

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**JOÃO RICARDO FRIEDRISCH**

**POLIMORFISMOS DO DNA NOS LOCI BCL11A, HMIP-2 E XMN1-HBG2 E SUA  
CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA FETAL EM PACIENTES  
COM ANEMIA FALCIFORME TRATADOS COM HIDOXIUREIA**

**PORTO ALEGRE**

**2015**

**POLIMORFISMOS DO DNA NOS LOCI BCL11A, HMIP-2 E XMN1-HBG2 E SUA  
CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS DE HEMOGLOBINA FETAL EM PACIENTES  
COM ANEMIA FALCIFORME TRATADOS COM HIDOXIUREIA**

**JOÃO RICARDO FRIEDRISCH**

A apresentação desta tese é requisito do programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Doutor.  
Orientadora: Profa. Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla

**PORTO ALEGRE**

**2015**

CIP - Catalogação na Publicação

Friedrich, João Ricardo  
POLIMORFISMOS DO DNA NOS LOCI BCL11A, HMIP-2  
EXMNI-HBG2 E SUA CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS  
DEHEMOGLOBINA FETAL EM PACIENTES COM ANEMIA  
FALCIFORMETRATADOS COM HIDOXIUREIA / João Ricardo  
Friedrich. -- 2015.  
135 f.

Orientadora: Lucia Mariano da Rocha Silla.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Anemia Falciforme. 2. Hemoglobina Fetal. 3.  
Polimorfismo de Nucleotídeo Único. 4. Hidroxiureia. I.  
da Rocha Silla, Lucia Mariano, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## BANCA EXAMINADORA

Professor Doutor Ernani Luis Rhoden - PPGCS-UFCSPA

Professor Doutor Marco Antonio Rodrigues Torres - PPGIE-UFRGS

Professor Doutor Carlos Roberto de Mello Rieder - PPGCM-UFRGS

Professor Doutor Marino Muxfeldt Bianchin - PPGCM-UFRGS

*À minha esposa, Mirella, ao meu filho, aos meus enteados e à minha mãe, pelo amor que  
sempre me dedicaram.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla, médica hematologista de inteligência e competência profissional ímpares e de espírito progressista, pela oportunidade do convívio, pelo incondicional apoio e pela possibilidade de constante aprendizagem, que não se limitam a esta Tese.

À Profa. Dra. Liane Esteves Daudt, chefe do Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a todos seus médicos e demais funcionários pelo incentivo, consideração e colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, aos seus professores, funcionários, meus colegas, pela oportunidade de aprimoramento e crescimento profissional.

À Ianaê Indiará Wilke, Biomédica, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo apoio, seriedade e competência que foram indispensáveis para a concretização deste estudo.

À Dra. Christina Matzembacher Bittar, médica hematologista do Centro de Referência em Anemia Falciforme do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio e ensinamentos valiosos.

À Dra. Maria Aparecida Lima da Silva pelo incentivo e colaboração.

Aos nossos caros pacientes e seus familiares, que gentilmente aceitaram fazer parte deste estudo.

À Profa. Dra. Vivien Sheehan e ao Prof. Dr. Jonathan M. Flanagan, do Laboratório do *Texas Children's Hematology Center, Department of Pediatrics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas*, pela oportunidade de podermos ter realizado este estudo colaborativo.

Em especial, à Profa. Dra. Fani Martins Job, *in memoriam*, que por toda sua vida deu peculiar atenção aos pacientes com anemia falciforme. Seus conhecimentos, seus preceitos e sua postura profissional foram basilares para a formação de várias gerações de médicos e a solidificação da hematologia como uma especialidade de excelência no Estado do Rio Grande do Sul.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Embora todos os indivíduos com anemia falciforme (AF) apresentem o mesmo defeito molecular nos genes da beta-globina, existe uma considerável variabilidade fenotípica entre eles. A síntese continuada da hemoglobina fetal (HbF) é o mais potente modificador da morbimortalidade da AF. A HbF diminui a polimerização da desoxi-HbS, reduzindo a intensidade da anemia hemolítica crônica e dos fenômenos vaso-oclusivos, conseqüentemente, as complicações sistêmicas da AF. Há uma grande variação na taxa de síntese de HbF (1% a 30%) em indivíduos com AF. Vários estudos demonstraram que o tratamento com hidroxiureia (HU) diminui a morbimortalidade desta hemoglobinopatia, principalmente, por estimular a síntese de HbF. Na dose máxima tolerada (DMT), a HU geralmente aumenta os níveis de HbF entre 10% e 40%. Contudo, há uma grande variabilidade de resposta, a DMT é muito variável, cerca de 25% dos portadores de AF não respondem e não há preditores de resposta definidos à HU. Estudos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) demonstraram a influência de modificadores epigenéticos na regulação da expressão da HbF. Estes elementos são, principalmente, o oncogene BCL11A, a região intergênica HMIP e o polimorfismo Xmn1-HBG2. Estes 3 *quantitative trait loci* (QTLs) detêm 20% a 50% do controle da expressão dos genes HBG (genes envolvidos na síntese da HbF). **OBJETIVOS:** Avaliar o comportamento epidemiológico e a associação dos SNPs Xmn1- HBG2; BCL11A rs7482144, rs4671393 e rs11886868; HMIP-2 rs9399137 e rs9402686 com a expressão da HbF e com o comportamento dos parâmetros hematimétricos em portadores de AF tratados com HU. **PACIENTES E MÉTODOS:** Neste estudo pioneiro de coorte prospectivo foram incluídos sequencialmente indivíduos com AF, em uso regular de HU por pelo menos 6 meses, que não receberam transfusão sanguínea 3 meses antes de ingressar no estudo e que não faziam uso de drogas que estimulassem a síntese de HbF. Foram coletados 4 ml de sangue venoso periférico para extração do DNA genômico. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por meio da reação da cadeia de polimerase em tempo real. **RESULTADOS:** Foram avaliados 121 pacientes, entre 1 ano e 9 meses-54 anos ( $19 \pm 14$ ) anos idade, que estavam recebendo doses regulares de HU entre 8,6-42,8 ( $23 \pm 7,6$ ) mg/kg/dia, durante 6- 254 ( $102 \pm 67$ ) meses. Não encontramos correlação entre a contagem de leucócitos, de neutrófilos e de reticulócitos; hemoglobina total; volume corpuscular médio e a concentração de hemoglobina corpuscular média, com os valores basais da HbF. A HbF basal ( $r=0,40$ ;  $P < 0,001$ ), a hemoglobina total basal ( $r=0,26$ ;  $P = 0,005$ ) e o tempo de exposição ( $r = -0,30$ ;  $P = 0,001$ ) foram associadas significativamente com maiores taxas de HbF ao final do estudo. Não houve correlação dos polimorfismos com os parâmetros hematimétricos, com o tempo de exposição e com a DMT de HU. Os SNPs HMIP-2 rs9399137 e rs9402686 foram responsáveis por 5,7% e 8,4% do total de variação da HbF basal ( $P= 0,01$  e  $P=0,002$ ). Não houve correlação, porém, entre os demais polimorfismos com a variação dos níveis basais de HbF. Os SNPs BCL11A rs1427407, rs4671393 e rs11886868 foram responsáveis, respectivamente, por uma variação de 7,6%, 4,5% e 4,3% nos níveis de HbF final ( $P=0,017$ ;  $P=0,025$  e  $P=0,029$ ). Ainda, houve uma associação do rs1427407 ( $B = 0,29$ ;  $P = 0,035$ ) e do rs4671393 ( $B = 0,28$ ;  $P = 0,036$ ) em relação aos valores do delta HbF (variação da HbF final menos a HbF inicial). **CONCLUSÃO:** Estes dados sugerem que os indivíduos com AF com SNP BCL11A rs1427407 respondem mais favoravelmente ao tratamento com HU, no incremento dos níveis de HbF. São necessários estudos com populações maiores para validarmos estes achados.

**Palavras-chave:** Anemia Falciforme, Hemoglobina Fetal, Polimorfismo de Nucleotídeo Único, Hidroxiureia.



## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Although all individuals with sickle cell anemia (SCA) have the same molecular defect in the beta-globin genes, considerable phenotypic variability exists between them. Continued synthesis of fetal hemoglobin (HbF) is the most powerful SCA morbimortality modifier. HbF decreases the polymerization of deoxy-Hb, reducing the intensity of chronic hemolytic anemia and vaso-occlusive phenomena, and consequently systemic complications of SCA. There is a large variation in the HbF synthesis rate (1 to 30%) in patients with SCA. Several studies show that treatment with hydroxyurea (HU) decreases the morbimortality of this hemoglobinopathy, mainly by stimulating HbF synthesis. At the maximum tolerated dose (MTD), HU generally increases HbF levels from 10 to 40%. However, there is great variability in response as the MTD is highly variable, about 25% of SCA patients do not respond and there are no response predictors set for HU. Single nucleotide polymorphism studies (SNPs) demonstrate the influence of epigenetic modifiers in the regulation of HbF expression. These elements are, mainly, the BCL11A oncogene, the HMIP intergenic region and the Xmn1-HBG2 polymorphism. These 3 quantitative trait loci (QTLs) hold 20 to 50% of HBG gene expression control (genes involved in HbF synthesis).

**OBJECTIVE:** To study the epidemiological behaviors and the association of SNPs Xmn1- HBG2; BCL11A rs7482144, rs4671393 and rs11886868; HMIP-2 rs9399137 and rs9402686

with HbF expression and with the behavior of hematimetric parameters in SCA patients treated with HU. **PATIENTS AND METHODS:** In this pioneering prospective cohort study, we included SCA patients, in regular treatment with HU at least for 6 months, who had not received blood transfusions in the 3 months prior to entering in the study and who didn't use drugs that stimulate HbF synthesis. We collected 4 ml of venous blood to proceed with the genomic DNA extraction. The polymorphism genotyping was done by real-time polymerase chain reaction. **RESULTS:** We evaluated 121 individuals with SCA aged between 1 year 9 months and 54 years ( $19 \pm 14$ ) who were receiving HU doses between 8.6 and 42.8 ( $23 \pm 7.6$ ) mg/kg/day for 6 to 254 ( $102 \pm 67$ ) months. No correlation was found between total leukocyte, neutrophils and reticulocytes counts; total hemoglobin; mean corpuscular volume and the concentration of mean corpuscular hemoglobin with baseline values of HbF. Basal HbF ( $r = 0.40$ ;  $P < 0.001$ ), total baseline hemoglobin ( $r = 0.26$ ;  $P = 0.005$ ) and exposure time to HU ( $r =$

$-0.30$ ;  $P = 0.001$ ) were significantly associated with higher HbF rates at the end of the study. There was no correlation of polymorphisms with the hematological parameters, exposure time and the MTD of HU. The SNPs HMIP-2, rs9399137 and rs9402686 accounted for 5.7% and 8.4% of the total variation of baseline HbF ( $P = 0.01$  and  $P = 0.002$ ). There was no correlation, however, between the other polymorphisms and variation in baseline HbF levels. The SNPs BCL11, rs1427407, rs4671393 and rs11886868 were responsible, respectively, for a variation of 7.6%, 4.5% and 4.3% in the final HbF levels ( $P = 0.017$ ,  $P = 0.025$  and  $P = 0.029$ ). Still, there was an association of rs1427407 ( $B = 0.29$ ;  $P = 0.035$ ) and rs4671393 ( $B = 0.28$ ;  $P = 0.036$ ) in relation to delta HbF values (final minus initial HbF variation). **CONCLUSIONS:** These data suggest that individuals with SCA who have SNP rs1427407 BCL11A respond more favorably to HU treatment, with increased HbF levels. Studies with larger populations are necessary to validate these findings.

**Keywords:** Sickle Cell Anemia, Fetal Hemoglobin, Single Nucleotide Polymorphism, Hydroxyurea

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Descrição esquemática dos resultados encontrados na busca da literatura .....	26
Figura 2: Representação da estrutura tetramérica da molécula de HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) humana. Cada cadeia de globina está associada a um grupo prostético heme ao qual se liga o átomo de ferro. Adaptado de (47).....	28
Figura 3: Representação esquemática da expressão normal das cadeias de globinas e dos principais sítios de hematopoese, conforme o estágio de desenvolvimento ontogênico humano, com os respectivos níveis de expressão das cadeias de globina nos períodos embrionário, fetal e adulto. Adaptado de (48) .....	30
Figura 4: Agrupamento dos genes de alfa-globina (braço curto do cromossomo 16) e de beta- globina (braço curto do cromossomo 11) e as respectivas moléculas de Hb a que dão origem. Todos os genes de globina têm estrutura similar, compostos de 3 éxons e de 2 íntrons. Adaptado de (56) .....	32
Figura 5: Frequências do gene S em diferentes estados do Brasil, conforme dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal do Ministério da Saúde. Adaptado de (135).	48
Figura 6: Fisiopatologia da Anemia Falciforme. A síntese de HbS é resultado de uma mutação de ponto simples. Quando desoxigenada, a desoxi-HbS polimeriza no interior dos eritrócitos, deformando-os e tornando-os rígidos (eritrofalciformação). Os eritrócitos, neutrófilos e reticulócitos participam do processo de vaso-oclusão, além da hemólise intravascular. N: neutrófilos, He: hemácias, EC: células endoteliais, ISQ: isquemia. Adaptado de (142).	51
Figura 7: Representação das regiões geográficas associadas aos sítios polimórficos localizados no cromossomo 11, bem como o padrão de clivagem para diferentes endonucleases de restrição. Adaptado de (162).....	62
Figura 8: Estrutura química da hidroxíureia .....	63
Figura 9: Mecanismo de Ação e os Efeitos Benéficos do Uso de Hidroxíureia na Doença Falciforme .....	66
Figura 10: Produção de Óxido Nítrico pela Hidroxíureia.....	70

## **LISTA DE TABELAS DA TESE**

Tabela 1: Anemia Hemolítica e Suas Complicações.....	59
Tabela 2: Síndromes Dolorosas e suas Complicações .....	59
Tabela 3: Principais Complicações Em Múltiplos Órgãos e Suas Sequelas .....	60

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1. Fetal hemoglobin association results for SNPs BCL11A, HMIP-2, and Xmn1-HBG2 loci in the SCA patients .....	117
---	-----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ADAMTS13</b>	<i>A disintegrin-like and metalloprotease with trombospondin type 1 motifs</i>
<b>Atip</b>	Haplótipo atípico
<b>AVC</b>	Acidente vascular cerebral
<b>BCL11A</b>	<i>B-cell lymphoma/leukemia 11A</i>
<b>Ben</b>	Haplótipo Benin
<b>BRG1- ATP</b>	<i>Dependent helicase SMARCA4 (fator de transcrição)</i>
<b>Cam</b>	Haplótipo Camarões
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CAR</b>	Haplótipo República Centro Africana ou Bantu
<b>CD36</b>	<i>Cluster of differentiation 36</i>
<b>cGMP</b>	Guanosina monofosfato cíclica
<b>CHCM</b>	Concentração de hemoglobina corpuscular média
<b>c-MYB</b>	Proto-oncogene membro da família de mieloblastoses (myeloblastosis)
<b>COUP-TF</b>	<i>Chicken ovalbumin upstream promoter.-transcription factor 2</i>
<b>CRAF</b>	Centro de Referência em Anemia Falciforme
<b>DF</b>	Doença falciforme
<b>DMT</b>	Dose máxima tolerada
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DRED</b>	<i>Direct Repeat Erythroid-Definitive</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético sódico
<b>EGR1</b>	<i>Early Growth Response 1</i>
<b>EKLF1</b>	<i>Erythroid Krüppel-like factor 1</i>
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>ERK1</b>	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase 1</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>F cells</b>	Células fetais
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FOG</b>	<i>Friend of GATA – fator de transcrição</i>
<b>FT</b>	Fator tecidual
<b>FvW</b>	Fator de von Willebrand
<b>GATA-1</b>	<i>Globin Transcription Factor 1</i>
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
<b>H2O2</b>	Peróxido de hidrogênio
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HBA</b>	Gene da alfa-globina
<b>HbA1</b>	Hemoglobina 1 do adulto
<b>HbA2</b>	Hemoglobina 2 do adulto
<b>HbAS</b>	Heterozigoto para hemoglobina S, traço falciforme
<b>HBB</b>	Gene da beta-globina
<b>HbC</b>	Hemoglobina C
<b>HBD</b>	Gene da delta-globina
<b>HbD</b>	Hemoglobina D
<b>HBE1</b>	Gene épsilon-globina
<b>HbF</b>	Hemoglobina fetal
<b>HbG</b>	Gene da gama-globina
<b>HbH</b>	Hemoglobina H

<b>HbS</b>	Hemoglobina S
<b>HBS1-L</b>	<i>Hsp70 subfamily B suppressor 1-like protein</i>
<b>HbSS</b>	Homozigoto para a hemoglobina S, anemia falciforme
<b>HBZ</b>	Gene da zeta-globina
<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular média
<b>HCPA</b>	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
<b>HDAC</b>	<i>Histone deacetylase</i>
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
<b>HS-40</b>	Sítios hipersensíveis à DNase I
<b>Ht</b>	Hematócrito
<b>HU</b>	Hidroxiureia
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
<b>ICAM-2</b>	<i>Intercellular adhesion molecule-2</i>
<b>ICAM-4</b>	<i>intercellular adhesion molecule 4</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	interleucina 1 beta
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IL-3</b>	Interleucina 3
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>kb</b>	Kilobases
<b>kDa</b>	KiloDaltons
<b>KLF1</b>	<i>Krüppel-like factor 1</i>
<b>LCR</b>	<i>Locus Control Region</i> (região controladora de locus)
<b>LDH</b>	Enzima desidrogenase láctica
<b>LILACS</b>	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
<b>Lu/BCAM</b>	<i>Lutheran/Molécula de adesão celular basal</i>
<b>MBD2</b>	<i>Methyl-CpG Binding Domain Protein 2</i>
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotática de monócito-1
<b>M-CSF</b>	Fator estimulador de colônia de macrófago
<b>miR</b>	Micro-RNA
<b>NF-E2</b>	<i>Nuclear Factor Erythroid derived 2</i>
<b>NF-E4</b>	<i>Nuclear factor, erythroid 4</i>
<b>NFK <math>\beta</math></b>	Fator transcricional Kappa beta
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	<i>Nitric oxide synthase</i>
<b>NuRD</b>	<i>Nucleosome Remodeling Deacetylase Complex</i>
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio molecular
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OR51B5/6</b>	<i>Olfactory Receptor, Family 51, subfamily B</i>
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da Polimerase
<b>PHHF</b>	Persistência hereditária de hemoglobina fetal
<b>PNTN</b>	Programa Nacional de Triagem Neonatal
<b>Primers</b>	Sequência dos oligonucleotídeos sintéticos
<b>QTL</b>	<i>Quantitative Trait Loci</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Espécies reativas ao oxigênio

<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
<b>Saudi</b>	Haplótipo Saudi
<b>SciELO</b>	<i>Scientific Electronic Library Online</i>
<b>Sen</b>	Haplótipo Senegal
<b>sGC</b>	Guanilato ciclase solúvel
<b>SNP</b>	Polimorfismo de único nucleotídeo
<b>SRY-6</b>	<i>Sex Determining Region Y-box 6</i>
<b>STA</b>	Síndrome Torácica Aguda
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TM</b>	<i>Trade Mark</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>USA</b>	<i>United States of America</i>
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adesão à célula vascular-1
<b>VCM</b>	Volume corpuscular médio
<b><math>\beta</math>LCR</b>	<i>Hemoglobin beta locus control region</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

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



## ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO .....	19
2.	REVISÃO DA LITERATURA .....	25
2.1	ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES .....	25
2.2	A MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA .....	27
2.3.	ONTOGÊNESE DAS HEMOGLOBINAS HUMANAS .....	28
2.4.	OS GENES DAS GLOBINAS HUMANAS .....	30
2.5.	TRANSIÇÃO DA SÍNTESE DAS HEMOGLOBINAS EMBRIONÁRIA-FETAL-ADULTA.....	32
2.6.	OS POLIMORFISMOS GENÉTICOS E A REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA HEMOGLOBINA FETAL .....	34
261	..... O Polimorfismo Xmn1-HBG2 no Locus HBB do Cromossomo 11p15 .....	35
262	..... A região intergênica HBS1L-MYB (HMIP) no cromossomo 6q23.3 .....	36
263	..... O Oncogene BCL11A no cromossomo 2p16 .....	38
2.7.	AS HEMOGLOBINOPATIAS .....	40
271	..... As Hemoglobinopatias de Síntese .....	40
272	..... As Hemoglobinopatias Estruturais .....	41
273	..... A Anemia Falciforme .....	41
2731	1..... Aspectos Históricos .....	42
2732	2..... Epidemiologia da Anemia Falciforme .....	44
2733	3..... Fisiopatologia da Anemia Falciforme .....	48
27331	1..... A Polimerização da Desoxi-Hemoglobina S .....	

	49	
27332	2. As Alterações no Canal de Gardos e no Sistema de Co-Transporte do K-CI	52
27333	3. .... A Diminuição da Biodisponibilidade do Óxido Nítrico	52
27334	4. .... Anemia Falciforme: Uma Doença Inflamatória Crônica	53
27335	5. .... Hipercoagulabilidade na Anemia Falciforme	56
2734	4. .... Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme	57
2735	5. .... As Variantes Haplotípicas na Anemia Falciforme	61
2736	6. .... Anemia Falciforme e o Tratamento com Hidroxiureia	62
27361	1. .... Preditores Hematimétricos de Resposta ao Tratamento com Hidroxiureia	72
27362	2. .... Preditores Genéticos de Resposta ao Tratamento com Hidroxiureia	73
27363	3. .... Impacto dos Polimorfismos Genéticos na Expressão da Hemoglobina Fetal em Portadores de Doença Falciforme Tratados com Hidroxiuréia	75
3.	JUSTIFICATIVA	79
4.	MARCO CONCEITUAL DO ESTUDO	81
5.	OBJETIVOS	82
5.1.	OBJETIVO PRIMÁRIO	82
5.2.	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	82
6.	REFERÊNCIAS DA TESE	83
7.	ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	108
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	131
9.	PERPECTIVAS FUTURAS	132
10.	ANEXOS	133

ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	134
---	-----

## 1. INTRODUÇÃO

A anemia é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade da população humana, tanto em países desenvolvidos, subdesenvolvidos e em desenvolvimento, com importantes consequências deletérias no progresso socioeconômico das nações (1,2).

A anemia tem uma fisiopatogenia complexa e é conceituada pela redução do número de eritrócitos ou pela redução da taxa hemoglobínica. As principais causas que determinam a anemia podem ser devido à destruição prematura dos eritrócitos, a perdas sanguíneas ou à deficiência na produção dos eritrócitos. As desordens hemoglobínicas que levam à deformidade dos eritrócitos causam anemia por meio da sua destruição precoce: anemia hemolítica (3).

Estima-se que aproximadamente 7% da população mundial seja portadora de alguma desordem genética da hemoglobina (Hb) e que nasçam anualmente 300.000 a 400.000 indivíduos com desordens hemoglobínicas graves. Este grupo de enfermidades, portanto, constitui uma das principais e mais frequentes doenças genéticas que acometem a população humana (4).

Embora essas condições ocorram com maior frequência em regiões tropicais, a migração das populações fez com que elas sejam encontradas nas mais diversas regiões do planeta. Algumas dessas desordens hemoglobínicas hereditárias, se não tratadas precocemente e de maneira eficaz, resultam em grande morbidade e mortalidade (4).

A anemia falciforme (AF), primeira doença monogênica humana caracterizada em nível molecular, é causada pela herança da hemoglobina mutante S (a letra S faz alusão à palavra inglesa *sickle*, que significa foice), no estado homozigótico, que é o resultado da substituição da adenina pela timina no sexto códon do gene da  $\beta$ -globina, codificando a valina na posição do ácido glutâmico. Tal modificação provoca grandes alterações na solubilidade e estabilidade da molécula hemoglobínica, levando-a a sua polimerização quando desoxigenada

e à distorção da forma do eritrócito (fenômeno da eritrofalциformação). A eritrofalциformação leva a dois fenômenos matriciais: à anemia hemolítica crônica e à vaso-oclusão, com consequente dano tecidual sistêmico por hipóxia, isquemia e necrose (5,6).

Estudos indicam que a mutação de ponto simples que deu origem à AF ocorreu no oeste da África, na Península Arábica e na Índia há cerca de 50-100 mil anos, sendo trazida no período da escravidão para as Américas (7).

No Brasil, o percentual estimado de afrodescendentes portadores da forma heterozigótica de HbS é de cerca de 5% a 10% da população (8,9).

No Rio Grande do Sul, Wagner e colaboradores (10) encontraram uma frequência da heterozigose para HbS de 1,19% entre recém-nascidos identificados pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal; em Caxias do Sul foi descrita a frequência de 0,09% para os heterozigotos AS entre doadores de sangue de descendência italiana (11). Em Porto Alegre, Daudt e colaboradores (12) encontraram uma frequência do gene da HbS de 1,2% entre recém-nascidos triados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A AF tem sido associada com alta morbidade e mortalidade devido a crises de infarto ósseo, sepsé bacteriana, acidente vascular cerebral, crise de sequestro esplênico e síndrome torácica aguda, além de outros efeitos deletérios sistêmicos, constituindo um grave e desconhecido problema de saúde pública no Brasil (13).

Sabe-se que na AF ocorre uma ampla variabilidade na gravidade do quadro clínico, que pode ser modulada por alguns fatores ambientais, socioeconômicos e genéticos, como o nível de hemoglobina fetal (HbF), a coerança com outras hemoglobinas anormais e a presença de determinadas variantes haplotípicas. Portanto, embora todos os pacientes com AF apresentem o mesmo defeito molecular nos genes da beta-globina, existe considerável variabilidade fenotípica entre eles, havendo casos de extrema gravidade, com morte precoce

na infância e casos com poucas complicações e perspectiva de vida próxima a da população normal (14).

O HbF é considerado o mais potente modificador da doença e tem sido o modulador genético mais amplamente estudado na AF. Excluída do polímero da HbS, ela age diminuindo a polimerização da desoxi-HbS (15).

Os recém-nascidos com AF possuem níveis elevados de HbF e, principalmente por essa razão, geralmente não apresentam manifestações clínicas graves da doença. De fato, apenas quando os níveis de HbF declinam significativamente aparecem os primeiros sinais e sintomas mais graves da AF, frequentemente, após o sexto mês de vida. A transição da HbF para HbS, em crianças com hemoglobinopatia SS, ocorre de maneira mais gradual do que a transição da HbF para HbA em crianças que não são portadoras de variantes hemoglobínicas. A HbF na AF somente estabiliza sua taxa de síntese entre os 3 a 4 anos de idade, permanecendo constante para o resto da vida após esta faixa etária, caso o indivíduo não utilize medicações que interfiram na dinâmica de síntese das  $\gamma$ -globinas (16).

Indivíduos adultos normais sintetizam, geralmente, menos de 1% de HbF no sangue periférico, que está distribuída de forma heterogênea em uma subpopulação de eritrócitos denominada —FceIsl. Há uma evidente variação na concentração de HbF, não somente em populações normais mas também em indivíduos com AF e  $\beta$ -talassemia. Embora a maioria dos adultos tenham taxas de HbF menores de 0,6% do total de Hbs, 10%–15% dos indivíduos sintetizam valores de 0,8% a 5%. Na AF há uma variação entre os diferentes indivíduos que pode oscilar entre 1% a 30% (17).

Indivíduos com AF com níveis mais elevados de HbF têm menor morbidade e a mortalidade (18).

O único procedimento curativo consolidado de que dispomos até o momento para a AF é o transplante alogeneico de medula óssea (19). Porém, a diversidade clínica da doença e

a possibilidade de instituir medidas distintas de tratamento a estes pacientes têm levado à busca de fatores preditivos de gravidade e de possíveis modificadores da evolução clínica da doença (20).

O rastreamento neonatal da AF, a instituição precoce de medidas preventivas (antibiótico-profilaxia e vacinação específica), o aconselhamento familiar e as medidas educativas direcionadas para profissionais de saúde, familiares e pacientes reduziram a mortalidade precoce e a morbidade da AF. Embora haja todos esses avanços no manejo desses indivíduos, ainda há uma expressiva morbidade e mortalidade global associadas à doença (13).

Já que inúmeros estudos, tanto em humanos quanto em modelos animais de AF, demonstraram uma relação inversa entre a morbidade e mortalidade da AF e níveis elevados de HbF, tanto em crianças quanto em adultos, tratamentos direcionados à reativação da síntese de HbF após o nascimento em indivíduos portadores de desordens hemoglobínicas, especialmente naqueles com AF e  $\beta$ -talassemias, são tema de inúmeras pesquisas básicas e clínicas há várias décadas e levaram à descoberta de diversos agentes farmacológicos capazes de incrementar a taxa de síntese da HbF (18,21–24).

A HU é um dos principais agentes farmacológicos utilizados no manejo dos indivíduos com AF. Um dos seus fundamentais mecanismos de ação é o de estimular a síntese de hemoglobina fetal (HbF). Estudos demonstraram que o tratamento com HU diminui a morbimortalidade da doença em adultos e crianças com AF (25–30).

Na DMT, a HU geralmente aumenta os níveis de HbF entre 10 a 40%. Contudo, há uma grande variabilidade de resposta, a DMT é muito variável, cerca de 25% dos portadores de AF não respondem e não há preditores de resposta definidos à HU (31).

Embora a HU tenha sido associada com maior risco de desenvolvimento de leucemias agudas em alguns pacientes com síndromes mieloproliferativas, o potencial mutagênico,

carcinogênico e teratogênico da droga não foi elucidado na AF. Alguns estudos demonstraram maior genotoxicidade em indivíduos com AF expostos à HU, quando comparados a indivíduos normais não expostos (32,33).

Os estudos de polimorfismos genéticos têm comprovado a influência de modificadores epigenéticos na regulação da expressão dos genes HBG (genes envolvidos na síntese da HbF). Esses elementos estão situados, principalmente, nos cromossomos 2p15, 6q23 e 11p15, em que se localizam, respectivamente, o oncogene BCL11A, a região intergênica c-MYB-HBS1L (HMIP) e o polimorfismo Xmn1-HBG2. Esses 3 QTLs juntos detêm de 20% a 50% do controle da expressão dos genes HBG, tanto em indivíduos normais quanto em portadores de AF e talassemias (17,34–37).

Alguns estudos demonstraram que indivíduos com HbF basal mais elevada, contagem de leucócitos e de reticulócitos basais mais elevados e com haplótipo República Centro Africana (CAR) apresentaram melhor resposta à HU quando se avaliou a taxa de incremento da HbF (38,39). Porém, esses achados não foram reproduzidos em outros estudos. Portanto, não há preditores acurados de resposta à HU quanto à indução da HbF e seu uso permanece empírico sob esse aspecto (40,41).

Nosso objetivo foi avaliar o impacto dos polimorfismos de nucleotídeo único, previamente descritos e fortemente correlacionados com a expressão da HbF, do locus HBG2- Xmn1; rs7482144, rs4671393 e rs11886868 do oncogene BCL11A; rs9399137 e rs9402686 da região intergênica HMIP-2, na expressão dos níveis de HbF e nos parâmetros hematimétricos em indivíduos com AF tratados com HU.

A elucidação de modificadores genéticos específicos, associados à indução da HbF, poderá explicar as razões pela grande variabilidade fenotípica de expressão da HbF e permitirá uma melhor compreensão da variabilidade de resposta à HU dos portadores de AF em relação ao incremento da taxa de HbF basal.



Esses avanços, no melhor entendimento da expressão da HbF, poderão evitar a exposição desnecessária do paciente a uma droga de potencial genotóxico e estabelecer novos alvos terapêuticos, no futuro, por meio da terapia gênica.

Este estudo originou um artigo, que constitui a presente tese cujo título é: *DNA polymorphism at the BCL11A (rs1427407) Locus is Associated with Better Response To Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia Patients from Southern Brazil.*

A estrutura da apresentação da tese segue as normas do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

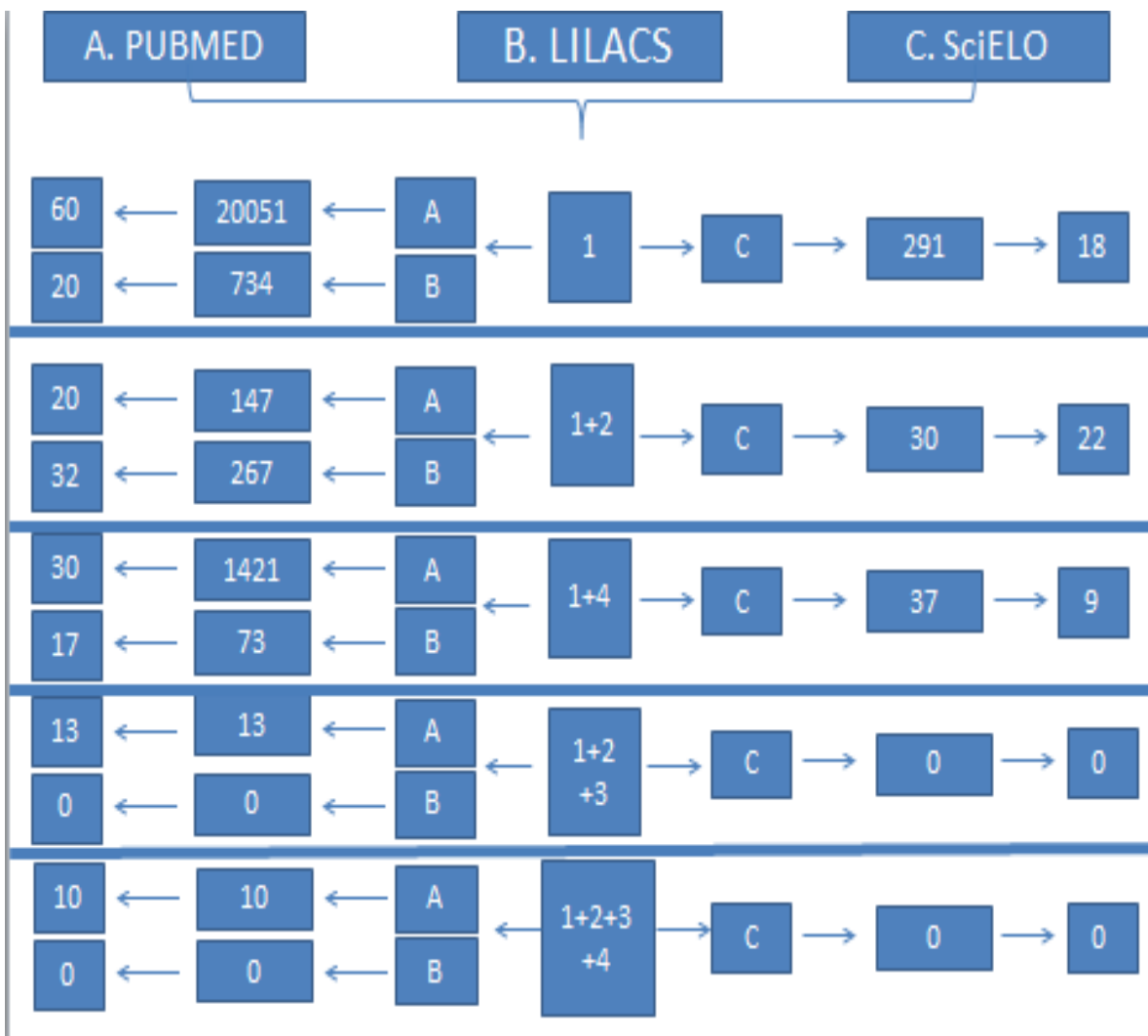
### 2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES

A revisão da literatura médica foi direcionada para estabelecer as correlações entre a anemia falciforme, o tratamento com hidroxureia, os polimorfismos de nucleotídeo único e a expressão da HbF. A estratégia de busca, realizada exclusivamente em meio eletrônico, envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SciELO e PubMed, no período de 1960 a 2015.

Foram realizadas buscas por meio dos termos —*Sickle Cell Anemia*‖, —*Fetal Hemoglobin*‖, —*Single Nucleotide Polymorphism*‖ e —*Hydroxyurea*‖. As combinações encontradas estão apresentadas na Figura 1.

**Palavras-Chave**

- 1) *Sickle cell anemia* (SCA)
- 2) *Single nucleotide polymorphism* (SNP)
- 3) *Hydroxyurea* (HU)
- 4) *Fetal hemoglobin* (HbF)



**Figura 1: Descrição esquemática dos resultados encontrados na busca da literatura**

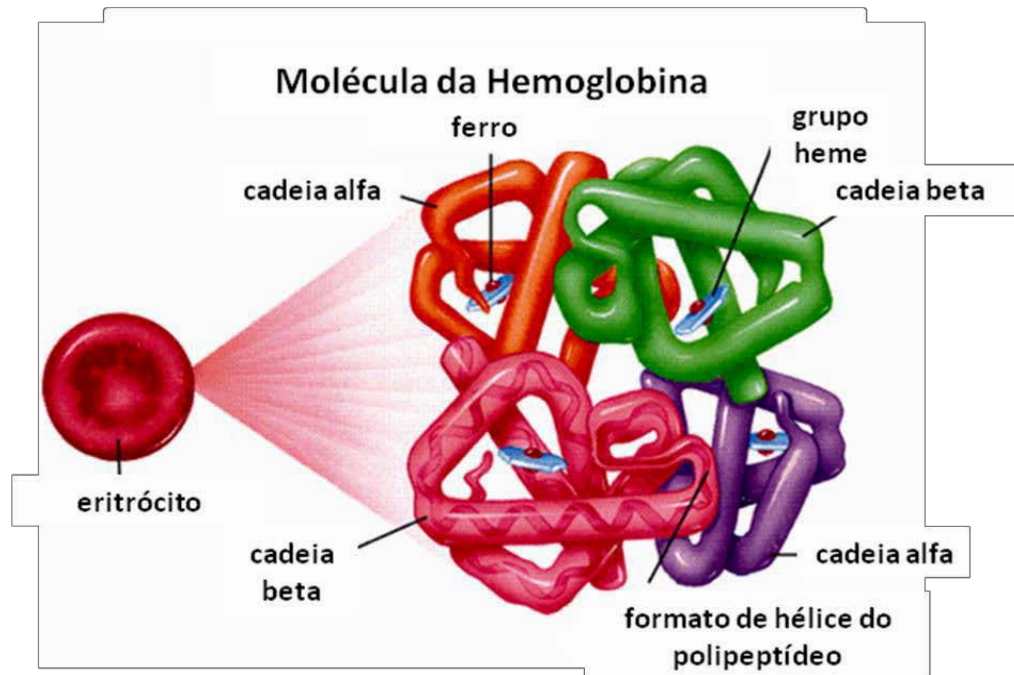
## 2.2 A MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA

A molécula de Hb é uma metaloproteína que possui estrutura globular e tetramérica, com peso molecular de 64.500 daltons, sendo o maior constituinte proteico dos eritrócitos dos mamíferos (42).

A molécula de Hb é formada por quatro subunidades. Cada subunidade é composta por uma cadeia polipeptídica, denominada globina, e um grupo heme (Figura 2).

O grupo heme é formado pelo grupamento prostético protoporfirina IX ligado ao átomo de ferro no estado ferroso ( $Fe^{+2}$ ), ao qual se liga o oxigênio ( $O_2$ ). Portanto, cada molécula de Hb é capaz de combinar-se com quatro moléculas de  $O_2$ . O grupamento heme possui sítios que facilitam a ligação e/ou liberação do  $O_2$  para os tecidos. Dessa forma, a Hb é responsável pela absorção, transporte e distribuição do  $O_2$  para os diversos tecidos do organismo e pelo transporte de parte do dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Ainda, a Hb tem interação com outros dois gases, o monóxido de carbono (CO) e o óxido nítrico (NO), que desempenham funções biológicas importantes (3,43–45).

As cadeias de globinas distintas se agrupam aos pares, sendo um dos pares de cadeias alfa (alfa-  $\alpha$  e zeta-  $\delta$ ) e o outro par de cadeias beta (beta-  $\beta$ , delta-  $\delta$ , gama-  $\gamma$  e épsilon-  $\epsilon$ ). Os dois tipos de cadeias são semelhantes tanto na sequência dos aminoácidos (aa) quanto na configuração tridimensional da proteína. A estrutura similar encontrada entre essas cadeias sugere que esses genes se originaram, em algum ponto primitivo da evolução, a partir da duplicação de um gene ancestral único (46).



**Figura 2:** Representação da estrutura tetramérica da molécula de HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) humana. Cada cadeia de globina está associada a um grupo prostético heme ao qual se liga o átomo de ferro. Adaptado de (47).

### 2.3. ONTOGÊNESE DAS HEMOGLOBINAS HUMANAS

Cada cadeia de globina é composta por diferentes sequências de aa, e as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  possuem 141aa e 146 aa, respectivamente. As combinações entre as diversas cadeias polipeptídicas darão origem às diferentes Hbs que caracterizam o período embrionário, fetal e adulto (42).

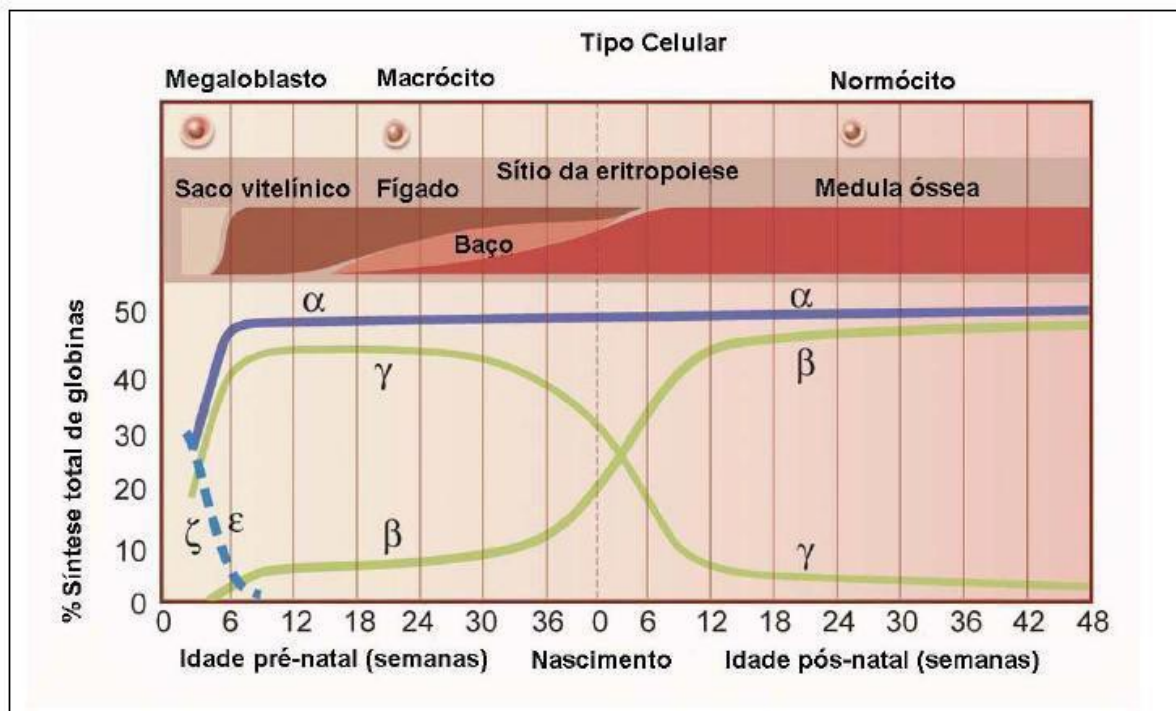
A síntese das cadeias globínicas é regulada por agrupamentos de genes nos cromossomos 11 e 16. Os genes responsáveis pela síntese das globinas  $\beta$  estão localizados em um segmento de DNA de 60 kilobases (kb) no braço curto do cromossomo 11, ao passo que os genes das globinas  $\alpha$  estão localizados em um segmento de DNA de 40 kb no braço curto do cromossomo 16. A organização dos genes nos cromossomos 11 e 16 segue a mesma ordem em que são expressos nos períodos embrionário, fetal e adulto (47).

Um complexo mecanismo de supressão e ativação gênica, não totalmente elucidado, que ocorre durante o desenvolvimento ontogênico humano, que determina as diferentes combinações destas cadeias de globinas (Figura 3 (48,49)).

Na fase embrionária a hematopoese ocorre no saco vitelínico. Da fase embrionária até o terceiro mês de gestação, são encontradas principalmente as hemoglobinas Gower-1 ( $\delta_2\varepsilon_2$ ), Portland ( $\delta_2\gamma_2$ ) e Gower-2 ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ). Ainda na fase intrauterina ocorre produção maior das cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$ , que, a partir da quarta semana de gestação, se combinam para formar a HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ). A HbF é a Hb predominante no feto e no recém-nascido, sendo encontrada em pequenas concentrações (inferiores a 1%) a partir do 6º ao 12º mês de vida em indivíduos normais (42).

A HbA, predominante entre as Hbs normais do adulto, é composta de duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ). Ela é sintetizada a partir da décima semana de gestação, mantendo-se em concentrações próximas a 10% até o nascimento e aumenta paulatinamente sua taxa de síntese até atingir concentrações aproximadas de 95% do total de Hbs em torno do sexto mês de vida do indivíduo (50).

A produção das cadeias  $\delta$  se inicia na 25ª semana de gestação, conduzindo à síntese da HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), que permanece em concentrações reduzidas de 2,5% a 3,5% na fase adulta (50).



**Figura 3:** Representação esquemática da expressão normal das cadeias de globinas e dos principais sítios de hematopoese, conforme o estágio de desenvolvimento ontogênico humano, com os respectivos níveis de expressão das cadeias de globina nos períodos embrionário, fetal e adulto. Adaptado de (48).

#### 2.4. OS GENES DAS GLOBINAS HUMANAS

O genes responsáveis pela codificação das cadeias globínicas são compactos e de estrutura similar entre eles, com cerca de 1kb a 2 kb de DNA, cada um deles tem 3 éxons e 2 íntrons (50).

Esses genes específicos estão localizados em dois agrupamentos multigênicos, situados nos braços curtos dos cromossomos 11 (que codifica as globinas tipo  $\beta$ ) e 16 (que codifica as globinas do tipo  $\alpha$ ) (42). Estão organizados ao longo dos cromossomos na mesma ordem em que se expressam durante o desenvolvimento humano, ou seja, no sentido  $5' \rightarrow 3'$ , produzindo os diferentes tetrâmeros de Hbs (51–53).

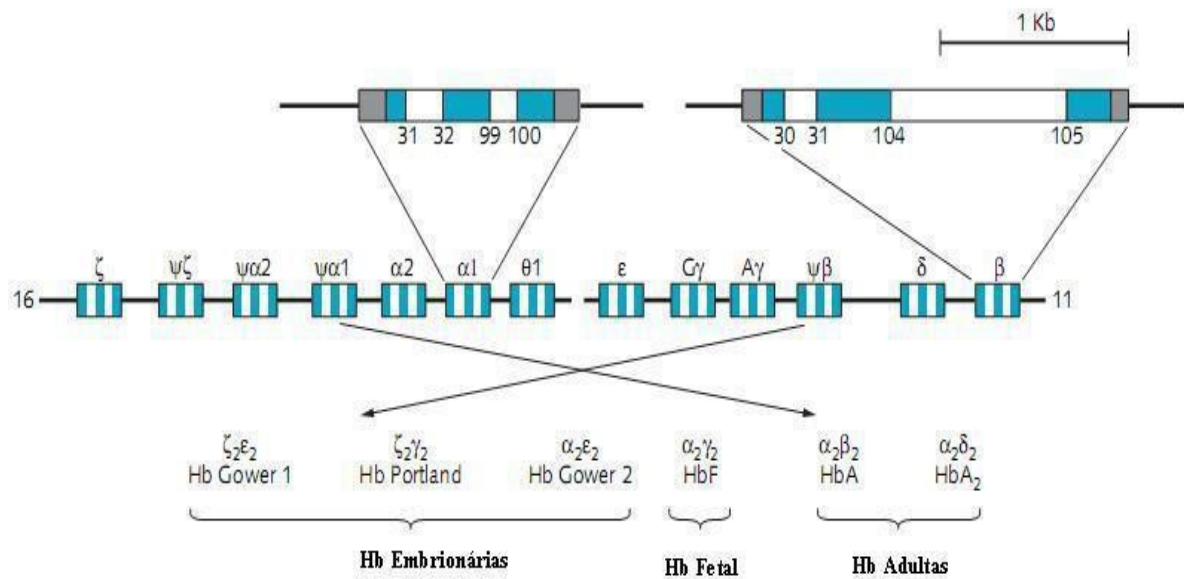
O grupo de genes da globina  $\beta$  (11p15.5) está localizado em um segmento de DNA superior a 60 kb e é composto pelo gene embrionário  $\epsilon$  (HBE1), dois genes de globina

fetal,  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$  (gama-glicina e gama-alanina-HBG), um pseudogene ( $\psi\beta$ ) e dois genes de globinas adultas,  $\delta$  (HBD) e  $\beta$  (HBB), dispostos na ordem: 5' -  $\epsilon$  -  $\gamma^G$  -  $\gamma^A$  -  $\psi\beta$  -  $\delta$  -  $\beta$  - 3' (51).

O grupo de genes da globina  $\alpha$  (16p13.3) está localizado em um segmento de DNA de 35kb e é formado pelo gene embrionário  $\zeta$  (HBZ), os pseudogenes  $\psi\zeta$  e  $\psi\alpha_1$ , os genes da globina  $\alpha$  duplicados,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  (HBA1 e HBA2) e os genes  $\theta$  e  $\alpha^D$ , assim dispostos: 5' -  $\delta$  -  $\psi\delta$  -  $\mu$  -  $\psi\alpha_1$  -  $\alpha_2$  -  $\alpha_1$  -  $\theta$  - 3'. Os genes alfa estão duplicados (HBA1 e HBA2) no ser humano, em decorrência do evento de duplicação gênica que ocorreu durante o processo evolutivo (43,51,54).

A expressão proteica desses genes dá origem às diferentes Hbs: Embrionárias (Gower I -  $\zeta_2\epsilon_2$ , Gower II -  $\alpha_2\epsilon_2$  e Portland I -  $\zeta_2\gamma_2$ ), Fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ) e Adultas (Hb A -  $\alpha_2\beta_2$  e Hb A2 -  $\alpha_2\delta_2$ ) (42,53) e é regulada em ambos os agrupamentos de acordo com o estágio de desenvolvimento humano e de maneira tecido-específica (Figura 4) (55).





**Figura 4:** Agrupamento dos genes de alfa-globina (braço curto do cromossomo 16) e de beta-globina (braço curto do cromossomo 11) e as respectivas moléculas de Hb a que dão origem. Todos os genes de globina têm estrutura similar, compostos de 3 éxons e de 2 íntrons. Adaptado de (56).

## 2.5. TRANSIÇÃO DA SÍNTESE DAS HEMOGLOBINAS EMBRIONÁRIA-FETAL-ADULTA:

Os mecanismos subjacentes à ativação e ao silenciamento progressivo dos genes de globina embrionários, fetais e adultos são apenas parcialmente conhecidos (42).

A HbF facilita a da troca de  $O_2$  transplacentária. Com o nascimento, ocorre uma queda abrupta na taxa de síntese de HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) e há um incremento na taxa de síntese da HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) (transição da HbF por HbA). Esse processo é gradativo até que entre o sexto mês e o primeiro ano de vida, quando a síntese das cadeias  $\gamma$  é amplamente substituída pela síntese das cadeias  $\beta$ , o indivíduo normal adquire o seu padrão hemoglobínico definitivo, ou seja, sintetizar 96% a 98% de HbA, 2% a 3,5% de HbA<sub>2</sub> e 0,2% a 1% de HbF (57).

A síntese de HbF está restrita a uma subpopulação de eritrócitos denominados de — F cells, e há uma correlação entre o número de F cells e a quantidade total de HbF (17).

O exato mecanismo pelo qual fenômeno da transição hemoglobínica ocorre ainda não está totalmente compreendido em nível molecular, sendo atribuído à metilação dos genes e a outras condições que podem influenciar a transcrição gênica (47,58).

A regulação dos genes HBB, HBG1 e HBG2 é um dos modelos de expressão gênica mais estudados atualmente e envolve elementos regulatórios *cis*, que compreendem promotores, silenciadores, o *Locus Control Region* (LCR), e fatores de transcrição (elementos *trans*) ubíquos ou eritroide específicos, que podem exercer tanto atividade estimuladora quanto repressora no controle da expressão gênica (58–60).

A região controladora do locus da  $\beta$ -globina ou LCR é o principal elemento regulatório da expressão diferenciada desse grupo de genes. A LCR é constituída por 6 sítios hipersensíveis à ação da DNase I (5'-HS1-HS5), dispostos ao longo de 6-22kb, na região 5' do gene. Cada um desses sítios contém diferentes combinações de domínios conservados, onde ocorre a ligação de proteínas que influenciam diretamente o processo da transcrição gênica (61).

As sequências conservadas TATA, CAAT, e CACCC box estão presentes na região promotora dos genes em geral e apresentam papel importante na regulação da expressão dos genes da globina  $\beta$ . As diferenças existentes entre as regiões promotoras dos genes HBG e HBB têm sido objeto de vários estudos, na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos na transição dos genes HBG pelo gene HBB (58–60).

Vários fatores transcricionais que estão envolvidos na regulação da hematopoese e da expressão do complexo dos genes da  $\beta$ -globina por interação com a LCR e as regiões promotoras foram descritos (58,60).

Alguns fatores de transcrição importantes para a regulação da transição dos genes HBG pelo gene HBB incluem NF-E2 (62–64), o *Globin Transcription Factor 1* (GATA-1), que possui múltiplos sítios de ligação nos promotores dos genes e no LCR, (65); FOG (*friend*

of GATA-1) (66,67); EKLF (*Erythroid Krüppel-like factor*), um *zinc finger* ativador da transcrição de  $\beta$ -globina (68), que também tem participação na estrutura cromatínica do locus e tem sido implicado no processo de troca de globinas (69) e FKLF (*Fetal Krüppel-like factor*) com participação na expressão dos genes  $\epsilon$  e  $\gamma$  (70), NuRD, COUP-TF, DRED/TR2/TR4, MBD2, *Ikaros-PYR complex*, BRG1, entre outros (58).

Após o indivíduo adquirir o padrão hemoglobínico definitivo, pode haver grande variabilidade nas concentrações sanguíneas de HbF, tanto em indivíduos normais quanto em portadores de desordens hemoglobínicas (71).

Essas variações naturais na concentração de HbF entre indivíduos já são reconhecidas há vários anos e refletem diferentes níveis de transcrição dos genes responsáveis pela síntese da HbF (37,61).

## 2.6. OS POLIMORFISMOS GENÉTICOS E A REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA HEMOGLOBINA FETAL

Na tentativa de esclarecer as variações individuais da taxa de síntese de HbF, foram realizados vários estudos de associação de todo o genoma. Nesses estudos pioneiros, foram encontrados diversos SNPs, correlacionados com a variação da HbF em populações de adultos não anêmicos do norte da Europa e da Sardenha e que, na sua maioria, apresentavam taxas de HbF inferiores a 1%. (17,36,72).

Estudos posteriores demonstraram a influência desses modificadores epigenéticos na regulação da expressão dos genes HBG, tanto indivíduos normais quanto em portadores de desordens hemoglobínicas. Foi demonstrado que essas regiões gênicas estavam principalmente localizadas nos cromossomos 2p15, 6q23 e 11p15, onde se encontram o oncogene BCL11A, a região intergênica HBS1L-MYB (HMIP) e o polimorfismo Xmn1-HBG2, respectivamente (34–37,72–83).

Estes 3 QTLs respondem por 20% a 50% da variação da HbF, tanto em indivíduos normais quanto em portadores de DF e  $\beta$ -talassemia (73).

Os efeitos biológicos destes QTLs na expressão da HbF incluem dois mecanismos plausíveis: efeito direto na expressão do gene HBG (ativação ou repressão da transcrição do gene HBG), ou alteração da cinética de maturação e diferenciação eritroides, mimetizando uma situação de estresse na eritropoese, que resulta em um incremento da eritropoese à custa de progenitores eritroides, que sintetizam maiores quantidades de HbF.

As outras regiões do DNA candidatas: o conjunto de receptores olfatórios (OR51B2, OR51B5 e OR51B6), ARG1, ARG2, FLT1, GLPR2, HAO2, HBE, HMOX1, NOS1, SALL2 e SAR1 não foram confirmadas até a presente data quanto a sua forte correlação com a expressão dos genes HBG nas diferentes populações, sendo este tema de vários estudos atuais (76,84–87)

### **2.6.1. O Polimorfismo Xmn1-HBG2 no Locus HBB do Cromossomo 11p15**

Em 1985, foi descrito pela primeira vez o polimorfismo (C→T) na posição -158 do gene HBG2, posteriormente denominado polimorfismo Xmn1-HBG2 ou rs7482144, que ocorre no promotor do gene da G $\gamma$ -globina e que foi identificado pelo sequenciamento dos genes HBG. Foi demonstrado que este polimorfismo tinha impacto na expressão do gene HBG2 e contribuía para a variabilidade observada nas concentrações da HbF entre indivíduos normais (88).

Estudos posteriores, independentes, confirmaram a associação entre o alelo T do sítio Xmn1-HBG2 com uma maior concentração de HbF (89,90).

O QTL identificado com o sítio Xmn1-HBG2 não tem um padrão de herança mendeliano, e a presença do alelo T nem sempre implica a expressão fenotípica de maiores concentrações de HbF, sugerindo que o polimorfismo Xmn1-HBG2 deva coexistir com outros fatores genéticos para que haja uma maior expressão de HbF (71).

Acredita-se que o polimorfismo Xmn1-HBG2 reduza a ligação a fatores transcricionais, alterando o complexo formado com o  $\beta$ LCR, que silencia a expressão do gene da  $\gamma$ -globina em adultos. O desarranjo desse complexo provavelmente resultaria em reativação do gene da  $\gamma$ -globina (92).

Uma associação positiva entre o Xmn1-HBG2 e os níveis da HbF foi mais bem documentada em indivíduos com DF da Tanzânia (73,79), afrodescendentes norte-americanos selecionados do *Cooperative Study of Sickle Cell Disease* (CSSCD) (93) e indivíduos com AF de uma população tribal da Índia (94). Foi demonstrado que os participantes do CSSCD com alta expressão de HbF apresentavam o alelo A do SNP Xmn1-HBG2 com uma frequência significativa maior do que a encontrada no grupo com níveis de HbF mais baixos (30% versus 10%, respectivamente,  $P = 0.002$ ).

Entretanto, esta frequência do alelo A do SNP Xmn1-HBG2 não foi diferente entre o grupo com HbF alta e o grupo com HbF baixa em uma amostra de indivíduos afrodescendentes selecionados no *Boston Medical Center* (10% versus 8%, respectivamente,  $P = 1.0$ ) (95).

Da mesma forma, não foram encontrados efeitos significativos do SNP Xmn1-HBG2 nos níveis de HbF em afrodescendentes com DF do Reino Unido, provenientes do Caribe (Jamaica, Trinidad e Tobago) e da África Ocidental (Nigéria, Gana, Serra-Leoa), selecionados em um estudo realizado no *King's College Hospital*, em Londres, e em afrodescendentes com DF do estado de Pernambuco (73).

### **2.6.2. A região intergênica HBS1L-MYB (HMIP) no cromossomo 6q23.3**

O primeiro locus correlacionado à expressão da HbF, não localizado no locus de  $\beta$ - globina, descrito por estudos de associação que englobam todo o genoma, foram SNPs situados na região intergênica de 126 kb do cromossoma 6 do gene HBS1L e do oncogene MYB. Esses dois genes se expressam nos precursores eritroides (72,73,96,97).

Vários estudos identificaram polimorfismos genéticos na região intergênica de 126 kb do cromossoma 6, entre os genes HBS1L e o MYB, com forte associação com a expressão da HbF, tanto em indivíduos portadores de desordens hemoglobínicas quanto em indivíduos não anêmicos (71,72,98).

A região intergênica HMIP tem importante papel na regulação dos níveis de HbF e parece estar associada com parâmetros de diferenciação e maturação eritroide e leucocitária, como contagem total de eritrócitos, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, percentual de Hb A2, total de hemoglobina, contagem de monócitos e plaquetas (80).

A função do gene HBS1L no desenvolvimento e maturação eritroide não está totalmente definida. Porém, sabe-se que o gene MYB codifica o fator de transcrição c-MYB, que tem um papel fundamental no controle da proliferação e diferenciação eritroide (99).

O mecanismo pelo qual c-MYB regula a expressão de HbF foi recentemente sugerido ao observar-se que este fator de transcrição ativa diretamente os genes BCL11A e KLF1, que são repressores da expressão de  $\gamma$ -globina. O gene c-MYB, portanto, estabeleceria mecanismos moleculares de repressão da síntese de HbF por meio da estimulação dos genes BCL11A e KLF1 (80).

Uma forte associação SNPs rs28384513 e rs9399137 do locus HMIP com os níveis de HbF foi descrita pela primeira em indivíduos sem desordens hemoglobínicas do norte da Europa (72).

Em seguida, foi identificada uma forte associação do SNP rs4895441 da região intergênica HMIP com a modulação da expressão da HbF em uma grande coorte de

indivíduos não anêmicos da Sardenha (36). Os estudos posteriores demonstraram que estes três SNPs HMIP (rs28384513, rs9399137 e rs4895441) também estavam fortemente associados com a expressão da HbF em indivíduos afrodescendentes com DF dos Estados Unidos da América, do Reino Unido (79), da Tanzânia (79) e do estado de Pernambuco (73).

O estudo de Thein e colaboradores (71), em populações de indivíduos não anêmicos do norte da Europa, evidenciou que os polimorfismos HMIP estão distribuídos em três blocos haplotípicos: blocos 1, 2 e 3. Nesse estudo, houve 12 SNPs fortemente associados à expressão da HbF. O bloco 2 (24 kb) está associado com a maior variação da HbF (71).

O HMIP-2 é caracterizado por 11 SNPs (rs9376090, rs9399137, rs9402685, rs11759553, rs4895440, rs4895441, rs9376092, rs9389269, rs9402686, rs11154792 e rs9483788). Todos esses SNPs demonstraram forte associação com níveis de HbF em populações do norte da Europa, mas apenas alguns destes (rs9399137, rs9402685, rs11759553, rs4895440, rs4895441, rs9376092, rs9389269, rs9402686 e rs11154792), demonstraram uma associação significativa em indivíduos afrodescendentes britânicos portadores de DF (71,79).

O alelo T do SNIP rs9399137 é o que tem maior associação com a expressão da HbF, porém é o que tem menor frequência na população africana, com frequências gênicas de 1–2% em afrodescendentes com miscigenação europeia (98).

Em indivíduos não anêmicos do norte da Europa, o locus HMIP responde por aproximadamente 19% da variação populacional da HbF (71).

### **2.6.3. O Oncogene BCL11A no cromossomo 2p16**

O *zinc-finger transcriptional factor* BCL11A (*B-cell lymphoma/leukaemia 11A*), também conhecido como EVI9 e CTIP1, foi inicialmente clonado como um proto-oncogene mieloide ou de linfócito B em ratos e humanos (100).

Embriões com determinadas mutações no gene BCL11A podem ter ausência de produção de linfócitos B e alterações em várias linhagens de linfócitos T, indicando que o gene BCL11A é fundamental para o desenvolvimento normal dos linfócitos T e B (101).

Por meio de estudos de associação que englobam todo genoma, identificou-se que uma região de um íntron do oncogene BCL11A, no cromossomo 2p16, exercia importante papel na regulação da expressão da HbF em indivíduos normais e em indivíduos com DF e beta- talassemia. Evidenciou-se, dessa maneira, que o oncogene BCL11A também é um regulador estágio-específico da transição das Hbs fetal para adulta.

O BCL11A tem uma expressão estágio-específica na ontogenia das hemoglobinas, e os progenitores eritroides embrionários e fetais, que têm altas concentrações de HbF, têm baixas expressões do gene BCL11A (102).

Nos progenitores eritroides, o BCL11A interage com o complexo de cromatina remodelado NuRD e com os fatores de transcrição eritroide GATA1 e FOG1. O BCL11A ocupa a cromatina dos progenitores eritroides em vários sítios do locus da  $\beta$ -globina, incluindo regiões do LCR, HBG1 e a região intergênica HBG1-HBD (102).

Ao silenciar o gene BCL11A em progenitores eritroides humanos há uma expressão robusta de HbF. Isso prova que o BCL11A tem um papel repressor sobre a expressão dos genes HBG1 e HBG2 e é, portanto, um regulador da transição das Hbs fetal para adulta, desempenhando uma função fundamental na manutenção do silenciamento da HbF nos progenitores eritroides dos indivíduos adultos (103).

Recentes estudos de polimorfismos demonstraram que o alelo A do SNP rs4671393, do gene BCL11A, foi o que apresentou a maior associação com a expressão da HbF, sendo



responsável por 10% da variação da HbF de uma população de indivíduos afrodescendentes com DF das Regiões Norte e Nordeste do Brasil, dos EUA, da Tanzânia e do Reino Unido (73,79,81,95).

Um estudo contemporâneo com portadores de DF da Índia evidenciou que o polimorfismo do gene BCL11A rs1427407 G > T estava fortemente associado com os níveis de HbF {19.12 ± 6.61 (GG), 20.27 ± 6.92 (GT) e 24.83 ± 2.92 (TT) respectivamente}, contribuindo para aproximadamente 23% da variabilidade deste traço (94).

Outros SNPs do gene BCL11A que se correlacionaram significativamente com a expressão da HbF na DF foram o rs11886868 e o rs766432 (81,94).

## 2.7. AS HEMOGLOBINOPATIAS

As hemoglobinopatias constituem desordens genéticas caracterizadas por alterações na porção proteica da molécula hemoglobínica. São decorrentes de alterações nos genes responsáveis pela síntese das cadeias polipeptídicas da Hb, sendo classificadas em hemoglobinopatias estruturais e hemoglobinopatias de síntese. Já foram descritas mais de 1200 mutações nos genes das globinas (8).

### 2.7.1. As Hemoglobinopatias de Síntese

As hemoglobinopatias de síntese, denominadas síndromes talassêmicas, são desordens autossômicas recessivas. Compõem as alterações genéticas monogênicas mais prevalentes na população mundial (52).

As síndromes talassêmicas são decorrentes da ausência ou diminuição da produção de uma ou mais cadeias de globina  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$ , desequilibrando as suas quantidades relativas,

formando um tetrâmetro hemoglobínico anômalo. As talassemias  $\alpha$  e  $\beta$  são as mais frequentes, uma vez que compõem as hemoglobinas presentes na vida adulta (52).

Nas síndromes talassêmicas, as cadeias produzidas em quantidades normais podem formar tetrâmeros que precipitam no interior do eritroblasto e do eritrócito, levando à hemoglobinizacão deficiente dos eritroblastos e à diseritropoese. Conseqüentemente, há lesão da membrana celular eritrocitária, desencadeando anemia hemolítica crônica de diferentes magnitudes. A hemoglobinizacão deficiente resulta em hipocromia e microcitose, achados característicos nesse conjunto de doenças (55).

### **2.7.2. As Hemoglobinopatias Estruturais**

As hemoglobinopatias estruturais são decorrentes da presença de mutações pontuais, inserções e deleções de nucleotídeos que ocorrem em regiões codificantes dos genes das globinas, levando à substituição de aa na cadeia polipeptídica. A maioria ocorre por substituição de um único aa em uma cadeia das cadeias de globina (52).

Essas alterações estruturais podem comprometer, intensamente, as propriedades físico-químicas e, portanto, funcionais da molécula hemoglobínica, de acordo com o tipo da mutação e de sua localização na cadeia de globina (104).

Entre os defeitos estruturais mais importantes destaca-se a AF, conhecida pela sua gravidade e frequência, principalmente entre os povos da África e afrodescendentes (105).

A associação da Hb variante S, que no estado homozigótico origina a AF (hemoglobinopatia SS), com outras Hbs anômalas, como as Hbs C, D, E ou talassemias, é denominada de doença falciforme (DF), que têm complicações clínicas menos graves, geralmente, do que a AF (3).

### **2.7.3. A Anemia Falciforme**

### 2.7.3.1.Aspectos Históricos

Desde o início do século XIX, havia casos descritos na literatura sobre uma anemia hereditária associada à icterícia, infecções frequentes e crises dolorosas, que acometiam principalmente jovens e crianças na África. Os indivíduos que apresentavam tais sinais e sintomas eram marcados com tatuagens nos membros e na cintura, para identificar que eram acometidos de um ‘mal desconhecido’. Em 1874, Dr. Horton, um médico de Serra-Leoa, fez a primeira descrição na literatura dos sinais e sintomas clínicos clássicos do que hoje conhecemos por AF (106,107).

Porém, a AF somente foi descrita cientificamente pela primeira vez em 1910, pelo médico cardiologista James Bryan Herrick, na cidade de Chicago, no sangue do estudante de odontologia, Walter Clement Noel, afrodescendente, oriundo da Ilha de Granada, no Caribe. Herrick descreveu os eritrócitos falciformados no sangue periférico deste indivíduo. Ele apresentava anemia, icterícia, úlceras nos membros inferiores e complicações pulmonares (108).

Vários casos foram descritos durante os anos seguintes, apoiados na ideia de que esta era uma nova entidade nosológica e fornecendo informações para um melhor entendimento da doença (108).

Na literatura ocidental, os primeiros esforços para determinar as bases genéticas da eritrofalção foram reportados por Emmel (109), que sugeriu a hereditariedade do fenômeno após observá-lo em pai e filho (109,110).

Em 1927, Hahn e Gillespie demonstraram a inter-relação do fenômeno da eritrofalção com a tensão de O<sub>2</sub>, atribuindo o defeito à Hb, e não tão somente a um defeito eritrocitário (111).

Em 1949, foi caracterizada como "a primeira doença molecular humana" por Linus Pauling e colaboradores, ao demonstrarem a diferença entre a HbA e a HbS por meio da mobilidade eletroforética, evidenciando, dessa maneira, que existe uma diferença no

número ou tipo de grupos ionizáveis das duas Hbs (112). Nesse mesmo ano, a herança autossômica recessiva da doença foi elucidada (113). Concomitantemente, Watson e colaboradores (114) previram a importância da HbF como fator modificador da fisiopatogenia da doença, sugerindo que a sua presença em maiores quantidades nos recém-nascidos poderia explicar o maior período necessário para a falciformação dos eritrócitos dos recém-nascidos em comparação com os eritrócitos das suas mães com AF (114). Ingram e colaboradores (1958) demonstraram, por meio da técnica de *fingerprint*, que a HbS diferia da HbA por um único aa. Foi a primeira comprovação de uma substituição de um aa em uma proteína humana (115).

Estudos posteriores analisaram a estrutura e as propriedades físico-químicas da HbS, evidenciando que a HbS formava polímeros intracelulares sob baixas tensões de O<sub>2</sub>. Em 1960, Perutz decifrou a estrutura completa da hemoglobina, elucidando as bases moleculares de sua função (44).

Todos esses estudos pioneiros colocaram a DF como um modelo biológico de vanguarda para investigação e compreensão das bases moleculares de outras doenças humanas (116).

As primeiras pesquisas brasileiras atinentes à AF se devem às investigações feitas pelo médico Dr. Álvaro Serra de Castro, no Hospital São Francisco de Assis, na cidade do Rio de Janeiro. Seus estudos precursores foram apresentados em uma sessão da Sociedade de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro em 27 de junho de 1933 (117).

A primeira publicação brasileira específica sobre a AF foi um artigo de autoria do Dr. Álvaro Serra de Castro, publicado no Jornal de Pediatria, em 1934, sendo considerado, por seus contemporâneos, como o primeiro profissional a identificar a AF no País (118). Nesse artigo pioneiro foram descritos cinco casos clínicos de AF a partir da análise sistemática de

oitenta crianças afrodescendentes à procura de eritrócitos falciformados no sangue periférico (119).

### **2.7.3.2.Epidemiologia da Anemia Falciforme**

A AF é uma das principais e mais frequentes doenças genéticas que acometem a população humana (13,120).

Provavelmente, a mutação que originou a hemoglobinopatia SS ocorreu há 50-100 mil anos (121).

Os estudos iniciais discordavam quanto ao local de origem da mutação e alguns apontavam como sendo a Ásia (122) e outros a África (123).

Wainscoat e colaboradores (124), ao estudarem um grupo de indivíduos com AF na Jamaica, encontraram diferentes haplótipos do gene da HbS, suportando a hipótese de que ocorreram múltiplas mutações em diferentes partes dos Continentes Africano e Asiático (124).

Estudos posteriores legitimaram que a mutação tenha surgido em pelo menos quatro regiões independentes nas populações africanas: no Benin, na República Africana Central, no Senegal e em Camarões (125–127).

Ao estudar grupos populacionais da Arábia Saudita e da Índia, Kulozik e colaboradores (1986) sugeriram o aparecimento deste alelo mutante no Continente Asiático, independentemente. Essas mutações estão associadas a haplótipos e são denominados de acordo com sua região geográfica de origem: Benin (BEN), Senegal (SEN), Bantu (CAR), Camarões e Árabe-Indiano ou Asiático (128).

O que se observa é que o alelo S é muito comum em regiões onde a malária causada pelo *Plasmodium falciparum* é ou foi endêmica (teoria malarígena). Essa constatação levou à

hipótese de que os portadores heterozigotos do gene S (traço falciforme) teriam um efeito protetor contra o desenvolvimento da malária causada pelo *Plasmodium falciparum* (129).

Essa seleção gênica parece ter sido a principal responsável pela grande expansão do alelo S há cerca de 4 mil anos na Índia e há aproximadamente 3 mil anos na África (130).

Inicialmente, os estudos sugeriam que o lucro adaptativo do traço falciforme seria decorrente do fato de que a eritrofalciformação seletiva dos eritrócitos parasitados resultaria em sua remoção mais efetiva pelo baço, bem como inibiria o crescimento do parasita devido ao baixo pH dos eritrócitos falciformados (131).

Posteriormente, evidenciou-se que alterações das moléculas de adesão da membrana celular dos eritrócitos falciformados levariam a uma maior aderência desses eritrócitos aos neutrófilos, facilitando a ação do sistema imunológico (130).

O alelo S apresenta frequência elevada na África, fundamentalmente nas regiões Sul, Centro-Ocidental e Atlântico-Ocidental, com uma frequência gênica de 0,12 a 0,14 no Congo e 0,1 no Senegal. Da mesma forma, é encontrada com frequência expressiva em países da bacia do Mediterrâneo, na Arábia Saudita e na Índia (120).

O alelo S difundiu-se para outras regiões do mundo, sobretudo devido a migrações oriundas da bacia do Mediterrâneo, a rotas comerciais traçadas a partir do centro-oeste africano, devido ao comércio de escravos, ao deslocamento populacional decorrente das guerras e pelas migrações voluntárias (31).

A introdução do alelo S no continente americano, e conseqüentemente no Brasil, se deu entre os séculos XVI e XIX, em função do intenso comércio de escravos africanos. Estima-se que mais de 3,6 milhões de escravos africanos foram trazidos ao Brasil, oriundos principalmente da Costa Ocidental da África (110).

Com a finalidade de prevenir as inúmeras complicações da AF e a possibilidade de realizar o aconselhamento familiar precoce, o programa de triagem neonatal foi estabelecido

nos EUA na década de 1970. No Brasil, a Portaria nº 822/01, de 6 de junho de 2001, do Ministério da Saúde, estabeleceu o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), permitindo o diagnóstico precoce da AF, visando à redução da morbimortalidade da doença e proporcionando a inserção do paciente em programas de tratamento multidisciplinares, com a utilização de medidas preventivas e orientação aos cuidadores, bem como o diagnóstico do traço falciforme (13).

Nos EUA, conforme dados do programa de rastreamento neonatal, a frequência do traço falciforme entre afrodescendentes é de 8%, com uma proporção da DF de aproximadamente 1 indivíduo para cada 500 afro-americanos e uma incidência de 1 com a DF para cada 625 recém-nascidos vivos (132).

Em dez anos de triagem da população do estado norte-americano da Califórnia, foram estudados 84.663 recém-nascidos e 4% desses apresentavam mutações relacionadas aos genes da hemoglobina. A frequência de DF nesse estudo foi de 1/951 nascimentos. Comparadas com a incidência de outras doenças rastreadas no programa de triagem neonatal (hipotireoidismo congênito 1/3.849, fenilcetonúria 1/22.474 e galactosemia 1/74.103), as desordens hemoglobínicas foram as alterações congênicas mais frequentes (133,134).

A distribuição do alelo S é muito heterogênea entre os diversos estados brasileiros, uma vez que a composição étnica das diferentes regiões brasileiras é muito variada, sendo mais frequente na Região Nordeste, onde a proporção de afrodescendentes é maior e se caracteriza como um grave e desconhecido problema da saúde pública brasileira (1).

Os dados epidemiológicos brasileiros fornecidos pelo Ministério da Saúde referentes à DF confirmam a maior frequência do alelo S nas regiões onde há maior proporção de afrodescendentes na população (Figura 4) (135).

A Bahia apresenta a frequência brasileira mais elevada para a DF. Um estudo com pré-escolares na Bahia encontrou uma frequência de 7,4% de indivíduos com traço falciforme (136).

Em um outro estudo realizado com recém-nascidos na cidade de Salvador, na Bahia, foi observada a frequência de 9,8% para o genótipo AS, a frequência de 0,9% para a variante SC e de 0,2% para homocigóticos SS (137).

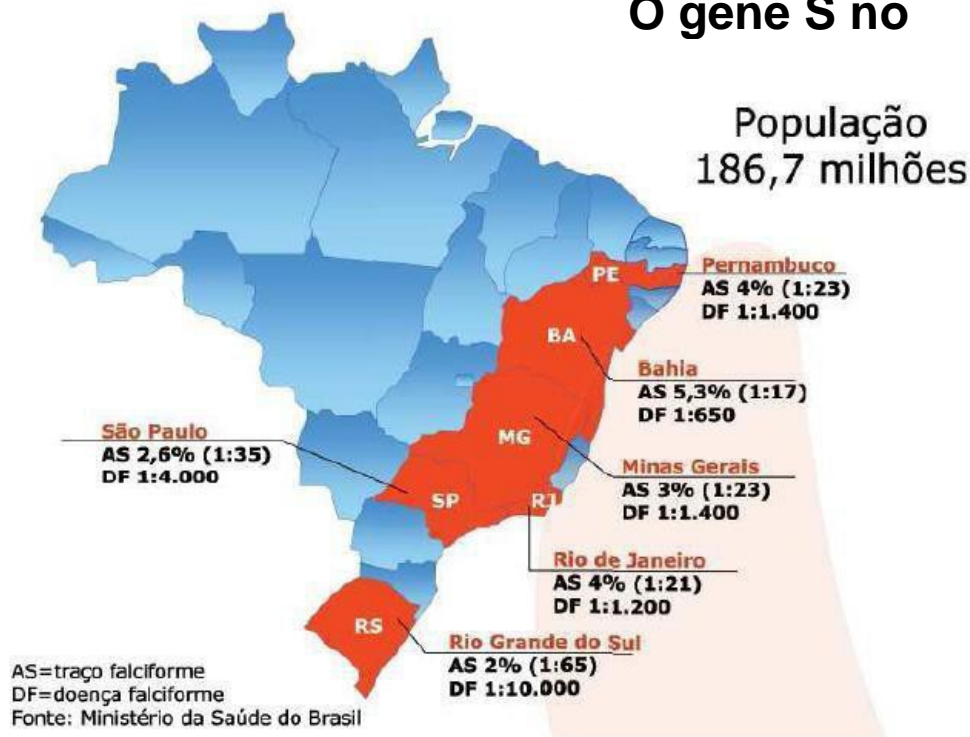
Em Natal, no Rio Grande do Norte, foi descrita a frequência de 1,5% para o genótipo AS e a de 0,05% para o genótipo SS em recém-nascidos (138).

Ramalho (1986), estudando a população afrodescendente de São Paulo, descreveu a frequência de 6,6% para os heterocigotos HbAS (139).

Um estudo de triagem neonatal, realizado na cidade paulista de Campinas, encontrou uma frequência de DF (hemoglobinop atias SS e SC) de 0,02% (140).



## O gene S no



**Figura 5:** Frequências do gene S em diferentes estados do Brasil, conforme dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal do Ministério da Saúde. Adaptado de (135).

No Rio Grande do Sul, Wagner e colaboradores (10) encontraram uma frequência de traço falciforme de 1,19% entre recém-nascidos rastreados pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (10); em Caxias do Sul foi descrita a frequência de 0,09% para os heterozigotos AS entre doadores de sangue de descendência italiana (11).

Em Porto Alegre, Daudt e colaboradores (12) encontraram uma frequência do gene da HbS de 1,2% entre recém-nascidos triados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### 2.7.3.3. Fisiopatologia da Anemia Falciforme

A AF é uma doença monogênica mendeliana, de herança autossômica recessiva, que é causada pela homozigose de uma mutação de ponto simples, na qual o 17º nucleotídeo adenina é trocado por timina ( $A \rightarrow T$ ), no sexto códon do gene da  $\beta$ -globina. Devido a essa mutação, um resíduo de ácido glutâmico é substituído por um resíduo de valina (glu6val) na sexta posição da cadeia polipeptídica da globina  $\beta$  (42)

Os indivíduos que possuem hemoglobinopatia SS apresentam anemia hemolítica crônica, no entanto, indivíduos heterozigotos para a HbS (HbAS) possuem no interior do eritrócito 20% a 45% de HbS, sendo assintomáticos em condições fisiológicas normais (31).

A AF possui morbidade e mortalidade elevadas, principalmente decorrentes de infecções (crianças) e fenômenos vaso-oclusivos, que levam à lesão e à falência de múltiplos órgãos (adultos) (141).

O quadro clínico da AF é muito heterogêneo, com a presença de anemia hemolítica grave, crises dolorosas e a ocorrência de fenômenos vaso-oclusivos de frequência e gravidade variadas (141).

Os aspectos genéticos, ambientais e socioeconômicos contribuem fortemente para a grande variabilidade clínica da AF, uma vez que as taxas de óbito em países desenvolvidos, onde as pessoas têm maior acesso aos cuidados de saúde, são muito menores que nos países em desenvolvimento e nos subdesenvolvidos. Contudo, mesmo em países desenvolvidos, há ampla heterogeneidade de manifestações clínicas entre os pacientes com hemoglobinopatia SS (141).

### **27331 . A Polimerização da Desoxi-Hemoglobina S**

O principal pilar fisiopatogênico da AF está centralizado na polimerização da desoxi- HbS. A HbS, quando desoxigenada, polimeriza-se, perde sua estrutura globular e quaternária e forma estruturas filamentosas insolúveis, que se precipitam no interior dos eritrócitos, resultando na alteração do citoesqueleto e da membrana celular eritrocitária e, conseqüentemente, na forma do eritrócito, levando ao fenômeno da eritrofalcoformação. Por conseguinte, há acentuada redução da deformabilidade e da sobrevivência eritrocitária (142).

O fenômeno de eritrofalção pode ser revertido quando níveis elevados de O<sub>2</sub> são novamente atingidos, no entanto, falcizações sucessivas alteram permanentemente a estrutura da membrana do eritrócito e do seu citoesqueleto, favorecendo a formação de eritrócitos irreversivelmente falciformados (142).

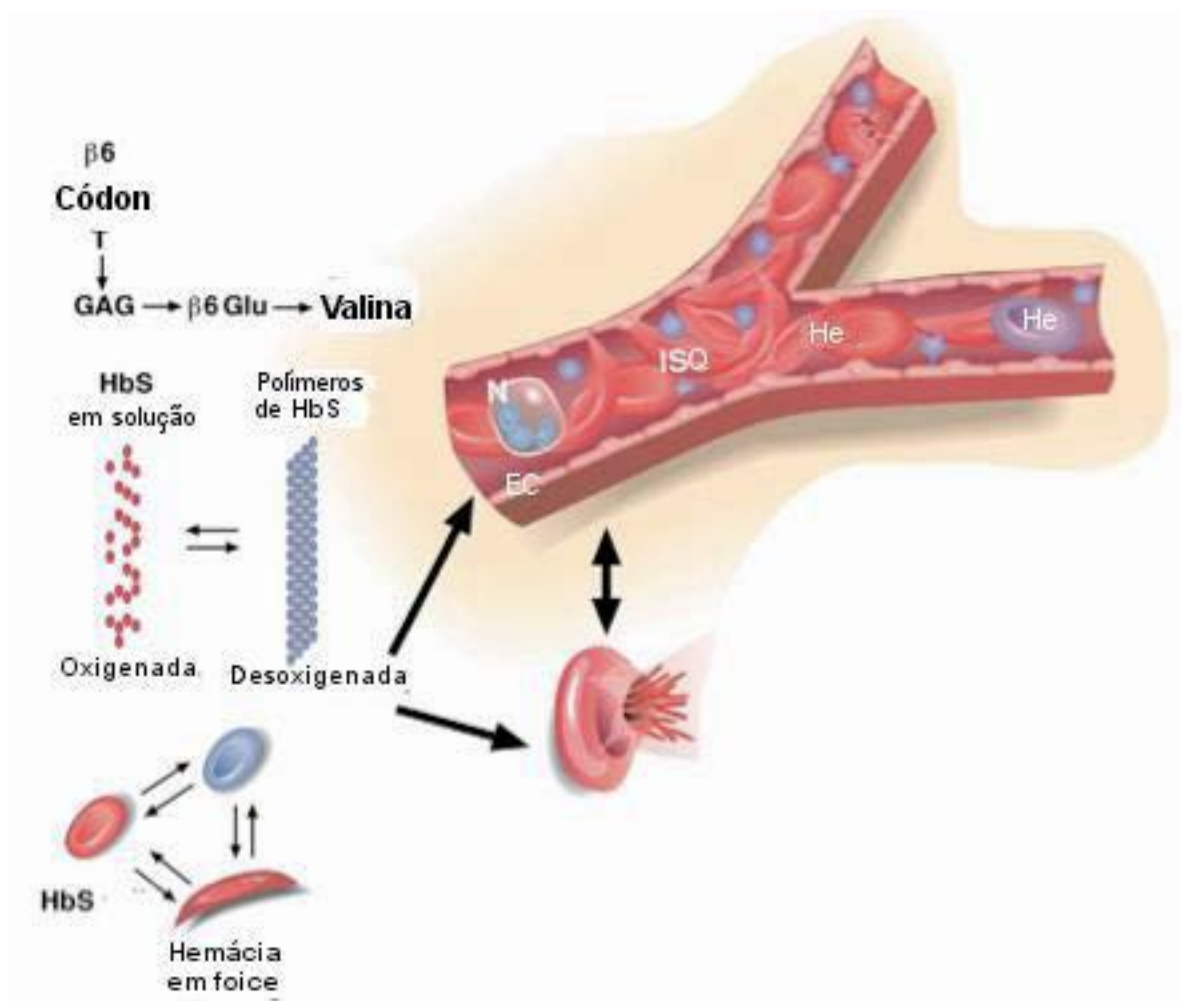
Esses eritrócitos irreversivelmente falciformados são sequestrados por macrófagos do sistema mononuclear macrófágico e retirados rapidamente da circulação (hemólise extravascular). Pode ocorrer hemólise intravascular. O resultado desses fenômenos é a anemia hemolítica crônica característica da doença. Ainda, os eritrócitos falciformados favorecem a vaso-oclusão (52).

A vaso-oclusão é a principal causa de morbimortalidade na AF. A obstrução de vasos sanguíneos, seguida por hipóxia, isquemia ou infarto em vários tecidos, leva, em última instância, à lesão progressiva dos órgãos-alvo, principalmente, naqueles em que a microvasculatura é mais rica, como rins, cérebro, pulmões, baço e retina (143).

O entendimento do processo vaso-oclusivo tem evoluído ao longo das várias décadas. Inicialmente, foi pensado que a polimerização da HbS, resultando nos eritrócitos falciformados, que mecanicamente bloqueavam os vasos de pequeno calibre, respondia completamente ao processo fisiopatogênico da doença. Entretanto, posteriormente, foi reconhecido que estes eritrócitos lesados, exclusivamente, não eram suficientes para produzir a vaso-oclusão em vasos de maior calibre, o que pode ser observado tanto em seres humanos quanto em modelos animais. Assim, foi postulado que outros fatores exercem papel relevante nesse processo, incluindo a inflamação vascular crônica, a adesão dos leucócitos e reticulócitos, a ativação e agregação das plaquetas, a ativação de fatores da coagulação, o dano endotelial e a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), entre outros fatores. Dessa forma, uma visão desdobrada da fisiopatogenia da AF é crucial para a

compreensão da grande heterogeneidade de manifestações clínicas observada nesta hemoglobinopatia (105).

Na AF, o processo de vaso-oclusão tem início com as interações entre os leucócitos, as plaquetas, os eritrócitos e as células endoteliais na microvasculatura, resultando na redução do fluxo sanguíneo, com conseqüente hipóxia, o que acentua ainda mais a polimerização da HbS (Figura 6) (144).



**Figura 6: Fisiopatologia da Anemia Falciforme.** A síntese de HbS é resultado de uma mutação de ponto simples. Quando desoxigenada, a desoxi-HbS polimeriza no interior dos eritrócitos, deformando-os e tornando-os rígidos (eritrofalciformação). Os eritrócitos, neutrófilos e reticulócitos participam do processo de vaso-oclusão, além da hemólise intravascular. N: neutrófilos, He: hemácias, EC: células endoteliais, ISQ: isquemia. Adaptado de (142).

### **27332 . As Alterações no Canal de Gardos e no Sistema de Co-Transporte do K-Cl**

As alterações nos mecanismos de transporte de íons eritrocitários contribuem para a fisiopatologia da AF. A homeostasia catiônica é prejudicada nos eritrócitos falciformados, principalmente, pela sua capacidade reduzida em manter o gradiente normal de  $K^+$ , pela alteração no canal de Gardos e o sistema de cotransporte do K-Cl (145).

O sistema de cotransporte do K-Cl, quando ativado, permite que o  $K^+$  e o  $Cl^-$  saiam do eritrócito, seguidos pela água, o que resulta em desidratação do meio intra-eritrocitário. O sistema de cotransporte do K-Cl está anormalmente aumentado na AF, o que leva a uma maior concentração intracelular de HbS, fenômeno que favorece sua polimerização (31).

O canal de Gardos é um canal de efluxo de  $K^+$ . Ele está ativado pelo aumento intracelular de  $Ca^{++}$  decorrente da desoxigenação e da eritrofalciformação. Assim, como ocorre no sistema de cotransporte do K-Cl, a saída de  $K^+$  resulta no efluxo de água, desidratação do eritrócito e aumento da concentração interna de HbS, favorecendo a polimerização da HbS (31).

### **27333 . A Diminuição da Biodisponibilidade do Óxido Nítrico**

O óxido nítrico (NO), um gás sinalizador, com meia-vida estimada em segundos, tem como principais funções a inibição da agregação plaquetária, da adesão dos leucócitos e da expressão do fator tecidual (FT), o efeito vasodilatador, a modulação da permeabilidade vascular, além de exercer atividade anti-inflamatória e antioxidante, atuando como protetor de lesões teciduais (146–148).

O NO ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) e aumenta os níveis de guanosina monofosfato cíclica (cGMP), que atua como segundo mensageiro para mediar várias respostas

fisiológicas, tais como relaxamento muscular, inibição da adesão plaquetária, neurotransmissão, entre outros (149).

A redução da biodisponibilidade NO, em consequência da hemólise intravascular na AF, é ocasionada quando o NO é sequestrado pela Hb livre no plasma pelo aumento da atividade da enzima arginase liberada pela hemólise e pelo consumo de NO pelas espécies reativas de O<sub>2</sub> (150).

Pacientes com AF apresentaram diminuição da biodisponibilidade do NO em condições basais e durante os fenômenos vaso-oclusivos, como nos episódios algícos agudos, há exacerbação dessa redução. Isso se deve ao fato de que, com acentuação da hemólise crônica, há maior liberação de arginase dos eritrócitos hemolisados para o plasma. Com o aumento da arginase no plasma, a arginina, substrato natural do NO, tem sua rota metabólica direcionada preferencialmente para a formação de ornitina, e não de NO (151).

A redução de NO facilita a vasoconstrição, aumenta a ativação plaquetária e a adesão endotelial e leucocitária, favorecendo o processo vaso-oclusivo (152).

### **2734 . Anemia Falciforme: Uma Doença Inflamatória Crônica**

A vaso-oclusão na AF é um processo muito complexo, não totalmente esclarecido quanto a seus processos fisiopatogênicos, em que estão envolvidos eritrócitos, células endoteliais, leucócitos, plaquetas e proteínas da coagulação sanguínea. O processo inflamatório crônico característico da AF é decorrente do aumento das células do endotélio vascular envolvidas com adesão, bem como o aumento da função e expressão de moléculas de adesão das células endoteliais, dos leucócitos, principalmente dos neutrófilos e dos eritrócitos (153–155).

Portanto, as funções e interações endoteliais estão alteradas na AF, havendo uma maior adesão entre o endotélio e os eritrócitos, plaquetas e leucócitos, além da maior liberação de citocinas inflamatórias, levando ao moderno conceito de que a AF é uma doença

inflamatória crônica (16).

Portanto, a inflamação e a ativação endotelial exercem um papel essencial na vaso-oclusão (156). Na AF, os eritrócitos aderem mais prontamente às células endoteliais *in vitro* (157,158) e às proteínas da matriz extracelular: laminina e fibronectina (159).

Estudos *in vivo* com camundongos transgênicos demonstraram que a adesão dos eritrócitos à parede vascular na AF ocorre nas vênulas pós-capilares, onde o fluxo sanguíneo é mais lento e o diâmetro dos vasos é menor (160,161).

Vários mecanismos estão envolvidos na maior adesão dos eritrócitos na AF e são classificados de acordo com o tipo de interação molecular nos receptores de eritrócitos, proteínas ligantes e receptores endoteliais (156,162).

A integrina  $\alpha 4\beta 1$ , CD36, Lu/BCAM (*Lutheran*/Molécula de adesão celular basal) e ICAM-4 (*intercellular adhesion molecule 4*) são receptores presentes nos eritrócitos e podem mediar a adesão interagindo respectivamente com VCAM-1 (*vascular cell adhesion protein 1*) trombospondina, laminina e  $\alpha v\beta 3$  (163–165).

As proteínas ligantes incluem a trombospondina e o Fator de von Willebrand, que são sintetizados pelo endotélio e pelas plaquetas, podendo estar presentes na forma solúvel no plasma, bem como na superfície endotelial (163,166).

Alguns dos receptores endoteliais descritos, que intercedem a adesão dos eritrócitos, são a integrina  $\alpha v\beta 3$ , a P-selectina, a VCAM-1 e a Lu/BCAM (164,167,168).

A adesão anormal dos eritrócitos rígidos e densos ao endotélio devido a esta interação molecular anômala nos receptores de eritrócitos, proteínas ligantes e receptores endoteliais resulta em injúria e ativação endotelial (156).

Uma vez ativadas, sob estímulos hipóxico e inflamatório, as células endoteliais passam a expressar maior número de moléculas de adesão, incluindo: CD 36, VCAM-1, integrina  $\alpha v\beta 3$ , P-selectina, Lu/BCAM e receptores para proteoglicanas e fosfatidilserina. Essa hiperexpressão aumenta a adesão dos eritrócitos, dos leucócitos e das plaquetas ao endotélio vascular, favorecendo a vaso-oclusão (156,162).

A constatação de que há níveis elevados de moléculas adesão, como VCAM-1, ICAM-

1 e de células endoteliais circulantes no plasma de indivíduos com AF, reforça o fato de que o endotélio vascular está ativado nesta doença (169–171).

O exato mecanismo pelo qual o processo inflamatório se inicia não está totalmente esclarecido na AF. Sabe-se que o endotélio vascular é ativado por mediadores inflamatórios e pela maior adesão dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas ao endotélio. Assim sendo, o endotélio ativado produz citocinas e quimiocinas, incluindo IL-1, IL-6, IL-8, fator ativador plaquetário e proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1), o que resulta em grandes níveis de moléculas inflamatórias na circulação, como o fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6 e IL-8 (172,173).

Eventos de isquemia-reperfusão dos vasos sanguíneos geram espécies reativas ao oxigênio (ROS), que também podem ativar o processo inflamatório (174).

A exposição de fosfatidilserina na membrana celular dos eritrócitos lesados na AF pode ativar a cascata de coagulação e provocar inflamação por meio da geração de trombina e de FT (175).

A diminuição da biodisponibilidade do NO devido à anemia hemolítica crônica também provoca lesão e ativação das células endoteliais, seguida da expressão de mediadores inflamatórios como endotelina-1 (ET-1), FT e da inativação de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (148,176).

Por fim, os neutrófilos, também ativados pelas citocinas inflamatórias, tais como IL- 1 $\beta$ , IL- 6, IL-8, TNF- $\alpha$ , são recrutados para o sítio inflamatório, aumentando a produção de peróxidos e expondo maior quantidade de moléculas de adesão em sua superfície, facilitando, assim, a adesão ao endotélio, a outros neutrófilos, às plaquetas e aos eritrócitos falciformes, resultando no fenômenos vaso-oclusivos (177).

## **2735 . Hipercoagulabilidade na Anemia Falciforme**

Os indivíduos com AF, durante períodos clinicamente estáveis, apresentam,



normalmente, aumento da ativação das plaquetas, da geração de trombina e da fibrinólise. Entretanto, observa-se ampliação dessas atividades trombogênicas durante períodos de crises vaso-oclusivas, o que caracteriza um estado de hipercoagulabilidade, resultante da ativação de fatores da coagulação e da ativação do endotélio vascular (178,179).

O estado de hipercoagulabilidade é considerado multifatorial. A lesão da membrana celular eritrocitária com conseqüente exposição de fosfatidilserina desempenha papel crucial no processo de ativação dos fatores da coagulação (178,180).

Outros pesquisadores relataram que micropartículas, que são pequenas vesículas de membrana liberadas pelas plaquetas, eritrócitos, leucócitos e células endoteliais, após ativação ou durante a apoptose, também contribuem para o estado de hipercoagulabilidade na AF (178,181).

O Fator de *von Willebrand* é outro componente que tem participação relevante nos mecanismos relacionados ao estado de hipercoagulabilidade observado na AF. O Fator de *von Willebrand* é uma glicoproteína multimérica de alto peso molecular, sintetizado pelos megacariócitos e pelas células endoteliais. No plasma, os multímeros do Fator de *von Willebrand* são clivados por uma protease denominada ADAMTS13 (*a disintegrin-like and metalloprotease with trombospondin type 1 motifs*), que limita a formação do trombo plaquetário. O Fator de *von Willebrand* tem duas funções primordiais: ligar-se ao colágeno presente no subendotélio e nas plaquetas, promovendo adesão e agregação plaquetária em

locais de dano vascular e ligar e transportar o fator VIII da coagulação, protegendo-o da degradação proteolítica no plasma (182).

Estudos *in vitro* demonstraram que a hipóxia é um forte agonista para a liberação endotelial do Fator de *von Willebrand*. Posteriormente, um mecanismo adicional foi postulado, pelo qual a hemólise intravascular aumentada conduz a um estado trombótico, por aumentar a atividade do Fator de *von Willebrand*. Nesse processo, a Hb livre liga-se diretamente ao Fator de *von Willebrand*, exatamente no local do sítio proteolítico da metaloprotease, ADAMTS13, bloqueando, portanto, a clivagem do Fator de *von Willebrand*. Dessa forma, o aumento da Hb livre está correlacionado com altos níveis de multímeros do Fator de *von Willebrand* hiperativos no plasma de indivíduos com AF que, por sua vez, podem levar a complicações trombóticas e vaso-oclusivas (183–185).

As plaquetas na AF, estimuladas pela presença de citocinas inflamatórias, tais como IL-6, IL-8 e GM-CSF, também liberam multímeros de *von Willebrand*, o que favorece a maior adesão entre plaquetas, endotélio vascular, leucócitos e o eritrócitos (171).

O TNF- $\alpha$  é capaz de alterar as propriedades anticoagulantes do endotélio vascular e induzir uma atividade pró-coagulante na superfície endotelial, estimulando a produção do fator de ativação plaquetário (PAF), podendo levar ao aumento da adesão celular ao endotélio vascular (186,187).

O NO regula a ativação das plaquetas. A redução da biodisponibilidade do NO observada na AF pode levar a uma maior agregação plaquetária e à formação de coágulos vasculares (188).

#### **2.7.3.4. Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme**

A AF é uma doença de característica pleotrópica que causa injúria em praticamente todos os órgãos. Suas manifestações clínicas são amplamente diversas quanto à frequência e à

gravidade. Também diferem ao longo do tempo no mesmo indivíduo e entre os indivíduos acometidos (189).

Até o sexto mês de idade, as manifestações clínicas da AF, frequentemente, são mais brandas. Isso é atribuído à presença de maior quantidade de HbF neste período etário. Como a HbF é mais ávida por O<sub>2</sub> do que a HbS, quanto maior sua expressão no interior do eritrócito, menor será a polimerização dos tetrâmeros da desoxi-HbS, aumentando a solubilidade da HbS e, portanto, menor a taxa de eritrofalção e suas complicações sistêmicas deletérias (25,190).

A forma anormal do eritrócito falciforme, aliada à sua rigidez acentuada, viscosidade aumentada e a tendência a aderir às células endoteliais favorece a ocorrência de dois mecanismos patológicos principais: hemólise e vaso-oclusão (148).

As principais alterações atribuídas à hemólise são anemia, hipertensão pulmonar, priapismo e úlceras isquêmicas de membros inferiores. Os eventos vaso-oclusivos podem gerar dores intensas, necrose óssea, dactilite, síndrome torácica e retinopatia, entre outras complicações graves (148).

O fenômeno vaso-oclusivo pode levar à injúria progressiva do baço e conseqüentemente à asplenia funcional, sendo esta a responsável pela maior suscetibilidade a infecções graves, principalmente por bactérias capsuladas, que estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todas as idades nesse grupo de pacientes, sobretudo no grupo pediátrico (162).

Conforme Ballas e colaboradores (189), as manifestações clínicas da AF podem ser divididas em três grandes grupos: anemia hemolítica crônica e suas complicações (Tabela 1); síndromes dolorosas e suas complicações (Tabela 2) e complicações em múltiplos órgãos e suas sequelas (Tabela 3).

**Tabela 1: Anemia Hemolítica e Suas Complicações**

<p><b>Exacerbação Aguda da Anemia</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>Hiper-hemólise</li><li>Crise de Sequestro Esplênico</li><li>Crise Aplástica</li></ul> <p><b>Complicações Secundárias à Transfusão Sanguínea</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>Síndrome de Hiperviscosidade</li><li>Hemólise Autoimune</li><li>Sobrecarga de Ferro</li></ul>
---

Adaptado de BALLAS (189).

**Tabela 2: Síndromes Dolorosas e suas Complicações**

<ul style="list-style-type: none"><li>Episódios Álgicos Agudos</li><li>Neuropatia (dor neuropática)</li><li>Síndromes dolorosas iatrogênicas</li></ul>
--

Adaptado de BALLAS (189)

**Tabela 3: Principais Complicações Em Múltiplos Órgãos e Suas Sequelas**

<p><b>Neurológicas</b>  Aneurisma  Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico  Acidente Vascular Cerebral Isquêmico  Moya Moya  Infarto Cerebral Silencioso  Ataque Isquêmico Transitório  Elevação da Velocidade de Fluxo Arterial à Ecografia Doppler Transcraniana  Convulsões</p> <p><b>Oftalmológicas</b>  Estrias Angioides  Cicatrizes Pigmentares na Retina Periférica (<i>Black Sunburst Lesion</i>)  Hemorragias na Retina Periférica (<i>Salmon Patch Hemorrhage</i>)  Glaucoma  Hifema  Retinopatia Proliferativa  Hemorragia Vítrea  Descolamento da Retina</p> <p><b>Cardíacas</b>  Cardiomegalia  Cardiomiopatia  Insuficiência Cardíaca Congestiva  Prolapso da Válvula Mitral  Hipertensão Arterial Sistêmica</p> <p><b>Pulmonares</b>  Síndrome Torácica Aguda  Hipertensão Pulmonar</p> <p><b>Gastrointestinais/Hepatobiliares</b>  Colecistite  Colelitíase/Barro Biliar  Crise de Sequestro Hepático  Colestase Intra-hepática</p> <p><b>Renais/Geniturinárias</b>  Insuficiência Renal Aguda  Insuficiência Renal Crônica  Priapismo  Proteinúria / Síndrome Nefrótica  Pielonefrite</p> <p><b>Esplênicas</b>  Infarto Esplênico Agudo  Asplenia Funcional  Hiperesplenismo  Crise de Sequestro Esplênico</p> <p><b>Musculares/Esqueléticas/Cutâneas</b>  Necrose Avascular da Cabeça Femoral  Dactilite  Miosite/Mionecrose/Fasceíte  Osteomielite  Osteopenia/Osteoporose</p> <p><b>Complicações Do Crescimento e Desenvolvimento</b>  Retardo de Crescimento</p>
---

Adaptado de BALLAS (189)

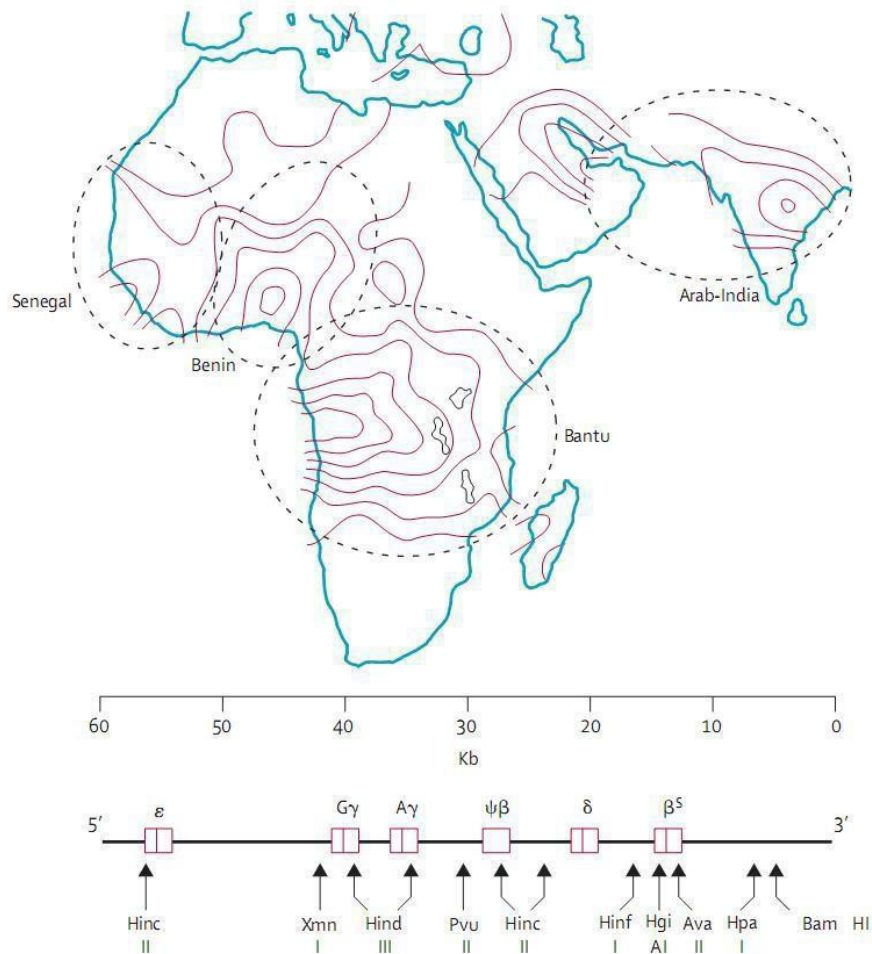
### 2.7.3.5. As Variantes Haplótípicas na Anemia Falciforme

Os haplótipos ligados ao grupo de genes da  $\beta$ -globina são definidos como a associação não randômica de combinações de sítios de clivagem para endonucleases de restrição localizados ao longo desse grupo de genes e têm sido associados a concentrações variadas de HbF e consequentemente a diferentes comportamentos clínicos da doença (191).

Cinco haplótipos principais foram descritos e designados de acordo com a região geográfica onde foram identificados primeiramente: o haplótipo Benin (Ben), associado à África Ocidental; o Bantu ou República Centro Africana (CAR) associado à África Oriental e Centro-Sul; o Senegal (Sen) relacionado à África Atlântico Ocidental; a Índia-Arábia Saudita (Saudi) associada à Índia e Península Arábica Oriental e o Camarões (Cam) associado à Costa Ocidental da África (Figura 7) (191–193).

Indivíduos com AF e o haplótipo Sen, que está associado a concentrações mais elevadas de HbF, geralmente apresentam o curso clínico menos grave da doença; o Ben apresenta concentrações intermediárias de HbF e curso clínico de moderada gravidade ao passo que o haplótipo o CAR tem concentrações diminuídas de HbF e manifestações clínicas mais graves. Os indivíduos com o haplótipo Saudi apresentam concentração elevada de HbF e curso clínico heterogêneo (191,192).

Em um estudo realizado no Estado do Rio Grande do Sul com pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, relacionando os haplótipos ligados ao grupo de genes da  $\beta$ -globina na AF, não foram encontradas diferenças entre a gravidade clínica e a taxa de HbF entre os diferentes grupos haplotípicos (194).



**Figura 7: Representação das regiões geográficas associadas aos sítios polimórficos localizados no cromossomo 11, bem como o padrão de clivagem para diferentes endonucleases de restrição. Adaptado de (162).**

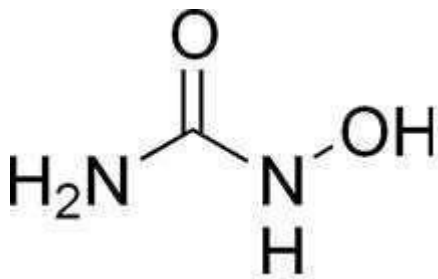
### 2.7.3.6. Anemia Falciforme e o Tratamento com Hidroxiureia

Já que inúmeros estudos, tanto em humanos quanto em modelos animais de DF, demonstraram uma relação inversa entre a morbidade e mortalidade da DF e níveis elevados de HbF, tanto em crianças quanto em adultos, tratamentos direcionados à reativação da síntese de HbF após o nascimento em indivíduos portadores de desordens hemoglobínicas, especialmente naqueles com DF e  $\beta$ -talassemias, são temas de inúmeras pesquisas básicas e clínicas há várias décadas e levaram à descoberta de diversos agentes farmacológicos capazes incrementar a taxa de síntese da HbF (18,21–24,104).

O ponto de corte que define o grupo de baixo risco para complicações graves da DF é ter uma HbF superior a 20% (195).

Em meio aos indutores de síntese de HbF para o tratamento dos indivíduos com DF se destacam a HU, os agentes inibidores da histona deacetilase (HDAC), tais como o butirato de sódio e outros ácidos graxos de cadeia curta, a 2-desoxi-5-azacitidina, a decitabina e a eritropoietina (196,197).

A HU hidroxíureia é um agente citostático, antineoplásico, sintetizado em 1869, na Alemanha, por Dresler e Stein. Sua estrutura molecular é simples, semelhante à ureia, diferenciando-se desta apenas pela hidroxilação do átomo de nitrogênio adjacente à cetona (Figura 8). Seu uso tem despertado grande interesse científico até os dias de hoje (105,198).



**Figura 8: Estrutura química da hidroxíureia.**

**Fonte:** SANTOS & CHIN (22).

Foi somente em 1967, quase um século depois de sua descoberta, que a HU foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), agência regulatória norte-americana, para o tratamento de algumas doenças neoplásicas. Nos anos subsequentes, foi aprovada para o tratamento de pacientes com transtornos mieloproliferativos (leucemia mieloide crônica, trombocitemia essencial e policitemia vera) e para outras doenças como a psoríase e doenças reumáticas. Em 1984, a HU vem a ser estudada como indutora da síntese de HbF nas



desordens hemoglobínicas. Primeiramente, foi testada em macacos e em seguida, em portadores de DF, tendo sido demonstrado o seu papel positivo no incremento dos níveis de HbF neste grupo de indivíduos (199).

No Brasil, passa a ser oficialmente introduzida nos protocolos de tratamento da DF a partir de 2002, mediante a Portaria de nº 872 do Ministério da Saúde (200).

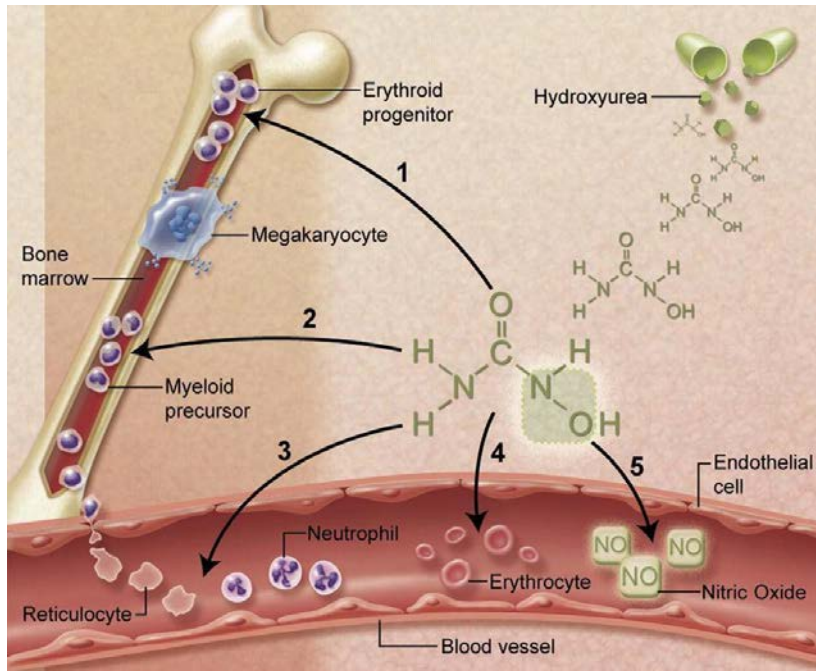
Até os dias atuais a HU constitui o tratamento farmacológico mais consolidado no manejo dos indivíduos com DF. É o único medicamento que, efetivamente, tem forte impacto na melhora da qualidade de vida, reduzindo o número de episódios álgicos agudos, diminuindo as necessidades transfusionais, o número de hospitalizações, o tempo de internação, a ocorrência de síndromes torácicas agudas, e, possivelmente, de eventos neurológicos agudos, além de demonstrar, de maneira contundente, redução do número de óbitos decorrentes da DF, quando comparado ao grupo de pacientes que não faz uso da droga (25,26,29,30).

A HU é um antimetabólito citorredutor e citotóxico que atua diretamente na via da síntese de DNA, por inibir a ação da enzima ribonucleotídeo redutase, reduzindo a formação de desoxiribonucleotídeos a partir de seus ribonucleosídeos precursores (201).

Sua via de administração é oral. No Brasil a apresentação da droga é em cápsulas de 500 mg. Tem uma excelente biodisponibilidade oral, sendo absorvida rapidamente, atingindo nível plasmático máximo entre 20 e 30 minutos (respondedores rápidos) e 60 minutos (respondedores lentos) após sua administração. A meia-vida plasmática é de 2 a 4 horas. É metabolizada no fígado e excretada principalmente por via renal. A dose recomendada na DF varia de 15-35mg/Kg/dia. Não é recomendado extrapolar a dose máxima tolerada (DMT) de 35mg/Kg/dia, na tentativa de evitar a ocorrência de toxicidade hepática, hematológica, renal e gastrointestinal (202,203).

A resposta terapêutica favorável à HU é indicada, principalmente, por meio do aumento nos níveis de HbF em 5% a 15% e do aumento da hemoglobina total em cerca de 1 g/dl, em 4 a 12 semanas após o início do tratamento (202,204).

Indivíduos com DF tratados com HU apresentam aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média e do volume corpuscular médio, redução da contagem de reticulócitos e plaquetas, redução do número de leucócitos, dos neutrófilos e outros granulócitos (participantes diretos dos fenômenos inflamatórios/vaso-oclusivos da doença), aumento do número de  $\text{--F cells}$  e reticulócitos F. Há aumento de solubilização e diminuição de polimerização da HbS, com maior deformabilidade dos eritrócitos, que podem estar indiretamente relacionados à estabilização do cotransporte de Na, K e Cl e consequente aumento da hidratação eritrocitária. Em última instância, há redução da hemólise, com aumento da sobrevida eritrocitária e aumento da concentração total de Hb (Figura 9) (27,173,202,205,206).



**Figura 9: Mecanismo de Ação e os Efeitos Benéficos do Uso de Hidroxiureia na Doença Falciforme.**

(1) Indução de síntese da HbF (2) Citotoxicidade na medula óssea e consequente diminuição do número de leucócitos, plaquetas e reticulócitos no sangue periférico. (3) Diminuição da expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos e reticulócitos circulantes, reduzindo a adesividade e o dano às células endoteliais. (4) Macrocitose e aumento da hidratação eritrocitária, diminuindo a hemólise e a eritrofalção. (5) Doação de NO, resultando em vasodilatação e seus outros efeitos benéficos. *Erythroid progenitor* (progenitor eritroide); *Hydroxyurea* (hidroxiureia); *Megakaryocyte* (megacariócitos); *Bone marrow* (medula óssea); *Myeloid precursor* (precursor mielóide); *Reticulocyte* (reticulócitos); *Neutrophil* (neutrófilos); *Erythrocyte* (eritrócitos); *Blood vessel* (vaso sanguíneo); *Endothelial cell* (célula endotelial); *Nitric oxide* (óxido nítrico). Figura adaptada de (27).

A despeito dessa série de efeitos favoráveis, o tratamento com HU pode causar eventos adversos como mielossupressão, lesões ulcerativas em membros inferiores, hiperpigmentação cutânea e ungueal e aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , favorecendo o surgimento ou potencializando os episódios álgicos agudos (207).

A HU está indicada para indivíduos com AF ou S/ $\beta^0$ -talassemia que apresentem três ou mais episódios álgicos agudos nos últimos 12 meses, um ou mais episódios de STA nos últimos 24 meses, indivíduos com disfunções orgânicas e episódios vaso-oclusivos graves ou com anemia sintomática (síndrome anêmico) (202,204,208).

A dose inicial recomendada é de 15mg/kg/dia, uma vez ao dia. Na ausência de toxicidade, esta dose deve ser aumentada em 5mg/kg/dia, a cada 12 semanas, até atingir a

DMT, ou seja, a maior dose que causa melhora das manifestações clínicas sem eventos adversos graves, sem ultrapassar a dose máxima recomendada de 35mg/kg/dia. É necessária uma monitorização cautelosa durante o tratamento com HU, por meio da avaliação do hemograma, provas de função hepática e provas de função renal periódicas (202,204,208,209).

Em um estudo pioneiro de fase III, observou-se uma redução de aproximadamente 50% na frequência das hospitalizações, de episódios algícos agudos, de eventos de síndrome torácica aguda e das necessidades de transfusão de concentrado de glóbulos vermelhos nos indivíduos tratados com HU quando comparados com o grupo de indivíduos com AF que receberam placebo (25).

Esses achados em adultos com DF tratados com HU foram confirmados posteriormente em uma população pediátrica de indivíduos com DF tratados com HU, em um estudo de Fase III, multicêntrico, duplo-cego, controlado por placebo denominado *BABYHUG* (21).

O tratamento com HU em crianças com DF reduz a ocorrência de infarto esplênico, a diminuição natural da HbF associada ao aumento da faixa etária e a incidência de dactilite (21).

Há estudos em populações pediátricas de portadores de DF que demonstraram melhora da qualidade de vida (210,211), estabilização da hiperfiltração renal (212) e da hipostenúria (21,213) e melhora o fluxo vascular cerebral (214,215). O uso prolongado na população pediátrica diminui a anemia, marcadores de hemólise, contagens de leucócitos e plaquetas e aumenta o volume corpuscular médio (91).

Um estudo multicêntrico, com seguimento de pacientes adultos com crises vaso-oclusivas frequentes, tratados com HU por nove anos, demonstrou também redução na mortalidade. Nesse estudo, a maior sobrevida foi correlacionada com o aumento da HbF e

com a menor incidência de eventos vaso-oclusivos (7). Posteriormente, Voskaridou e colaboradores (26), após seguimento de 17 anos, evidenciaram que a probabilidade de sobrevida em 10 anos em um grupo de indivíduos com DF tratados com HU foi de 86% comparado com 65% no grupo não tratado com HU ( $P = .001$ ). O aumento da sobrevida no grupo tratado com HU ficou evidente, mesmo que este grupo de pacientes apresentasse formas mais agressivas da doença (26).

Em dois estudos brasileiros atuais também foi observada significativa diminuição da mortalidade nos indivíduos com DF tratados com HU, quando comparados ao grupo de indivíduos não tratados com HU, tanto na população de adultos quanto na pediátrica (29,30).

Entre as hipóteses relacionadas ao mecanismo de ação da HU, no que tange ao aumento da HbF, uma das mais aceitas atualmente é a evidenciada pela rápida regeneração de células jovens comprometidas com a linhagem eritroide após uma fase de citorredução. Devido à sua ação inibitória sobre a enzima ribonucleotídeo redutase, prolonga a fase S do ciclo de divisão celular, alterando a cinética de proliferação eritroide e favorecendo a formação das  $\text{--F cells}$  a partir de precursores eritroides primitivos e de divisão mais lenta. Esse efeito deve-se à inibição da produção de eritrócitos que contêm grandes concentrações de HbS, constituídos a partir dos precursores eritroides maduros de acelerada proliferação e do aumento da expressão direta do gene da  $\gamma$ -globina (14,199,216).

Embora a HU tenha sido utilizada inicialmente no manejo dos indivíduos com DF devido à sua capacidade de induzir o incremento da síntese de HbF, há um grande número de indivíduos em que não ocorre aumento da HbF e casos em que há melhora clínica, mesmo antes de apresentarem aumento significativo dos níveis de HbF, sugerindo que a indução de HbF, isoladamente, não explicaria todos os efeitos benéficos do tratamento com HU e que outros mecanismos de ação da droga estão envolvidos (27,202).

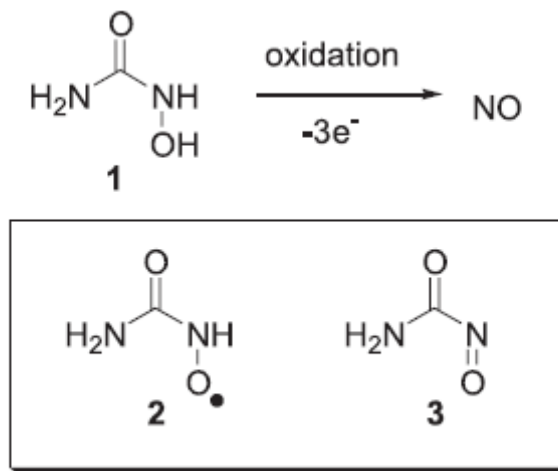
Há estudos que sugeriram que a redução de leucócitos, plaquetas e reticulócitos, ligados ao tratamento com HU, poderia estar correlacionada com a diminuição da aderência ao endotélio vascular e à conseqüente redução dos fenômenos vaso-oclusivos (217).

Em alguns estudos, a diminuição da contagem de neutrófilos no sangue periférico foi o parâmetro biológico mais fortemente relacionado com o efeito benéfico da HU, sugerindo que a redução dos neutrófilos possa ser um dos alvos preferenciais do tratamento (218,219).

O tratamento crônico dos pacientes com HU reduz a expressão e a atividade de moléculas de adesão na membrana celular dos eritrócitos, das células endoteliais e dos leucócitos, diminuindo a vaso-oclusão. Foi demonstrado que, em indivíduos com DF que fazem uso de HU, a adesão de neutrófilos à fibronectina e ao ICAM-1 é significativamente diminuída quando comparada a indivíduos com DF que não fazem tratamento com HU. O grupo tratado apresentou níveis de adesão dos neutrófilos semelhantes a níveis de adesão de indivíduos normais (220). No entanto, alguns estudos demonstram que o tratamento com HU não é capaz de reduzir os níveis séricos de citocinas inflamatórias, como a IL-6, IL-8 e IL-10 (173,221).

O NO tem papel significativo no mecanismo de ação da HU (146,149,222). O NO pode ser produzido a partir da oxidação da HU, *in vitro* e *in vivo* (223). Outros estudos demonstraram que a HU atuaria regulando de maneira positiva o TNF-alfa, que, por sua vez, agiria sobre a enzima óxido nítrico sintetase (eNOS), estimulando sua fosforilação e a ativação, que resultaria no aumento da síntese de NO (220,223,224). Portanto, ambos os mecanismos podem estar envolvidos na produção de NO mediada pela HU (225). Outro efeito da HU *in vivo* seria a diminuição do sequestro de NO pela Hb livre (156).

Alguns estudos evidenciaram que a HU também é uma doadora de NO. A HU é oxidada pela Hb gerando a nitrosilhemoglobina e NO (226,227), além de gerar NO por meio da ação das enzimas peroxidase, urease e catalase (228).



**Figura 10: Produção de Óxido Nítrico pela Hidroxiureia.**

Oxidação química da hidroxiureia (1) a óxido nítrico (NO) e intermediários: radical nitróxido (2) e C-nitrosoformamida (3).

Fonte: KING (229).

O NO ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) e aumenta os níveis de guanosina monofosfato cíclica (cGMP) (149). Um dos mecanismos pelos quais a HU induz à expressão de  $\gamma$ -globina abrange a via da guanilato ciclase, aumentando os níveis de cGMP (223,230).

Foi observado ainda que a HU apresenta propriedades antioxidantes, ao inibir a hidroperóxido terc-butil, responsável pela produção de hidroperóxidos, contribuindo para a redução da peroxidação lipídica, da formação de radicais livres e da formação de meta- hemoglobina no interior dos eritrócitos (28,224).

Apesar de seu uso ser considerado um marco histórico no tratamento da DF e de ser amplamente utilizada em pacientes com DF, a HU parece ter atividade clastogênica, carcinogênica, mutagênica e teratogênica, sugerindo que se deva ter uma cuidadosa avaliação da relação entre riscos e benefícios do seu uso (173,231).

Os relatos na literatura sobre os possíveis danos ao DNA em indivíduos expostos são muito controversos. Levando em conta o potencial citotóxico da HU, os estudos clínicos envolvendo o tratamento de pacientes com DF se preocuparam em acessar a toxicidade e a segurança do uso prolongado da HU, tanto em adultos quanto em crianças tratadas. Em um estudo de revisão da literatura, foram encontrados quatro casos de neoplasias malignas desenvolvidas durante o tratamento com HU, dos quais apenas dois pareciam ter relação com a exposição à HU (232).

Steinberg e colaboradores (7), ao avaliarem o impacto da HU sobre a morbidade e a mortalidade em pacientes adultos com DF, ao longo de nove anos de tratamento, observaram três casos de câncer, dos quais um foi fatal, em um total de 299 pacientes analisados (7).

Outros estudos demonstraram que a HU é genotóxica (32,33,233). Um estudo que procurou avaliar o dano ao DNA utilizando a análise de leucócitos do sangue periférico indivíduos com AF tratados com HU por meio da técnica do cometa evidenciou um maior índice de dano do DNA em indivíduos com AF expostos à HU quando comparados com indivíduos normais ( $p < 0.05$ ) (32).

Nesse contexto é importante o desenvolvimento de estudos que avaliem a segurança da HU, a fim de obter informações mais consolidadas sobre a genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade desse medicamento, para que os riscos e benefícios sobre o tratamento sejam avaliados individualmente (233).



Quando a HU é administrada na dose máxima tolerada, a HbF aumenta para níveis que geralmente oscilam entre 10% a 40%. No entanto, a variabilidade de resposta quanto ao incremento da taxa de HbF entre os diversos indivíduos é muito grande, a dose máxima tolerada entre os diferentes portadores de DF é muito variável e não há preditores de resposta acurados relacionados ao tratamento com HU nos indivíduos com DF até a presente data (94).

Cerca de 25% dos pacientes com DF não apresentam resposta clínica favorável ao uso de HU. Portanto, é necessário o desenvolvimento de estudos robustos, capazes de esclarecer quais os preditores de resposta à HU, para identificar previamente os indivíduos que não respondem ao tratamento, a fim de evitar a exposição do paciente a uma droga potencialmente tóxica, desnecessariamente (32).

### **27361 1. Preditores Hematimétricos de Resposta ao Tratamento com Hidroxiureia**

A transição da HbF para HbS em crianças com hemoglobinopatia SS ocorre de maneira mais gradual do que a transição da HbF para HbA em crianças que não são portadoras de variantes hemoglobínicas. A HbF na DF somente estabiliza sua taxa de síntese entre os 3 a 4 anos de idade, permanecendo constante para o resto da vida após esta faixa etária, caso o indivíduo não utilize medicações que interfiram com a taxa de síntese das  $\gamma$ -globinas (16).

Preditores de resposta ao tratamento com HU na DF, particularmente no que diz respeito ao aumento do percentual de HbF, foram previamente propostos. Os estudos originais de Fase I e II em adultos com DF evidenciaram que as melhores respostas quanto ao incremento da taxa de HbF ocorriam naqueles indivíduos com HbF e com contagem de leucócitos basais mais elevada (234).

No *Multicenter Study of Hydroxyurea* (MSH), as melhores respostas à HU, no que se refere ao aumento da taxa de síntese da HbF, ocorreram nos indivíduos com contagem absoluta de neutrófilos e de reticulócitos mais elevada, bem como naqueles que apresentaram maior diminuição na contagem de neutrófilos e de reticulócitos em relação ao nível basal, entretanto, o nível basal de HbF não foi preditivo (38).

Nos estudos de Fase I e II com população pediátrica com DF, as maiores taxas de HbF em indivíduos tratados com HU foram observadas no grupo com HbF, leucócitos e reticulócitos basais mais elevados e naqueles que apresentaram maiores diminuições na taxa de reticulócitos, na contagem de leucócitos e maior aumento do VCM, após o tratamento com HU. Porém, nenhum desses parâmetros se correlacionou, de forma acurada, com o grau de resposta à HU no que diz respeito ao incremento da HbF em relação aos níveis basais, quando foram estudadas outras populações de indivíduos com DF tratados com HU (235).

## **27362 2. Preditores Genéticos de Resposta ao Tratamento com Hidroxiureia**

Estudos que buscam preditores genéticos de resposta ao tratamento com HU no incremento da taxa de síntese de HbF na DF são raros na literatura médica (16,40).

A ausência do haplótipo CAR se correlacionou a um maior incremento da taxa de HbF em indivíduos com DF tratados com HU no estudo MSH (38). Em contrapartida, em um estudo brasileiro, o haplótipo CAR demonstrou melhor resposta na elevação da HbF em indivíduos com AF tratados com HU, quando comparado aos demais haplótipos (236).

No estudo realizado com nossa coorte de pacientes do Centro de Referência em Anemia Falciforme do Hospital de Clínicas de Porto Alegre não houve correlação entre variantes haplotípicas e a expressão de HbF (194).

Costa e colaboradores (239) investigaram o perfil de expressão gênica diferencial em células da medula óssea de uma paciente com AF antes e após a exposição à HU, por meio da metodologia de *Serial Analysis of Gene Expression*. Nesse estudo, foram identificados 147 genes com expressão diferencial, envolvidos na regulação dos processos de transcrição e

tradução, tais como ARHGAP4, CENTB1, EGR-1 e o RIN3. Genes associadas a atividades transcricionais e de síntese de proteínas apresentaram aumento moderado em seu padrão de expressão após a exposição à HU. A categoria funcional atividade repressora da transcrição (*transcriptional repressor activity*), estabelecida de acordo com o *Gene Ontology* ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)), apresentou uma diminuição de expressão após a exposição à HU na avaliação global dos transcritos. Os achados nesse estudo sugerem que provavelmente a HU induza a uma alteração global no padrão de expressão gênica (237).

O efeito da HU na expressão gênica dos reticulócitos em portadores de DF também foi estudado, e os genes com expressão alterada encontrados nesse estudo, tais como SUDS3, FZD5 e PHC3, estavam associados com a regulação da expressão de globinas (238).

Observou-se que o ERK1 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase 1*) tem níveis de fosforilação diminuídos em células da linhagem eritroleucêmica K562 expostas à HU, enquanto P38 tem seus níveis aumentados. Essas proteínas fazem parte da família de MAPKs (*RAS-mitogen-activated Protein Kinases*), proteíno-quinases comprometidas com a regulação de inúmeros de processos celulares, tais como a diferenciação, a sobrevivência e a proliferação celular (239,240).

Wang e colaboradores (241) demonstraram que vários genes sofrem modificações de expressão induzida pela HU. Utilizando microarranjos em células da linhagem AC133<sup>+</sup> expostas e não expostas à HU, foi avaliada a expressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular, apoptose e várias vias de transdução de sinal. A exposição a altas concentrações de HU levou a um aumento significativo da expressão de genes associados com apoptose (DR5, CASPASE 3, CASPASE 10, BAX e BCL-XL) e com o ciclo celular (P21, SKP-1, GADD45 e MDM2). Já a exposição a baixas concentrações de HU aumentou a expressão de

genes atuando em diversas vias celulares, como o fator de transcrição EGR1 (*Early Growth Response 1*). Esse estudo também demonstrou que a expressão dos fatores de transcrição GATA-1 e GATA-2, nas células eritroides, sofrem alterações induzidas pela HU em cultura líquida duas fases (241).

### **2733 3. Impacto dos Polimorfismos Genéticos na Expressão da Hemoglobina Fetal em Portadores de Doença Falciforme Tratados com Hidroxiureia**

A concepção atual é a de que uma atuação conjunta de genes que desempenham papel de fatores de transcrição ou com outras funções celulares relevantes poderia vir a contribuir para a compreensão do complexo mecanismo de ação da HU. Portanto, os estudos da expressão gênica têm fundamental importância para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na ação da HU. A influência da HU na expressão gênica de pacientes com DF começou a ser mais estudada na última década, principalmente por estudos que utilizaram a metodologia de análise de expressão gênica em larga escala (85).

Os estudos na literatura médica que procuraram avaliar o impacto dos polimorfismos genéticos na expressão da HbF em indivíduos com DF tratados com HU, na tentativa de explicar a grande variabilidade de resposta a este fármaco neste grupo de indivíduos, especialmente no que diz respeito à expressão da HbF são raros (16,39,40,85,242). A maioria destes envolveu populações pediátricas (16,39,40,85,242).

Ma e colaboradores (85) avaliaram a variabilidade de resposta no incremento da HbF em indivíduos com AF tratados com HU. Nesse estudo foram avaliados os polimorfismos de 29 genes candidatos previamente relacionados à expressão da HbF, envolvidos no metabolismo da HU e relacionados à proliferação dos progenitores eritroides. Foram incluídos 137 pacientes com AF tratados com HU. Os estudos de polimorfismos de nucleotídeos únicos revelaram que os polimorfismos das regiões gênicas 6q22.3–23.2 e 8q11–q12 e dos genes

ARG2, FLT1, HAO2 e NOS1 estavam fortemente associados à modulação de resposta da expressão da HbF neste grupo indivíduos tratados com HU. A conclusão do estudo foi a de que polimorfismos em genes que regulam a expressão de HbF, o metabolismo da HU e a proliferação de progenitores eritroides devam modular os diferentes graus de resposta à HU observados (85).

Kumkhaek e colaboradores (242) avaliaram se os polimorfismos do promotor SAR1A, que exerce um papel fundamental na indução do gene HBG e na maturação eritroide, teriam algum impacto na regulação da expressão gênica da HbF em indivíduos com AF tratados e não tratados com HU. Foram estudados 386 indivíduos adultos e pediátricos e 69 indivíduos com AF foram tratados com HU. Três SNPs *upstream* à região 5'UTR (-809 C>T, -502 G>T e -385 C>A) foram associados significativamente a uma maior resposta no incremento da HbF nos indivíduos tratados com HU ( $P < 0.05$ ). Ainda, outros quatro SNPs (rs2310991, -809 C>T, -385 C>A e rs4282891) foram associados significativamente com o incremento na taxa de HbF após 2 anos de tratamento. Esse estudo sugeriu que variações do elemento regulatório SAR1A pode contribuir para as diferenças interindividuais na regulação da expressão da HbF e para as diferenças de resposta à HU nos portadores de AF (242). Esses achados, porém, não foram confirmados em estudos posteriores (73,79,81,95).

O estudo HUSTLE (*Hydroxyurea Study of Long-Term Effects*) foi desenhado para avaliar dados quanto à farmacocinética, à farmacodinâmica e à farmacogenética em uma população pediátrica com DF que estava iniciando tratamento com HU. A análise farmacogenética evidenciou, por meio de polimorfismos de nucleotídeos únicos, que 5 polimorfismos do gene BCL11A (rs1427407, rs766432, rs4671393, rs7557939 e rs11886868), o polimorfismo Xmn1-HBG2 e 1 polimorfismo do gene HBE (rs7130110) influenciavam o percentual HbF basal, mas não a DMT de HU nem mesmo o percentual de

HbF após o tratamento com HU. Já os polimorfismos dos genes ARG1 (rs17599586) e ARG2 (rs2295644) influenciaram no percentual de aumento da HbF após o tratamento com HU (39).

Green e colaboradores (16) avaliaram crianças com DF em um estudo observacional quanto aos polimorfismos de nucleotídeo único de loci candidatos relacionados à expressão da HbF, em indivíduos expostos e indivíduos não expostos ao tratamento com HU. Nesse estudo, foram demonstradas fortes associações com 6 polimorfismos do gene BCL11A (rs1427407, rs766432, rs11886868, rs4671393, rs7557939, rs10184550), dos loci Xmn1-HBG2 e da épsilon globina: HBE (rs7130110), com uma variância aditiva atribuída a estes loci de 23% no grupo de não expostos à HU. No grupo de crianças com DF expostas à HU, o nível basal de HbF explicou 33% dos níveis induzidos com HU. Foi atribuída ao polimorfismo do loci HBE (rs7130110) uma variação adicional de 13% dos níveis basais de HbF, ao passo que os polimorfismos dos loci Xmn1-HBG2 e BCL11A não contribuíram para a variação da HbF além dos níveis basais no grupo tratado com HU (16).

Em um recente estudo, que procurou identificar novos genes relacionados à resposta à HU na expressão de síntese da HbF em crianças portadoras de AF, por meio de metodologia de análise de expressão gênica em larga escala, encontrou-se uma associação entre o polimorfismo do gene SALL2 com maior expressão de HbF em crianças tratadas com HU (40), ainda não havia sido previamente relatado. O gene SALL2 está envolvido com a maturação das células hematopoéticas e com o ciclo celular (243). Esse gene possui a mesma região conservada de 12 aminoácidos na região N-terminal que o gene BCL11A (103,244). Essa região gênica é essencial para a ligação dos complexos de remodelação do nucleosoma e histona deacetilase (NuRD), que incluem as histonas deacetilases HDAC1 e HDAC2. Tanto a HDAC1 quanto a HDAC2 atuam como correpressores do gene da  $\gamma$ -globina. A variante do gene SALL2 (rs61743453) determina uma troca de prolina por arginina no resíduo 840, que

altera a expressão gênica. Dessa forma, a variante P840R SALL2 estaria associada a maior expressão de HbF (40).

### 3. JUSTIFICATIVA

A elucidação dos mecanismos envolvidos na expressão dos genes HBG é matéria de grande interesse da pesquisa médica atual, uma vez que a síntese continuada de HbF durante a vida adulta é um fator de prognóstico favorável em hemoglobinopatias graves, como na DF e na  $\beta$ -talassemia (61,190). Portadores de DF podem ter níveis de HbF que variam de 1% a 30% (245), e os que expressam maior quantidade de HbF têm menor morbidade e mortalidade relacionadas à doença (18,246–248).

Mais recentemente, uma vez reconhecida a variabilidade da expressão da HbF em indivíduos normais e indivíduos com  $\beta$ -hemoglobinopatias, vários estudos de associação genética procuraram explicar essa variação (34-37,71-83).

Os estudos de polimorfismos genéticos têm demonstrado a influência de modificadores epigenéticos na regulação da expressão dos genes HBG. Esses elementos estão localizados, principalmente, nos cromossomos 2p15, 6q23 e 11p15, onde se localizam o oncogene BCL11A, a região intergênica HBS1L-MYB (HMIP) e o polimorfismo Xmn1-HBG2. Esses 3 QTLs detêm 20% a 50% do controle da expressão dos genes HBG (34–37,72– 83).

A HU é uma droga capaz de estimular a síntese de HbF. Quando a HU é administrada na DMT, a HbF aumenta para níveis que geralmente oscilam entre 10 a 40%. No entanto, a variabilidade de resposta quanto ao incremento da taxa de HbF entre os diversos indivíduos é muito grande, a DMT entre os diferentes portadores de DF é muito variável e não dispomos de preditores de resposta acurados relacionados ao tratamento com HU nos indivíduos com DF (94).

A HU tem potencial genotóxico, conforme demonstrado por alguns estudos (32,33,236).



Os estudos que procuram avaliar determinantes genéticos de resposta à HU em portadores de DF são raros na literatura médica e os resultados são conflitantes (16,39,40,86,245).

Não dispomos de estudos em nossas populações no que diz respeito ao impacto dos principais polimorfismos do locus Xmn1-HBG2, do oncogene BCL11A e da região intergênica HMIP-2, na expressão da HbF em indivíduos com AF tratados com HU.

Realizamos o presente estudo para um melhor entendimento da associação dos polimorfismos genéticos Xmn1-HBG2; rs7482144, rs4671393 e rs11886868 do oncogene BCL11A; rs9399137 e rs9402686 da região intergênica HMIP-2, com a expressão da HbF e com o comportamento de parâmetros hematimétricos, em indivíduos com AF tratados com HU. Ainda pretendemos conhecer o comportamento epidemiológico desses polimorfismos em nossas populações de portadores de AF.

A escolha dos SNPs do locus Xmn1-HBG2; rs7482144, rs4671393 e rs11886868 do oncogene BCL11A; rs9399137 e rs9402686 da região intergênica HMIP-2 se deveu as suas fortes correlações com a expressão da HbF, observadas em estudos prévios, tanto em indivíduos normais quanto em portadores de  $\beta$ -hemoglobinopatias (36,73,94,97,249).

Nesta seara, uma melhor compreensão da regulação gênica da resposta à HU poderá nos ajudar a estabelecer marcadores precoces de gravidade da doença, avançar no entendimento dos fatores de variabilidade de resposta à HU, evitando a exposição desnecessária de indivíduos que, previamente selecionados, não vão responder favoravelmente a este fármaco de potencial genotóxico. Além disso, poderá contribuir para a definição de critérios mais claros para indicação de outras abordagens terapêuticas, como o transplante alogeneico de medula óssea e para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos futuros, por meio da terapia gênica.

Também, uma vez validados, estes preditores prognósticos poderão ter impacto no aconselhamento familiar desse grupo de pacientes.

#### **4. MARCO CONCEITUAL DO ESTUDO**

A AF apresenta grande variabilidade fenotípica.

Um dos principais responsáveis por esta variabilidade é a expressão da HbF.

Portadores de AF que expressam maiores quantidade de HbF têm menor morbidade e mortalidade.

Há uma grande variação na taxa de síntese de HbF entre os indivíduos com AF e isto é uma das explicações para a grande diversidade fenotípica observada no curso clínico da doença.

A HU é capaz de estimular a produção de HbF. Porém, a resposta à HU é errática e não há preditores de resposta definidos na literatura.

Há três principais QTLs que regulam a expressão da HbF: o BCL11A, o HMIP e o Xmn1-HBG2.

Elucidar o impacto desses três loci na expressão da HbF e nos marcadores hematimétricos de resposta à HU em portadores de AF poderá melhorar o manejo terapêutico deste grupo de indivíduos, selecionar grupos de pacientes com melhor resposta à HU, criar perspectivas para novos alvos terapêuticos por meio da terapia gênica e ter implicações no aconselhamento familiar desta hemoglobinopatia.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO PRIMÁRIO:

- Avaliar o impacto dos polimorfismos de nucleotídeo único do locus Xmn1-HBG2; rs7482144, rs4671393 e rs11886868 do oncogene BCL11A; rs9399137 e rs9402686 da região intergênica HMIP-2, na expressão dos níveis de hemoglobina fetal em indivíduos com anemia falciforme, em tratamento com hidroxiureia, atendidos no Centro de Referência de Anemia Falciforme do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CRAF-HCPA).

### 5.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:

- Avaliar o impacto dos polimorfismos de nucleotídeo único do locus Xmn1-HBG2; rs7482144, rs4671393 e rs11886868 do oncogene BCL11A; rs9399137 e rs9402686 da região intergênica HMIP-2, nos índices hematimétricos nesta população de indivíduos com anemia falciforme, em tratamento com hidroxiureia, atendidos no Centro de Referência de Anemia Falciforme do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CRAF-HCPA).
- Avaliar o comportamento epidemiológico polimorfismos de nucleotídeo único do locus Xmn1-HBG2; rs7482144, rs4671393 e rs11886868 do oncogene BCL11A; rs9399137 e rs9402686 da região intergênica HMIP-2 na população de indivíduos com anemia falciforme atendidos no Centro de Referência de Anemia Falciforme do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CRAF-HCPA).

## 6. REFERÊNCIAS DA TESE

1. Pasricha S-R, Drakesmith H, Black J, Hipgrave D, Biggs B-A. Control of iron deficiency anemia in low- and middle-income countries. *Blood* [Internet]. 2013 Apr 4;121(14):2607–17. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2012-09-453522>
2. Silla LM da R, Zelmanowicz A, Mito I, Michalowski M, Hellwing T, Shilling MA, et al. High Prevalence of Anemia in Children and Adult Women in an Urban Population in Southern Brazil. Nizami Q, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jul 29;8(7):e68805. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0068805>
3. Weatherall DJ, Provan AB. Red cells I: inherited anaemias. *Lancet*. 2000;355(9210):1169–75.
4. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*. 2001. p. 704–12.
5. White JG. Ultrastructural Features of Erythrocyte and Hemoglobin Sickling. *Arch Intern Med*. 1974 Apr;133(4):545.
6. Marotta CA, Wilson JT, Forget BG, Weissman SM. Human beta-globin messenger RNA. III. Nucleotide sequences derived from complementary DNA. *J Biol Chem*. 1977;252(14):5040–53.
7. Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003.
8. Zago MA. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. *Rev Paul Med*. 1986;104:300–4.
9. Goncalves MS, Nechtman JF, Figueiredo MS, Kerbauy J, Arruda VR, Sonati MF, et al. Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the beta s haplotypes. *Hum Hered*. 1994;44(6):322–7.

10. Wagner SC, de Castro SM, Gonzalez TP, Santin AP, Zaleski CF, Azevedo LA, et al. Neonatal screening for hemoglobinopathies: results of a public health system in South Brazil. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010;14(4):565–9.
11. Lisot CLA, Silla LM da R. Screening for hemoglobinopathies in blood donors from Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil: prevalence in an Italian colony. *Cad saude publica / Minist da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica*. 2004;20(6):1595–601.
12. Daudt LE, Zechmaister D, Portal L, Neto EC, Silla LM da R, Giugliani R. Neonatal screening for hemoglobinopathies: a pilot study in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Cad saude publica / Minist da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica*. 2002;18(3):833–41.
13. Sil a LMR. Doença falciforme : um grave e desconhecido problema de saúde pública no Brasil Sickle cell disease : a serious and unknown problem of public health in Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 1999;75(3):145–6.
14. Rodgers GP. Overview of pathophysiology and rationale for treatment of sickle cell anemia. *Semin Hematol*. 1997;34(3 Suppl 3):2–7.
15. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2005;129(4):465–81.
16. Green NS, Ender KL, Pashankar F, Driscoll C, Giardina PJ, Mullen CA, et al. Candidate Sequence Variants and Fetal Hemoglobin in Children with Sickle Cell Disease Treated with Hydroxyurea. *PLoS One*. 2013;8(2).
17. Garner C, Tatu T, Game L, Cardon LR, Spector TD, Farrall M, et al. A candidate gene study of F cell levels in sibling pairs using a joint linkage and association analysis. *GeneScreen*. 2000;1(1):9–14.
18. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994;330(23):1639–44.
19. Locatelli F, Pagliara D. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(2):372–6.

20. Fertrin KY, Costa FF. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. *Expert Rev Hematol.* 2010;3(4):443–58.
21. Wang WC, Ware RE, Miller ST, Iyer R V., Casella JF, Minniti CP, et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: A multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). *Lancet.* 2011;377(9778):1663–72.
22. Dos Santos JL, Chin CM. Anemia falciforme: Desafios e avanços na busca de novos fármacos. *Quim Nova.* 2012;35(4):783–90.
23. Gravia A, Chondrou V, Sgourou A, Papantoni I, Borg J, Katsila T, et al. Individualizing fetal hemoglobin augmenting therapy for  $\beta$ -type hemoglobinopathies patients. *Pharmacogenomics.* 2014;15(10):1355–64.
24. Rahim F, Allahmoradi H, Salari F, Shahjahani M, Fard AD, Hosseini SA, et al. Evaluation of signaling pathways involved in  $\gamma$ -globin gene induction using fetal hemoglobin inducer drugs. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research.* 2013. p. 40–5.
25. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert S V, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *The New England journal of medicine.* 1995.
26. Voskaridou E, Christoulas D, Bilalis A, Plata E, Varvagiannis K, Stamatopoulos G, et al. The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: Results of a 17-year, single-center trial (LaSHS). *Blood.* 2010;115(12):2354–63.
27. Ware RE. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood.* 2010. p. 5300–11.
28. Steinberg MH, Brugnara C. Pathophysiological-based approaches to treatment of sickle cell disease. *Annu Rev Med.* 2003;54:89–112.
29. Silva-Pinto AC, Angulo IL, Brunetta DM, Neves FIR, Bassi SC, Santis GC De, et al. Clinical and hematological effects of hydroxyurea therapy in sickle cell patients: a

- single-center experience in Brazil. *Sao Paulo Med J.* 2013;131(4):238–43.
30. Lopes de Castro Lobo C, Pinto JFC, Nascimento EM, Moura PG, Cardoso GP, Hankins JS. The effect of hydroxycarbamide therapy on survival of children with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2013;161(6):852–60.
  31. Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal.* 2008;8:1295–324.
  32. Friedrisch JR, Prá D, Maluf SW, Bittar CM, Mergener M, Pollo T, et al. DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. *Mutat Res.* 2008;649(1-2):213–20.
  33. Maluf S, Prá D, Friedrisch JR, Bittar C, da Silva MAL, Henriques JA, et al. Length of treatment and dose as determinants of mutagenicity in sickle cell disease patients treated with hydroxyurea. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009;27(1):26–9.
  34. Wyszynski DF, Baldwin CT, Cleves MA, Amirault Y, Nolan VG, Farrell JJ, et al. Polymorphisms near a chromosome 6q QTL area are associated with modulation of fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2004;50(1):23–33.
  35. Jiang J, Best S, Menzel S, Silver N, Lai MI, Surdulescu GL, et al. cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults. *Blood.* 2006;108(3):1077–83.
  36. Menzel S, Garner C, Gut I, Matsuda F, Yamaguchi M, Heath S, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nat Genet.* 2007;39(10):1197–9.
  37. Thein SL, Menzel S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *British Journal of Haematology.* 2009. p. 455–67.
  38. 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.
  39. Ware RE, Despotovic JM, Mortier NA, Flanagan JM, He J, Smeltzer MP, et al.

- Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia. *Blood*. 2011;118(18):4985–91.
40. Sheehan VA, Crosby JR, Sabo A, Mortier NA, Howard TA, Muzny DM, et al. Whole Exome Sequencing Identifies Novel Genes for Fetal Hemoglobin Response to Hydroxyurea in Children with Sickle Cell Anemia. *PLoS One*. 2014;9(10):e110740.
  41. Italia K, Jain D, Gattani S, Jijina F, Nadkarni A, Sawant P, et al. Hydroxyurea in sickle cell disease-A study of clinico-pharmacological efficacy in the Indian haplotype. *Blood Cells, Mol Dis*. 2009;42(1):25–31.
  42. Zago MA, Falcao RP, Pasquini R. *Hematologia: fundamentos e prática*. Atheneu; 2001. 1043 p.
  43. Bunn HF, Forget BG. Sickle cell disease-molecular and cellular pathogenesis. In: BUNN HF, FORGET BG, editors. *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*. Philadelphia, PA; 1986. p. 453–501.
  44. Perutz MF, Rossmann MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North AC. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*. 1960;185(4711):416–22.
  45. Lehninger AL, Cox N. *Princípios de bioquímica*. 4ª ed. Sarvier; 2006. 1202 p.
  46. Papayannopoulou T, Vichinsky E, Stamatoyannopoulos G. Fetal Hb production during acute erythroid expansion. I. Observations in patients with transient erythroblastopenia and post-phlebotomy. *Br J Haematol*. 1980;44(4):535–46.
  47. Kiefer CM, Hou C, Little JA, Dean A. Epigenetics of beta-globin gene regulation. *Mutat Res*. 2008;647(1-2):68–76.
  48. Steinberg MH. Modulation of fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Hemoglobin*. 2001;25(2):195–211.
  49. Sankaran VG, Xu J, Orkin SH. Advances in the understanding of haemoglobin switching: Review. *British Journal of Haematology*. 2010. p. 181–94.



50. Hill A V, Wainscoat JS. The evolution of the alpha- and beta-globin gene clusters in human populations. *Hum Genet.* 1986;74(1):16–23.
51. Wenning MR, Sonati MF. Hemoglobinopatias hereditárias. In: Lopes AC, editor. *Diagnóstico e tratamento.* São Paulo: Manole; 2007.
52. Sonati M de F, Costa FF. Genética das doenças hematológicas: as hemoglobinopatias hereditárias. *J Pediatr (Rio J).* 2008;84(4).
53. Cao A, Moi P. Regulation of the globin genes. *Pediatr Res.* 2002;51(4):415–21.
54. Pace BS, Zein S. Understanding mechanisms of  $\gamma$ -globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. *Developmental Dynamics.* 2006. p. 1727–37.
55. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. *Lancet.* 2012;379(9813):373–83.
56. Proudfoot NJ, Shander MH, Manley JL, Gefter ML, Maniatis T. Structure and in vitro transcription of human globin genes. *Science.* 1980;209(4463):1329–36.
57. Ginder GD. Epigenetic regulation of fetal globin gene expression in adult erythroid cells. *Transl Res.* 2014;1–11.
58. Sankaran VG, Lettre G, Orkin SH, Hirschhorn JN. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of hemoglobin disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Dec;1214:47–56.
59. Harju S, McQueen KJ, Peterson KR. Chromatin structure and control of beta-like globin gene switching. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002;227(9):683–700.
60. Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin: New players, new complexities. *Blood.* 2006. p. 435–43.
61. Stamatoyannopoulos G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Experimental Hematology.* 2005. p. 259–71.

62. Andrews NC, Erdjument-Bromage H, Davidson MB, Tempst P, Orkin SH. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature*. 1993;362(6422):722–8.
63. Gong QH, McDowell JC, Dean A. Essential role of NF-E2 in remodeling of chromatin structure and transcriptional activation of the epsilon-globin gene in vivo by 5' hypersensitive site 2 of the beta-globin locus control region. *Mol Cell Biol*. 1996;16(11):6055–64.
64. Forsberg EC, Downs KM, Bresnick EH. Direct interaction of NF-E2 with hypersensitive site 2 of the beta-globin locus control region in living cells. *Blood*. 2000;96(1):334–9.
65. Merika M, Orkin SH. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol*. 1993;13(7):3999–4010.
66. Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, et al. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*. 1997;90(1):109–19.
67. Tsang AP, Fujiwara Y, Horn DB, Orkin SH. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev*. 1998;12(8):1176–88.
68. Miller IJ, Bieker JJ. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol*. 1993;13(5):2776–86.
69. Lee JS, Lee CH, Chung JH. The beta-globin promoter is important for recruitment of erythroid Krüppel-like factor to the locus control region in erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(18):10051–5.
70. Asano H, Li XS, Stamatoyannopoulos G. FKLf-2: a novel Krüppel-like transcriptional factor that activates globin and other erythroid lineage genes. *Blood*. 2000;95(11):3578–84.
71. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: New insights emerging from genomics and clinical implications. *Hum Mol Genet*. 2009;18(R2).

72. Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(27):11346–51.
73. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MAC, Araújo AS, Uda M, Sanna S, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(33):11869–74.
74. Wahlberg K, Jiang J, Rooks H, Jawaid K, Matsuda F, Yamaguchi M, et al. The HBS1L-MYB intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. *Blood*. 2009;114(6):1254–62.
75. Belini É, Cançado RD, Domingos CRB. The XmnI polymorphic site 5' to the gene *Gy* in a Brazilian patient with sickle cell anaemia - Fetal haemoglobin concentration, haematology and clinical features. *Arch Med Sci*. 2010;6(5):822–5.
76. Solovieff N, Milton JN, Hartley SW, Sherva R, Sebastiani P, Dworkis DA, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5' olfactory receptor gene cluster. *Blood*. 2010;115(9):1815–22.
77. Chinelato IS, Carrocini GC de S, Bonini-Domingos CR. XmnI polymorphism frequency in heterozygote beta thalassemia subjects and its relation to Fetal hemoglobin levels. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2011. p. 483–483.
78. Farrell JJ, Sherva RM, Chen ZY, Luo HY, Chu BF, Ha SY, et al. A 3-bp deletion in the HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is associated with HbF expression. *Blood*. 2011;117(18):4935–45.
79. Makani J, Menzel S, Nkya S, Cox SE, Drasar E, Soka D, et al. Genetics of fetal hemoglobin in Tanzanian and British patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2011;117(4):1390–2.

80. Stadhouders R, Aktuna S, Thongjuea S, Aghajanirefah A, Pourfarzad F, Van IJcken W, et al. HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers. *J Clin Invest.* 2014;124(4):1699–710.
81. Cardoso GL, Diniz IG, Martins da Silva ANL, Cunha DA, da Silva Junior JS, Carvalho Uchôa CT, et al. DNA polymorphisms at BCL11A, HBS1L-MYB and Xmn1-HBG2 site loci associated with fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia patients from Northern Brazil. *Blood Cells, Mol Dis.* 2014;53(4):176–9.
82. Wonkam A, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, Ramesar R, Cooper RS, Tayo B, et al. Association of variants at BCL11A and HBS1L-MYB with hemoglobin F and hospitalization rates among sickle cell patients in Cameroon. *PLoS One.* 2014;9(3).
83. Garner C, Silver N, Best S, Menzel S, Martin C, Spector TD, et al. Quantitative trait locus on chromosome 8q influences the switch from fetal to adult hemoglobin. *Blood.* 2004;104(7):2184–6.
84. Bhatnagar P, Purvis S, Barron-Casella E, DeBaun MR, Casella JF, Arking DE, et al. Genome-wide association study identifies genetic variants influencing F-cell levels in sickle-cell patients. *J Hum Genet.* 2011;56(4):316–23.
85. Ma Q, Wyszynski DF, Farrell JJ, Kutlar A, Farrer LA, Baldwin CT, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic determinants of response to hydroxyurea. *Pharmacogenomics J.* 2007;7(6):386–94.
86. Gil GP, Ananina G, Oliveira MB, Costa FF, Silva MJ, Santos MNN, et al. Polymorphism in the HMOX1 Gene is Associated with High Levels of Fetal Hemoglobin in Brazilian Patients with Sickle Cell Anemia. *Hemoglobin.* 2013;37(4):315–24.
87. Mtatiro SN, Makani J, Mmbando B, Thein SL, Menzel S, Cox SE. Genetic variants at HbF-modifier loci moderate anemia and leukocytosis in sickle cell disease in Tanzania. *Am J Hematol.* 2015 Jan;90(1):E1–4.
88. Gilman JG, Huisman TH. DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. *Blood.* 1985;66(4):783–7.
89. Thein SL, Wainscoat JS, Sampietro M, Old JM, Cappellini D, Fiorelli G, et al.

- Association of thalassaemia intermedia with a beta-globin gene haplotype. *Br J Haematol.* 1987;65(3):367–73.
90. Labie D, Dunda-Belkhodja O, Rouabhi F, Pagnier J, Ragusa A, Nagel RL. The -158 site 5' to the G gamma gene and G gamma expression. *Blood.* 1985;66(6):1463–5.
  91. Green NS, Barral S. Emerging science of hydroxyurea therapy for pediatric sickle cell disease. *Pediatr Res.* 2014;75(1-2):196–204.
  92. Haj Khelil A, Morinière M, Laradi S, Khelif A, Perrin P, Ben Chibani J, et al. Xmn I polymorphism associated with concomitant activation of G $\gamma$  and A $\gamma$  globin gene transcription on a  $\beta$ 0-thalassemia chromosome. *Blood Cells, Mol Dis.* 2011;46(2):133–8.
  93. Gaston M, Rosse WF. The cooperative study of sickle cell disease: review of study design and objectives. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1982;4(2):197–201.
  94. Bhanushali AA, Patra PK, Pradhan S, Khanka SS, Singh S, Das BR. Genetics of fetal hemoglobin in tribal Indian patients with sickle cell anemia. *Transl Res.* 2015;
  95. Akinsheye I, Solovieff N, Ngo D, Malek A, Sebastiani P, Steinberg MH, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Molecular characterization of the unusually high fetal hemoglobin phenotype in African Americans. *American Journal of Hematology.* 2012. p. 217–9.
  96. So C-C, Song Y-Q, Tsang ST, Tang L-F, Chan AY, Ma ES, et al. The HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is a quantitative trait locus controlling fetal haemoglobin level in carriers of beta-thalassaemia. *Journal of medical genetics.* 2008. p. 745–51.
  97. Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(5):1620–5.
  98. Creary LE, Ulug P, Menzel S, McKenzie CA, Hanchard NA, Taylor V, et al. Genetic variation on chromosome 6 influences F cell levels in healthy individuals of African descent and HbF levels in sickle cell patients. *PLoS One.* 2009;4(1).

99. Vegiopoulos A, García P, Emambokus N, Frampton J. Coordination of erythropoiesis by the transcription factor c-Myb. *Blood*. 2006;107(12):4703–10.
100. Nakamura T, Yamazaki Y, Saiki Y, Moriyama M, Largaespada DA, Jenkins NA, et al. Evi9 encodes a novel zinc finger protein that physically interacts with BCL6, a known human B-cell proto-oncogene product. *Mol Cell Biol*. 2000;20(9):3178–86.
101. Liu P, Keller JR, Ortiz M, Tessarollo L, Rachel RA, Nakamura T, et al. Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat Immunol*. 2003;4(6):525–32.
102. Sankaran VG, Xu J, Ragozy T, Ippolito GC, Walkley CR, Maika SD, et al. Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature*. 2009;460(7259):1093–7.
103. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*. 2008;322(5909):1839–42.
104. Hutz MH, Salzano FM. Sickle cell anemia in Rio de Janeiro, Brazil: demographic, clinical and laboratory data. *Braz J Med Biol Res*. 1983;16(3):219–26.
105. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *The Lancet*. 2010. p. 2018–31.
106. Horton JAB. *The Diseases of Tropical Climates and Their Treatment*. Churchill; 1874. 669 p.
107. Adewoyin AS. Management of Sickle Cell Disease: A Review for Physician Education in Nigeria (Sub-Saharan Africa). *Anemia*. 2015;2015:1–21.
108. Savitt TL, Goldberg MF. Herrick's 1910 case report of sickle cell anemia. The rest of the story. *JAMA*. 1989;261(2):266–71.
109. Emmel VE. A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle-shaped red blood corpuscles. *Archives of Internal Medicine*. 1917. p. 586 – NP.

110. Tondo C V, Salzano FM. Abnormal hemoglobins in a Brazilian Negro population. *Am J Hum Genet.* 1962;14:401–9.
111. Hahn E V., Gillespie EB. Sickle cell anemia: report of a case greatly improved by splenectomy. Experimental study of sickle cell formation. *Archives of Internal Medicine.* 1927. p. 233–54.
112. Pauling L, Itano HA. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science.* 1949;109(2835):443.
113. Neel J V. The Inheritance of Sickle Cell Anemia. *Science.* 1949;110(2846):64–6.
114. Watson J. A study of sickling of young erythrocytes in sickle cell anemia. *Blood.* 1948;3(4):465–9.
115. Ingram VM. Abnormal human haemoglobins. *Proc R Soc Med.* 1958;51(8):645–6.
116. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: Old discoveries, new concepts, and future promise. *Journal of Clinical Investigation.* 2007. p. 850–8.
117. Coutinho E. Diagnóstico de anemias. *A Folha Médica Rio Janeiro.* 1993;14:447–50.
118. Araujo JT. Literatura brasileira sobre anemia falciforme. *Sagre: Zaragoza;* 1961. 87-98 p.
119. Castro AS. Anemia de hemácias falciformes. *J Pediatr Rio Janeiro.* 1934;1(1):247–445.
120. Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012;12(6):457–68.
121. Naoum PC. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2000;22(1):5–22.
122. Lehman H, Maranhian G, Mourant AE. Distribution of sickle-cell hemoglobin in Saudi Arabia. *Nature.* 1963;198:492–3.

123. Gelpi AP. Migrant populations and the diffusion of the sickle-cell gene. *Ann Intern Med.* 1973;79(2):258–64.
124. Wainscoat JS, Bell JI, Thein SL, Higgs DR, Sarjeant GR, Peto TE, et al. Multiple origins of the sickle mutation: evidence from beta S globin gene cluster polymorphisms. *Mol Biol Med.* 1983;1(2):191–7.
125. Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(6):1771–3.
126. Chebloune Y, Pagnier J, Trabuchet G, Faure C, Verdier G, Labie D, et al. Structural analysis of the 5' flanking region of the beta-globin gene in African sickle cell anemia patients: further evidence for three origins of the sickle cell mutation in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(12):4431–5.
127. Lapoum roulie C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Mony-Lob  M, Bodo JM, et al. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Hum Genet.* 1992;89(3):333–7.
128. Kulozik AE, Wainscoat JS, Serjeant GR, Kar BC, Al-Awamy B, Essan GJ, et al. 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(2):239–44.
129. Allison AC. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J.* 1954;1(4857):290–4.
130. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Williams TN, et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun.* 2010;1:104.
131. Pasvol G. The interaction between sickle haemoglobin and the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980;74(6):701–5.
132. Meier ER, Miller JL. Sickle cell disease in children. *Drugs.* 2012. p. 895–906.
133. Vichinsky E, Hurst D, Earles A, Kleman K, Lubin B. Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality. *Pediatrics.* 1988;81(6):749–55.



134. Shafer FE, Lorey F, Cunningham GC, Klumpp C, Vichinsky E, Lubin B. Newborn screening for sickle cell disease: 4 years of experience from California's newborn screening program. *J Pediatr Hematol Off J Am Soc Pediatr Hematol.* 1996;18(1):36–41.
135. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):204–6.
136. Azevedo ES, Alves AFP, Olympio Da Silva MCB, Souza MG, Muniz Dias Lima AM. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. *Am J Phys Anthropol.* 1980;53(4):509–12.
137. Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JP de, Menezes JF, Rêgo M, Reis MG dos, et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad saude publica / Minist da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica.* 21(1):292–8.
138. Araújo MCPE, Serafim ÉSS, Castro Jr. WAP de, Medeiros TMD de. Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública.* 2004. p. 123–8.
139. Ramalho AS. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética; 1986.
140. Brandelise S, Pinheiro V, Gabetta CS, Hambleton I, Serjeant B, Serjeant G. Newborn screening for sickle cell disease in Brazil: The Campinas experience. *Clin Lab Haematol.* 2004;26(1):15–9.
141. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *ScientificWorldJournal.* 2009;9:46–67.
142. Steinberg MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2006. p. 204–10.
143. Jimenez MA, Tutuncuoglu E, Barge S, Novelli EM, Sundd P. Quantitative microfluidic fluorescence microscopy to study vaso-occlusion in Sickle Cell Disease. *Haematologica.* 2015;

144. Frenette PS. Sick cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol.* 2002;9(2):101–6.
145. Lew VL, Bookchin RM. Ion transport pathology in the mechanism of sickle cell dehydration. *Physiol Rev.* 2005;85(1):179–200.
146. Conran N, Ferreira HH, Lorand-Metze I, Thomazzi SM, Antunes E, de Nucci G. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms in vitro by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. *Br J Pharmacol.* 2001;134(3):632–8.
147. Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood.* 2007;110(6):2166–72.
148. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev.* 2007;21(1):37–47.
149. Nahavandi M, Wyche MQ, Perlin E, Tavakkoli F, Castro O. Nitric Oxide Metabolites in Sickle Cell Anemia Patients after Oral Administration of Hydroxyurea; Hemoglobinopathy. *Hematology.* 2000;5(4):335–9.
150. Mack AK, Kato GJ. Sick cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(8):1237–43.
151. Lopez BL, Davis-Moon L, Ballas SK, Ma XL. Sequential nitric oxide measurements during the emergency department treatment of acute vasoocclusive sickle cell crisis. *Am J Hematol.* 2000;64(1):15–9.
152. Kato GJ. Defective nitric oxide metabolism in sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62(3):373–4.
153. Chappey O, Wautier-Pepin MP, Wautier JL. Adhesion of erythrocytes to endothelium in pathological situations: a review article. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1994;36(4):281–8.

154. Wick TM, Eckman JR. Molecular basis of sickle cell-endothelial cell interactions. *Curr Opin Hematol.* 1996;3(2):118–24.
155. Parise L V, Telen MJ. Erythrocyte adhesion in sickle cell disease. *Curr Hematol Rep.* 2003;2(2):102–8.
156. Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clinical Biochemistry.* 2009. p. 1824–38.
157. Hebbel RP, Yamada O, Moldow CF, Jacob HS, White JG, Eaton JW. Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium. Possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. *J Clin Invest.* 1980;65(1):154–60.
158. Walmet PS, Eckman JR, Wick TM. Inflammatory mediators promote strong sickle cell adherence to endothelium under venular flow conditions. *Am J Hematol.* 2003;73(4):215–24.
159. Natarajan M, Udden MM, McIntire L V. Adhesion of sickle red blood cells and damage to interleukin-1 beta stimulated endothelial cells under flow in vitro. *Blood.* 1996;87(11):4845–52.
160. Kaul DK, Fabry ME, Costantini F, Rubin EM, Nagel RL. In vivo demonstration of red cell-endothelial interaction, sickling and altered microvascular response to oxygen in the sickle transgenic mouse. *J Clin Invest.* 1995;96(6):2845–53.
161. Kaul DK, Fabry ME. In vivo studies of sickle red blood cells. *Microcirculation.* 2004;11(2):153–65.
162. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet.* 2004. p. 1343–60.
163. Sugihara K, Sugihara T, Mohandas N, Hebbel RP. Thrombospondin mediates adherence of CD36+ sickle reticulocytes to endothelial cells. *Blood.* 1992;80(10):2634–42.
164. Swerlick RA, Eckman JR, Kumar A, Jeitler M, Wick TM. Alpha 4 beta 1-integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. *Blood.* 1993;82(6):1891–9.

165. Lee SP, Ataga KI, Orringer EP, Phillips DR, Parise L V. Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: Potential role for platelet-mediated inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(7):1626–31.
166. Wick TM, Moake JL, Udden MM, Eskin SG, Sears DA, McIntire L V. Unusually large von Willebrand factor multimers increase adhesion of sickle erythrocytes to human endothelial cells under controlled flow. *J Clin Invest.* 1987;80(3):905–10.
167. Kaul DK, Tsai HM, Liu XD, Nakada MT, Nagel RL, Collier BS. Monoclonal antibodies to alphaVbeta3 (7E3 and LM609) inhibit sickle red blood cell-endothelium interactions induced by platelet-activating factor. *Blood.* 2000;95(2):368–74.
168. Matsui NM, Borsig L, Rosen SD, Yaghmai M, Varki A, Embury SH. P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. *Blood.* 2001;98(6):1955–62.
169. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med.* 1997;337(22):1584–90.
170. Strijbos MH, Landburg PP, Nur E, Teerlink T, Leebeek FWG, Rijneveld AW, et al. Circulating endothelial cells: a potential parameter of organ damage in sickle cell anemia? *Blood Cells Mol Dis.* 2009;43(1):63–7.
171. Graido-Gonzalez E, Doherty JC, Bergreen EW, Organ G, Telfer M, McMillen MA. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood.* 1998;92(7):2551–5.
172. Croizat H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. *Br J Haematol.* 1994;87(3):592–7.
173. Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad STO, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol.* 2009;85(2):235–42.
174. Sakamoto TM, Lanaro C, Ozelo MC, Garrido VT, Olalla-Saad ST, Conran N, et al. Increased adhesive and inflammatory properties in blood outgrowth endothelial cells from sickle cell anemia patients. *Microvasc Res.* 2013;90:173–9.

175. Yasin Z, Witting S, Palascak MB, Joiner CH, Rucknagel DL, Franco RS. Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: Associations with cell age, density, and hemoglobin F. *Blood*. 2003;102(1):365–70.
176. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005;293(13):1653–62.
177. Manwani D, Frenette PS. Vaso-Occlusion in sickle cell disease: Pathophysiology and novel targeted therapies. *Blood*. 2013. p. 3892–8.
178. Van Beers EJ, Schaap MCL, Berckmans RJ, Nieuwland R, Sturk A, Van Doormaal FF, et al. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica*. 2009;94(11):1513–9.
179. Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med*. 2001;137(6):398–407.
180. Yamaja Setty BN, Koneti Rao A, Stuart MJ. Thrombophilia in sickle cell disease: The red cell connection. *Blood*. 2001;98(12):3228–33.
181. SM C, Moraes D, P B, P A, Jeune L, F L, et al. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. 2015;
182. Chen J, Hobbs WE, Le J, Lenting PJ, De Groot PG, López JA. The rate of hemolysis in sickle cell disease correlates with the quantity of active von Willebrand factor in the plasma. *Blood*. 2011;117(13):3680–3.
183. Krishnan S, Siegel J, Pullen G, Hevelow M, Dampier C, Stuart M. Increased von Willebrand factor antigen and high molecular weight multimers in sickle cell disease associated with nocturnal hypoxemia. *Thromb Res*. 2008;122(4):455–8.
184. Zhou Z, Han H, Cruz MA, López JA, Dong JF, Guchhait P. Haemoglobin blocks von Willebrand factor proteolysis by ADAMTS-13: A mechanism associated with sickle cell disease. *Thromb Haemost*. 2009;101(6):1070–7.

185. Zhou Z, L. Yee D, Guchhait P. Molecular Link between Intravascular Hemolysis and Vascular Occlusion in Sickle Cell Disease. *Current Vascular Pharmacology*. 2012. p. 756–61.
186. Pathare A, Kindi S Al, Daar S, Dennison D. Cytokines in sickle cell disease. *Hematology*. 2003;8(5):329–37.
187. Sparkenbaugh E, Pawlinski R. Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*. 2013. p. 3–14.
188. Pakbaz Z, Wun T. Role of the hemostatic system on sickle cell disease pathophysiology and potential therapeutics. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2014. p. 355–74.
189. Ballas SK, Lieff S, Benjamin LJ, Dampier CD, Heeney MM, Hoppe C, et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *American Journal of Hematology*. 2010. p. 6–13.
190. Kaufman RE. Hydroxyurea: specific therapy for sickle cell anemia? *Blood*. 1992. p. 2503–6.
191. Powars DR, Meiselman HJ, Fisher TC, Hiti A, Johnson C. Beta-S gene cluster haplotypes modulate hematologic and hemorheologic expression in sickle cell anemia. Use in predicting clinical severity. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1994;16(1):55–61.
192. el-Hazmi MA. The relationship of the genetic heterogeneity of sickle cell gene to clinical manifestations. *J Trop Pediatr*. 1993;39(1):23–9.
193. Konstantopoulos K, Vulliamy T, Swirsky D, Reeves JD, Kaeda J, Luzzatto L. DNA haplotypes in Africans and West Indians with sickle cell anaemia or SC disease. *Gene Geogr*. 1996;10(1):19–24.
194. A. L. da Silva M, R. Friedrich J, M. Bittar C, Urnau M, Merzoni J, S. Valim V, et al.  $\beta$ -Globin Gene Cluster Haplotypes and Clinical Severity in Sickle Cell Anemia Patients in Southern Brazil. *Open J Blood Dis*. 2014;04(02):16–23.
195. Powars DR, Weiss JN, Chan LS, Schroeder WA. Is there a threshold level of fetal hemoglobin that ameliorates morbidity in sickle cell anemia? *Blood*. 1984;63(4):921–

- 6.
196. el-Hazmi MA, Al-Momen A, Warsy AS, Kandaswamy S, Huraib S, Harakati M, et al. The pharmacological manipulation of fetal haemoglobin: trials using hydroxyurea and recombinant human erythropoietin. *Acta Haematol.* 1995;93(2-4):57–61.
197. Fard AD, Hosseini SA, Shahjehani M, Salari F, Jaseb K. Evaluation of novel fetal hemoglobin inducer drugs in treatment of  $\beta$ -hemoglobinopathy disorders. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research.* 2013. p. 46–53.
198. Dressler EF., Stein R. Ueber den hydroxylharnstoff. *Liebigs Ann der Chemie.* 1869;150:242–52.
199. Platt OS, Orkin SH, Dover G, Beardsley GP, Miller B, Nathan DG. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *The Journal of clinical investigation.* 1984. p. 652–6.
200. BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. Brasília, DF: ANVISA; 2002.
201. Moore EC, Hurlbert RB. The inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea, guanazole and pyrazoloimidazole (IMPY). *Pharmacol Ther.* 1985;27(2):167–96.
202. Cançado RD, Lobo C, Angulo IL, Araújo PIC, Jesus J a. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;31(5):361–6.
203. Wiczling P, Liem RI, Panepinto JA, Garg U, Abdel-Rahman SM, Kearns GL, et al. Population pharmacokinetics of hydroxyurea for children and adolescents with sickle cell disease. *J Clin Pharmacol.* 2014;54(9):1016–22.
204. Figueiredo MS. Agentes indutores da síntese de hemoglobina fetal. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):313–5.
205. Okpala IE. New therapies for sickle cell disease. *Hematology/Oncology Clinics of North America.* 2005. p. 975–87.

206. Ballas SK, Marcolina MJ, Dover GJ, Barton FB. Erythropoietic activity in patients with sickle cell anaemia before and after treatment with hydroxyurea. *British journal of haematology*. 1999.
207. Tavakkoli F, Nahavandi M, Wyche MQ, Perlin E. Plasma levels of TNF-alpha in sickle cell patients receiving hydroxyurea. *Hematology*. 2004;9(1):61-4.
208. Brawley OW, Cornelius LJ, Edwards LR, Northington Gamble V, Green BL, Inturrisi C, et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: Hydroxyurea treatment for sickle cell disease. *Annals of Internal Medicine*. 2008. p. 932-8.
209. Aliyu ZY, Tumblin AR, Kato GJ. Current therapy of sickle cell disease. *Haematologica*. 2006;91(1):7-11.
210. Thornburg CD, Calatroni A, Panepinto JA. Differences in health-related quality of life in children with sickle cell disease receiving hydroxyurea. *J Pediatr Hematol Off J Am Soc Pediatr Hematol*. 2011;33(4):251-4.
211. Dampier C, Loeff S, LeBeau P, Rhee S, McMurray M, Rogers Z, et al. Health-related quality of life in children with sickle cell disease: a report from the Comprehensive Sickle Cell Centers Clinical Trial Consortium. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55(3):485-94.
212. Aygun B, Mortier NA, Smeltzer MP, Shulkin BL, Hankins JS, Ware RE. Hydroxyurea treatment decreases glomerular hyperfiltration in children with sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2013;88(2):116-9.
213. Alvarez O, Miller ST, Wang WC, Luo Z, Mccarville MB, Schwartz GJ, et al. Effect of hydroxyurea treatment on renal function parameters: Results from the multi-center placebo-controlled BABY HUG clinical trial for infants with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(4):668-74.
214. Kratovil T, Bulas D, Driscoll MC, Speller-Brown B, McCarter R, Minniti CP. Hydroxyurea therapy lowers TCD velocities in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;47(7):894-900.
215. Zimmerman SA, Schultz WH, Burgett S, Mortier NA, Ware RE. Hydroxyurea therapy



- lowers transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2007;110(3):1043–7.
216. Charache S, Dover GJ, Moore RD, Eckert S, Ballas SK, Koshy M, et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 1992.
217. Steinberg MH, Rodgers GP. Pharmacologic modulation of fetal hemoglobin. *Medicine (Baltimore)*. 2001;80(5):328–44.
218. Charache S. Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. *Seminars in hematology*. 1997.
219. Benkerrou M, Delarche C, Brahimi L, Fay M, Vilmer E, Elion J, et al. Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2002;99(7):2297–303.
220. Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad STO, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica*. 2008;93(4):605–9.
221. Saleh AW, Duits AJ, Gerbers A, De Vries C, Hillen HFP. Cytokines and soluble adhesion molecules in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. *Acta Haematol*. 1998;100(1):26–31.
222. Gladwin MT, Schechter AN. Nitric oxide therapy in sickle cell disease. *Semin Hematol*. 2001;38(4):333–42.
223. Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest*. 2003;111(2):231–9.
224. Agil A, Sadrzadeh SM. Hydroxy-urea protects erythrocytes against oxidative damage. *Redox Rep*. 2000;5(1):29–34.
225. Morris CR, Vichinsky EP, van Warmerdam J, Machado L, Kepka-Lenhart D, Morris SM, et al. Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. *Journal of pediatric hematology/oncology: official journal of the*

- American Society of Pediatric Hematology/Oncology. 2003.
226. Gladwin MT, Shelhamer JH, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Nichols JS, Link B, et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2002;116(2):436–44.
  227. Jain S, Gladwin MT. Arginine metabolism and nitric oxide bioavailability in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Off J Am Soc Pediatr Hematol.* 2010;32(7):e247–8.
  228. Jiang J, Jordan SJ, Barr DP, Gunther MR, Maeda H, Mason RP. In vivo production of nitric oxide in rats after administration of hydroxyurea. *Mol Pharmacol.* 1997;52(6):1081–6.
  229. King SB. The nitric oxide producing reactions of hydroxyurea. *Curr Med Chem.* 2003;10(6):437–52.
  230. Ikuta T, Ausenda S, Cappellini MD. Mechanism for fetal globin gene expression: Role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2001. p.1847–52.
  231. Lanzkron S, Strouse JJ, Wilson R, Beach MC, Haywood C, Park H, et al. Systematic review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. *Annals of Internal Medicine.* 2008. p. 939–55.
  232. Halsey C, Roberts I a G. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2003;120(2):177–86.
  233. Hanft VN, Fruchtman SR, Pickens C V, Rosse WF, Howard TA, Ware RE. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. *Blood.* 2000;95(11):3589–93.
  234. Zimmerman SA, Schultz WH, Davis JS, Pickens C V., Mortier NA, Howard TA, et al. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. *Blood.* 2004;103(6):2039–45.
  235. Ware RE, Eggleston B, Redding-Lallinger R, Wang WC, Smith-Whitley K, Daeschner C, et al. Predictors of fetal hemoglobin response in children with sickle cell anemia receiving hydroxyurea therapy. *Blood.* 2002.

236. Silva DG, Belini Junior E, Carrocini GC, Torres L De, Ricci Júnior O, Lobo CL, et al. Genetic and biochemical markers of hydroxyurea therapeutic response in sickle cell anemia. *BMC Med Genet.* 2013;14(1):108.
237. Chagas Costa F, Ferreira Da Cunha A, Fattori A, De Sousa Peres T, Gilson Lacerda Costa G, Ferraz Machado T, et al. Gene expression profiles of erythroid precursors characterise several mechanisms of the action of hydroxycarbamide in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2007;136(2):333–42.
238. Moreira LS, de Andrade TG, Albuquerque DM, Cunha AF, Fattori A, Saad STO, et al. Identification of differentially expressed genes induced by hydroxyurea in reticulocytes from sickle cell anaemia patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35(5-6):651–5.
239. Park JI, Choi HS, Jeong JS, Han JY, Kim IH. Involvement of p38 kinase in hydroxyurea-induced differentiation of K562 cells. *Cell Growth Differ.* 2001;12(9):481–6.
240. Nagai T, Tarumoto T, Miyoshi T, Ohmine K, Muroi K, Komatsu N, et al. Oxidative stress is involved in hydroxyurea-induced erythroid differentiation. *Br J Haematol.* 2003;121(4):657–61.
241. Wang M, Tang DC, Liu W, Chin K, Zhu JG, Fibach E, et al. Hydroxyurea exerts bi-modal dose-dependent effects on erythropoiesis in human cultured erythroid cells via distinct pathways. *Br J Haematol.* 2002;119(4):1098–105.
242. Kumkhaek C, Taylor VI JG, Zhu J, Hoppe C, Kato GJ, Rodgers GP. Fetal haemoglobin response to hydroxycarbamide treatment and sar1a promoter polymorphisms in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2008;141(2):254–9.
243. Chai L. The role of HSAL (SALL) genes in proliferation and differentiation in normal hematopoiesis and leukemogenesis. *Transfusion.* 2011;51(SUPPL. 4).
244. Lauberth SM, Rauchman M. A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *J Biol Chem.* 2006;281(33):23922–31.
245. Nagel RL, Platt OS. General pathophysiology of sickle cell anemia. In: Steinberg MH,

- Forget BG, Higgs D., Nagel RL, editors. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001. p. 494–526.
246. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med.* 1991;325(1):11–6.
247. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood.* 1994;84(2):643–9.
248. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med.* 1997;337(11):762–9.
249. Sankaran VG, Orkin SH, Walkley CR. Rb intrinsically promotes erythropoiesis by coupling cell cycle exit with mitochondrial biogenesis. *Genes Dev.* 2008;22(4):463–75.

## 7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

### **DNA Polymorphism at the BCL11A (rs1427407) Locus is Associated with Better Response To Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia Patients from Southern Brazil**

João Ricardo Friedrisch<sup>1</sup>, Christina Matzembacher Bitar<sup>2</sup>, Ianaê Indiará Wilke<sup>3</sup>, Liane Esteves Daudt<sup>4</sup>, Lucia Mariano da Rocha Silla<sup>5</sup>

Hematology and Bone Marrow Transplantation Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author:

João Ricardo Friedrisch

35, Alameda Eduardo Guimaraes

Porto Alegre-RS-Brazil

ZYP CODE: 91340350

Phone: 55 51 33337875

E-mail: drjrf@terra.com.br

---

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Hematology and Bone Marrow Transplantation Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Hematology and Bone Marrow Transplantation Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Hematology and Bone Marrow Transplantation Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup> Hematology and Bone Marrow Transplantation Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup> Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Hematology and Bone Marrow Transplantation Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

## ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is an inherited blood disorder, causing significant mortality and morbidity. Although a monogenic disease, individuals with SCA exhibit widespread variability in laboratory and clinical phenotypes. Fetal hemoglobin (HbF) is one of the major contributors to the significant phenotypic heterogeneity of SCA. High levels of HbF are a very well characterized factor that reduces SCA morbidity and mortality. HbF levels vary considerably, not only in patients with hemoglobin disorders, but also in healthy normal adults. Genetic polymorphisms at three principal loci (Xmn1-HBG2 on chromosome 11p, HBS1L-MYB (HMIP) intergenic region on chromosome 6q, and oncogene BCL11A on chromosome 2p) have been shown to influence HbF levels and disease severity in  $\beta$ -thalassemia and SCA.

Hydroxyurea (HU), a ribonucleotide reductase inhibitor, is one drug that increases HbF in SCD patients, with robust laboratory and clinical benefits, reducing morbidity and mortality. Most, but not all patients respond to HU treatment with an increase in HbF, and as with baseline HbF concentrations, the magnitude of the response to HU has an enormous variability. In addition, interpatient maximum tolerated dose (MTD) is variable. Accurate predictors of HU responses do not currently exist. We have investigated the influence of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) at the locus Xmn1-HBG2; rs1427407, rs4671393 and rs11886868 at the oncogene BCL11A; rs9399137 and rs9402686 at the intergenic region HMIP-2 on baseline and on HU-induced HbF levels and on hematological parameters in SCA patients from Southern Brazil.

We studied 121 SS patients (56% females), with ages from 1 year and 9 months to 54 years (mean  $19 \pm 14$ ) years, in treatment with doses of HU ranged 8, 6 - 42, 8 (mean  $23 \pm 7, 6$ ) mg/kg/day, during 6- 254 (mean  $102 \pm 67$ ) months.

Better response to HU on HbF levels at the end of the study was correlated with a higher HbF at baseline ( $r=0,40$ ;  $P < 0,001$ ), a higher total hemoglobin (Hbt) at baseline ( $r=0,26$ ;  $P = 0,005$ ) and a larger time of exposition to HU ( $r = -0,30$ ;  $P = 0,001$ ).

HbF levels at the baseline were strongly influenced only by the 2 HMIP-2 variant tested (rs9399137 and rs9402686) after multiple linear regression analysis adjusted for age at the start of HU and gender. Allele C of the SNP HMIP-2 rs9399137 explained 5.7% ( $B=0,59$ ;  $P=0,01$ ) of the total variation of the baseline HbF while allele A of the SNP HMIP-2 rs9402686 explained 8.4% ( $B=0,62$ ;  $P=0,002$ ) of this trait.

Allele T of the SNP BCL11A rs1427407 explained 7.6 % ( $B = 5,99$ ;  $P = 0,017$ ) of HbF final variation, allele A of the SNP BCL11A rs4671393 explained 4.5% ( $B=5,25$ ;  $P= 0,025$ ) of this variation and the allele C of the SNP BCL11A rs11886868 explained a variation of 4.3% ( $B = 4,05$ ;  $P = 0,029$ ) in the final HbF.

When we analyzed the variation of final HbF minus baseline HbF (delta HbF), we observed that allele T of the BCL11A rs1427407 had a strong influence, and accounted for 7.6% ( $B = 0,29$ ;  $P = 0,035$ ) of the variation in delta HbF.

We observed that all the SNP BCL11A rs1427407 has a significant impact on HU-induced HbF levels. Studies with more expressive populations are needed to validate these findings and additional loci may be identified through independent genome-wide association studies (GWASs) to explain the ample HbF and phenotypic inter-individual variations observed in baseline and HU-induced in SCA patients. Therefore, accurate prediction of HU responses on SCA remains a challenging objective.

**Key words:** Sickle cell anemia; Fetal hemoglobin; Single Nucleotide Polymorphism; Hydroxyurea.

## Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is among the most common genetic disorders worldwide with 300,000 annual affected newborns, and has a major impact on global economy, health, and mortality, especially in developing countries (1).

Although SCA is a monogenic Mendelian disorder caused by a single point mutation (homozygosity for HBB glu6val), within the gene encoding the  $\beta$ -subunit of adult Hb (HbA,  $\alpha_2\beta_2$ ) clinical manifestations of the disease include striking phenotypic heterogeneity, displaying a remarkable diversity of disease severity, that involves many genetic and environmental factors. SCA is characterized by deformation of erythrocytes (sickling), with severe hemolysis and vaso-occlusive phenomena, resulting in hypoxic/ischemic tissue injury, multiorgan dysfunctions, pain crisis and early mortality (2).

Normal human adults usually have less than 1% of HbF in peripheral blood, which is heterogeneously distributed among a subpopulation of erythrocytes called  $\beta$ -cells. There is a notable variation in the concentration of HbF not only in normal populations, but also in individuals with SCA and  $\beta$ -thalassemia. Although the majority of adults have an HbF of less than 0.6% of total hemoglobin, 10–15% of individuals have increases ranging from 0.8% to 5%. In SCA there is an interindividual variation ranging from 1 to 30% (3).

Increased levels of HbF may reduce SCA anemia severity (decreasing morbidity and mortality), due to their ability to inhibit the sickle Hb (HbS) polymerization (that leads to erythrocyte damage and dysfunction) and reduce the mean corpuscular HbS concentration (4).

Adult levels of HbF are highly heritable. GWASs have demonstrated, in normal population and in individuals with hemoglobin disorders, that the synthesis of HbF is

genetically controlled by elements linked to the HBB gene-like cluster and by several quantitative trait loci (QTLs) (5–7).

To date, GWASs have identified 3 major QTLs with robust and reproducible statistical evidence at *Xmn1-HBG2* on chromosome 11p15, *HBS1L-MYB* intergenic region on chromosome 6q23, and *BCL11A* on chromosome 2p16 that account for 20–50% of the common variation in HbF levels in patients with SCD,  $\beta$ -thalassemia, and in healthy adults. Two of the major QTLs include oncogenes, highlighting the importance of cell proliferation and differentiation as an important contribution to the HbF phenotype (8).

Additionally, these 3 QTLs were associated with the pain crisis rate in sickle cell disease (SCD) (9).

Newborn screening, preventive therapy (e.g., early antibiotic prophylaxis and vaccination), and parental guidance and counselling have mainly reduced morbidity and early mortality from SCD. Despite these advances for improving clinical outcomes of SCD, overall mortality is substantially increased and life expectancy decreased when compared with the general population, particularly in developing countries (1).

Hydroxyurea (HU), a ribonucleotide reductase inhibitor, is a worldwide used antineoplastic drug, which reduces morbidity and mortality and improves many hematological and clinical outcomes by increasing HbF (mainly through soluble guanylyl cyclase activation and altered erythroid kinetics) in adults and pediatric populations with SCD. Other potentially beneficial effects including lower neutrophil and reticulocyte counts from ribonucleotide reductase inhibition and marrow cytotoxicity; decreased adhesiveness and improved rheology of circulating neutrophils and reticulocytes; reduced hemolysis through improved erythrocyte hydration, macrocytosis, and reduced intracellular sickling; and nitric oxide (NO) release (10–12).



In 1995, the pivotal Multicenter Study of Hydroxyurea (MSH) phase III trial for adults with SCD demonstrated the remarkable clinical impact of HU: approximately 40% reduction in the incidence of acute pain episodes, acute chest syndrome, and hospitalization (13).

These results led to approval of HU for use in symptomatic SCD by the US Food Drug Administration (FDA) in 1998. HU remains the only FDA-approved drug for SCD but approval does not extend to pediatric use, although it has also become widely used for management of children with SCD, expressly in high-income countries (14–16).

Although HU is effective for mainly SCD patients almost one third of the patients do not have a good response. Clinical response to treatment varies considerably between individuals, creating a broad spectrum of response to HbF induction (17).

There are nearly 50 years of experience with the use of HU in humans, including 30 years in SCD. Remarkably, little is known about its transport, metabolism, distribution, clearance and the interindividual variability in the treatment response. Thus, all mechanisms of action for HbF remain incompletely understood; therefore, the use of HU in SCD remains empiric (18).

Predictability factors associated to HU response for HbF expression are higher baseline HbF values, higher with blood cell count (WBC), and absolute reticulocyte count (ARC). Genetic predictors of treatment are even more limited: the absence of CAR haplotype was beneficial in MSH and the presence of the Xmn1  $\gamma$ -globin promoter polymorphism was not required for a robust effect among Indian patients. Nevertheless, these parameters do not accurately predict the degree of HbF induction by HU in a determinate patient (14,18–20).

Analysis of sibling pairs demonstrated that the degree of HbF induction by HU has a solid heritable component, indicating that genetic modifiers could have a strong effect on HU response (14,21).

Although HU has been associated with an increased risk of leukemia in some patients with myeloproliferative disorders, the mutagenic, teratogenic and carcinogenic potential of HU has not been established in SCD and the long-term safety in this patient population remains incompletely defined. Studies demonstrated significantly greater genotoxicity in SCD patients treated with HU. In other studies, the HU treatment was not associated with any significant increases in genotoxicity (22–26).

Elucidation of specific genetic modifiers associated with HbF induction may detect the reasons for this phenotypic variability and provide new understandings into the HU mechanisms of action. Thus, we can avoid unnecessary exposure to this drug for patients that we previously know are not good responders.

According the best of our knowledge, there are no studies in Southern Brazilian populations with SCA that aimed to study the DNA polymorphisms of the Xmn1-HBG2; rs7482144, rs4671393 and rs11886868 at the oncogene BCL11A; rs9399137 and rs9402686 at the intergenic region HMIP-2 and its relationship with the expression of HbF and with hematological parameters pre and post-HU treatment.

## **Material and Methods**

Eligible patients were of SS hemoglobinopathy, in regular treatment with HU for at least 6 months in the Sickle Cell Center of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre. Patients were excluded if they did not have good adhesion to HU therapy, if they were in treatment with other drugs that stimulate the synthesis of HbF (e.g. erythropoietin) or if they had received blood transfusion 3 months before entry in the study.

Written informed consents from patients and from parents (in the case of children) were obtained according the Institutional Review Board at Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

From initial population of 180 sickle cell anemia patients in regular treatment in the Sickle Cell Center of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, 121 patients (56% females) fulfilled the eligible criteria, aged 1 year and 9 months to 54 years (mean  $19 \pm 14$ ) years, in treatment with doses of HU ranged 8,6 - 42,8 (mean  $23 \pm 7,6$ ) mg/kg/day, during 6- 254 (mean  $102 \pm 67$ ) months.

The HbF was measured by capillary electrophoresis using equipment Sebia CAPILLARYS 2 Flex Piercing<sup>TM</sup> (Cap 2FP; Sebia, Lisses, France).

Genetic variants were selected from 6 validated SNPS at the 3 main HbF modifier loci, which according previous evidence in the literature have strong correlation with HbF synthesis (5,9,27,28).

They were genotyped by Taq-Man<sup>TM</sup> procedure (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical analyses were performed using statistical software (SPSS, version 18.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Multiple linear regression was used to test for association of genetic markers with HbF, hematological parameters and response to HU.

To correct for the skew of the HbF percentage at baseline, the values were log<sub>10</sub>-transformed to create a nearly normally distributed quantitative trait.

An overall significance level of 0.05 was set for statistical analyses.

## **RESULTS**

### **Influence of the genetic modifier variants on hematological parameters**

In this study we did not detect a correlation between HbF levels at baseline, final HbF and delta HbF (HbF baseline – HbF final) with the hematological parameters: Hbt, mean

corpuscular volume (MCV), cellular hemoglobin concentration mean (CHCM), white blood cell count (WBC), absolute neutrophil count (ANC) and absolute reticulocyte count (ARC) at the baseline (before started with HU) and at the end of the study (after a period of exposure to HU).

We did not detected any correlation between the 3 loci studied on the hematological parameters before and after the exposure to HU.

The recent study published by Mtatiro et al. is the only one in the literature that addressed the impact of the SNPs Xmn1-HBG2, HMIP-2 (rs66650371 and rs9389269) and the BCL11A (rs11886868) on HbF levels and on hematological parameters in patients with sickle cell disease (SCD). They studied HbSS and HbS/  $\beta^0$  thalassemia, n= 726, aged 5 or older from Tanzania. In which HbF levels were positively correlated with Hbt, MCV and mean corpuscular hemoglobin (MCH), and negatively with WBC and platelet counts (all  $P < 0.0001$ ). Subsequently they assessed the contribution of the three HbF modifier loci and detected diverse effects, including a reduction in anemia, leukocytosis, and thrombocytosis associated with certain HbF promoting alleles. The presence of the  $\_T'$  allele at Xmn1-HBG2 led to a significant increase in hemoglobin ( $P= 9.8 \times 10^{-3}$ ) but no changes in cellular hemoglobin content. Xmn1-HBG2  $\_T'$  also had a weak effect decreasing WBC ( $P = 0.06$ ) and platelet ( $P= 0.06$ ) counts. The BCL11A variant (rs11886868- $\_C'$ ) increases hemoglobin ( $P= 2 \times 10^{-3}$ ) and one of the HMIP-2 variants decreases WBC values selectively ( $P= 2.3 \times 10^{-4}$ ) (29).

Improved response to HU on HbF levels at the end of our study was correlated with a higher HbF at baseline ( $r=0,40$ ;  $P < 0,001$ ), a higher Hbt at baseline ( $r=0,26$ ;  $P = 0,005$ ) and a larger time of exposure to HU ( $r = -0,30$ ;  $P = 0,001$ ).

### **Influence of genetic modifier variants on fetal hemoglobin**

All the polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium.

HbF levels at baseline were strongly influenced only by the 2 HMIP-2 variant tested (rs9399137 and rs9402686) after multiple linear regression analysis adjusted for age on start of HU and gender. The allele C of the SNP HMIP-2 rs9399137 explained 5.7% ( $B=0,59$ ;  $P=0,01$ ) of the total variation of baseline HbF while allele A of the SNP HMPI-2 rs9402686 explained 8,4% ( $B=0,62$ ;  $P=0,002$ ) of this trait.

The other 4 SNPs studied didn't influence the variation of baseline HbF.

Final HbF variation, at the end of the study, after the exposition to HU, was influenced by the SNPs of BCL11A only, according to the multiple linear regression analysis adjusted at the start of HU for age, gender, baseline HbF, baseline total Hb and time to exposition to HU.

Allele T of SNP BCL11A rs1427407 explained 7.6% ( $B = 5,99$ ;  $P = 0,017$ ) of HbF final variation, allele A of the SNP BCL11A rs4671393 explained 4.5% ( $B=5,25$ ;  $P= 0,025$ ) of this variation and allele C of the SNP BCL11A rs11886868 explained a variation of 4.3% ( $B = 4,05$ ;  $P = 0,029$ ) of this trait.

When we analyzed the variation of final HbF minus baseline HbF (delta HbF), we observed that allele T of the BCL11A rs1427407 had a strong influence, and accounted for 7.6% ( $B = 0,29$ ;  $P = 0,035$ ) of the variation in the delta HbF, after multiple linear regression analysis adjusted for age at the start of HU, gender, baseline HbF and time of exposure to HU.

We didn't find the genotype GG of the SNP Xmn1-HBG2. The most frequent was AA (120 patients) and 1 patient had the genotype AG.

**Table 1. Fetal hemoglobin association results for SNPs BCL11A, HMIP-2, and Xmn1-HBG2 loci in the SCA patients**

	EA/OA	MAF (allele)	Baseline HbF <sup>†</sup>				Final HbF <sup>‡</sup>				Delta HbF <sup>¥</sup>			
			B	EP	P	% Var	B	EP	P	% Var	B	EP	P	% Var
<b>BCL11A</b>														
rs1427407	T / G	0,09 (T)	0,24	0,13	0,060	1,9%	5,99	2,47	<b>0,017</b>	7,6%	0,29	0,14	<b>0,035</b>	7,6%
rs4671393	A / G	0,10 (A)	0,13	0,12	0,286	0,1%	5,25	2,32	<b>0,025</b>	4,5%	0,28	0,13	<b>0,036</b>	0,0%
rs11886868	C / T	0,18 (C)	0,01	0,10	0,939	0,0%	4,05	1,82	<b>0,029</b>	4,3%	0,17	0,10	0,100	4,3%
<b>HMIP-2</b>														
rs9399137	C / T	0,03 (C)	0,59	0,23	<b>0,010</b>	5,7%	1,09	4,65	0,814	1,6%	-0,05	0,26	0,860	3,6%
rs9402686	A / G	0,03 (A)	0,62	0,20	<b>0,002</b>	8,4%	2,66	4,14	0,521	3,7%	0,07	0,23	0,762	4,2%
<b>Xmn1-HBG2</b>														
	A / G		0,55	0,40	0,171	2,1%	1,33	7,90	0,867	0,6%	0,20	0,44	0,652	0,6%

MAF: minor frequency allele; EA: effect allele; OA: other allele; B: multiple linear regression estimated coefficient; EP: standard error

<sup>†</sup> adjusted for age on start of HU, gender

<sup>‡</sup> adjusted for age on start of HU, gender, baseline HbF, baseline total Hb, time of treatment

<sup>¥</sup> adjusted for age on start of HU, gender, baseline HbF, time of treatment

## DISCUSSION

Clinical heterogeneity of SCA patients represents a challenge in medical management. The clinical course of SCA is extremely heterogeneous. Some patients are asymptomatic, especially those with higher HbF levels, and others are characterized by severe pain, acute clinical events and early mortality. Because of these complications, SCA patients have increased mortality as compared with normal population (4).

All the risk factors underlying these complications are not well defined, but it is well documented that higher expression of HbF in SCA patients reduces mortality and morbidity of this hemoglobinopathy (4,30,31).

Thus, interindividual variation in HbF levels is likely one of the main modifiers that contribute to the clinical heterogeneity observed in SCA, and is the strongest predictor of disease severity (9).

The observation on natural history of SCA have led to efforts to discover drugs that stimulate HbF to treat patients with SCA and other  $\beta$ -hemoglobinopathy. Since pharmacological induction of HbF is clinically beneficial, experimental and clinical work in this area has led to the use of HU, an agent that was found empirically to increase the HbF expression (32,33).

Currently, HU is the only FDA-approved pharmacologic treatment for induction of HbF in adult patients with SCA, and is approved by the European Medicines Agency for both children and adults with SCA. HU significantly reduces pain and acute chest episodes, the need for blood transfusions and hospitalizations, and most importantly reduces mortality in adults and in children (34–37).

While HU has been suspected of disease-modulating effects outside of HbF induction, the majority of its benefits are directly related to the amount of HbF produced in response to the drug (14,38,39).

There is an inverse relationship between levels of drug-induced HbF and the incidence of pain episodes, number of hospitalizations and overall mortality (14,34,40).

Several clinical studies have shown that interindividual hematological response to HU treatment are highly variable, with indices of HbF ranging from 10% to 40, even for patients on similar dosing and compliant regimens (14,41–44).

HbF is a heritable complex trait. Recently, genetic association studies have isolated several SNPs that are reproducibly associated with variation in the expression of HbF into adulthood in healthy European populations and patients with SCD and thalassemia (8,9,27,28,45). These SNPs are located in gene BCL11A on chromosome 2, in the HMIP intergenic region on chromosome 6 and in the Xmn1-HBG2 locus on chromosome 11 (5,6,9,46–50).

Up to the present time, only limited reports have examined relationships between the impact of HU-induced HbF and specific genetic polymorphism in patients with sickle cell disease (14,51–53).

This is the first report, to the best of our knowledge, that addressed the correlation between DNA polymorphisms of the Xmn1-HBG2; rs7482144, rs4671393 and rs11886868 at the oncogene BCL11A; rs9399137 and rs9402686 at the intergenic region HMIP-2 and their relationship with the expression of HbF and hematological parameters pre and post-HU treatment in SCA patients.

Previous efforts to identify predictors associated with final HbF produced in response to HU have identified higher baseline HbF values, higher WBC and higher ARC as important factors to better response to HU (42,53,54).



The best response to HU on HbF levels at the end of our study was correlated with a higher HbF at baseline ( $r=0,40$ ;  $P < 0,001$ ), a higher Hbt at baseline ( $r=0,26$ ;  $P = 0,005$ ) and a larger time of exposure to HU ( $r = -0,30$ ;  $P = 0,001$ ). The findings regarding the influence of baseline levels of HbF and time of exposure to HU were the same as the studies of Ware et al. and Zimmermann et al. (42,54). The maximum tolerated dose did not influence the response to HU in our study.

Understanding the general effect that these SNPs have on blood cell production and parameters will be important in defining their biological roles and developing new target therapies (9).

We tested correlations between these 6 SNPs and several blood cell parameters (WBC, ANC, MCV, MCHC, Hbt, ARC), at baseline and at the end of the study, pre and post treatment with HU.

The recent study published by Mtatiro et al. is the only one in the literature that addressed the impact of the SNPs Xmn1-HBG2, HMIP-2 (rs66650371 and rs9389269) and the BCL11A(rs11886868) on HbF levels and on hematological parameters in patients with sickle cell disease (SCD) not exposed to HU. They studied HbSS and HbS/ $\beta^0$  thalassemia, n 5726, patients aged 5 or older, from Tanzania. HbF levels were positively correlated with Hbt, MCV and mean corpuscular hemoglobin (MCH), and negatively with WBC and platelet counts (all  $P < 0.0001$ ). Subsequently they assessed the contribution of the three HbF modifier loci and detected diverse effects, including a reduction in anemia, leukocytosis, and thrombocytosis associated with certain HbF promoting alleles. The presence of the  $\underline{\underline{T}}$  allele at Xmn1-HBG2 led to a significant increase in hemoglobin ( $P= 9.8 \times 10^{-3}$ ) but no changes in cellular hemoglobin content. Xmn1-HBG2  $\underline{\underline{T}}$  also has a weak effect decreasing WBC ( $P = 0.06$ ) and platelet ( $P= 0.06$ ) counts. The BCL11A variant (rs11886868- $\underline{\underline{C}}$ ) increases

hemoglobin ( $P= 2 \times 10^{-3}$ ) and one of the HMIP-2 variants decreased WBC values selectively ( $P= 2.3 \times 10^{-4}$ ) (29).

In our study the lack of correlation between the 6 SNPs tested and the blood cell parameters, pre and post-HU treatment, in contrast with the conclusions from Mtatiro et al., is unclear and could be explained by the sample size.

We found only the genotypes AA (n=120) and AG (n=1) of the Xmn1-HBG2 polymorphism. In contrast, the studies with SCA patients from the Brazilian states of Para (55) and Pernambuco (9) showed that the genotype GG is more frequent in these populations. This difference could be explained when we analyze the data on the African slave trade in Brazil. These data indicate that the slaves from Southern Brazil were more from Bantu-speaking Africa (Angola, Congo and Mozambique). The slaves from Northeastern Brazil (Pernambuco) were more from West-Central Africa and the slaves from the North (Para) were brought to Brazil directly from Atlantic West Africa.

Thus, this information must be the explanation for the observed difference in the distribution of the Xmn1-HBG2 genotype in our patients and those of Para and Pernambuco (9,55).

Cardoso et al. studied the polymorphisms Xmn1-HBG2, BCL11A rs4671393 and HMIP rs28384513, rs489544 e rs9399137 and their correlation on HbF expression in 167 patients with SCA from the state of Para, in northern Brazil. Their results showed that high levels of HbF were primarily influenced by alleles of BCL11A (rs4671393) and HMIP (rs4895441) loci, and to a lesser extent by Xmn1-HBG2. The SNPs rs4671393 and rs4895441 explained 10% and 9.2%, respectively, of the variation in HbF levels, while 4.1% of trait variation was explained by Xmn1-HBG2 (55).

Similar results regarding the SNP BCL11A rs4671393 were observed in Brazilian and African American (9), and Tanzanian and African-British (46) SCA patients, responding for around 10% of the variation in HbF.

In an Indian study of 240 individuals with SCD and 60 with the sickle cell trait, genotyping was performed for the BCL11A rs11886868 and rs34211119; HMIP rs9399137, rs189600565, rs7776196, rs34778774, and rs53293029; Xmn1-HBG2 polymorphism rs7482144; and -68C > T HBD promoter polymorphism. All the 3 QTLs were associated with HbF levels in Indian patients with SCD. The highest difference was seen in the Xmn1-HBG2 single nucleotide polymorphism, which accounted for 11% of trait variance, the BCL11A rs11886868 for 3.65%, whereas the HMIP rs9399137 for 3.8%. This study indicated that the BCL11A, HMIP, Xmn1-HBG2 region were associated with increased HbF levels in Indian SCD patients (56).

In our study, only the SNPs HMIP-2 rs9399137 and rs9402686 were correlated with variation of the baseline HbF (5, 7% and 8, 4%, respectively) ( $P=0.01$  and  $P=0.002$ ).

We didn't find correlation with the variation on baseline HbF between the other polymorphisms: rs1427407, rs4671393 and rs11886868 of the gene BCL11A and Xmn1-HBG2.

In the HUSTLE study (Hydroxyurea Study of Long-Term Effects), it was shown that 5 polymorphisms of the gene BCL11A (rs1427407, rs766432, rs4671393, rs7557939 and rs11886868), the polymorphism Xmn1-HBG2 and 1 polymorphism of the gene HBE (rs7130110), had an impact on baseline HbF, but did not have an influence on the MTD of HU and on final HbF after the treatment with HU (18)

Green et al. in a multi-site observational analysis examined the polymorphisms associated in children at the baseline and induced by HU therapy. In this study, the authors demonstrated significant association with 6 polymorphisms of the oncogene BCL11A

(rs1427407, rs766432, rs11886868, rs4671393, rs7557939, rs10184550) and the loci Xmn1-HBG2 and epsilon globin: HBE (rs7130110), with an additive attributive variance from these loci of 23%. Among a subset of children on HU, baseline HbF levels explained 33% of the variance in induced levels. The variant in HBE accounted for an additional 13% of the variance in induced levels, while variants in HBB and BCL11A loci did not contribute beyond baseline levels (53).

In our pioneer study, we demonstrated that the SNPs of BCL11A rs1427407, rs4671393 and rs11886868 accounted for an additional variance beyond baseline levels of 7, 6%, 4, 5%, and 3% respectively ( $P=0,017$ ;  $P=0,025$  and  $P=0,029$ ), after HU treatment.

When we analyzed the delta HbF (final HbF – baseline HbF) we showed that an influence of SNP rs1427407 accounted for 7.6% ( $B = 0, 29$ ;  $P = 0,035$ ) of this variation.

Taken together, these preliminary data suggested that patients with SNP BCL11A rs1427407 have more probability to respond favorably to HU regarding the induction of HbF.

Genetic studies examining larger populations with SCA on HU and with unusual responders are needed to better assess the specific variants in these 3 loci studied and other genetic loci responsible for HbF expression and the variability of HU response.

A better understanding of genetic polymorphisms that control HbF levels will shed light on the molecular mechanisms that modulate HbF expression and on the etiology of the clinical heterogeneity perceived in SCA patients. Such identifications might at last find innovative drug targets for novel treatments of SCA patients.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all of the patients and their families, who participated in this study.

We acknowledge the contributions of Vivien Sheehan, PhD and Jonathan M. Flanagan, PhD, Texas Children's Hematology Center, Department of Pediatrics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas for the polymorphism genotyping.

## REFERENCES

1. Silla LM. [Sickle cell disease: a serious and unknown problem of public health in Brazil]. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 1999 Jan [cited 2015 Jun 24];75(3):145–6.
2. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* [Internet]. 2010 Dec;376(9757):2018–31. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067361061029X>
3. Garner C, Tatu T, Game L, Cardon LR, Spector TD, Farrall M, et al. A candidate gene study of F cell levels in sibling pairs using a joint linkage and association analysis. *GeneScreen* [Internet]. 2000 May;1(1):9–14. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1466-9218.2000.00001.x>
4. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994;330(23):1639–44.
5. Galarneau G, Palmer CD, Sankaran VG, Orkin SH, Hirschhorn JN, Lettre G. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nat Genet* [Internet]. 2010 Dec;42(12):1049–51. Available from: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/ng.707>
6. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: New insights emerging from genomics and clinical implications. *Hum Mol Genet*. 2009;18(R2).
7. Bauer DE, Kamran SC, Lessard S, Xu J, Fujiwara Y, Lin C, et al. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. *Science* [Internet]. 2013;342(6155):253–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4018826&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Menzel S, Garner C, Gut I, Matsuda F, Yamaguchi M, Heath S, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nat Genet*. 2007;39(10):1197–9.
9. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MAC, Araújo AS, Uda M, Sanna S, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(33):11869–74.
10. Ware RE. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2010. p. 5300–11.
11. Lopes de Castro Lobo C, Pinto JFC, Nascimento EM, Moura PG, Cardoso GP, Hankins JS. The effect of hydroxycarbamide therapy on survival of children with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2013;161(6):852–60.

12. Voskaridou E, Christoulas D, Bilalis A, Plata E, Varvagiannis K, Stamatopoulos G, et al. The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: Results of a 17-year, single-center trial (LaSHS). *Blood*. 2010;115(12):2354–63.
13. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert S V, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *The New England journal of medicine*. 1995.
14. Sheehan VA, Crosby JR, Sabo A, Mortier NA, Howard TA, Muzny DM, et al. Whole exome sequencing identifies novel genes for fetal hemoglobin response to hydroxyurea in children with sickle cell anemia. *PLoS One*. 2014;9(10):e110740.
15. Wang WC, Ware RE, Miller ST, Iyer R V., Casella JF, Minniti CP, et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: A multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). *Lancet*. 2011;377(9778):1663–72.
16. Strouse JJ, Lanzkron S, Beach MC, Haywood C, Park H, Witkop C, et al. Hydroxyurea for Sickle Cell Disease: A Systematic Review for Efficacy and Toxicity in Children. *Pediatrics* [Internet]. 2008 Dec 1;122(6):1332–42. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2008-0441>
17. Silva DG, Belini Junior E, Carrocini GC, Torres L, Ricci Júnior O, Lobo CL, et al. Genetic and biochemical markers of hydroxyurea therapeutic response in sickle cell anemia. *BMC Med Genet* [Internet]. 2013;14(1):108. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/14/108>
18. Ware RE, Despotovic JM, Mortier NA, Flanagan JM, He J, Smeltzer MP, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia. *Blood* [Internet]. 2011 Nov 3;118(18):4985–91. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-07-364190>
19. 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.
20. Italia K, Jain D, Gattani S, Jijina F, Nadkarni A, Sawant P, et al. Hydroxyurea in sickle cell disease—A study of clinico-pharmacological efficacy in the Indian haplotype. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. 2009 Jan;42(1):25–31. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979608001769>
21. Steinberg MH, Voskaridou E, Kutlar A, Loukopoulos D, Koshy M, Ballas SK, et al. Concordant fetal hemoglobin response to hydroxyurea in siblings with sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2003;72(2):121–6.
22. Friedrisch JR, Prá D, Maluf SW, Bittar CM, Mergener M, Pollo T, et al. DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. *Mutat Res*. 2008;649(1-2):213–20.

23. Maluf S, Prá D, Friedrisch JR, Bittar C, da Silva MAL, Henriques JA, et al. Length of treatment and dose as determinants of mutagenicity in sickle cell disease patients treated with hydroxyurea. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009;27(1):26–9.
24. Flanagan JM, Howard TA, Mortier N, Avlasevich SL, Smeltzer MP, Wu S, et al. Assessment of genotoxicity associated with hydroxyurea therapy in children with sickle cell anemia. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 2010 Apr;698(1-2):38–42. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571810000835>
25. McGann PT, Flanagan JM, Howard TA, Dertinger SD, He J, Kulharya AS, et al. Genotoxicity associated with hydroxyurea exposure in infants with sickle cell anemia: Results from the BABY-HUG phase III clinical trial. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2012 Aug;59(2):254–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/psc.23365>
26. McGann PT, Howard TA, Flanagan JM, Lahti JM, Ware RE. Chromosome damage and repair in children with sickle cell anaemia and long-term hydroxycarbamide exposure. *Br J Haematol* [Internet]. 2011 Jul;154(1):134–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2011.08698.x>
27. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*. 2008;322(5909):1839–42.
28. Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):1620–5.
29. Mtatiro SN, Makani J, Mmbando B, Thein SL, Menzel S, Cox SE. Genetic variants at HbF-modifier loci moderate anemia and leukocytosis in sickle cell disease in Tanzania. *Am J Hematol* [Internet]. 2015 Jan;90(1):E1–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajh.23859>
30. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*. 1994;84(2):643–9.
31. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1997;337(11):762–9.
32. Platt OS. Hydroxyurea for the Treatment of Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2008 Mar 27;358(13):1362–9. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMct0708272>
33. Nathan DG, Oski FA, Orkin SH. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood, Volume 2 [Internet]. Philadelphia: Saunders; 2003 [cited 2015 Jun 24]. 852 p. Available from: <https://books.google.com/books?id=SW8vnQEACAAJ&pgis=1>



34. Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003.
35. Voskaridou E, Christoulas D, Bilalis A, Plata E, Varvagiannis K, Stamatopoulos G, et al. The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17-year, single-center trial (LaSHS). *Blood* [Internet]. 2010 Mar 25;115(12):2354–63. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2009-05-221333>
36. Lopes de Castro Lobo C, Pinto JFC, Nascimento EM, Moura PG, Cardoso GP, Hankins JS. The effect of hydroxycarbamide therapy on survival of children with sickle cell disease. *Br J Haematol* [Internet]. 2013 Jun;161(6):852–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.12323>
37. Silva-Pinto AC, Angulo IL, Brunetta DM, Neves FIR, Bassi SC, Santis GC De, et al. Clinical and hematological effects of hydroxyurea therapy in sickle cell patients: a single-center experience in Brazil. *Sao Paulo Med J* [Internet]. 2013;131(4):238–43. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-31802013000400238&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-31802013000400238&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
38. Lebensburger J, Johnson SM, Askenazi DJ, Rozario NL, Howard TH, Hilliard LM. Protective role of hemoglobin and fetal hemoglobin in early kidney disease for children with sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*. 2011. p. 430–2.
39. Lebensburger JD, Pestina TI, Ware RE, Boyd KL, Persons DA. Hydroxyurea therapy requires HbF induction for clinical benefit in a sickle cell mouse model. *Haematologica* [Internet]. 2010 Sep 1;95(9):1599–603. Available from: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2010.023325>
40. Smith WR, Ballas SK, McCarthy WF, Bauserman RL, Swerdlow PS, Steinberg MH, et al. The Association Between Hydroxyurea Treatment and Pain Intensity, Analgesic Use, and Utilization in Ambulatory Sickle Cell Anemia Patients. *Pain Med*. 2011;12(5):697–705.
41. Ware RE, Aygun B. Advances in the use of hydroxyurea. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;62–9.
42. Zimmerman SA, Schultz WH, Davis JS, Pickens C V., Mortier NA, Howard TA, et al. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. *Blood*. 2004;103(6):2039–45.
43. Kinney TR, Helms RW, O'Branski EE, Ohene-Frempong K, Wang W, Daeschner C, et al. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial. *Pediatric Hydroxyurea Group*. *Blood*. 1999.
44. Maier-Redelsperger M, de Montalembert M, Flahault A, Neonato MG, Ducrocq R, Masson MP, et al. Fetal hemoglobin and F-cell responses to long-term hydroxyurea

- treatment in young sickle cell patients. The French Study Group on Sickle Cell Disease. *Blood*. 1998;91(12):4472–9.
45. Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(27):11346–51.
  46. Makani J, Menzel S, Nkya S, Cox SE, Drasar E, Soka D, et al. Genetics of fetal hemoglobin in Tanzanian and British patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2011;117(4):1390–2.
  47. Sebastiani P, Wang L, Nolan VG, Melista E, Ma Q, Baldwin CT, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Bayesian modeling of genetic associations. *Am J Hematol*. 2008;83(3):189–95.
  48. Bhatnagar P, Purvis S, Barron-Casella E, DeBaun MR, Casella JF, Arking DE, et al. Genome-wide association study identifies genetic variants influencing F-cell levels in sickle-cell patients. *J Hum Genet*. 2011;56(4):316–23.
  49. Sedgewick AE, Timofeev N, Sebastiani P, So JCC, Ma ESK, Chan LC, et al. BCL11A is a major HbF quantitative trait locus in three different populations with  $\beta$ -hemoglobinopathies. *Blood Cells, Mol Dis*. 2008;41(3):255–8.
  50. Bae HT, Baldwin CT, Sebastiani P, Telen MJ, Ashley-Koch A, Garrett M, et al. Meta-analysis of 2040 sickle cell anemia patients: BCL11A and HBS1L-MYB are the major modifiers of HbF in African Americans. *Blood*. 2012. p. 1961–2.
  51. Kumkhaek C, Taylor JG, Zhu J, Hoppe C, Kato GJ, Rodgers GP. Fetal haemoglobin response to hydroxycarbamide treatment and sar1a promoter polymorphisms in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2008 Apr;141(2):254–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2008.07045.x>
  52. Ma Q, Wyszynski DF, Farrell JJ, Kutlar A, Farrer LA, Baldwin CT, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic determinants of response to hydroxyurea. *Pharmacogenomics J*. 2007;7(6):386–94.
  53. Green NS, Ender KL, Pashankar F, Driscoll C, Giardina PJ, Mullen CA, et al. Candidate Sequence Variants and Fetal Hemoglobin in Children with Sickle Cell Disease Treated with Hydroxyurea. Covas DT, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Feb 7;8(2):e55709. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0055709>
  54. Ware RE, Eggleston B, Redding-Lallinger R, Wang WC, Smith-Whitley K, Daeschner C, et al. Predictors of fetal hemoglobin response in children with sickle cell anemia receiving hydroxyurea therapy. *Blood*. 2002.
  55. Cardoso GL, Diniz IG, Martins da Silva ANL, Cunha DA, da Silva Junior JS, Carvalho Uchôa CT, et al. DNA polymorphisms at BCL11A, HBS1L-MYB and Xmn1-HBG2 site loci associated with fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia patients from

- Northern Brazil. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. 2014 Dec;53(4):176–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979614000734>
56. Bhanushali AA, Patra PK, Pradhan S, Khanka SS, Singh S, Das BR. Genetics of fetal hemoglobin in tribal Indian patients with sickle cell anemia. *Transl Res* [Internet]. 2015 Jun;165(6):696–703. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931524415000055>

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há que avaliar os dados deste estudo com cautela, uma vez que a coorte analisada foi pequena, embora tenhamos utilizando SNPs robustamente associados à expressão da HbF e validados previamente.

Este trabalho foi pioneiro no que diz respeito a determinar o impacto dos polimorfismos estudados na resposta ao tratamento com HU em portadores de AF.

Novos estudos com populações mais expressivas de portadores de AF serão necessários para validar os dados ora revelados.

Uma melhor compreensão da regulação gênica da resposta à HU poderá nos ajudar a estabelecer marcadores precoces de gravidade da doença, avançar na compreensão quanto à variabilidade de resposta à HU, evitando a exposição desnecessária de indivíduos que, previamente selecionados, não vão responder favoravelmente a este fármaco, de potencial teratogênico, carcinogênico e mutagênico. Esses avanços também terão implicações no aconselhamento familiar desse grupo de indivíduos.

Uma vez consolidados esses conhecimentos, poderemos definir critérios mais claros para indicação de abordagens terapêuticas mais contundentes, como o transplante alogeneico de medula óssea e desenvolver novos alvos terapêuticos por meio da terapia gênica.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A possibilidade da descrição genética do ser humano talvez represente o último estágio de uma busca de autoconhecimento que teve início há vários séculos.

Os estudos dos polimorfismos genéticos encontram-se na vanguarda da medicina atual e podem ser de extremo benefício na AF, principalmente, sob dois aspectos principais. Um desses aspectos é o de selecionar grupos de indivíduos com maior gravidade clínica e aqueles que têm melhor resposta a determinadas medidas terapêuticas, como o tratamento com HU na AF, por exemplo. Outro aspecto é o fato de que os próprios polimorfismos podem ser alvos terapêuticos. A seleção de polimorfismos desfavoráveis e o silenciamento de sua expressão gênica, por meio da terapia gênica, são um promissor caminho terapêutico a ser trilhado no futuro.

**10. ANEXOS**

## ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**SERVIÇO DE HEMATOLOGIA CLÍNICA**  
**LABORATÓRIO DE CULTURA E ANÁLISE MOLECULAR DE CÉLULAS**  
**HUMANAS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Pesquisador Responsável:** Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla

**Projeto 10585:** Variabilidade da Expressão da Hemoglobina Fetal em Indivíduos com Anemia Falciforme Tratados e Não Tratados com Hidroxiuréia e sua Correlação com o Polimorfismo dos Genes BCL11A, HBS1L-MYB,  $\beta$ -globina, OR51B2, OR51B5 e OR51B6

Prezado paciente,

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo identificar a presença de características herdadas de seus pais e antepassados que possam nos trazer conhecimentos sobre a anemia falciforme.

Pacientes com anemia falciforme que possuem as células vermelhas do sangue com características iguais aquelas apresentadas quando estava no ventre da mãe, chamada hemoglobina fetal, têm mais proteção contra as manifestações da doença.

Um dos motivos pelos quais tratamos os pacientes com anemia falciforme com a medicação hidroxiureia é justamente tentarmos fazer com que o paciente produza a hemoglobina fetal, que protege o indivíduo contra as manifestações graves da anemia falciforme.

Temos uma experiência de aproximadamente 15 anos com o uso de hidroxiureia no nosso grupo de pacientes com anemia falciforme e o que podemos observar é que há um grande número de pacientes que não aumentam a

taxa de produção da hemoglobina fetal. As razões genéticas para que isso ocorra não são totalmente esclarecidas e são motivo de inúmeros estudos na comunidade científica mundial.

Este projeto de pesquisa pretende estudar algumas dessas características herdadas que influenciam nas diferentes formas de aparecimento da hemoglobina fetal tanto em pacientes com anemia falciforme que estão usando hidroxiureia quanto em pacientes que não estão sendo submetidos ao tratamento com esse fármaco.

Os resultados deste estudo poderão auxiliar na melhoria do tratamento no grupo de bons respondedores e evitar a exposição desnecessária à hidroxiureia no grupo de indivíduos que já sabidamente, de antemão, não vão responder adequadamente a esse fármaco.

Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos por meio de entrevistas com as famílias, análise dos prontuários e uma coleta de aproximadamente duas colheres de sopa de sangue da veia. Esse procedimento provoca um desconforto semelhante ao de uma coleta de sangue para exames de rotina, ou seja, a dor da picada da agulha e um pequeno hematoma (cor roxa) na pele.

O material coletado será utilizado para caracterização para fins de pesquisa de polimorfismos genéticos (características herdadas de seus pais e antepassados), sendo garantido o anonimato das informações obtidas, reservando ao paciente ou familiar acesso a elas.

Se houver alguma despesa decorrente de deslocamento para realização da coleta, bem como alimentação, essa será ressarcida ao participante pelo grupo de pesquisa.

É importante ressaltar que você poderá recusar ou retirar o consentimento em qualquer fase do estudo sem prejuízo a seu atendimento na instituição.

Pelo presente Consentimento Pós- Informação, declaro que fui informado, de forma clara e detalhada sobre o presente Projeto de Pesquisa.

Fui igualmente informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, da liberdade de não participar do estudo, da segurança, do anonimato e do caráter confidencial das informações.

Este documento é fornecido em duas vias, sendo uma do paciente e outra do pesquisador.



Responde por este estudo a Pesquisadora Responsável Profa. Dra. Silla – (51) 33598850 e o Pesquisador executor, Dr. João Ricardo Friedrisch (51) 99958314, no Serviço de Hematologia Clínica do HCPA.

Autorizo o armazenamento do material coletado (DNA) para pesquisas futuras. A nova pesquisa será submetida novamente ao Comitê de Ética em Pesquisa e um novo consentimento pós- informação deverá ser assinado.

**S I M**

**N Ã O**

-----/-----/-----

Nome do Paciente

-----/-----/-----

Assinatura do Paciente ou Responsável Legal

-----/-----/-----

Nome e Assinatura do Pesquisador