



ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



POLITÉCNICO
DE LISBOA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Variabilidade genética, expressão da
hemoglobina fetal e severidade da doença em crianças
com anemia das células falciformes

Ana Paula Faleiro Ramos

Orientador: Doutor Rui Miguel Brito (ESTeSL)

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2021

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Variabilidade genética, expressão da
hemoglobina fetal e severidade da doença em crianças
com anemia das células falciformes

Ana Paula Faleiro Ramos

Orientador: Doutor Rui Miguel Brito (ESTeSL)

Júri: Presidente: Doutora Sofia Narciso (ESTeSL)

Arguente: Doutor Manuel Bicho (FMUL)

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2021



Mestrado em
Tecnologias
Moleculares
em Saúde

Variabilidade genética, expressão da
hemoglobina fetal e severidade da doença em crianças com
anemia das células falciformes

Ana Paula
Ramos

2021

“A lição é a seguinte: nunca desista, nunca, nunca, nunca. Em nada. Grande ou pequeno, importante ou não. Nunca desista. Nunca se renda à força, nunca se renda ao poder aparentemente esmagador do inimigo!!”

Winston Churchill

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar e me ensinar que para tudo existe seu tempo e que preciso confiar. Agradecer aos meus pais que nunca largaram minha mão. Não tem distância que separe nossos corações, PAI e MÃE vocês são meu porto seguro. Obrigada por me fazer ser quem sou e me compreender! Minha irmã que me apóia e me enlouquece e meu cunhado, que me fizeram a tia mais feliz do mundo, Maria Clara, Isaac e Maya meus amores! Todos os meus familiares, tias e tios, primos, sobrinhos, comadres, são muitos, próximos ou distantes sempre me apoiando nessa aventura. Meus amigos de uma vida toda, e amigos que mesmo recentes, tenho a sensação que estiveram sempre em minha vida. Obrigada Marina Lobato e todos do HEMOMINAS que me ensinaram amar a investigação, ao meu Coordenador Miguel Brito pela confiança, apoio, disponibilidade e acolhimento, Catarina, Mariana, Vera e Professora Carina Silva, não sei o que seria de mim sem vocês! Obrigada pelas palavras de apoio Professora Helena Soares, elas foram muitos importantes. Meus filhos, JOÃO PAULO e ISABELA, que são minha vida, o ar que eu respiro, meu coração fora do corpo e meu impulso todas as manhãs para buscar a cada dia o melhor. E por último, mas não menos importante: O amor da minha vida, CAIUBY, nesses últimos 18 anos você esteve de mãos dadas comigo, onde quer que a vida nos leve, eu estarei com você! Obrigada pelo amor incondicional, por cuidar de mim e da nossa família! Te amo!

RESUMO

A anemia falciforme é a doença hematológica genética mais comum, sendo diagnosticada em aproximadamente 305.000 nascimentos por ano e com milhões de pessoas afetadas em todo o mundo. É um importante contributo para a mortalidade de menores de 5 anos nos países de baixa renda.

Nesse estudo pretendemos analisar a associação de cinco SNPs com 21 aspectos clínicos e hematológicos da SCD e a resposta à HU, em população de crianças angolana. Para isso, selecionamos SNPs, encontrados em genes em trans (rs11759328 (ARHGAP), rs333 (CCR5), rs10793902 (ASS1), rs9483947 (MAP3K5) e rs836729 (Tox)) e estão relacionados com a gravidade da doença, aos níveis de HbF, a resposta a HU e na modulação da expressão de genes da globina.

Na associação entre os genótipos e os fenótipos para o SNP rs10793902 (ASS1) encontramos ligeiro aumento da bilirrubina indireta e uma diminuição dos episódios de AVCs, e para o SNP rs9483947 (MAP3K5) um aumento significativo de LDH. Nossos achados não demonstraram associação dos SNPs com a resposta à HU. Sendo essas associações relevantes para o prognóstico da doença, consideramos que essa descoberta possa abrir caminho para futuras investigações, principalmente em outros biomarcadores que regulam a expressão dos genes onde encontram-se esses SNPs. Para verificar a associação dos SNPs e a resposta a HU, consideramos importante o aumento da população tratada, o período entre a administração do fármaco e a colheita da amostra. Com base nesses novos achados e sua importância, podemos buscar de novos biomarcadores que beneficiem milhares de pacientes afetados pela SCD.

ABSTRACT

Sickle cell anemia is the most common genetic hematologic disease, being diagnosed in approximately 305,000 births per year and with millions of people affected worldwide. It is an important contributor to under-5 mortality in low-income countries.

In this study, we intend to analyze the association of five SNPs with 21 clinical and hematological aspects of SCD and the response to HU, in a population of Angolan children. For this, we selected SNPs, found in trans genes (rs11759328 (ARHGAP), rs333 (CCR5), rs10793902 (ASS1), rs9483947 (MAP3K5) and rs836729 (Tox)) and are related to disease severity, to HbF levels, the response to HU and in the modulation of the expression of globin genes.

In the association between genotypes and phenotypes for SNP rs10793902 (ASS1) we found a slight increase in indirect bilirubin and a decrease in stroke episodes, and for SNP rs9483947 (MAP3K5) a significant increase in LDH. Our findings showed no association of SNPs with the response to HU. As these associations are relevant for the prognosis of the disease, we believe that this discovery may open the way for future investigations, especially in other biomarkers that regulate the expression of genes where these SNPs are found. To verify the association of SNPs and the

response to HU, we consider important the increase in the population treated, the period between drug administration and sample collection. Based on these new findings and their importance, we can look for new biomarkers that benefit thousands of patients affected by SCD.

Palavras-chave: Anemia Falciforme, Hemoglobinopatias, Genotipagem, PCR, SNPs.

KeyWords: Sickle Cell Anemia, Hemoglobinopathies, Genotyping, PCR, SNPs.

Índice

1.	Enquadramento Teórico.....	1
1.1.	Anemia Falciforme	1
1.2.	Diagnóstico da SCD	8
1.3.	Terapêutica da SCD	8
1.4.	SNPs.....	12
1.4.1.	Gene ARHGAP18.....	13
1.4.2.	Gene CCR5.....	13
1.4.3.	Gene ASS1	14
1.4.4.	Gene MAP3K5	14
1.4.5.	Gene Tox	15
2.	Objetivo	16
3.	Metodologia	17
3.1.	Amostras	17
3.2.	Extração DNA	17
3.3.	Genotipagem	17
3.3.1.	Genotipagem ARHGAP rs11759328	17
3.3.2.	Genotipagem CCR5 rs333	18
3.3.3.	Genotipagem ASS1 rs10793902	18
3.3.4.	Genotipagem MAP3K5 rs9483947	19
3.3.5.	Genotipagem TOX rs 826729.....	19
4.	Análise Estatística.....	21
5.	Resultados.....	22
5.1.	Gene ASS1.....	23
5.1.1.	Análise do Equilíbrio de Hardy-Heinberg.....	23
5.1.2.	Análise Frequência Alélica e Genotípica	23
5.1.3.	Análise da Associação GenótiposX Fenótipos da SCD	24
5.2.	Gene MAP3K5.....	25
5.2.1.	Análise do Equilíbrio de Hardy-Heinberg.....	25
5.2.2.	Análise Frequência Alélica	26
5.2.3.	Análise da Associação Genótipos X Fenótipos	27
5.3.	Gene Tox.....	27
5.3.1.	Análise do Equilíbrio de Hardy-Heinberg.....	28
5.3.2.	Análise Frequência Alélica e Genotípica	28
5.3.3.	Análise da Associação Genótipos X Fenótipos	29

5.4.	Gene CCR5	30
5.4.1.	Análise do Equilíbrio de Hardy-Heinberg.....	31
5.4.2.	Análise Freqüência Alélica e Genotípica	31
5.4.3.	Análise da Associação Genótipos X Fenótipos	32
5.4.4.	Análise da Associação Genótipos X Resposta HU	Erro! Marcador não definido.
5.5.	Gene ARHGAP	32
5.6.	Análise da Associação Genótipos X Resposta HU	35
5.6.1.	ASS1 X Resposta HU	35
5.6.2.	MAP3K5X Resposta HU.....	36
5.6.3.	Tox X Resposta HU.....	36
5.6.4.	CCR5 X Resposta HU.....	36
6.	Discussão	37
7.	Conclusão.....	44
8.	Bibliografia.....	45
9.	Anexo	51
9.1.	Tabela de Curva de Fusão	51

Índice de Tabela

Tabela-5.1.2.1.....	23
Tabela-5.1.2.2.....	24
Tabela-5.1.3.1.....	25
Tabela-5.2.2.1.....	26
Tabela-5.2.2.2.....	26
Tabela-5.2.3.1.....	27
Tabela-5.3.2.1.....	28
Tabela-5.3.2.2.....	29
Tabela-5.3.3.1.....	30
Tabela-5.4.2.1.....	32
Tabela-5.4.2.2.....	32
Tabela-5.6.1.....	36
Tabela-6.1.....	38

Índice de Gráficos

Gráfico-5.1:	22
Gráfico-5.2:	22
Gráfico-5.3:	22
Gráfico-5.1.2.1	24
Gráfico-5.2.2.1	27
Gráfico-5.3.2.1	29
Gráfico 5.4.3	31
Gráfico 5.5.1	34
Gráfico 5.5.2	35

Índice de Figuras

Fig-1	1
Fig-2	2
Fig-3	3
Fig-4	3
Fig-5	6
Fig-6	9
Fig- 5.1.1.....	23
Fig- 5.2.1.....	25
Fig- 5.3.1.....	28
Fig- 5.4.1.....	30
Fig- 5.4.2.....	31

Abreviaturas

aCGH- Hibridização Comparativa de Genomas de Matriz.
ARHGAP18- Proteína 18 Ativadora de Rho GTPase
AVC- Acidente Vascular Cerebral
BCL11A- Linfoma de Células B / Leucemia 11A
Ca 2+ - Cálcio
CCR5 - Receptor de Quimiocina Associado à Célula Th1
CE- Eletroforese Capilar
CVS- Vilosidade Coriônica
DNA- Ácido Desoxirribonucleico
ERK- Quinase Regulada por Sinal Extracelular
FDA- Food and Drug Administration EUA
Fe (II)- Ferro
HbA- Hemoglobina A
HbA2- Hemoglobina A2
HbF- Hemoglobina Fetal
HBG1/HBG2- Gene Gamma Globulina
HbH- Hemoglobina H
HbS / HPFH- Mutações Associadas à HbS com Persistência Hereditária de HbF
HbS- Hemoglobina Falciforme
HIV1- Vírus da Imunodeficiência Humana
HMG-box- Caixa de Grupo de Alta Mobilidade
HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HU- Hidroxiurea
IEF- Focagem Isoelétrica
IL -10- Interleucina 10
IL-4- Interleucina 4
K- Potássio
MCH- Conteúdo Médio Hb Corpuscular
MCV- Volume Médio da Célula
MEK- Proteína Quinase Ativada por Mitogênio
MIP-1^a- Proteína Inflamatória de Macrófagos
miRNA- Micro Ácido Ribonucleico
MPLA- Amplificação de Sondas Dependente de Ligação Multiplex
NFAT- Fator Nuclear de Células T Ativadas
NO- Óxido Nítrico
OF- Fragilidade Osmótica de Tubo Único
PCR- Reação em Cadeia da Polimerase
PGD- Diagnóstico Genético Pré-Implantação
RBC- Contagem de Glóbulos Vermelhos
RCM- Morfologia dos Glóbulos Vermelhos
RDW- Amplitude de Distribuição de Volume de Glóbulos Vermelhos
RNA- Ácido Ribonucleico
SCD- Anemia Falciforme
SNP- Polimorfismo Nucleotídeo Único
STR- Repetição de Sequências Curtas em Tandem
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa
TST- Células T Tumor-Específicas
ZnPP- Protoporfirina Zinco

1. Enquadramento Teórico

1.1. Anemia Falciforme

A anemia das células falciformes, anemia falciforme, doença das células falciformes ou também chamada drepanocitose (SCD) é a doença hematológica genética mais comum, tem sido diagnosticada em aproximadamente 305.000 nascimentos por ano e com milhões de pessoas atualmente afetadas em todo o mundo (1). É um importante contributo para a mortalidade de menores de 5 anos nos países de baixa renda, particularmente na África subsaariana(2).

O fenótipo clínico da anemia das células falciformes foi observado pela primeira vez em 1670 em uma família africana(3) e estava presente na África por pelo menos cinco mil anos e conhecido por muitos nomes em muitas línguas tribais(4), mas somente em 1910, James B. Herrick M.D, documenta em um estudo das Índias Ocidentais, realizado na cidade de Chicago, um paciente de origem africana com sintomas que desconhecia, ficando assim a doença das células falciformes conhecida no cenário médico ocidental como uma sendo uma doença “estranha” ou como Herrick a chamou, “uma nova doença desconhecida”(5).(Fig-1)

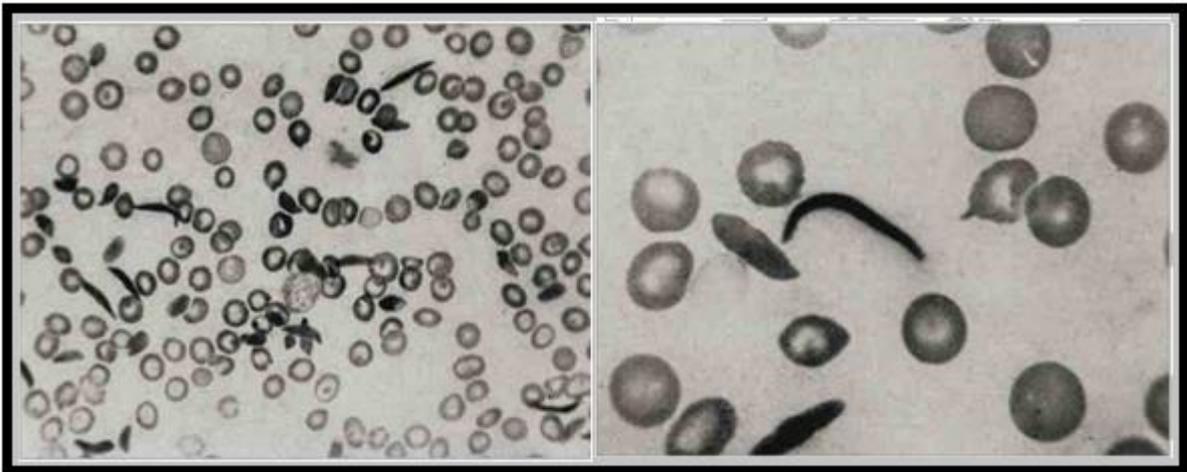


Fig-1: “Essas microfotografias mostram as formas alongadas peculiares dos corpúsculos vermelhos. As formas de sombra ocasionais são vistas com alguns vermelhos nucleados. ... O número relativamente grande de corpúsculos brancos e de normoblastos não é mostrado por estescamos específicos”. Adaptado de (5)

A aparência falciforme dos eritrócitos intrigava os médicos, pois relatos de casos e artigos analíticos com características clínicas detalhadas desse distúrbio envolviam sempre pessoas afro descendentes, ficando a doença conhecida como “doença negra”(6). Em 1927, foi relatado o mecanismo de formação de foice, quando Hahn e Gillespie observaram que a hemoglobina falciforme em seu estado desoxigenado assumia uma forma característica “foice” (Fig - 2), que dá então o nome ao distúrbio(7).

Somente em 1949, foi descoberta a natureza molecular da SCD, quando Linus Pauling demonstrou pela primeira vez que a SCD é uma doença molecular, que pode ser causada pela anormalidade da hemoglobina no sangue do paciente(8).

Em 1957, Vernon Ingram relatou que no fragmento N-terminal da cadeia β globina, o ácido glutâmico, um resíduo carregado negativamente, na sexta posição, é substituído por valina, um resíduo neutro(9).

Dando origem à variante genética da hemoglobina humana, a hemoglobinafalciforme HbS.

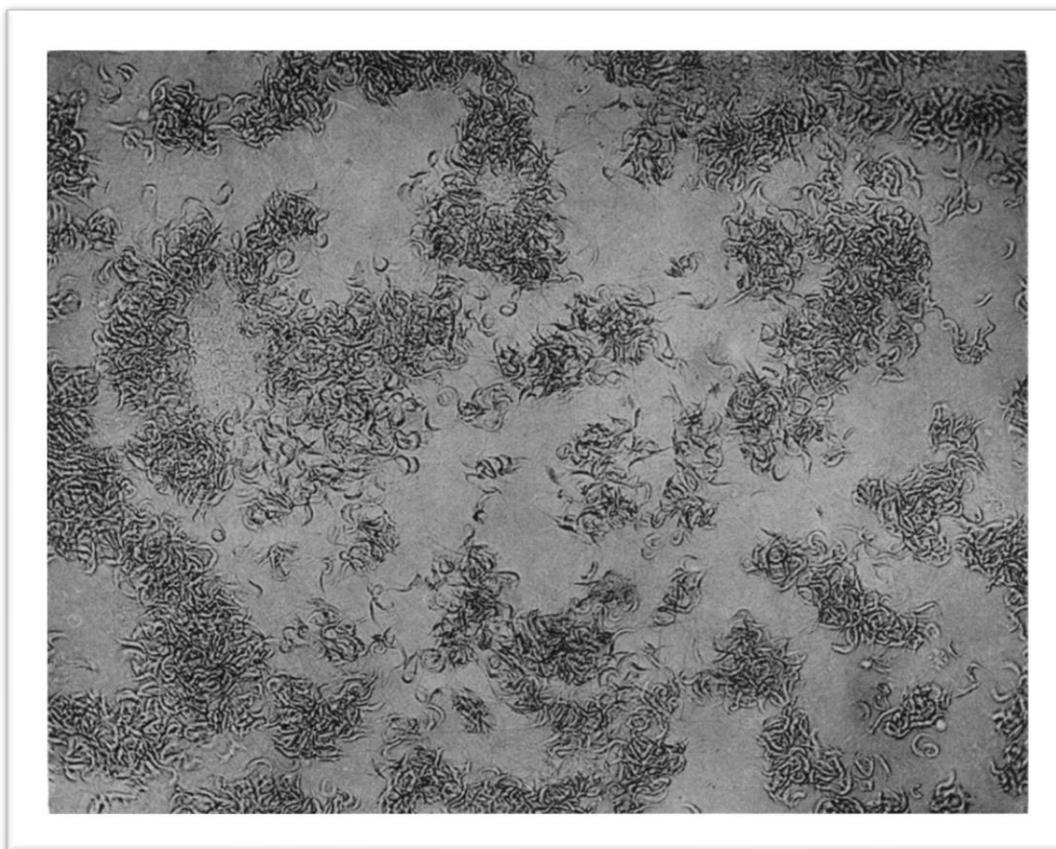


Fig-2: Uma cultura de esfregaço húmida do sangue do paciente quarenta e oito horas depois preparação. Praticamente todos os corpúsculos vermelhos têm forma de foice. A aparente colonização dos corpúsculos ao redor de áreas granulares não foi relatada anteriormente. (Adaptada de (7))

O eritrócito adulto normal contém três formas de hemoglobina (Hb): HbA (96%), HbA2 (2% a 3%) e HbF (<2%). A hemoglobina humana normal é uma proteína tetramérica ($\alpha_2\beta_2$) composta por duas cadeias α , codificadas por dois genes no cromossoma 16, e duas cadeias β , codificadas no cromossoma 11(Fig- 3).

Globinas : GENE

■ Locus da α -globina e locus da β - globina

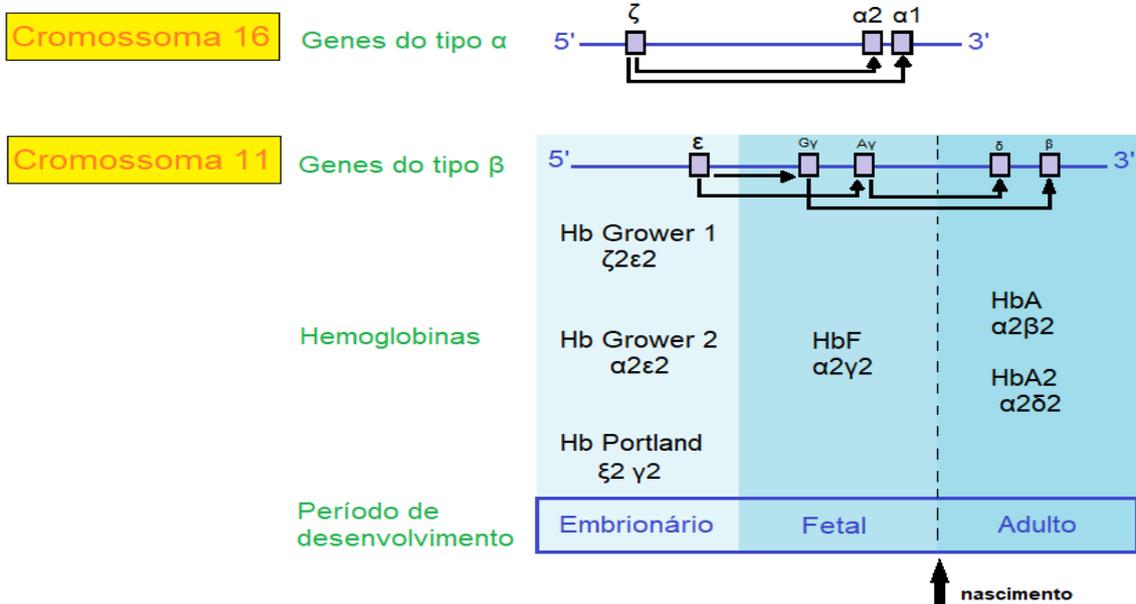


Fig-3: Genes da globina e a mudança da expressão gênica durante o desenvolvimento. (FONTE PRÓPRIA)

Cada uma das cadeias de globina é ligada não covalentemente a um núcleo de porfirina, onde Ferro (Fe (II)) é coordenado no centro do anel. A associação e dissociação sistemática de oxigênio com Fe (II) ajustada à pressão parcial de oxigênio dissolvido no sangue permite que a molécula de hemoglobina seja um transportador de oxigênio dos pulmões para os tecidos (Fig-4).

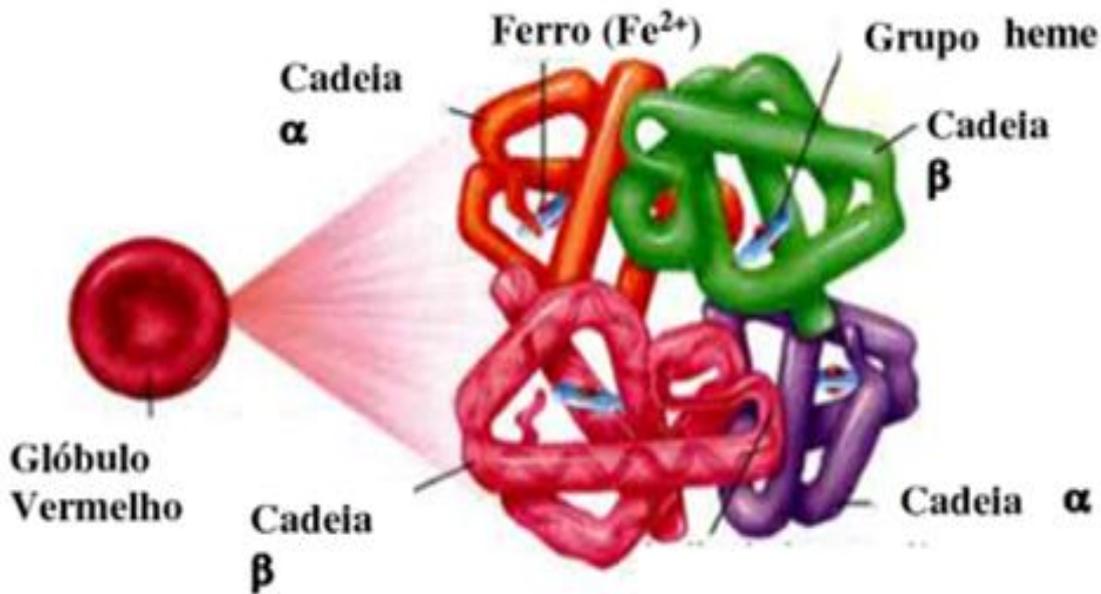


Fig-4: Composição da Hemoglobina (Imagem adaptada de <https://blog.ekincare.com/2016/07/20/hemoglobin-levels-and-its-significance/>)

A hemoglobina varia na sua composição das cadeias consoante o estado evolutivo do ser humano. Assim, no embrião, a hemoglobina pode ser Hb Gower I ($\xi_2 \epsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2 \epsilon_2$) e Hb Portland ($\xi_2 \gamma_2$), passando hemoglobina fetal (HbF), no feto, com a composição HbF ($\alpha_2 \gamma_2$) e finalizando, na normalidade em HbA1 ($\alpha_2 \beta_2$) ou HbA2 ($\alpha_2 \delta_2$)(10).

A HbF é composta por duas cadeias α e duas cadeias γ ($\alpha_2\gamma_2$). Os genes para as cadeias β , δ e γ estão intimamente ligados uns aos outros no cromossoma 11. Variações nas hemoglobinas acarretam hemoglobinopatias, que são distúrbios genéticos humanos em que as mutações nos genes da globina levam à substituição, deleção ou inserção de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas, resultando assim em variantes da hemoglobina.

Existem 1346 variantes de hemoglobina descobertas até o momento, onde 315 variantes são relatadas com distúrbios funcionais, como afinidade diferencial para ligação de oxigênio, tetrâmeros instáveis de hemoglobina ou formação de metahemoglobina(3).

As variantes de hemoglobinas, ou hemoglobinopatias, são o resultante de mutações que afetam os genes responsáveis pela síntese das cadeias de globina que formam a hemoglobina e que podem ser divididas em:

- Alterações quantitativas: com diminuição ou mesmo ausência de uma ou mais cadeias de globina e originando a talassemia;
- Alterações qualitativas: alterações estas que originam variantes estruturais das hemoglobinas, nomeadamente as HbS, C, D ou outras.

As hemoglobinopatias são as alterações monogênicas mais comuns encontradas, atingindo cerca de 6% da população mundial e são transmitidas de pais para filhos de forma autossômica recessiva em sua maioria (11).

A maioria das variantes da hemoglobina é rara e sem manifestação clínica, mas algumas são responsáveis por doenças genéticas e uma delas é a SCD.

A hemoglobina falciforme (HbS) é um exemplo de uma variante genética da hemoglobina humana, em que o ácido glutâmico na sexta posição da cadeia β da globina é substituído por valina, um resíduo de aminoácido hidrofóbico. Este é um exemplo de mutação missense, onde uma única mudança de nucleotídeo de A para T em GAG, codão de ácido glutâmico, para GTG, codão de valina, resulta em uma substituição de ácido glutâmico na sexta posição do β cadeia de globina para valina. Esta substituição de aminoácidos presentes na HbS irá modificar a carga elétrica da molécula, pelo fato de o ácido glutâmico apresentar carga negativa e a valina ser um aminoácido de carga neutra. ASCD é causada pela polimerização da HbS seguida de sua precipitação no interior das hemácias,

resultando em alteração na morfologia das hemácias sob baixas pressões parciais de oxigênio(3).

No estado heterozigótico da SCD, um indivíduo carrega uma cópia de um alelo normal de β globina e um alelo falciforme.

Os eritrócitos desses indivíduos contêm tanto a hemoglobina humana adulta normal HbA quanto a HbS, assim esses indivíduos não sofrem de SCD. No estado homozigótico os indivíduos contêm duas cópias do alelo falciforme, produzindo somente HbS, onde suas moléculas de hemoglobina serão compostas com ambas as cadeias β como cadeias mutantes β S e HbA.

A fisiopatologia da doença está resumida em várias revisões abrangentes. Mas não é mais válida a explicação simplista de que as células falciformes são as únicas responsáveis por causar bloqueio vascular ou oclusão de vasos, uma vez que os eritrócitos assumem o formato das células falciformes após desoxigenação da célula(12).

Enquanto a vaso-oclusão é central para a compreensão da doença e pode causar hipoxemia local com conseqüente lesão direta do tecido e inflamação, a mutação de um único gene observada na doença falciforme leva a alterações fisiológicas complexas. Essas mudanças resultam nas manifestações clínicas protéicas da doença. Agora reconhecemos a SCD como uma condição não apenas caracterizada por vaso-oclusão, anemia e hemólise, mas também com inflamação aumentada, hipercoagulabilidade, aumento do estresse oxidativo e metabolismo defeituoso da arginina(13).

A SCD é também uma vasculopatia e apresenta a presença de múltiplas deficiências nutricionais e de micronutrientes que afetam adversamente o paciente. Na desoxigenação, a hemoglobina falciforme é insolúvel e sofre polimerização e agregação dos polímeros em fibras de hemoglobina que produzem falciformação(14).

Assumindo uma forma rígida, as células podem ficar presas na micro circulação, enquanto os tecidos a jusante desse bloqueio não recebem o fluxo sanguíneo e oxigênio, sofrendo danos isquêmicos ou morte. A privação do fluxo sanguíneo leva a necrose tecidual ou lesão de perfusão.

Essas células falciformes também são propensas à desidratação devido a anormalidades no canal de Gardos (O canal Gardos, é um canal de efluxo de K^+ ativado pelo Ca^{2+} , desempenha um papel importante na regulação do volume sanguíneo)(Fig-5)(15).

Essas células são caracterizadas pela ativação anormal das vias de sinalização intracelular e têm menos óxido nítrico e conteúdo de trifosfato de adenosina(16).

As células falciformes possuem menor capacidade antioxidante. Como resultado, muitos componentes celulares podem ter danos oxidativos(17).

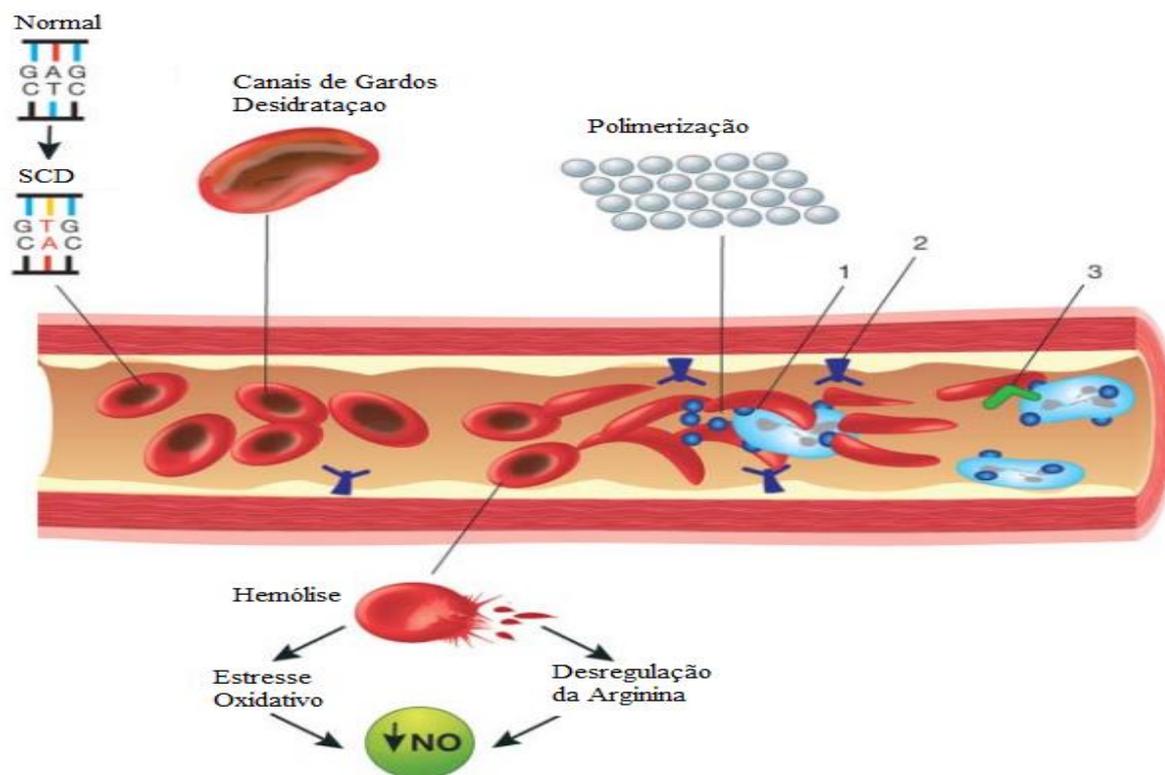


Fig-5: Representação esquemática da fisiopatologia (em parte) da SCD. Uma mutação genética única (GAG → GTG e CTC → CAC) resulta em uma hemoglobina defeituosa que quando exposta à desoxigenação (representada na metade direita do diagrama) polimeriza (canto superior direito do diagrama), resultando na formação de células falciformes. A oclusão de vaso pode então ocorrer. O distúrbio também é caracterizado por propriedades adesivas anormais das células falciformes; as células mononucleares do sangue periférico (representadas em azul claro; mostradas como as células grandes sob as células falciformes) e as plaquetas (representadas em azul escuro; mostradas como as formas circulares escuras nas células mononucleares) aderem aos eritrócitos falciformes. Esse agregado é marcado como 1. As células mononucleares têm receptores (por exemplo, CD44 [marcado 2 e representados em verde escuro na superfície celular]) que se ligam a ligantes, como P-selectina (marcado 2 e mostrado na superfície endotelial), que são regulados. Os eritrócitos falciformes também podem aderir diretamente ao endotélio. Também podem ocorrer movimentos anormais ou rolar e desacelerar as células no sangue. Essas alterações resultam em danos endoteliais. As células vermelhas falciformes também ficam desidratadas como resultado de anormalidades no canal de Gardos. A hemólise contribui para o estresse oxidativo e desregulação do metabolismo da arginina, os quais levam a uma diminuição do óxido nítrico (NO) que, por sua vez, contribui para a vasculopatia que caracteriza a SCD. (Adaptada de (18))

Os danos oxidativos às proteínas da membrana celular e a agregação de proteínas ao longo da superfície interna das membranas plasmáticas podem levar a anormalidades intracelulares na superfície dos eritrócitos; essas mudanças levam a um aumento da exposição à fosfatidilserina e à formação de micropartículas que permitem atividade procoagulante pelo próprio eritrócito(19).

Com a hemólise, a hemoglobina livre é liberada no plasma, atuando como eliminador de óxido nítrico(20).

Como a atividade da arginase-1, necessária para a produção de óxido nítrico, é mais baixa na célula falciforme do que no eritrócito normal, o óxido nítrico não pode ser prontamente refeito, especialmente em indivíduos hemolisam em altas taxas. Outro resultado da hemólise é a formação de espécies reativas ao oxigênio por reações que envolvem hemoglobina livre(21).

Também é verificada que a desregulação do microRNA ocorre na célula falciforme, pequenas moléculas de RNA não codificantes funcionam para silenciar o RNA e ocorre a regulação pós-transcricional da expressão gênica(21). Fazendo com que, a expressão gênica seja anormal durante a eritropoiese.

As propriedades adesivas anormais do eritrócito falciforme podem levar à ativação de receptores de adesão, como os da molécula de adesão intercelular(22). Da mesma forma, a molécula de adesão celular basal da glicoproteína (grupo sanguíneo luterano), uma molécula de adesão transmembranar encontrada no endotélio vascular, interage com a integrina alfa 4 beta 1 única expressa nas células falciformes, mediando sua adesão ao endotélio(23). Como resultado verifica-se as interações anormais entre eritrócitos, leucócitos, plaquetas, endotélio e proteínas da matriz extracelular.

Essas interações célula-célula anormais levam a um processo constante de interações aderentes, direcionando a expressão celular endotelial de proteínas procoagulantes. A proteína quinase ERK 1/2 ativada por mitogênio e a quinase a montante responsável por sua ativação, MEK 1/2, são constitutivamente ativadas nos eritrócitos falciformes, levando ao aumento da adesão(24). As selectinas E-selectina e P-selectina são reguladas na SCD e também mediar a adesão, com o grau de adesão dos eritrócitos correlacionando-se com maior gravidade da doença(25).

Além dessas alterações, a célula que contém hemoglobina falciforme é mais rígida do que um eritrócito normal estaria em circulação. Essa forma anormal persiste mesmo quando a célula assume uma forma ovóide aparentemente normal. Os eritrócitos falciformes morfologicamente normais são tão propensos a aderência quanto as células em forma de foice(26).

A inflamação também é fundamental para o início da vaso oclusão(27). Mesmo em estado estacionário, os leucócitos e as plaquetas são ativados e os marcadores da inflamação são elevados. Várias citocinas inflamatórias, como interleucina (IL) -10, IL-4, proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1a) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), são elevadas mesmo na linha de base(28).

A enzima sintética leucotrieno 5-lipoxigenase ativa células monocíticas e endoteliais, levando à produção de leucotrienos que são aumentados no estado estacionário, na medida em que níveis elevados se correlacionam com uma maior taxa de eventos dolorosos.

As células T killer naturais invariantes também são ativadas e estão presentes em maior número. Como exemplo de sua importância, elas podem desempenhar um papel na patogênese da lesão de isquemia / reperfusão na doença falciforme(29).

1.2. Diagnóstico da SCD

Como métodos de primeira linha no diagnóstico temos:

- Hemograma completo; onde são avaliados: MCV (volume médio da célula), RBC (contagem de Glóbulos Vermelhos), MCH (conteúdo médio Hb corpuscular), RDW (amplitude de distribuição do volume de glóbulos vermelhos), Quantificação de Hb A2.
- Análise do padrão da hemoglobina onde deve ser utilizados pelo menos 2 métodos, a eletroforese de Hb a pH 8,6 usando membrana de acetato de celulose, a eletroforese de hemoglobina a pH 6,0 usando gel de agarose ácida ou ágar citrato, focagem isoelétrica (IEF), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou eletroforese capilar (CE) .

Vários métodos podem ser úteis no suporte ao diagnóstico em casos que não têm um diagnóstico claro com os métodos de primeira linha descritos sendo esses métodos descritos como de segunda linha.

- Como métodos de segunda linha no diagnóstico temos:
 - Medição / avaliação da morfologia dos glóbulos vermelhos (RCM), reticulócitos e células F, inclusões de HbH, o teste de fragilidade osmótica de tubo único (OF), síntese da cadeia da globina, separação da cadeia da globina, testes de solubilidade ou foice para o teste de Hb S, formação de corpos de Heinz e medição de uma curva de dissociação de oxigênio e a espectrometria de massa.
 - Existindo dúvidas em casos raros ou resultados inconclusivos nas análises de primeira e segunda linha, é então indicado métodos para análise de DNA das baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) sendo esses.
 - PCR em tempo real, RFLP-PCR e microarrays.
 - Para detectar e / ou caracterizar deleções, a análise de Southern blot foi amplamente substituída por métodos baseados em PCR, incluindo gap-PCR, amplificação de sondas dependente de ligação multiplex (MLPA) hibridização comparativa de genomas de matriz (aCGH)(30).Após o diagnóstico deve se traçar estratégias de tratamento para o paciente.

1.3. Terapêutica da SCD

Atualmente, a abordagem de tratamento mais comumente aplicada é a administração de transfusões de hemácias (PRC), seguidas de quelação de ferro e, quando apropriado, por esplenectomia.

As opções atuais de tratamento concentram-se amplamente nos melhores cuidados de suporte, existindo apenas duas drogas aprovadas pela Food and Drug Administration dos EUA (FDA): a Hidroxiuréia (HU) e o Voxelotor(31).

A HU, ou hidroxycarbamida, é um análogo hidroxilado da uréia, sintetizado pela primeira vez em 1869 por Dresler e Stein e posteriormente testado em um modelo experimental em 1928 por Rosenthal, que sugeriu seu potencial mielossupressor(32).

A HU, devido ao seu potencial anti-falciforme, foi aprovado em 1999 pela FDA para o tratamento da SCD. Os benefícios da HU em pacientes com SCD têm sido atribuídos ao aumento dos níveis de HbF, que inibe a polimerização da variante HbS (Fig- 6), levando a uma redução na incidência de crises dolorosas, bem como à diminuição das taxas de hospitalização, síndrome do aumento do peito, transfusão de sangue e mortalidade(32).

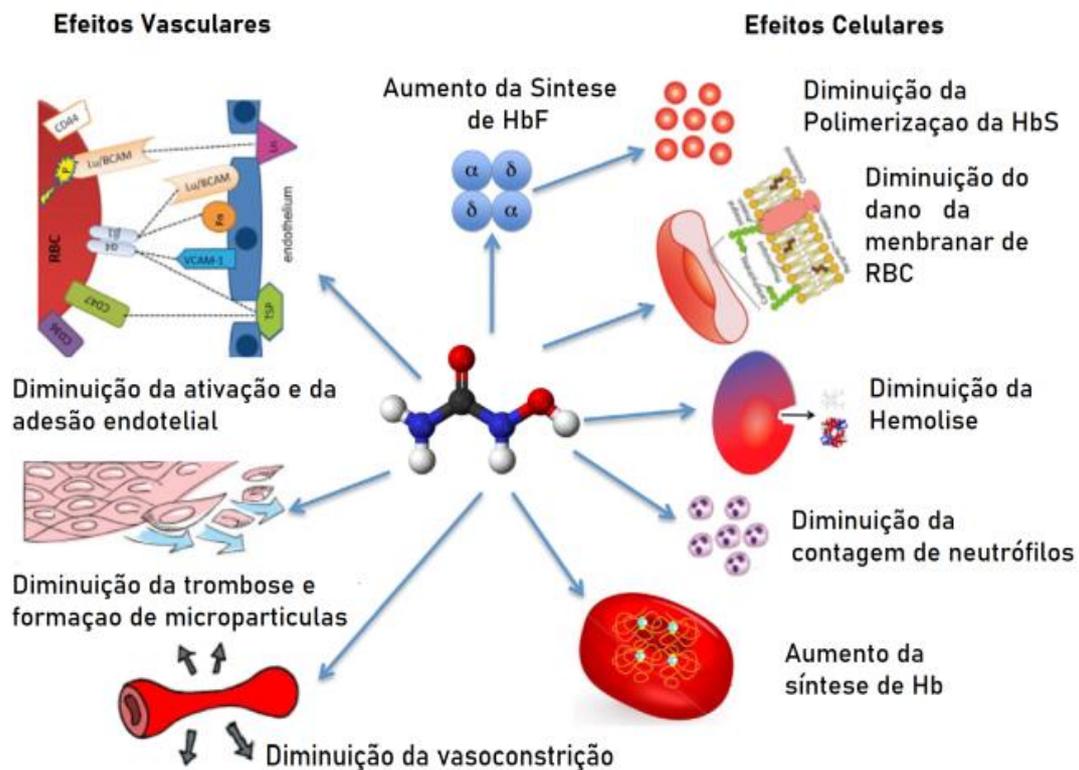


Fig-6: Os possíveis efeitos celulares e vasculares da HU (adaptada de (33))

A HU também está associada ao aumento da hemoglobina e ao volume médio de células vermelhas; redução da contagem de glóbulos brancos, plaquetas e reticulócitos; além de reduzir a expressão de moléculas de adesão e liberação de óxido nítrico (NO). No entanto, o aumento dos níveis de HbF e a resposta clínica induzida pela HU têm sido variáveis entre diferentes pacientes, necessitando de dosagens elevadas e aumento da toxicidade(34).

Diferenças nas respostas podem ser atribuídas a vários fatores, incluindo fatores fisiológicos, socioeconômicos e ambientais. O aumento de HbF induzido por HU não é distribuído igualmente entre os glóbulos vermelhos; caso contrário, seria ainda mais

eficaz. A eficácia clínica bem estabelecida da HU juntamente com evidências convincentes das mutações associadas à HbS com persistência hereditária de HbF (HbS / HPFH) que ocorrem naturalmente demonstram que concentrações mais altas de HbF podem aliviar as complicações clínicas da SCD. Isso motivou esforços farmacológicos e genéticos para encontrar abordagens que induzam a produção de HbF em todos os glóbulos vermelhos(31).

No entanto, fatores genéticos têm sido considerados alguns dos determinantes mais importantes das variações na resposta e tolerância à terapia medicamentosa. Recentemente, estudos em pacientes com SCD mostraram que, além das variações genômicas no gene da β -globina (HbB), variantes nos genes modificadores fora do HbB também estão significativamente associadas ao aumento dos níveis de HbF e, conseqüentemente, à resposta ao tratamento com HU(35).

Vários estudos realizados anteriormente demonstraram o papel das variantes genômicas dos genes na modulação da produção de HbF. Esses genes não estão ligados ao agrupamento de genes da b-globina humana e parecem mostrar uma correlação com a resposta à terapia com HU em pacientes adultos, que exibem níveis elevados de HbF e, portanto, melhoram seu fenótipo clínico. No entanto, nem todos os pacientes respondem igualmente bem à terapia com HU, como indicado por seus níveis elevados de HbF e, como resultado, eles não podem melhorar seu fenótipo clínico(36).

Voxelotor, segundo medicamento que inibe a falciformação, foi aprovado pelo FDA em novembro de 2019. O voxelotor liga-se preferencialmente à conformação R de HbS não polimerizante de alta afinidade com oxigênio, reduzindo a concentração da conformação T polimerizante a cada pressão de oxigênio. As moléculas de HbS ligadas ao medicamento estão em uma conformação que fornece muito pouco oxigênio aos tecidos, em uma doença caracterizada pela diminuição da oferta de oxigênio. Portanto, embora os pacientes em uso de voxelotor apresentem aumentos modestos nas concentrações de hemoglobina, isso não é necessariamente uma indicação de diminuição da anemia, porque o aumento na hemoglobina é quase o mesmo que a concentração da hemoglobina ligada ao medicamento e que não fornece oxigênio. Além disso, não há evidências atuais de uma diminuição da frequência de crises de células falciformes, e os efeitos no dano e na sobrevivência de órgãos ainda não foram determinados. O aumento da hemoglobina é acompanhado por marcadores reduzidos de ruptura de glóbulos vermelhos, indicando redução da falciforme(37).

O crizanlizumab, um anticorpo que bloqueia a molécula de adesão P-selectina, que é expressa pelos glóbulos vermelhos, diminuindo a adesão dos glóbulos vermelhos ao endotélio vascular, o que reduz a frequência de crises das células falciformes, foi aprovado pelo FDA em novembro de 2019(37).

Outras formas de tratamento ou possível “cura” da SCD consiste na correção da SCD ao nível molecular, e pode ser alcançada substituindo completamente a medula óssea

do paciente, onde são produzidos glóbulos vermelhos, por medula óssea que contém células-tronco produtoras de glóbulos vermelhos com o gene correto da β -globina(HbB) de um indivíduo não afetado. Esse procedimento de transplante alogênico provou ser curativo em aproximadamente 95% dos receptores, principalmente em crianças(38).

Os resultados de transplante alogênico forneceram prova de conceito de que a manipulação genética das células-tronco da medula óssea defeituosa pode ser igualmente terapêutica. Como tal, abordagens genéticas para manipular as células-tronco do próprio paciente e depois transplantá-las de volta para o paciente (transplante autólogo) foram vigorosamente adotadas. A integração permanente de um gene HbB terapêutico, juntamente com os principais elementos reguladores no DNA das células-tronco, tornou-se possível com o desenvolvimento de um sistema de transferência de genes usando um HIV1 modificado. Esse sistema permitiu a expressão sustentada e regulada endogenamente da b-globina terapêutica, suficiente para reverter a SCD em pacientes. Usando a mesma abordagem, o Zynteglo, uma terapia genética que consiste no transplante autólogo de células-tronco manipuladas com um vetor lentiviral para expressar um gene HBB, obteve recentemente aprovação da Comissão Européia para adolescentes e adultos jovens dependentes de transfusão com o distúrbio relacionado à SCD (31).

O progresso nas abordagens genéticas voltadas para a produção de HbF foi acelerado pelo progresso concomitante no entendimento do controle genético da mudança de HbF para a hemoglobina adulta que ocorre no nascimento (troca de hemoglobina). A descoberta do BCL11A (linfoma de células B / leucemia 11A) como principal repressor (entre outros) dos genes da globina-g, HbG1 e HbG2, que compõem o HbF, produziu novas abordagens genéticas para a produção de HbF(39).

Duas estratégias que visam a regulação do BCL11A em células-tronco da medula óssea para transplante autólogo estão atualmente em ensaios clínicos. Um envolve a transferência gênica mediada por vetor lentiviral de um RNA para reduzir a expressão de BCL11A. O outro envolve a interrupção de elementos reguladores discretos do gene BCL11A com a edição do gene CRISPRCas9. Outra abordagem genética usa a edição de genes para interromper os locais de ligação ao DNA do BCL11A nos promotores do HbG1 e HbG2, imitando as variantes do HPFH, mas isso não atingiu os testes clínicos(31).

Os ensaios clínicos em andamento e planejados das terapias gênicas resultantes projetados para aumentar a HbF no SCD têm a vantagem teórica sobre as atuais terapias de adição de genes da globina de preservar a relação recíproca entre a expressão da cadeia da globina fetal e adulta a partir do locus endógeno; o aumento de HbF alcançado com essas abordagens será acompanhado por uma redução potencialmente terapêutica da HbS.

O desafio final para tratar a SCD é corrigir geneticamente a mutação da HbS.

Para isso muitos estudos vêm sendo elaborados afim de elucidar o funcionamento da SCD em sua base molecular e clínica.

1.4. SNPs

A complexidade molecular da SCD e todas as suas vias de interação intrigam investigadores, pois a troca de uma única base confere um fenótipo tão variado nos pacientes, desde anemias leves, a pacientes com quadros graves da doença.

Na SCD, algumas revisões sugerem que, além de polimorfismos de base única (SNP) dentro de alguns genes do grupo de genes da β -globina, outros genes fora dele, podem afetar a gravidade da doença (40). Foi sugerido que esses polimorfismos não estão apenas associados à gravidade da anemia, mas também à frequência de recorrência da dor, incidência de acidente vascular cerebral (AVC), priapismo, úlceras de perna e complicações torácicas e hepato-biliares entre outros numerosos aspectos clínicos(41).

Foi relatado recentemente que SNPs em alguns genes dentro do agrupamento de genes da β -globina e fora dele também podem estar relacionado aos níveis de HbF(40).

Para isso nessa tese estudaremos SNPs (polimorfismos de uma única base) que encontram-se fora dos genes da globina, e sua relação com a SCD. Selecionamos 5 SNPs que demonstraram estar relacionados com a gravidade da doença, aos níveis de HbF e a resposta a HU em estudos com populações diferentes.

O SNPrs11759328 foi recentemente relacionado como um novo marcador genético no gene da proteína ativadora de RhoGTPase 18 (ARHGAP 18) estando associado à alta expressão de HbF na β -talassemia major em populações chinesas e tailandesas(42)(43).

O SNP rs333 encontrado no gene CCR5, acarreta em uma deleção de 32 pb na região codificadora no exão 1 do gene, foi associado a suscetibilidade a várias doenças inflamatórias, podendo oferecer um benefício seletivo em seu portador, sendo fator de proteção contra a doença, em estudo com populações egípcios e da parte árabe da África(41).

Já os SNPrs10793902, rs9483947 e rs826729, encontrados nos genes ASS1, MAP3K5 e Tox, respectivamente, estudados em pacientes de origem Helênicademonstraram associação em relação aos níveis de HbF e eficácia do tratamento de HU(44).Os SNPs encontrados nesses genes foram selecionados para o nosso estudo.

1.4.1. Gene ARHGAP18

ARHGAP18 (Proteína 18 Ativadora de Rho GTPase), também conhecido como SENEX, é um gene codificador de proteína, pertence à família RhoGAP que controla a angiogênese, morfologia celular e motilidade. Desempenha um papel na regulação da atividade de pequenas Rho GTPases, exibindo especificidade diferente para Rho GTPases individuais. Em células endoteliais, ARHGAP18 demonstrou atuar preferencialmente sobre RhoC(45), enquanto em células cancerosas apresenta especificidade principalmente para RhoA(46).

No entanto, descobertas recentes sugerem que a atividade de RhoA também pode ser regulada por ARHGAP18 em células endoteliais(47). Ele se associa aos microtúbulos de uma maneira dependente do domínio GAP e localiza-se na vanguarda durante a propagação e migração celular(46). Em células endoteliais, a expressão de ARHGAP18 contribui para a estabilização vascular e atua como um regulador negativo da angiogênese(45). A superexpressão de ARHGAP18 leva à senescência prematura das células endoteliais(48). Recentemente, demonstrou-se que facilita o alinhamento da célula endotelial protetora em resposta ao fluxo de cisalhamento laminar(49). Altamente expresso na linha celular K562 humana e quando regulado negativamente nessas células a aumenta expressão de HBG1 / 2 e a apoptose, sugerindo que ARHGAP18, que foi localizado pelo SNP rs11759328 via seleção positiva, desempenha um papel potencial na regulação da expressão de HbF na β -talassemia e pode ser um alvo terapêutico promissor(42).

1.4.2. Gene CCR5

CCR5, conhecido como receptor de quimiocina associado à célula Th1, desempenha alguns papéis cruciais no sistema imunológico por meio da regulação da migração de células imunes e sua ativação durante a resposta imune, ele está associado a estados inflamatórios crônicos. O polimorfismo genético rs333 no gene CCR5 é sugerido como um marcador genético molecular que pode indicar a suscetibilidade a várias doenças inflamatórias(50). Vários estudos revelaram que o polimorfismo CCR5- Δ 32 (rs333), uma deleção de 32 pb na região codificadora no exão 1 do gene CCR5, levou à regulação negativa do gene com resposta Th1 menos eficiente(51). Tem sido sugerido que esse polimorfismo não está apenas associados com a gravidade da anemia, mas também com a frequência de recorrência da dor, incidência de AVC, priapismo, úlceras de perna e complicações torácicas e hepato-biliares entre outros numerosos aspectos clínicos. Portanto, considerando o papel inflamatório na fisiopatologia da SCD, o alelo CCR5 Δ 32, que codifica o receptor de quimiocina C-C truncado tipo 5 (CCR5), pode oferecer um benefício seletivo em seu portador. No entanto, o papel do

CCR5 Δ 32 como fator protetor contra a doença ainda é motivo de controvérsia e sua frequência alélica varia amplamente em todo o mundo(51).

1.4.3. Gene ASS1

ASS1 codifica a argininosuccinato sintetase-1, uma enzima envolvida na síntese de arginina e de fundamental importância na síntese de óxido nítrico. O óxido nítrico é um ativador potente estabelecido da via de sinalização, envolvido na regulação positiva da expressão de HbF. Ao mesmo tempo, a Hidroxiuréia é conhecida por induzir a produção de óxido nítrico através da via de sinalização de óxido nítrico / guanilil ciclase solúvel / cGMP(52). Variantes genômicas como ASS1 podem ser marcadores farmacogenômicos da eficácia do tratamento de HU e aumento de HbF e podem servir como biomarcadores farmacogenômicos para prever a eficácia do tratamento com HU. Considera-se que esses marcadores exercem seu efeito induzindo a biossíntese de óxido nítrico, seja via alteração de splicing e / ou ligação de miRNA, conforme previsto por análise in silico e, finalmente, aumentam os níveis de γ globina, via direcionamento de guanilil ciclase. Notavelmente, o SNP rs10793902 do gene ASS1, está associado a níveis elevados de HbF e eficácia de tratamento de HU(44).

1.4.4. Gene MAP3K5

Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases) são quinases funcionalmente conectadas que regulam os principais processos celulares envolvidos, como sobrevivência, morte, diferenciação e proliferação. O módulo de quinase MAP típico é composto por uma cascata de três quinases: uma quinase quinase MAP (MAP3K) que fosforila e ativa uma quinase quinase MAP (MAP2K) que fosforila uma quinase MAP (MAPK)(53).

MAP3K5, também conhecido como ASK1, é um membro da família MAPK e, como tal, faz parte da via MAPK. Essa cascata de sinalização é um dos mecanismos mais importantes para a transdução citoplasmática de sinais extracelulares. O MAP3K5 é ativado por vários estresses e por citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , que contribuem para a apoptose celular(54).

Estudos revelam a forte associação do STR do promotor do gene MAP3K5 com a resposta à terapia com HU. O p38 e a via JNK MAPK são alguns dos mecanismos que foram propostos para estar envolvidos na indução da produção de Hb F mediada por HU. Parece que a presença de uma repetição GCGCG extra, pode resultar na diminuição da expressão do gene MAP3K5, possivelmente perturbando o p38 e a via JNK MAPK, levando à incompetência de não respondedores para obter benefícios de HU(36).

1.4.5. Gene Tox

As proteínas da família HMG-box são encontradas em uma variedade de organismos eucarióticos e a maioria são reguladores conhecidos ou suspeitos da expressão gênica. Recentemente, foi identificado um gene denominado Tox (para o gene HMG-box associado à seleção de timócitos), que codifica uma proteína nuclear que mostra um padrão de expressão altamente regulado durante a diferenciação de timócitos. A proteína TOX tem 526 aminoácidos com um domínio N-terminal ácido, uma sequência de sinal de localização nuclear bipartida e um único motivo HMG-box localizado centralmente.

A HMG-box de TOX está mais intimamente relacionada ao domínio de ligação ao DNA de proteínas HMG-box independentes de sequência. Além disso, três outras proteínas previstas compartilham domínios HMG-box quase idênticos com TOX, definindo uma nova subfamília de proteínas HMG-box. A subfamília TOX é altamente conservada em camundongos e humanos, e é distribuída em quatro cromossomos separados. Fora do domínio HMG-box, essas proteínas são menos bem conservadas, sugerindo que podem ter funções não sobrepostas. Dois exões que codificam o domínio HMG-box podem ser a unidade evolutiva da subfamília TOX, encontrada como uma única cópia em um invertebrado e replicada nos primeiros vertebrados. Esta subfamília TOX expandida provavelmente assumiu novas funções, incluindo papéis específicos no sistema imunológico dos mamíferos(55).

Em estudos anteriores o fator nuclear Tox foi identificado como um regulador crucial da diferenciação de células T tumor-específicas (TST). Sendo demonstrado que Tox é altamente expresso em células TST disfuncionais de tumores e em células T exauridas durante a infecção viral crônica. A expressão de TOX é conduzida pela estimulação crônica do receptor de células T e ativação de NFAT(56).

Vários estudos demonstraram o papel das variantes genômicas que incluem, TOX na modulação da produção de Hb F em pacientes com hemoglobinopatias do tipo Beta e como biomarcador para prever a gravidade da doença b-tal e / ou a resposta à terapia com HU(36).

2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo identificar em crianças 200 crianças angolanas a presença dos SNPs rs10793902 (ASS1), rs9483947 (MAP3K5) e rs826729 (Tox), rs333 (CCR5) e rs11759328 (ARHGAP), podendo assim determinar a prevalência desses SNPs na população estudada e verificar a existência de associação entre os genótipos encontrados e os fenótipos de gravidade da Anemia Falciforme, os níveis de HbF e a resposta a Hidroxiuréia, através dessas associações definir esses SNPs como possíveis biomarcadores da severidade e resposta a terapêutica em SCD.

3. Metodologia

3.1. Amostras

Foram selecionadas 200 crianças com doença falciforme, acompanhadas pelo Hospital Pediátrico David Bernardino em Luanda e no Hospital Geral do Bengo em Caxito, com consentimento informado por escrito do responsável.

A amostragem foi realizada entre abril e agosto de 2019. As crianças selecionadas não receberam tratamento com hidroxiureia ou transfusão nos últimos 3 meses.

Foram coletadas cerca de 4 mL de amostras de sangue total foram em tubos de EDTA de cada participante no contexto do acompanhamento médico de rotina dos pacientes e utilizadas para análises hematológicas, estudo de frações de hemoglobina e genotipagem de DNA. Os seguintes parâmetros hematológicos foram medidos: hemoglobina, hemoglobina fetal, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), contagem de leucócitos, contagem de neutrófilos, contagem de plaquetas, contagem de reticulócitos usando o analisador de hematologia XT-2000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japão) As diferentes frações de hemoglobina foram quantificados por cromatografia líquida de alto desempenho usando um dispositivo Variant II (Biorad, Hercules, CA).

Dessas, 52 crianças, após a primeira amostragem, receberam hidroxiureia, sendo novamente coletada amostra de sangue total após 6 meses para reavaliação dos parâmetros hematológicos.

3.2. Extração DNA

O DNA genómico foi extraído de 200 µL de sangue total utilizando o kit QIAGEN QIAamp® Blood Mini Kit de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -20 ° C para posterior genotipagem.

3.3. Genotipagem

3.3.1. Genotipagem ARHGAP rs11759328

O ensaio de genotipagem para o SNP rs11759328 foi feito com base na análise de PCR e HRM. As misturas para PCR com volume final de 20 µL incluíram: 1 µL de DNA genómico, 10 µL do kit iQ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD), 0,6 µL de primer *forward* á 10 µM e 0,6 µL de primer *reverse* á 10 µM, com o restante é água destilada. Os ciclos do PCR foram realizados em um sistema CFX Connect Real-Time System BIO-RAD. O par de primers para SNP rs11759328 consistia em primer *forward* (5'-TAAACACACACTTTCCCTA-3') e primer *reverse* (5'-CTGTGTAGTCTTTATCAAGGCATAA-3'). A amplificação por PCR foi iniciada

com pré-aquecimento a 95 ° C (3 min) seguido por 40 ciclos (95 ° C por 5 seg a 63 ° C por 15 seg). Após a amplificação por PCR, o estágio de curva de fusão (HRM) foi realizado por um ciclo de fusão de 50 ° C a 95 ° C. Foram selecionadas 6 amostras para confirmação pelo método de sequenciação de Sanger.

3.3.2. Genotipagem CCR5 rs333

O ensaio de genotipagem para o SNP rs333 foi feito com base na análise de PCR. As misturas para PCR com volume final de 20 µL incluíram: 1 µL de DNA genómico, 10 µL do kit MyTaq™ 2X (BIOLINE), 0,6 µL de primer *forward* á 10 µM de e 0,6 µL de primer *reverse* á 10 µM, com o restante é água destilada. Os ciclos de PCR foram realizados em um sistema i-Cycler BIO-RAD. O par de primers para SNP rs333 consistia em primer *forward* (5'-ACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCT-3') e primer *reverse* (5'-CATGATGGTGAAGATAAGCCTCAC-3'). A amplificação por PCR foi iniciada com pré-aquecimento a 95 ° C (3 min) seguido por 30 ciclos (95 ° C por 15 seg, 58 ° C por 15 seg, 72 ° C por 1 min), terminando com um ciclo á 72 ° C por 10 min. Após a amplificação por PCR, o produto de PCR foi analisado utilizando eletroforese em gel de agarose a 2%. Após genotipagem de todas as amostras foram selecionadas 9 amostras com resultados para análise por Agilent 4200 TapeStation. O produto amplificado por PCR esperado deve conter 206 pb para os genótipos selvagem (CCR5 / CCR5), 174 pb para o homocigoto mutante (delta-32 / delta-32. A presença de ambas as bandas indica um genótipo heterocigoto carregando tanto o alelo selvagem (CCR5) quanto o alelo mutante (delta CCR5; CCR5Δ32).

3.3.3. Genotipagem ASS1 rs10793902

O ensaio de genotipagem para o SNP rs10793902 foi feito com base na análise de PCR- RFLP. As misturas para PCR com volume final de 20 µL incluíram: 1 µL de DNA genómico, 10 µL do kit MyTaq™ 2X (BIOLINE), 0,6 µL de primer *forward* á 10 µM de e 0,6 µL de primer *reverse* á 10 µM, com o restante é água destilada. Os ciclos de PCR foram realizados em um termociclador i-Cycler BIO-RAD. O par de primers para SNP rs10793902 consistia em primer *forward* (5'-GCCAAACACTTCGCTACACA-3') e primer *reverse* (5'-CAACAAGACAAACGCACAAGA-3'). A amplificação por PCR foi iniciada com pré-aquecimento a 95 ° C (3 min) seguido por 30 ciclos (95 ° C por 15 seg, 58 ° C por 15 seg, 72 ° C por 1 min), terminando com um ciclo á 72 ° C por 10 min. Após a amplificação por PCR, 8,5µl do produto de PCR foi incubado com a 0,4 µl da enzima BsaJI e 1 µ Buffer CutSmart por 60 min á 60 ° C e 20 min a 80 ° C em um termociclador i-Cycler BIO-RAD, após incubação o produto de digestão foi analisado utilizando eletroforese em gel de agarose a 2%.

O produto de digestão esperado deve conter uma banda com 213pb para o genótipo variante (TT), uma banda com 169pb e uma banda com 44pb para o genótipo selvagem (CC). A presença de três bandas, 213pb e 169pb e 44pb indica um genótipo heterozigoto carregando tanto o alelo selvagem (C) quanto o alelo variante (T). Pois a enzima selecionada tem seu ponto de corte quando da presença do alelo selvagem (C).

3.3.4. Genotipagem MAP3K5 rs9483947

O ensaio de genotipagem para o SNP rs9483947 foi feito com base na análise de PCR- RFLP. As misturas para PCR com volume final de 20 µL incluíram: 1 µL de DNA genômico, 10 µL do kit MyTaq™ 2X (BIOLINE), 0,6 µL de primer *forward* á 10 µM de e 0,6 µL de primer *reverse* á 10 µM, com o restante é água destilada. Os ciclos do PCR foram realizados em um termociclador i-Cycler BIO-RAD. O par de primers para SNP rs9483947 consistia em primer *forward* (5'- TTCCCTGGCACACCATG-3') e primer *reverse* (5'- ATCTCCCCTGCTCCACAAA-3'). A amplificação por PCR foi iniciada com pré-aquecimento a 95 ° C (3 min) seguido por 30 ciclos (95 ° C por 15 seg, 65 ° C por 15 seg, 72 ° C por 1 min), terminando com um ciclo a 72 ° C por 10 min. Após a amplificação por PCR, 13,5µl do produto de PCR foi incubado com a 0,7 µl da enzima PvuII e 1 µ Buffer por 4 h e 30 min á 37 ° C em um termociclador i-Cycler BIO-RAD, após incubação o produto de digestão foi analisado utilizando eletroforese em gel de agarose a 2%.

O produto de digestão esperado deve conter uma banda com 356pb, uma banca com 196pb e uma banda com 24 bp para o genótipo variante (CC), uma banda com 551pb e uma banda com 24pb para o genótipo selvagem (TT). A presença de quatro bandas, 551bp, 365pb, 196pb e 24pb respectivamente indica um genótipo heterozigoto carregando tanto o alelo selvagem (T) quanto o alelo variante (C). Pois a enzima selecionada tem seu ponto de corte quando da presença do alelo variante (C).

3.3.5. Genotipagem TOX rs 826729

O ensaio de genotipagem para o SNP rs826729 foi feito com base na análise de PCR- RFLP. As misturas para PCR com volume final de 20µL incluíram: 1 µL de DNA genômico, 10 µL do kit MyTaq™ 2X (BIOLINE), 0,6 µL de primer *forward* á 10 µM de e 0,6 µL de primer *reverse* á 10 µM, com o restante é água destilada. Os ciclos do PCR foram realizados em um termociclador i-Cycler BIO-RAD. O par de primers para SNP rs826729 consistia em primer *forward* (5'-CAGACCACAGTGAACGCAG-3') e primer *reverse* (5'-GATGGCCACAATCCTTACACA-3'). A amplificação por PCR foi iniciada com pré-aquecimento a 95 ° C (3 min) seguido por 30 ciclos (95 ° C por 15 seg, 65 ° C por 15 seg, 72 ° C por 1 min), terminando com um ciclo a 72 ° C por 10 min. Após a amplificação por PCR, 4µl do produto de PCR foi incubado com a 0,25 µl da enzima Sau3AI e 1 µ Buffer CutSmart e 4,75 µl de água destilada

por 4 h e 30 min á 37 ° C em um termociclador i-Cycler BIO-RAD, após incubação o produto de digestão foi analisado utilizando eletroforese em gel de agarose a 2%.

O produto de digestão esperado deve conter uma banda com 385pb, uma banca com 195pb e uma banda com 61 pb para o genótipo variante (GG), uma banda com 580pb e uma banda com 61pb para o genótipo selvagem (AA). A presença de quatro bandas, 580bp, 385pb, 195pb e 61pb respectivamente indica um genótipo heterozigoto carregando tanto o alelo selvagem quanto o alelo variante (G). Pois a enzima selecionada tem seu ponto de corte quando da presença do alelo variante (G).

4. Análise Estatística

As frequências genóticas e alélicas foram comparadas entre grupos de amostra apropriados usando os testes χ^2 e o Exato de Fisher, um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, para realização desses testes foi utilizado o programa RStudio versão 4.0.4 (2021-02-15) -- "Lost Library Book" e confirmado pelo programa GenePop.

Para analisar se a população em estudo encontrava-se em equilíbrio realizamos o teste Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg χ^2 , para análise da Associação Genótipos x Fenótipos e para Análise da Associação Genótipos x Resposta HU, realizamos o teste de χ^2 , para essas análises foi utilizando o programa RStudio versão 4.0.4 (2021-02-15) -- "Lost Library Book" e considerado um valor de $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

5. Resultados

Em um total de 200 crianças com SCD foram estudadas (103 meninas e 97 meninos, representando 51,5% e 48,5% da amostra (Gráfico- 5.1) com idade média de 6,6 anos, variando dos 3 aos 12 anos. (Gráfico-5.2)

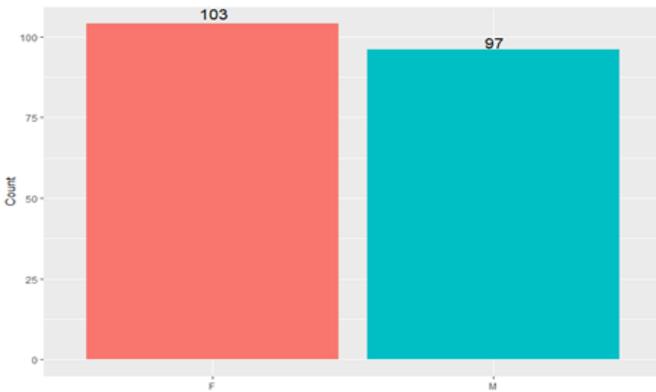


Gráfico-5.1: Gênero

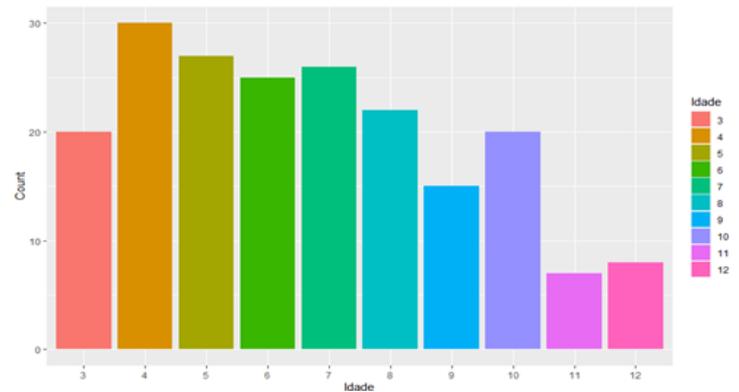


Gráfico-5.2: Idade

As 200 crianças foram classificadas como tendo anemia severa ou moderada com ponto de corte estabelecido em 8.0 (g/dL) de hemoglobina. Onde 48 são classificados como tendo anemia moderada (28 meninas e 20 meninos) e 152 são classificados como tendo anemia severa (76 meninos e 76 meninas). (Gráfico- 5.3)

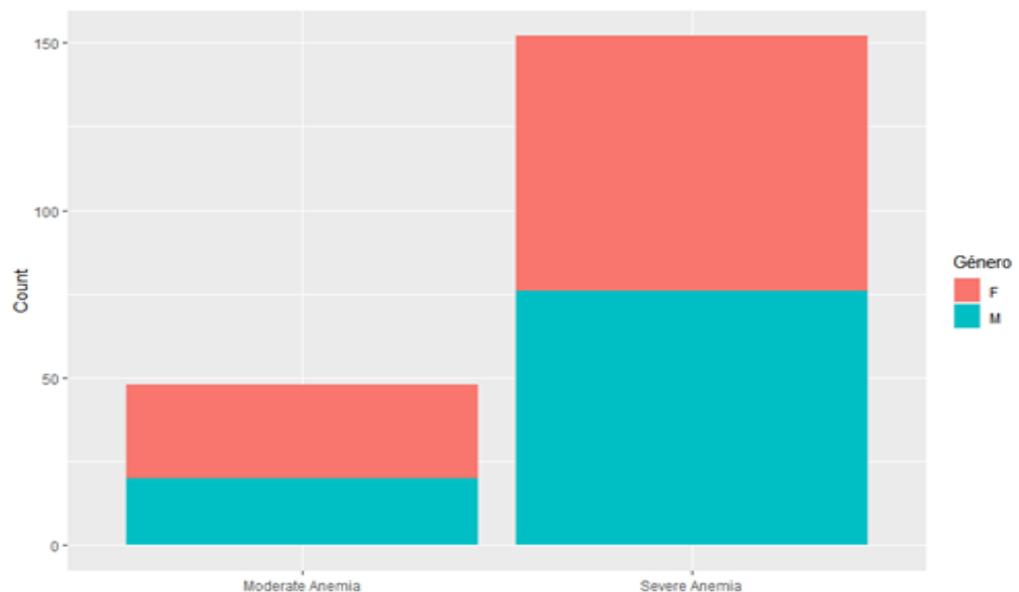


Gráfico-5.3: Severidade da Anemia X Gênero

5.1. Gene ASS1

Os genótipos encontrados para o SNP do gene ASS1 (rs10793902) foram: 52 amostras com genótipo selvagem (CC), 108 amostras com genótipo heterozigótico (CT) e 40 amostras com o genótipo variante (TT). (Imagem-5.1.1)

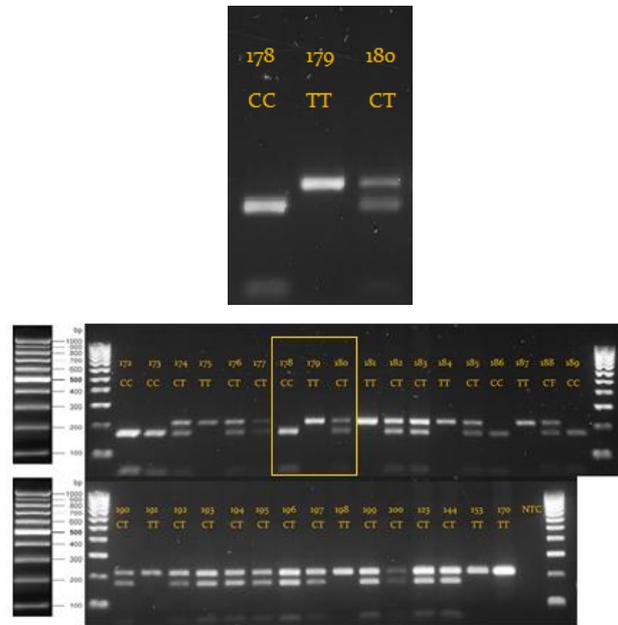


Fig- 5.1.1-Fotografia do gel de agarose para os genótipos do SNP rs10793902 do geneASS1

5.1.1. Análise do Equilíbrio de Hardy-Heinberg

Não foram observados desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os genótipos do gene ASS1 ($\chi^2 = 1,1676$ $p = 0,2798$) com distribuição do genótipo de tipo selvagem CC (26%) e de heterozigotos de CT (54%) e homozigoto variante TT (20%).

5.1.2. Análise Freqüência Alélica e Genotípica

A freqüência observada de homozigoto TT para o gene ASS1 foi de 20%. (Tabela-5.1.2.1)

ASS1	
Rótulos de Linha	Contar de AMOSTRA
CC	26.00%
CT	54.00%
TT	20.00%
Total geral	100.00%

Tabela-5.1.2.1:Freqüência genotípico do SNP rs10793902 do gene ASS1

FREQUÊNCIA ALÉLICA	
Frequência alélica C	53%
Frequência alélica T	47%

Tabela-5.1.2.2:Frequência alélica do SNP rs10793902 do gene ASS1

Relativamente à frequência alélica foi observado que ASS1 possui 53% de frequência para o alelo “C” e 47% para o alelo “T”. (Tabela 5.1.2.2)

Para o Teste Exato de Fisher obtivemos o seguinte resultado; $p = 0.2581$ para o gene ASS1, demonstrando novamente que a população estudada encontra-se em equilíbrio. (Gráfico-5.1.2.1)

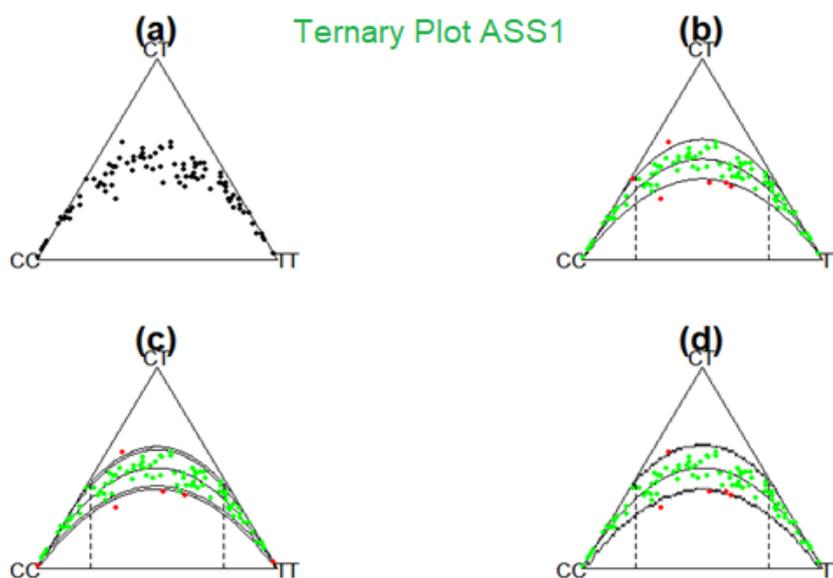


Gráfico-5.1.2.1.TernaryPlot para Teste Exato de Fisher para o SNP rs10793902 do gene ASS1

5.1.3. Análise da Associação Genótipos X Fenótipos da SCD

Para perceber a existência de associações entre os genótipos de ASS1 e o fenótipo da SCD consideramos 21 aspectos como: idade, número de transfusões e internamentos por ano, se já houve episódios de AVCs, níveis de hemoglobina fetal, hemoglobina, reticulócitos, eritrócitos, LDH, creatinina, bilirrubina total e indireta, uréia, TGO e TGP, VGM, HGM, leucócitos, neutrófilos e plaquetas. (Tabela- 5.1.3.1)

Na associação entre os genótipos “CC”, “CT” e “TT” e os fenótipos para o gene ASS1 encontramos ligeiro aumento para bilirrubina indireta (mg/dL) com valor de $p=0,0414$ e uma diminuição dos episódios de AVC's com valor de $p=0,0473$.

	CC SAMPLE SIZE (52)			CT SAMPLE SIZE (107)			TT SAMPLE SIZE (40)			p-value raw
	MEAN (SD)	RANGE	MEDIAN	MEAN (SD)	RANGE	MEDIAN	MEAN	RANGE	MEDIAN	
Idade	6.73 (2.61)	3-12	7.00	6.67 (2.44)	3-12	7.0	6.42 (2.68)	3-12	6.0	0.7789a
Hemoglobina Fetal (%)	6.13(4.01)	1.3-23.3	4.85	5.88 (4.41)	0.7-23.8	4.45	4.938 (3.36)	0.5-14.6	4.20	0.3298a
No de Transfusões por ano	0.38 (0.52)	0-3.14	0.25	0.40 (0.56)	0-3.75	0.25	0.40 (0.45)	0-1.83	0.26	0.9698a
No Internamentos por ano	0.48 (0.54)	0-3.14	0.34	0.47 (0.51)	0-2.75	0.33	0.49 (0.43)	0-1.67	0.44	0.8141a
Hemoglobina (g/dL)	7.55 (0.87)	5.8-9.33	7.62	7.24 (1.04)	4.25-10	7.22	7.40 (0.92)	5.7-9.77	7.46	0.167b
Reticulócitos (10 ³ L)	9.91 (4.84)	3.51-25.58	8.68	10.40 (4.78)	2.04-36.57	9.73	10.4 (3.96)	2.73-24.68	10.45	0.3581a
Eritrócitos (μL)	3.05 (0.60)	1.89-4.58	3.02	2.89 (0.63)	1.32-4.77	2.76	2.97 (0.59)	1.85-4.91	2.88	0.1234a
LDH (U/L)	433.76 (152.75)	99.5-822	399.00	428.23 (159.68)	140-1035	381	433.34 (152.63)	207.55-952.5	385.4	0.8122a
Creatinina (mg/dL)	0.66 (0.55)	0.1-2.3	0.40	0.64 (0.54)	0.1-2.30	0.4	0.69 (0.58)	0.1-2.95	0.45	0.9132a
Bilirubina Direta (mg/dL)	0.35 (0.28)	0-1.1	0.30	0.42 (0.46)	0-2.90	0.3	0.52 (0.46)	0.0-2.1	0.55	0.2811a
Bilirubina Total (mg/dL)	1.5 (1.01)	0.4-4.9	1.25	1.53 (1.67)	0.1-15.15	1.16	1.24 (0.74)	0.2-2.8	1.00	0.5438a
Bilirubina Indireta (mg/dL)	1.18 (0.99)	0.3-4.85	0.88	1.13 (1.60)	0.05-14.65	0.8	0.74 (0.56)	0.1-2.25	0.55	0.04414a
Ureia (g/L)	19.79 (10.63)	2.25-52.33	16.94	21.92 (29.16)	1.4-300.30	16.95	19.96 (14.19)	6.85-90.09	15.13	0.8904a
TGO (U/L)	25.64 (9.15)	9-43.55	25.75	36.24(76.95)	9.00-808.67	27.00	27.01 (11.77)	2-67.10	26.77	0.6646a
TGP (U/L)	7.41 (3.35)	2-19.27	6.53	8.62 (5.62)	2.4-32.50	6.13	8.72 (5.75)	1-30.5	7.4	0.5148a
VGM (fL)	76.74 (8.77)	58.90-95.9	78.09	77.2 (8.95)	53.6-113.75	77.62	77.30 (7.61)	61.67-94.43	78.11	0.9101a
HGM (pg)	25.26 (3.00)	19.27-31.20	25.65	25.54 (3.0)	18.52-32.10	26.10	25.32 (2.79)	18.92-29.10	26.17	0.719a
Leucócitos (10 ³ L)	13.46 (4.0)	7.24-22.03	12.46	14.17(5.05)	6.15-44.79	13.17	14.12 (4.35)	5.5-26.51	14.11	0.7323a
Neutrófilos (10 ³ L)	5.54 (1.98)	2.47-12.26	5.4	6.09 (2.41)	2.91-14.89	5.71	5.98 (2.52)	2.45-14.5	5.22	0.5235a
Plaquetas (10 ³ L)	468.46 (218.41)	114-1606.67	447.5	435.04 (146.81)	141.25-781.25	434.75	402.85 (156.25)	150.67-875	405.17	0.2848a
AVC	1.0 (1.92)			4(3.7)			1.12 (0.33)	1-2		0.0473c

* Todos os parametros analisados antes da administração de HU
a Kruskal-Wallis non parametric test
b ANOVA
c Person χ^2

Tabela-5.1.3.1: Eventos Clínicos e Hematológicos subdivididos pelos três genótipos do SNP rs10793902 do gene ASS1

5.2. Gene MAP3K5

Para o SNP MAP3K5 (rs9483947) foram encontradas 60 amostras com genótipo selvagem (TT), 81 amostras com genótipo heterozigótico (CT) e 50 amostras com o genótipo variante (CC) e 9 amostras não obtivemos resultados de genotipagem para esse SNP.

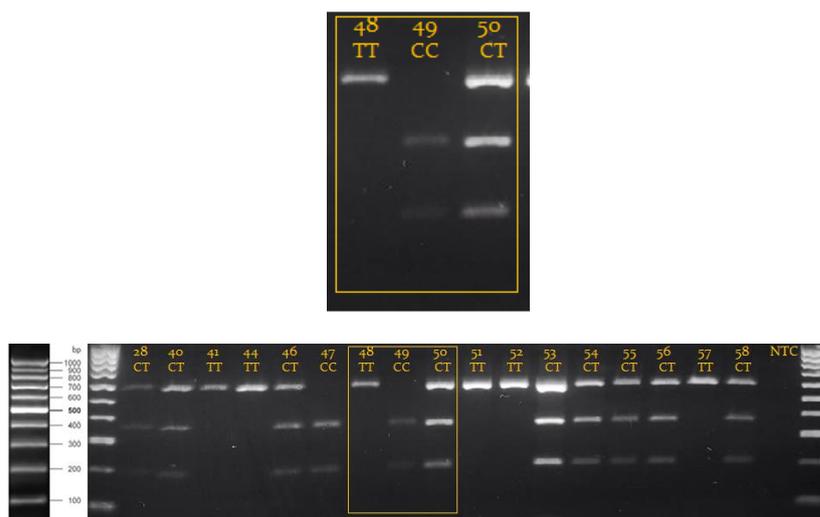


Fig- 5.2.1-Fotografia do gel de agarose para os genótipos do SNP rs9483947 do gene MAP3K5

5.2.1. Análise do Equilíbrio de Hardy-Heinberg

Para o gene MAP3K5 podemos observar um pequeno desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 3.9326$ $p = 0,0473$) com uma

diminuição do genótipo de tipo selvagem TT (31.43%) e de heterozigotos de CT (56,46%) e um ligeiro aumento do homozigoto variante CC (15,47%).

5.2.2. Análise Freqüência Alélica

A freqüência observada de homozigoto de CC para o gene MAP3K5 e foi de 26,17%. (Tabela-5.2.2.10)

MAP3K5	
Rótulos de Linha	Soma de AMOSTRA
TT	31.43%
CT	42.41%
CC	26.17%
Total Geral	100.00%

Tabela-5.2.2.1: Freqüência genotípica do SNP rs9483947 do gene MAP3K5

FREQUÊNCIA ALÉLICA	
Frequência alélica C	47%
Frequência alélica T	53%

Tabela-5.2.2.2: Freqüência alélica do SNP rs9483947 do gene MAP3K5

Relativamente a freqüência alélica foi observado que em MAP3K5 foi encontrada uma freqüência alélica de 53% para a alelo "T" e 47% de freqüência para o alelo "C".(Tabela-5.2.2.2)

Para o Teste Exato de Fisher obtivemos o seguinte resultado; $p = 0.04049$ para o SNP MAP3K5 demonstrando novamente que a população estudada encontra-se em ligeiro desequilíbrio.(Gráfico-5.2.2.1)

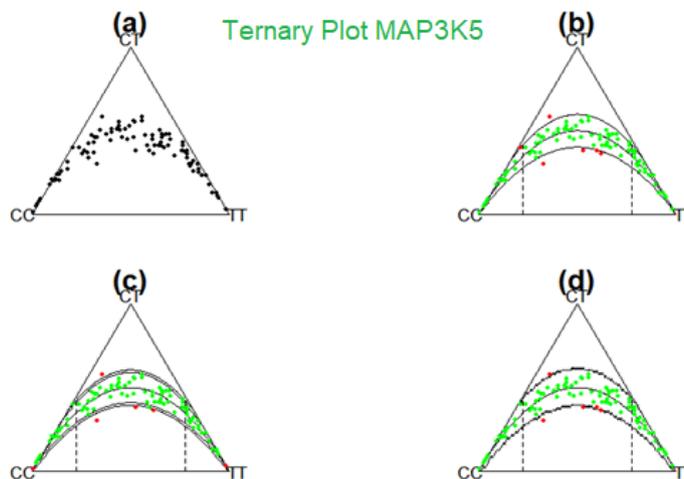


Gráfico-5.2.2.1. TernaryPlot para Teste Exato de Fisher para SNP rs9483947 do gene MAP3K5

5.2.3. Análise da Associação Genótipos X Fenótipos

Para perceber a existência de associações entre os SNP's e o fenótipo da SCD consideramos 21 aspectos como: idade, número de transfusões e internamentos por ano, se já houve episódios de AVCs, níveis de hemoglobina fetal, hemoglobina, reticulócitos, eritrócitos, LDH, creatinina, bilirubina total e indireta, uréia, TGO e TGP, VGM, HGM, leucócitos, neutrófilos e plaquetas. (Tabela-5.2.3.1)

Na associação entre os genótipos e fenótipos para o gene MAP3K5 encontramos um aumento significativo para o LDH (UI/L) com valor de $p=0.0016$.

	CC			CT			TT			p-value raw	p-value adjusted
	MEAN (SD)	RANGE	MEDIAN	MEAN (SD)	RANGE	MEAN	RANGE	MEDIAN			
Idade	6.79 (2.55)	3-12	7.00	6.75 (2.57)	3-12	6.00	6.58 (2.54)	3-12	6.00	0.8695a	1.00
Hemoglobina Fetal (%)	5.63 (3.71)	0.8-14.6	4.60	6.09 (4.9)	1-23.8	4.40	5.37 (3.17)	0.5-13.4	4.40	0.9921a	1.00
No de Transfusões por ano	0.35 (0.53)	0-3.14	0.22	0.35 (0.49)	0-3.14	0.23	0.42 (0.55)	0-3.75	0.25	0.4438a	1.00
No Internamentos por ano	0.49 (0.56)	0-3.14	0.36	0.4 (0.45)	0-2.43	0.30	0.49 (0.42)	0-2.5	0.38	0.1461a	1.00
Hemoglobina (g/dL)	7.33 (1.07)	4.25-9.93	7.40	7.52 (0.9)	5.1-10	7.56	7.26 (0.93)	4.9-9.45	7.28	0.217b	1.00
Reticulócitos (10^3 L)	11.08 (6.24)	3.1-36.57	10.39	9.91 (3.89)	2.04-25.35	9.76	9.98 (4.05)	2.73-25.58	9.21	0.704a	1.00
Eritrócitos (μ L)	2.94 (0.73)	1.32-4.76	2.83	3 (0.57)	1.96-4.77	2.94	2.92 (0.59)	1.94-4.91	2.82	0.514a	1.00
LDH (UI/L)	383.12 (154.37)	212.9-952.5	336.15	466.25 (147.68)	140-935.15	450.05	419.69 (163.4)	99.5-1035	385.40	0.0016a	0.032
Creatinina (mg/dL)	0.74 (0.57)	0.1-2.25	0.50	0.65 (0.59)	0.1-2.95	0.40	0.59 (0.5)	0.1-2.3	0.40	0.4264a	1.00
Bilirubina Direta (mg/dL)	0.52 (0.62)	0-2.9	0.34	0.33 (0.34)	0-2.1	0.23	0.43 (0.33)	0-1.4	0.40	0.07275a	1.00
Bilirubina Total (mg/dL)	1.4 (0.99)	0.1	1.20	1.44 (1.85)	0.15-15.15	1.00	1.52 (0.94)	0.2-5.1	1.17	0.1292a	1.00
Bilirubina Indireta (mg/dL)	0.93 (0.8)	0.05-4.13	0.87	1.14 (1.83)	0.05-14.65	0.65	1.09 (0.86)	0.1-4.4	0.80	0.3789a	1.00
Ureia (g/L)	20.68 (10.79)	5.75-55.28	16.81	20.91 (33.19)	2.25-300.3	15.30	21.22 (13.26)	1.4-90.09	19.20	0.1122a	1.00
TGO (U/L)	25.85 (11.21)	12-64	24.20	37.5 (88.63)	9-808.67	27.05	29.02 (14.14)	2-87	27.30	0.3395a	1.00
TGP (U/L)	9.22 (6.4)	1.05-30.5	6.80	7.62 (4.62)	1-26.85	6.20	7.95 (5.43)	1-32.5	6.45	0.4357a	1.00
VGM (fL)	78.35 (10.83)	56.4-113.75	79.17	76.42 (7.86)	53.6-95.9	77.80	77.01 (8.0)	60.43-94.52	77.20	0.6679a	1.00
HGM (pg)	25.66 (3.29)	19.15-32.1	26.17	25.52 (2.85)	18.52-30.6	26.27	25.27 (2.86)	18.9-31.02	25.67	0.6874a	1.00
Leucócitos (10^3 L)	13.55 (4.31)	7.22-25.32	13.11	14.09 (4.25)	5.5-26.51	13.21	14.22 (5.41)	6.15-44.79	13.34	0.7277a	1.00
Neutrófilos (10^3 L)	5.8 (2.35)	2.47-13.52	5.20	6.13 (2.56)	2.45-14.89	5.58	5.93 (2.06)	2.68-12.26	5.79	0.7935a	1.00
Plaquetas (10^3 L)	484.45 (223.23)	114-1606.67	480.00	436.15 (145.25)	141.25-765.33	427.96	426.48 (155.5)	150.67-875	400.67	0.1423a	1.00
AVC; yes (N, %)	2 (4.6)	-	-	3 (3.8)	-	-	5 (7.2)	-	-	NA**	NA**
Sample size (N, %)	43 (21.5)	-	-	80 (40)	-	-	69(34.5)	-	-	NA	NA

* Todos os parâmetros analisados antes da administração de HU

** Sem condições de aplicabilidade

a Kruskal-Wallis non parametric test

b ANOVA

c Pearson χ^2

Tabela-5.2.3.1: Eventos Clínicos e Hematológicos subdivididos pelos três genótipos deMAP3K5

5.3. Gene Tox

Para o SNP TOX (rs826729) foram encontradas 56 amostras com genótipo selvagem (AA), 114 amostras com genótipo heterozigótico (AG) e 30 amostras com o genótipo variante (GG). (Imagem 5.3.1)

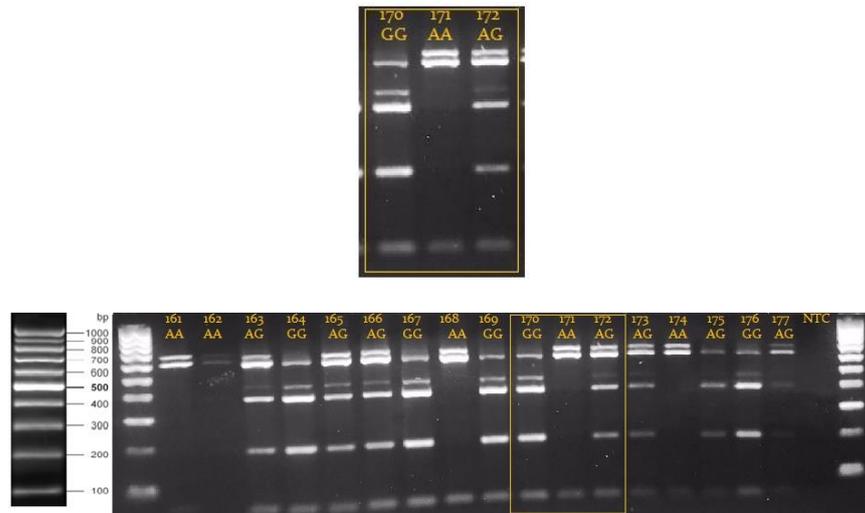


Fig- 5.3.1-Fotografia do gel de agarose para os genótipos do SNP rs826729 do geneTox

5.3.1. Análise do Equilíbrio de Hardy-Heinberg

Para o gene Tox foi observados um pequeno desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 4.6175$ $p = 0,0316$) com um ligeiro aumento do genótipo de tipo selvagem AA (28,07%) e de heterozigotos de AG(56,46%) e uma diminuição do homozigoto variante GG (15,47%).

5.3.2. Análise Frequência Alélica e Genotípica

A frequência observada de homozigoto GG para o gene Tox foi de 15,47%.(Tabela-5.3.2.1)

TOX	
Rótulos de Linha	Soma de AMOSTRA
AA	28.07%
AG	56.46%
GG	15.47%
Total geral	100.00%

Tabela-5.3.2.1: Frequência genotípica para o SNP rs826729 do gene Tox

FREQUÊNCIA ALÉLICA	
Frequência alélica A	56,5%
Frequência alélica G	43,5%

Tabela-5.3.2.2: Frequência alélica para o SNP rs826729 do gene Tox

Relativamente a frequência alélica foi observado que em Tox a frequência de 56,5% para o alelo "A" e de 43,5% para o alelo "G". (Tabela-5.3.2.2)

Para o Teste Exato de Fisher obtivemos o seguinte resultado; $p = 0.03081$ para o SNP Tox, demonstrando novamente que a população estudada encontra-se em ligeiro desequilíbrio.(Gráfico-5.3.2.1)

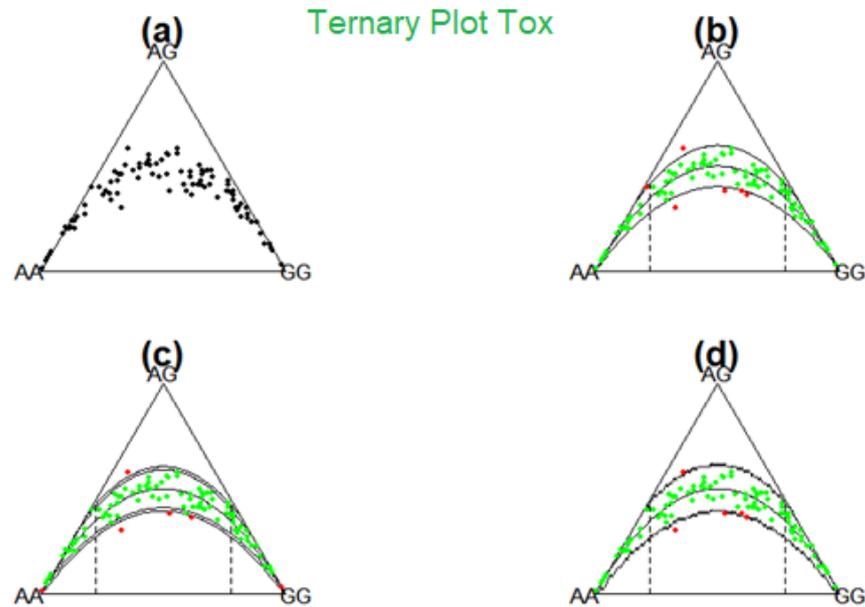


Gráfico-5.3.2.1.TernaryPlot para Teste Exato de Fisher para o SNP rs826729 do gene Tox

5.3.3. Análise da Associação Genótipos X Fenótipos

Para perceber a existência de associações entre os SNPs e o fenótipo da SCD consideramos 21 aspectos como: idade, número de transfusões e internamentos por ano, se já houve episódios de AVCs, níveis de hemoglobina fetal, hemoglobina, reticulócitos, eritrócitos, LDH, creatinina, bilirubina total e indireta, uréia, TGO e TGP, VGM, HGM, leucócitos, neutrófilos e plaquetas. (Tabela-5.3.3.1)

Para a associação entre os genótipos do gene Tox não foi encontrado nenhum valor de associação estatisticamente significativo entre os parâmetros avaliados.

	AA SAMPLE SIZE (56)			AG SAMPLE SIZE (114)			GG SAMPLE SIZE (30)			p-value raw
	MEAN (SD)	RANGE	MEDIAN	MEAN (SD)	RANGE	MEDIAN	MEAN	RANGE	MEDIAN	
Icôde	6.75 (2.58)	3-12	7.00	6.65 (2.47)	3-12	6.00	6.50 (2.71)	3-12	6.00	0.861a
Hemoglobina Fetal (%)	6.07(4.17)	0.5-23.3	5.35	5.53 (3.88)	0.7-23.6	4.30	5.98 (4.9)	0.8-23.8	4.30	0.6902a
No de Transfusões por ano	0.29 (0.34)	0-1.67	0.25	0.44 (0.61)	0-3.75	0.25	0.40 (0.46)	0-1.67	0.25	0.4909a
No Internamentos por ano	0.41 (0.39)	0-1.67	0.29	0.52 (0.56)	0-3.14	0.40	0.42 (0.41)	0-1.67	0.29	0.4584a
Hemoglobina (g/dL)	7.39 (0.99)	4.9-9.93	7.52	7.31 (0.94)	4.25-9.77	7.28	7.42 (1.09)	4.9-10.0	7.51	0.814b
Reticulócitos (10 ³ L)	9.70 (4.65)	2.73-25.48	9.21	10.47 (4.64)	3.48-36.57	9.45	10.51 (4.53)	2.04-24.68	10.26	0.2994a
Eritrócitos (μL)	2.99 (0.68)	1.62-4.91	2.88	2.93 (0.58)	1.32-4.67	2.89	2.93 (0.62)	1.85-4.77	2.89	0.932a
LDH (U/L)	407.24 (137.83)	178.5-683.05	372.25	443.39 (160.2)	99.5-1035	401.00	426.26 (170.14)	198-952.5	376.5	0.336a
Creatinina (mg/dL)	0.63 (0.52)	0.1-1.9	0.4	0.68 (0.59)	0.1-2.95	0.40	0.62 (0.43)	0.1-1.7	0.40	0.8731a
Bilirubina Direta (mg/dL)	0.45 (0.48)	0-2.9	0.35	0.39 (0.37)	0-2.53	0.30	0.50 (0.48)	0.05-2.1	0.40	0.8731a
Bilirubina Total (mg/dL)	1.5 (1.05)	0.2-5.10	1.17	1.44 (1.61)	0.1-15.15	1.10	1.48 (0.76)	0.4-3.05	1.20	0.2802a
Bilirubina Indireta (mg/dL)	1.07 (0.93)	0.1-4.4	0.8	1.14 (1.57)	0.05-14.65	0.65	1.00 (0.70)	0.2-2.65	0.80	0.5165a
Ureia (g/L)	20.79 (14.71)	4.7-90.09	16.91	18.87 (9.21)	1.4-52.33	16.50	28.74 (52.38)	2.25-300.30	17.95	0.9419a
TGO (U/L)	26.61 (10.71)	2-67.10	26.98	29.26 (13.12)	10.63-87	27.00	50.07 (143.67)	9-808.67	22.90	0.1844a
TGP (U/L)	7.77 (5.67)	1-32.5	6.4	8.62 (5.62)	1-30.50	6.65	7.10 (3.08)	2.65-16.00	6.10	0.5044a
VGM (fL)	78.38 (9.34)	58.90-90.40	77.96	76.83 (8.63)	53.6-113.75	77.55	77.56 (7.09)	59.95-94.43	78.45	0.7544a
HGM (pg)	25.35 (3.19)	18.92-30.57	26.01	25.40 (2.98)	18.52-32.1	25.96	25.66 (2.31)	19.65-30.15	26.12	0.9418a
Leucócitos (10 ³ L)	14.19 (4.3)	7.24-25.32	13.45	13.98 (5.02)	5.5-44.79	13.01	13.47 (3.70)	6.15-18.87	13.13	0.8085a
Neutrófilos (10 ³ L)	6.1 (2.36)	2.47-13.52	5.52	5.92 (2.49)	2.45-14.89	5.49	5.56 (1.47)	3.42-8.62	5.49	0.6634a
Plaquetas (10 ³ L)	455.28 (158.01)	114-875	437.29	431.41 (181.11)	144.5-1606.67	424.00	420.91 (153.48)	141.25-837.67	422.83	0.5471a
AVC	2 (3.6)			8 (7)			0 (0)			0.247c

* Todos os parametros analisados antes da administração de HU
a Kruskal-Wallis non parametric test
b ANOVA
c Person χ^2

Tabela-5.3.3.1: Eventos Clínicos e Hematológicos subdivididos pelos três genótipos de Tox

5.4. Gene CCR5

Para o SNP rs333 do gene CCR5 foram encontradas 199 amostras com o genótipo selvagem para CCR5 e 1 amostra com o genótipo heterozigótico CCR5/CCR5Δ32, não sendo encontrado em nenhuma amostra o genótipo homozigótico para CCR5Δ32/CCR5Δ32. (Imagem 5.4.1)

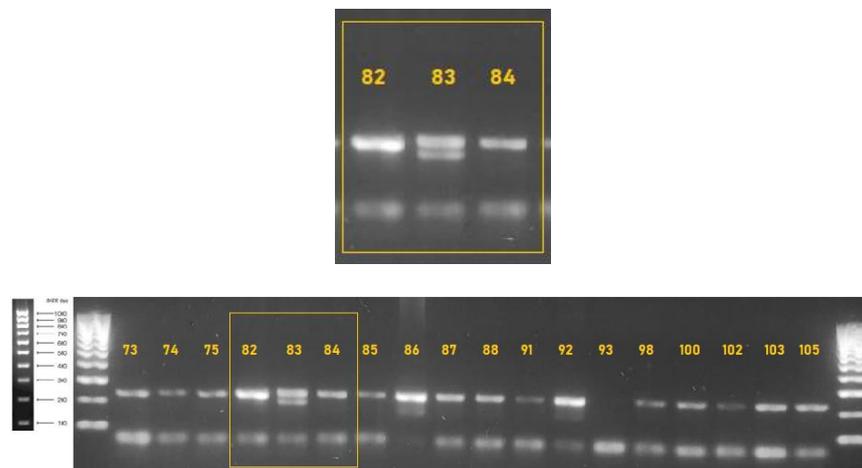


Fig- 5.4.1-Fotografia do gel de agarose para os genótipos do SNP CCR5 do gene CCR5

Para confirmação do heterozigoto CCR5/CCR5Δ32 foi realizada Eletroforese Capilar utilizando Agilent 4200 TapeStation. (Imagem 5.4.2)

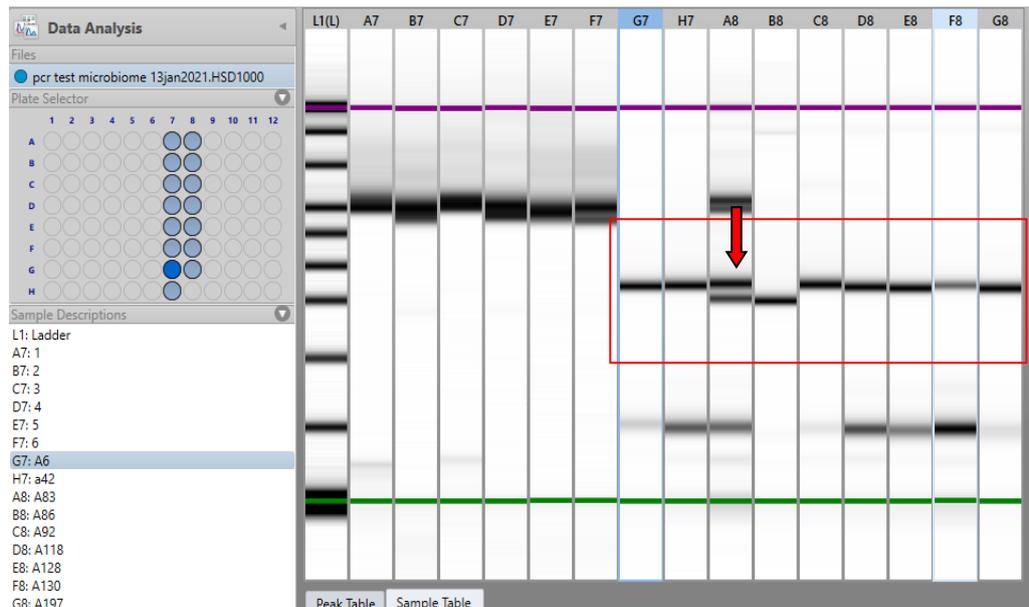


Fig- 5.4.2- Eletroforese Capilar Agilent 4200 TapeStation das 9 amostras selecionadas.

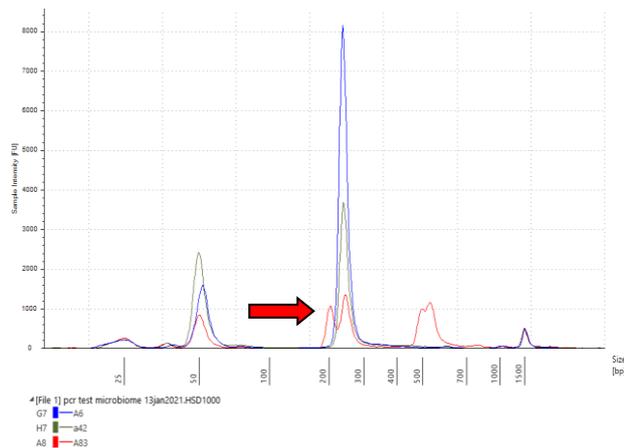


Gráfico 5.4.3- Curva Eletroforese Capilar Agilent 4200 TapeStation.

5.4.1. Análise do Equilíbrio de Hardy-Heinberg

Não foram observados desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os genótipos do gene CCR5 ($\chi^2 = 199,2506$ $p = 3,0434$) com distribuição do genótipo de tipo selvagem CCR5 (99,5%) e de heterozigotos de CCR5/CCR5 Δ 32 (0,5%) e homozigoto variante CCR5 Δ 32/ CCR5 Δ 32 (0%).

5.4.2. Análise Frequência Alélica e Genotípica

A frequência observada de homozigoto CCR5 para o gene CCR5 foi de 99,5%. (Tabela-5.4.2.1)

CCR5	
CCR5	99,5%
CCR5/CCR5 Δ 32	0,5%
CCR5 Δ 32	0%
Total geral	100%

Tabela-5.4.2.1: Frequência genotipado SNP rs333 do gene CCR5

FREQUÊNCIA ALÉLICA	
Frequência alélica CCR5	99,75%
Frequência alélica CCR5 Δ 32	0,25%

Tabela-5.4.2.2: Frequência alélica do SNP rs333 do gene CCR5

Relativamente a frequência alélica foi observado queo SNP do gene CCR5 possui 99,75% de frequência para o alelo “CCR5” e 0,25% para o alelo “CCR5 Δ 32”. (Tabela 5.4.2.2)

Para o Teste Exato de Fisher obtivemos o seguinte resultado; $p = 0.1$ para o gene CCR5,demonstrando novamente que a população estudada encontra-se em equilíbrio.

Da mesma forma não foi possível verificar associação com os genótipos encontrados para o SNP rs333 do gene CCR5 e a resposta a HU.

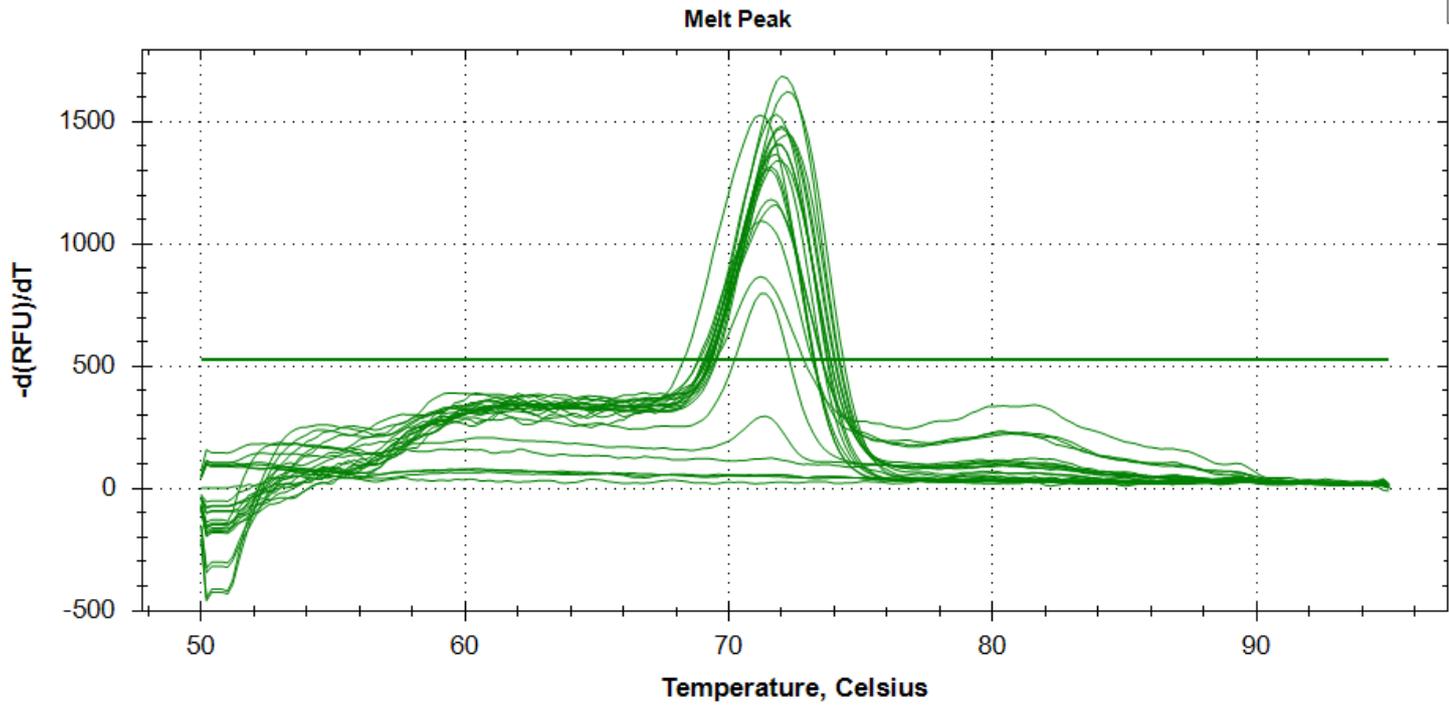
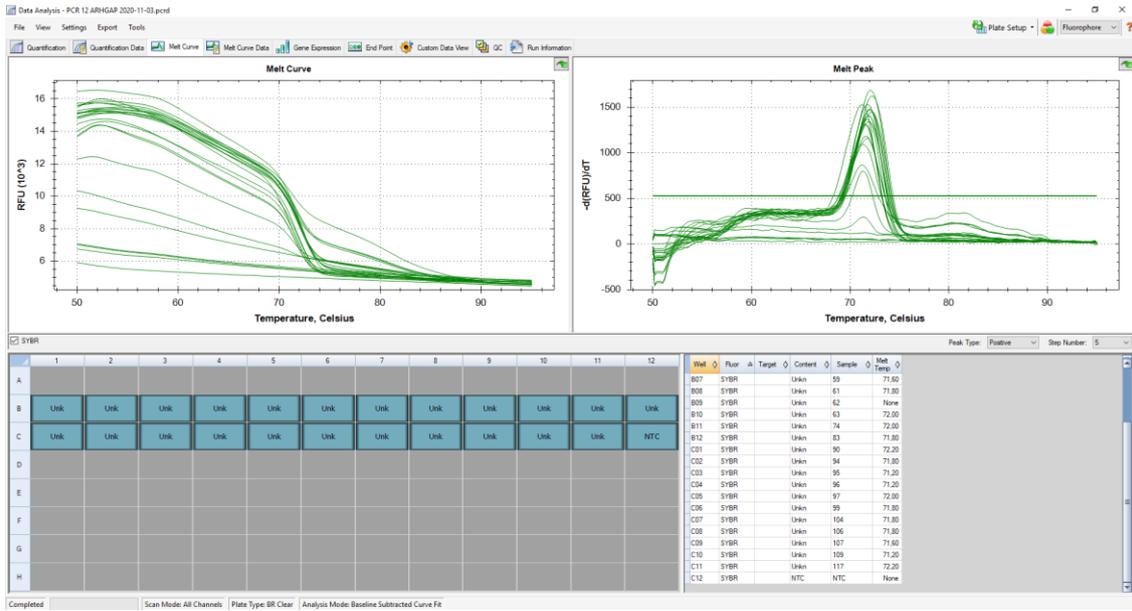
5.4.3. Análise da Associação Genótipos X Fenótipos

Para perceber a existência de associações entre os SNPs e o fenótipo da SCD consideramos 21 aspectos como: idade, número de transfusões e internamentos por ano, se já houve episódios de AVCs, níveis de hemoglobina fetal, hemoglobina, reticulócitos, eritrócitos, LDH, creatinina, bilirubina total e indireta, uréia, TGO e TGP, VGM, HGM, leucócitos, neutrófilos e plaquetas. (Tabela-5.3.3.1)

As análises de associação dos genótipos do SNP rs333 do gene CCR5 com os fenótipos de SCD analisados nos outros SNPs não foram possíveis devido a baixa frequência do alelo variante CCR5 Δ 32 tanto em homozigose quanto em heretozigose.

5.5. Gene ARHGAP

Para o SNP (rs11759328) do gene ARHGAP obtivemos amplificação para 195 das 200 amostras analisadas. Analisadas através de RT-PCR e a análise das Curvas de Fusão (Gráfico: 5.5.1). Com temperaturas de curvas de fusão variando de 70,4 °C a 72.5 °C (Anexo 9.1-Tabela Curva de Fusão).



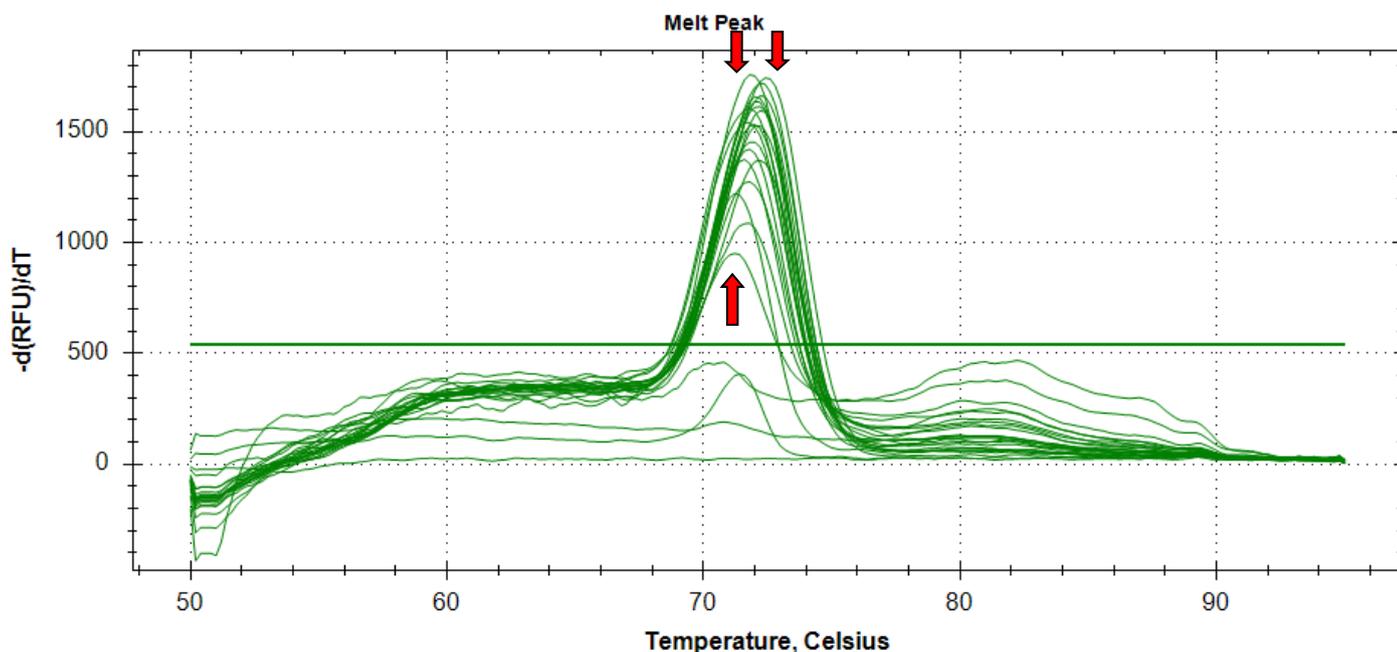
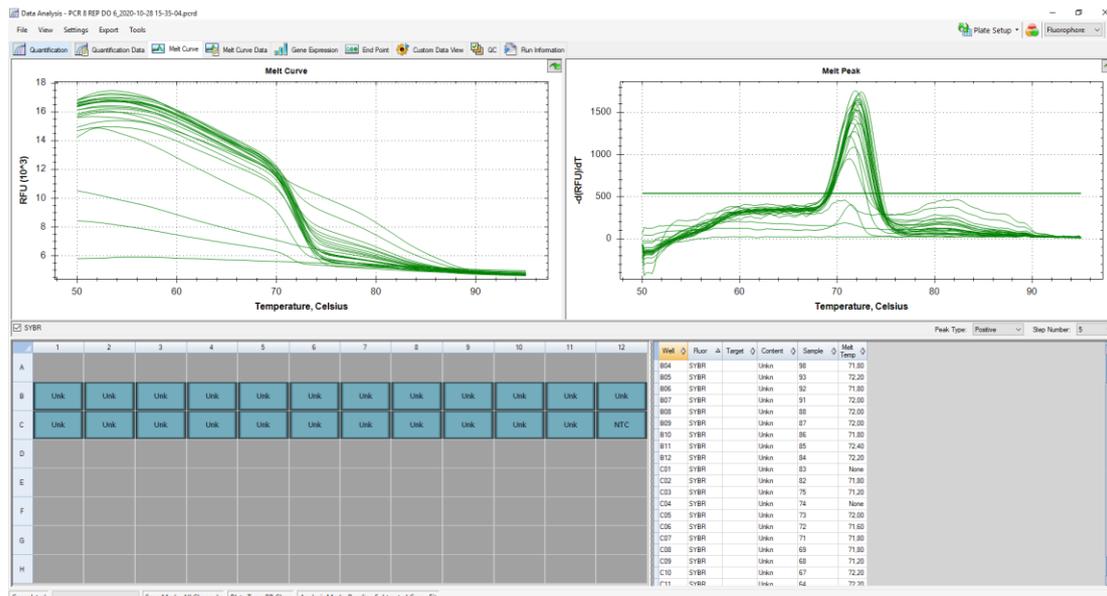


Gráfico 5.5.1: RT- PCR e Curvas de Fusão

Foram selecionadas 6 amostras, 2 amostras com temperaturas no extremo inferior, 2 amostras do extremo superior e duas amostras de temperatura medianas para verificar os genótipos através de método de Sequenciação de Sanger (Gráfico 5.5.2). Os dados obtidos na genotipagem para o SNP (rs11759328) foram considerados inconclusivos, por falta de sensibilidade da técnica utilizada e também não foram considerados para as análises feitas aos outros genes.

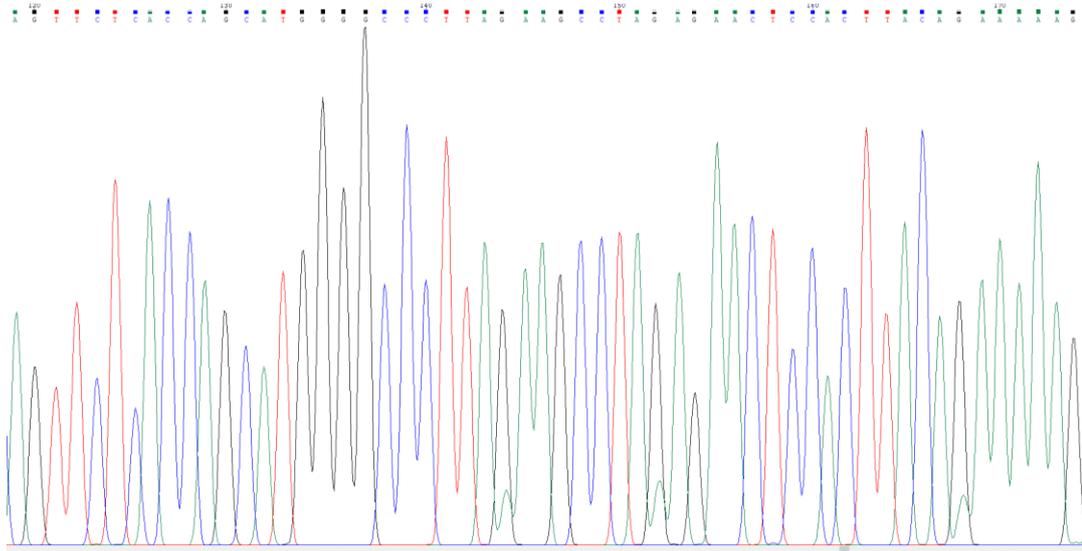


Gráfico 5.5.2: Sequenciação de Sanger

5.6. Análise da Associação Genótipos X Resposta HU

Dos 200 pacientes do estudo, 52 foram selecionados para administração de Hidroxiuréia. Após 6 meses de administração do fármaco novamente foram colhidas amostras para medir o nível de hemoglobina fetal desses pacientes, sendo assim possível verificar a variação dos índices de hemoglobina fetal.

O delta da variação de hemoglobina fetal foi estabelecido e adotado um ponto de corte da resposta ao fármaco como sendo “Bom Respondedor” aqueles que se enquadravam dentro dos 50% superiores e “Fracos Respondedor” aqueles que se enquadravam dentro dos 50% inferiores.

Após obtido esses dados de bons e fracos respondedores foi avaliado a associação dos genótipos dos SNPs selecionados com a resposta ao fármaco. (Tabela 5.6.1:

5.6.1. ASS1 X Resposta HU

Para o SNP rs10793902 ASS1, obtivemos para o genótipo “CC”, 8 bons respondedores e 7 fracos respondedores, para o genótipo “TT”, 4 bons respondedores e 7 fracos respondedores, para “CT” obtivemos 11 bons respondedores e 15 fracos respondedores. Após teste de χ^2 obtivemos um $p=0.664$

5.6.2. MAP3K5X Resposta HU

Para o SNP MAP3K5, obtivemos para o genótipo “CC”, 6 bons respondedores e 2 fracos respondedores, para o genótipo “TT”, 8 bons respondedores e 14 fracos respondedores, para “CT” obtivemos 9 bons respondedores e 13 fracos respondedores. Após teste de χ^2 obtivemos um $p=0.1556$.

5.6.3. Tox X Resposta HU

Para Tox, obtivemos para o genótipo “GG”, 3 bons respondedores e 4 maus respondedores, para o genótipo “AA”, 10 bons respondedores e 6 fracos respondedores, para “AG” obtivemos 10 bons respondedores e 19 fracos respondedores. Após teste de χ^2 obtivemos um $p=0.1933$.

5.6.4. CCR5 X Resposta HU

Para CCR5, obtivemos para o genótipo “CCR5”, 22 bons respondedores e 29 fracos respondedores, para o genótipo “CCR5/CCR5 Δ 32” obtivemos 1 bom respondedor e para “CCR5 Δ 32/CCR5 Δ 32” não obtivemos amostras com esse genótipo. Não sendo possível aplicar o teste χ^2 para análise de associação.

SNPs X RESPOSTA A HU				
SNPs	GENÓTIPO	BOM RESPONDEDOR	FRACO RESPONDEDOR	P-VALUE
ASS1	CC	8	7	0.664
	CT	4	7	
	TT	4	7	
MAP3K5	CC	6	2	0.156
	CT	9	13	
	TT	8	14	
Tox	GG	3	4	0.193
	AA	10	6	
	AG	10	19	
CCR5	CCR5	22	29	-
	CCR5/CCR5 Δ 32	1	0	
	CCR5 Δ 32	0	0	

Tabela 5.6.1: SNPs X Resposta HU

6. Discussão

Avaliação da variação genética e sua associação com a diversidade clínica de pacientes com SCD é uma das estratégias para elucidar sua etiologia subjacente, patogênese e desfechos da SCD(57).

O presente estudo, até onde sabemos, é o primeiro a analisar a associação entre cinco SNPs rs11759328 (ARHGAP), rs333 (CCR5), rs10793902 (ASS1), rs9483947 (MAP3K5) e rs836729 (Tox), com os fenótipos da SCD e a resposta á HU, em população angolana.

Objetivando investigar a potencial correlação dessas variantes genômicas, localizadas em genes que já se mostraram previamente envolvidos na modulação da expressão de genes da globina, e para isso selecionamos, com base em estudos que demonstram essa correlação, SNPs nos genes, ARHGAP18, ASS1, CCR5, MAP3K5, TOX.(43)(32)(36)(41)

Para esse estudos foram selecionadas 200 crianças angolanas, com doença falciforme, dessas 103 meninas e 97 meninos, com idade média de 6,6 anos, variando dos 3 aos 12 anos, onde 48 crianças foram classificados como tendo anemia moderada (28 meninas e 20 meninos) e 152 crianças foram classificados como tendo anemia severa (76 meninos e 76 meninas), a fim de determinar possíveis variações genômicas existentes nos loci genômicos mencionados acima.

Primeiramente foi verificado se a população estudada estava mantendo as proporções esperadas da frequência alélica e genotípica estando em equilíbrio de Hardy –Weinberg.

Para verificar a existência de variação nas frequências alélicas obtidas em nossas análises, utilizamos os dados fornecidos pelo projeto ALFA inserido no banco de dados NCBI como referência (62), sendo assim possível comparar as frequências alélicas esperadas para a população Global e Africana com dados obtidos na nossa população (Tabela-6.1).

Verificamos que os SNPs rs333 e rs10793902, mantiveram uma frequência muito aproximada aos números Globais e Africanos, ao contrario dos SNP rs9483947 e o SNP rs836729, os genótipos para o SNP rs9483947 encontrado na população tiveram um aumento na frequência do alelo “C” e uma diminuição do alelo “T” comparados a frequência desses alelos tanto na população Global e Africana.

O SNP 836729 demonstrou uma maior discrepância aos valores, tendo uma inversão nas frequências, onde o alelo “A” torna-se maioria em relação ao alelo “G”, o que nos leva a pensar que na população estudada esse gene pode ter sofrido uma seleção, pois o alelo selvagem está sendo menos freqüente que o alelo variante.

A presença do alelo variante confere melhor prognóstico da doença com isso reduz a taxa de mortalidade para os pacientes que possuem o alelo variantem com isso podemos associar o alelo selvagem a uma taxa maior de mortalidade, forçando um

aumento do alelo variante. Para corroborar nossas observações realizamos o teste Exato de Fisher, com um valor de $p < 0,05$ comprovamos que os SNPs rs9483947 ($p = 0.04049$) e rs836729 ($p = 0.03081$) não mantinham a frequência alélica esperada para população angolana como vemos na base de dados ALFA.

SNP	Frequência alélica ALFA		Frequência alélica encontrada
	Global	Africana	Angolana
rs333			
ACA	0,907	0,976	0,995
del	0,092	0,023	0,005
rs10793902			
C	0,430	0,564	0,530
T	0,569	0,435	0,470
rs9483947			
C	0,370	0,367	0,470
T	0,629	0,632	0,530
rs 836729			
G	0,797	0,762	0,435
A	0,202	0,237	0,565

Tabela-6.1: Frequências alélicas esperadas para a população Global, Africana e dados obtidos na nossa população Angolana.

A frequência do alelo representa a incidência de uma variante do gene em uma população, sendo calculada dividindo o número de vezes que o alelo de interesse é observado em uma população pelo número total de cópias de todos os alelos naquele locus genético específico na população. Em uma população, as frequências alélicas são um reflexo da diversidade genética. Mudanças nas frequências dos alelos ao longo do tempo podem indicar que a deriva genética está ocorrendo ou que novas mutações foram introduzidas na população ou que a população vem sofrendo forças seletivas (58).

Um tipo de pressão, seleção de equilíbrio, ocorre quando mais de um alelo é mantido em um locus. Esta seleção pode surgir da superdominância (na qual a aptidão dos heterozigotos em um locus é maior do que qualquer tipo de homozigoto) ou da seleção dependente de frequência, temporal ou espacial (59). Um caso clássico de superdominância ocorre no locus da hemoglobina- β em populações localizadas em regiões endêmicas de malária. Os homozigotos para um alelo têm anemia falciforme e os homozigotos para o outro alelo apresentam um risco aumentado de malária. Em contraste, os heterozigotos são protegidos da malária e, no máximo, apresentam um caso leve de anemia falciforme (60).

Após verificarmos se a população estudada estava mantendo os padrões as proporções esperadas da frequência alélica e genotípica, foi verificado se a população

encontrava-se em equilíbrio, para isso utilizamos o teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para o SNP rs9483947 do gene MAP3K5 foi observado um pequeno desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 3.9326$ $p = 0,0473$) com uma diminuição do genótipo de tipo selvagem TT (31.43%) e de heterozigotos de CT (42.41%) e um ligeiro aumento do homozigoto variante TT (26.17%).

Já no SNP rs836729 do gene Tox foi observados um pequeno desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 4.6175$ $p = 0,0316$) com um ligeiro aumento do genótipo de tipo selvagem AA (28,07%) e de heterozigotos de AG (56,46%) e uma diminuição do homozigoto variante GG (15,47%).

Sendo o princípio de Hardy-Weinberg um princípio fundamental na genética de populações relevante em muitas áreas relacionadas das ciências da vida, como epidemiologia, bioinformática e bioestatística. Em sua forma mais elementar, a lei afirma que as freqüências do genótipo AA, AB e BB para um marcador bi alélico autossômico ocorrerão nas proporções relativas p^2 , $2pq$ e q^2 , onde p é a freqüência do alelo de A e $q = 1 - p$ a freqüência do alelo de B. Na ausência de forças perturbadoras (migração, seleção e assim por diante), essas proporções serão alcançadas em uma geração de acasalamento aleatório e, posteriormente, o genótipo e as freqüências do alelo permanecerão inalterados ao longo das gerações. Nesse estado, a população está em equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE) (63).

Para estudos de base populacional, os dados do genótipo de todos os indivíduos para estudos de características quantitativas são analisados para determinar se há desvios do HWE (64). Os erros de genotipagem podem criar desvio positivo, negativo ou nenhum desvio do HWE, dependendo de como o erro de genotipagem ocorreu. Em geral, o teste de desvio do HWE não é uma abordagem poderosa para detectar erros de genotipagem (65).

Os desvios do HWE não são necessariamente devidos a erro de genotipagem e podem ser devidos ao acaso ou a fatores genéticos que incluem uma vantagem heterozigótica, mistura / subestrutura populacional, endogamia ou variantes do número de cópias (66). Por exemplo, a subestrutura da população cria um excesso de genótipos homozigotos e, portanto, um coeficiente HWE positivo. Desvios de HWE que são observados apenas em dados de genótipo de casos podem ser devido a uma associação entre a característica e um locus funcional ou um marcador SNP que está em desequilíbrio de ligação (LD) com um locus funcional. (67).

Após os resultados da análise do equilíbrio de HW procuramos perceber a existência de associações entre os genótipos dos SNPs rs10793902, rs9483947 e rs836729 e o fenótipo da SCD. Para isso considerados 21 aspectos como sendo os a importantes para essa avaliação, foram então considerados: idade, número de transfusões e internamentos por ano, se já houve episódios de AVCs, níveis de hemoglobina fetal, hemoglobina, reticulócitos, eritrócitos, LDH, creatinina, bilirubina total e indireta, uréia, TGO e TGP, VGM, HGM, leucócitos, neutrófilos e plaquetas.

Na associação entre o genótipo e os fenótipos para o gene ASS1 encontramos ligeiro aumento para o indicador da bilirrubina indireta (mg/dL) com valor de $p=0,0414$ e uma diminuição dos episódios de AVCs com valor de $p=0,0473$.

A hiperbilirrubinemia é comum em pacientes com SCD, principalmente não conjugada e deriva da hemólise crônica de hemácias. Além disso, foi relatado que pacientes com colestase falciforme intra-hepática SCIC tem uma taxa de mortalidade geral de até 50% em adultos e 31% em pacientes pediátricos devido a coagulopatia e insuficiência hepática fulminante (69).

O envolvimento do fígado na SCD pode se manifestar principalmente como crise hepática falciforme aguda (ASHC) e crise de sequestro hepático e colestase falciforme intra-hepática (SCIC), por isso podemos considerar esse achado como sendo de grande importância, como um biomarcador de fatores ligados ao aumento da hemólise causada na SCD. (68)

O AVC como complicação da SCD afeta 6 a 17% das crianças e adultos jovens em todo o mundo. O risco de acidente vascular cerebral é maior durante a primeira década de vida e é mais significativo entre as idades de 2 e 5 anos. Aproximadamente 10% dos pacientes terão um AVC por volta dos 20 anos. Os subtipos de AVC variam de acordo com a idade em pacientes com SCD. A incidência de AVC isquêmico, que constitui 54% de todos os AVCs na SCD, é maior durante a primeira década de vida e após os 30 anos de idade. O AVC hemorrágico é mais comum em indivíduos na casa dos 20 anos (70). Uma criança com SCD tem risco de derrame 333 vezes maior do que uma criança saudável sem SCD ou doença cardíaca (70).

Para o gene MAP3K5 encontramos um aumento significativo para o LDH (UI/L) com valor de $p=0.0016$.

Na SCD o papel do LDH é altamente controverso. Por definição, a SCD é um distúrbio hemolítico dos eritrócitos. Todas as variantes de SCD têm graus variáveis de hemólise e, portanto, têm graus variáveis de níveis elevados de LDh que são mais graves na SCD. Além disso, a gravidade da hemólise varia entre os pacientes, dependendo do nível de hemoglobina F, da presença ou ausência de deleção de um gene coexistente e dos haplotipos β s.(71)

Dada a abundância relativa de LDH em diferentes tecidos e os danos aos tecidos que acompanham a SCD, os níveis de LDH são frequentemente altos ou muito altos no estado estacionário de pacientes com SCD. Conceitos que associam hiperemólise a certas complicações específicas da SCD, incluindo hipertensão pulmonar, úlceras de perna e priapismo, são muito atraentes e fornecem guias práticos no tratamento de pacientes com SCD.(72)

Para genótipos do SNP rs836729 do gene Tox não foi encontrado nenhum valor de associação estatisticamente significativo entre os parâmetros avaliados.

O SNP rs11759328 aqui estudado, encontrado na região do íntron de ARHGAP18, está associado à expressão de HbF, o que pode conferir uma elevação dos níveis de HbF em pacientes chineses com β -talassemia (42). Neste estudo, não conseguimos verificar se rs11759328 (alelo A) estava associado aos níveis de HbF e aos outros 21 aspectos classificados como importantes no fenótipo da SCD, também não foi possível encontrar associações com a resposta a HU, pois a técnica utilizada não demonstrou ter sensibilidade suficiente para diferenciar as temperaturas de curvas de fusão obtidas nos diferentes tipos de genótipos conferidos ao SNP.

Na população angolana, não há literatura publicada ainda, até onde sabemos, nem sobre de CCR5 Δ 32 entre pacientes com SCD, e se esses polimorfismos poderiam oferecer um benefício seletivo para os pacientes.

Em nossos resultados para a genotipagem do SNP rs333 do gene CCR5, somente foi encontrado 1 paciente com o alelo variante CCR5 Δ 32, e 199 pacientes com alelo selvagem CCR5, conseguimos verificar a frequência alélica e genotípica do SNP na população estudada e a mesma seguia a uma frequência um pouco inferior para o alelo variante comparado a população Global e Africana. Para as análises da associação entre os genótipos do SNP rs333 e aspectos fenotípicos da SCD e a resposta a HU, não obtivemos dados com significado estatístico suficiente para avaliar essas associações.

O SNP rs333 do gene CCR5 foi sugerido em vários estudos como sendo um biomarcador genético molecular que identifica a suscetibilidade a várias doenças inflamatórias (50) (74), e esses estudos também revelaram que o polimorfismo variante CCR5- Δ 32 (rs333), uma deleção de 32 pb na região codificadora no exão 1 do gene CCR5, levou à regulação negativa do gene com resposta Th1 menos eficiente (51) (75).

Portanto, considerando o papel inflamatório na fisiopatologia da SCD, o alelo variante CCR5 Δ 32, que codifica o receptor de quimioquina C-C truncado tipo 5 (CCR5), pode oferecer um benefício seletivo em seu portador, pois proporciona uma resposta Th1 mais eficiente. Com isso podemos entender o papel das variações genéticas que podem explicar a diversidade clínica e as taxas variáveis de resposta ao tratamento entre pacientes com SCD (14) (76).

Para o SNP rs10793902 encontrado no gene ASS1, não conseguimos encontrar associação entre os seus genótipos e a resposta a administração de HU, ($p=0.6872$).

ASS1 um dos genes citados em trabalhos anteriores pelo envolvimento na biossíntese e sinalização do óxido nítrico, no aumento dos níveis de HbF (indicativo de gravidade da doença β -talassêmica em pacientes com hemoglobinopatia do tipo Beta, na eficácia do tratamento com HU em pacientes com talassemia SCD / β (44) e

previamente associados a uma alteração significativa em HbF (% ou g / dl) em pacientes com SCD (77,) o ASS1 codifica para argininosuccinato sintetase-1 (EC 6.3.4.5), uma enzima que está envolvida na síntese de arginina e é de fundamental importância na síntese de óxido nítrico(78).

ASS1 foi relatado em um estudo de associação de SNP significativamente associado à resposta ao tratamento com HU em pacientes com SCD (79).

Além disso, descobriu-se que ASS1 é expresso diferencialmente entre células progenitoras hematopoiéticas respondedores a HU e não respondedores a HU, após tratamento com HU (80).

Curiosamente, o fenilbutirato de sódio (BUPHE NYL, AMMONAPS) e ASS1 foram originalmente considerados como um par de biomarcador de fármaco pela FDA(81) e pela EMA(82). Fenilbutirato de sódio, um medicamento indicado cromoterapia adjuvante no tratamento crônico dos distúrbios do ciclo da uréia foi relatada como capaz de indução transitória da expressão do gene da γ -globina(83).

Uma vez que uma explicação mecanicista óbvia para a associação de rs10793902 com a eficácia do tratamento de HU está faltando, pode-se apenas especular que essas variantes podem estar ligadas a outros elementos genômicos que conferem capacidades funcionais alteradas para qualquer mRNA ou proteína ASS1. Uma hipótese é que rs10793902 induz a biossíntese de óxido nítrico, seja por meio de splicing e / ou ligação de miRNA (84) e, finalmente, aumentam os níveis de γ -globina, via direcionamento de guanilil ciclase (85).

Com relação ao SNP rs836729 Tox, já foi demonstrado implicações na modulação dos níveis de HbF em pacientes adultos que sofrem de tipo b-hemoglobinopatias, e pode ser considerada como biomarcador genômico para prever a resposta a terapia HU em HbS-b-tal heterozigotos compostos e / ou gravidade da doença b-tal(36).

Para a associação entre os genótipos do SNP rs836729 do gene Tox e os fenótipos de SCD estudados, não foi encontrada associação entre os genótipos e a resposta ao tratamento co HU ($p=0.1386$) em nossa população.

Em estudos anteriores foram encontrados fortes associações nas alterações de porcentagem de HbF e na resposta a terapia a HU para o SNP rs9483947 (MAP3K5)(36).

Nossos achados não demonstraram associação do SNP rs9483947 do gene MAP3K5 com a resposta à terapia com HU ($p=0.2128$).

Sendo, MAP3K5 um membro das vias p38 e JNK MAPK, envolvido em várias cascatas de sinalização ativadas por sinais de sobrevivência e mitogênicos, ou como uma resposta a vários estresses celulares.

O p38 e a via JNK MAPK são alguns dos mecanismos que foram propostos para estar envolvidos na indução da produção de Hb F mediada por HU. Parece que a presença

de uma repetição GCGCG extra pode resultar na diminuição da expressão do gene MAP3K5, possivelmente perturbando o p38 e a via JNK MAPK, levando à incompetência de NRs para obter benefícios de HU(54).

Sendo assim nenhum dos SNPs selecionados mostrou associação com a resposta a terapia com HU, podemos relacionar essa não associação com o número reduzido da nossa amostra e o tempo entre o início da terapia e a colheita das amostras, pois somente 52 pacientes foram tratados com o fármaco e as amostras foram colhidas 6 meses após essa administração. Acreditamos que aumentando o número de pacientes tratados e analisando os dados da resposta após pelo menos 1 ano da administração será possível verificar associações semelhantes as encontradas nos estudos que possuíam uma coorte maior e que analisaram a resposta após 2 anos de tratamento com HU.

Podemos também relacionar a não associação dos SNPs com os fenótipos da SCD e com a resposta a HU a regulação da expressão dos genes onde encontramos os SNPs selecionados por RNA não codificantes, que podem promover o silenciamento desses genes, com isso os pacientes não expressam esses genes e não se beneficiam com os aspectos de melhores fenótipos e na melhor resposta a HU.

7. Conclusão

No presente estudo, tivemos como objetivo identificar a presença de 5 SNPs em genes que se encontram fora da cadeia das globinas, mas previamente associados em outras populações aos fenótipos de gravidade da Anemia Falciforme, níveis de HbF e resposta a Hidroxiuréia, e verificar a existência dessas associações em uma população angolana.

Compreender e conhecer SNPs nos genes como, ARHGAP 18, ASS1, CCR5, MAP3K5, TOX, considerados em outros estudos como possíveis biomarcadores para a gravidade dos fenótipos da SCD, os níveis variáveis da HbF e como biomarcadores farmacogenómicos para tratamentos.

Isso nos ajuda a compreender o mecanismo da SCD que envolve esses genes e SNPs e a esclarecer como uma condição genética causada pela troca de um único aminoácido pode causar diferenças tão extensas entre os sintomas ligeiros em alguns pacientes e sintomas extremamente agressivos em outros pacientes.

Esse conhecimento possibilita prever a eficácia dos tratamentos e criar novas estratégias de tratamento que melhore a qualidade de vida do paciente e encontrarmos uma possível cura. Podemos com isso evitar tratamentos invasivos, caros e que muitas vezes não atingem o efeito esperado.

Nesse estudo conseguimos verificar a associação do SNP rs10793902 ASS1 onde encontramos ligeiro aumento para bilirrubina indireta (mg/dL) com valor de $p=0,0414$ e uma diminuição dos episódios de AVCs com valor de $p=0,0473$ e para o SNP rs9483947 MAP3K5 encontramos um aumento significativo para o LDH (UI/L) com valor de $p=0.0016$.

Sendo a bilirrubina e o LDH metabolitos diretamente envolvidos em vias do metabolismo comprometidas pela SCD, e os episódios de AVCs complicações muitas vezes graves para o prognóstico do desenvolvimento da SCD consideramos que essa descoberta possa abrir um caminho para futuras investigações aumentando o número de participantes investigação e abrindo o leque de SNPs considerados, ou até mesmo a verificação de outros fatores envolvidos na expressão genotípica como os RNAs não codificantes em especial os microRNAs.

Afim de verificar a associação dos SNPs com a resposta a HU devemos aumentar o número de pacientes tratados com o fármaco e aumentar o tempo entre o a administração e a colheita das amostras, que nesse estudo foi de 6 meses após a administração, sugerimos que esse tempo seja de pelo menos 1 ano.

8. Bibliografia

1. Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sickle cell disease. *Lancet* [Internet]. 2017;390(10091):311–23. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30193-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30193-9)
2. Williams TN, Weatherall DJ. World Distribution, Population Genetics, and Health Burden of the Hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012;2:1–14. Available from: <http://perspectivesinmedicine.org/content/2/9/a011692.full.pdf>
3. Hoeger U, Harris JH. Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and Other Body Fluid Proteins [Internet]. Mendeley, editor. Mendely; 2020. 297–322 p. Available from: https://www.mendeley.com/catalogue/22c45b0b-8d6d-318d-af81-618ab4f72ae9/?utm_source=desktop&utm_medium=1.19.8&utm_campaign=open_catalog&userDocumentId=%7B5946c1d1-f25e-48dc-9efd-620848110374%7D
4. William P. Winter PD. A Brief History of Sickle Cell Disease. Mendeley. 2010. p. <http://www.sicklecell.howard.edu/ABriefHistoryofSi>.
5. James B. Peculiar Physical. *Karolinska Institutet Univ Libr*. 1910;VI(5):517.
6. Savitt TL. Learning about sickle cell: The patient in early sickle cell disease case reports, 1910-1933. *J Natl Med Assoc* [Internet]. 2014;106(1):31–41. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-9684\(15\)30068-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-9684(15)30068-7)
7. OGIER TL. Hereditary Predisposition. *Bost Med Surg J*. 1848;39(1):11–5.
8. Strasser BJ. “Sickle cell anemia, a molecular disease.” *Science* (80-). 1999;286(5444):1488–90.
9. Elliott R. © 1956 Nature Publishing. *Nature*. 1956;
10. Manning LR, Russell JE, Padovan JC, Chait BT, Popowicz A, Manning RS, et al. Human embryonic, fetal, and adult hemoglobins have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell. *Protein Sci*. 2007;16(8):1641–58.
11. Cadeia V. Abordagem Laboratorial Hemoglobina Hemoglobinopatias As hemoglobinopatias resultam de mutações que cadeias de globina da hemoglobina . *Inst Nac Saúde*. 2019;1–15.
12. Odièvre M-H, Verger E, Silva-Pinto AC, Elion J. Pathophysiological insights in sickle cell disease. *Indian J Med Res*. 2011;
13. Hyacinth HI, Gee BE, Hibbert JM. The Role of Nutrition in Sickle Cell Disease. *Nutr Metab Insights*. 2010;3:NMI.S5048.
14. Brittenham GM, Schechter AN, Constance TN. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with reduced incidence of acute chest syndrome among children with sickle cell disease. *Bloodjournal*.

- 1985;65(1):183–9.
15. Brugnara C, De Franceschi L, Alper SL. Inhibition of Ca²⁺-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest.* 1993;92(1):520–6.
 16. Lachant NA, Davidson WD, Tanaka KR. Hydroxyurea in Sickle Cell Disease: Drug Review. *Am J Hematol.* 1983;15(1):1–13.
 17. Chirico EN, Pialoux V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life.* 2012;64(1):72–80.
 18. Gardner R V. Sickle cell disease: Advances in treatment. *Ochsner J.* 2018;18(4):377–89.
 19. Romana M, Connes P, Key NS. Microparticles in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;68(2–3):319–29.
 20. Stevens M, Frobisher C, Hawkins M, Jenney M, Lancashire E, Reulen R, et al. The British Childhood Cancer Survivor Study: Objectives, methods, population structure, response rates and initial descriptive information. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;50(5):1018–25.
 21. Chen SY, Wang Y, Telen MJ, Chi JT. The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. *PLoS One.* 2008;3(6).
 22. El Nemer W, Colin Y, Le Van Kim C. Les protéines Lu/BCAM dans les maladies du globule rouge. *Transfus Clin Biol.* 2010;17(3):143–7.
 23. El Nemer W, Wautier MP, Rahuel C, Gane P, Hermand P, Galactéros F, et al. Endothelial Lu/BCAM glycoproteins are novel ligands for red blood cell $\alpha 4\beta 1$ integrin: Role in adhesion of sickle red blood cells to endothelial cells. *Blood.* 2007;109(8):3544–51.
 24. Zhao Y, Schwartz EA, Palmer GM, Zennadi R. MEK1/2 inhibitors reverse acute vascular occlusion in mouse models of sickle cell disease. *FASEB J.* 2016;30(3):1171–86.
 25. 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.
 26. Chien S, Usami S, Bertles JF. Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest.* 1970;49(4):623–34.
 27. Keikhaei B, Mohseni AR, Norouzirad R, Alinejadi M, Ghanbari S, Shiravi F, et al. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. *Eur Cytokine Netw.* 2013;24(1):45–52.
 28. Knight-Perry J, Debaun MR, Strunk RC, Field JJ. Leukotriene pathway in sickle cell disease: A potential target for directed therapy. *Expert Rev Hematol.* 2009;2(1):57–68.
 29. Van Kaer L, Parekh V V., Wu L. Invariant natural killer T cells as sensors and

- managers of inflammation. *Trends Immunol.* 2013;34(2):50–8.
30. Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL, Old JM, Petrou M, Galanello R, Giordano P, et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):426–37.
 31. Tisdale BJJ, Thein SL, Eaton WA. Treating sickle cell anemia. *Science* (80-). 2020;367(6483).
 32. Cocou S, Alexandre M, Vitória E, Caroline A, Samuel U, Suellen N, et al. Hydroxyurea in the management of sickle cell disease : pharmacogenomics and enzymatic metabolism. *Pharmacogenomics J.* 2018;
 33. Polonica AH. Retrospection of the effect of hydroxyurea treatment in patients with sickle cell disease. *Acta Haematol Pol.* 2018;49(March):1–8.
 34. Agrawal RK, Patel RK, Shah V, Nainiwal L, Trivedi B. Hydroxyurea in sickle cell disease: Drug review. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2014;30(2):91–6.
 35. Mnika K, Pule GD, Dandara C, Wonkam A. An expert review of pharmacogenomics of sickle cell disease therapeutics: Not yet ready for global precision medicine. *Omi A J Integr Biol.* 2016;20(10):565–74.
 36. Koliopoulou A, Siamoglou S, John A, Sgourou A, Kourakli A, Symeonidis A, et al. Role of Genomic Biomarkers in Increasing Fetal Hemoglobin Levels Upon Hydroxyurea Therapy and in β -Thalassemia Intermedia : A Validation Cohort Study Role of Genomic Biomarkers in Increasing Fetal Hemoglobin Levels Upon Hydroxyurea Therapy and in β -Thal. *Hemoglobin Int J Hemoglobin Res.* 2019;0269.
 37. Strader MB, Liang H, Meng F, Harper J, Ostrowski DA, Henry ER, et al. Interactions of an Anti-Sickling Drug with Hemoglobin in Red Blood Cells from a Patient with Sickle Cell Anemia. *Bioconjug Chem.* 2019;30(3):568–71.
 38. Olowoyeye A, Okwundu CI. Gene therapy for sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;2020(11).
 39. Frati G, Miccio A. Genome Editing for β -Hemoglobinopathies: Advances and Challenges. *J Clin Med.* 2021;10(3):482.
 40. Jaseb K, Ramezani A, Far MAJ, Mohammadi-Asl J, Khosravi A, Saki N. Association between beta globin haplotypes, HBBP1 and HMOX1 polymorphisms in relation to HbF among sickle cell anemia patients: a study in Southwest Iran. *Comp Clin Path.* 2017;26(5):1149–55.
 41. Bakr S, Khorshied M, Talha N, Jaffer KY, Soliman N, Eid K, et al. Implication of HMOX1 and CCR5 genotypes on clinical phenotype of Egyptian patients with sickle cell anemia. *Ann Hematol.* 2019;98(8):1805–12.
 42. He Y, Luo J, Chen Y, Zhou X, Yu S, Jin L, et al. ARHGAP18 is a novel gene under positive natural selection that influences HbF levels in β -thalassaemia. *Mol Genet Genomics.* 2018;293(1):207–16.
 43. Jomoui W, Tepakhan W, Yamsri S, Srivorakun H, Fucharoen G, Fucharoen S.

- A novel SNP rs11759328 on Rho GTPase-activating protein 18 gene is associated with the expression of Hb F in hemoglobin E-related disorders. *Ann Hematol.* 2020;99(1):23–9.
44. Ali BR. Genomic variants in the ASS1 gene, involved in the nitric oxide biosynthesis and signaling pathway, predict hydroxyurea treatment efficacy in compound sickle cell disease/ β -thalassemia patients. *Futur Med.* 2016;
 45. Chang GH, Lay AJ, Ting KK, Zhao Y, Coleman PR, Powter EE, et al. Arhgap18: An endogenous inhibitor of angiogenesis, limiting tip formation and stabilizing junctions. *Small GTPases.* 2014;5(3):1–15.
 46. Maeda M, Hasegawa H, Hyodo T, Ito S, Asano E, Yuang H, et al. ARHGAP18, a GTPase-activating protein for RhoA, controls cell shape, spreading, and motility. *Mol Biol Cell.* 2011;22(20):3840–52.
 47. Li X, Tao Y, Wang X, Wang T, Liu J. Advanced glycosylation end products (AGEs) controls proliferation, invasion and permeability through orchestrating ARHGAP18/RhoA pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Glycoconj J.* 2020;37(2):209–19.
 48. Coleman PR, Hahn CN, Grimshaw M, Lu Y, Li X, Brautigan PJ, et al. Stress-induced premature senescence mediated by a novel gene, SENEX, results in an anti-inflammatory phenotype in endothelial cells. *Blood.* 2010;116(19):4016–24.
 49. Lay AJ, Coleman PR, Formaz-Preston A, Ka Ting K, Roediger B, Weninger W, et al. ARHGAP18: A flow-responsive gene that regulates endothelial cell alignment and protects against atherosclerosis. *J Am Heart Assoc.* 2019;8(2).
 50. Silva-carvalho WHV, Moura RR De, Victor A, Coelho C, Crovella S, Guimar RL. Frequency of the CCR5-delta32 allele in Brazilian populations: a systematic literature review and meta-analysis. *Mendeley.* 2016;
 51. Lopes MP, Nueldo M, Santos N, Faber EW, André M, Bezerra C, et al. The CCR5 Δ 32 Polymorphism in Brazilian Patients with Sickle Cell Disease. *Dis Markers.* 2014;2014.
 52. Cokic VP, Andric SA, Stojilkovic SS, Noguchi CT, Schechter AN. Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. *Am Soc Hematol.* 2016;111(3):1117–24.
 53. Fernandez-fernandez B, Sanz AB, Ortiz A, José J, Sanchez-ni MD. MAP3K kinases and kidney injury. *Rev la Soc Española Nefrol.* 2019;(x x):1–13.
 54. Tafrali C, Paizi A, Radmilovic M, Bartsakoulia M, Giannopoulou E, Giannakopoulou O, et al. Genomic variation in the MAP3K5 gene is associated with β - thalassemia disease severity and hydroxyurea treatment efficacy R esearch A rticle. *Futur Med.* 2013;469–83.
 55. Flaherty EO, Kaye J. TOX defines a conserved subfamily of HMG-box proteins. *BMC Genomics BioMed Cent.* 2003;10:1–10.
 56. Scott AC, Dündar F, Zumbo P, Chandran SS, Klebanoff CA, Shakiba M, et al. TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature.*

57. Bean CJ, Boulet SL, Ellingsen D, Pyle ME, Barron-Casella EA, Casella JF, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with reduced incidence of acute chest syndrome among children with sickle cell disease. *Blood*. 2012;120(18):3822–8.
58. Ilona Miko PD. *Nature*. 2014. p. (<https://www.nature.com/scitable/definition/allele>).
59. Charlesworth D. Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions. *PLoS Genet*. 2006;2(4):379–84.
60. Luzzatto L. Sickle cell anaemia and malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1).
61. Gao Z, Przeworski M, Sella G. Footprints of ancient-balanced polymorphisms in genetic variation data from closely related species. *Evolution (N Y)*. 2015;69(2):431–46.
62. National Center for Biotechnology Information. NCBI ALFA [Internet]. NCBI. 2021. p. dbSNP. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
63. Graffelman J, Weir BS. Testing for Hardy-Weinberg equilibrium at biallelic genetic markers on the X chromosome. *Heredity (Edinb)*. 2016;116(6):558–68.
64. Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A, et al. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet*. 2004;12(5):395–9.
65. Leal SM. Detection of genotyping errors and pseudo-SNPs via deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. *Genet Epidemiol*. 2005;29(3):204–14.
66. Deng HW, Chen WM, Recker RR. Population admixture: Detection by Hardy-Weinberg test and its quantitative effects on linkage-disequilibrium methods for localizing genes underlying complex traits. *Genetics*. 2001;157(2):885–97.
67. Dudbridge F, Gusnanto A. Estimation of significance thresholds for genomewide association scans. *Genet Epidemiol*. 2008;32(3):227–34.
68. Lacaille F, Allali S, de Montalembert M. The Liver in Sickle Cell Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2021;72(1):5–10.
69. Khurshid I, Anderson L, Downie GH, Pape GS. Sickle cell disease, extreme hyperbilirubinemia, and pericardial tamponade: Case report and review of the literature. *Crit Care Med*. 2002;30(10):2363–7.
70. Munube D, Katabira E, Ndeezi G, Joloba M, Lhatoo S, Sajatovic M, et al. Prevalence of stroke in children admitted with sickle cell anaemia to Mulago Hospital. *BMC Neurol*. 2016;16(1):1–6.
71. Ballas SK, Marcolina MJ. Determinants of red cell survival and erythropoietic activity in patients with sickle cell anemia in the steady state. *Hemoglobin*. 2000;24(4):277–86.
72. 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.
73. Ballas SK, Marcolina MJ. Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. *Transfusion.* 2006;46(1):105–10.
 74. Al-Jaberi SA, Ben-Salem S, Messedi M, Ayadi F, Al-Gazali L, Ali BR. Determination of the CCR5 Δ 32 frequency in Emiratis and Tunisians and the screening of the CCR5 gene for novel alleles in Emiratis. *Gene.* 2013;529(1):113–8.
 75. Ghorban K, Dadmanesh M, Hassanshahi G, Momeni M, Zare-Bidaki M, Arababadi MK, et al. Is the CCR5 Δ 32 mutation associated with immune system-related diseases? *Springer Sci.* 2013;36(3):633–42.
 76. Chies JAB, Hutz MH. High frequency of the CCR5 Δ 32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Brazilian J Med Biol Res.* 2003;36(1):71–5.
 77. Papantoni I, Borg J, Katsila T. Individualizing fetal hemoglobin augmenting therapy for β -type hemoglobinopathies patients. *Pharmacogenomics.* 2014;15:1355–64.
 78. Synthetase A, Gene ASS, Ha J, Engel K, Ho W, Sly WS. Mutations and Polymorphisms in the Human. *Hum Genome Variation Soc.* 2008;
 79. 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.
 80. Pourfarzad F, von Lindern M, Azarkeivan A, Hou J, Kia SK, Esteghamat F, et al. Hydroxyurea responsiveness in β -thalassemic patients is determined by the stress response adaptation of erythroid progenitors and their differentiation propensity. *Haematologica.* 2013;98(5):696–704.
 81. Jouini L, Sahli CA, Laaouini N, Ouali F, Ben Youssef I, Dakhlaoui B, et al. Association between clinical expression and molecular heterogeneity in β -thalassemia Tunisian patients. *Mol Biol Rep.* 2013;40(11):6205–12.
 82. Galanello R, Sanna S, Perseu L, Sollaino MC, Satta S, Lai ME, et al. Amelioration of Sardinian β 0 thalassemia by genetic modifiers. *Blood.* 2009;114(18):3935–7.
 83. Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood.* 2008;112(10):3927–38.
 84. Nuinon M, Makarasara W, Mushiroda T, Setianingsih I, Wahidiyat PA, Sripichai O, et al. A genome-wide association identified the common genetic variants influence disease severity in β 0-thalassemia/hemoglobin e. *Hum Genet.* 2010;127(3):303–14.
 85. Giannopoulou E, Bartsakoulia M, Tafrali C, Kourakli A, Poulas K, Stavrou EF, et al. A single nucleotide polymorphism in the HBBP1 gene in the human β -globin locus is associated with a mild β -thalassemia disease phenotype. *Hemoglobin.* 2012;36(5):433–45.

9. Anexo

9.1. Tabela de Curva de Fusão

SNP rs11759328 do gene ARHGAP				
Nº da amostra	Nome da amostra	Concentração de DNA (ng/μl)	Data do RT-PCR	Resultado
1	AF1	20.2	23/11/2020	72
2	AF2	18.5	2/11/2020	71.6
3	AF3	60.8	2/11/2020	72.2
4	AF4	13.9	2/11/2020	71.4
5	AF5	11.7	2/11/2020	71.8
6	AF6	19.3	2/11/2020	72
7	AF7	16.4	2/11/2020	71.4
8	AF8	17.1	2/11/2020	72
9	AF9	37.2	23/11/2020	70.4
10	AF10	30.8	2/11/2020	71.4
11	AF11	13.1	2/11/2020	71.6
12	AF12	171.2	2/11/2020	72
13	AF13	11.4	2/11/2020	não amplificou
14	AF14	12.4	2/11/2020	71.8
15	AF15	10.6	2/11/2020	71.8
16	AF16	9.34	2/11/2020	72.2
17	AF17	7.18	2/11/2020	72.2
18	AF18	1.89	2/11/2020	72
19	AF19	102	2/11/2020	71.8
20	AF20	20.6	2/11/2020	71.8
21	AF21	25.6	2/11/2020	71.6
22	AF22	56.4	2/11/2020	71.6
23	AF23	53	2/11/2020	72
24	AF24	33.8	2/11/2020	71.8
25	AF25	15.4	2/11/2020	71.4
26	AF26	12.9	2/11/2020	71.8
27	AF27	3.18	23/11/2020	71.8
28	AF28	5.94	2/11/2020	71.6
29	AF29	112.2	2/11/2020	71.4
30	AF30	6.08	2/11/2020	71.8
31	AF31	37.8	2/11/2020	71.4
32	AF32	61.4	2/11/2020	71.6
33	AF33	116	2/11/2020	71.8

SNP rs11759328 do gene ARHGAP

Nº da amostra	Nome da amostra	Concentração de DNA (ng/µl)	Data do RT-PCR	Resultado
34	AF34	13.3	2/11/2020	72.2
35	AF35	71.8	2/11/2020	71.8
36	AF36	20.8	2/11/2020	72.2
37	AF37	6.5	2/11/2020	71.6
38	AF38	4.16	23/11/2020	72
39	AF39	32.4	23/11/2020	71.2
40	AF40	41.6	2/11/2020	72
41	AF41	13.2	30/10/2020	72.4
42	AF42	70.8	30/10/2020	72
43	AF43	9.66	30/10/2020	72.4
44	AF44	26	30/10/2020	71.4
45	AF45	9.56	30/10/2020	72
46	AF46	35.6	30/10/2020	71.4
47	AF47	30.6	30/10/2020	71.6
48	AF48	12.6	30/10/2020	71.8
49	AF49	199.8	30/10/2020	71.8
50	AF50	26.2	30/10/2020	71.6
51	AF51	21	30/10/2020	71.6
52	AF52	18.8	30/10/2020	71.6
53	AF53	8.68	30/10/2020	71.6
54	AF54	11	30/10/2020	71.6
55	AF55	27.4	30/10/2020	72.4
56	AF56	8.38	30/10/2020	72.4
57	AF57	4.42	30/10/2020	não amplificou
58	AF58	5.84	30/10/2020	72.4
59	AF59	5.44	30/10/2020	72.2
60	AF60	17.8	30/10/2020	72
61	AF61	5.84	30/10/2020	71.8
62	AF62	23.4	23/10/2020	71.8
63	AF63	19.7	30/10/2020	72

SNP rs11759328 do gene ARHGAP

Nº da amostra	Nome da amostra	Concentração de DNA (ng/µl)	Data do RT-PCR	Resultado
64	AF64	8.18	28/10/2020	72.2
65	AF65	11.5	2/11/2020	72
66	AF66	18,1	2/11/2020	72.2
67	AF67	59.2	28/10/2020	72.2
68	AF68	49.2	28/10/2020	71.6
69	AF69	26.4	28/10/2020	71.8
70	AF70	21.6	2/11/2020	72
71	AF71	16.3	28/10/2020	71.8
72	AF72	116	28/10/2020	71.6
73	AF73	72.6	28/10/2020	72
74	AF74	37.6	28/10/2020	72
75	AF75	49.2	28/10/2020	71
76	AF76	32.2	2/11/2020	72
77	AF77	22.4	2/11/2020	72.2
78	AF78	26.6	2/11/2020	72
79	AF79	11.7	2/11/2020	72
80	AF80	6.42	23/11/2020	72.2
81	AF81	29.6	2/11/2020	72
82	AF82	99.8	28/10/2020	71.8
83	AF83	93.8	28/10/2020	71.8
84	AF84	35	28/10/2020	72.2
85	AF85	28.8	28/10/2020	72.4
86	AF86	78.5	28/10/2020	71.8
87	AF87	69.2	28/10/2020	72
88	AF88	11.9	28/10/2020	72
89	AF89	6.54	2/11/2020	71.8
90	AF90	32,8	3/11/2020	72.2
91	AF91	28.2	28/10/2020	72
92	AF92	87	28/10/2020	71.8
93	AF93	3.18	28/10/2020	72.2
94	AF94	8.96	3/11/2020	71.8
95	AF95	8.92	3/11/2020	71.2
96	AF96	56	3/11/2020	71.2
97	AF97	34.2	3/11/2020	72
98	AF98	27.6	28/10/2020	71.8
99	AF99	14,1	3/11/2020	71.8

SNP rs11759328 do gene ARHGAP				
Nº da amostra	Nome da amostra	Concentração de DNA (ng/µl)	Data do RT-PCR	Resultado
100	AF100	11	23/10/2020	72.2
101	AF101	8.26	23/10/2020	71.4
102	AF102	17.8	23/10/2020	72
103	AF103	18.6	23/10/2020	71.6
104	AF104	4	3/11/2020	71.8
105	AF105	72.2	23/10/2020	72
106	AF106	52.8	3/11/2020	71.8
107	AF107	60	3/11/2020	71.6
108	AF108	23.2	23/10/2020	71.8
109	AF109	54.5	3/11/2020	71.2
110	AF110	15.6	23/10/2020	72
111	AF111	51.2	23/10/2020	72
112	AF112	77.2	23/10/2020	71.8
113	AF113	8.88	23/10/2020	71.6
114	AF114	6.82	23/10/2020	72
115	AF115	57.6	23/10/2020	72
116	AF116	30.2	23/10/2020	72.2
117	AF117	15.2	3/11/2020	72.2
118	AF118	108	23/10/2020	71.8
119	AF119	1.8	23/10/2020	72.2
120	AF120	3.88	4/11/2020	71.8
121	AF121	13.9	4/11/2020	71.6
122	AF122	28.6	4/11/2020	72.2
123	AF123	43.8	23/10/2020	72.2
124	AF124	3.6	23/10/2020	71.4
125	AF125	42.2	23/10/2020	72.2
126	AF126	33	23/10/2020	72.2
127	AF127	9.2	23/10/2020	71.6
128	AF128	24.4	23/10/2020	72
129	AF129	8.96	4/11/2020	71.8
130	AF130	43	22/10/2020	71.8
131	AF131	17.9	22/10/2020	71.6
132	AF132	46.8	22/10/2020	Não amplificou

SNP rs11759328 do gene ARHGAP

Nº da amostra	Nome da amostra	Concentração de DNA (ng/µl)	Data do RT-PCR	Resultado
133	AF133	47	22/10/2020	72.4
134	AF134	21.6	22/10/2020	72.4
135	BAF1	10.2	22/10/2020	71.8
136	BAF2	16.8	22/10/2020	72.2
137	BAF3	18.7	22/10/2020	71.8
138	BAF4	6.86	22/10/2020	71.8
139	BAF5	25.6	22/10/2020	72.2
140	BAF6	8.68	4/11/2020	72.2
141	BAF7	15	22/10/2020	71.6
142	BAF8	35	22/10/2020	72.2
143	BAF9	23.2	22/10/2020	72
144	BAF10	90	22/10/2020	71.6
145	BAF11	9.04	22/10/2020	71.8
146	BAF12	11	22/10/2020	70.8
147	BAF13	50.8	22/10/2020	71.2
148	BAF14	110	4/11/2020	Não amplificou
149	BAF15	49.2	4/11/2020	72
150	BAF16	3.26	22/10/2020	71.8
151	BAF17	4.44	4/11/2020	72
152	BAF18	6.54	22/10/2020	72.2
153	BAF19	12.3	22/10/2020	71.6
154	BAF20	31.8	22/10/2020	72.2
155	BAF21	10.6	22/10/2020	71.6
156	BAF22	106	21/10/2020	72
157	BAF23	60	21/10/2020	72.4
158	BAF24	5.22	4/11/2020	72
159	BAF25	5.54	21/10/2020	72.4
160	BAF26	41.4	4/11/2020	72
161	BAF27	18.3	21/10/2020	72.4
162	BAF28	16.7	21/10/2020	71.6
163	BAF29	40.8	21/10/2020	71.8
164	BAF30	6.34	21/10/2020	72.2
165	BAF31	15.3	21/10/2020	71.8
166	BAF32	3.66	4/11/2020	72.4
167	BAF33	3.14	21/10/2020	72.4

SNP rs11759328 do gene ARHGAP

Nº da amostra	Nome da amostra	Concentração de DNA (ng/μl)	Data do RT-PCR	Resultado
168	BAF34	14.1	21/10/2020	72
169	BAF35	9.62	4/11/2020	72.2
170	BAF36	33.2	21/10/2020	72.2
171	BAF37	21.8	21/10/2020	72.2
172	BAF38	37.6	21/10/2020	72
173	BAF39	13.9	21/10/2020	72
174	BAF40	9.54	4/11/2020	72.4
175	BAF41	4.06	21/10/2020	72
176	BAF42	7.6	5/11/2020	72.2
177	BAF43	3.5	5/11/2020	71.6
178	BAF44	31.2	5/11/2020	71.8
179	BAF45	21.6	5/11/2020	71.6
180	BAF46	12.3	5/11/2020	71.8
181	BAF47	6.84	5/11/2020	71.6
182	BAF48	36.2	4/11/2020	72.4
183	BAF49	56.8	21/10/2020	Não amplificou
184	BAF50	10.4	21/10/2020	71.5
185	BAF51	29	5/11/2020	72
186	BAF52	12.4	4/11/2020	72.4
187	BAF53	12.7	5/11/2020	71.6
188	BAF54	9.12	5/11/2020	71.4
189	BAF55	9.74	5/11/2020	72.2
190	BAF56	13.9	5/11/2020	72
191	BAF57	5.04	5/11/2020	72.2
192	BAF58	13.8	5/11/2020	72.2
193	BAF59	45.2	5/11/2020	72
194	BAF60	19.6	5/11/2020	72.5
195	BAF61	28.2	5/11/2020	72
196	BAF62	12.7	5/11/2020	71.6
197	BAF63	29.2	21/10/2020	72.4
198	BAF64	8.24	5/11/2020	72.4
199	BAF65	36.6	5/11/2020	71.6
200	BAF66	9.3	5/11/2020	71.6