu/Bantu seguido do Bantu/Benin, além de haplótipos Atípicos. Os polimorfismos genéticos avaliados - *ADA* (G22A), *ECA1* (I/D 287pb), *ECA2* (A1075G), *CBS* (844ins68) e *PAI1* (-675pb 4G/5G) - não diferem nas frequências genotípicas e alélicas entre os subgrupos amostrais.
2. O perfil fenotípico leve é mais frequente nas crianças de 0 a 10 anos de idade, e o moderado e grave é mais frequente nos indivíduos acima de 20 anos de idade.
3. A ocorrência de clínica moderada e grave é mais comum em indivíduos com genótipo SS, de todas as idades, em relação aos demais genótipos da DF. O genótipo GG para o polimorfismo A1075G da *ECA2* tem um efeito protetor no perfil clínico de crianças com AF até quatro anos de idade. Os haplótipos da globina beta-S e os polimorfismos genéticos avaliados - *ADA* (G22A), *ECA1* (I/D 287pb), *CBS* (844ins68) e *PAI1* (-675pb 4G/5G) - não interferem no perfil de gravidade clínica dos indivíduos com DF.

Concluimos que o fenótipo clínico da DF apresenta-se com gravidade variável nas diferentes fases de vida dos indivíduos, e que essa gravidade é influenciada, principalmente, pela idade, adesão ao tratamento e genótipo para a doença. Encontramos interação gênica entre o genótipo SS e o polimorfismo A1075G da *ECA2* como moduladores clínicos em crianças com AF. No entanto, muitos outros fatores genéticos e ambientais, não abordados nesse trabalho, podem estar envolvidos na complexidade da doença e modulação diferencial dos fenótipos. Dessa forma, estudos a cerca da complexidade da DF ao longo da vida dos portadores podem ser úteis para prevenir eventos graves já previstos para cada faixa etária.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ADORNO, E. V. et al. The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. **Hemoglobin**, v. 28, n. 3, p. 267–271, ago. 2004.
- ADORNO, E. V. et al. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 621–625, 2008.
- ALMEIDA, C. B. et al. Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. **Blood**, v. 120, n. 14, p. 2879–2888, 2012.
- BALLAS, S. K. et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 1, p. 6–13, 2010.
- BALLAS, S. K. et al. Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. **TheScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 949535, 2012.
- BARABINO, G. A.; PLATT, M. O.; KAUL, D. K. Sickle cell biomechanics. **Annual review of biomedical engineering**, v. 12, p. 345–367, ago. 2010.
- BARBOSA, A. et al. Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and cystathionine beta-synthase in oral cancer – a case–control study in southeastern Brazilians. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 82, n. 5, p. 558–566, 2016.
- BATTISTUZZI, G. et al. Activity of adenosine deaminase allelic forms in intact erythrocytes and in lymphocytes. **Annals of human genetics**, v. 45, n. 1, p. 15–19, 1981.
- Begliomini, H. Priapism due to “S” and “C” hemoglobinopathy successfully treated with finasteride. **Brazilian Journal of Urology**, v. 27, n. 5, p. 475–477, 2001.
- BELINI JUNIOR, E. et al. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: Severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 54, n. 4, p. 321–327, 2015.
- BENDER, M.; SEIBEL, G. **Sickle Cell Disease**. Seattle: [s.n.].
- BENJAFIELD, A. V.; WANG, W. Y. S.; MORRIS, B. J. No association of angiotensin-converting enzyme 2 gene (ACE2) polymorphisms with essential hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 17, n. 7, p. 624–628, 2004.
- BENSINGER, T. A.; GILLETTE, P. N. Hemolysis in sickle cell disease. **Archives of internal medicine**, v. 133, n. 4, p. 624–631, abr. 1974.
- BERNAUDIN, F. et al. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. **Blood**, v. 117, n. 4, p. 1130–1140, 2011.

7. REFERÊNCIAS

- BOAS, W. V. et al. Metabolism and gene polymorphisms of the folate pathway in Brazilian women with history of recurrent abortion. **Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia**, v. 37, n. 2, p. 71–6, 2015.
- BONANOMI, M. T. B. C.; LAVEZZO, M. M. Sick cell retinopathy : diagnosis and treatment. **Arq Bras Oftalmol**, v. 76, n. 5, p. 320–327, 2013.
- BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias**. 1^o. ed. São José do Rio Preto: [s.n.].
- BREWSTER, U. C.; PERAZELLA, M. A. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: Effects on kidney disease. **American Journal of Medicine**, v. 116, n. 4, p. 263–272, 2004.
- BRITTENHAM, G. M.; SCHECHTER, A. N.; NOGUCHI, C. T. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. **Blood**, v. 65, n. 1, p. 183–9, 1985.
- BYDLOWSKI, S. P.; MAGNANELLI, A. C.; F, D. D. A. Hiper-Homocisteinemia e Doenças Vaso-Oclusivas. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 71, n. n^o 1, p. 69–76, 1998.
- CAMARGO, U. et al. Lack of association of the G22A polymorphism of the ADA gene in patients with ankylosing spondylitis. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 2, p. 1178–1184, 2012.
- CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 204–206, 2007.
- CELIK, V. K. et al. Determination of serum adenosine deaminase and xanthine oxidase levels in patients with crimean-congo hemorrhagic fever. **Clinics**, v. 65, n. 7, p. 697–702, 2010.
- CHAKRAVARTI, A et al. Nonuniform recombination within the human beta-globin gene cluster. **Am J Hum Genet**, v. 36, p. 1239–1258, 1984.
- CHIANG, E. Y.; FRENETTE, P. S. Sick cell vaso-occlusion. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 19, n. 5, p. 771–784, 2005.
- COKIC, V. P. et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide – dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 2, p. 231–239, 2003.
- DA CUNHA, J. G. A adenosinadesaminase. Uma enzima pluridisciplinar. **Acta medica portuguesa**, v. 4, n. 6, p. 315–323, 1991.
- DANILCZYK, U. et al. A story of two ACEs. **Journal of molecular medicine**, v. 81, n. 4, p. 227–234, abr. 2003.
- DESAI, P. C.; ATAGA, K. I. The acute chest syndrome of sickle cell disease. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 14, n. 8, p. 991–9, 2013.

7. REFERÊNCIAS

DIGGS, L. W.; BELL, A. N. N. Intraerythrocytic hemoglobin crystals in sickle cell-hemoglobin C disease. **Blood**, p. 218–223, 1965.

EMONTS, M. et al. The 4G/4G Plasminogen Activator Inhibitor-1 Genotype Is Associated With Frequent Recurrence of Acute Otitis Media. **Pediatrics**, v. 120, n. 2, p. e317–e323, 2007.

ERIKSSON, P. et al. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 6, p. 1851–5, 1995.

FERNANDES, A. P. P. C.; AVENDANHA, F. A.; VIANA, M. B. Hospitalizations of children with sickle-cell disease in the Brazilian Unified Health System in the state of Minas Gerais. **Jornal de Pediatria**, n. xx, 2016.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FLEMING, I.; KOHLSTEDT, K.; BUSSE, R. The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 15, n. 1, p. 8–13, jan. 2006.

FORGET, B. G.; BUNN, H. F. Classification of the disorders of hemoglobin. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 2, p. 1–12, 2013.

FRANKLIN BUNN, H. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 762–769, 1997.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease : old discoveries , new concepts , and future promise. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 850–58
doi:10.1172/JCI30920, 2007.

GALIZA NETO, G. C. DE et al. Análise dos haplótipos do gene da betaS-globina no Ceará. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, p. 315–321, 2005.

GALLEGOS-ARREOLA, M. P. et al. The association between the 844ins68 polymorphism in the CBS gene and breast cancer. **Archives of Medical Science**, v. 10, n. 6, p. 1214–1224, 2014.

GLADWIN, M. T.; VICHINSKY, E. Pulmonary complications of sickle cell disease. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 21, p. 2254–2265, nov. 2008.

HANCHARD, N. et al. Classical sickle beta-globin haplotypes exhibit a high degree of long-range haplotype similarity in African and Afro-Caribbean populations. **BMC genetics**, v. 8, p. 52, 2007.

HEBBEL, R. P. Reconstructing sickle cell disease: A data-based analysis of the “hyperhemolysis paradigm” for pulmonary hypertension from the perspective of evidence-based medicine. **American Journal of Hematology**, v. 86, p. 123–154, 2011.

7. REFERÊNCIAS

HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 74, n. 3, p. 179–184, 2001.

HIGGS, D. R.; ENGEL, J. D.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Thalassaemia. **Lancet (London, England)**, v. 379, n. 9813, p. 373–383, jan. 2012.

ITANO, H. A.; NEEL, J. V. A new inherited abnormality of human hemoglobin. **Pathology**, v. 36, p. 613–617, 1950.

JACOB, M. A.; BASTOS, C. D. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. The 844ins68 cystathionine beta-synthase and C677T MTHFR gene polymorphism and the vaso-occlusive event risk in sickle cell disease. **Archives of Medical Science**, v. 7, n. 1, p. 97–101, 2011.

KOHLER, H. P.; GRANT, P. J. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. **New England Journal of Medicine**, v. 42, p. 1792–1801, 2000.

KRUSZEWSKI, M. Labile iron pool: The main determinant of cellular response to oxidative stress. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 531, n. 1-2, p. 81–92, 2003.

LABIE, D.; ELION, J. Molecular and cellular pathophysiology of sickle cell anemia. **Pathologie-biologie**, v. 47, n. 1, p. 7–12, jan. 1999.

LAWRENCE EDWARDS, N. Immunodeficiencies Associated with Errors in Purine Metabolism. **Medical Clinics of North America**, v. 69, n. 3, p. 505–518, 1985.

LAYLAND, J. et al. Adenosine: Physiology, Pharmacology and Clinical Application. **Cardiovascular Interventions**, v. 7, n. 6, p. 581–591, 2014.

LEVEY, H. R.; KUTLU, O.; BIVALACQUA, T. J. Medical management of ischemic stuttering priapism: a contemporary review of the literature. **Asian Journal of Andrology**, v. 14114, n. 10, p. 156–163, 2012.

LI, X. et al. Worldwide spatial genetic structure of angiotensin-converting enzyme gene: a new evolutionary ecological evidence for the thrifty genotype hypothesis. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 19, n. 9, p. 1002–8, 2011.

LIGUORI, R. et al. A novel polymorphism in the PAI-1 gene promoter enhances gene expression. A novel pro-thrombotic risk factor? **Thrombosis Research**, v. 134, n. 6, p. 1229–1233, 2014.

LIMA, L. M. et al. Associação dos Níveis Plasmáticos de PAI-1 e Polimorfismo 4G/5G em Pacientes com Doença Arterial Coronariana. **Arq Bras Cardiol**, v. 97, n. 6, p. 462–467, 2011.

LOBO, C. L. C. et al. The effect of hydroxycarbamide therapy on survival of children with sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 161, n. 6, p. 852–860, 2013.

LOBO, C. L. DE C. et al. Newborn screening program for hemoglobinopathies in Rio de

7. REFERÊNCIAS

Janeiro, Brazil. **Pediatric blood & cancer**, v. 61, n. 1, p. 34–39, jan. 2014.

LUZ, J. A. et al. Alfa-thalassemia, HbS, and beta-globin gene cluster haplotypes in two Afro-Uruguayan sub-populations from northern and southern Uruguay. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 595–600, 2006.

MAHJOUB, S. A. et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism is not associated with vasoocclusive complications of sickle cell anemia. **International journal of applied & basic medical research**, v. 6, n. 4, p. 267–270, 2016.

MARCUS, S. J. et al. Quantitative analysis of erythrocytes containing fetal hemoglobin (F cells) in children with sickle cell disease. **American journal of hematology**, v. 54, n. 1, p. 40–46, jan. 1997.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. **Journal of clinical pathology**, v. 18, n. 6, p. 790–792, nov. 1965.

MARGAGLIONE, M. et al. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 18, p. 152–156, 1998.

MARTINEZ-QUINTANA, E. et al. Prognostic value of ACE I/D, AT1R A1166C, PAI-I 4G/5G and GPIIb a1/a2 polymorphisms in myocardial infarction. **Cardiology Journal**, v. 21, n. 3, p. 229–237, 2014.

MCKERRELL, T. D. H.; COHEN, H. W.; BILLETT, H. H. The older sickle cell patient. **American Journal of Hematology**, v. 76, n. 2, p. 101–106, 2004.

MEIER, E. R. E.; MILLER, J. J. L. Sickle cell disease in children. **Drugs**, v. 72, n. 7, p. 895–906, 2012.

MILLER, A. C.; GLADWIN, M. T. Pulmonary complications of sickle cell disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 185, n. 11, p. 1154–1165, 2012.

MORISSON, P.; NEVES, D. D. Avaliação da adenosina desaminase no diagnóstico da tuberculose pleural: uma metanálise brasileira. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 4, p. 217–224, 2008.

MUNCIE, H. L.; CAMPBELL, J. Alpha and beta thalassemia. **American family physician**, v. 80, n. 4, p. 339–344, 2009.

NAGEL, R. L. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. **Einstein Quarterly Journal of Biology and Medicine**, v. 2, p. 53–62, 1984.

NAGEL, R. L.; FABRY, M. E.; STEINBERG, M. H. The paradox of hemoglobin SC disease. **Blood Reviews**, v. 17, n. 3, p. 167–178, 2003.

NAOUM, P. C. **Eletroforese, técnicas e diagnósticos**. [s.l.] São Paulo, Santos, 1990.

7. REFERÊNCIAS

NAUCK, M.; WIELAND, H.; MÄRZ, W. Rapid, homogeneous genotyping of the 4G/5G polymorphism in the promoter region of the PAI1 gene by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 8 I, p. 1141–1147, 1999.

NIU, W. et al. Correlation of angiotensin-converting enzyme 2 gene polymorphisms with stage 2 hypertension in Han Chinese. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 150, n. 6, p. 374–80, 2007.

ODIÈVRE, M. H. et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **The Indian Journal of Medical Research.**, v. 134, n. 4, p. 532–537, 2011.

OKUMURA, J. V.; BONINI-DOMINGOS, C. R. **A importância de identificar os haplótipos da globina beta-S na doença falciforme - Interdisciplinaridade na Saúde: Doença Falciforme.** [s.l.] Editora UFMS, 2016.

OKUMURA, J. V.; LOBO, C. L. D. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, n. 1, p. 71–72, 2013.

ORKIN, S. H. et al. Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. **Nature**, v. 296, p. 627–631, 1982.

PACE, B. S. **Renaissance of Sickle Cell Disease Research in the Genome Era - Sickle Cell Disease in Adults.** [s.l.] World Scientific, 2007.

PACHECO, R. et al. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 27, p. 9583–9588, 2005.

PALMER, B. R. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 A1075G polymorphism is associated with survival in an acute coronary syndromes cohort. **American Heart Journal**, v. 156, n. 4, p. 752–758, 2008.

PIEL, F. B. et al. The distribution of haemoglobin C and its prevalence in newborns in Africa. **Scientific reports**, v. 3, p. 1671, 2013.

PIEL, F. B. et al. Associations between environmental factors and hospital admissions for sickle cell disease. **Haematologica**, 2016.

PORTER, J.; GARBOWSKI, M. Consequences and management of iron overload in sickle cell disease. **Hematology**, v. 2013, n. 1, p. 447–56, 2013.

POWARS, D.; HITI, A. Sickle cell anemia. Beta s gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. **American Journal of Diseases of Children**, v. 147, n. 11, p. 1197–1202, nov. 1993.

POWARS, D. R. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 5, n. 3, p. 475–493, jun. 1991.

7. REFERÊNCIAS

QUINN, C. T. et al. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. **Blood Journal**, v. 115, n. 17, p. 3447–3452, 2010.

QUINN, C. T.; ROGERS, Z. R.; BUCHANAN, G. R. Survival of children with sickle cell disease. **Blood**, v. 103, n. 11, p. 4023–4027, 2004.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, p. 2018–2031, 2010.

RIGAT, B. et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. **The Journal of clinical investigation**, v. 86, n. 4, p. 1343–6, 1990.

ROTHER, R. P.; BELL, L.; HILLMEN, P. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **JAMA**, v. 293, n. 13, p. 1653–1662, 2005.

SABARENSE, A. P. et al. Characterization of mortality in children with sickle cell disease diagnosed through the Newborn Screening Program. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 3, p. 242–247, 2015.

SAFRANOW, K. et al. ADA*2 allele of the adenosine deaminase gene may protect against coronary artery disease. **Cardiology**, v. 108, n. 4, p. 275–281, 2007.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. **Science**, v. 230, p. 1350–1354, 1985.

SALEHABADI, M. et al. Association of G22A and A4223C ADA1 gene polymorphisms and ADA activity with PCOS. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 62, n. 3, p. 213–222, 2016.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANATIS, T. **Molecular cloning : a laboratory manual**. Disponível em: <http://trove.nla.gov.au/work/13615226?q&sort=holdings+desc&_=1425567226098&versionId=180145381>. Acesso em: 5 mar. 2015.

SANCHO, J. et al. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular homeostasis in normal human subjects. **Circulation**, v. 53, n. 3, p. 400–405, mar. 1976.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8258–63, 2003.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: New players of the renin-angiotensin system. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, 2013.

SAYED-TABATABAEI, F. A. et al. ACE polymorphisms. **Circulation Research**, v. 98, n. 9, p. 1123–1133, 2006.

7. REFERÊNCIAS

SEBASTIANI, P. et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2727–2735, 2007.

SEBASTIANI, P. et al. Genetic modifiers of the severity of sickle cell anemia identified through a genome-wide association study. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 1, p. 29–35, 2010.

SERJEANT, G. R. The Natural History of Sickle Cell Disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, p. 1–12, 2013.

SHETH, S.; LICURSI, M.; BHATIA, M. Sickle cell disease: time for a closer look at treatment options? **British Journal of Haematology**, v. 162, n. 4, p. 455–464, 2013.

SILVA, L.; GONÇALVES, R. P.; RABENHORST, S. H. B. Análise dos haplótipos da anemia falciforme em Fortaleza revela as origens étnicas da população cearense. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, p. 115–118, 2009.

SILVERTHORN, D. . **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 5^a. ed. [s.l.] Porto Alegre: Artmed, 2010.

SIVIERI, D. O. et al. Potentiation of bradykinin effect by angiotensin-converting enzyme inhibition does not correlate with angiotensin-converting enzyme activity in the rat mesenteric arteries. **Hypertension**, v. 50, n. 1, p. 110–115, 2007.

SMITS, P. et al. Endothelial release of nitric oxide contributes to the vasodilator effect of adenosine in humans. **Circulation**, v. 92, n. 8, p. 2135–2141, out. 1995.

STEINBERG, M. H. et al. Sickle cell anemia in septuagenarians. **Blood**, v. 86, n. 10, p. 3997–3998, 1995.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 129, p. 465–481, 2005.

STEINBERG, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **TheScientificWorldJournal**, v. 8, p. 1295–1324, 2008.

STURGEON, P.; ITANO, H. A.; BERGREN, W. R. Clinical manifestations of inherited abnormal hemoglobins. **Blood**, p. 389–404, 1955.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R. L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. **American Journal of Hematology**, v. 32, n. 1, p. 66–69, set. 1989.

THEIN, M. S.; IGBINWEKA, N. E.; THEIN, S. L. Sickle cell disease in the older adult. **Pathology**, v. 49, n. January, p. 1–9, 2017.

TORRES, L. DE S. et al. Hemoglobin D-Punjab: Origin, distribution and laboratory diagnosis. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 37, n. 2, p. 120–126, 2014.

7. REFERÊNCIAS

- TORRES, L. S. et al. Phenotypic Diversity of Sickle Cell Disease in Patients with a Double Heterozygosity for Hb S and Hb D-Punjab. **Hemoglobin**, v. 40, n. 5, p. 356–358, 2016.
- TSAI, M. Y. et al. High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. **American journal of human genetics**, v. 59, n. 6, p. 1262–1267, 1996.
- VAN DEN TWEEL, X. W. et al. Development and validation of a pediatric severity index for sickle cell patients. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 10, p. 746–751, 2010.
- VELLA, F. Acid-agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **American journal of clinical pathology**, v. 49, n. 3, p. 440–442, mar. 1968.
- VELLA, F.; LEHMANN, H. Haemoglobin D Punjab (D Los Angeles). **Journal of medical genetics**, v. 11, p. 341–348, 1974.
- VICKERS, C. et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14838–14843, 2002.
- WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 704–712, 2001a.
- WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. **The Thalassaemia Syndromes**. [s.l.: s.n.].
- WEBB, J.; KWIATKOWSKI, J. L. Stroke in patients with sickle cell disease. **Expert review of hematology**, v. 6, n. 3, p. 301–16, 2013.
- WIERENGA, K. J. J.; HAMBLETON, I. R.; LEWIS, N. A. Survival estimates for patients with homozygous sickle-cell disease in Jamaica: a clinic-based population study. **Lancet**, v. 357, n. February 2016, p. 680–683, 2001.
- YANG, H.-Y. et al. Impact of interaction of cigarette smoking with angiotensin-converting enzyme polymorphisms on end-stage renal disease risk in a Han Chinese population. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system**, v. 16, n. 1, p. 203–210, 2015.
- ZAGO, M. A et al. Atypical beta(s) haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. **American Journal of Hematology**, v. 63, n. December 1998, p. 79–84, 2000.
- ZAGO, M. A; FIGUEIREDO, M. S.; OGO, S. H. Bantu Beta-S Cluster Haplotype Predominates among Brazilian Blacks. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 88, p. 295–298, 1992.
- ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes : da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 207–214, 2007.
- ZHANG, Y. et al. Detrimental effects of adenosine signaling in sickle cell disease. **Nature medicine**, v. 17, n. 1, p. 79–86, 2011.
- ZHONG, J. et al. Association of angiotensin-converting enzyme 2 gene A/G polymorphism

7. REFERÊNCIAS

and elevated blood pressure in Chinese patients with metabolic syndrome. **J Lab Clin Med**, v. 147, n. 2, p. 91–95, 2006.

ZHUO, J. L. et al. New frontiers in the intrarenal renin-angiotensin system: A critical review of classical and new paradigms. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, n. NOV, p. 1–14, 2013.

ZORIO, E. et al. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 9, p. 923–929, 2008.

8. APÊNDICES

8. APÊNDICES

8.1. APÊNDICE I: Artigo científico relacionado com o projeto de doutorado

Journal of Medical Genetics

Journal of
Medical Genetics

Atypical beta-S haplotypes: classification and genetic modulation in patients with sickle cell anemia

Journal:	<i>Journal of Medical Genetics</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Okumura, Jessika; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Biology Silva, Danilo; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Torres, Lidiane; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Belini Junior, Edis; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Venancio, Larissa; Universidade Federal do Oeste da Bahia Nascimento, Patricia; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Biology Lobo, Clarisse; HEMORIO Bonini-Domingos, Claudia; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Biology
Keywords:	beta-S haplotypes, sickle cell anemia, Bantu, Benin, transcription factors

SCHOLARONE™
 Manuscripts

<https://mc.manuscriptcentral.com/jmedgenet>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Title: Atypical beta-S haplotypes: classification and genetic modulation in patients with sickle cell anemia

Running title: Atypical β^S -haplotypes as genetic modulators

Authors:

Jéssika V. Okumura^a, Danilo G. H. Silva^a, Lidiane S. Torres^a, Edis Belini-Junior^a, Larissa P. R. Venancio^b, Patrícia P. Nascimento^a, Clarisse L. C. Lobo^c, Claudia R. Bonini-Domingos^a.

Author's institution:

^a Department of Biology, Hemoglobin and Hematologic Genetic Diseases Laboratory, São Paulo State University (UNESP), Sao Paulo, Brazil
Address: Cristovao Colombo street, nº 2265, Jardim Nazareth
Postal Code: 15054-000, Sao Jose do Rio Preto, Sao Paulo, Brazil
Phone number: 55 (17) 32212392

^b Western Bahia Federal University (UFOB), Reitor Edgard Santos Campus - Biological Science and Health Center.
Address: Bertioga street, Morada Nobre I
Postal Code: 47810059 - Barreiras, Bahia - Brazil
Phone number: 55 (77) 36143500, Ramal: 3126

^c Institute of Hematology "Arthur de Siqueira Cavalcanti" (HEMORIO), Rio de Janeiro, Brazil
Address: Frei Caneca street, Nº 8, Center
Postal Code: 20211-030, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
Phone number: 55 (21) 23328611

Author's e-mail:

Jéssika Viviani Okumura - jessika_okumura@hotmail.com
Danilo Grünig Humberto da Silva - dangrunig@gmail.com
Lidiane de Souza Torres - lidiane.unesp@gmail.com
Edis Belini-Junior - belini.jnr@gmail.com
Larissa Paola Rodrigues Venancio - larissa.venancio@ufob.edu.br
Patrícia Pereira do Nascimento - ppnascimento.unesp@gmail.com
Clarisse Lopes de Castro Lobo - clarisse.lobo@hemorio.rj.gov.br
Claudia Regina Bonini-Domingos - claudiabonini@sjrp.unesp.br

Corresponding author:

Jéssika Viviani Okumura
Department of Biology, Hemoglobin and Hematologic Genetic Diseases Laboratory, São Paulo State University (UNESP), Sao Paulo, Brazil
Address: Cristovao Colombo street, nº 2265, Jardim Nazareth
CEP: 15054-000, Sao Jose do Rio Preto, Sao Paulo, Brazil
Phone number: 55 (17) 32212392
E-mail: jessika_okumura@hotmail.com

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Beta-S globin haplotypes (β^S haplotypes) characterization in sickle cell anemia (SCA) patients is important because it assists an individualized treatment. However, the atypical haplotypes do not present detailed studies such as clinical and laboratories data. To understand the phenotypic expression of atypical haplotype patients in relation to typical haplotype ones, assessing the main clinical and laboratorial parameters and investigating transcription factors as possible genetic modulators, can contribute to the improvement of the SCA patients clinical. The study group was composed by 600 SCA Brazilian patients, regardless gender and age range between one and 68 years. The atypical haplotypes were the third most frequent (5.7%) with 11 pattern numerically ranked according to occurrence. We verified that the patients with Atypical 1 haplotype in combination to Bantu haplotype presented milder clinical outcome in relation to Bantu/Bantu and Benin/Benin patients, according to improved values of hemoglobin and hematocrit. In clinical severity, we did not observe significant difference between typical and atypical haplotypes and this result can be explained due the action of transcription factors in beta-globin cluster. Thus, we presented the atypical haplotypes relationship with SCA pathophysiology reinforcing the hypothesis that individual genetic factors may be responsible for phenotypic diversity of the disease.

Key-words: beta-S haplotypes, sickle cell anemia, Bantu, Benin, transcription factors.

INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is the most common genetic complication in the world and it is characterized by hemoglobin S (Hb S) presence [1]. The genetic alteration for

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Hb S is resulted from a point mutation in the beta-globin gene, changing adenine to thymine at the 20^o nucleic acid position (*HBB:c.20A>T* - rs334), and causing the substitution of glutamic acid to valine in the protein [2]. Sickle cell anemia (SCA) is the homozygous inheritance of Hb S and confers the most severe disease phenotype to patients [3].

The Hb S mutation probably emerged in the African continent, where the malaria was the main modulator. According to historical and genetic characteristics, researchers began to track polymorphic sites in order to study the anthropology of Hb S in Africa [4] and its origin and dissemination at other world regions [5]. The preliminary investigations contributed to the discovery of many polymorphic sites along the beta-globin cluster [6] named beta-S globin haplotypes (β^S haplotypes). Therefore, the β^S -haplotypes are a set of mutations in the beta-globin cluster recognized by specific restriction enzymes, which are inherited together due to the proximity [7].

Currently, there are five typical β^S -haplotypes described and these are designated according to the geographical area where they are most commonly found, being: Benin associated with Midwestern Africa, Senegal with Atlantic West Africa, Bantu with South-Central and Eastern Africa [6], the Arab-Indian (Saudi) associated with Indian subcontinent and Eastern Arabian Peninsula [8] and the Cameroon along the west coast of Africa [9]. During the β^S -haplotypes investigations, researchers have found unusual haplotypes in relation to the patters decribed, and they were named as atypical haplotypes [6, 10, 11]. The different haplotype patterns are generated by several genetic mechanisms involving β^S -chromosomes with typical haplotypes, such as point mutation and recombination or gene conversion [6, 10, 11].

1
2
3
4 Besides the importance of studies about population genetics, anthropology,
5 origin and evolution of HbS mutation, the additional investigation about the β^S -
6 haplotypes may be helpful to explain the great clinical diversity observed in SCA
7 patients, directing for a suitable individual treatment [12, 13]. According to Nagel
8 (1984), the first three haplotypes identified (Bantu, Benin and Senegal) confer three
9 different clinical phenotypes in SCA patients. The explanation for this clinical diversity
10 according to haplotypes presence is due to a differential genetic modulation at beta-
11 globin genes, especially in gamma-genes (*HBG2* e *HBG1*), because they are associated
12 with Hb F levels [10, 13, 14]. In this context, SCA patients with Senegal haplotype
13 present lifelong milder clinical development, while the SCA patients with Benin
14 haplotype present intermediated clinical, and the Bantu haplotype presents severe
15 clinical [15, 16]. The haplotypes performance as clinical modulators in SCA patients
16 may occur due to the action of transcription factors that regulate gene expression in the
17 beta-globin cluster.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35 In the present study, we characterized the atypical haplotypes found in our SCA
36 population. Furthermore, we compared the Hb F levels, the main hematologic and
37 hemolytic markers and the clinical severe score among the SCA patients with at least
38 one atypical haplotype in relation to the reference groups: Bantu/Bantu and
39 Benin/Benin. Finally, we used *in silico* analyses to evaluate six polymorphic sites that
40 characterize the β^S -haplotype to verify the possible transcription factors that can
41 interfere in beta-globin cluster modulation.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 MATERIAL and METHODS

54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Patients

The study group was selected from 1348 SCD patients regularly treated at the Hematology Institute “Arthur Siqueira Cavalcante” - HEMORIO. After the genotyping of hemoglobin profile and β^S -haplotypes, we included in the study patients with SCA (Hb SS) without any degree of kinship, and whose haplotype identification was conclusive. Therefore, the study group was composed by 600 SCA patients, being 338 female and 262 male, with age varying from one to 68 years old (median equivalent to 22 years old). All subjects consented to participate of this study which was approved by the Supervision and Data Security Board of the institution in accordance with the Brazilian Norms and Research Ethics Committee.

Blood samples

Peripheral blood samples were collected by venipuncture in two tubes with 4 mL each containing 5% ethylenediaminetetraacetic acid. One tube was used to measure hematological and hemolytic index. The other tube was used to characterize hemoglobin profile and β^S -haplotypes.

Sickle cell disease genotyping and beta-S haplotypes characterization

Genomic DNA was extracted from leukocytes to molecular analysis [17]. The Hb S mutation (*HBB*:c.20A>T - rs334) was confirmed by polymerase chain reaction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and the amplified fragment was cleaved using *DdeI* (C↓TNAG) restriction enzyme (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)[18]. The characterization of β^S -haplotypes was performed by PCR-RFLP with the following polymorphic sites being analyzed: 5'*HBG2* (*XmnI*) *HBG2* (*HindIII*); *HBG1*

1
2
3
4 (HincIII); *HBBP* (HincII); 3' *HBBP* (HincII) and 5' *HBB* (HincI) as previously
5 described [19].
6
7
8
9

10 11 **Hb F levels, hematologic and hemolytic index**

12 Quantification of Hb F levels was obtained by high performance liquid
13 chromatography using automated equipment (*Ultra*², Trinity Biotech HPLC, Bray, Co
14 Wicklow, Ireland). Hematologic markers were estimated by flow cytometry and
15 spectrophotometry methods (Cell-Dyn Ruby, Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA).
16 The parameters measured were: red blood cells count (RBC, M/ μ L), Hb levels (g/dL),
17 hematocrit (Ht, %), mean corpuscular volume (MCV, fL) and relative reticulocyte (Ret.
18 Rel., %). Serum total bilirubin levels (TB, mg/dL) were estimated by 2,4-
19 dichlorophenyl diazonium method and lactate dehydrogenase (LDH, U/L) and aspartate
20 aminotransferase (AST, U/L) by UV enzymatic methods (AU680 Chemistry System,
21 Beckman Coulter Inc., Jersey, NJ, USA). The Rel. Ret. was used along with LDH, AST
22 and TB to infer hemolysis [20].
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 **Clinical severity classification**

41 We used the online tool "Sickle Cell Disease Severity Calculator", available in
42 <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects>, to classify the SCA patients into
43 categories according to clinical severity (mild, intermediate and severe). The network
44 model calculates the death risk within five years and considers this risk as a disease
45 severity score, ranging from 0 (least severe) to 1 (most severe). The calculator requires
46 the following variables that are sufficient to compute the score for severity of disease:
47 age, gender, serum total bilirubin, blood transfusion, reticulocyte count, LDH, MCV,
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

total leukocyte, acute chest syndrome, pain crises, priapism, stroke, avascular necrosis of bone and genotype of SCD. Scores ranging from 0 to 0.399 were considered mild, from 0.400 to 0.599 intermediate and 0.600 to 1.0 severe [21]. This tool was standardized and validated by our research group for SCD Brazilian patients [22].

***In silico* transcription factor detection**

The dataset evaluated in this study comprised the evaluation of approximately 200 bp sequence of three region from the human *HBB* gene (NG_000007.3; one in *HBG2*- ID 3048; two in *HBBP* - ID 3044). The set of vertebrate transcription factors (TFs) with their binding sites was obtained from the non-redundant, curated, and publically available JASPAR database (<http://jaspar.genereg.net>) [23, 24]. The transcription factor binding site (TFBS) analysis was performed in the *XmnI* (5' *HBG2*), *HincII* (*HBBP*) and *HincII* (3' *HBBP*) sites in order to identify TFs associated with this regions. The evaluation was performed in two different situations: a TFBS search when the sequence possess the ancestral allele (wild type) and a TFBS search in a sequence in which the polymorphisms were present, in order to identify possible changes to TFBS due to the presence of polymorphism.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistica 8.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) and the graphics were done using GraphPad Prisma version 5.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The data were tested for normality by using Normal Probability Plots of Residuals. To perform the statistic test we removed the extreme values of the parameters Ht, LDH, AST, TB and Rel.Ret. that were

1
2
3
4 selected from an analysis of outliers (Box Plot). For comparison analysis between the
5
6 predictor variables, we used General Linear Models (GLMs), which provides a
7
8 comparison of categorical variables (predictors) and numerical (dependent variables)
9
10 corrected for variables that may affect the outcome (covariates). The β^S -haplotypes were
11
12 selected as predictors, the HC use, age and genders as covariates, and the Hb F levels,
13
14 hematological index, hemolytic index and severity score as dependent variables. If
15
16 appropriate, we applied the Fisher *post hoc* test. Wilk's λ test was performed as a
17
18 multivariate analysis, that indicates the proportion of generalized variance in the
19
20 dependent variables that is accounted for the predictors. Data were expressed as mean \pm
21
22 95% confidence intervals and differences with a P-value<0.05 were considered
23
24 significant. The subjects with *Xmn1* (rs7482144) polymorphism were not included in the
25
26 statistical analysis due to the influence in the Hb F levels.
27
28
29
30
31

32 33 RESULTS

34 35 36 37 Study group characterization

38
39 One thousand and two hundred chromosomes of SCA patients were classified to
40
41 β^S -haplotypes. Among the typical haplotypes, the most frequent was Bantu haplotype
42
43 (N= 879; 73.2%) followed by Benin haplotype (N= 239; 19.9%). Cameroon haplotype
44
45 presented frequency of 0.6% (N=7) and Saudi and Senegal presented the same
46
47 frequency of 0.3% (N=4). In the sample subgroup, we found 63 (5.7%) subjects with 11
48
49 haplotype patterns different from those previously described in the literature. They were
50
51 named of atypicals and classified according to observed frequency in Arabic numerals
52
53 from 1 to 11, according to Figure 1.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The most common atypical haplotype was Atypical 1 (N=32; 47.8%), followed by Atypicals 2 (N=8; 12.0%) and 3 (N=7; 10.4%). Atypicals 4, 5 and 6 presented the same frequency (N=4; 5.9%); Atypical 7 with 4.6% (N=3); Atypical 8 with 3.0% (N=2) and the Atypicals 9, 10 and 11 were verified in just one chromosome each (1.5%). The criteria used to classify atypical haplotypes with same frequency was based on the amount of polymorphic sites presence (+) for the restriction enzymes. Genotypic haplotypes profile show that 55.2% SCA patients presented Bantu/Bantu haplotype, 24.5% Bantu/Benin and 7.9% with Bantu/Atypicals (Table I).

We built a haplotype tree according to presence (+) or absence (-) of restriction enzymes sites that characterized β^S -haplotypes in order to understand the derivation of each atypical haplotype from the typical ones (Figure 2). The Bantu haplotypes might have originated four atypical haplotypes, the Benin three atypical haplotypes, the Cameroon and Senegal two atypical haplotypes and the Saudi just one atypical haplotype. The majority of 11 haplotypes patterns described probably occurred by point mutation in typical and atypical haplotypes. Gene recombination event also may have originated atypical haplotypes, for example, Atypicals 1 and 5 can be derived from gene recombination between Bantu and Benin haplotypes, the Atypicals 2 and 6 from Cameroon and Benin haplotypes and the Atypicals 3 and 9 from Bantu and Cameroon haplotypes. Senegal, Atypical 8 and 11 were not part of any branching haplotype tree.

Evaluation of study parameters

We compared the Hb F levels, hematological and hemolytic markers and score of severity among haplotypes groups to verify the haplotypes influence in the studied parameters. The first group evaluated was composed by homozygous patients for Bantu

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

haplotype and Bantu/Atypicals, being included all the subjects with at least one atypical haplotype.

We verified that RBC levels in Bantu/Bantu patients were decreased compared to same parameters in Bantu/Atypicals patients (Figure 3. A1. A2 and A3). The variation found in hematological parameters was explained by 96.0% haplotypes actions (*Wilk's* λ : 0.96; *F*: 2.53; *p-value*: 0.04). Thus, we showed a modulating effect of atypical haplotypes on hematological parameters.

A second study group was formed among Bantu/Bantu x Bantu/Atypical 1 x Bantu/Atypicals* haplotypes. We included in Bantu/Atypicals* group all the patients with atypical haplotypes associated to Bantu haplotypes, except the Atypical 1. Two criteria were essential for this second group formation: 1. Atypical 1 haplotype is the most frequent atypical in our study population providing a good sample size for statistical analysis; and 2. Atypical 1 does not present restriction site for the enzymes used in the β^S -haplotypes classification. We verified that the subjects with Bantu/Atypical 1 haplotypes showed the best values for RBC, Hb and Ht levels compared to Bantu haplotypes in homozygous (Figure 3. B1. B2. and B3.).

The comparison in the Benin group occurred between Benin/Benin x Benin/Atypical 1, because it was not possible to form the Benin/Atypicals* group due to the small sample size. We did not find statistic difference in the hematological and hemolytic markers or clinical severity between these two sample groups (Data not shown).

We compared the five sample groups and verified that the subjects with Bantu haplotype in combination to Atypical 1 haplotype showed the best Hb and Ht values compared to Bantu haplotype homozygous (Hb *p-value*: 0.002; Ht *p-value*: 0.014; *p*-

value by Fisher post-hoc) and Benin haplotype homozygous (Hb p-value: 0.002; Ht p-value: 0.016; p-value by Fisher post-hoc) (Figure 3. C1. and C2). Table II shows the mean and confidence interval of the parameters evaluated in five groups formed.

Polymorphic sites that characterize beta-S globin haplotypes and transcription factors involved

We evaluated six restriction sites used to classify the β^S - haplotypes in order to better understand the results obtained (Table III). According to beta-globin cluster sequence available on NCBI database, the combination formed (- + + - - +) characterized the wild pattern haplotype. From the changes of nitrogenous bases, we know that in *XmnI* site occurs the exchange C→T in the promoter region in the *HBG2* (-158pb position C→T; rs7482144); to the *HincII* site, occurs the exchange G→A in 1140pb position and the exchange T→A in 2325pb position in the *HBBP* gene. Regarding the analysis of these three changes, it was possible to report four transcription factors motifs that may influence the SCA phenotype: (1) transcription factor CP2 (TFCP2) in mutated sequence 5'*HBG2* region, (2) the MYB proto-oncogene (Myb) in mutated and wild sequence in *HBBP* region, (3) the GATA binding protein 1 and 2 factors (GATA1 and GATA2) to wild sequence in 3'*HBBP* region, and (4) the GATA2 mutated sequence in 3'*HBBP* region. In the other three restriction sites that compose the β^S - haplotypes, it were not possible to identify the genetic changes to the *HindIII* and *HinI* enzymes sites.

DISCUSSION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The point mutation responsible for SCA is not enough to explain the wide phenotypic variability found among individuals affected by the disease. Studies involving β^S - haplotype, such as the analysis of genetic modulators in SCA clinical severity, can be an useful tool to infer a severity profile, providing a more appropriate and effective treatment [13]. The five β^S - haplotypes with typical patterns are well characterized in literature, however, the patterns that are beyond the traditional, called atypical haplotype, require further study. To our knowledge, this is the first research that suggests a classification for atypical haplotypes and checks possible modulation effects on Hb F levels, hematological and hemolytic parameters and clinical severity in SCA patients.

Atypical haplotypes in our study population were the third more frequent after the Bantu and Benin haplotypes, with 5.7% and this frequency is expected because the atypical haplotypes are associated with 5 to 10% of the whole β^S -chromosome [11]. We described 11 different patterns according to the presence or absence of six restriction sites. Other studies also related a diversity of atypical haplotype patterns being 11 patterns observed in Central African Republic [10] and 14 patterns observed in SCA Brazilian patients [11]. The description of several atypical haplotypes show the miscegenation of the study population as well as the high mutation rate in cluster-beta globin region. Studies showed that 3' cluster-beta region, where *HBBP*, *HBD* and *HBB* genes are located, is called "hot spot" region because it is characterized by mutations 100 times higher than normal [25, 26].

The atypical haplotypes origin occurs by several genetics mechanisms involving the most common β^S - haplotypes like Bantu and Benin. These mechanisms are: point mutations in typical haplotypes; simple and double recombination between a β^S -

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

chromosome either with a common β^S -haplotype or with a less common haplotype associated with a β^A -chromosome present in given populations and, less frequent, gene conversion [7, 10, 11]. In a total of 63 chromosomes with atypical haplotypes, 47.8% were named Atypical 1 for being the most frequent. The Atypical 1 haplotype is characterized for the absence of restriction sites for enzymes, suggesting that Atypical 1 is a hybrid formed by gene recombination between 5' Benin region and 3' Bantu region. However, the opposite hybrid (Atypical 5) was not among the most common haplotypes. The other reason for elevated frequency of Atypical 1 could be the loss of the restriction site for the enzyme *HindIII* in *HBG2* gene from Bantu haplotype, or the loss of the restriction site for the enzyme *HincII* in 3'*HBBP* gene from haplotype Benin by point mutations.

The analysis of the haplotype tree drawn from study population showed that approximately 91.0% of the atypical haplotypes derived by point mutations in typical ones. In addition to the origin by point mutation, six patterns of atypical haplotype may have occurred by recombination between typical haplotypes. The only atypical haplotype that did not present direct relation with typical haplotypes was Atypical 4. Furthermore, the Senegal and its derivative haplotypes (Atypicals 8 and 11), did not participate of the haplotype tree branch.

With the parameter analysis we showed that SCA patients with Bantu haplotype homozygous presented the worst rates of RBC, Hb and Ht in relation to SCA patients with Bantu haplotype in interaction with any atypical haplotype. These results corroborate with the literature, which shows the relationship of the Bantu haplotype with the worst outcomes for inflammation, oxidative stress and DNA damage [15, 16, 27, 28].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

In the comparison among Bantu/Bantu, Bantu/Atypical 1 and Bantu/Atypicals* we verified that Bantu/Atypical 1 subjects showed better values of RBC, Hb and Ht. With this result, we can suggest that the presence of Atypical 1 haplotype can contribute to a moderate clinical severity in SCA patients. This finding was corroborated when evaluating individuals with Benin haplotype. In the comparison made between Benin/Benin and Benin/Atypical 1, we did not find difference in any evaluated parameter. Benin haplotype causes in the patient a moderate pathophysiology compared to Bantu haplotype [12, 15, 16]. When comparing all sample groups, we found that the Atypical 1 haplotype in combination with Bantu contributes to the best Hb and Ht values in relation to individuals homozygous for the Bantu and homozygous for Benin. Regarding the clinical severity, we did not verify any statistically significant difference in the comparisons among the sample groups. The explanation for the non-influence of atypical haplotypes in clinical severity may be in the analysis of polymorphic sites that characterize the β^S -haplotypes.

Since the beginning of cluster beta-globin studies, the haplotypes are characterized by the presence or absence of restriction sites for specific enzymes [4, 6, 8, 9]. Considering that, mostly, the beta-globin cluster is a "hot spot" region, any change in nitrogenous base can contribute to the loss of the restriction site for the enzymes. According to the beta-globin cluster analysis in wild individuals, we did not find which nitrogenous base is changed in order to occur or not the recognition of the restriction enzyme to *HindIII* e *HinI*. Thus, depending on the nitrogenous base changed, different transcription factors may act in the gene regulation, and probably in the phenotypic characteristics of the individual. This way we can explain why individuals with the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

same pattern of haplotypes presented different parameters or individuals with different haplotypes do not present the expected phenotypic variation.

For *XmnI* and *HincII* restriction enzymes, four transcription factors that could act in the beta-globin cluster gene regulation were listed. Transcription factor CP2 presented relationship in cluster beta-globin regulation in presence of *XmnI* restriction sites (5'*HBG2*- C→T, rs7482144). This factor activates the transcription of the alpha-globin gene (*HBA*) and indirectly regulates expression of *HBG* genes when it forms a complex with the specific factor of the erythrocyte (Nuclear factor, erythrocyte 4 - NF-E4) [29, 30]. The *HincII* enzyme recognizes a site in *HBBP* (G1140A) and other site in 3' *HBBP* region (T2325A). In *HBBP* site (G1140A) the transcription factor Myb presented a relationship in cluster beta-globin regulation regardless of whether the sequence was wild or mutant. This factor regulates vertebrate hematopoiesis, but acts as a negative regulator of Hb F levels by inhibiting the expression of *HBG* [30–32]. In 3' *HBBP* site (T2325A) of *HincII*, both GATA-1 and GATA-2 factors can interfere in the modulation of beta-globin cluster of the wild sequence, and only the GATA-2 can interfere in the sequence mutated. GATA-1 factor is essential for the survival and final maturation of the erythrocytes precursors [33]. However, in the globin regulation it is involved in the silencing of *HBG*, because it forms Hb F protein repressor complexes [34]. GATA-2 factor forms complexes that activate the *HBG* genes transcription [35].

We believed that the β^S -haplotypes modulate the SCA pathophysiology because different transcription factors can act according to the presence or absence of the restriction sites that characterize the β^S -haplotypes. The four transcription factors reported above show direct or indirect relation to the expression regulation of the *HBG* genes. The Myb, GATA-1 and GATA-2 factors, by being present in *HBBP* gene region,

1
2
3
4 which is a pseudo-gene, may not exhibit significant activity as genetic factors. Thus, to
5
6 better understand the modulation of haplotypes in clinical severity of SCA patients, a
7
8 more detailed study of the beta-globin cluster is necessary to find and validate all
9
10 possible transcription factors able to influence the phenotypic expression of SCA
11
12 patients.
13

14
15 The present study suggested a classification for 11 atypical haplotypes patterns
16
17 found in a population of SCA patients unrelated and most of the atypical haplotype
18
19 derived from point mutations in typical haplotypes. The Atypical 1 haplotype is the
20
21 most common and its presence was related to a mild phenotypic expression. A detailed
22
23 study of restriction sites that characterize the β^S -haplotypes and the identification of
24
25 transcription factors that can influence the modulation of beta-globin cluster may assist
26
27 in understanding the pathophysiology found in SCA patients.
28
29

30 31 32 33 **ACKNOWLEDGEMENTS** 34

35 We would like to thank Izabella Luisa Tambones for her technical assistance in
36
37 transcription factors analysis and the Foundation Pro-Institute of Hematology (Fundarj),
38
39 the Lucas Pereira Ramos for English text revision and the Foundation for Research
40
41 Support of the State of Sao Paulo (FAPESP process number 2011/14168-5) for financial
42
43 support. Silva is a partnership member of Redoxoma - CEPID / FAPESP (2013/07937-
44
45 8).
46
47

48 49 50 51 **AUTHORS' CONTRIBUTIONS** 52

53 *Jéssika V. Okumura* and *Danilo G. H. Silva*: data design, data acquisition, data
54
55 analysis, statistical analysis, data interpretation and manuscript preparation. *Lidiane S.*
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Torres and *Edis Belini-Junior*: technical assistance on molecular, biochemical and statistical analysis. *Larissa P. R. Venancio*: data analysis, data interpretation and technical assistance in the *in silico* analysis. *Patricia P. Nascimento*: data interpretation. *Clarisse L. C. Lobo*: data provision and critical review of manuscript. *Claudia R. Bonini-Domingos*: study concept and design and critical review of manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- 1 Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010;**376**:2018–31.
- 2 Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* 1957;**180**:326–8.
- 3 Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal* 2008;**8**:1295–324.
- 4 Kan YW, Dozy a M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;**75**:5631–5.
- 5 Mears JG, Lachman HM, Cabannes R, Amegnizin KPE, Labie D, Nagel RL. Its Origin and Diffusion From West Africa. *J Clin Invest* 1981;**68**:606–10.
- 6 Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, Labie D. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;**81**:1771–3.
- 7 Hockham C, Piel FB, Gupta S, Penman BS. Understanding the contrasting spatial

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- haplotype patterns of malaria-protective beta-globin polymorphisms. *Infect Genet Evol* 2015;**36**:174–83.
- 8 Kulozik a E, Wainscoat JS, Serjeant GR, Kar BC, Al-Awamy B, Essan GJ, Falusi a G, Haque SK, Hilali a M, Kate S. Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. *Am J Hum Genet* 1986;**39**:239–44.
- 9 Lapoum roulie C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Mony-Lob  M, Bodo JM, Carnevale P, Labie D, Elion J, Krishnamoorthy R. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Hum Genet* 1992;**89**:333–7.
- 10 Srinivas R, Dunda O, Krishnamoorthy R, Fabry ME, Georges A, Labie D, Nagel RL. Atypical haplotypes linked to the beta-S gene in Africa are likely to be the product of recombination. *Am J Hematol* 1988;**29**:60–2.
- 11 Zago M a, Silva W a, Dalle B, Gualandro S, Hutz MH, Lapoumeroulie C, Tavella MH, Araujo a G, Krieger JE, Elion J, Krishnamoorthy R. Atypical beta(s) haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *Am J Hematol* 2000;**63**:79–84.
- 12 Nagel RL. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. *Einstein Q J Biol Med* 1984;**2**:53–62.
- 13 Gabriel a, Przybylski J. Sickle cell anaemia: a look at global haplotype distribution. *Nat Educ* 2010;**3**:2.
- 14 Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2005;**129**:465–81.
- 15 Powars DR. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991;**5**:475–93.
- 16 Powars D, Hiti A. Sickle cell anemia. Beta s gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *Am J Dis Child* 1993;**147**:1197–202.
- 17 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harb. Lab. Press. 1989.<http://www.molecularcloning.com/> (accessed 4 Mar2015).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 18 Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Science (80-)* 1985;**230**:1350–4.
- 19 Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol* 1989;**32**:66–9.
- 20 Nourae M, Lee JS, Zhang Y, Kaniyas T, Zhao X, Xiong Z, Oriss TB, Zeng Q, Kato GJ, Gibbs JSR, Hildesheim ME, Sachdev V, Barst RJ, Machado RF, Hassell KL, Little J a., Schraufnagel DE, Krishnamurti L, Novelli E, Girgis RE, Morris CR, Rosenzweig EB, Badesch DB, Lanzkron S, Castro OL, Goldsmith JC, Gordeuk VR, Gladwin MT. The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. *Haematologica* 2013;**98**:464–72.
- 21 Sebastiani P, Nolan VG, Baldwin CT, Abad-grau MM, Wang L, Adewoye AH, McMahon LC, Farrer L a, Iv JGT, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood* 2007;**110**:2727–35.
- 22 Belini Junior E, Silva DGH, Torres LDS, Okumura JV, Lobo CLDC, Bonini-Domingos CR. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: Severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. *Blood Cells, Mol Dis* 2015;**54**:321–7.
- 23 Mathelier A, Zhao X, Zhang AW, Parcy F, Worsley-Hunt R, Arenillas DJ, Buchman S, Chen CY, Chou A, Ienasescu H, Lim J, Shyr C, Tan G, Zhou M, Lenhard B, Sandelin A, Wasserman WW. JASPAR 2014: An extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:142–7.
- 24 Sandelin A, Alkema W, Engström P, Wasserman WW, Lenhard B. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 2004;**32**:D91–4.
- 25 Hanchard N, Elzein A, Trafford C, Rockett K, Pinder M, Jallow M, Harding R,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- Kwiatkowski D, McKenzie C. Classical sickle beta-globin haplotypes exhibit a high degree of long-range haplotype similarity in African and Afro-Caribbean populations. *BMC Genet* 2007;**8**:52.
- 26 Chakravarti a, Buetow KH, Antonarakis SE, Waber PG, Boehm CD, Kazazian HH. Nonuniform recombination within the human beta-globin gene cluster. *Am J Hum Genet* 1984;**36**:1239–58.
- 27 Silva-Rocha LB, Dias-Elias DB, Barbosa MC, Bandeira ICJ, Gonçalves RP. DNA damage in leukocytes of sickle cell anemia patients is associated with hydroxyurea therapy and with HBB*S haplotype. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 2012;**749**:48–52.
- 28 Steinberg MH, Lu ZH, Barton FB, Terrin ML, Charache S, Dover GJ. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. Multicenter Study of Hydroxyurea. *Blood* 1997;**89**:1078–88.
- 29 Zhou W, Zhao Q, Sutton R, Cumming H, Wang X, Cerruti L, Hall M, Wu R, Cunningham JM, Jane SM. The role of p22 NF-E4 in human globin gene switching. *J Biol Chem* 2004;**279**:26227–32.
- 30 Carrocini GC de S, Venancio LPR, Bonini-Domingos CR. Screening of transcription factors involved in fetal hemoglobin regulation using phylogenetic footprinting. *Evol Bioinforma* 2015;**11**:239–44.
- 31 Soza-ried C, Hess I, Netuschil N, Schorpp M, Boehm T. Essential role of c-myb in definitive hematopoiesis is evolutionarily conserved. *Pnas* 2010;**107**:17340–17308.
- 32 Bauer D, Kamram S, Orkim S. Reawakening fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the β -globin disorders. *Blood* 2012;**120**:2945–53.
- 33 Ikonomi P, Noguchi CT, Miller W, Kassahun H, Hardison R, Schechter AN. Levels of GATA-1/GATA-2 transcription factors modulate expression of embryonic and fetal hemoglobins. *Gene* 2000;**261**:277–87.
- 34 Xu J, Sankaran VG, Ni M, Menne TF, Puram R V., Kim W, Orkin SH. Transcriptional

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

silencing of beta-globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes Dev* 2010;**24**:783–9.

- 35 Zhu X, Wang Y, Pi W, Liu H, Wickrema A, Tuan D. NF-Y Recruits Both Transcription Activator and Repressor to Modulate Tissue- and Developmental Stage-Specific Expression of Human Y-Globin Gene. *PLoS One* 2012;**7**.
doi:10.1371/journal.pone.0047175

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure legends

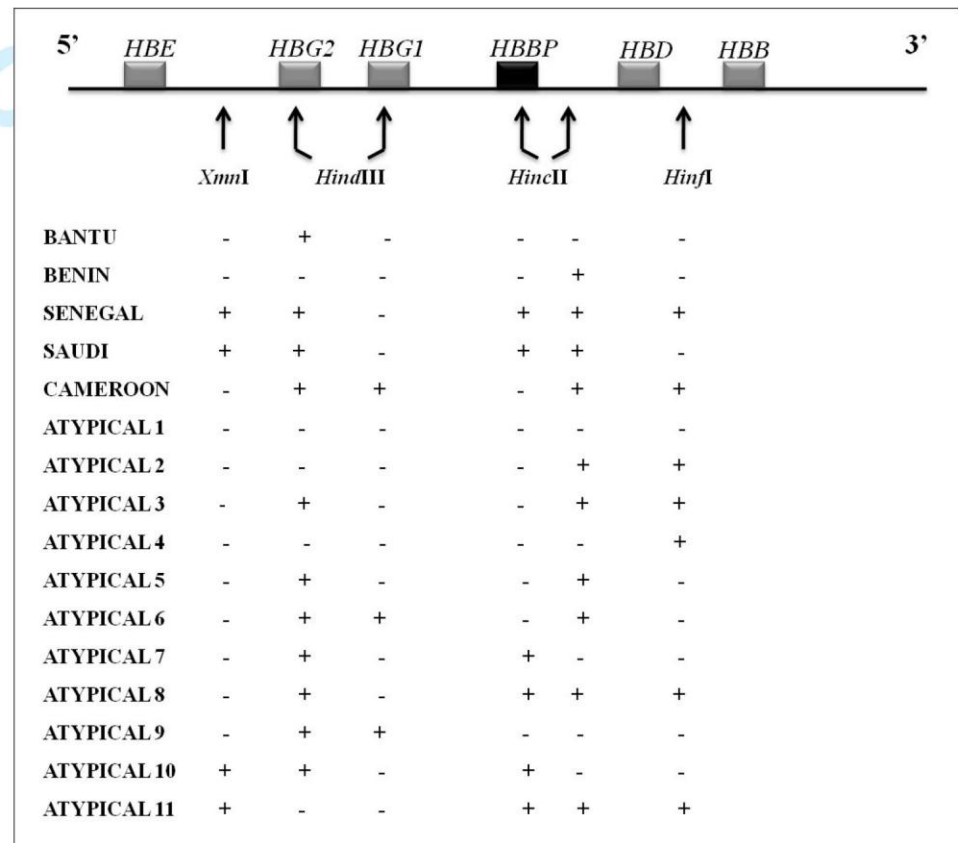
Figure 1. Classification of typical and atypical haplotypes according to six polymorphic sites analysis of the beta-globin cluster. *HBE*: epsilon gene; *HBG2*: gama-glicin gene; *HBG1*: gama-alanin gene; *HBBP*: pseudo-beta gene; *HBB*: beta gene. (-) absence of enzyme restriction sites; (+) presence of enzyme restriction sites.

Figure 2. Haplotype tree. *HBG2*: gama-glicin gene; *HBG1*: gama-alanin gene; *HBBP*: pseudo-beta gene; *HBB*: beta gene. (-) absence of enzyme restriction sites; (+) presence of enzyme restriction sites. The dark gray squares indicate the haplotypes that may have originated from gene recombination or point mutation. The light gray squares indicate the haplotypes that may have originated only by point mutation.

Figure 3. Hematological index among sample groups: **A.** Difference between Bantu/Bantu x Bantu/Atypicals groups: **A1.** Red blood cells (RBC M/uL), **A2.** Hemoglobin (Hb g/dL) and **A3.** Hematocrit (Ht %). **B.** Difference among Bantu/Bantu x Bantu/Atypical 1 x Bantu/Atypicals* groups: **B1.** Red blood cells (RBC M/uL), **B2.** Hemoglobin (Hb g/dL) and **B3.** Hematocrit (Ht %). **C.** Difference among Bantu/Bantu x Bantu/Atypical 1 x Bantu/Atypicals* x Benin/Benin x Benin/Atypical 1 groups: **C1.** Hemoglobin (Hb g/dL) and **C2.** Hematocrit (Ht %). Comparison made by General Linear Models. Data were expressed as mean \pm 95% confidence intervals.

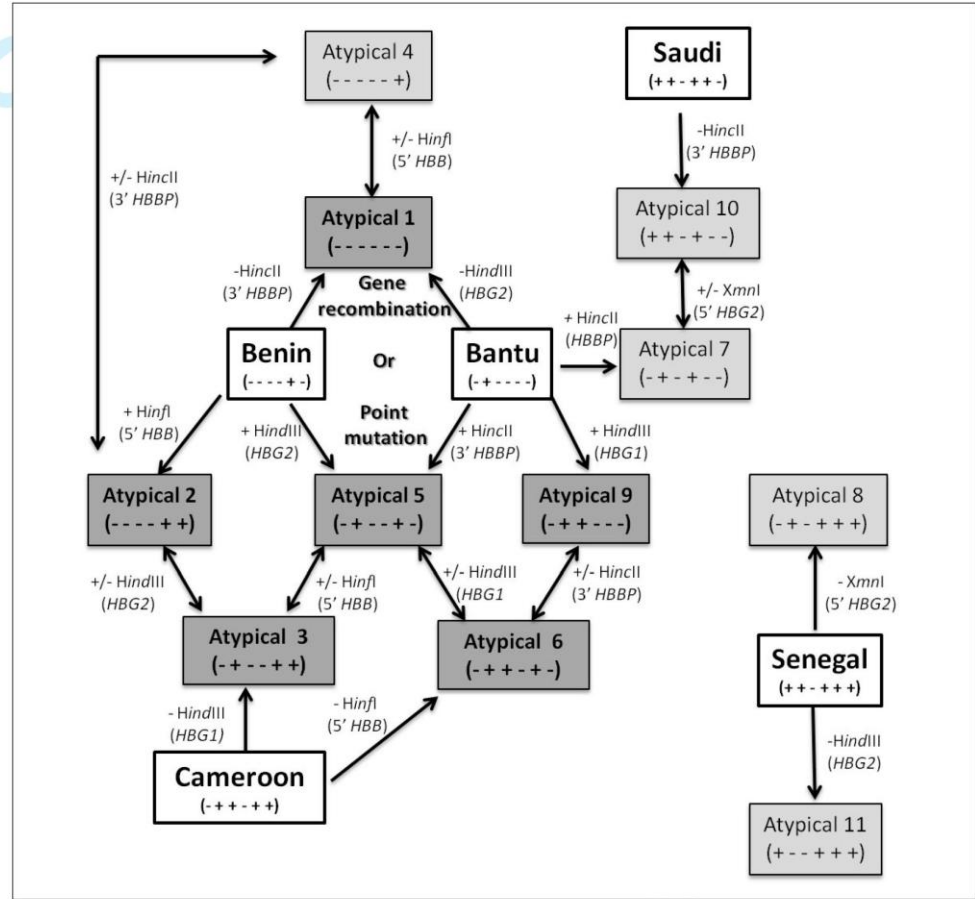
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 2



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 3

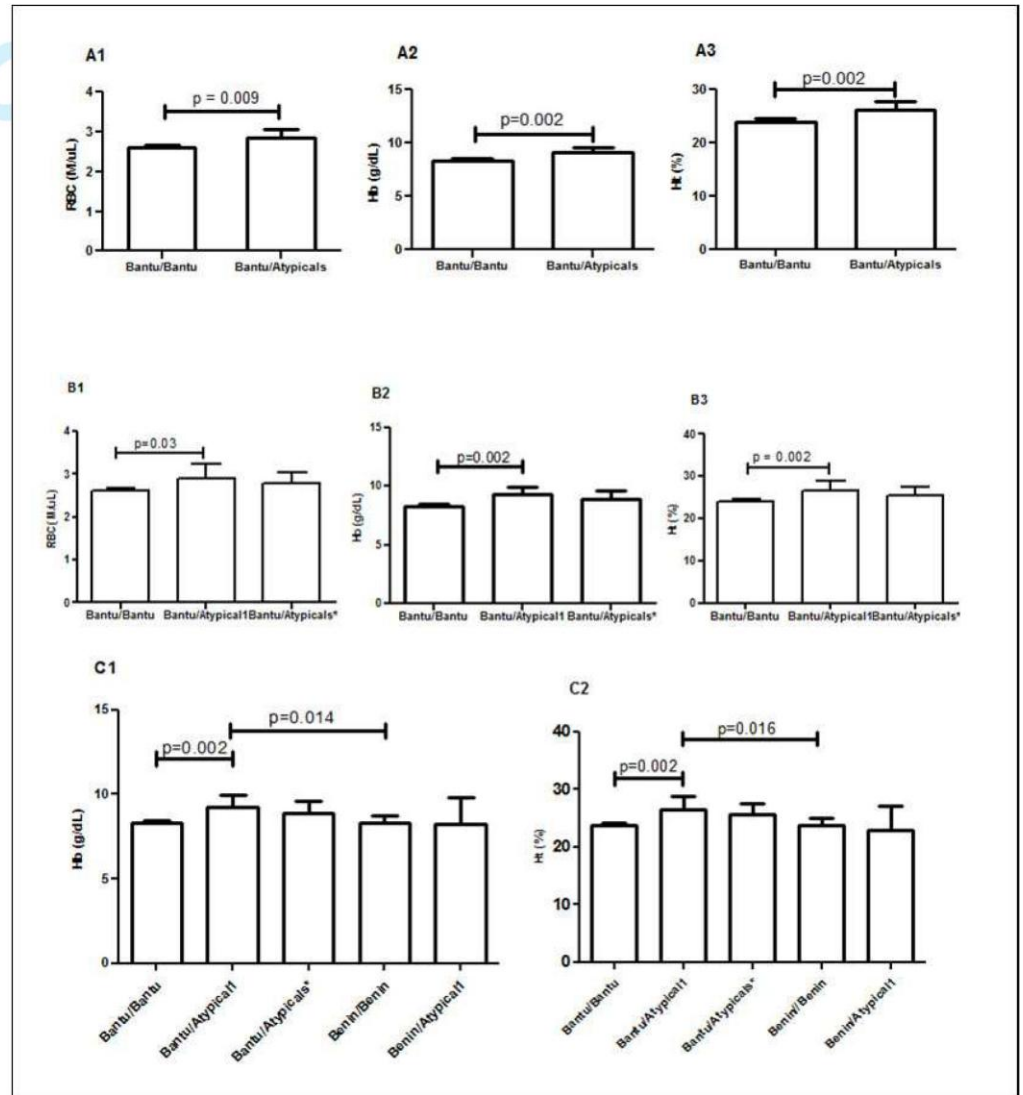


Table I. Frequency of beta-S globin haplotypes in study group

Beta-S globin haplotypes	Gender (N)		TOTAL		Atypicals beta-S haplotypes	Gender (N)		TOTAL	
	M	W	N (600)	%		M	W	N (63)	%
Bantu/Bantu	141	195	336	55.2	Bantu/ Atypical 1	8	14	22	34.9
Bantu/Benin	69	80	149	24.5	Bantu/ Atypical 2	5	2	7	11.1
Bantu/Cameroon	2	2	4	0.7	Bantu/ Atypical 3	4	1	5	7.9
Bantu/Saudi	2	1	3	0.5	Bantu/ Atypical 4	2	2	4	6.3
Bantu/Senegal	2	1	3	0.5	Bantu/ Atypical 1 5	-	1	1	1.6
Bantu/Atypical	22	26	48	7.9	Bantu/ Atypical 6	2	-	2	3.2
Benin/Benin	16	22	38	6.2	Bantu/ Atypical 7	-	3	3	4.7
Benin/Saudi	-	1	1	0.2	Bantu/ Atypical 8	-	2	2	3.2
Benin/Camarões	-	3	3	0.5	Bantu/ Atypical 9	-	1	1	1.6
Benin/ Atypical	6	4	10	1.6	Bantu/ Atypical 10	1	-	1	1.6
Senegal/ Atypical	-	1	1	0.2	Benin/ Atypical 1	3	3	6	9.5
Atypical / Atypical	2	2	4	0.7	Benin/ Atypical 2	-	1	1	1.6
					Benin/ Atypical 5	1	-	1	1.6
					Benin/Atypical 6	2	-	2	3.2
					Senegal/ Atypical 11	-	1	1	1.6
					Atypical 1/ Atypical 1	-	2	2	3.2
					Atypical 3/ Atypical 3	1	-	1	1.6
					Atypical 5/ Atypical 5	1	-	1	1.6

N: sample number; M: man; W: woman; - without sample number

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

Table II. Levels of study parameters between the main sample groups according to HC treatment

Beta-S haplotypes	Hb F (%) Mean (95% CI)	Hematological index			
		RBC (M/ μ L)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV(fL)
		Mean (95% CI)	Mean (95%)	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)
Bantu/Bantu	7.89 (7.15 - 8.63)	2.61 (2.54 - 2.68) ^a	8.31 (8.15 - 8.48) ^a	23.64 (23.14 - 24.24)	94.29 (87.92 - 100.67)
Bantu/Atypical 1	7.01 (3.89 - 10.13)	2.89 (2.55 - 3.23) ^b	9.24 (8.52 - 9.96) ^b	26.53 (24.27 - 28.80)	91.56 (87.08 - 96.04)
Bantu/Atypicals*	8.31 (5.47 - 11.16)	2.79 (2.53 - 3.04) ^{a,b}	8.88 (8.20 - 9.57) ^{a,b}	25.57 (23.57 - 27.58)	91.98 (85.72 - 98.24)
p-value	0.63	0.03*	0.002*	0.002*	0.90
Benin/Benin	9.40 (7.07 - 11.72)	2.54 (2.35 - 2.74)	8.31 (7.89 - 8.72)	23.70 (22.48 - 24.92)	92.18 (87.65 - 96.71)
Benin/ Atypical 1	10.76 (3.99 - 17.53)	2.52 (2.06 - 2.97)	8.22 (6.61 - 9.83)	22.90 (18.64 - 27.15)	90.66 (85.17 - 96.14)
p-value	0.95	0.79	0.99	0.60	0.89
Reference Values	0.0 - 1.0	4.5 - 6.0	11.5 - 17.0	35.0 - 43.0	77.0 - 100.0
Beta-S haplotypes	Clinical severity Mean (95% CI)	Hemolytic index			
		LDH (U/L)	TB (mm/dL)	AST (U/L)	Rel. Ret. (%)
		Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)
Bantu/Bantu	0.51 (0.48 - 0.54)	995.50 (944.34- 1046.65)	3.15 (2.92 - 3.37)	54.81 (52.43 - 57.20)	9.75 (9.21 - 10.29)
Bantu/Atypical 1	0.54 (0.45 - 0.63)	909.25 (764.88 - 1053.61)	3.53 (2.43 - 4.62)	62.23 (45.64 - 78.82)	9.49 (7.61 - 11.37)
Bantu/Atypicals*	0.53 (0.38 - 0.69)	1098.92 (785.38 - 11412.46)	2.62 (1.89 - 3.36)	56.28 (46.16 - 66.40)	8.38 (6.38 - 10.37)
p-value	0.73	0.35	0.23	0.22	0.67
Benin/Benin	0.57 (0.48 - 0.66)	967.00 (832.01 - 1101.98)	3.04 (2.31 - 3.77)	53.06 (45.04 - 61.09)	9.71 (8.23 - 11.19)
Benin/ Atypical 1	0.42 (0.19 - 0.64)	1240.75 (459.80 - 2021.69)	4.58 (2.44 - 6.71)	56.40 (38.09 - 74.70)	10.03 (6.03 - 14.02)
p-value	0.81	0.23	0.36	0.94	0.90
Reference	0.0	< 480.0	< 1.0	< 35.0	0.80 - 2.0

Values

HC + : reference values in patients in HC treatment; HC - : reference values in patients without HC treatment; CI: confidence interval; Hb F: hemoglobin fetal; RBC: red blood cells; Hb: total hemoglobin; Ht: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; LDH: lactate dehydrogenase; TB: total bilirubin; AST: aspartate transaminase; Rel. Ret.: relative reticulocytocity; Atypicals: all patients that presented atypical haplotypes; Atypicals*: all patients that presented atypical haplotypes except the haplotype Atypical 1; *p-value by Fisher post-hoc

Table III. Transcription factors in beta-globin cluster

Restriction enzymes	Beta-globin cluster region	Recognition site	Wild sequence	Mutation	Pattern of the wild subject	Number of the transcription factors		Specific factors	
						Wild	Mut.	Wild	Mut.
<i>Xmn</i> I	5' <i>HBG2</i>	GAANN↓NNTTC	GAAACGGT <u>CC</u>	C→T (rs7482144)	-	1	8	-	TFCP2
<i>Hind</i> III	<i>HBG2</i>	A↓AGCTT	AAGCTT	?	+	?	?	?	?
<i>Hind</i> III	<i>HBG1</i>	A↓AGCTT	AAGCTT	?	+	?	?	?	?
<i>Hinc</i> II	<i>HBBP</i>	GTY↓RAC	GTTG <u>GC</u>	G→A	-	18	28	Myb	Myb
<i>Hinc</i> II	3' <i>HBBP</i>	GTY↓RAC	GTTA <u>TC</u>	T→A	-	16	38	GATA1 GATA2	GATA2
<i>Hinf</i> I	5' <i>HBB</i>	G↓ANTC	GAATC	?	+	?	?	?	?

HBG2: gama-glicin gene; *HBG1*: gama-alanin gene; *HBBP*: pseudo-beta gene; *HBB*: beta gene. (-) absence of enzyme restriction sites; (+) presence of enzyme restriction sites. ?: unknown mutation; Mut.: mutation

8. APÊNDICES

8.2. APÊNDICE II: Questionário do projeto de Pesquisa “*Estudo de Polimorfismos em Pacientes portadores de Doença Falciforme e sua associação com complicações clínicas*”.

Data: ____/____/____ Matrícula: _____

Nome completo: _____

Sexo: () feminino () masculino Data de nascimento: ____/____/____

História Clínica: Complicações Agudas e Crônicas

Nº de crises de dor por ano no último ano: 0 a 2 3 a 5 maior igual a 6

Nº de infecções por ano no último ano: 0 a 2 3 a 5 maior igual a 6

Nº de internações por ano no último ano: 0 a 2 3 a 5 maior igual a 6

Complicações clínicas na doença falciforme		SIM	NÃO	Quantidade
Neurológicas	Acidente vascular cerebral			
Pulmonares	Síndrome Torácica Aguda			
	Hipertensão Pulmonar			não aplicável
Oftálmicas	Retinopatia			não aplicável
Cardíacas	Cardiomegalia			não aplicável
Hepatobiliar	Colecistomizado			não aplicável
	Litíase biliar			não aplicável
Renal/Geniturinária	Priapismo			não aplicável
	Preteinúria			não aplicável
Osteoarticular	Necrose fêmur: estágio I			não aplicável
	Necrose fêmur: estágio II			não aplicável
	Necrose úmero: estágio I			não aplicável
	Necrose úmero: estágio II			não aplicável
Ósseas	Alterações faciais			
Cutânea	Úlcera isquêmica: estágio I			
	Úlcera isquêmica: estágio II			
	Úlcera isquêmica: estágio III			
Complicações esplênicas	Esplenectomizado			não aplicável
	Sequestros esplênicos			

Histórico Transfusional

- Nº de unidades de concentrado de hemácias transfundidas até o início do estudo?

menor 10 10 a 20 21 a 30 31 a 10 maior que 40

- Em regime regular de transfusão de hemácias?

Não Sim Intervalo: _____ Data início da transfusão: _____

Data da última transfusão: _____

Número de transfusão: _____

Medicamentos em uso

- Hidroxiureia: Não Sim Início (data): _____ Dose diária: _____

- Desferroxamina (Desferal): Não Sim Início (data): _____ Dose diária: _____

- Deferiprona (Ferriprox): Não Sim Início (data): _____ Dose diária: _____

- Deferasirox (Exjade): Não Sim Início (data): _____ Dose diária: _____

- Ácido fólico: Não Sim Início (data): _____

- Vitaminas: Não Sim Quais? _____

- Analgésicos: Não Sim Quais? _____

- Outros: Não Sim Quais? _____

8. APÊNDICES

Dados Bioquímicos

- Sobrecarga de ferro: Não Sim Órgão afetado: _____
- Nível de ferritina: _____
- Saturação de ferritina: _____
- T2*: _____

Observações: _____

9. ANEXOS

9. ANEXO

9.1. ANEXO I: Parecer CEP da UNESP/IBILCE

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Vaso-oclusão em doença falciforme: interação gênica e/ou características intrínsecas da manifestação clínica?

Pesquisador: Jéssika Viviani Okumura

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 26806914.6.0000.5466

Instituição Proponente: Instituto de Biotecnologia Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 566.710

Data da Relatoria: 14/03/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto é interessante e pretende investigar em amostras de sangue de pacientes com doença Falciforme (DF), provenientes do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti- HEMORIO do Rio de Janeiro-RJ, a associação de alguns polimorfismos genéticos envolvidos no controle da pressão arterial, regulação do fluxo sanguíneo e coagulação com a ocorrência de crises vaso-oclusivas. Dessa forma comparar o perfil genético dos pacientes e a evolução clínica, podendo trazer resultados que poderão auxiliar no tratamento diferenciado dos pacientes e diminuir a morbidade e mortalidade.

O projeto será dividido em um estudo de coorte prospectivo para avaliar um grupo de cerca de 200 crianças com DF (GCDF); e estudo de coorte retrospectivo para avaliar um grupo de cerca de 500 adolescentes e adultos com DF (GADF). Também serão utilizados dados de prontuários dos pacientes, que serão consultados semestralmente, para obtenção de dados clínicos como crises de vaso-oclusão dentre outros e laboratoriais.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto tem como objetivos gerais avaliar a relação entre haplótipos da beta globina e polimorfismos genéticos envolvidos no controle da pressão arterial (ADA), reguladores do fluxo

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2428

Fax: (17)3221-2500

E-mail: liliane@ibilce.unesp.br

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO**



Continuação do Parecer: 566.710

sanguíneo (ECA I e II) e coagulação (PAI-1 e CBS) e relacionados com a ocorrência de vaso-oclusão em pacientes (crianças, adolescentes e adultos) com doença falciforme (Hb SS, Hb SC e Hb S/β-talassemia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Das crianças com DF serão coletadas amostras de sangue (cerca de 4 ml) por profissional do HEMORIORJ, sendo que estarão expostas somente a risco considerado mínimo, caracterizado pela possibilidade de hematoma no local da punção. Todas as informações fornecidas pelos sujeitos da pesquisa, após assinatura do TCLE e os resultados obtidos nos exames laboratoriais serão mantidos em sigilo sendo que, estes últimos, só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Os resultados dos testes laboratoriais serão informados aos clínicos responsáveis pelos pacientes, por meio de laudo específico. Os médicos hematologistas do HEMORIO acompanharão a consulta aos prontuários para a obtenção dos dados clínicos. Quanto aos adolescentes e adultos as amostras de sangue já foram coletadas e encontram-se armazenadas sob a responsabilidade da pesquisadora/orientadora, devendo-se apenas obter novas informações clínicas dos prontuários.

Quanto aos benefícios os resultados poderão permitir uma melhor conduta terapêutica e avaliação dos pacientes atendidos pelo HEMORIO, destacando assim, para essa instituição, um avanço no atendimento personalizado de seus pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante, o projeto esta bem redigido e estruturado com a descrição da metodologia e etapas que serão realizadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nesta nova versão do projeto a pesquisadora solicitou dispensa do TCLE referente ao estudo retrospectivo do grupo de 500 indivíduos jovens e adultos, cujas amostras de DNA encontram-se armazenadas no laboratório sob responsabilidade da docente Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos, oriunda de projeto anterior também aprovado por este CEP. A solicitação é pertinente considerando o grande número de amostras e dificuldade para contactar novamente os pacientes.

Quanto ao estudo prospectivo em crianças esta sendo apresentado um novo TCLE redigido de forma adequada, com clareza dos objetivos e incluindo o risco mínimo, assim como os dados para contato com o CEP.

Recomendações:

Nenhuma recomendação

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2428

Fax: (17)3221-2500

E-mail: liliane@ibilce.unesp.br

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



Continuação do Parecer: 566.710

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Os relatórios parciais são obrigatórios e devem ser encaminhados semestralmente a partir desta data.

SAO JOSE DO RIO PRETO, 25 de Março de 2014

Assinador por:
Ana Carolina Conti e Silva
(Coordenador)

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265
Bairro: JARDIM NAZARETH **CEP:** 15.054-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3221-2428 **Fax:** (17)3221-2500 **E-mail:** liliane@ibilce.unesp.br

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica da presente Tese, em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 08 de março de 2017

Jéssika Viviani Okumura