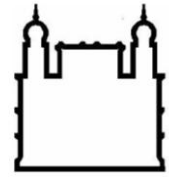




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA  
FALCIFORME DA REGIÃO SUL DA BAHIA**

**MILENA MAGALHÃES ALELUIA**

**Salvador – Bahia**

**2016**

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

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA  
FALCIFORME DA REGIÃO SUL DA BAHIA**

**MILENA MAGALHÃES ALELUIA**

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

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor.

**Salvador – Bahia**

**2016**


Título da Tese: " AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA FALCIFORME DA REGIÃO SUL DA BAHIA. "

**MILENA MAGALHÃES ALELUIA**


FOLHA DE APROVAÇÃO


Salvador, 12 de agosto de 2016

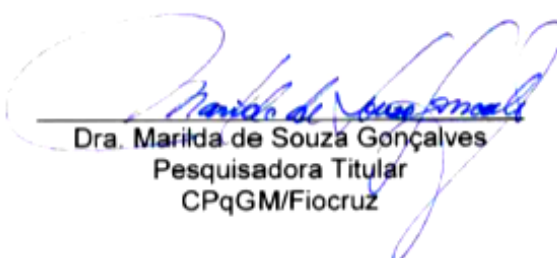
COMISSÃO EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Carmem Silva Bertuzzo  
Professora  
UNICAMP

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Cynara Gomes Barbosa  
Professora Adjunta  
UFBA

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ricardo Riccio Oliveira  
Pesquisador Adjunto  
IGM/Fiocruz

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Kiyoko Abe Sandes  
Professora Pleno  
UFBA

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Marilda de Souza Gonçalves  
Pesquisadora Titular  
CPqGM/Fiocruz

Trabalho realizado no Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional (LHGB) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/Fiocruz-Ba), após aprovação dos projetos de pesquisa no Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE 08452913.9.0000.0040), com auxílio financeiro do CNPq, FAPESB e PPSUS.

“É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz pra poder sorrir, é preciso a chuva para florir... Penso que cumprir a vida, seja simplesmente compreender a marcha, e ir tocando em frente...Cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si, carrega o dom de ser capaz... E ser feliz!”

***Almir Sater e Renato Teixeira***

## AGRADECIMENTO

A realização desse trabalho se entrelaça na conclusão de um sonho e, o início de uma nova jornada. Venho trilhando com muita fé, amor e determinação, com alguns tropeços da vida, que me fazem crescer a cada dia, com a certeza do quero!

A todas as bênçãos, boas energias e ensinamentos divinos!

Ao meu esposo, Felipe Kalil, por todo apoio quando achei que não fosse aguentar, pelas noites que dormia no sofá só para estar ao meu lado enquanto escrevia, pelo companheirismo e força quando precisei estar em Salvador e, acima de tudo pelo seu amor. Te dedico essa vitória!

A meus pais, Júlio Cezar e Teresa Cristina, tudo que sou hoje é reflexo de todo amor, educação e ensinamentos que me proporcionaram. Muito mais do que meu porto-seguro, vocês representam tudo de maravilhoso que um filho pode ter na vida! Obrigada pela família que somos!

Pequeno, mas imensamente notável, Augusto Cezar, mais que um irmão, um companheiro, conselheiro, amigo. Obrigada pelos puxões de orelha, sei que nada mais é do que uma demonstração de amor, fruto da mais pura e linda irmandade. Para sempre!

A Cezar e Maristela, pela certeza que esse sentimento de filha que tenho por vocês é de outras vidas, meus padrinhos, mas também, pai e mãe. Sinto-me imensamente afortunada e orgulhosa de ser tão amada por vocês. Obrigada por todo esse período que fizeram do seu lar, o meu; todo carinho, atenção e ensinamentos.

A Olga e Quico, por todo carinho, força e apoio. Muito mais que sogros, vocês são inexoravelmente especiais!

A tia Cristiane e família, pelas alegrias, conversas e, me receber tão carinhosamente em seu lar! Muito obrigada!

A todos familiares pela força, incentivo e todas as vibrações para que este momento se concretizasse.

A minha querida orientadora, Pró Marilda... A vida é uma caixinha de surpresas e me proporcionou trabalhar com uma das pessoas mais incríveis que já conheci; que emana boas energias e transmite paz! Muito obrigada pelos seus ensinamentos e conversas que me fazem crescer!

As consultoras acadêmicas, Rayra e Caroline, vocês são incríveis... Nossas resenhas, discussões, puxões de orelha, “hora do café”, carinho, cuidado, parceria, foram essenciais para a conclusão desse trabalho e, saibam que quero essa consultoria para a vida! Obrigada.

O doutorado me trouxe conhecimentos, lições... E uma pessoa maravilhosa, Júnia; muito bom compartilharmos aulas, estudos, discussões, tristezas, alegrias... Aprendi muito contigo e, tenho grande carinho e admiração! Valeu por tudo, Jú!

As minhas amigas, Tamara, Raquel, Renata, Ana Clara, Ednara, Luita e Emanuelle. Obrigada por todo apoio e carinho. Amigas Inesquecíveis!

Aos amigos da Rat Race: Felipe, Roberto, Paula, Ricardo, Aline, Hamilton, essa energia é muito boa e ninguém tira!

Aos amigos do Laboratório de Hematologia Genética e Biologia Computacional/CPqGM: Rayra, Caroline, Júnia, Silvana, Magda, Camylla, Luciana, Modeste, Sanzio, Corynne, Thassila, Rodrigo, Jeanne e Jaqueline.

As funcionárias do Laboratório de Hematologia Genética e Biologia Computacional e CPqGM, Jane, Taiane e Elze por todo apoio e dedicação.

Aos alunos de Iniciação científica: Bruna, Felipe e Larissa, pelo apoio na realização dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Patologia em Anemias/UFBA: Elisângela, Joelma, Cynara, Jean, Karina, Nathalie, Mirella e Suéllen.

As Dra. Teresa, Regiana e Fábila pela confiança em nosso trabalho, por todo apoio na realização desse trabalho e a toda equipe do Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna, Bahia (CERDOFI).

Aos pacientes e voluntários, muito grata pela confiança e, permitir a realização desse trabalho. Espero ter contribuído para melhoria da saúde de vocês.

Aos professores, funcionários do Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz-BA;

Ao apoio de toda equipe da biblioteca, Fiocruz-BA;

A CAPES pela concessão da bolsa;

E a todas as pessoas que contribuíram para o fechamento desse ciclo.

ALELUIA, Milena Magalhães. Avaliação de Biomarcadores em Indivíduos com Doença Falciforme da Região Sul da Bahia. 156 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** a doença falciforme (DF) é uma desordem genética com prevalência mundial elevada, clínica heterogênea e cursa com alterações nos parâmetros hematológicos, bioquímicos, presença da talassemia alfa deleção 3.7 Kb, haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S ( $\beta^S$ ) e de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) relacionados à síntese da HbF. Desta forma, torna-se importante a investigação de biomarcadores associados à gravidade e mecanismos fisiopatológicos da DF. **OBJETIVO:** investigar a população em estudo, caracterizar o perfil sociodemográfico, eventos clínicos, marcadores laboratoriais e genéticos associados aos mecanismos fisiopatológicos e a gravidade da DF. **MÉTODOS:** consiste em estudo de corte transversal, com casuística composta por 200 pacientes com DF acompanhados pelo Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna-Bahia (CERDOFI) e 36 pacientes com anemia falciforme (AF) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA), Brasil, no período de 2013 a 2015. Os indivíduos apresentavam faixa etária pediátrica e adulta, com 70,5 % (141/200) de pacientes com AF e 29,5 % (59/200) com a doença HbSC. Todos os envolvidos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e responderam ao questionário sociodemográfico. Foram realizadas análises dos parâmetros hematológicos, bioquímicos, metabólitos do óxido nítrico (NOm) e investigação do perfil de hemoglobinas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A talassemia alfa deleção de 3.7kb foi investigada pela reação em cadeia de polimerase (PCR). Os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S ( $\beta^S$ ) foram investigados por PCR e digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP); os SNPs nos genes *BCL11A* (rs6732518 e rs766432), *HMIP* (rs11759553 e rs35959442) e *OR51B5/6* (rs4910755 e rs7483122), no cromossomo 2, 6 e 11, respectivamente, foram investigados por PCR em Tempo Real utilizando sondas TaqMan. **RESULTADOS:** entre os pacientes acompanhados pelo CERDOFI, 52,0 % (104/200) eram do o sexo feminino, 22,0 % (44/200) possuíam faixa etária de 6 a 10 anos de idade e 20,0 % (40/200) de 21 a 30 anos (40/200). A cor parda autodeclarada foi descrita em 52,0 % (104/200) dos pacientes. Em relação à idade do primeiro diagnóstico, 38,0 % (76/200) dos pacientes foram diagnosticados até os 6 meses, sendo que 89,5 % (68/76) foram por triagem neonatal. No que se refere à escolaridade, 60,5 % (121/200) relataram algum grau de instrução. Observamos que 87,5 % (70/80) dos pacientes pediátricos fizeram uso de profilaxia medicamentosa. Encontramos que 91,8 % (90/98) das hospitalizações ocorreram entre pacientes os com AF sem uso de hidroxiureia (HU). A frequência da talassemia  $-\alpha^{3,7Kb}$  foi de 9% (36/400), sendo 12,5% (4/32) pacientes homocigotos ( $-\alpha/-\alpha$ ) e 87,5% (28/32) heterocigotos ( $-\alpha\alpha$ ); além disso, o haplótipo BEN foi mais frequente, seguido do haplótipo CAR. Entre os biomarcadores investigados nos pacientes com AF, evidenciamos que concentrações elevadas de desidrogenase láctica (LDH) corroboram um perfil hemolítico. Os metabólitos do óxido nítrico (NO) demonstraram influência na ativação endotelial, e concentrações elevadas de lipoproteína de alta densidade de colesterol (HDL-C) estiveram associadas a concentrações elevadas de lipoproteína de baixa densidade de colesterol (LDL-C), sugerindo o estabelecimento do subfenótipo dislipidêmico na AF. No que tange a co-herança da talassemia alfa com a AF foi observada melhora do quadro hemolítico, embora haja contribuição para viscosidade sanguínea, corroborando o subfenótipo vaso-oclusivo; além disso, verificamos associação com a



contagem diminuída de plaquetas. Na análise dos 177 pacientes com AF acompanhados no CERDOFI e HEMOBA encontramos que em relação ao perfil genético modulador da HbF, o haplótipo CAR foi o mais frequente e associado a concentrações intermediárias de HbF e elevadas de HbS. No que se refere ao tratamento com HU, os pacientes com AF receberam doses de 15, 20 e 25 mg/kg/dia e o tempo de utilização variou de 2 meses a 4 anos e 2 meses, observando melhora no perfil hematológico, com redução na contagem de leucócitos e plaquetas. Além disso, verificamos que a melhora dos parâmetros laboratoriais e perfil clínico estiveram associados ao tempo de utilização. A análise dos SNPs localizados nos genes *BCL11A*, *HMIP* e *OR51B5/6* demonstrou influência maior sobre o perfil hematológico e a associação do SNP *BCL11A* rs766432 com a utilização de HU e com o perfil hematológico demonstrando contagem elevada de hemácias, concentração elevada de hemoglobina, contagem menor de plaquetas e concentrações reduzidas de bilirrubina direta e indireta, sugerindo influência maior da presença do SNP na resposta terapêutica à HU. Em relação à caracterização clínica, a associação do SNP *BCL11A* rs766432 e HU demonstrou diminuição de eventos clínicos; entretanto, a litíase biliar foi mais observada entre os pacientes em uso de HU. Sugerimos que esse evento clínico ocorra de forma independente à presença do SNP e a resposta terapêutica à HU. **CONCLUSÃO:** concluímos que parâmetros laboratoriais e marcadores genéticos contribuem para compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e heterogeneidade clínica da DF na população alvo do presente estudo. Ressaltamos a importância desses marcadores para o seguimento clínico adequado e delineamento de estratégias para o desenho de novos fármacos e modalidades terapêuticas.

**Palavras-Chave:** Doença Falciforme; Biomarcadores; Talassemia Alfa deleção 3.7kb; Haplótipos da globina- $\beta^S$ ; Polimorfismos Genéticos; Hidroxiureia.

ALELUIA, Milena Magalhães. Evaluation of Biomarkers in Individuals with Sickle Cell Disease in the Southern Region of Bahia. 156 f. il. Thesis (Doctorate in pathology) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Sickle cell disease (SCD) is a genetic disorder with high global prevalence, heterogeneous clinical course and changes in hematological and biochemical parameters, presence of alpha thalassemia with 3.7 kb deletion, haplotypes linked to the beta globin gene cluster, and single nucleotide polymorphisms (SNPs) related to fetal hemoglobin (HbF) synthesis. Thus, it is important to investigate biomarkers associated with the severity and pathophysiological mechanisms of SCD. **OBJECTIVE:** to investigate the study population, to characterize the sociodemographic profile, clinical events, laboratory and genetic markers associated with pathophysiological mechanisms and severity of SCD patients. **METHODS:** this is a cross-sectional study with a series of 200 SCD patients followed by the Reference Center for Sickle Cell Disease of Itabuna-Bahia (CERDOFI) and 36 patients with sickle cell anemia (SCA) of the Hematology and Hemotherapy Foundation of the State of Bahia (HEMOBA), Brazil, from 2013 to 2015. The subjects had a pediatric and adult age group, with 70.5% (141/200) of patients with SCA and 29.5% (59/200) with hemoglobin SC disease (HbSC). All the participants signed the informed consent form and answered the sociodemographic questionnaire. Hematological and biochemical parameters, nitric oxide (NO) metabolites and hemoglobin profiles were investigated using high performance liquid chromatography (HPLC). The thalassemia alpha deletion of 3.7 kb ( $\alpha$ -Thal<sup>3.7Kb</sup>) was investigated by the polymerase chain reaction (PCR). The haplotypes linked to the beta S globin ( $\beta$ S) gene cluster were investigated by PCR and restriction enzyme digestion (PCR-RFLP); The SNPs on *BCL11A* gene (rs6732518 and rs766432), *HMIP* (rs11759553 and rs35959442) and *OR51B5 / 6* (rs4910755 and rs7483122) on chromosome 2, 6 and 11 respectively were investigated by Real-time PCR using TaqMan probes. **RESULTS:** The casuistic had 52.0% (104/200) of female, 22.0% (44/200) were between 6 and 10 years of age and 20.0% (40 / 200) from 21 to 30 years (40/200). The self-reported brown color was described in 52.0% (104/200) of the patients. Regarding the age of the first diagnosis, 38.0% (76/200) of the patients were diagnosed up to 6 months, and 89.5% (68/76) were by neonatal screening. With regard to schooling, 60.5% (121/200) reported some degree of education. We observed that 87.5% (70/80) of the pediatric patients used medication prophylaxis. We found that 91.8% (90/98) of hospitalizations occurred among SCA patients without hydroxyurea (HU). The frequency of thalassemia  $\alpha$ 3.7Kb was 9% (36/400), with 12.5% (4/32) of patients homozygous ( $-\alpha/-\alpha$ ) and 87.5% (28/32) heterozygotes ( $-/\alpha\alpha$ ); moreover, the BEN haplotype was more frequent, followed by the CAR haplotype. Among the biomarkers investigated in SCA patients, we have shown that high concentrations of lactic dehydrogenase (LDH) corroborate a hemolytic profile. NO metabolites have been shown to influence endothelial activation, and high concentrations of high-density lipoprotein (HDL-C) have been associated with high levels of low-density lipoprotein (LDL-C), suggesting the establishment of the dyslipidemic subphenotype in SCA. Regarding the co-inheritance of alpha thalassemia with SCA, an improvement in the hemolytic condition was observed, although there was a contribution to blood viscosity, corroborating the vaso-occlusive sub-phenotype; in addition, we found an association with decreased platelet count. In the analysis of the 177 SCA patients followed in the CERDOFI and HEMOBA we found that in relation to the genetic profile modulator of HbF, the haplotype CAR was the most frequent and associated to intermediate concentrations of HbF and elevated of HbS. Regarding treatment with HU, patients with SCA

received doses of 15, 20 and 25 mg / kg / day and the time of use ranged from 2 months to 4 years and 2 months, observing improvement in the hematological profile, with reduction of leukocyte and platelet count. In addition, we verified that the improvement of the laboratory parameters and clinical profile were associated to the time of use. Analysis of the SNPs located in the *BCL11A*, *HMIP* and *OR51B5 / 6* genes demonstrated greater influence on the hematological profile and the association of *BCL11A* SNP rs766432 with the use of HU and with the hematological profile demonstrating high red blood cell count, high hemoglobin concentration, lower platelets count and reduced concentrations of direct and indirect bilirubin, suggesting a greater influence of the presence of SNP in the therapeutic response to HU. Regarding the clinical characterization, the association of *BCL11A* SNP rs766432 and HU demonstrated a decrease in clinical events; however, biliary lithiasis was more frequently observed among patients taking HU. We suggest that this clinical event occur independently of the presence of the SNP and the response of treatment. **CONCLUSION:** we conclude that laboratory parameters and genetic markers contribute to the understanding of the pathophysiological mechanisms and clinical heterogeneity of SCD in the studied population. We emphasize the importance of these markers for the adequate clinical follow-up and to strategies for the design of new drugs and therapeutic modalities.

**Key Words:** Sickle cell disease; Biomarkers; Alpha thalassemia deletion 3.7kb;  $\beta^S$ - globin haplotypes; Genetic Polymorphisms; Hydroxyurea.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Mapa de distribuição da frequência mundial do alelo $\beta^S$ .....	21
<b>Figura 2.</b> Fisiopatologia na anemia falciforme: vaso-oclusão e lesão endotelial .....	23
<b>Figura 3.</b> Eventos clínicos na doença falciforme e mecanismos fisiopatológicos associados	26
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de ação da hidroxiureia na medula óssea 1. Efeitos nos precursores eritroides; 2. Efeitos nos precursores mieloides; 3. Efeitos nos neutrófilos; 4. Efeitos nos eritrócitos; 5. Produção de NO .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Genótipo homocigoto para a hemoglobina normal do adulto
AF	Anemia falciforme
APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
AST	Aspartato aminotransferase
AVC	Acidente vascular cerebral
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
EVO	Evento vaso oclusivo
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade – Colesterol, do inglês <i>High density lipoprotein of cholesterol</i>
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade – Colesterol, do inglês <i>Low density lipoprotein of cholesterol</i>
VLDL-C	Lipoproteína de muito baixa densidade – Colesterol, do inglês, <i>Very low density lipoprotein of cholesterol</i>
CVO	Crise vaso oclusiva
DF	Doença falciforme
FAL	Fosfatase Alcalina
Hb	Hemoglobina
HbA2	Hemoglobina A2 do adulto
HbAS	Heterocigoto para hemoglobina S; traço Falciforme
<i>HBB</i>	Gene da globina- $\beta$
HbF	Hemoglobina Fetal
HbSC	Hemoglobinopatia SC
HCM	Concentração média de hemácia
HU	Hidroxiureia
LDH	Desidrogenase Láctica

Mac-1	Antígeno Macrofágico-1
NF- κB	Fator Nuclear Kappa B
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
HbS	Hemoglobina S
NOM	Metabólitos do Óxido Nítrico
RDW	Amplitude de distribuição do tamanho das hemácias, do inglês <i>red cell distribution width</i>
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo, do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>
STA	Síndrome Torácia Aguda
TGO	Aspartato aminotransferase, do inglês <i>ALT – aspartate aminotransferase</i> )
VCM	Volume corpuscular médio
VO	Vaso-oclusão
VPM	Volume médio plaquetário

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\kappa$	Kappa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1	DOENÇA FALCIFORME .....	19
2.1.1	Epidemiologia e Histórico da Hemoglobina S .....	20
2.1.2	Fisiopatologia da doença falciforme .....	21
2.1.3	Manifestações clínicas na doença falciforme .....	23
2.2	MARCADORES LABORATORIAIS .....	27
2.2.1	Perfil hematológico .....	27
2.2.2	Perfil bioquímico .....	28
2.2.3	Óxido Nítrico e metabólitos .....	29
2.3	MARCADORES GENÉTICOS .....	30
2.3.1	Haplótipos ligados ao grupo de genes da globina $\beta^S$ e suas influências .....	30
2.3.2	Talassemia alfa .....	31
2.3.3	Polimorfismos moduladores da hemoglobina fetal .....	32
2.4	TRATAMENTO .....	33
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	36
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
4.1	OBJETIVO GERAL .....	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>5</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	38
<b>6</b>	<b>MANUSCRITOS PUBLICADOS/ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	40
6.1	MANUSCRITO 1 .....	40
6.2	MANUSCRITO 2 .....	67
6.3	MANUSCRITO 3 .....	
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	109
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	125



<b>9 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>126</b>
<b>APÊNDICE A: Produções científicas.....</b>	<b>143</b>
<b>APÊNDICE B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Responsável Legal do Paciente.....</b>	<b>146</b>
<b>APÊNDICE C: Termo de Assentimento Informado.....</b>	<b>149</b>
<b>APÊNDICE D: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Paciente.....</b>	<b>152</b>
<b>APÊNDICE E: Questionário Epidemiológico para Paciente ou Responsável Legal .....</b>	<b>155</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A hemoglobina S (HbS) é decorrente de uma mutação de ponto (rs334), que troca a adenina por timina (GAG>GTG), no sexto códon do gene beta (*HBB*) da globina, com substituição do aminoácido ácido glutâmico (Glu) por valina (Val) na sexta posição da cadeia polipeptídica beta (p.Glu6Val). A homozigose para o alelo beta S ( $\beta^S$ ) é denominada anemia falciforme (AF), caracterizada por herança autossômica recessiva, que cursa com anemia hemolítica grave e alterações sistêmicas que comprometem órgãos e sistemas diversos. A denominação doença falciforme (DF) refere-se aos estados sintomáticos, onde a HbS é encontrada em homozigose ou em heterozigose dupla com outras hemoglobinas variantes ou talassemias (WEATHERALL e PROVAN, 2000; STEINBERG, 2008; TAYLOR et al., 2008). Com base na definição de DF, o traço falciforme ou heterozigose para a HbS (HbAS) não é considerado doença, uma vez que seus portadores são assintomáticos. Uma característica clínica importante dos indivíduos com a DF corresponde a vaso-oclusão, com obstrução de vasos sanguíneos, formação de trombos e infarto de tecidos, que podem apresentar fibrose e calcificação (STEINBERG, 1995, 2009; AKINSHEYE et al., 2011, 2012).

A avaliação dos perfis bioquímicos e hematológicos contribui para a identificação de marcadores de prognóstico e do curso clínico da DF (CERQUEIRA et al., 2010). Outros marcadores genéticos são utilizados na caracterização desses indivíduos, como o estudo dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina  $\beta$ , que variam de acordo com a sua origem, área geográfica e da mutação, sendo encontrados associados ao quadro clínico do paciente (GONÇALVES et al., 2003). A hemoglobina fetal (HbF) é considerada modulador da DF, uma vez que sua expressão continuada após o nascimento contribui para a redução dos eventos clínicos apresentados pelos indivíduos com a doença (STEINBERG, 2001).

Outro fator a ser descrito é a identificação de alguns polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) localizados em genes específicos, que apresentam papel relevante na expressão da globina gama ( $\gamma$ ); assim como aqueles identificados nos genes da célula B de linfoma/leucemia 11A (*BCL11A*) localizado no cromossomo 2p16; região variante intergênica *HBS1L-MYB*, (gene *HMIP*) cromossomo 6q23, e '5 do receptor olfatório 51B5/6 (*OR51B5/6*) no cromossomo 11q, que são descritos por estarem relacionados a apresentação clínica dos indivíduos com DF e expressão da HbF (UDA et al., 2008; NUINOON et al., 2010). Desta maneira, todos os marcadores acima citados estão associados ao curso clínico dessa doença.

Quanto a terapia medicamentosa, a HU é o medicamento de escolha até os dias atuais, consiste em um medicamento citostático, quimioterápico, cujo mecanismo de ação está associado à indução direta das células F através da estimulação da guanilato ciclase solúvel e inibição da ribonucleotídeo redutase com redução de células com concentrações reduzidas de HbF (STEINBERG et al., 1997; ORAH e PLATT, 2008), proporcionando influência nos parâmetros laboratoriais com indução do aumento da síntese de HbF, contribuindo para melhoria clínica dos pacientes com DF (STEINBERG et al., 2008).

Diante do exposto, tendo como base a ausência de investigação desses marcadores na região Sul da Bahia, localidade que apresenta frequência elevada da DF, foram investigados marcadores já previamente associados ao perfil clínico da DF em pacientes atendidos no Centro de Referência a Doença Falciforme (CERDOFI), localizado no município de Itabuna, Bahia. A obtenção de informações genéticas, laboratoriais e clínicas referentes ao perfil dessa população podem contribuir para elucidar mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença e subsidiar o desenvolvimento de outros estudos para desenho de novos fármacos e modalidades terapêuticas, além do acompanhamento adequado dos pacientes com DF.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 DOENÇA FALCIFORME**

A AF é caracterizada pela presença em homozigose do alelo beta S ( $\beta^S$ ) e está associada a um quadro clínico heterogêneo, variando desde a presença de anemia hemolítica grave à ocorrência de crises dolorosas, resultando em fenômenos vaso-oclusivos. Denota-se uma morbimortalidade elevada, principalmente decorrente de infecções associadas, sendo necessário o desenvolvimento de estudos que possam vir a estabelecer marcadores de prognóstico para os quadros clínicos mais graves da doença (STEINBERG, 2001). O termo DF é designado às hemoglobinopatias que apresentam o alelo  $\beta^S$  em homozigose responsável pela síntese da hemoglobina S (HbS), cujo quadro é denominado AF ou em heterozigose dupla com outros tipos de hemoglobinas variantes ou de síntese como nas hemoglobinopatias SC (HbSC) e S $\beta$  talassemia (KATO, GLADWIN e STEINBERG, 2007).

### 2.1.1 Epidemiologia e Histórico da Hemoglobina S

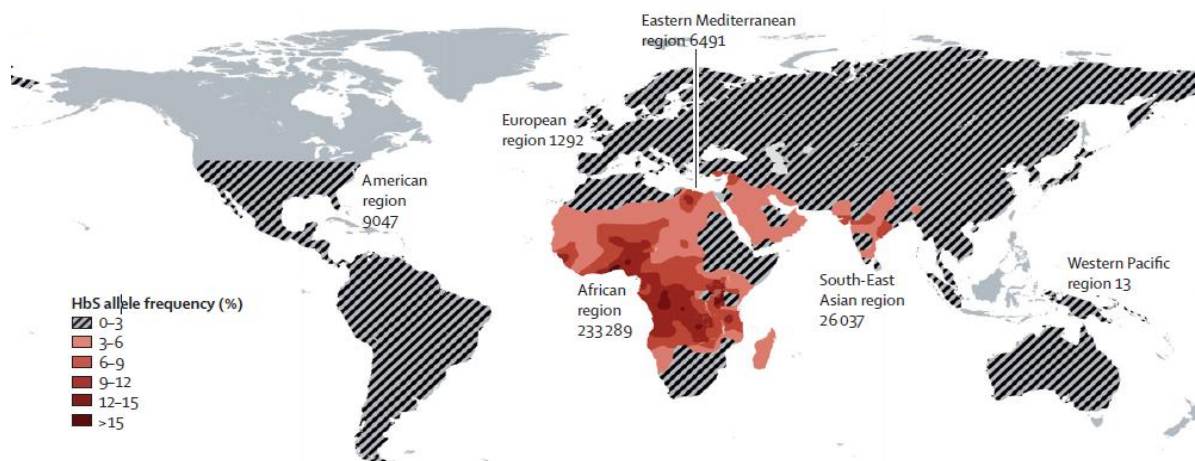
A mutação responsável pela HbS originou-se na África e foi trazida pelos africanos para as Américas em virtude do período da escravidão. Muitos africanos vinham de regiões como o Senegal e áreas vizinhas e, posteriormente, em meados do século XVII, os principais portos foram da África Ocidental (Benin) e costa africana onde os povos falavam a língua Bantu (Namíbia e Angola) (NAGEL e STEINBERG, 2001). Assim, cerca de 3,6 milhões de indivíduos foram trazidos para o Brasil, ocasionando a disseminação do alelo  $\beta^S$ , introduzindo no Brasil a AF (BRASIL, 2001). A AF consiste em doença hematológica hereditária com prevalência e incidência mundial elevada, principalmente em países da África, América Central, América do Sul, Arábia Saudita, Índia, Turquia, Grécia e Itália. Desta maneira, estudos mostram que a mutação associada a HbS está em aproximadamente 7 % da população mundial (WEATHERALL e CLEGG, 2001), sendo que algumas hipóteses apontam o seu surgimento entre os períodos paleolíticos e mesolíticos, há 50-100 mil anos (NAOUM, 2000).

A HbS foi difundida a partir da seleção de portadores do alelo mutante pela vantagem evolutiva em regiões onde a malária é endêmica e, em decorrência da imigração de africanos pelo comércio de escravos (REES, WILLIAMS e GLADWIN, 2010). O alelo  $\beta^S$  apresenta dispersão variada na população africana, com prevalência mais elevada na região central da África Subsaariana. Cerca de 230.000 crianças dessa região nascem com AF, correspondendo a cerca de 80% do total mundial. Na Europa detectam-se cerca de 1300/ano crianças com AF e na América do Norte 2600/ano de nascidos com a doença (REES, WILLIAMS e GLADWIN, 2010) (Figura 1). Na América Latina, o Brasil apresenta frequência variada do alelo  $\beta^S$ , a depender da região geográfica estudada. No estado de São Paulo foi verificada a frequência de 6,6 % para os indivíduos HbAS entre os descendentes africanos (RAMALHO, 1986); enquanto na Bahia, a partir de um trabalho com 1200 crianças, a frequência do genótipo HbAS foi de 7,4 % (AZEVEDO et al., 1980). Outro estudo bastante relevante, realizado em Salvador, Bahia consistiu na investigação de recém-nascidos, observando frequência de 9,8 % para os indivíduos HbAS e incidência de 0,2 % para os indivíduos com AF (ADORNO et al., 2005).

Nesse contexto, podemos observar a prevalência elevada da AF no Brasil, demonstrando a importância da triagem precoce para o acompanhamento e tratamento adequado. Em virtude da morbimortalidade elevada e precoce da DF foi implantado no Brasil o teste do pezinho ou triagem neonatal no ano de 2001, juntamente com a criação do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN)/Teste do Pezinho para hemoglobinopatias,

no qual foi incluída a investigação dessa doença (BRASIL, 2001; SERJEANT, 2000; RAMALHO, MAGNA e PAIVA-SILVA, 2003). Esse programa possibilitou o diagnóstico no período neonatal, levando ao aumento da sobrevivência de indivíduos com DF. A partir de informações do PNTN, sabemos hoje que nascem cerca de 3500 crianças/ano com a doença ou 1/1000 nascidos vivos (NAOUM, 2000).

As incidências de 1/601 para a DF e de 1/1435 para a AF foram descritas em estudo realizado pela Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE-SSA) (AMORIN, PIMENTEL e FONTES, 2010). Esses dados foram obtidos na triagem neonatal do estado da Bahia, que apresenta a prevalência para a DF mais elevada do país. No Brasil, estima-se que a DF acometa até 0-3 % da população afrodescendente, podendo ser mais expressiva em decorrência do grau elevado de miscigenação racial (DI-NUZZO e FONSECA, 2004; GUIMIERO et al., 2007) (Figura 1).



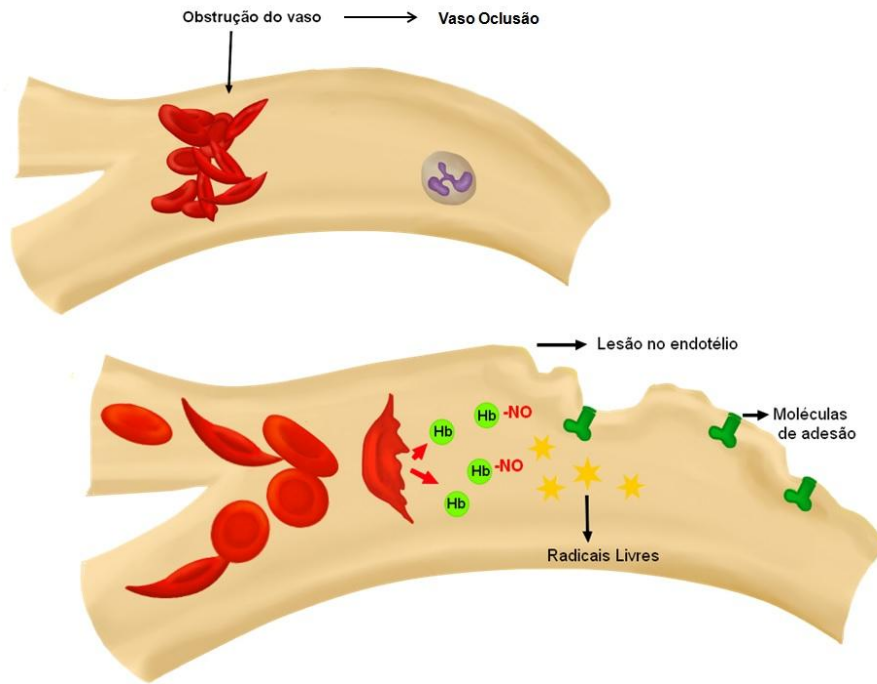
**Figura 1.** Mapa de distribuição da frequência do alelo  $\beta$ S no mundo. Figura adaptada (REES, WILLIAMS e GLADWIN, 2010).

### 2.1.2 Fisiopatologia da doença falciforme

A fisiopatologia da falcização tem origem na substituição do ácido glutâmico (aminoácido hidrofílico) pela valina (aminoácido hidrofóbico), proporcionando durante as fases de desoxigenação, interações hidrofóbicas entre moléculas vizinhas, gerando estruturas poliméricas, as quais deixam a hemácia deformada (CANÇADO e JESUS, 2007; HANNEMANN et al., 2011). Desta forma, quando a molécula da HbS perde o oxigênio, permite uma aproximação anormal entre as moléculas de Hb, a partir das pontes de hidrogênio, entre o aminoácido valina e fenilalanina ( $\beta$ -85), leucina ( $\beta$ -88) da molécula

adjacente da HbS (GALIZA NETO e PITOMBEIRA, 2003; SILVA e SHIMAUTE, 2006). Essa interação leva a polimerização das moléculas com consequente alteração de estabilidade e solubilidade, resultando em deformação e diminuição da flexibilidade (STEINBERG, 2008; HABARA e STEINBERG, 2016). O fenômeno da falcização é reversível durante a oxigenação, no entanto, as hemácias ao sofrerem lesões em sua membrana não conseguem retornar ao formato discoide; porém, eventos repetidos de falcizações levam ao encurtamento da vida média das hemácias em circulação e, a alterações definitivas e irreversíveis na membrana eritrocitária (BRASIL, 2001; STEINBERG, 2008). A polimerização da HbS com eventos repetitivos de falcização ocasiona hemólise intravascular, crise vaso-oclusiva (CVO) com surgimento de espécies reativas de oxigênio (ERO), estresse oxidativo, diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), lesão do endotélio, hipercoagulabilidade, aumento da expressão de moléculas de adesão, isquemia/perfusão e processo inflamatório crônico (Figura 2). Esses eventos levam ao acometimento de processos patológicos secundários de significância expressiva (FRANCIS e HAYWOOD, 1992; TURHAN et al., 2002; WOOD, HEBBEL e GRANGER, 2004; RAPHAEL, 2005; MORRIS, 2008).

A isquemia e danos ao tecido são decorrentes da oclusão da microcirculação pelos eritrócitos falcizados, levando a diversos eventos patológicos (SCHNOG et al., 2004). A CVO envolve a obstrução de microvasos, lesão tecidual, com inflamação local (STUART e NAGEL, 2004), sendo que tanto as hemácias quanto os reticulócitos dos pacientes com AF expressam em sua superfície moléculas de adesão (Figura 2). A ativação e adesão leucocitária nos microvasos é também um fator de risco para o processo de vaso-oclusão, pois implica na ativação do ambiente em cascata, com liberação de citocinas e radicais livres (THURAN et al., 2002, STUART e NAGEL, 2004).



**Figura 2.** Fisiopatologia da anemia falciforme: vaso-oclusão e lesão endotelial. Fonte: elaborado por Luciana Fiuza.

### 2.1.3 Manifestações clínicas na doença falciforme

O quadro clínico da DF, além de variável é dependente de fatores genéticos, sociais, culturais e ambientais. O diagnóstico precoce possibilitou melhores expectativas quanto à morbimortalidade, porém, em virtude da heterogeneidade clínica, ainda é difícil o acompanhamento clínico e terapêutico do indivíduo com DF (PLATT et al., 1991, MORRIS, 2008, REES e GIBSON, 2012).

As crises dolorosas refletem causa de morbimortalidade e hospitalizações na DF, assim a crise algica é ocasionada pela oclusão microvascular e isquemia tecidual, sendo que alguns fatores têm sido considerados desencadeadores, como desidratação, hipóxia, infecção, acidose, alterações de temperatura e estresse emocional (Figura 3). A lesão tecidual também leva a estimulação do sistema simpático, promovendo aumento da isquemia tecidual e criação de um círculo vicioso da dor (STUART e NAGEL, 2004, STEINBERG, 2008).

A síndrome torácica aguda (STA) é a maior causa de óbito e a segunda maior causa de hospitalização de indivíduos com DF nos países desenvolvidos (NANSSEU et al., 2015). A STA tem sido associada a uma influência sazonal, com prevalência maior no inverno, coincidindo com a época de ocorrência maior de infecções em crianças, em especial, das vias superiores (ADISA et al., 2013). Essas infecções são em sua maioria bacterianas, por microrganismos como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (OBARO e IROH

TAM, 2016). Muitos estudos vêm elucidando a etiologia da STA e acredita-se que seja multifatorial, envolvendo infarto e infecção pulmonar, atelectasias secundárias a infarto de costelas e respiração superficial por dor, embolia pulmonar e trombose microvascular devido à aderência dos eritrócitos ao endotélio (FAUROUX, 2000; NANSSEU et al., 2015). Nesse caso, tanto a hipóxia quanto a vasoconstrição favorecem não só a polimerização da HbS, como também diminuem a velocidade dos eritrócitos no capilar, levando a adesão endotelial (Figura 3).

O acidente vascular cerebral (AVC) possui prevalência elevada nos indivíduos com DF, sendo uma das principais causas de deficiência cognitiva e de óbito em crianças e adultos com a doença. O AVC ocorre devido ao acúmulo de hemácias falcizadas, com oclusão do lúmen de microvasos e aparecimento súbito de uma deficiência neurológica focal e, em alguns casos, com cefaleia, perda de consciência e convulsões (LAWRENCE e WEBB, 2016). Alguns fatores de risco estão relacionados ao AVC isquêmico, como concentrações diminuídas de Hb, episódio recente ou prevalência elevada de STA e pressão arterial sistólica elevada. O AVC hemorrágico (AVCH) está associado com a diminuição da Hb e leucocitose (ADEKILE, 2015).

O baço apresenta grande variedade de alterações, dependendo da idade e gravidade do quadro clínico que o paciente com DF apresente. As hemácias enrijecem e perdem a plasticidade morfológica dificultando o seu trânsito nos sinusoides esplênicos, fato que acaba comprometendo o órgão (KHATIB, RABAH e SARNAIK, 2009; BROUSSE, BUFFET e REES, 2014). Esse evento clínico é bem comum na infância, nas faixas etárias entre cinco (5) meses a dois (2) anos de idade, contribuindo para o aumento do baço ou esplenomegalia, que é evidenciado devido à congestão dos cordões de Billroth pelos eritrócitos falcizados, comprometendo sua função. Ainda na infância é verificada a ocorrência de sequestro esplênico devido ao armazenamento maciço e súbito dos eritrócitos no baço, levando ao aumento rápido do órgão, fato que requer a esplenectomia que pode ser parcial ou total (BROUSSE, BUFFET e REES, 2014). O sequestro esplênico cursa com palidez mucocutânea, distensão e dor abdominal, podendo surgir polidipsia. A perda de volume sanguíneo para o baço pode levar o indivíduo ao choque, com taquidispnéia intensa, taquicardia e astenia (KHATIB, RABAH e SARNAIK, 2009; BROUSSE, BUFFET e REES, 2014).

O priapismo acomete indivíduos do sexo masculino, sendo definido pela ereção peniana prolongada, involuntária e dolorosa não acompanhada de desejo ou estímulo sexual, podendo durar mais de 30 minutos (KEOGHANE, SULIVAN e MILLER, 2002; GEBRESELASSIE, SIMMONS e MONTAGUE, 2015). Pode ser caracterizado por duração



prolongada crônica (mais de 4 horas) ou por crises repetidas de curta duração (menos de 4 horas), podendo ocorrer também por períodos bastante prolongados (de 24 a 48 horas), o que pode acarretar em disfunção erétil permanente ou amputação do membro, necessitando de internação hospitalar. O tratamento inicia-se com hidratação, analgesia intravenosa e uso de ansiolíticos (SERJEANT e HAMBLETON, 2015).

As ulcerações de perna são lesões que ocorrem uni ou bilateramente, em especial, nos maléolos laterais e mediais dos tornozelos, mas podem se desenvolver no dorso dos pés e nas pernas, sendo frequentemente crônicas e incapacitantes (PALADINO, 2007). As lesões menores são rasas, superficiais e se resolvem espontaneamente com repouso e higiene local; já as lesões maiores são dolorosas, profundas, de longa duração, necessitando tratamento mais agressivo (PALADINO, 2007; MINNITI e KATO, 2015).

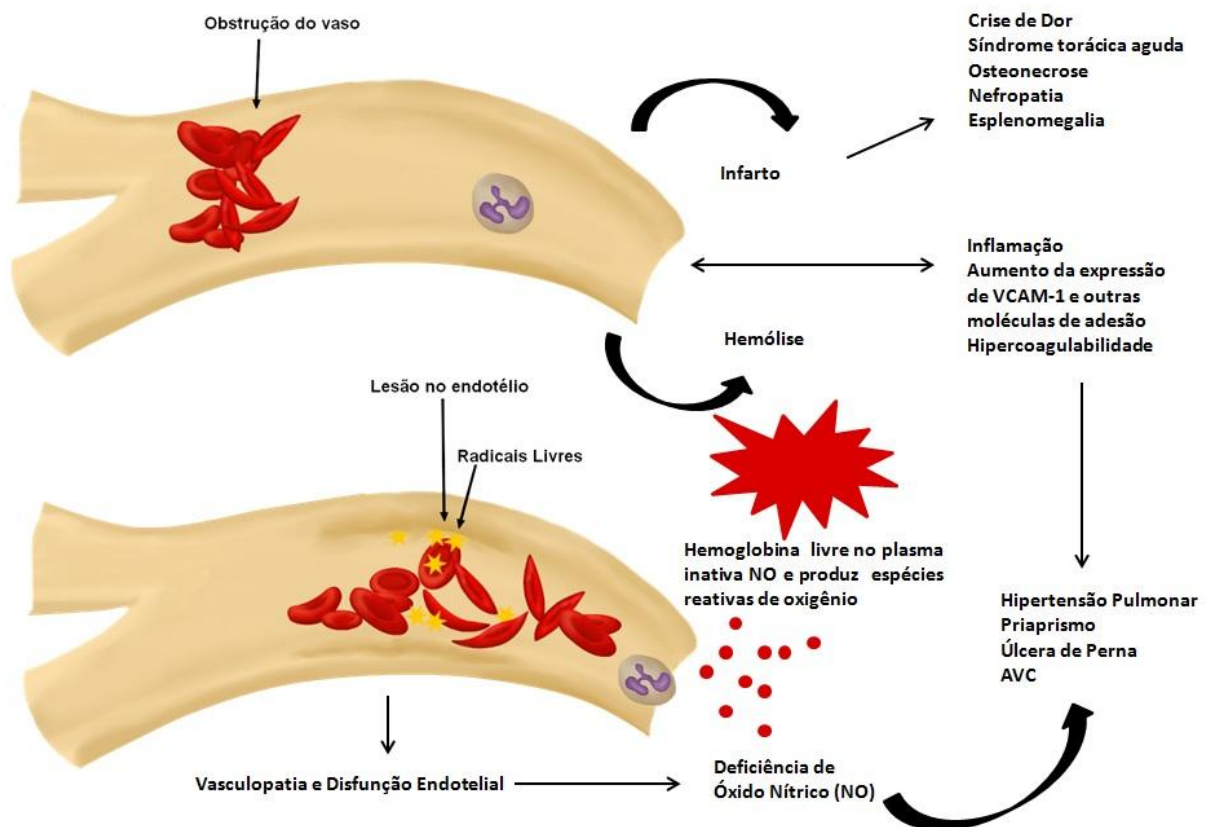
As alterações ósseas são ocasionadas pela hiperplasia medular crônica, que por sua vez leva a modulação medular pela hemólise, resultando no adelgaçamento da região cortical do osso, alargamento dos espaços medulares e trabeculação dispersa e irregular. Esse fenômeno leva a algumas lesões precursoras de crises vaso oclusivas (CVO), que contribuem para a instalação de osteonecrose (necrose isquêmica) e da síndrome mão-pé (NAOUM, 2000).

Devido a polimerização da HbS, eventos de vaso-oclusão também podem ocorrer nos rins dos indivíduos com DF, contribuindo para a hiperosmolaridade, hipoxemia e acidose local. O processo de lesão glomerular está intimamente relacionado à hipertrofia glomerular e à esclerose glomerular focal, sendo observada proteinúria, que aumenta a sua ocorrência conforme aumenta a idade (POWARS, 1991; PAULA et al., 2013). A hematúria é decorrente da necrose papilar ou da ruptura de vasos neoformados dilatados, sendo geralmente assintomática e com evolução benigna. Contudo, quando é evidenciada a perda da função renal, esta ocorre devido à hiperfiltração glomerular prolongada, elevando a morbidade e mortalidade dos pacientes (HIRSCHBERG, 2010; PAULA et al., 2013). Em casos raros pode ser observada a insuficiência renal aguda, sendo atribuída à hipovolemia (PAULA et al., 2013).

Algumas manifestações hepatobiliares são evidenciadas nos indivíduos com DF, sendo as doenças do trato biliar e do parênquima hepático as principais complicações do sistema digestório, onde cerca de 70 a 80 % desses indivíduos apresentam hepatomegalia, ou seja, aumento do fígado (TRAINA e SAAD, 2007). Nesse evento clínico, alguns sintomas são clássicos, em especial, a icterícia que reflete a hiperbilirrubinemia, em decorrência da bilirrubina indireta, observada nos indivíduos com anemia hemolítica crônica. A concentração

de bilirrubina varia de acordo com as diferentes intensidades de hemólise denotando diferentes estágios do comprometimento hepático (TRAINA e SAAD, 2007). Ainda sobre as complicações hepáticas, a colelitíase é consequência do metabolismo acelerado da bilirrubina devido à hemólise crônica, que pode acometer crianças durante os primeiros anos de vida, sendo observada em cerca de 70 % dos indivíduos adultos com DF (GUMIERO, BELLOMO-BRANDÃO e COSTA PINTO, 2008).

As alterações oftalmológicas correspondem a lesões oculares de graus de intensidade distintos, sendo também resultante de um evento CVO, podendo culminar em complicações visuais graves, levando a cegueira (MYINT et al., 2015). A retinopatia é uma manifestação clínica prevalente, principalmente no indivíduo com HbSC (MYINT et al., 2015). As lesões oculares aumentam com a idade e com o tempo, sendo a faixa etária de 15 a 30 anos de maior risco. A retinopatia pode ocorrer na forma não proliferativa e proliferativa, sendo verificados eventos clínicos como hemorragia, descolamento de retina, obstrução arteriolar e necrose.



**Figura 3.** Eventos clínicos na doença falciforme e mecanismos fisiopatológicos associados. Fonte: elaborado por Luciana Fiuza.

## 2.2 MARCADORES LABORATORIAIS

### 2.2.1 Perfil hematológico

A diferenciação das variações nos genótipos da DF advém da realização obrigatória de exames laboratoriais dentre outros, a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) que permite a diferenciação e quantificação das hemoglobinas (NAOUM, 1987, MITIKO, 2007). Outros exames também são importantes para o acompanhamento dos pacientes com DF, como o hemograma, que demonstra anemia normocrômica e normocítica, aumento na contagem de reticulócitos, presença de corpos de Howell-Jolly, eritroblastos circulantes, além de hemácias falcizadas, leucocitose e plaquetose (ZAGO e PINTO, 2007, DRISS et al., 2011).

A quantidade de reticulócitos no sangue periférico indica a velocidade de produção de eritrócitos viáveis na medula óssea. Em situações normais, os reticulócitos permanecem de 2 a 3 dias na medula óssea e um (1) dia no sangue periférico, quando então seu conteúdo hemoglobínico se completa, ou seja, se torna normoconcentrado, transformando-se em eritrócito maduro (MITIKO, 2007). Os eritrócitos vivem cerca de 120 dias na circulação, já os reticulócitos circulam por apenas 1 dia, podendo permanecer de 3 a 4 dias, quando liberados precocemente pela medula óssea, induzida por níveis elevados de eritropoetina circulante. Com isso, torna-se possível avaliar o perfil da população celular que se renova no máximo de 3 a 4 dias, além da caracterização morfológica e índices hematimétricos do eritrograma (SWERDLOW, 2006; KIM, 2014).

O hemograma, hoje automatizado, inclui índices hematimétricos como o volume corpuscular médio (VCM), a amplitude de distribuição dos eritrócitos (*red cell distribution width*; RDW), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), variação da CHCM dos eritrócitos (HDW) e variação da HCM dos eritrócitos (CHDW), bem como o reticulograma automatizado que tem importância no diagnóstico diferencial e na monitorização terapêutica das hemoglobinopatias (CERQUEIRA et al., 2010; KIM, 2014).

Os leucócitos, também conhecidos por glóbulos brancos, se diferenciam a partir de células-tronco pluripotentes oriundas da medula óssea. Correspondem como componente do sistema imunitário inato do organismo, com objetivo de combater e eliminar microrganismos e estruturas químicas estranhas ao organismo, porém podem promover doenças inflamatórias (NAUSSEF e BORREGAARD, 2014). A leucocitose reflete no aumento da contagem de

leucócitos, que se relacionam a processos infecciosos, observados na DF de maneira frequente, em virtude da gravidade clínica. Desta forma, na invasão de microrganismos ou substâncias estranhas, os neutrófilos são os primeiros a atacar o agente invasor (principalmente em infecções bacterianas) e, posteriormente o monócito/macrófago (MAYADAS, CULLERE e LOWELL, 2014).

As plaquetas se constituem de fragmento citoplasmático anucleado, presente no sangue e produzido na medula óssea e atuam no processo de coagulação sanguínea e são essenciais para hemóstase, no entanto, a ativação plaquetária pode ser expressa na DF durante CVO, promovendo a inflamação (WUN et al., 1997; SEMPLE, ITALIANO e FREEDMAN, 2011).

### 2.2.2 Perfil bioquímico

Os indivíduos com DF apresentam estresse oxidativo elevado, com produção de radicais livres e associação com alterações no perfil lipídico, com diminuição significativa do colesterol total (COL-TOT) (SEIXAS et al., 2010; OZTAS et al., 2011) e colesterol de lipoproteína de alta densidade (C-HDL); entretanto, observa-se hipertrigliceridemia e aumento da fração de lipoproteína de muito baixa densidade (C-VLDL), além de sugerir marcador potencial de gravidade na DF (SEIXAS et al., 2010). O colesterol é um esteroide precursor de compostos bioativos, como os hormônios esteroides, ácidos biliares e vitamina D. Estudos demonstraram níveis mais elevados de HDL-C na doença falciforme, apresentando baixo risco de hemólise e disfunção endotelial, incluindo contagem menor de reticulócitos e eritroblastos, bem como concentração reduzida de HbS, estando relacionado ao consumo elevado de colesterol devido a aceleração da produção de células sanguíneas na medula durante a crise de hemólise (ATAGA et al., 2015). Desta maneira, em pacientes com DF e níveis elevados de HDL-C este pode ser reflexo das propriedades anti-inflamatória e anti-oxidativa dessa molécula (SEIXAS et al., 2010). RAHIMI e colaboradores (2006) investigaram os níveis de colesterol total, C-HDL, triglicerídeos e C-LDL em indivíduos com DF e associaram o estresse hemolítico à redução dos níveis plasmáticos de lipídios em comparação a indivíduos normais.

No perfil renal, aminoácidos provenientes do catabolismo proteico são desaminados com a produção de amônia, como este é um composto tóxico, se convertido em ureia ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ ) no fígado, associando-se ao  $\text{CO}_2$ , que constitui a maior parte do nitrogênio não

proteico no sangue. Após a síntese hepática, a uréia é transportada pelo plasma até os rins, onde é filtrada pelos glomérulos. A excreção ocorre na urina, embora 40 % a 70 % sejam reabsorvidos por difusão passiva pelos túbulos, já a produção da creatinina resulta da desidratação não enzimática da creatinina muscular, que é sintetizada no fígado, rins e pâncreas, por duas reações mediadas enzimaticamente; Posteriormente é transportada no sangue para outros órgãos, como músculos e cérebro, onde é fosforilada a creatinina-fosfato, sua excreção é constante a partir da filtração glomerular (ASNANI, LYNCH e REID, 2013; GOSMANOVA et al., 2014).

O processo de falcização dos eritrócitos ocorre em várias partes do organismo dos indivíduos com DF, levando a processos isquêmicos agudos ou crônicos e, conseqüentemente, lesão progressiva do órgão. A hematúria, proteinúria, necrose papilar renal e perda da função renal são eventos observados em indivíduos com DF (ALEEM, 2008; DRAWZ et al., 2016). Muitas hemácias senis são destruídas, o tempo todo no organismo humano, sendo iniciado através do sistema monocítico fagocitário do fígado, baço e medula óssea. A degradação da hemoglobina leva a liberação da globina e do grupo prostético heme. A degradação de heme gera, através de uma série de reações de oxirredução, a produção de bilirrubina. O aumento do nível de bilirrubina pode ser decorrente do aumento da degradação dos eritrócitos (hemólise) e dano hepatocelular (KOOLMAN e ROEHM, 2005).

A desidrogenase láctica (LDH) é uma enzima formada por 334 aminoácidos, com dois tipos diferentes de subunidades (M e H) sendo que estas subunidades se associam formando cinco tipos de isoenzimas que são encontradas no organismo. Assim, quando algum órgão é lesionado, as enzimas intracelulares são liberadas no sangue e a avaliação das isoenzimas e dosagens possibilitam identificar a origem da lesão. O fígado e os músculos esqueléticos produzem subunidades M da LDH, enquanto que o cérebro e o músculo cardíaco produzem subunidade H (KOOLMAN e ROEHM, 2005). Além disso, níveis elevados de LDH encontram-se associados á hipertensão pulmonar e anemias hemolíticas adquiridas ou hereditárias, sendo também considerado marcador importante de hemólise intravascular (KATO, GLADWIN e STEINBERG, 2007).

### 2.2.3 Óxido Nítrico e metabólitos

A lise das hemácias em decorrência da hemólise intravascular promove liberação de Hb livre no plasma, apresentando efeitos inflamatórios e oxidantes que contribuem para a

disfunção do endotélio. Em consequência da lise, produtos como a porção heme e espécies reativas de oxigênio são liberadas na corrente sanguínea, levando ao aumento do estresse oxidativo e redução dos níveis de óxido nítrico (NO). Esse contexto oxidativo e inflamatório contribui para a ativação de hemácias, leucócitos, plaquetas e células endoteliais, as quais, por sua vez, mantêm o ciclo inflamatório, com mais produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas pro inflamatórias (VILAS BOAS et al., 2010; DUTRA et al., 2014).

A hemólise libera arginase, uma enzima que tem como substrato o aminoácido L-arginina, essencial para a produção do NO, levando à redução desse metabólito quando em vasoconstrição. O NO atua na regulação da vasodilatação e manutenção do tônus vascular, atuando no controle da expressão das moléculas de adesão e ativação leucocitária. A Hb liberada durante a hemólise é capaz de converter o NO em seu metabólito inativo reduzindo sua biodisponibilidade no plasma. Em decorrência disso, os pacientes com DF passam a apresentar resistência à dilatação do vaso e aumento da adesão celular no endotélio (ZAGO e PINTO, 2007; KATO, GLADWIN e STEINBERG, 2007, BELANGER et al., 2015).

## 2.3 MARCADORES GENÉTICOS

### 2.3.1 Haplótipos ligados ao grupo de genes da globina $\beta^S$ e suas influências

Estudos prévios sugerem rotas diferentes para a dispersão do alelo  $\beta^S$ ; porém, o estudo de Wainscoat e colaboradores (1983), que foi realizado em indivíduos africanos com AF, demonstrou a existência de diversidade grande de haplótipos diferentes, reforçando a hipótese de origem múltipla para o alelo. Com isso, há pelo menos três grupos populacionais na África com segmentos cromossômicos diferentes e caracterizados pela disposição sequencial específica de bases nitrogenadas, os quais estão distribuídos em regiões geográficas distintas, denominadas de Senegal (SEN), Benin (BEN) e Bantu (BANTU) (KULOZIK et al., 1986; ADORNO et al., 2008). Posteriormente, dois grupos étnicos também foram descritos por possuírem haplótipos diferentes, sendo o grupo de Camarões (CAR) e Saudita (SAUDI) em populações da Arábia Saudita e grupos tribais da Índia (KULOZIK et al., 1986).

Ao longo dos anos as populações foram migrando dentro do seu próprio continente e, em seguida, para outros continentes, o que fez com que o alelo  $\beta^S$  fosse bastante difundido. Desta forma, com os avanços da biologia molecular foi possível traçar as possíveis rotas do alelo  $\beta^S$  através dos haplótipos. O haplótipo Benin (BEN) foi disseminado para Espanha,

Portugal, Sicília e ilhas ao sudeste da Itália, Grécia, Turquia e noroeste da Arábia Saudita, enquanto que o haplótipo Bantu foi disseminado para o Kenia, Zâmbia e Sudão (OJWANG et al., 1989; MOHAMMED et al., 2006). No Brasil o haplótipo Bantu é o mais prevalente (55 a 75 %), seguido de Benin (27 a 45 %) e Camarões (aproximadamente 2 %), resultados decorrentes de estudos desenvolvidos nos estados da Bahia, São Paulo e Rio de Janeiro (ADORNO et al., 2005; SILVA et al., 2010; NAZARÉ KLAUTAU-GUIMARÃES e GRISOLIA, 2010; LYRA et al., 2005; SILVA FILHO, 2012).

Os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina  $\beta^S$  são descritos por exercerem influência no curso clínico dos indivíduos com AF. O haplótipo BEN está relacionado a níveis intermediários de HbF e gravidade moderada da doença; o CAR a níveis diminuídos de HbF e quadro clínico mais grave, o SEN e SAUDI a níveis elevados de HbF e curso clínico menos grave da doença (NAGEL e FABRY, 1984; POWARS, 1991; RAHGOZAR et al., 2000). No Brasil, os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina  $\beta^S$  possuem distribuição heterogênea, com predominância maior do haplótipo BEN na Bahia (ANTONARAKIS et al., 1984; GONÇALVES et al., 1984; ZAGO, FIGUEIREDO e OGO, 1992; COSTA et al., 1994; ADORNO et al., 2005; LYRA et al., 2005).

### 2.3.2 Talassemia alfa

A talassemia alfa é decorrente de mutações no cromossomo 16p13.3, envolvendo o agrupamento de genes da globina alfa por mutações de ponto ou deleções, entre as últimas as mais comuns são as  $-\alpha^{3.7Kb}$  e  $-\alpha^{4.2Kb}$ . Essas mutações provavelmente tiveram origem por *crossing over* desigual entre os genes alfa  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  (HIGGS et al., 1989). A deleção  $-\alpha^{3.7}$  é heterogênea, surgiu do *crossing over* desigual entre regiões homólogas no cromossomo 16, que envolve a perda de 3.7 quilobases (Kb) de DNA e apresenta três subtipos diferentes (I, II, III), a depender da localização exata da mutação no gene (NOGUCHI et al., 1985; SONATI e COSTA, 2006).

No Brasil é estimada a prevalência elevada da talassemia alfa de acordo com diferentes grupos étnicos que compõem a população de determinada região. A talassemia alfa decorrente da deleção 3.7Kb encontra-se distribuída em todas as regiões brasileiras até o momento estudadas (CANÇADO, 2006; SONATI e COSTA, 2006). A co-herança da talassemia alfa na AF vem trazendo muitos questionamentos acerca da atenuação clínica ou melhor prognóstico. Diversos estudos abordam que a talassemia causa impacto nos

parâmetros laboratoriais, sobrevida dos pacientes e eventos clínicos. De acordo com a literatura, alterações são encontradas, principalmente nos achados laboratoriais, que em sua maioria, denota aumento no número de hemácias, concentração de Hb total e hematócrito, diminuição nas concentrações de VCM, HCM, CHCM, reticulócitos, contagem de leucócitos e intensidade da hemólise (NAGEL e STEINBERG, 2001; RUMANEY et al., 2014). Em decorrência da redução da hemólise e aumento do hematócrito, pode haver elevação na viscosidade sanguínea, com aumento consequente das manifestações vasclusivas, podendo haver surgimento de osteonecrose e retinopatia (WEATHERALL e PROVAM 2000, KATO, GLADWIN e STEINBERG, 2007).

### 2.3.3 Polimorfismos moduladores da hemoglobina fetal

A distribuição das hemácias com HbF em adultos saudáveis é contínua, embora a maioria dos adultos tenha HbF em concentrações menores de 0,5 % do total de Hb, com 10-15 % de indivíduos que apresentam aumentos que variam de 0,8 % a 5 % (THEIN, SAMPIETRO e ROHDE, 1994; THEIN et al., 2009). Os indivíduos que apresentam níveis elevados de HbF são considerados como tendo persistência hereditária heterocelular de HbF (hPHHF). Desta forma, quando em associação com a talassemia na AF, a hPHHF pode elevar a produção de HbF a níveis que são clinicamente benéficos (PLATT et al., 1994; MENZEL et al., 2007). O aumento de HbF está relacionado com a melhora do quadro clínico do indivíduo com DF e, além da co-herança com a talassemia alfa, são descritos polimorfismos moduladores dessa Hb. Foram identificadas variantes genéticas múltiplas que estão associadas à presença de células F em indivíduos caucasianos (THEIN et al., 2007). Estas variantes genéticas residem em desequilíbrio de ligação na região intergênica *HBSIL - MYB*. De acordo com a literatura, há uma correlação na expressão aumentada de células progenitoras eritroides devido à presença de polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) na região do gene *HBSIL*, indicando associação com o mapeamento dos loci de traço quantitativo (QTLs) (THEIN et al., 2007).

As variantes genéticas influenciam na regulação das concentrações de HbF, exercendo papel importante na proteção do indivíduo em parte das complicações clínicas da AF (MENZEL et al., 2007). Esta proteção é dependente da capacidade da HbF de impedir a polimerização da HbS, sendo que a concentração é variável e hereditária. Desta maneira, é importante avaliar os polimorfismos em células B de linfoma/leucemia 11A (*BCL11A*), do



cromossomo 2p, na região intergênica *HBS1L-MYB*, gene *HMIP* no cromossomo 6q, e aqueles ligados ao gene de receptor olfatório 51B5/6 (*OR51B5/6*) do cromossomo 11p que tem sido associados a alterações na expressão da HbF (CRAIG et al., 1996; AKINSHEYE et al., 2011, 2012; BHANUSHALI et al., 2015).

Os SNPs localizados nesses genes estão associados à indução da expressão das células F, embora suas respectivas proteínas contribuam com outras funções. A proteína do gene *BCL11A*, denota função mieloide e de células B do proto-oncogene. Pode desempenhar importante participação na leucogênese e hematopoiese. Um fator essencial na linfopoiese remete-se à formação de células B no fígado fetal, além de funcionar como modulador da atividade de repressão transcricional ARP1 (SAIKI et al., 2000). Na proteína de receptor olfatório 51B5 pode apresentar uma proteína G associada, na qual participa da transdução de sinal celular, promovendo a troca de GDP por GTP. Além disso, pode transmitir o sinal a partir de um lado da membrana para o outro, dando início à mudança na atividade celular em resposta à detecção do olfato. Essa transdução de sinal termina com regulação de um processo celular como, por exemplo, regulação da transcrição ou da regulação de um processo metabólico (BULGER et al., 2000).

## 2.4 TRATAMENTO

A hidroxiureia (HU) é o medicamento de escolha utilizado até os dias atuais e ainda se constitui o melhor agente terapêutico, por proporcionar melhoria da qualidade de vida dos indivíduos com a DF (WONG et al., 2014). Na AF, a HU provoca o aumento nas concentrações de HbF e diminui os episódios de hemólise com consequente redução das CVO. O aumento nas concentrações de HbF é dito por estar associado a indução direta da produção de células F através da estimulação da guanilato ciclase solúvel e inibição da ribonucleotídeo-reductase levando a redução do ciclo de células que contém níveis mínimos de HbF (STEINBERG et al., 1997; IKUTA, AUSENDA e CAPPELLINI, 2001; ORAH e PLATT, 2008) (Figura 4).

Outras evidências positivas são observadas no perfil hematológico dos indivíduos, como o aumento da concentração de Hb e VCM, além de redução na contagem de plaquetas, reticulócitos e neutrófilos (HEENEY et al., 2004; STEINBERG, 2008). Quanto à adesão ao endotélio, também é verificada, a redução na expressão das moléculas de adesão na superfície das hemácias, plaquetas, leucócitos, bem como de proteínas receptoras levando a diminuição

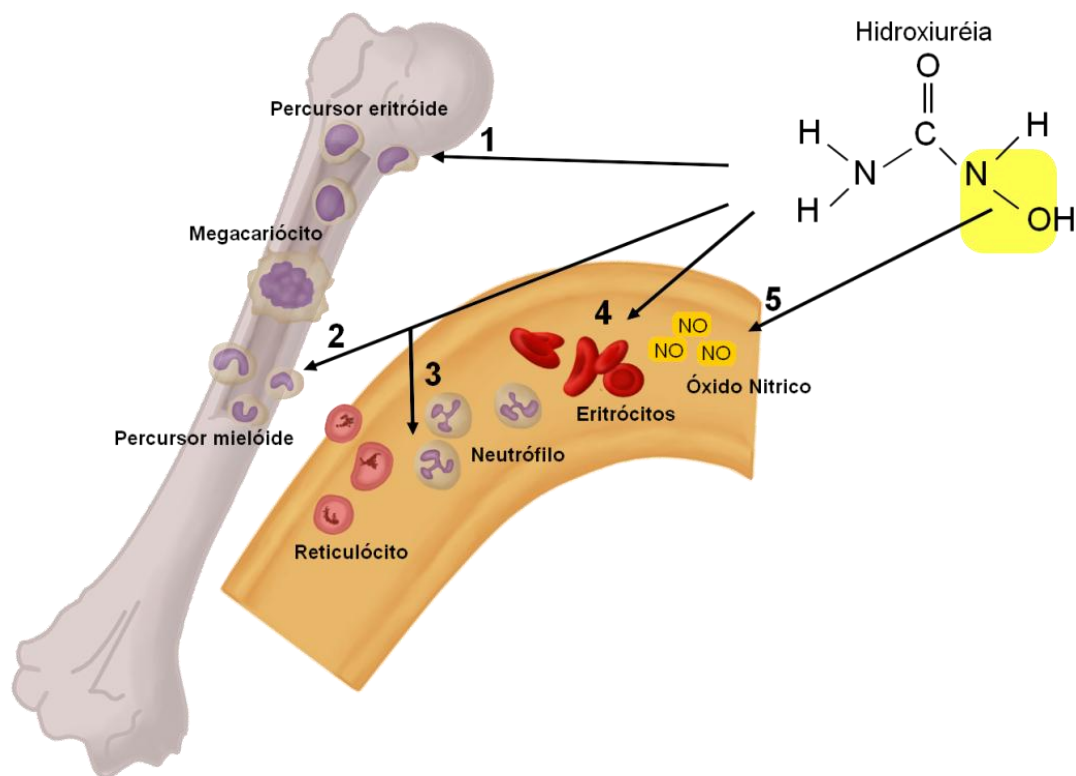
das oclusões vasculares, além da participação na redução e regulação da produção de citocinas, mediadores inflamatórios e oxidantes com aumento da síntese de NO (CHARACHE et al., 1992; OSIÉVRE et al., 2008; LOU et al., 2009). No Brasil, recomenda-se a administração de HU segundo o Protocolo de Uso do Ministério da Saúde, de acordo com a Portaria N° 55, de 29 de Janeiro de 2010; por via oral em cápsulas de 500 mg sendo metabolizada no fígado e excretada por via renal (80 %). A dose recomendada varia de 15-30 mg/kg ao dia, não excedendo a dose máxima tolerada de 35 mg/kg ao dia promovendo o máximo de melhora clínica (MONTALEMBERT et al., 2006).

Alguns eventos adversos são observados nos indivíduos com DF em uso de HU, incluindo mielossupressão, perturbação gastrointestinal, erupção cutânea, enxaqueca, potencial teratogênico e possível carcinogênese, variando a depender da resposta farmacológica de cada indivíduo. Por conseguinte, devem ser avaliados efeitos de toxicidade que estão associados à supressão de precursores eritróides com ciclagem mais rápida, favorecendo a duração maior das células F com ciclagem mais lenta, não tendo alteração da sua estrutura pela mutação no gene *HBB* (STEINBERG et al., 2010; GREEN et al., 2013). A taxa elevada de morbimortalidade na DF bem como a sua associação a eventos de hemólise, CVO, infecções recorrentes e outras complicações clínicas, vem demonstrando a grande importância da existência de um tratamento eficaz; porém, até o momento, só existem medicamentos paliativos para a sintomatologia clínica e/ou na tentativa de evitar complicações mais graves (CHARACHE et al., 1992; DARBARI et al., 2013). A expectativa de vida dos indivíduos com AF foi de 14 anos em 1973; no entanto, devido aos avanços e manejo da ciência e medicina a expectativa de vida aumentou para uma média de 50 anos, principalmente devido aos modelos de atenção integral e atendimento especializado em hospital-dia (STEINBERG et al., 2010; LÊ et al., 2015).

As complicações clínicas têm tratamentos e acompanhamentos específicos de acordo com o órgão envolvido, fato que comprova a necessidade de uma equipe multidisciplinar. Nessa direção, o diagnóstico precoce se constitui em ferramenta importante para o atendimento mais rápido e aplicação de medidas educacionais e preventivas, tais como: a utilização de antibioticoprofilaxia até cinco (5) anos, vacinação precoce contra pneumococos e hepatites virais, administração de ácido fólico, analgésicos e anti-inflamatórios quando necessário, auxiliando no bem-estar e na promoção da saúde do indivíduo com a DF (STEINBERG, 2008; BRASIL, 2014).

Até o momento, o único tratamento associado à cura da DF é o transplante de medula óssea (TMO), porém sua aplicação ainda é restrita e de alto risco ao paciente devido à

existência de um doador compatível, ocorrência de complicações e alto índice de mortalidade (SCHNOG et al., 2004; WALTERS, 2015). Estudos mais recentes apontam que as estratégias terapêuticas desenvolvidas para o indivíduo falciforme se baseia em três pontos importantes: diminuir a concentração intracelular de HbS com agentes que ativem o aumento da HbF ou impeçam o acometimento da falcização; em seguida diminuir eventos de adesão celular e, por conseguinte, a VO e, por último reduzir o processo inflamatório e o estresse oxidativo (WARE et al., 2011; SILVA et al., 2013).



**Figura 4.** Mecanismo de ação da hidroxiureia na medula óssea 1. Efeitos nos precursores eritroides; 2. Efeitos nos precursores mieloides; 3. Efeitos nos neutrófilos; 4. Efeitos nos eritrócitos; 5. Produção de NO. Fonte: elaborado por Luciana Fiuza.

### **3 HIPÓTESE**

#### **HIPÓTESE 1**

Características sociodemográficas, marcadores laboratoriais e genéticos associados a mecanismos fisiopatológicos e de gravidade, caracterizam fenotipicamente indivíduos com DF (AF e HbSC), contribuindo para a compreensão da heterogeneidade clínica.

#### **HIPÓTESE 2**

Marcadores genéticos e a resposta terapêutica da hidroxiureia influenciam os parâmetros laboratoriais, proporcionando menor gravidade aos pacientes com AF.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar marcadores laboratoriais e genéticos, perfil clínico e sociodemográfico associados aos mecanismos fisiopatológicos e gravidade da DF (AF e HbSC).

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conhecer o perfil sociodemográfico e clínico de pacientes com DF (AF e HbSC) da região Sul da Bahia;
2. Analisar marcadores laboratoriais associados à gravidade dos pacientes em estudo;
3. Caracterizar subfenotipicamente os indivíduos com AF com base nos parâmetros laboratoriais obtidos;
4. Identificar talassemia alfa ( $\alpha$ ) deleção 3,7 Kb, suas correlações com biomarcadores e influência na fisiopatologia da DF;
5. Investigar haplótipos ligados ao grupo de genes da globina  $\beta^S$  nos pacientes com DF;
6. Identificar SNPs em genes localizados nos cromossomos 2, 6 e 11 relacionados à modulação da HbF e, associação ao uso de hidroxiureia em pacientes com AF.

## 5 JUSTIFICATIVA

A DF acomete milhões de pessoas em diversas regiões do mundo, assim a África e os países com populações afrodescendentes são as regiões que apresentam as prevalências mais elevadas da doença (WANG e LUKENS, In: LEE et al., 1998). A Bahia é o estado brasileiro com a incidência mais elevada da DF; em Salvador, Adorno e colaboradores (2005) encontraram a incidência de 0,2 % de indivíduos HbSS e a frequência de 9,8 % para indivíduos HbAS ao estudarem recém-nascidos de uma maternidade pública. Na região Sul da Bahia ainda não há nenhum estudo de caracterização fenotípica da DF na população, tornando importante o levantamento de dados relacionados a esta hemoglobinopatia, visando à melhoria do prognóstico, diagnóstico e acompanhamento clínico do paciente. A apresentação clínica dos indivíduos com DF é heterogênea, sendo que alguns estudos têm demonstrado papel importante da interação gênica e de fenômenos epistáticos no fenótipo do paciente (STEINBERG, 2005; SILVA FILHO, 2012). Os pacientes com DF podem apresentar STA, que envolve infarto ou infecção pulmonar; sequestro esplênico e AVC, bem como o surgimento de outras complicações clínicas, como priapismo, necrose asséptica do fêmur e retinopatia (STEINBERG, 2009; DARBARI et al., 2013).

Em relação à gravidade da DF, fatores genéticos têm sido descritos por determinarem mudanças no curso clínico da doença. Desta forma, a simples presença de tais fatores tem sido utilizada para estimar riscos clínicos e para estratégias de seguimento desses pacientes (CHARACHE, 1990; DARBARI et al., 2013).

A anemia hemolítica apresentada pelos pacientes com DF varia em intensidade entre os subfenótipos, sendo que a presença de talassemia  $\alpha$  causada pela deleção de 3.7Kb tem sido considerada como característica importante para a apresentação dos subfenótipos hemolíticos e vaso-oclusivo/viscoso (KATO, GLADWIN e STEINBERG, 2007), fato que aponta para a importância desse marcador.

A diversidade fenotípica apresentada pelos pacientes com AF também tem sido associada à presença de haplótipos ligados ao grupo de genes da globina  $\beta$ , que também têm sido relacionados de acordo com as concentrações de HbF (POWARS et al., 1991; STEINBERG, 2001). Cinco haplótipos principais são descritos e nomeados de acordo com a região geográfica onde foram primeiro identificados: Benin (BEN) associado à África Centro-Ocidental, Senegal (SEN) à África Centro-Ocidental, Bantu (CAR) à região Centro-Sul e Oriente Africano, Camarões (CAMER) à Costa Oeste da África, com descrição em afro-

americanos do Sudeste dos Estados Unidos, e a Arábia Saudita-Índia ao subcontinente indiano e a secção Ocidental da Península Arábica (COSTA et al., 1994; GONÇALVES et al., 1984, 2003).

As concentrações de HbF podem chegar a 30 % nos pacientes com AF (STEINBERG et al., 2005), sendo que os valores elevados de HbF têm sido relacionados a menor gravidade clínica da doença, além da diminuição na mortalidade infantil e em adultos (CHARACHE et al., 1990; STEINBERG, 2005). A HbF em indivíduos adultos é regulada de maneira multigênica, com identificação de 3 loci de características quantitativas (QTLs) na modulação da síntese da HbF: o SNP C/T no gene *HBB2* localizado na região cromossômica 11p15; o polimorfismo intergênica *HBSIL-MYB* na região cromossômica 6q23, e o polimorfismo *BCL11A* na região cromossômica 2p16 (BHANUSHALI et al., 2015; HARBARA e STEINBERG, 2016). Com base na prevalência elevada da DF e no papel modulador exercido pela HbF, torna-se importante a elucidação de mecanismos que possam favorecer o desenvolvimento de estratégias indutoras da Hb.

Com o desenvolvimento do presente trabalho foram avaliados um grupo de pacientes com DF da região Sul da Bahia, em acompanhamento no Centro de Referência para DF do município de Itabuna, caracterizando-os quanto as concentrações de HbF, presença da talassemia  $\alpha$  3.7 Kb, haplótipos ligados ao grupo de genes da globina  $\beta^S$  e SNPs ligados aos principais QTLs relacionados a síntese da HbF, associando-os a marcadores hematológicos, bioquímicos e clínicos, visando o estabelecimento de marcadores preditivos da gravidade da doença. Cumpre ressaltar que estas alterações podem explicar o curso clínico heterogêneo apresentado pelos pacientes com DF, contribuindo para a compreensão da evolução clínica da doença na população alvo do estudo, trazendo informações adicionais que podem ser utilizadas no seguimento clínico dos pacientes e no delineamento de estratégias futuras para o desenho de novos fármacos e outras modalidades terapêuticas.

## 6 MANUSCRITOS PUBLICADOS/ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

### 6.1 MANUSCRITO 1

**Título:** Comparative study of sickle cell anemia and hemoglobin SC disease: clinical characterization, laboratory biomarkers and genetic profiles

**Autores:** Milena Magalhães Aleluia<sup>1,2</sup>, Teresa Cristina Cardoso Fonseca<sup>3,4</sup>, Regiana Quinto Souza<sup>3,4</sup>, Fábila Idalina Neves<sup>3</sup>, Caroline Conceição da Guarda<sup>1,2</sup>, Rayra Pereira Santiago<sup>1,2</sup>, Bruna Laís Almeida Cunha<sup>2</sup>, Camylla Villas Boas Figueiredo<sup>1,2</sup>, Sânzio Silva Santana<sup>1,2</sup>, Silvana Sousa da Paz<sup>1</sup>, Júnia Raquel Dutra Ferreira<sup>1,2</sup>, Bruno Antônio Veloso Cerqueira<sup>5</sup>, Marilda de Souza Gonçalves<sup>1,2\*</sup>.

**Situação:** Submetido

**Objetivo:** (*referente ao objetivo 1,2,4 e 5 da tese*):

1. Conhecer o perfil sociodemográfico e clínico de pacientes com DF (AF e HbSC) da região Sul da Bahia;
2. Analisar marcadores laboratoriais associados à gravidade nos pacientes em estudo;
4. Identificar talassemia alfa ( $\alpha$ ) deleção 3,7 Kb, suas correlações com biomarcadores e influência na fisiopatologia da DF;
5. Investigar haplótipos ligados ao grupo de genes da globina  $\beta^S$  nos pacientes com DF;

#### **Principais resultados:**

A casuística desse estudo foi composta por 200 pacientes com DF acompanhados no Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna, Bahia. A maioria dos pacientes com DF era do sexo feminino (52%), a idade do primeiro diagnóstico foi de até 6 meses de vida, com 38% (76/200), desses, 68 pacientes foram diagnosticados através de triagem neonatal. Nas associações de parâmetros laboratoriais, observamos perfil hemolítico com disfunção endotelial na AF e, a HbSC está mais associada ao perfil vaso-oclusivo/viscosidade. O haplótipo BEN foi mais frequente, com maiores concentrações de HbF e menor concentração de HbS. A talassemia  $-\alpha^{3,7Kb}$  teve a frequência de 0,09 (9,0%), com concentração elevada de hemoglobina e hematócrito, porém com microcitose e hipocromia. Sobre os eventos clínicos



foi verificada ocorrência maior de hospitalizações na AF. Os nossos dados sugerem a caracterização da população em estudo e, com base nos parâmetros laboratoriais, marcador genético e perfil clínico, enfatizam as diferenças entre os genótipos da AF e HbSC.

## BMC Hematology

### Comparative study of sickle cell anemia and hemoglobin SC disease: clinical characterization, laboratory biomarkers and genetic profiles

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Comparative study of sickle cell anemia and hemoglobin SC disease: clinical characterization, laboratory biomarkers and genetic profiles
<b>Article Type:</b>	Research article
<b>Section/Category:</b>	Non-malignant hematological diseases
<b>Funding Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p><b>Background:</b> In this study, we evaluate the association of different clinical profiles, laboratory and genetic biomarkers in patients with sickle cell anemia (SCA) and hemoglobin SC disease (HbSC) contributing to characterize the sickle cell disease (SCD) genotypes.</p> <p><b>Methods:</b> We conducted a cross-sectional study from 2013 to 2014 in 200 SCD individuals (141 with SCA; 59 with HbSC) and analyzed demographic data to characterize the study population. In addition, we determined the association of hematological, biochemical and genetic markers including the <math>\beta</math>S-globin gene haplotypes and the 3.7 Kb deletion of <math>\alpha</math>-thalassemia (<math>-\alpha</math>3.7Kb-thal), as well as the occurrence of clinical events in both SCD genotypes.</p> <p><b>Results:</b> Laboratory parameters showed a hemolytic profile associated to endothelial dysfunction in SCA individuals; however, the HbSC genotype was more associated with increased blood viscosity and inflammatory conditions. The BEN haplotype was the most frequently observed and was associated with elevated fetal hemoglobin (HbF) and low S hemoglobin (HbS). The <math>-\alpha</math>3.7Kb-thal prevalence was 0.09 (9%), and it was associated with elevated hemoglobin and hematocrit concentrations. Clinical events were more frequent in SCA patients.</p> <p><b>Conclusions:</b> Our data emphasize the differences between SCA and HbSC patients based on laboratory parameters and the clinical and genetic profile of both genotypes.</p>
<b>Corresponding Author:</b>	Marilda de Souza Gonçalves Laboratório de Hematologia e Genética Computacional/Instituto Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Laboratório de Hematologia e Genética Computacional/Instituto Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Milena Magalhães Aleluia
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	<p>Milena Magalhães Aleluia</p> <p>Teresa Cristina Cardoso Fonseca</p> <p>Regiana Quinto Souza</p> <p>Fábia Idalina Neves</p> <p>Caroline Conceição da Guarda</p> <p>Rayra Pereira Santiago</p> <p>Bruna Laís Almeida Cunha</p> <p>Camylla Villas Boas Figueiredo</p>

**Title:**

Comparative study of sickle cell anemia and hemoglobin SC disease: clinical characterization, laboratory biomarkers and genetic profiles

Milena Magalhães Aleluia<sup>1,2</sup>, Teresa Cristina Cardoso Fonseca<sup>3,4</sup>, Regiana Quinto Souza<sup>3,4</sup>, Fábila Idalina Neves<sup>3</sup>, Caroline Conceição da Guarda<sup>1,2</sup>, Rayra Pereira Santiago<sup>1,2</sup>, Bruna Laís Almeida Cunha<sup>2</sup>, Camylla Villas Boas Figueiredo<sup>1,2</sup>, Sânzio Silva Santana<sup>1,2</sup>, Silvana Sousa da Paz<sup>1</sup>, Júnia Raquel Dutra Ferreira<sup>1,2</sup>, Bruno Antônio Veloso Cerqueira<sup>5</sup>, Marilda de Souza Gonçalves<sup>1,2\*</sup>.

**Authors' institutional addresses:**

<sup>1</sup> Laboratório de Hematologia e Genética Computacional, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Salvador, Bahia, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil.

<sup>3</sup> Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna, Itabuna, Brasil.

<sup>4</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Brasil.

<sup>5</sup> Universidade Estadual da Bahia (UNEB), Salvador, Bahia, Brasil.

**Authors' e-mails address:**

milena.aleluia@gmail.com; ruiteresafonseca@uol.com.br; regianaquinto@hotmail.com;

fabia\_neves83@yahoo.com.br; cguarda4@hotmail.com; rayrasantiago@hotmail.com;

brunal.a.cunha@gmail.com; myllavilas@hotmail.com; sanziobiomedico@hotmail.com;

spaz@bahia.fiocruz.br; juniadutra@gmail.com; brunoveloso2@hotmail.com;

mari@bahia.fiocruz.br;

**\*Corresponding author:**

Ph.D. Marilda de Souza Gonçalves

Postal address: Instituto Gonçalo Moniz - IGM.

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA, CEP: 40296-710. E-mail address:

mari@bahia.fiocruz.br, Tel.: +55 71 3176-2226.

**Abstract**

**Background:** In this study, we evaluate the association of different clinical profiles, laboratory and genetic biomarkers in patients with sickle cell anemia (SCA) and hemoglobin SC disease (HbSC) contributing to characterize the sickle cell disease (SCD) genotypes.

**Methods:** We conducted a cross-sectional study from 2013 to 2014 in 200 SCD individuals (141 with SCA; 59 with HbSC) and analyzed demographic data to characterize the study population. In addition, we determined the association of hematological, biochemical and genetic markers including the  $\beta^S$ -globin gene haplotypes and the 3.7 Kb deletion of  $\alpha$ -thalassemia ( $-\alpha^{3.7Kb}$ -thal), as well as the occurrence of clinical events in both SCD genotypes.

**Results:** Laboratory parameters showed a hemolytic profile associated to endothelial dysfunction in SCA individuals; however, the HbSC genotype was more associated with increased blood viscosity and inflammatory conditions. The BEN haplotype was the most frequently observed and was associated with elevated fetal hemoglobin (HbF) and low S hemoglobin (HbS). The  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thal prevalence was 0.09 (9%), and it was associated with elevated hemoglobin and hematocrit concentrations. Clinical events were more frequent in SCA patients.

**Conclusions:** Our data emphasize the differences between SCA and HbSC patients based on laboratory parameters and the clinical and genetic profile of both genotypes.

**Keywords:** sickle cell anemia, hemoglobin SC disease, biomarkers, genetic profile

## Background

Sickle cell disease (SCD) is a group of inherited diseases that includes sickle cell anemia (SCA), which is the homozygous state of the beta S ( $\beta^S$ ) allele and the most severe SCD genotype. Likewise, the heterozygous state of the  $\beta^S$  allele, is characterized by the presence of hemoglobin S (HbS) associated with changes in the structure or synthesis of the other globin chain, consists of a group of less severe SCD, including hemoglobin SC disease (HbSC). SCD has important implications for public health, and both worldwide incidence and prevalence are high, which reinforces it as a significant social problem in many countries [1,2]. The clinical diversity of SCD includes hemolytic and vaso-occlusive episodes (VOE), infections, stroke, acute chest syndrome (ACS), pulmonary hypertension, multiple organ dysfunctions and other complications [3]. Several factors have been shown to modulate the clinical manifestations of SCD including hematological, biochemical, inflammatory and genetic markers, as well as environmental, sociodemographic, and socioeconomic characteristics [3,4].

With respect to the genetic markers, SCA patients can also be carriers of one or more gene determinants such as the 3.7 Kb deletion of  $\alpha$ -thalassemia ( $-\alpha^{3.7\text{Kb}}\text{-thal}$ ). In Afro-descendants, the heterozygous ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) or homozygous ( $-\alpha/-\alpha$ )  $-\alpha^{3.7\text{Kb}}\text{-thal}$  genotype in SCA individuals is associated with a reduction in HbS concentration, which consequently lowers polymerization and cell damage and improves the hemolysis profile [5,6]. In addition, this association promotes changes in hematological and biochemical [5,6,7].

$\beta^S$  globin gene haplotypes are constituted of polymorphisms in the  $\beta^S$  globin gene cluster, which are associated with specific levels of fetal hemoglobin (HbF), contributing to phenotypic diversity in SCA patients [8,9,10]. There are five main haplotypes, named Benin

(BEN), Central African Republic (CAR), Senegal (SEN), Arab-Indian, and Cameroon (CAM), according to their geographical origin and ethnic groups [9,11].

Considering the wide range of variability in the severity of SCA and HbSC individuals, some laboratory biomarkers are important to understand the disease physiopathology, such as hemolysis (reticulocyte count and serum LDH) and viscosity markers (hemoglobin and hematocrit concentration) [12]. HbF levels, inflammation and endothelial dysfunction play a pivotal role in differentiating SCD sub-phenotypes [12,13].

The severity of SCD arises from several clinical complications that influence each individual's immunity. Therefore, the use of medication, prophylactic vaccines and practicing healthy habits are recommended [14,15]. However, another important point is the cost to the health care system and how much the government pays for each patient with SCD, including hospital admissions and readmissions, therapy and the spectrum of comorbidities that may require years of follow-up in different specialists [15,16].

In this study, we investigated the association of the different clinical manifestations, laboratory biomarkers and genetic profiles in patients with SCA and HbSC to establish parameters that highlight sub-phenotypes differences in these SCD genotypes.

## **Methods**

### **Subjects**

We conducted a cross-sectional study from 2013 to 2014 at the Itabuna Reference Center for Sickle Cell Disease in Bahia, Brazil, that follows a total of 536 SCD patients from the south coast, extreme south and southwest regions of Bahia. Our sample size was 200 SCD patients (141 with SCA and 59 with HbSC) with a mean age of  $16.06 \pm 11.83$  years and a

median age of 13 years (range: 1-61 years). Clinical data were collected from the medical records. Each patient enrolled in the study was in a steady state and had not received a blood transfusion in the last six months. Informed consent was obtained from all individuals or responsible party prior to enrollment in the study, and the study protocol was approved by the Ethics Research Board of the Gonçalo Moniz Institute of the Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ-BA) following the ethical principles of the Declaration of Helsinki of 1975 and its revision.

### **Hematological and biochemical parameters**

Hematological analyses were carried out using Sysmex KX-21N™ Automated Hematology Analyzer (Sysmex Corporation, Tokyo, Japan). Serum lipids and lipoproteins were analyzed using fully automated equipment (Cobas, Roche Diagnostics, Salt Lake City, Utah, USA). Hemoglobin profiles and HbF concentration were determined using High Performance Liquid Chromatography (HPLC, VARIANT I-Bio-Rad, CA, USA). Nitric oxide metabolites (NOM) were determined using the Griess reaction, as previously described [17].

### **Genetic analysis**

Genomic DNA was extracted from leukocytes using a QIAamp® DNA Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions.  $\beta^S$  globin gene cluster haplotypes were investigated using polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) [18]. Allele-specific PCR was used to investigate the  $\alpha^{3.7Kb}$ -thal deletion presence [19]. All analyses were performed in the Anemia Research Laboratory at the Federal University of Bahia and Laboratory of Hematology, Genetics and Computational Biology at the IGM-FIOCRUZ-BA.

## **Statistical Analysis**

Baseline values of selected variables were summarized as the mean and stratified according to percentile. Distribution of the quantitative variables was analyzed using Shapiro-Wilk test. Quantitative variables were compared between two groups using the t-test for data with a parametric distribution and the Mann-Whitney test for nonparametric data. The Chi-square test and Fisher exact test were used to analyze the qualitative or categorical variables. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 20.0 software (IBM, New York, NY, USA), and P values <0.05 were considered significant.

## **Results**

In our study, we analyzed patients with SCA and HbSC and have identified that the majority of the SCD patients were female (52.0%; 104/200) and were aged either between 6 and 10 years (22.0%; 44/200) or 21 and 30 years (20.0%; 40/200). Brown skin color (52.0%; 104/200) was self-reported by the majority of the patients during the interview (Table 1). With respect to the patient's educational status, 60.5% (121/200) reported some type of educational degree, 26.0% (52/200) were uneducated or partially completed elementary school, and 53.5% (107/200) had only completed elementary school (Table 1). The age at first diagnosis of SCD was younger than 6 months of age in the majority of the patients (38.0%; 76/200), and 68 patients in this group were diagnosed through the newborn screening. In addition, 25.0% of the patients were diagnosed between the age of 7 months and 4 years (50/200) and 17.0% were diagnosed between the ages of 5 and 9 years (34/200) (Table 1). When we analyzed the number of patients who have any relatives with SCD, we found that



31.5% (63/200) had a brother with the disease, and 28.5% (57/200) had four or more brothers with SCD (Table 1).

SCD patients were from several cities belonging to administrative regions, with 78.0% from the south coast of Bahia, 14.5% from the extreme south of Bahia, and 7.5% from the southwest of Bahia (Fig. 1). In the south coast, the city of Itabuna had the highest number of SCD patients, which represented 38.5% (77/200) of the study population, followed by Eunapólis, Ilhéus, Porto Seguro, and Camacan, which had 6.0% (12/200), 6.0% (12/200), 5.5% (11/200), and 5.0% (10/200) of the SCD patients respectively.

We found that BEN haplotype (47.9%; 135/282) was the predominant haplotype in SCA patients, followed by CAR haplotype (45.0%; 127/282), and atypical haplotype (7.1%; 20/282). In the HbSC patients, 54.2% had BEN haplotype (32/59) and 45.8% had CAR haplotype (27/59). Regarding the genotype of the  $\beta^S$  globin gene cluster haplotypes among the SCA patients, 41.2% (58/141) had BEN/CAR genotype, followed by CAR/CAR genotype (22.7%; 32/141) and BEN/BEN genotype (24.8%; 35/141). Among the SCA patients, we found that 5.0% had BEN/Atypical genotype (7/141), 3.5% had CAR/Atypical genotype (5/141), and 2.8% for the atypical genotype (4/141). When we analyzed the globin gene cluster haplotypes associated to the HbSC, we found that 5.1% (3/59) had the BEN II genotype, 35.6% (21/59) had the CAR I genotype, 47.4% (28/59) had the BEN I genotype, 8.5% (5/59) had the CAR III genotype, 1.7% (1/59) had the CAR II genotype, and 1.7% (1/59) had the BEN III genotype (Table 2). The haplotypes are known to modulate HbF levels, thus, we analyzed 99 patients with SCA and 52 patients with HbSC who had no history of HU therapy and absence of the CAR haplotype lead to elevated HbF levels (Table 3).

We found that 168 patients had the wild type of the  $\alpha$ - genotype and that 32 patients had the deletion ( $-\alpha^{3.7\text{Kb}}\text{-thal}$ ). In this group, we observed 4 patients with the homozygous genotype ( $-\alpha/-\alpha$ ) and 28 patients with the heterozygous genotype ( $-\alpha/\alpha$ ) (Table 2). When we

evaluated 98 patients with SCA and 52 patients with HbSC who had no history of HU therapy, we have found that hemoglobin and hematocrit concentrations were high and that MCV and MCH were low in the presence of the  $\alpha^{3.7Kb}$ -thal in both SCD genotypes (Table 3).

We observed in the biomarkers of hemolysis the red blood cell count ( $p < 0.001$ ), hemoglobin ( $p < 0.001$ ) and hematocrit concentrations ( $p < 0.001$ ) were low, and MCV ( $p < 0.001$ ), MCH ( $p < 0.001$ ) concentration and red blood cell distribution width (RDW) ( $p < 0.001$ ) were high (Table 4) in SCA patients. Additionally, in the same group, we found that the levels of total ( $p < 0.001$ ), direct ( $p < 0.001$ ) and indirect ( $p < 0.001$ ) bilirubin, LDH ( $p < 0.001$ ), NO metabolites ( $p = 0.047$ ) and reticulocyte count ( $p < 0.001$ ) were high (Table 3). We also found that the total white blood cell (WBC) ( $p < 0.001$ ), eosinophil ( $p = 0.007$ ), lymphocyte ( $p < 0.001$ ) and monocyte ( $p = 0.003$ ) counts (Table 4) were high in SCA patients. The platelet count was increased in SCA patients ( $p < 0.001$ ). Conversely, we observed low levels of total cholesterol ( $p = 0.012$ ) and HDL-C ( $p < 0.001$ ) in these patients (Table 4).

We analyzed the distribution of clinical events in the different SCD genotypes (SCA and HbSC) with no history of HU therapy, and we found that hospitalization was strongly associated with the SCA genotype (91.8%; 90/98) ( $p = 0.001$ ) (Table 5).

With regard to the use of prophylactic penicillin, we identified that 87.5% (70/80) of SCD pediatric patients received prophylactic penicillin therapy. Following the use of prophylactic penicillin therapy, 92.5% (185/200) of SCD patients in all age groups reported the use of folic acid everyday ( $p = 0.046$ ). HU therapy was used by 25.0% (50/200) of SCD patients all older than 6 years and was more frequently used in patients aged 11 to 31 years ( $p < 0.001$ ).

## Discussion

The present study analyzed the laboratory, genetic, clinical and demographic characteristics of 200 SCD patients who were followed at the Reference Center living in the south of Bahia in the northeast of Brazil.

We observed low educational level in patients with SCD, which is in accordance with findings from studies in the United States and other Brazilian regions [20,21]. Another study observed that sociodemographic characteristics had no influence on the development of SCD complications; however, age, low socioeconomic class and education level were associated with anemic crisis in SCD [22,23].

Among our patients 38.0% were diagnosed younger than 6 months of age, and 25.0% were diagnosed between 7 months and 4 years old, which is consistent with a delayed diagnosis. Newborn screening for SCD started in 2001 in Brazil when the National Newborn Screening Program (PNTN)/Guthrie test was founded to test for hemoglobinopathies [24], establishing important early diagnosis to SCD. Newborn screening for hemoglobinopathies resulted in a reduction of mortality and clinical complications in SCD patients in Brazil, due to the therapeutic and clinical monitoring of the child from birth. Therefore, delayed diagnosis contributes to the risk of mortality and disease severity [24].

In the geographic region of our study, we found high occurrence of SCD at patients of the south coast of Bahia. In this region, the majority of SCD patients were from the city of Itabuna. Specialized care located in the city of Itabuna facilitates patient access to health care and support. Much about the SCD history in the south coast region of Bahia remains unknown. The beginning of the peopled of Itabuna started firstly with the cowboys from Sergipe, in 1867, when they also immigrated to Vitória da Conquista [25]. Sergipean immigrants, from a state close to Bahia, initiated holdings on the Cachoeira River banks

during the same period that the Jesuits provided a catechesis to the *Pataxó*, *Guerren* and *Camacã* natives on farms. In 1730 and 1790, pioneers braved the wilderness and the natives [25]. Blacks and mulattos coming from the Sergipe and Bahia backlands in 1850 were attracted to the wealth of the region and the possibility of working on the cocoa farms [25]. As a result, Ilhéus and Itabuna had a significant influence of many Brazilian natives. In addition, people from different tribes and African regions came from South Africa and landed in the port of Ilhéus during the slave trade.

Interestingly, some of the historical aspects suggest the possibility of greater dispersion of the  $\beta^S$  allele in Itabuna. The predominant genotype in SCA patients was BEN/CAR and in HbSC patients was BEN I followed by CAR I. According to the literature, in 1678-1814, approximately 39 of the 1770 ships that exported tobacco from Bahia went to the Congo and Angola, where they captured Africans for slave labor, which represents the genetic contribution from the central Atlantic region of Africa [26]. After 1815, Bahia was the only Brazilian state that restricted slave traffic through Ecuador, which explains the correlation between the genotypic frequencies in Bahia and Western Africa, principally the Benin region [27]. We found high levels of HbF and low levels of HbS in patients with the BEN haplotype. Most of the patients with the CAR haplotype had low HbF levels (below 5% of the total HbF), whereas carriers of the BEN haplotype had intermediate HbF levels (between 5 and 15%) and this is in agreement with a previous study [28].

In Brazil, the prevalence of  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thal is associated with different ethnic groups that constitute its population. Previous studies have shown that the  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thal genotype is the most frequent deletion that causes  $\alpha$ -thal in all Brazilian regions [29,30]. We observed a high prevalence of  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thal deletion in the studied population. It is estimated that in Brazil, the overall frequency of the  $\alpha$ -thalassemia trait is between 1% and 3%. [30]. According to our results, the distribution of the hematologic profile with the co-inheritance of  $\alpha^{3.7Kb}$ -thal

deletion lead to increased hemoglobin levels, despite the microcytosis, hypochromia and increased hematocrit levels. The literature reports that the homozygous and heterozygous states of  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thal, are characterized by mild anemia, hypochromia and microcytosis. However, increased hematocrit levels are observed, which contribute to enhance blood viscosity, increase vaso-occlusion and the occurrence of clinical events [7,31].

Several studies have demonstrated the physiopathological mechanisms underlying SCA and HbSC. We observed that SCA patients had a more prominent hemolytic pattern compared to HbSC patients who presented a lower RBC count and hemoglobin concentration, and increased LDH levels. This is in agreement with previous studies which described that in HbSC patients the HbC presence induces the HbS polymerization, however it occur in a reduced degree when compared to SCA patients. Thus, HbSC patients exhibits a less severe hemolytic anemia [2,32]. SCD patients with increased hemolysis exhibit several complications, such as priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension and early mortality [2,32].

We identified increased reticulocytes count in SCA patients in response to hemolysis. This is related to anemic stress that promotes the release of immature RBCs from the bone marrow, which consequently increases reticulocytes count on peripheral blood [33]. We observed a slight decrease in NOM in HbSC patients. The lysis of erythrocytes promotes the release of free Hb in the plasma, which promotes inflammatory and oxidative effects that contribute to endothelial dysfunction. As a result, SCD patients classically present with vessel dilation resistance and increased cell adhesion to the endothelium [12,34]. Due to this process, the heme portion and reactive oxygen species (ROS) are released into the bloodstream, increasing oxidative stress and decreasing NOM levels [35,36].

Patients with HbSC had a lower leukocyte count than SCA patients. This result is consistent with previous findings that identify the same association [37]. Moreover, SCA

patients had higher platelet counts; however, the mean platelet volume (MPV) was high in both the genotypes. Platelets regulate hemostasis, but they are also responsible for inducing inflammation. An increase in platelet activation has been found in SCD patients during vaso-occlusive events [38].

The analysis of the lipid profile in SCA patients included low total cholesterol levels and lower HDL-C levels compared to HbSC patients; however, both genotypes had values below the reference value, which represents a risk factor for the development of cardiovascular disease [39]. Hypertriglyceridemia and increased VLDL-C were observed in SCA patients in this study, although these results were not statistically significant. According to previous reports, SCD individuals have decreased lipid plasma levels during hemolytic stress and compared with normal individuals [40].

Clinical manifestations are considered a limiting factor that may influence patient mortality; these include pain crisis, VOE and the coexistence of comorbidities, such as malleolar ulcers, infection, cholelithiasis, splenomegaly, retinopathy, vascular necrosis, and neurological disorders, which have a negative effect on the cognitive development of these patients [11,16]. As demonstrated in our results, we found increased hospitalizations in SCA patients, once this is the most severe genotype of SCD characterized by a higher incidence of clinical complications and hospitalizations than HbSC [16].

We found that a high percentage of patients used oral prophylactic penicillin, including Benzathine, which was administered in patients prior to age 7 years. The prophylactic use of penicillin significantly reduces the risk of sepsis and death due to pneumococcal infection [41]. Another prescribed drug, folic acid, is used in cases of increased activity secondary to chronic hemolysis that results in high RBC destruction and leads to a deficit in folic acid [42,43]. Our data showed daily high adherence to folic acid use in all age groups [44].

## Conclusion

Our data highlight the differences between sub-phenotypes among SCA and HbSC patients, based on laboratory characterization, genetic profiles and clinical manifestations of both genotypes. The results of our analyses emphasize the need for specialized care services for SCA and HbSC patients, particularly because of their heterogeneous genetic, clinical and pathophysiological backgrounds, and indicate the need for public health policies that significantly improve the health of these patients.

## Abbreviations

**SCA**: sickle cell anemia; **HbSC**: hemoglobin SC disease; **SCD**: sickle cell disease; **- $\alpha^{3.7Kb}$ -thal**:  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thalassemia; **HbF**: fetal hemoglobin; **HbS**: hemoglobin S; **HbC**: hemoglobin C; **VOE**: vaso occlusion events; **ACS**: acute chest syndrome; **BEN**: Benin; **CAR**: Central African Republic; **SEN**: Senegal; **CAM**: Arab-Indian, and Cameroon; **LDH**: lactate dehydrogenase; **NOM**: nitric oxide metabolites; **PCR**: reaction polimerase chain; **RFLP**: Restriction Fragment Length Polymorphism; **HU**: hydroxyurea; **MCV**: mean cell volume; **MCH**: mean corpuscular hemoglobin; **RDW**: red blood cell distribution width; **WBC**: white blood cell; **RBC**: red blood cell; **HDL-C**: high-density lipoprotein cholesterol; **VLDL-C**: very low-density lipoprotein cholesterol; **ROS**: reactive oxygen species; **MPV**: mean platelet volume.

## Declarations

## Acknowledgements

Not applicable.

**Funding**

No funding was received.

**Availability of data and materials**

The datasets supporting the conclusions of this article are included in the article.

**Authors' Contributions**

MSG, MMA, and BAVC, performed conception and design of the study, acquisition of data, analysis and interpretation of data. RPS, CCG and JRDF drafting the article or revising it critically for important intellectual content. TCCF, FIN, RQS and BLAC assisted and performed the blood collection of the patients. CVBF and SSP helped perform the experiments, the hematological, biochemical and molecular analysis. SSS helped review the medical records and perform the statistical analyses.

**Competing interests**

The authors have no competing interests.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Ethics approval and consent to participate**

The study received approval from the institutional review board of Instituto Gonçalo Moniz at the Fundação Oswaldo Cruz (IGM-FIOCRUZ – Bahia - Brazil) (CAAE 08452913.9.0000.0040) and the informed consent was obtained from all the participants.



## References

1. WHO/AFRO. The health of the people: what works – the African Regional Health Report. Public health - organization and administration. 2014.
2. Grosse SD, Odame I, Atrash HK, Amendah DD, Piel FB, Williams TN. Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. *Am J Prev Med.* 2011;41(6 Suppl 4):S398-405.
3. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *ScientificWorldJournal.* 2009;9:46-67.
4. Rees DC, Gibson JS. Biomarkers in sickle cell disease. *British journal of haematology.* 2012;156(4):433-45.
5. Steinberg MH, Coleman MB, Adams JG, Rosenstock W. Interaction between HBS-beta-o-thalassemia and alpha-thalassemia. *The American journal of the medical sciences.* 1984;288(5):195-9.
6. Steinberg MH, Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *American journal of hematology.* 2012;87(8):795-803.
7. Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JP, Menezes JF, Rego M, Reis MG, et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cadernos de saude publica.* 2005;21(1):292-8.
8. Charache S. Fetal hemoglobin, sickling, and sickle cell disease. *Advances in pediatrics.* 1990;37:1-31.
9. Nagel RL, Fabry ME. Sickle cell anemia as a multigenetic disease: new insights into the mechanism of painful crisis. *Progress in clinical and biological research.* 1984;165:93-102.
10. Goncalves MS, Bomfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A, et al. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al].* 2003;36(10):1283-8.
11. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *British journal of haematology.* 2005;129(4):465-81.
12. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood reviews.* 2007;21(1):37-47.
13. Damanhoury GA, Jarullah J, Marouf S, Hindawi SI, Mushtaq G, Kamal MA. Clinical biomarkers in sickle cell disease. *Saudi journal of biological sciences.* 2015;22(1):24-31.
14. Steinberg MH, Voskaridou E, Kutlar A, Loukopoulos D, Koshy M, Ballas SK, et al. Concordant fetal hemoglobin response to hydroxyurea in siblings with sickle cell disease. *American journal of hematology.* 2003;72(2):121-6.
15. Raphael JL, Dietrich CL, Whitmire D, Mahoney DH, Mueller BU, Giardino AP. Healthcare utilization and expenditures for low income children with sickle cell disease. *Pediatric blood & cancer.* 2009;52(2):263-7.
16. Pizzo E, Lavery AA, Phekoo KJ, AlJuburi G, Green SA, Bell D, et al. A retrospective analysis of the cost of hospitalizations for sickle cell disease with crisis in England, 2010/11. *J Public Health (Oxf).* 2015;37(3):529-39.
17. Nims RW, Cook JC, Krishna MC, Christodoulou D, Poore CM, Miles AM, et al. Colorimetric assays for nitric oxide and nitrogen oxide species formed from nitric oxide stock solutions and donor compounds. *Methods in enzymology.* 1996;268:93-105.
18. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. *American journal of hematology.* 1989;32(1):66-9.
19. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. *Blood.* 2000;95(1):360-2.

20. Carroll PC, Haywood C, Jr., Hoot MR, Lanzkron S. A preliminary study of psychiatric, familial, and medical characteristics of high-utilizing sickle cell disease patients. *Clin J Pain*. 2013;29(4):317-23.
21. Loureiro MM, Rozenfeld S. [Epidemiology of sickle cell disease hospital admissions in Brazil]. *Rev Saude Publica*. 2005;39(6):943-9.
22. Adegoke SA, Adeodu OO, Adekile AD. Sickle cell disease clinical phenotypes in children from South-Western, Nigeria. *Niger J Clin Pract*. 2015;18(1):95-101.
23. Ballas SK, Kesen MR, Goldberg MF, Luty GA, Dampier C, Osunkwo I, et al. Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:949535.
24. Serjeant GR. Screening for sickle-cell disease in Brazil. *Lancet (London, England)*. 2000;356(9224):168-9.
25. Aleluia MM MM, Alcântara LCJ, Rego FFA, Santos LPS, Galvão-Castro B, Gonçalves MS, Oliveira T, Marin LJ, Sousa SMB, Gadelha SR. The origin of HTLV-1 in southern Bahia by phylogenetic, mtDNA and  $\beta$ -globin analysis. *Virology Reports Elsevier*. 2015;5:63–74.
26. Verger. Flux et Reflux de la Traite des Nègres Entre le Golfe de Benin et Bahia de Todos os Santos. Mouton Press, Paris, France. 1968.
27. Florentino M. Em Costas Negras. Companhia das Letras Press. 1997.
28. Powars DR. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. *Hematology/oncology clinics of North America*. 1991;5(3):475-93.
29. Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet journal of rare diseases*. 2010;5:13.
30. Figueiredo MS, Kerbauy J, Goncalves MS, Arruda VR, Saad ST, Sonati MF, et al. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *American journal of hematology*. 1996;53(2):72-6.
31. Lyra IM, Goncalves MS, Braga JA, Gesteira Mde F, Carvalho MH, Saad ST, et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cadernos de saude publica*. 2005;21(4):1287-90.
32. Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *American journal of hematology*. 2009;84(9):618-25.
33. Discher DE, Ney PA. The reason sickle reticulocytes expose PS. *Blood*. 2015;126(15):1737-8.
34. Belanger AM, Keggi C, Kanas T, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. Effects of nitric oxide and its congeners on sickle red blood cell deformability. *Transfusion*. 2015;55(10):2464-72.
35. Vilas-Boas W, Cerqueira BA, Zanette AM, Reis MG, Barral-Netto M, Goncalves MS. Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. *Annals of hematology*. 2010;89(9):877-82.
36. Dutra FF, Alves LS, Rodrigues D, Fernandez PL, de Oliveira RB, Golenbock DT, et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(39):E4110-8.
37. Colella MP, de Paula EV, Machado-Neto JA, Conran N, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, et al. Elevated hypercoagulability markers in hemoglobin SC disease. *Haematologica*. 2015;100(4):466-71.
38. Wun T, Paglieroni T, Tablin F, Welborn J, Nelson K, Cheung A. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1997;129(5):507-16.
39. Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood*. 2007;110(6):2166-72.
40. Rahimi Z, Merat A, Haghshenass M, Madani H, Rezaei M, Nagel RL. Plasma lipids in Iranians with sickle cell disease: hypocholesterolemia in sickle cell anemia and increase of HDL-cholesterol in sickle cell trait. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2006;365(1-2):217-20.

41. Gaston MH, Verter JI, Woods G, Pegelow C, Kelleher J, Presbury G, et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. A randomized trial. *The New England journal of medicine*. 1986;314(25):1593-9.
42. Dixit R, Nettem S, Madan SS, Soe HH, Abas AB, Vance LD, et al. Folate supplementation in people with sickle cell disease. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2016;2:Cd011130.
43. Martyres DJ, Vijenthira A, Barrowman N, Harris-Janzen S, Chretien C, Klaassen RJ. Nutrient Insufficiencies/Deficiencies in Children With Sickle Cell Disease and Its Association With Increased Disease Severity. *Pediatric blood & cancer*. 2016.
44. Nwenyi E, Leafman J, Mathieson K, Ezeobah N. Differences in quality of life between pediatric sickle cell patients who used hydroxyurea and those who did not. *Int J Health Care Qual Assur*. 2014;27(6):468-81.

**Table 1.** Characterization of SCD patients followed by the Reference Center in the South of Bahia, Brazil.

Age (years)	N (%)	Sex	N (%)	Skin color (self-declared)	N (%)	Education	N (%)
≤ 5	36 (18.0)	Female	104 (52.0)	White	13 (6.5)	Elementary school	107(53.5)
6 to 10	44 (22.0)	Male	96 (48.0)	Black	74 (37.0)	High school	40 (20.0)
11 to 15	37 (18.5)			Brown	104 (52.0)	University	1 (0.5)
16 to 20	21 (10.5)			Yellow	9 (4.5)	Uneducated or incomplete elementary school	52 (26.0)
21 to 30	40 (20.0)						
≥ 31	22 (11.0)						

Number of brothers with SCD	N (%)	Age at 1st Diagnosis	N (%)	Parents with SCD	N (%)	Region of Origin	N (%)
0	21 (10.5)	≤ 6 months	76 (38.0)	None	100 (50.0)	South Coast	156 (78.0)
1	47 (23.5)	7 months to 4 years	50 (25.0)	Father	4 (2.0)	Extreme South	29 (14.5)
2	42 (21.0)	5 to 9 years	34 (17.0)	Mother	3 (1.5)	Southwest	15 (7.5)
3	33 (16.5)	10 to 14 years	11 (5.5)	Brother	63 (31.5)		
4 or More	57 (28.5)	15 to 17 years	15 (7.5)	Cousin	22 (11.0)		
		≥ 17 years	14 (7.0)	Aunt and Uncle	1 (0.5)		
				Nephews	2 (1.0)		
				Not heard			
				Inform	5 (2.5)		

**Table 2.** Distribution of the genotypes and alleles of the  $\beta^S$  globin haplotype and  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thalassemia in SCD.

$\beta^S$ globin Genotype				$-\alpha^{3.7Kb}$ -Thalassemia Genotype			
HbSC	% (N=59)	SCA	% (N=141)	HbSC	% (N=59)	SCA	% (N=141)
BEN II	5.1 (3)	BEN/BEN	24.8 (35)	Absence	84.7 (50)	Absence	83.7 (118)
CAR I	35.6 (21)	BEN/CAR	41.2 (58)	Heterozygous	13.6 (8)	Heterozygous	14.2 (20)
BEN I	47.4 (28)	CAR/CAR	22.7 (32)	Homozygous	1.7 (1)	Homozygous	2.1 (3)
CAR III	8.5 (5)	BEN/Atypical	5.0 (7)				
CAR II	1.7 (1)	CAR/Atypical	3.5 (5)				
BEN III	1.7 (1)	Atypical	2.8 (4)				

$\beta^S$ globin Haplotype in HbSC		$\beta^S$ globin Haplotype in SCA		Frequency of $-\alpha^{3.7Kb}$ -Thalassemia chromosome in SCD	
BEN	54.2 (32/59)	BEN	47.9 (135/282)	Presence	0.09 (36/400)
CAR	45.8 (27/59)	CAR	45.0 (127/282)		
		Atypical	7.1 (20/282)		

**Table 3.** Distribution of the median (25<sup>th</sup> – 75<sup>th</sup>) hematological data among the  $\beta^S$  globin haplotypes and  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thalassemia.

$\beta^S$ globin Haplotype				$-\alpha^{3.7Kb}$ -Thalassemia			
HbSC (N=52)		SCA (N=99)		HbSC (N=52)		SCA (N=99)	
Median (25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> )	Median (25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> )	Median (25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> )	Median (25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> )	Median (25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> )	Median (25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> )	Median (25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> )	Median (25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> )
<b>Absence CAR</b>	<b>Presence CAR</b>	<b>Absence CAR</b>	<b>Presence CAR</b>	<b>Absence <math>-\alpha^{3.7Kb}</math></b>	<b>Presence <math>-\alpha^{3.7Kb}</math></b>	<b>Absence <math>-\alpha^{3.7Kb}</math></b>	<b>Presence <math>-\alpha^{3.7Kb}</math></b>
<b>N=26</b>	<b>N=26</b>	<b>N=29</b>	<b>N=70</b>	<b>N=43</b>	<b>N=9</b>	<b>N=85</b>	<b>N=14</b>
<b>HbS</b>		<b>HbS</b>		<b>Hb</b>		<b>Hb</b>	
50.0 (48.1 – 51.4) p=0.301	50.6 (49.5 – 51.6)	83.0 (76.0 – 88.3) <b>p=0.004</b>	88.3 (83.5 – 91.7)	10.8 (10.1 – 11.6) p=0.735	10.9 (9.9 – 12.4)	7.6 (7.1 – 8.3) p=0.427	8.2 (7.3 – 8.8)
<b>HbF</b>		<b>HbF</b>		<b>Ht</b>		<b>Ht</b>	
1.9 (0.8 – 4.5) p=0.181	1.3 (0.7 – 3.2)	12.9 (7.5 – 18.3) <b>p=0.005</b>	7.7 (4.1 – 11.5)	30.7 (28.7 – 32.5) p=0.961	31.7 (28.0 – 34.1)	21.7 (19.9 – 24.1) p=0.252	23.8 (21.4 – 25.5)
				<b>MCV</b>		<b>MCV</b>	
				76.1 (71.5 – 80.1) <b>p=0.018</b>	71.6 (67.3 – 72.4)	88.0 (83.6 – 93.2) <b>p&lt;0.001</b>	80.3 (76.3 – 83.1)
				<b>MCH</b>		<b>MCH</b>	
				27.2 (24.6 – 28.8) p=0.071	25.0 (23.4 – 26.5)	30.8 (28.8 – 32.7) <b>p&lt;0.001</b>	27.7 (25.7 – 29.0)

Hb: hemoglobin; Ht: hematocrit; MCV: mean cell volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin. Bold values indicate significance at  $p < 0.05$ ; p-value obtained using Mann-Whitney.

**Table 4.** Comparison of the laboratory data between SCA and HbSC patients.

Laboratory value	SCA (N=98)	HbSC (N=52)	p value
	Median (25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> )	Median (25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> )	
<b>Hemolysis</b>			
RBC, x10 <sup>12</sup> /L	2.60 (2.30 – 2.80)	4.15 (3.80 – 4.50)	<b>&lt;0.001</b>
Hemoglobin, g/dL	7.60 (7.15 – 8.50)	10.90 (10.12 – 11.82)	<b>&lt;0.001</b>
Hematocrit, %	21.80 (20.15 – 24.47)	30.80 (28.72 – 32.50)	<b>&lt;0.001</b>
MCV, fL	86.05 (81.37 – 91.10)	74.40 (70.80 – 79.72)	<b>&lt;0.001</b>
MCH, fL	30.15 (27.87 – 32.25)	26.60 (24.60 – 28.67)	<b>&lt;0.001</b>
RDW, fL	24.80 (21.60 – 27.20)	18.65 (17.62 – 19.57)	<b>&lt;0.001</b>
Total bilirubin, mg/dL	2.55 (1.67 – 3.72)	1.20 (0.80 – 1.67)	<b>&lt;0.001</b>
Direct bilirubin, mg/dL	0.45 (0.30 – 0.60)	0.30 (0.20 – 0.40)	<b>&lt;0.001</b>
Indirect bilirubin, mg/dL	2.20 (1.20 – 3.12)	0.90 (0.52 – 1.27)	<b>&lt;0.001</b>
LDH, U/L	1094.00 (785.50 – 1684.50)	481.50 (381.75 – 567.25)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Reticulocyte</b>			
Reticulocyte count	5.40 (4.20 – 8.20)	3.65 (2.62 – 4.37)	<b>&lt;0.001</b>
<b>NO metabolites</b>			
NOm, µM	35.62 (28.02 – 47.50)	31.34 (23.19 – 40.80)	<b>0.047</b>
<b>Leukocytes</b>			
WBC, x 10 <sup>9</sup> /L	13800.00 (11175.00 – 16100.00)	10450.00 (7225.00 – 12900.00)	<b>&lt;0.001</b>
Segment count, x 10 <sup>9</sup> /L	5778.00 (4275.25 – 7203.50)	5182.00 (3498.50 – 6717.00)	0.080
Eosinophil count, x 10 <sup>9</sup> /L	695.50 (281.50 – 1774.75)	421.50 (216.50 – 895.25)	<b>0.007</b>
Lymphocyte count, x 10 <sup>9</sup> /L	5535.00 (4335.00 – 7156.50)	3356.50 (2492.00 – 4704.75)	<b>&lt;0.001</b>
Monocyte count, x 10 <sup>9</sup> /L	349.50 (219.00 – 670.75)	257.00 (144.50 – 402.75)	<b>0.003</b>
<b>Platelets</b>			
Platelet count, x10 <sup>3</sup> /mL	441500.00 (365250.00 – 547000.00)	267000.00 (189500.00 – 389000.00)	<b>&lt;0.001</b>
MPV, fL	9.50 (8.80 – 10.40)	9.70 (9.30 – 10.40)	0.314
<b>Lipid metabolism</b>			
Total Cholesterol, mg/dL	122.00 (97.75 – 146.75)	133.50 (110.25 – 166.75)	<b>0.012</b>
HDL-C, mg/dL	32.00 (27.00 – 38.00)	37.00 (33.00 – 44.75)	<b>&lt;0.001</b>
LDL-C, mg/dL	67.00 (41.75 – 88.25)	73.00 (57.00 – 109.75)	0.071
VLDL-C, mg/dL	22.00 (16.75 – 31.25)	21.00 (14.00 – 27.75)	0.178
Triglycerides, mg/dL	110.00 (82.75 – 156.50)	103.50 (68.50 – 138.50)	0.175

RBC: red blood cells; MCV: mean cell volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; RDW: red cell distribution width; LDH: lactate dehydrogenase. NOm: nitric oxide metabolites; WBC: white blood cell; MPV: mean platelet volume; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; VLDL-C: very low-density lipoprotein cholesterol; Bold values indicate significance at p<0.05; p-value obtained using Mann-Whitney.

**Table 5.** Clinical characterization of SCA and HbSC patients.

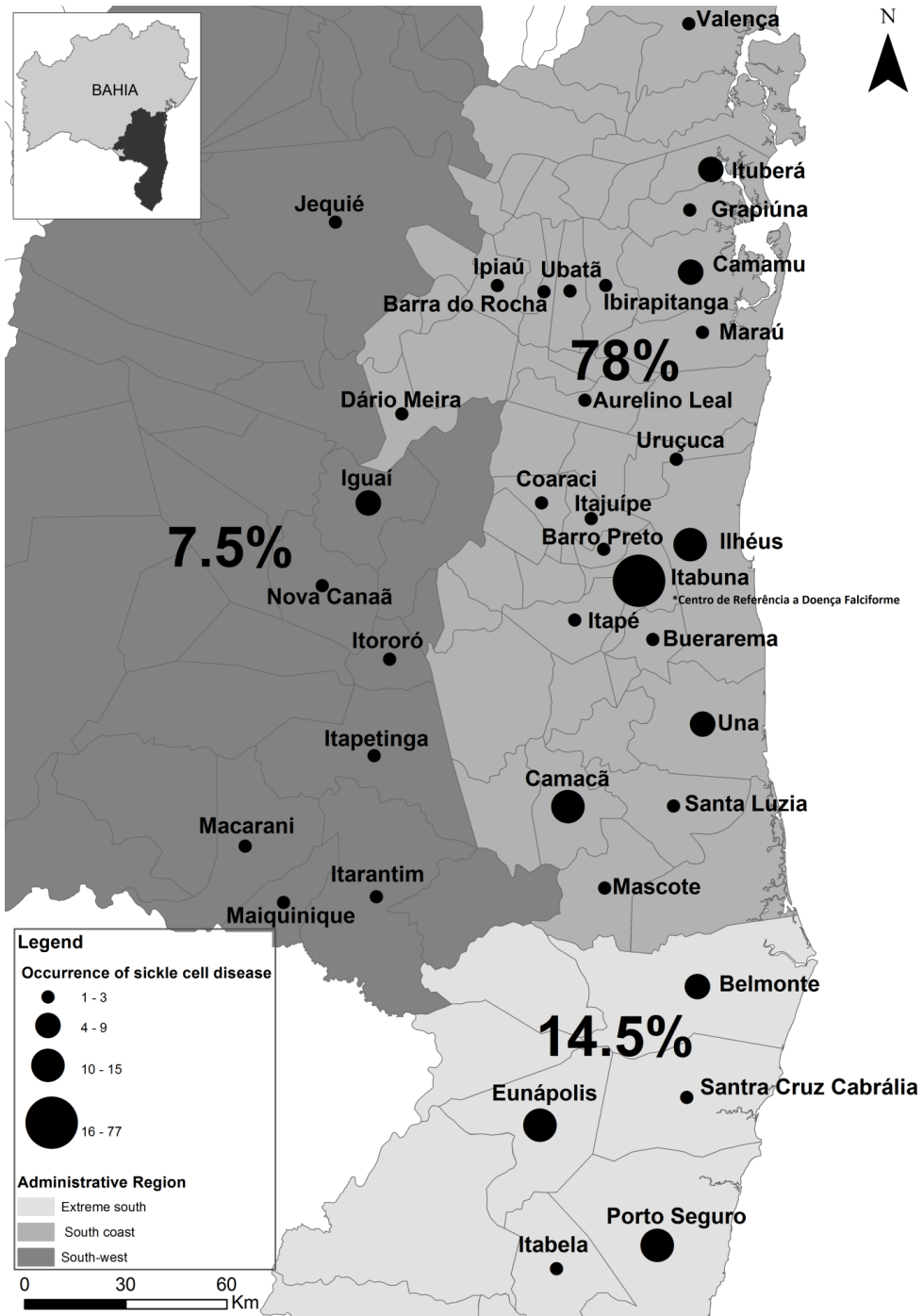
<b>Clinical characterization</b>	<b>SCA</b>	<b>HbSC</b>	<b><i>p value</i></b>
	N= 98	N= 52	
Hospitalization	90/98 (91.8%)	36/52 (69.2%)	<b>0.001</b>
Pneumonia	38/98 (38.8%)	22/52 (42.3%)	0.728
Splenomegaly	40/98 (40.8%)	18/52 (34.6%)	0.486
Asthma	6/98 (6.1%)	3/52 (5.8%)	1.000
Pain crises	83/98 (84.7%)	41/52 (78.8%)	0.374
Infection	36/98 (36.7%)	18/52 (34.6%)	0.859
Priapism	10/50 (20.0%)	5/22 (22.7%)	0.764
Vaso-occlusion	89/98 (90.8%)	42/52 (80.8%)	0.119
Retinopathy	3/98 (3.0%)	4/52 (7.7%)	0.236
Cholelithiasis	17/98 (17.3%)	4/52 (7.7%)	0.139

Comparison of clinical events among the SCA and HbSC genotypes calculated using the Fisher's exact test. Bold values indicate significance at  $p < 0.05$ .



**Figure Legend**

**Fig. 1** The SCD patients followed by the Reference Center in South Coast, Extreme South, Southwest Bahia.



## 6.2 MANUSCRITO 2

**Título:** Association of classical markers and establishment of the dyslipidemic sub-phenotype of sickle cell anemia

**Autores:** Milena Magalhães Aleluia<sup>1,2</sup>; Caroline Conceição da Guarda<sup>1,2</sup>; Rayra Pereira Santiago<sup>1,2</sup>; Teresa Cristina Cardoso Fonseca<sup>3,4</sup>; Fábila Idalina Neves<sup>3</sup>; Regiana Souza Quinto<sup>3,4</sup>; Larissa Alves Farias<sup>4</sup>; Felipe Araújo Pimenta<sup>4</sup>; Luciana Magalhães Fiuza<sup>1,2</sup>; Thassila Nogueira Pitanga<sup>1</sup>; Júnia Raquel Dutra Ferreira<sup>1,2</sup>; Elisângela Vitória Adorno<sup>2</sup>; Bruno Antônio Veloso Cerqueira<sup>5</sup>; Marilda de Souza Gonçalves\*<sup>1,2</sup>

**Situação:** Submetido

**Objetivo:** (*referente ao objetivo 3 da tese*):

3. Caracterizar subfenotipicamente os indivíduos com AF com base nos parâmetros laboratoriais obtidos;

### **Principais resultados:**

Nesse trabalho verificamos a associação de biomarcadores e possíveis subfenótipos que norteiam a fisiopatologia da AF. Desta forma, encontramos associação significativa entre concentrações elevadas de LDH, sugerindo uma condição hemolítica, através da contagem diminuída de hemácias e hematócrito, além de concentrações elevadas de bilirrubina total e indireta. Nos pacientes com concentrações menores de NO, encontramos associação com concentrações reduzidas de bilirrubina direta e contagem de reticulócitos; entretanto, no perfil lipídico, observamos aumento das concentrações de colesterol total, HDL-C, LDL-C, seguido de diminuição de VLDL-C e triglicérides. Sugerimos que esse subfenótipo dislipidêmico participe da disfunção endotelial. No biomarcador HDL-C, os pacientes com níveis de HDL-C acima de 40 mg/dL tiveram aumento na contagem de hemácias e concentração de hematócrito; por conseguinte, de VLDL-C e triglicérides, possivelmente auxiliando uma condição inflamatória da AF. Em relação a presença da Tal  $-\alpha^{3.7Kb}$  na AF, foram encontradas contagem elevada de hemácias e concentrações baixas de VCM e HCM, bilirrubina total e indireta. Os resultados encontrados, além de corroborar os subfenótipos previamente descritos, sugerem o estabelecimento do novo subfenótipo dislipidêmico na AF.

**Lipids in Health and Disease**  
**Association of classical markers and establishment of the dyslipidemic sub-phenotype**  
**of sickle cell anemia**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	LHAD-D-16-00403
<b>Full Title:</b>	Association of classical markers and establishment of the dyslipidemic sub-phenotype of sickle cell anemia
<b>Article Type:</b>	Research
<b>Funding Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p><b>Background:</b> Sickle cell anemia (SCA) patients have a wide range of clinical manifestations, and it is suggested that the disease is constituted by sub-phenotypes. Several genetic features modulate SCA clinical course and laboratory biomarkers are useful to follow the patients. This study aims to analyze laboratory biomarkers and the presence of <math>\alpha</math>-thalassemia (<math>\alpha</math>-thal), which both underlie the pathophysiology of Sickle Cell Anemia.</p> <p><b>Methods:</b> A cross-sectional study was conducted from 2013 to 2014, and 99 patients in steady-state SCA were enrolled. We assessed correlations and associations with hematological and biochemical data and investigated the co-inheritance of <math>-\alpha 3.7\text{Kb}</math>-thalassemia (<math>-\alpha 3.7\text{Kb}</math>-thal). Correlation analyses were performed using Spearman and Pearson coefficient. The median of quantitative variables between two groups was compared using t-test and Mann-Whitney. P-values &lt; 0.05 were considered statistically significant.</p> <p><b>Results:</b> We found significant association of high lactate dehydrogenase levels with decreased red blood cell count and hematocrit as well as high levels of total and indirect bilirubin. SCA patients with low nitric oxide metabolites had high total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol and reduced very low-density cholesterol, triglycerides, direct bilirubin level and reticulocyte counts. In SCA patients with high-density lipoprotein cholesterol greater than 40 mg/dL, we observed increased red blood cell count, hemoglobin, hematocrit, and fetal hemoglobin and decreased nitric oxide metabolites levels. The presence of <math>-\alpha 3.7\text{Kb}</math>-thal was associated with high red blood cell count and low mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, platelet count and total and indirect bilirubin levels.</p> <p><b>Conclusions:</b> Our results provide additional information about the association between biomarkers and co-inheritance of <math>-\alpha 3.7\text{Kb}</math>-thal in SCA, and suggest the role of dyslipidemia and nitric oxide metabolites in the characterization of this sub-phenotype.</p>
<b>Corresponding Author:</b>	Marilda de Souza Gonçalves, Ph.D Laboratório de Hematologia e Genética Computacional, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e Universidade Federal da Bahia (UFBA) BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Laboratório de Hematologia e Genética Computacional, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e Universidade Federal da Bahia (UFBA)
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Milena Magalhães Aleluia, PhD
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Milena Magalhães Aleluia, PhD Caroline Conceição da Guarda, Master Rayra Pereira Santiago, Master Teresa Cristina Cardoso Fonseca, M.D.

**Title:**

Association of classical markers and establishment of the dyslipidemic sub-phenotype of sickle cell anemia

Milena Magalhães Aleluia<sup>1,2</sup>; Caroline Conceição da Guarda<sup>1,2</sup>; Rayra Pereira Santiago<sup>1,2</sup>; Teresa Cristina Cardoso Fonseca.<sup>3,4</sup>; Fábila Idalina Neves<sup>3</sup>; Regiana Souza Quinto<sup>3,4</sup>; Larissa Alves Farias<sup>4</sup>; Felipe Araújo Pimenta<sup>4</sup>; Luciana Magalhães Fiuza<sup>1,2</sup>; Thassila Nogueira Pitanga<sup>1</sup>; Júnia Raquel Dutra Ferreira<sup>1,2</sup>; Elisângela Vitória Adorno<sup>2</sup>; Bruno Antônio Veloso Cerqueira<sup>5</sup>; Marilda de Souza Gonçalves\*<sup>1,2</sup>

**Authors' institutional addresses:**

<sup>1</sup> Laboratório de Hematologia e Genética Computacional, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Salvador, Bahia, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil.

<sup>3</sup> Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna, Itabuna, Brasil.

<sup>4</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Brasil.

<sup>5</sup> Universidade Estadual da Bahia (UNEB), Salvador, Bahia, Brasil.

**Authors' e-mails address:**

milena.aleluia@gmail.com; cguarda4@hotmail.com; rayrasantiago@hotmail.com;

ruiteresafonseca@uol.com.br; fabia\_neves83@yahoo.com.br; regianaquinto@hotmail.com;

biomed.larissa@hotmail.com; f.pimenthas@gmail.com; mfiuza.luciana@gmail.com;

pitanga.tn@hotmail.com; juniadutra@gmail.com; liuadorno@hotmail.com;

brunoveloso2@hotmail.com; mari@bahia.fiocruz.br;

**\*Corresponding author:**

Marilda de Souza Gonçalves, PhD

Postal address: Instituto Gonçalo Moniz - IGM.

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA, CEP: 40296-710. E-mail address:

mari@bahia.fiocruz.br, Tel.: +55 71 3176-2226.

**Abstract**

**Background:** Sickle cell anemia (SCA) patients have a wide range of clinical manifestations, and it is suggested that the disease is constituted by sub-phenotypes. Several genetic features modulate SCA clinical course and laboratory biomarkers are useful to follow the patients. This study aims to analyze laboratory biomarkers and the presence of  $\alpha$ -thalassemia ( $\alpha$ -thal), which both underlie the pathophysiology of Sickle Cell Anemia.

**Methods:** A cross-sectional study was conducted from 2013 to 2014, and 99 patients in steady-state SCA were enrolled. We assessed correlations and associations with hematological and biochemical data and investigated the co-inheritance of  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thalassemia ( $-\alpha^{3.7Kb}$ -thal). Correlation analyses were performed using Spearman and Pearson coefficient. The median of quantitative variables between two groups was compared using t-test and Mann-Whitney. P-values < 0.05 were considered statistically significant.

**Results:** We found significant association of high lactate dehydrogenase levels with decreased red blood cell count and hematocrit as well as high levels of total and indirect bilirubin. SCA patients with low nitric oxide metabolites had high total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol and reduced very low-density cholesterol, triglycerides, direct bilirubin level and reticulocyte counts. In SCA patients with high-density lipoprotein cholesterol greater than 40 mg/dL, we observed increased red blood cell count, hemoglobin, hematocrit, and fetal hemoglobin and decreased

nitric oxide metabolites levels. The presence of  $-\alpha^{3.7\text{Kb}}$ -thal was associated with high red blood cell count and low mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, platelet count and total and indirect bilirubin levels.

**Conclusions:** Our results provide additional information about the association between biomarkers and co-inheritance of  $-\alpha^{3.7\text{Kb}}$ -thal in SCA, and suggest the role of dyslipidemia and nitric oxide metabolites in the characterization of this sub-phenotype.

**Keywords:** Sub-phenotype, sickle cell anemia, dyslipidemia,  $\alpha$ -thalassemia

## Background

Sickle cell anemia (SCA), represents the homozygous condition of the beta S ( $\beta^S$ ) globin allele, is the more severe genotype of sickle cell disease (SCD). SCA is characterized by hemolysis, chronic and acute inflammation, vaso-occlusive complications, multiple organ damage, and reduced patient survival [1]. The pathophysiology of SCA is complex and influenced by hypoxia, acidosis and cell dehydration, which contribute to the HbS polymerization and leads to erythrocyte deformation [2].

The sickled red cells alter the microcirculation by adherence or indirectly by changing in the endothelium. SCA has sub-phenotypes that may be helpful to understand the pathophysiological mechanisms of the disease. The sub-phenotypes are associated with blood viscosity and vaso occlusive events (VOE) as well as hemolysis and endothelial dysfunction, with alterations in nitric oxide (NO) levels or biochemical markers, such as lactate dehydrogenase (LDH), and hematological parameters [3].

Changes in biochemical and hematological parameters and an imbalance of molecules associated with endothelium dysfunction in SCA may influence blood flow and contribute to

oxidative stress, leading to VOE complications, such as acute chest syndrome (ACS), stroke, priapism, gallstone disease, and retinopathy [4,5].

Hemolysis in the SCD exhibits heterogeneous intensities due to changes in the hemoglobin (Hb) concentration altering laboratory biomarkers, such as reticulocyte and red blood cells (RBC), bilirubin and its fractions, LDH and mean corpuscular volume (MCV) [3]. NO is a potent vasodilator and is an important endothelial mediator in the natural control of vascular tone, adhesion, platelet aggregation and thrombosis [6]. The conversion of GTP to cGMP mediated by NO leads to vasodilatation; however, sickled erythrocytes under hemolysis release free Hb in the plasma, leading to methemoglobin and nitrate production [3,6]. Hence, the decrease of NO bioavailability in the vascular environment in SCD patients affects the beneficial properties of NO, such as reduction of platelet activation, and leads to increased adhesion molecule expression [3,7]. Of note, hemolysis increases arginase level that consumes L-arginine, decreasing NO endothelial production. Furthermore, important associated clinical events may be related to hemolysis [8].

Lipid metabolism in SCD is potentially associated with hemolytic profile and endothelial dysfunction. Similarly, dyslipidemia has been described among patients with different SCD genotypes, increased low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and decreased high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels, revealing a potential predictor biomarker of disease severity [9,10]. HDL-C plays important role in reducing the risk of hemolysis and improving endothelial dysfunction and contributes to a better clinical outcome. HDL-C fractions, such as pro-HDL-C are associated with inflammatory disease [11]. The very low-density cholesterol (VLDL-C) fraction and triglycerides increase the number of LDL-C receptors and its serum levels, contributing to the dyslipidemia sub-phenotype in SCD [10]. This sub-phenotype explained the high oxidative stress secondary to the intravascular hemolysis in SCD patients. However, there are several reports about low HDL-C [9,10] and



increased triglycerides [3,8,12] in SCD patients, features widely recognized in the general population as important factors in cardiovascular disease.

Alpha ( $\alpha$ )-thalassemia ( $\alpha$ -thal) results from deletions on chromosome 16p13.3, which harbors a group of globin- $\alpha$  genes (*HBA*). In Brazil, there is a high prevalence of  $-\alpha^{3.7\text{Kb}}$ -thal in different ethnic groups that compose the population and its different regions [13].  $\alpha$ -thal co-inheritance with SCA raises numerous questions about prognosis attenuation, addressing impacts in systemic parameters, patient survival and clinical events.

This study aims to analyze laboratory biomarkers and  $-\alpha^{3.7\text{Kb}}$ -thal presence and their association with the pathophysiological mechanism of SCA. To achieve the main purpose of the study, we analyzed hematological and biochemical parameters to provide knowledge about the SCA sub-phenotypes previously described.

## **Methods**

### **Subjects**

We developed a cross-sectional study conducted from 2013 to 2014, and 99 steady-state SCA patients were included. Patients had not received blood transfusion at least six months before the blood collection, and they were not treated with hydroxyurea (HU) therapy. The present study received approval from the institutional review board of the Gonçalo Moniz Institute at the Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ – Bahia - Brazil) and is in compliance with the guidelines for human research established by the Declaration of Helsinki, as well as its subsequent revisions. Informed written consent was obtained from all study subjects or their guardians who agreed to participate in the study and authorized the use of collected samples. SCA patients were seen at Sickle Cell Disease Reference Center of Itabuna, Bahia, Brazil.

## Laboratory Methods

Hematological analyses were performed using the Sysmex KX-21N™ Automated Hematology Analyzer (Sysmex Corporation, Tokyo, Japan), and biochemical analyses were performed using the Cobas automated analyzer (Roche Diagnostics, Salt Lake city, Utah, USA). We investigated the hemoglobin profile and the fetal hemoglobin (HbF) concentration by high-performance liquid chromatography using a hemoglobin testing system (HPLC/Variant-I; Biorad, Hercules, CA, USA). NO metabolites (NOm) were determined in serum by Griess reaction, as previously described [14]. Genomic DNA was extracted from peripheral blood using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Vestfália, Germany) according to manufacturer's recommendations. In addition,  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thal detection was investigated by allele-specific polymerase chain reaction (PCR) [15]. Blood samples were analyzed at the Laboratory of Hematology, Genetic and Computational Biology (LHGB-IGM-FIOCRUZ) and at the College of Pharmaceutical Sciences (UFBA).

## Statistical Analysis

The variables selected were expressed as the means, medians and percentile. Distribution of quantitative variables was analyzed using the Shapiro-Wilk test. The median of quantitative variables between two groups was compared using t-test for data with normal distribution and Mann-Whitney for nonparametric data.

In order to perform the analysis of laboratory parameters, we decided to use the median value for LDH and NOm. Thus, we divided the patients into two groups: low LDH (less than 1094.0 U/L) and high LDH (at least 1094.0 U/L); and low NOm (less than 35.75  $\mu$ M) and high NOm (at least 35.75  $\mu$ M). HDL-C level of 40 mg/dl is reported to be the normal reference range limit and we divided the groups into low HDL-C (less than 40 mg/dl)

and high HDL-C (at least 40 mg/dl). The presence of  $-\alpha^{3.7\text{Kb}}$ -thal co-inheritance was also associated with laboratory data in SCA patients.

Correlation analyses were performed between variables using Spearman and Pearson coefficient (R). Data were tabulated and analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 20.0 (IBM, New York, NY). JMP software was used to assemble the correlation graphs, P-values<0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Association of LDH with hemolysis biomarkers

The low LDH group (less than 1094.0 U/L) included 29 SCA patients within the interval of 553.50 to 747.00 U/L with a mean of 644.97 U/L. The high LDH group (greater than or equal to 1094.0 U/L) included 70 SCA patients within the interval ranging from 1036.50 to 1885.25 U/L with a mean of 1466.60 U/L.

The high LDH group showed decreased values of RBC count ( $p=0.015$ ), hemoglobin (Hb) ( $p=0.040$ ) and hematocrit (Ht) ( $p=0.016$ ) concentration and increased levels of total (p=0.028) and indirect bilirubin ( $p=0.025$ ), mean corpuscular volume (MCV) ( $p=0.030$ ) and mean corpuscular hemoglobin (MCH) ( $p=0.032$ ) concentrations (Table 1). An increase in the monocyte count was also observed ( $p=0.017$ ) (Table 1).

The LDH was negatively correlated to RBC count ( $R=-0.3906$ ;  $p<0.001$ ) and Ht ( $R=-0.4006$ ;  $p<0.001$ ), and positively correlated to monocytes count ( $R=0.2205$ ,  $p=0.034$ ) (Figure 1).

### Association of NOm with lipids biomarkers

The group with low levels of NOm (less than 35.75  $\mu\text{M}$ ) includes 59 SCA patients, with an interval of 29.55 to 34.56  $\mu\text{M}$  and a mean of 28.88  $\mu\text{M}$ . The group with high levels of

NOM (greater than or equal to 35.75  $\mu\text{M}$ ) included 38 SCA patients with an interval of 43.06 to 66.49  $\mu\text{M}$  and a mean of 58.62  $\mu\text{M}$ .

The group with high levels of NOM was significantly associated with a increased reticulocyte count ( $p=0.012$ ), direct bilirubin ( $p=0.024$ ), VLDL-C ( $p=0.003$ ) and triglycerides levels ( $p=0.008$ ). In the same group, we observed decreased total cholesterol ( $p=0.014$ ), HDL-C ( $p=0.018$ ) and LDL-C levels ( $p=0.007$ ).

Correlation analyses established from the measurement of NOM were significantly negatively correlated with total cholesterol ( $R=-0.2650$ ,  $p=0.010$ ), HDL-C ( $R=-0.2693$ ,  $p=0.008$ ) and LDL-C ( $R=-0.3481$ ;  $p<0.001$ ). NOM was also significantly positively correlated with VLDL-C ( $R=0.3614$ ;  $p<0.001$ ) and triglycerides ( $R=0.3586$ ;  $p<0.001$ ) (Figure 2).

#### **Association of HDL-C with hematologic and NOM biomarkers**

The low HDL-C group (less than 40.00 mg/dL) includes 81 SCA patients with an interval of 26.00 to 34.00 mg/dL and a mean of 29.65 mg/dL. The high HDL-C group (greater than or equal to 40.00 mg/dL) includes 18 SCA patients with an interval of 41.00 to 45.00 mg/dL and a mean of 44.11 mg/dL.

HDL-C concentrations greater than 40 mg/dL were associated with increased RBC count ( $p=0.018$ ), Hb ( $p=0.049$ ), Ht concentration ( $p=0.036$ ), HbF ( $p=0.005$ ) and LDL-C levels ( $p<0.001$ ) (Table 1). Likewise, we observed a decreased NOM ( $p=0.024$ ) and VLDL-C levels ( $p=0.036$ ) (Table 1).

HDL-C was positively correlated with RBC count ( $R=0.3041$ ,  $p=0.002$ ), Hb ( $R=0.2139$ ,  $p=0.036$ ), Ht ( $R=0.02706$ ;  $p=0.007$ ) and HbF ( $R=0.3652$ ;  $p<0.001$ ) (Figure 3).

#### **Detection of with $-\alpha^{3.7\text{Kb}}$ -thalassemia**

We identified 85 patients non-carriers of  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thal and 14 patient carriers of the deletion, 11 heterozygous ( $-\alpha\alpha$ ) and 3 homozygous ( $-\alpha/-\alpha$ ). The group with  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thal exhibited high RBC counts ( $p=0.012$ ) and low MCV ( $p<0.001$ ) and MCH ( $p<0.001$ ). This group also had low levels of total ( $p=0.026$ ) and indirect ( $p=0.026$ ) bilirubin. Reduced lymphocyte ( $p=0.036$ ) and platelets count ( $p=0.003$ ) (Table 2) were also observed.

## Discussion

This study was designed to evaluate laboratory data and their associations with LDH, NOm and HDL-C levels in steady-state SCA patients. We observed associations among the biomarkers that are related to hemolysis, vaso-occlusion, endothelial dysfunction, inflammation, and lipid metabolism, which comprises several mechanisms that are suggested to be involved in the pathophysiological mechanism of SCA

The LDH is a classical biomarker of intravascular hemolysis, and RBC disruption results in the simultaneous release of Hb, heme and arginase into blood stream [3]. We observed association of elevated LDH levels with other classical hemolysis biomarkers such as decreased RBC count, Hb, Ht, as well as with increased MCV, MCH, total and indirect bilirubin and monocyte count, suggesting that our data are consistent with the findings commonly described in the literature [16]. Elevated LDH levels had also been associated with clinical manifestations related to hemolysis, such as higher prevalence of leg ulcers, priapism, pulmonary hypertension and increased risk of death [17]. In addition, the elevated monocyte count may be related to hemolysis due to increased phagocytic activity and removal of excess lysed RBC from the peripheral blood [18].

Our evaluation of NOm between the groups showed in the low NOm group reduced levels of direct bilirubin, VLDL-c and triglycerides as well as reticulocyte count. We also

observed in the same group increased total cholesterol, HDL-c and LDL-c levels. NO biological properties, such as increasing vascular permeability, inhibition of platelet aggregation and endothelial activation, play important role in SCA [19]. However, the release of Hb and arginase from the RBC limits NO bioavailability [3,19,20] and promotes a vasoconstrictor status. It is known that bilirubin can exert antioxidant properties in vitro, acting as an endogenous scavenger of both NO and reactive nitrogen species [21]. Thus, it is possible that the decreased NOm levels observed may be due to the potential scavenging activities of bilirubin.

Importantly, SCA patients exhibit a dyslipidemic phenotype, as previously described [9,10]. The observed decreased levels of total cholesterol, HDL-c and LDL-c and increased VLDL-c and triglycerides are not new findings, however, the dyslipidemic characteristic has not been previously associated to NOm levels. Altered serum lipid levels have been associated to endothelial dysfunction and as a risk factor for pulmonary hypertension [22]. In addition, it was identified a pro-inflammatory fraction of HDL (pro-HDL), which has been increased and also contribute to the pathophysiology of pulmonary vascular disease in SCD patients [23]. Thus, our results reinforce the presence of a dyslipidemic sub-phenotype in SCA, as well as the previous association with vascular alterations.

In the group of patients where HDL-C levels were greater than 40.0 mg/dL we identified an improvement of the hematological features, since we observed high RBC count, hemoglobin and hematocrit levels. These results are in according to other [10] which also described association between HDL-c levels and hematologic parameters. Thus, HDL-c plays an important role as a prognostic marker in SCA. We also found an association between HbF and HDL-C levels. HbF plays an important role in the modulation of SCA pathogenesis, and its levels are generally inversely related to the severity of SCA for a particular sub-phenotype. Therefore, the increase in HbF levels reduces HbS polymerization and consequently VOE,

pain crisis and hospitalization [2,24]. HDL-C exhibits anti-inflammatory, antioxidant, platelet anti-aggregation, anticoagulant and pro-fibrinolysis activity [25]. In patients with SCA, high HDL-C levels may promote a reduction in the risk of intravascular hemolysis and endothelial injury [10].

Regarding the co-inheritance of  $\alpha$ -<sup>3.7Kb</sup>-thal, we observed a prevalence of 0.14 of the deletion. Likewise, in the Brazilian population, a study conducted among 590 newborns reports a prevalence of 0.19 for  $\alpha$ -<sup>3.7Kb</sup>-thal [26]. Overall, the prevalence of  $\alpha$ -<sup>3.7Kb</sup>-thal worldwide is approximately 5% [27]. The coexistence of  $\alpha$ -<sup>3.7Kb</sup>-thal in SCA patients is associated with the improvement of anemia, as suggested by high RBC count and Hb levels and low levels of total and indirect bilirubin; although, we have found low MCV and MCH concentrations. The biological relevance of co-inheritance of  $\alpha$ -<sup>3.7Kb</sup>-thal and bilirubin levels is still controversial [28], however our results suggest a significant reduction of total and indirect bilirubin, emphasizing the improvement in the hemolytic profile. The sickled erythrocytes are more susceptible to mechanical damage probably due to the low deformability and stability of the membrane [28]. Individuals with co-inheritance of  $\alpha$ -thal have a low count of dense cells probably due to reduced RBC mechanical fragility. We also verified reduced lymphocyte counts, consistent with previous report [26].

SCA patients with  $\alpha$ -thal co-inheritance exhibit a less severe anemia [28]. We observed that the increase in the hematocrit in association with the presence of  $\alpha$ -thal also increases viscosity and cell-cell adhesion in the endothelium. The viscosity is associated with the onset of VOE, and the presence of  $\alpha$ -thal may bring adverse effects to SCA patients [28]. The  $\alpha$ -thal co-inheritance also exhibited a significant reduction in platelet count. Platelets are essential for hemostasis but may contribute to the inflammatory process [29]. To date, we have not found studies that show the influence of  $\alpha$ -thal on platelet count in SCA patients [28].

Considering our results, we corroborate with previously reports and described that these sub-phenotypes are dynamic, associated with several biomarkers alterations and can occur simultaneously in SCA, emphasizing the known associations concerning the pathophysiological processes present in the disease (Figure 4).

## **Conclusion**

According to our data, LDH, NOm and HDL-C biomarkers were associated with the laboratory characterization, allowing the classification of hemolytic and dyslipidemic sub-phenotypes, respectively. The co-inheritance of  $-\alpha^{3.7\text{Kb}}$ -thal and SCA improves the anemia and low platelet count but contributes to blood viscosity. All the laboratory parameters helped to corroborate the previously described hemolytic, vaso-occlusive/viscous sub-phenotypes and suggest the dyslipidemic sub-phenotype, but SCA has a peculiar phenotypic diversity that makes it difficult to establish separately which occurs in the pathophysiology of the disease. Therefore, further studies should be developed to understand the processes involved in association with systemic biomarkers and genetic markers of SCA.



**Abbreviations**

**SCA**: sickle cell anemia; **SCD**: sickle cell disease; **RBC**: red blood cell; **Hb**: hemoglobin; **HbF**: hemoglobin fetal; **HBA**: globin- $\alpha$  genes; **Ht**: hematocrit; **MCV**: mean cell volume; **MCH**: mean corpuscular hemoglobin; **VOE**: vaso occlusion events; **ACS**: acute chest syndrome; **LDH**: lactate dehydrogenase; **Nom**: nitric oxide metabolites; **HDL-C**: high-density lipoprotein cholesterol; **LDL-C**: low-density lipoprotein cholesterol; **VLDL-C**: very low-density lipoprotein cholesterol; **- $\alpha^{3.7Kb}$ -thal**:  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thalassemia;  **$\alpha$ -thal**:  $\alpha$ -thalassemia.

**Declarations****Acknowledgements**

Not applicable.

**Funding**

Not applicable.

**Availability of data and materials**

The datasets supporting the conclusions of this article are included in the article.

**Authors' Contributions**

MMA: performed the interviews, collected the samples, analyzed the data and wrote the manuscript; CCG, RPS: analyzed the data and co-wrote the manuscript; TCCF, FIN, RQS: attended the patients; LAF, FAP: performed the interviews; LMF, TNP, JRDF, EVA: reviewed the paper; BAVC, MSG: analyzed the data, provided academic support and revised the paper critically.

**Competing interests**

The authors have no competing interests.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Ethics approval and consent to participate**

The study received approval from the institutional review board of the Gonçalo Moniz Institute at the Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ – Bahia - Brazil) (CAAE 08452913.9.0000.0040).

## References

1. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med.* 1994; 330:1639-1644.
2. Alexy T, Sangkatumvong S, Connes P, Pais E, Tripette J, Barthelemy JC, Fisher TC, Meiselman HJ, Khoo MC, Coates TD. Sickle cell disease: selected aspects of pathophysiology. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2010; 44:155-166.
3. 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; 21:37-47.
4. Adegoke SA, Adeodu OO, Adekile AD. Sickle cell disease clinical phenotypes in children from South-Western, Nigeria. *Niger J Clin Pract.* 2015; 18:95-101.
5. Iughetti L, Bigi E, Venturelli D. Novel insights in the management of sickle cell disease in childhood. *World J Clin Pediatr.* 2016; 5:25-34.
6. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension.* 1988; 12:365-372.
7. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, 3rd, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med.* 2002; 8:1383-1389.
8. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM, Jr., Gladwin MT. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *Jama.* 2005; 294:81-90.
9. Shores J, Peterson J, VanderJagt D, Glew RH: Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease. *J Natl Med Assoc.* 2003; 95:813-817.
10. Seixas MO, Rocha LC, Carvalho MB, Menezes JF, Lyra IM, Nascimento VM, Couto RD, Atta AM, Reis MG, Goncalves MS. Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. *Lipids Health Dis.* 2010; 9:91.
11. McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, Dahlin-Lee E, Wallace DJ, Thong BY, Badsha H, Kalunian K, Charles C, Navab M, et al. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:2541-2549.
12. Buchowski MS, Swift LL, Akohoue SA, Shankar SM, Flakoll PJ, Abumrad N. Defects in postabsorptive plasma homeostasis of fatty acids in sickle cell disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2007; 31:263-268.
13. Shimauti EL, Silva DG, de Souza EM, de Almeida EA, Leal FP, Bonini-Domingos CR. Prevalence of beta(S)-globin gene haplotypes, alpha-thalassemia (3.7 kb deletion) and redox status in patients with sickle cell anemia in the state of Parana, Brazil. *Genet Mol Biol.* 2015; 38:316-323.
14. Nims RW, Cook JC, Krishna MC, Christodoulou D, Poore CM, Miles AM, Grisham MB, Wink DA. Colorimetric assays for nitric oxide and nitrogen oxide species formed from nitric oxide stock solutions and donor compounds. *Methods Enzymol.* 1996; 268:93-105.
15. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. *Blood.* 2000; 95:360-362.
16. Stankovic Stojanovic K, Lionnet F. Lactate dehydrogenase in sickle cell disease. *Clin Chim Acta.* 2016; 458:99-102.
17. Taylor JGT, Nolan VG, Mendelsohn L, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. *PLoS One.* 2008; 3:e2095.
18. Rees DC, Gibson JS. Biomarkers in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2012; 156:433-445.

19. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*. 2013; 121:1276-1284.
20. Wang X, Mendelsohn L, Rogers H, Leitman S, Raghavachari N, Yang Y, Yau YY, Tallack M, Perkins A, Taylor JGt, et al. Heme-bound iron activates placenta growth factor in erythroid cells via erythroid Kruppel-like factor. 2014; 124:946-954.
21. Lanone S, Bloc S, Foresti R, Almolki A, Taille C, Callebort J, Conti M, Goven D, Aubier M, Dureuil B, et al. Bilirubin decreases nos2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats. *Faseb j*. 2005; 19:1890-1892.
22. Zorca S, Freeman L, Hildesheim M, Allen D, Remaley AT, Taylor JGt, Kato GJ. Lipid levels in sickle-cell disease associated with haemolytic severity, vascular dysfunction and pulmonary hypertension. *Br J Haematol*. 2010; 149:436-445.
23. Ataga KI, Hinderliter A, Brittain JE, Jones S, Xu H, Cai J, Kim S, Pritchard KA, Hillery CA. Association of pro-inflammatory high-density lipoprotein cholesterol with clinical and laboratory variables in sickle cell disease. *Hematology*. 2015; 20:289-296.
24. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, Kinney TR. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med*. 1991; 325:11-16.
25. Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*. 2002; 161:1-16.
26. Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JP, Menezes JF, Rego M, Reis MG, Goncalves MS. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad Saude Publica*. 2005; 21:292-298.
27. Weatherall DJ. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. *Curr Mol Med*. 2008; 8:592-599.
28. Rumaney MB, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, Ramesar R, Kengne AP, Ngogang J, Wonkam A. The co-inheritance of alpha-thalassemia and sickle cell anemia is associated with better hematological indices and lower consultations rate in Cameroonian patients and could improve their survival. *PLoS One*. 2014; 9:e100516.
29. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11:264-274.

## Figures

### Figure 1

**Title: Correlation of laboratory data between LDH levels in SCA.**

Legend: RBC count (R=-0.3906; p<0.001); hematocrit (Ht) (R=-0.4006; p<0.001); monocyte count (R=0.2205; p<0.034).

### Figure 2

**Title: Correlation of laboratory data between NOM levels in SCA.**

Legend: Total cholesterol (T-Chol) (R=-0.2650; p=0.010); HDL-C (R=-0.2693; p=0.008); LDL-C (R=-0.3481; p<0.001); VLDL-C (R=0.3614; p<0.001) and triglycerides (Trigl) (R=0.3586; p<0.001).

### Figure 3

**Title: Correlation of laboratory data between HDL-C levels in SCA.**

Legend: RBC count (R=0.3041; p=0.002); hemoglobin (Hb) (R=0.2139; p=0.036); hematocrit (Ht) (R=0.2706; p=0.007) and fetal hemoglobin (HbF) (R=0.3652; p<0.001).

### Figure 4

**Title: Model of dyslipidemic, hemolysis and endothelial dysfunction, vaso-occlusion/viscosity sub-phenotypes associated with laboratory data in SCA.**







Legend:  (severe),  (mildest),  (severe),  (mildest),  (severe),  (mildest). T-chol, HDL-C and LDL-C levels exhibit an association, suggesting a new dyslipidemic sub-phenotype. Lactate dehydrogenase (LDH) and indirect bilirubin are important biomarkers of hemolytic and endothelial dysfunction sub-phenotypes. Hematocrit (Ht), red blood cell (RBC) and MCV are associated with  $-\alpha^{3.7Kb}$ -thalassemia, reflecting the vaso-occlusive/viscosity sub-phenotype. However, we observed that reticulocyte count is associated with hemolysis and vaso-occlusion. HbF, NO metabolites and monocyte count show influence among all the proposed sub-phenotypes. The laboratory parameters described exhibit peculiar phenotypic diversity that was difficult for separating the pathophysiological mechanism of SCA.

Figure 1

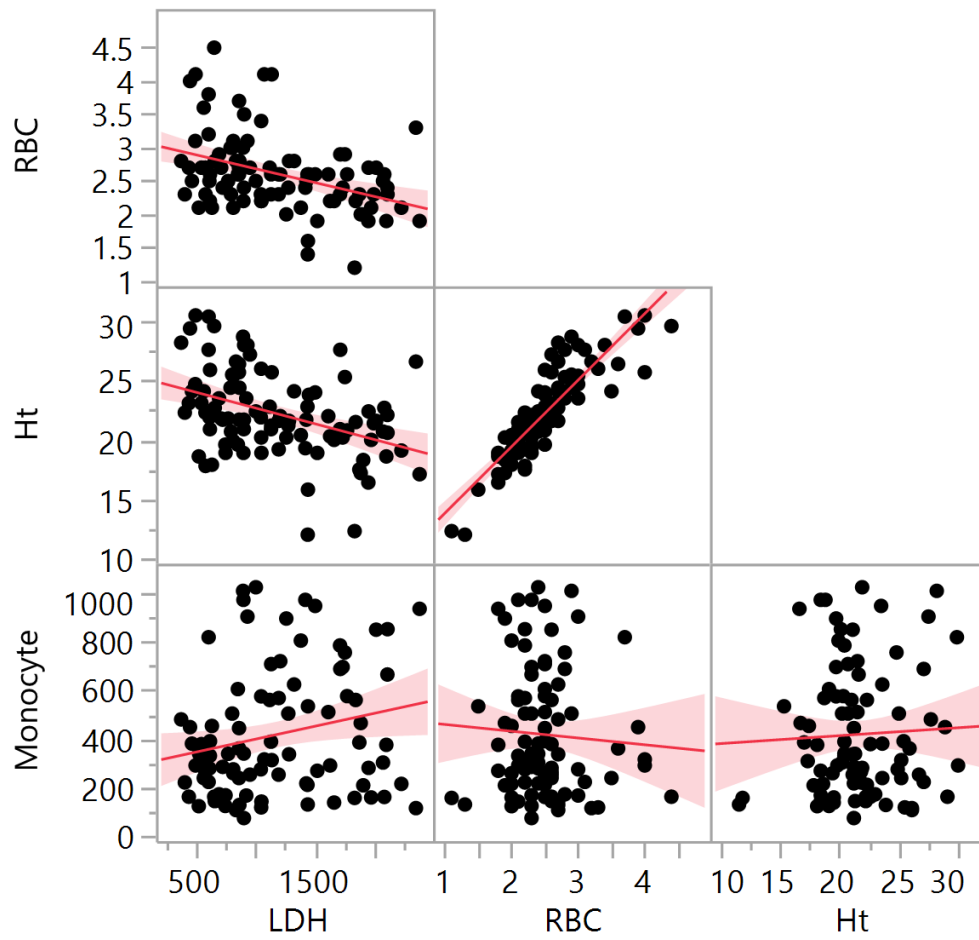


Figure 2

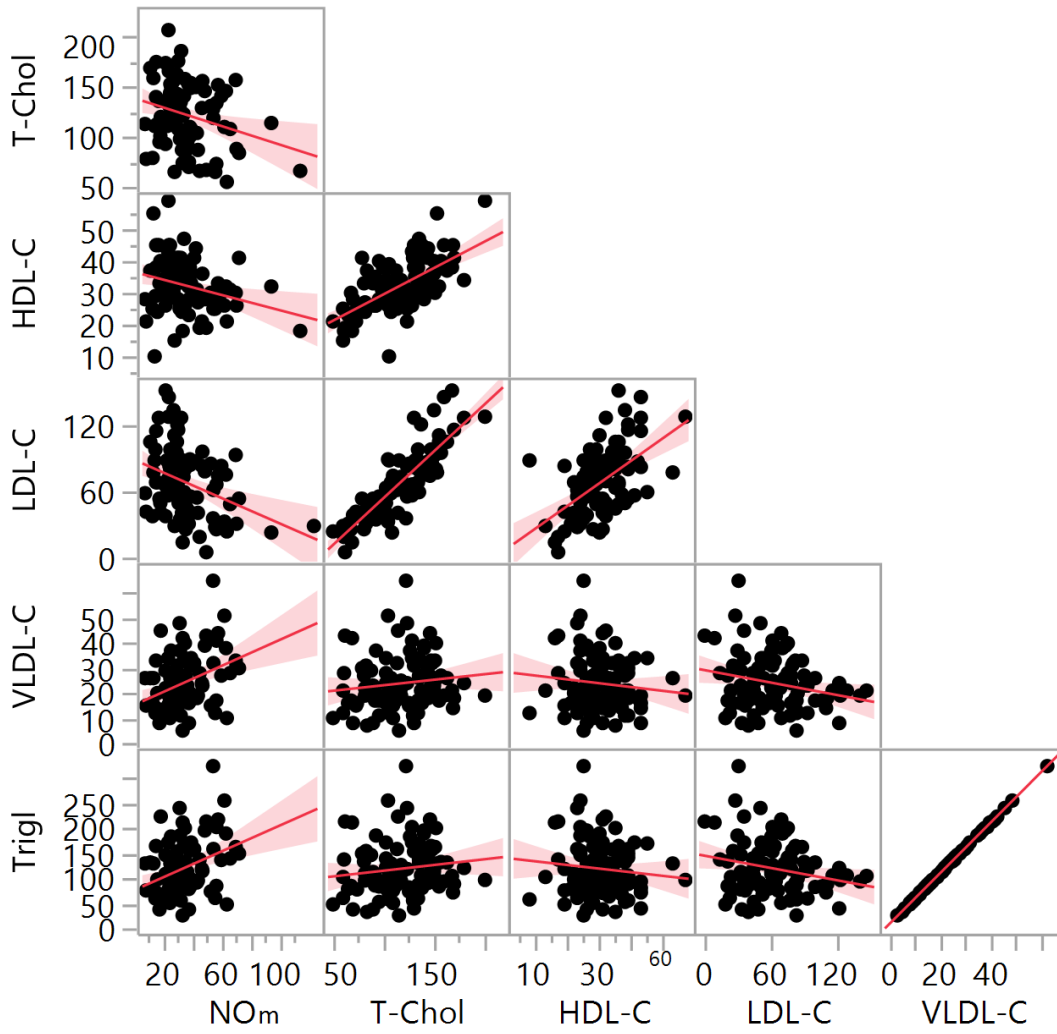


Figure 3

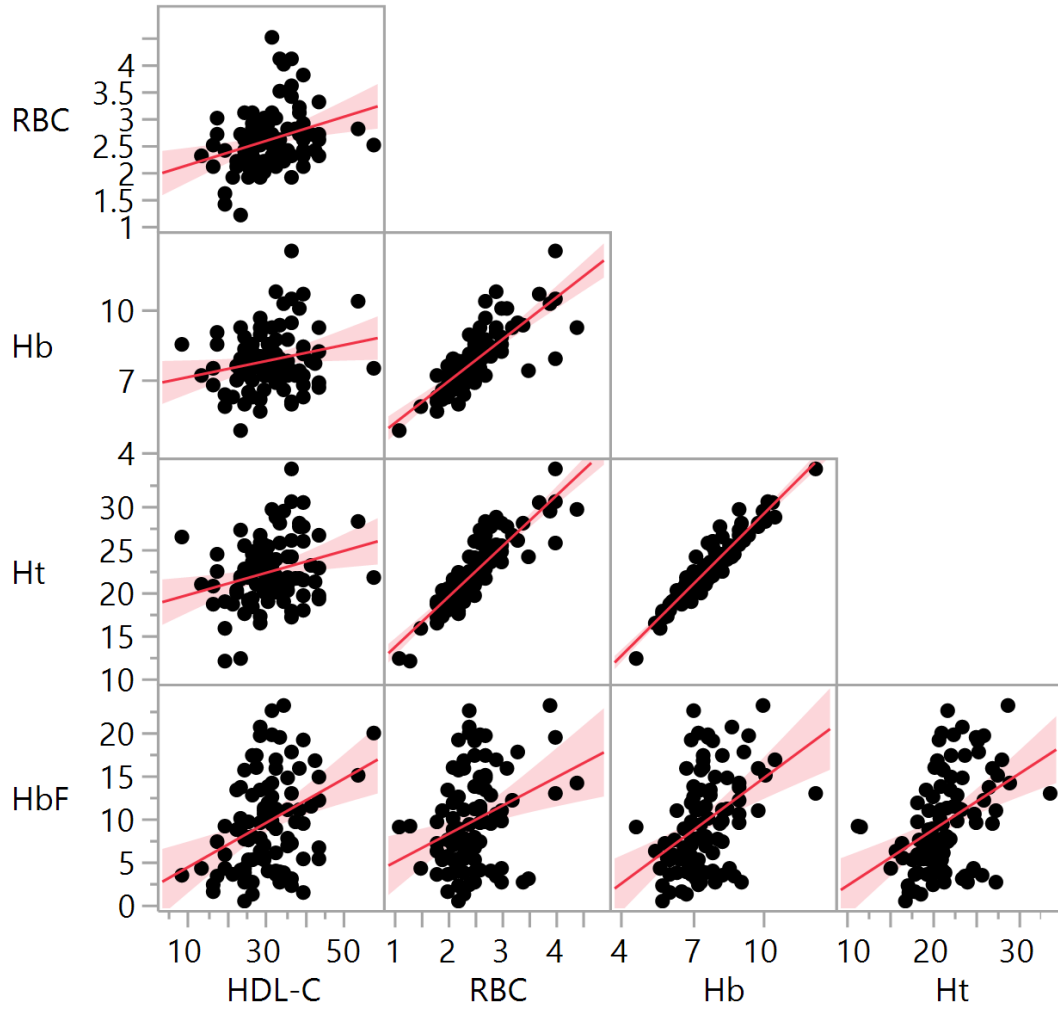
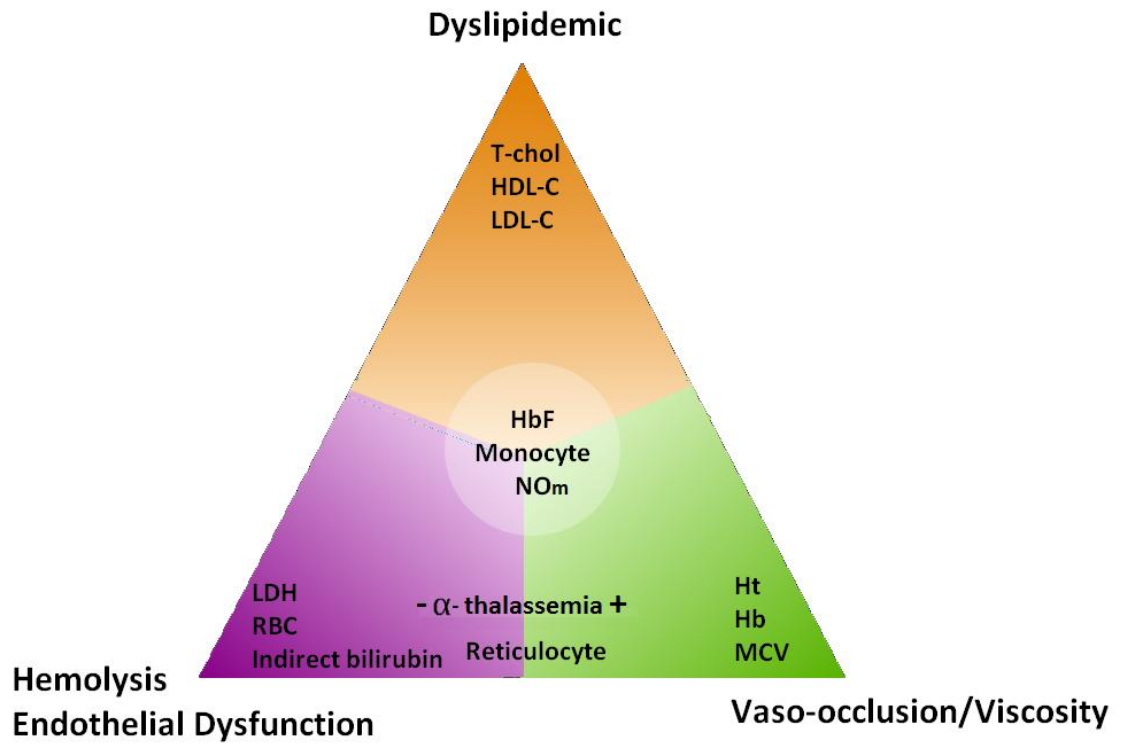




Figure 4



**Table 1.** Association of laboratory data and LDH, NOm and HDL-C levels in SCA patients.

	LDH < 1094.0 U/L (N=29) Median (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	LDH ≥ 1094.0 U/L (N=70) Median (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	Nitric Oxide m < 35.75 μM (N=59) Median (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	Nitric Oxide m ≥ 35.75 μM (N=38) Median (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	HDL-C < 40.00 mg/dL (N=81) Median (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	HDL-C ≥ 40.00 mg/dL (N=18) Median (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	P1	P2	P3
<b>Hemolysis</b>									
RBC, x10 <sup>12</sup> /L	2.7 (2.4 – 3.1)	2.5 (2.2 – 2.7)	2.6 (2.3 – 2.8)	2.4 (2.2 – 2.8)	2.5 (2.2 – 2.8)	2.7 (2.4 – 3.1)	<b>0.015*</b>	0.176*	<b>0.018</b>
Hemoglobin, g/dL	7.9 (7.3 – 9.1)	7.5 (7.0 – 8.5)	7.6 (7.20 – 8.5)	7.5 (6.6 – 8.5)	7.6 (7.1 – 8.5)	7.9 (7.1 – 10.0)	<b>0.040*</b>	0.349	<b>0.049</b>
Hematocrit, %	23.1 (21.3 – 26.7)	21.5 (19.8 – 24.0)	21.7 (20.20 – 25.5)	21.8 (18.9 – 24.1)	21.7 (20.0 – 24.1)	22.9 (20.8 – 27.7)	<b>0.016*</b>	0.346	<b>0.036</b>
MCV, fL		88.1 (83.5 – 92.8)	85.1 (81.20 – 89.8)	88.2 (83.0 – 94.6)	86.4 (81.6 – 91.3)	85.0 (80.9 – 90.5)	<b>0.030</b>	0.120	0.403
MCH, fL	29.1 (26.5 – 31.3)	30.5 (28.7 – 32.6)	29.9 (27.80 – 32.1)	30.7 (27.8 – 32.7)	30.4 (28.0 – 32.7)	29.6 (27.7 – 31.3)	<b>0.032</b>	0.260	0.288
Total bilirubin, mg/dL	1.9 (1.3 – 3.4)	3.1 (1.8 – 3.9)	2.3 (1.60 -3.8)	3.2 (1.8 – 3.9)	2.8 (1.8 – 3.8)	2.0 (0.5 – 3.8)	<b>0.028</b>	0.183	0.983*
Direct bilirubin, mg/dL	0.4 (0.3 – 0.5)	0.5 (0.3 – 0.6)	0.4 (0.30 – 0.5)	0.5 (0.4 – 0.7)	0.5 (0.3 – 0.6)	0.4 (0.2 – 0.6)	0.166	<b>0.024</b>	0.501
Indirect bilirubin, mg/dL	1.5 (0.9 – 2.6)	2.4 (1.4 – 3.3)	2.0 (1.20 – 3.3)	2.4 (1.4 – 3.3)	2.2 (1.3 – 3.2)	1.4 (0.4 – 3.2)	<b>0.025</b>	0.085*	0.958*
LDH, U/L			1096.0 (837.0 – 1713.5)	1201.0 (830.0 – 1931.2)	1096.0 (837.0 – 1713.5)	937.5 (650.0 – 1546.7)		0.152*	0.416*
Reticulocyte count	5.9 (3.9 – 8.2)	5.25 (4.40 – 8.12)	5.0 (3.9 – 7.1)	7.1 (4.9 – 8.6)	5.3 (4.2 – 7.9)	5.9 (4.0 – 10.7)	0.775*	<b>0.012</b>	0.498*
<b>Hemoglobin profile</b>									
Fetal hemoglobin, %	11.4 (4.6 – 17.4)	8.7 (5.2 – 13.0)	9.6 (5.3 – 14.8)	8.9 (3.8 – 13.0)	7.9 (4.2 – 13.1)	13.4 (8.7 – 19.0)	0.077*	0.311*	<b>0.005</b>
<b>NO metabolites</b>									
NOm, μM	34.6 (29.1 – 42.8)	36.1 (27.9 – 51.0)			37.6 (29.1 – 51.1)	30.5 (26.3 – 36.8)	0.702		<b>0.024</b>
<b>Leukocytes</b>									
WBC, x 10 <sup>9</sup> /L	14.3 (11.5 – 16.6)	13.7 (11.1 – 15.8)	13.7 (11.1 – 16.0)	13.90 (11.7 – 16.6)	13.9 (11.4 – 15.9)	12.2 (10.4 – 16.9)	0.508	0.450	0.751*
Neutrophil, x 10 <sup>9</sup> /L	6664.0 (4209.0 – 8355.0)	5382.0 (4080.0 – 7113.5)	5424.0 (3892.0 – 7182.0)	6088.0 (4485.2 – 7203.5)	5760.0 (4210.5 – 71.82.0)	5516.0 (3361.5 – 7691.0)	0.305	0.387	0.824
Eosinophil, x 10 <sup>9</sup> /L	714.0 (255.5 – 1967.0)	685.0 (288.7 – 1608.7)	800.0 (291.0 – 1807.0)	704.5 (281.5 – 2109.0)	805.0 (303.5 – 1925.0)	502.0 (238.5 – 1328.2)	0.319*	0.336*	0.415*
Lymphocyte, x 10 <sup>9</sup> /L	5408.0 (4540.0 – 6726.5)	5580.0 (4261.0 – 7564.5)	5408.0 (3990.0 – 7224.0)	5939.5 (4491.5 – 7569.7)	5560.0 (4359.0 – 7209.5)	5798.0 (3751.5 – 7728.0)	0.508	0.439*	0.647
Monocyte, x 10 <sup>9</sup> /L	290.0 (169.0 – 419.0)	454.5 (248.5 – 763.2)	338.0 (222.0 – 576.0)	377.5 (212.5 – 863.0)	330.0 (212.0 – 680.5)	492.0 (309.0 – 720.7)	<b>0.017*</b>	0.296*	0.792
<b>Platelets</b>									
Platelet, x10 <sup>3</sup> /mL	450.0 (350.0 – 514.0)	439.0 (367.7 – 550.2)	445.0 (384.0 – 558.0)	419.5 (342.5 – 514.5)	442.0 (358.0 – 559.0)	439.5 (402.0 – 497.0)	0.982	0.337	0.345
<b>Lipid profile</b>									
Total Cholesterol, mg/dL	132.0 (85.0 – 152.0)	120.5 (101.5 – 144.5)	131.0 (111.0 – 153.0)	109.0 (85.5 – 146.0)			0.933	<b>0.014*</b>	
HDL-C, mg/dL	33.0 (28.5 – 40.5)	31.0 (26.0 – 36.2)	34.0 (28.0 – 40.0)	30.0 (26.0 – 33.2)			0.108	<b>0.018</b>	
LDL-C, mg/dL	66.0 (41.5 – 87.5)	67.0 (44.0 – 88.2)	74.0 (57.0 – 99.0)	51.5 (30.5 – 84.2)	66.0 (40.0 – 84.0)	92.0 (73.5 – 128.2)	0.982	<b>0.007*</b>	<b>&lt;0.00</b>
VLDL-C, mg/dL	22.0 (16.0 – 33.0)	22.0 (17.0 – 31.0)	21.0 (16.0 – 26.0)	28.0 (18.0 – 35.0)	23.0 (17.0 – 32.0)	20.0 (15.5 – 28.5)	0.948	<b>0.003*</b>	<b>0.036</b>
Triglycerides, mg/dL	109.0 (81.0 – 164.0)	110.0 (84.0 -155.2)	103.0 (78.0 – 130.0)	139.0 (91.7 – 176.5)	113.0 (83.5 – 158.5)	101.5 (78.7 – 144.0)	0.951	<b>0.008*</b>	0.441

RBC: red blood cell; MCV: mean cell volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; LDH: dehydrogenase; Nom: nitric oxide metabolites; WBC: white blood cell; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; VLDL-C: very low-density lipoprotein cholesterol. Bold values indicate significance at p<0.05; p-value obtained using Mann-Whitney test. \*p-value obtained using t-test. P1=LDH <1094.0 U/L X LDH≥1094.0 U/L; P2= NOm < 35.75 μM X NOm ≥ 35.75 μM; P3=HDL-C < 40.0 mg/dl x HDL-C ≥40.0 mg/dL.

**Table 2.** Association of laboratory data between SCA patients in the presence or absence of  $-\alpha^{3.7\text{kb}}$ -thalassemia

	Presence of $-\alpha^{3.7\text{kb}}$ -thalassemia (N=14)	Absence of $-\alpha^{3.7\text{kb}}$ -thalassemia (N=85)	P1
	Median (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	Median (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	p value
<b>Hemolysis</b>			
RBC, x10 <sup>12</sup> /L	2.9 (2.5 – 3.3)	2.5 (2.2 – 2.7)	<b>0.012</b>
Hemoglobin, g/dL	8.2 (7.3 – 8.8)	7.6 (7.1 – 8.3)	0.814*
Hematocrit, %	23.8 (21.4 – 25.5)	21.7 (19.9 – 24.1)	0.839*
MCV, fL	80.3 (76.3 – 83.0)	88.0 (83.6 – 93.2)	<b>0.001</b>
MCH, fl	27.7 (25.7 – 29.0)	30.8 (28.8 – 32.7)	<b>0.001</b>
Total bilirubin, mg/dL	1.8 (1.2 – 2.7)	2.8 (1.7 – 3.9)	<b>0.026</b>
Direct bilirubin, mg/dL	0.4 (0.2 – 0.5)	0.5 (0.3 – 0.6)	0.180
Indirect bilirubin, mg/dL	1.3 (0.9 – 2.2)	2.3 (1.3 – 3.4)	<b>0.026</b>
LDH, U/L	958.0 (852.2 – 1845.7)	1120.0 (762.5 – 1693.0)	0.848*
Reticulocyte count	4.6 (3.7 – 8.6)	5.8 (4.3 – 8.1)	0.736*
<b>Hemoglobin profile</b>			
Fetal hemoglobin, %	9.4 (3.4 – 13.9)	9.3 (5.2 – 14.4)	0.651
<b>NO metabolites</b>			
NOM, $\mu\text{M}$	33.9 (20.7 – 44.4)	35.7 (28.8 – 48.0)	0.400
<b>Leukocytes</b>			
WBC, x 10 <sup>9</sup> /L	12.3 (7.6 – 14.8)	14.0 (11.2 – 16.1)	0.161
Neutrophil, x 10 <sup>9</sup> /L	5124.0 (3830.2 – 7061.7)	5796.0 (4208.5 – 7225.0)	0.550
Eosinophil, x 10 <sup>9</sup> /L	582.5 (232.5 – 1936.5)	800.0 (303.50 – 1785.5)	0.676*
Lymphocyte, x 10 <sup>9</sup> /L	3711.0 (2695.5 – 6960.7)	5688.0 (4533.0 – 7269.0)	<b>0.036</b>
Monocyte, x 10 <sup>9</sup> /L	202.0 (124.5 – 432.7)	380.0 (252.0 -702.0)	0.120*
<b>Platelets</b>			
Platelet, x10 <sup>3</sup> /mL	335.5 (239.2 – 443.0)	450.0 (382.0 – 559.0)	<b>0.003</b>
<b>Lipid profile</b>			
Total Cholesterol, mg/dL	118.5 (106.7 – 142.2)	123.0 (97.5 – 148.0)	0.810
HDL-C, mg/dL	30.0 (24.7 – 38.0)	32.0 (27.0 – 37.5)	0.376
LDL-C, mg/dL	68.0 (56.7 – 99.5)	67.0 (41.0 – 87.0)	0.396
VLDL-C, mg/dL	22.5 (18.0 – 28.7)	22.0 (16.5 – 32.0)	0.936
Triglycerides, mg/dL	111.0 (89.5 – 142.5)	110.0 (82.5 – 158.5)	0.928

RBC: red blood cells; MCV: mean cell volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; LDH: lactate dehydrogenase; NOM: nitric oxide metabolites; WBC: white blood cell; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; VLDL-C: very low-density lipoprotein cholesterol; Bold values indicate significance at  $p < 0.05$ ; p-value obtained using Mann-Whitney. \*p-value when used T-Test. P1= presence of  $-\alpha^{3.7\text{kb}}$ -thalassemia X absence of  $-\alpha^{3.7\text{kb}}$ -thalassemia

### 6.3 MANUSCRITO 3

**Título:** Genetic Modulation of Fetal Hemoglobin in Hydroxyurea-Treated Sickle Cell Anemia

**Autores:** Milena Magalhães Aleluia<sup>1,4</sup>, Rayra Pereira Santiago<sup>1,4</sup>, Caroline Conceição da Guarda<sup>1,4</sup>, Teresa Cristina Cardoso Fonseca<sup>2</sup>, Fábila Idalina Neves<sup>2</sup>, Regiana Souza Quinto<sup>2</sup>, Camylla Villas Boas Figueiredo<sup>1,4</sup>, Sètonджи Cocou Modeste Alexandre Yahouédéhou<sup>1,4</sup>, Rodrigo Mota Oliveira<sup>1,4</sup>, Júnia Raquel Dutra Ferreira<sup>1,4</sup>, Bruno Antônio Veloso Cerqueira<sup>3,4</sup>, Cynara Gomes Barbosa<sup>4</sup>, Jacqueline Nicole Milton<sup>5</sup>, Martin H. Steinberg<sup>6</sup>, Marilda de Souza Gonçalves<sup>1,4</sup>

**Situação:** Submetido

**Objetivo:** (*referente ao objetivo 5 e 6 da tese*):

5. Investigar haplótipos ligados ao grupo de genes da globina  $\beta^S$  nos pacientes com DF;
6. Identificar SNPs em genes localizados nos cromossomos 2, 6 e 11 relacionados à modulação da HbF e, associação ao uso de hidroxiureia em pacientes com AF.

**Principais resultados:**

Nesse trabalho investigamos 177 pacientes com AF acompanhados em Centros de Referência da DF na Bahia. Na associação do perfil laboratorial à terapia de HU, encontramos perfil hematológico melhor nos pacientes em uso de HU, bem como contagem menor de leucócitos e plaquetas. No que se refere às doses administradas de 15, 20 e 25 mg/kg/dia e o período de utilização evidenciamos redução significativa na contagem plaquetária. Além disso, sugerimos que na maior dose administrada de HU foi verificada influência maior nos parâmetros laboratoriais. Na associação do SNP rs766432 no gene *BCL11A* e o uso de HU, foram encontrados aumento expressivo na contagem de hemácia, concentração de hemoglobina, concentração menor de bilirrubina direta e indireta, além de contagem menor de plaquetas. Em relação à caracterização clínica, do SNP rs766432 no gene *BCL11A* e a associação ao uso de HU, encontramos ocorrência menor dos eventos clínicos; embora, a litíase tenha sido mais observada nos pacientes em uso de HU. Dessa forma, sugerimos que esse evento ocorra de forma independente da presença do SNP e resposta terapêutica da HU.

Assim, sugerimos que o SNP rs766432 e resposta terapêutica à HU contribuem significativamente para o aumento da síntese da HbF e influencia os parâmetros laboratoriais, contribuindo para melhora clínica da AF.



**Genetic Modulation of Fetal Hemoglobin in Hydroxyurea-Treated Sickle Cell Anemia**

Journal:	<i>American Journal of Hematology</i>
Manuscript ID	AJH-16-1234
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	30-Nov-2016
Complete List of Authors:	<p>Aleluia, Milena ; Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz; Universidade Federal da Bahia  Santiago, Rayra ; Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz; Universidade Federal da Bahia  Guarda, Caroline; Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional - LHGB; Universidade Federal da Bahia  Fonseca, Teresa Cristina; Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna  Neves, Fábila; Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna  Quinto, Regiana; Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna  Figueiredo, Camylla; Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional - LHGB; Universidade Federal da Bahia  Yahouédéhou, Sétondji; Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz; Universidade Federal da Bahia  Oliveira, Rodrigo ; Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz; Universidade Federal da Bahia  Ferreira, Júnia ; Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz; Universidade Federal da Bahia  Cerqueira, Bruno; Universidade Estadual da Bahia; Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional - LHGB  Barbosa, Cynara; Universidade Federal da Bahia  Milton, Jacqueline; Boston University, Biostatistics  Steinberg, Martin; Boston University School of Medicine,  Goncalves, Marilda; Fiocruz/CPqGM, ; UFBA/FF, Toxicology and Clinical Analyses</p>
Keywords:	Sickle cell anemia, hydroxyurea, gene polymorphisms $\beta$ S haplotype, SNP

SCHOLARONE™  
Manuscripts

John Wiley & Sons

## Genetic Modulation of Fetal Hemoglobin in Hydroxyurea-Treated Sickle Cell Anemia

Milena Magalhães Aleluia<sup>1,4</sup>, Rayra Pereira Santiago<sup>1,4</sup>, Caroline Conceição da Guarda<sup>1,4</sup>, Teresa Cristina Cardoso Fonseca<sup>2</sup>, Fábria Idalina Neves<sup>2</sup>, Regiana Souza Quinto<sup>2</sup>, Camylla Villas Boas Figueiredo<sup>1,4</sup>, Sètonджи Cocou Modeste Alexandre Yahouédéhou<sup>1,4</sup>, Rodrigo Mota Oliveira<sup>1,4</sup>, Júnia Raquel Dutra Ferreira<sup>1,4</sup>, Bruno Antônio Veloso Cerqueira<sup>3,4</sup>, Cynara Gomes Barbosa<sup>4</sup>, Jacqueline Nicole Milton<sup>5</sup>, Martin H. Steinberg<sup>6</sup>, Marilda de Souza Gonçalves<sup>1,4</sup>

### **Author's Affiliations**

1 Laboratório de Hematologia e Genética Computacional, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Salvador, Bahia, Brasil.

2 Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna, Itabuna, Brasil.

3 Universidade Estadual da Bahia (UNEB), Salvador, Bahia, Brasil.

4 Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil.

5 Boston University School of Public Health, Boston MA, USA

6 Boston University School of Medicine, Boston MA, USA

### **\*Corresponding author:**

Ph.D. Marilda de Souza Gonçalves

Postal address: Instituto Gonçalo Moniz - IGM.

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA, CEP: 40296-710. E-mail address:

mari@bahia.fiocruz.br, Tel.: +55 71 3176-2226.

## ABSTRACT

Fetal hemoglobin (HbF) levels modify the clinical course of sickle cell anemia (SCA) and are genetically regulated. We analyzed  $\beta^S$ -globin gene haplotypes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in quantitative trait loci (QTL) known to regulate HbF expression in SCA patients treated with hydroxyurea (HU) to ascertain their contribution to the HbF response to this drug. We examined 141 SCA patients seen from 2013 to 2014, 42 of whom were treated with HU. The association of  $\beta$ -globin gene cluster haplotypes and polymorphisms in *BCL11A*, *HBS1L-MYB* and *OR51B5/6* genes with hematological and biochemical laboratory data, HU therapy was analyzed. The Benin (BEN) haplotype chromosome was the most frequent among our patients and the Central African Republic (CAR) haplotype the next most common. There were no Senegal (SEN) or Arab Indian (AI) haplotype chromosomes. Rs766432 in *BCL11A* and HU use was associated with less anemia and hemolysis.  $\beta^S$ -globin gene cluster haplotypes and variants in HbF-associated QTL might contribute to variation in HbF and other laboratory parameters in SCA treated with HU.

**Keywords:** Sickle cell anemia, hydroxyurea, gene polymorphisms  $\beta^S$  haplotype, SNP.



## INTRODUCTION

Sickle cell anemia (SCA) is caused by homozygosity for a G-T transversion in codon 6 of the  $\beta$ -globin gene (*HBB*; rs334) that leads to the production of sickle hemoglobin (HbS; HBB glu6val) [1-3]. SCA is characterized by many clinical complications and exceptional phenotypic heterogeneity [4,5]. Fetal hemoglobin (HbF) inhibits the polymerization of deoxyHbS and high levels reduce disease severity. Therefore, inducing high levels of HbF is a therapeutic goal as well as a target for gene therapy [6]. High levels of HbF are associated with a reduction of acute painful events, use of transfusion and hospitalizations and HbF levels above the 75 percentile has been associated with decreased mortality [7,8]. The regulation of HbF gene (*HBG2*, *HBG1*) expression is complex and controlled by cis- and trans-acting quantitative trait loci (QTL) that affect HbF concentration and are responsible for some of the observed phenotypic variability [9].

HbF levels are associated with haplotypes of the *HBB* gene cluster although the functional elements of this effect are unknown [10-14]. Genome-wide association studies (GWAS) have revealed three QTL, *HBG2* on chromosome 11p15, *HBS1L-MYB* intergenic region on chromosome 6q23 and *BCL11A* on chromosome 2p16, which account for 20-50% of the HbF variation in SCA and  $\beta$ -thalassemia [15-17]. Polymorphisms in the *HBS1L-MYB* interval were associated with a pleiotropic effect on hematological parameters and HbF [6,18-21]. The olfactory receptors genes *OR51B5/6* are also located on chromosome 11 and might have a regulatory role in  $\gamma$ -globin gene expression [22].

Hydroxyurea (HU) induces the production of HbF in SCA [23,24], providing a pharmacological therapeutic approach for the prevention and reduction of some acute clinical complications [25,26]. HU increases hemoglobin level, HbF, mean corpuscular volume (MCV) and red blood cell (RBC) count [3,24] while decreasing white blood cell (WBC), reticulocyte and platelet counts. Among other postulated beneficial effects of HU are increase of nitric oxide (NO) [27] and decreased the adhesion of RBCs to the vascular endothelium [28]. Clinically, this drug promotes a significant reduction in morbidity and mortality [7,3,23]. The HbF response to HU is highly variable suggesting that HbF levels in response to HU might also be genetically modified [9]. Accordingly we analyzed  $\beta^S$ -globin gene haplotypes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in HbF associated QTL to study their role in regulating HbF response to HU.

## METHODS

### Subjects

The study was conducted from 2013 to 2014 in 141 SCA patients, 42 on HU and 99 not using HU, who attended Sickle Cell Disease Reference Center in Itabuna, Bahia, Brazil. Mean age was  $15.2 \pm 11.1$  years (median, 13 years) with 71 females and 70 males. Laboratory variables were measured at the “steady state” and without transfusion therapy in the preceding three months. The study was approved in the Research Board of the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM-FIOCRUZ-Bahia-Brazil). Patients were included after signed informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975, and its revision.

### Laboratory

Biological samples were collected and hematological analyses were performed using a Sysmex Count KX 21 N electronic cell counter (Sysmex Corporation, Tokyo, Japan), serum biomarkers were developed using automated equipment Cobas (Roche Diagnostics, Salt Lake city, Utah, USA). The hemoglobin profile and HbF concentration were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using VARIANT-I hemoglobin analyzer system (BioRad, Hercules, CA, USA). All analyses were performed in the Laboratory of Research in Anemia (LPA/UFBA) at the Universidade Federal da Bahia and Laboratory of Hematology, Genetic and Computacional Biology at the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz (LHGB-CPqGM-FIOCRUZ-Bahia-Brazil).

### Genetic Analysis

Genomic DNA was extracted from leukocytes using QIAamp® DNA extraction Kit following the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany).  $\beta^S$ -globin gene cluster haplotypes were investigated by polymerase chain reaction (PCR) using specific synthetic oligonucleotide primers and by restriction fragments length polymorphisms (RFLP) [29]. SNPs of *BCL11A* (rs6732518, C > T; rs766432, A > C), the *HBS1L-MYB* interval (rs11759553, A > C; rs35959442, C > G), and *OR51B5/6* genes (rs4910755, A > C; rs7483122, C > T), corresponding to QTL on chromosomes 2, 6 and 11 respectively, were analyzed by Real-Time PCR TaqMan Assays according to the manufacturer's protocols (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) in the LHGB-CPqGM-FIOCRUZ-Bahia-Brazil.

### Statistical Analysis

Characteristics evaluated were summarized in means, medians and percentile in the variables selected for analysis. Distribution of quantitative variables was analyzed using the Shapiro-Wilk test. Quantitative variables between groups were compared using t-test for data with normal distribution, and Mann-Whitney with data outside normality. Differences in laboratory data associated with SNP genotypes and dose of HU (mg/kg/day) were determined by Kruskal-Wallis. Multivariate linear regression analyses were performed to estimate the likelihood of having HbF levels as outcome and a possible interaction with age, sex, HU use, CAR haplotype and polymorphisms in genes related to HbF modulation in SCA patients. Data obtained were tabulated and then statistically analyzed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 20.0 (IBM, New York, NY). All tests were considered significant when p values were <0.05.

## RESULTS

Hematologic data of all patients are shown in Table 1. Compared with patients not taking HU, HU was associated with an increase in HbF and improvement of some laboratory variables as previously described (Table 1). The dose of HU was available in 42 of the 42 treated patients; mean length of use was  $13.4 \pm 9.7$  months (median 12 months; minimum 2 months, maximum 50 months). Fifteen mg/kg/day was used in 47.6% of cases, followed by 26.2% using 25 mg/kg/day and 23.8% using 20 mg/kg/day; one patient received the maximum tolerated dose of 35 mg/kg/day and was excluded from the analysis. The association of HU dose with blood counts is shown in Table 2. The highest dose of 25 mg/kg/day was associated with lower platelet count ( $374,272 \pm 96,612$ ;  $p=0.03$ ) and mean platelet volume (MPV) ( $9.5 \pm 1.2$ ,  $p=0.08$ ). Exposure to HU for more than 12 months was associated with lower reticulocyte counts ( $p=0.03$ ) and higher direct bilirubin level ( $p=0.02$ ).

Forty-five percent of chromosomes (127/282) were CAR haplotype, 47.9% (135/282) Benin (BEN) haplotype and 7.1% (20/282) atypical haplotypes; Cameroon, SEN and AI haplotype chromosomes were not found. Forty-one percent (58/141) of the patients were BEN/CAR heterozygotes; 24.8% BEN/BEN (35/141) homozygotes and 22.7% (32/141) CAR/CAR homozygotes. Patients with an atypical haplotype on one chromosomes represented 5.0% (7/141) of BEN/Atypical and 3.5% (5/141) of CAR/Atypical heterozygotes.

The Atypical/Atypical haplotype was found in 2.8% (4/141). The CAR haplotype was associated with low HbF levels ( $p=0.01$ ), with an average of 8.9%.

SNP genotypes in *BCL11A* (rs766432, rs6732518), *HBS1L-MYB* (rs11759553, rs35959442) and *OR51B5/6* (rs4910755, rs7483122) were successfully assayed in 141 patients and are shown in Table 3. In 42 patients on HU there was a significant association with homozygosity for the minor allele (C) of rs766432 in *BCL11A* with an increased hemoglobin concentration ( $9.8 \pm 1.2$ ;  $p=0.03$ ), RBC count ( $2.8 \pm 0.46$   $p=0.01$ ), and hematocrit ( $27.3 \pm 3.7$ ;  $p=0.02$ ) (Table 4). This same group had lower platelet counts ( $281,400 \pm 141,895$ ;  $p=0.05$ ) and direct bilirubin ( $0.30 \pm 0.16$ ;  $p=0.04$ ) (Table 4).

Multivariate linear regression analysis models were used to investigate the association of SNPs in genes related to HbF expression. We found statistical significance in an adjusted model that demonstrates the influence of HbF associated variable like gender, age, HU therapy, CAR haplotype and rs766432; rs11759553; rs7483122 among the patients ( $R=0.429$ ;  $p<0.001$ ). The model shows that the association of independent variables such as HU use ( $p=0.008$ ) and CAR haplotype ( $p=0.04$ ) and rs11759553 ( $p=0.007$ ) contribute significantly and independently to modulating the expression of HbF (Table 5).

## DISCUSSION

SCA is notorious for its clinical heterogeneity even though it is caused by a single *HBB* mutation. HbF is the major modulator of the disease phenotype and reduces the incidence of vaso occlusive complications and improves hemolysis. HbF levels are genetically regulated by cis-acting elements that are marked by the haplotype of the *HBB* cluster and trans-acting QTL that govern silencing of the fetal globin genes. We hypothesized that variation in known modulators of HbF gene expression would affect the HbF response to HU.

Our young Brazilian patients had a high frequency of the BEN/CAR and CAR/CAR HbS haplotypes as is typical in Brazil [30-32]. According to previous reports the CAR haplotype is associated with decreased levels of HbF and increased disease severity compared with other *HBB* haplotypes [33]. The history of the slave trade in Bahia accounts for the presence of the CAR and East Africa BEN haplotype that were imported from the Gulf of Benin [12,30]. In 1815 the Bahia state, Brazil restricted slave traffic through Ecuador, what

explains the association among the genotypic frequencies in Bahia and Western Africa, principally the Benin region [34].

Polymorphisms in three QTL have been associated with variation in HbF level. In our patients *BCL11A* rs6732518 C>T and rs766432 A>C had minor allele frequencies of 0.59 and 0.27 (Table 3). Homozygotes for the minor C allele of *BCL11A* rs766432 had a higher RBC count, hematocrit, hemoglobin concentration and HbF level (Table 4), suggesting that in the presence of this allele patients treated with HU had less hemolysis contributing to clinical improvement of the disease and lower rates of hospitalizations. Our results suggest that SCA patients homozygous for the minor allele of *BCL11A* rs766432 and who use HU had greater increases in HbF expression and a corresponding improvement in hematological parameters.

*BCL11A* variants influence HbF levels in healthy individuals and in patients with SCA and  $\beta$ -thalassemia [18,20,35]. *BCL11A* is a developmentally regulated silencer of *HBG* expression [36]. In a study from Northeast Brazil, *BCL11A* SNPs were associated with the expression of HbF and rs4671393 explained 10% of HbF variance [37]. The results of a study of polymorphisms in *BCL11A* and *OR51B5/6*, and *HBSIL-MYB* in 622 Brazilian sickle cell disease patients including patients with hemoglobin SC disease and SCA who were not taking HU were similar to the present study [38]. A cohort study of Tanzanian SCA found SNPs in *HBSIL-MYB* and *BCL11A* associated with HbF [35].

In our multivariate model, *HBSIL-MYB*, sex, HU treatment, and HbS gene haplotype modulated HbF expression.

**Acknowledgments**

MMA performed the interview, collected the samples, analyzed the data and wrote the manuscript. RPS, CCG analyzed the data and co-wrote the manuscript. TCCF, FIN, RSQ, attended the patients. CVBF, SCMAY, RMO, JRDF reviewed the paper. BAVC, CGB, JNM, MHS and MSG analyzed the data, provided academic support and revised the paper critically.

**Competing Interests**

The authors declare no conflict of interest.

**Ethics approval and consent to participate**

The study received approval from the institutional review board of the Instituto Gonçalo Moniz at the Fundação Oswaldo Cruz (IGM-FIOCRUZ – Bahia - Brazil) (CAAE 08452913.9.0000.0040).

## REFERENCES

1. Embury SH, Clark MR, Monroy G, et al. Concurrent sickle cell anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes. *The Journal of clinical investigation* 1984;73:116-123.
2. Akinsheye I, Solovieff N, Ngo D, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: molecular characterization of the unusually high fetal hemoglobin phenotype in African Americans. *American journal of hematology* 2012;87:217-219.
3. Steinberg MH, Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *American journal of hematology* 2012;87:795-803.
4. Driss A, Asare KO, Hibbert JM, et al. Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. *Genomics insights* 2009;2009:23-48.
5. Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood* 2011;118:19-27.
6. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, et al. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Human molecular genetics* 2009;18:R216-223.
7. Charache S, Terrin ML, Moore RD, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *The New England journal of medicine* 1995;332:1317-1322.
8. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *British journal of haematology* 2005;129:465-481.
9. Steinberg MH. Therapies to increase fetal hemoglobin in sickle cell disease. *Current hematology reports* 2003;2:95-101.
10. Nagel RL, Fabry ME. Sickle cell anemia as a multigenetic disease: new insights into the mechanism of painful crisis. *Progress in clinical and biological research* 1984;165:93-102.
11. Nagel RL, Steinberg MH. Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. *Pediatric pathology & molecular medicine* 2001;20:123-136.
12. Goncalves MS, Bomfim GC, Maciel E, et al. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 2003;36:1283-1288.
13. Higgs DR, Wood WG. Genetic complexity in sickle cell disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:11595-11596.
14. Okumura JV, Silva DG, Torres LS, et al. Inheritance of the Bantu/Benin haplotype causes less severe hemolytic and oxidative stress in sickle cell anemia patients treated with hydroxycarbamide. *Journal of human genetics* 2016.
15. Uda M, Galanello R, Sanna S, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:1620-1625.
16. Nuinon M, Makarasara W, Mushiroda T, et al. A genome-wide association identified the common genetic variants influence disease severity in beta0-thalassemia/hemoglobin E. *Human genetics* 2010;127:303-314.
17. Wonkam A, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, et al. Association of variants at BCL11A and HBS1L-MYB with hemoglobin F and hospitalization rates among sickle cell patients in Cameroon. *PloS one* 2014;9:e92506.
18. Menzel S, Jiang J, Silver N, et al. The HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23.3 influences erythrocyte, platelet, and monocyte counts in humans. *Blood* 2007;110:3624-3626.
19. Thein SL, Menzel S, Peng X, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2007;104:11346-11351.

20. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2008;105:11869-11874.

21. Stadhouders R, Aktuna S, Thongjuea S, et al. HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers. The Journal of clinical investigation 2014;124:1699-1710.

22. Solovieff N, Milton JN, Hartley SW, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5' olfactory receptor gene cluster. Blood 2010;115:1815-1822.

23. Platt OS. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. The New England journal of medicine 2008;358:1362-1369.

24. Meier ER, Byrnes C, Weissman M, et al. Expression patterns of fetal hemoglobin in sickle cell erythrocytes are both patient- and treatment-specific during childhood. Pediatric blood & cancer 2011;56:103-109.

25. Hoppe C, Vichinsky E, Quirolo K, et al. Use of hydroxyurea in children ages 2 to 5 years with sickle cell disease. Journal of pediatric hematology/oncology 2000;22:330-334.

26. Zimmerman SA, Schultz WH, Davis JS, et al. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. Blood 2004;103:2039-2045.

27. Gladwin MT, Shelhamer JH, Ognibene FP, et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. British journal of haematology 2002;116:436-444.

28. Hillery CA, Du MC, Wang WC, et al. Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. British journal of haematology 2000;109:322-327.

29. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. American journal of hematology 1989;32:66-69.

30. Costa FF, Arruda VR, Goncalves MG, et al. Beta S-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from two regions of Brazil. American journal of hematology 1994;45:96-97.

31. Figueiredo MS, Kerbauy J, Goncalves MS, et al. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. American journal of hematology 1996;53:72-76.

32. Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JP, et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. Cadernos de saude publica 2005;21:292-298.

33. Powars DR. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. Hematology/oncology clinics of North America 1991;5:475-493.

34. Florentino M. Em Costas Negras. Companhia das Letras Press 1997.

35. Makani J, Menzel S, Nkya S, et al. Genetics of fetal hemoglobin in Tanzanian and British patients with sickle cell anemia. Blood 2011;117:1390-1392.

36. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. Science (New York, NY) 2008;322:1839-1842.

37. Cardoso GL, Diniz IG, Silva AN, et al. DNA polymorphisms at BCL11A, HBS1L-MYB and Xmn1-HBG2 site loci associated with fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia patients from Northern Brazil. Blood cells, molecules & diseases 2014;53:176-179.

38. Barbosa CG, Aleluia AC, Pacheco AP, et al. Genetic modulation of HbF in Brazilians with HbSC disease and sickle cell anemia. American journal of hematology 2013;88:923-924.



**Table 1.** Laboratory characteristics of SCA patients taking and not taking hydroxyurea (HU)

Laboratory value	All the patients	Without HU use*	With HU use*	p value*
	N=141 Median (25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> )	N=99 Median (25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> )	N=42 Median (25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> )	
RBC, x10 <sup>12</sup> /L	2.4 (2.2 – 2.8)	2.6 (2.3 – 2.8)	2.2 (2.0 – 2.6)	<b>0.004</b>
Hemoglobin, g/dL	7.7 (7.2 – 8.7)	7.6 (7.2 – 8.5)	8.0 (7.3 – 9.2)	0.206
Hematocrit, %	22.0 (20.0 – 25.0)	21.8 (20.0 – 24.4)	22.4 (19.6 – 25.2)	0.757
MCV, fL	89.2 (83.6 – 96.3)	86.2 (81.4 – 90.9)	97.2 (90.7 – 103.4)	<b>&lt;0.001</b>
Total bilirubin, mg/dL	2.4 (1.6 – 3.5)	2.6 (1.7 – 3.8)	2.1 (1.5 – 3.0)	0.084
Direct bilirubin, mg/dL	0.4 (0.3 – 0.6)	0.4 (0.3 – 0.6)	0.4 (0.3 – 0.5)	0.501
Indirect bilirubin, mg/dL	2.0 (1.2 – 3.0)	2.2 (1.2 – 3.2)	1.6 (1.1 – 2.5)	0.072
LDH, U/L	999.0 (738.5 – 1586.5)	1094.0 (791.0 – 1710.0)	897.0 (677.2 – 1480.5)	0.101
HbF, %	9.9 (5.7 – 14.6)	9.3 (5.2 – 14.1)	11.1 (9.0 – 15.4)	<b>0.013</b>
HbS, %	85.4 (81.1 – 90.0)	86.7 (81.2 – 91.5)	83.6 (80.3 – 86.6)	<b>0.007</b>
WBC, x 10 <sup>9</sup> /L	12700.0 (9700.0 – 15600.0)	13900.0 (11200.0 – 16100.0)	9700.0 (8050.0 – 12800.0)	<b>&lt;0.001</b>
Neutrophils, x 10 <sup>9</sup> /L	5396.0 (4005.0 – 7153.0)	5760.0 (4081.0 – 7182.0)	4839.0 (3684.5 – 6705.7)	0.102
Eosinophil count, x 10 <sup>9</sup> /L	642.0 (249.0 – 1541.0)	696.0 (282.0 – 1807.0)	394.5 (146.0 – 738.0)	<b>0.001</b>
Lymphocyte count, x 10 <sup>9</sup> /L	4998.0 (3918.0 – 6726.5)	5560.0 (4350.0 – 7224.0)	4156.5 (3329.2 – 5085.0)	<b>&lt;0.001</b>
Monocyte count, x 10 <sup>9</sup> /L	338.0 (200.0 – 611.5)	360.0 (220.0 – 688.0)	279.5 (156.7 – 517.5)	<b>0.045</b>

RBC: red blood cell; MCV: Mean cell volume; LDH: lactate dehydrogenase; WBC: white blood cell. p-value obtained using Mann-Whitney and \*p-value using t test. Bold values indicate significance at p < 0.05 between patients not using and using HU.

**Table 2.** Association of laboratory data and hydroxyurea dose (mg/kg/day)

<b>Hydroxyurea therapy doses (mg/kg/day) (N=41)</b>	<b>15 mg/kg/day n=20</b>	<b>20 mg/kg/day n=10</b>	<b>25 mg/kg/day n=11</b>	<b>p value</b>
<b>WBC, x 10<sup>9</sup>/L</b>				
Mean ± SD	11620.0 ± 3480.41	10400 ± 3306.89	9400.00 ± 2976.57	0.154
<b>RBC, x 10<sup>12</sup>/L</b>				
Mean ± SD	2.380 ± 0.4786	2.50 ± 0.6549	2.173 ± 0.4585	0.470
<b>Platelet, x 10<sup>3</sup>/mL</b>				
Mean ± SD	494150.00 ± 141693.62	396700.00 ± 156767.38	374272.72 ± 96612.72	<b>0.032</b>
<b>MPV, fl</b>				
Mean ± SD	9.705 ± 1.053	10.940 ± 1.850	9.464 ± 1.254	0.088

WBC: white blood cells; RBC: red blood cells; HbF: fetal hemoglobin; MPV: mean platelet volume. p-values were obtained using the Kruskal-Wallis. The bolded value indicate significance at  $p < 0.05$ .

**Table 3.** Frequencies of *BCL11A* (2p16), *HBS1L-MYB* (6q23) and *OR51B6* (11p15) SNPs among SCA patients.

Gene /SNPs n=141	Genotype frequencies (%)			Allele frequencies	
				Major	Minor
<i>BCL11A</i> (rs766432)	AA	AC	CC	A	C
	76 (53.9%)	53 (37.6%)	12 (8.5%)	0.73	0.27
<i>BCL11A</i> (rs6732518)	CC	CT	TT	C	T
	23 (16.3%)	69 (48.9%)	49 (34.8%)	0.41	0.59
<i>OR51B5/6</i> (rs7483122)	TT	TC	CC	T	C
	115 (81.6%)	24 (17.0%)	2 (1.4%)	0.90	0.10
<i>OR51B5/6</i> (rs4910755)	AA	AC	CC	A	C
	114 (80.8%)	25 (17.8%)	2 (1.4%)	0.90	0.10
<i>HBS1L-MYB</i> (rs11759553)	AA	AT	TT	A	T
	68 (48.2%)	63 (44.7%)	10 (7.1%)	0.71	0.29
<i>HBS1L-MYB</i> (rs35959442)	CC	CG	GG	C	G
	68 (48.2%)	60 (42.5%)	11 (7.8%)	0.70	0.30

Data are based on 141 patients where the data for all SNPs is complete.

**Table 4.** Association of laboratory biomarkers in 42 SCA patients taking hydroxyurea and the genotype of rs766432 in *BCL11A*

<i>BCL11A</i> gene rs766432 (N=42)	AA (n=20)	AC (n=17)	CC (n=5)	p value
<b>RBC, x 10<sup>12</sup>/L</b>	2.195 ± 0.5296	2.388 ± 0.4357	2.840 ± 0.4615	<b>0.012</b>
<b>Hb, g/dL</b>	7.680 ± 1.3197	8.112 ± 1.5455	9.760 ± 1.2095	<b>0.026</b>
<b>Hematocrit, %</b>	21.350 ± 3.6386	22.735 ± 4.6534	27.340 ± 3.6733	<b>0.024</b>
<b>HbF, %</b>	12.535 ± 8.5333	13.653 ± 6.2139	15.960 ± 8.8299	0.338
<b>Direct Bilirubin, mg/dL</b>	0.385 ± 0.163	0.524 ± 0.213	0.300 ± 0.158	<b>0.045</b>
<b>Indirect Bilirubin, mg/dL</b>	2.065 ± 1.5652	1.765 ± 0.7664	1.680 ± 0.8871	0.970
<b>Platelet, x 10<sup>3</sup>/mL</b>	436100.00 ± 172067.58	468411.76 ± 92620.23	281400.00 ± 141895.38	0.053
<b>MPV, fl Mean ± SD</b>	9.875 ± 1.2527	9.529 ± 1.4225	11.440 ± 1.1781	<b>0.032</b>

RBC: red blood cells; Hb: hemoglobin concentration; HbF: fetal hemoglobin; MPV: mean platelet volume. Bold values indicate significance at  $p < 0.05$ , analyses were developed using the Kruskal-Wallis test. Values are given as means ±SD.

**Table 5.** Multivariate model associating polymorphisms in genes related to HbF.

Variables	B	SD	t	P	P model	R model
<b>Model 1</b>						
Sex	-0.102	0.073	-1.406	0.162		
Age	0.150	0.077	1.957	0.052		
Hydroxyurea use	-0.227	0.085	-2.687	<b>0.008</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.428
CAR haplotype	0.164	0.079	0.167	<b>0.040</b>		
rs766432 ( <i>BCL11A</i> )	0.098	0.075	1.302	0.195		
rs11759553 ( <i>HMIP</i> )	0.205	0.075	2.718	<b>0.007</b>		
rs7483122 ( <i>OR51B5/6</i> )	-0.130	0.443	-0.293	0.770		

## 7 DISCUSSÃO

A investigação do perfil sociodemográfico, marcadores laboratoriais e genéticos caracterizou a população em estudo, além de possibilitar a associação dos biomarcadores, eventos clínicos, mecanismos fisiopatológicos e resposta terapêutica a HU. Desta maneira, no primeiro manuscrito foram avaliados dados laboratoriais, características sociodemográficas, perfil genético e clínico em pacientes com DF oriundos de regiões do Sul da Bahia. A casuística foi composta por 200 pacientes com DF acompanhados pelo Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna, Bahia. Os pacientes com DF vivem em condições precárias, em residências localizadas distantes do centro de referência, com saneamento e infraestrutura inadequada. Além disso, descrevemos a susceptibilidade elevada a infecções e complicações clínicas (PEREIRA et al., 2013).

Em relação ao diagnóstico precoce na DF, verificamos que 38,0 % dos pacientes do estudo foram diagnosticados até os seis (6) meses de vida e, nesse grupo, 34% foram diagnosticados através de triagem neonatal. Em pacientes com DF de sete (7) meses a quatro (4) anos foi verificada a frequência de 24,0 % para diagnóstico tardio. A triagem neonatal brasileira para DF começou em 2001, com a fundação do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN)/teste do pezinho para hemoglobinopatias, que possibilitaram sobrevida maior aos portadores da DF (SERJEANT, 2000). Com base nesse programa foi encontrada redução na mortalidade e complicações clínicas da doença, em decorrência ao monitoramento terapêutico adequado desde o nascimento da criança. Deste modo, o diagnóstico tardio pode contribuir para risco de mortalidade e gravidade da doença (SERJEANT, 2000).

A caracterização dos pacientes em estudo revelou nível educacional baixo, sendo que 21 pacientes de 13 a 38 anos são analfabetos ou não concluíram o ensino fundamental e 10 pacientes de 17 a 56 anos apresentaram apenas o ensino básico. Portanto, o nível baixo de escolaridade observado em nosso estudo é corroborado conforme estabelecido em estudos desenvolvidos nos EUA e em outras regiões do Brasil (LOUREIRO e ROZENFELD, 2005; ADEGOKE, ADEODU e ADEKILE, 2015). Um estudo que avaliou fenótipos clínicos em crianças com DF na Nigéria, concluiu que características sociodemográficas não estão unicamente associadas ao nível educacional, a crise anêmica reflete importante associação

com o nível educacional baixo e desenvolvimento da doença (BALLAS et al., 2012; CARROLL et al., 2013).

Na região geográfica em que nosso estudo foi realizado, e a cidade de Itabuna apresentou grande parte dos pacientes com DF. Além do atendimento especializado localizado nessa cidade, facilitando o acesso dos pacientes aos cuidados com a saúde.

Acerca do período histórico da DF na região litoral Sul da Bahia ainda permanece desconhecido. A cidade de Itabuna está localizada próxima a Ilhéus e começou a ser povoada por imigrantes do estado de Sergipe, cujo destino era a cidade de Vitória da Conquista em 1867 (ALELUIA et al., 2015). Imigrantes sergipanos vieram de um estado próximo à Bahia, com participações nas margens do Rio Cachoeira e, nesse mesmo período, houve auxílio dos jesuítas na catequese das tribos indígenas *Pataxó*, *Guerren* e *Camacã* em fazendas, para atividades de caça e pesca. Em 1730 e 1790, os pioneiros enfrentaram o deserto e os índios (ALELUIA et al., 2015). Os negros e pardos provenientes do sertão de Sergipe e Bahia, em 1850, foram atraídos pela riqueza da região e, com a possibilidade de trabalhar no cultivo de cacau (ALELUIA et al., 2015). Desta forma, Ilhéus e Itabuna foram cidades que tiveram influência de muitos índios, além de pessoas provenientes de diferentes tribos e regiões africanas oriundas do Sul da África, que também desembarcou no porto de Ilhéus, para o trabalho escravo.

Curiosamente, aspectos históricos sugerem a possibilidade de dispersão maior do alelo  $\beta^S$  nessa cidade. O genótipo BEN/CAR foi predominante na AF, seguido do genótipo BEN I e CAR I na HbSC, com contribuição elevada do haplótipo BEN na DF. De acordo com a literatura, em 1678 a 1814, aproximadamente 39 dos 1770 navios que exportaram tabaco da Bahia foi para Congo e Angola, onde foram capturados africanos para o trabalho escravo, com possível contribuição africana de áreas Central e Sul da África (VERGER, 1968). Além disso, o período histórico do tráfico de escravos teve contribuição de quatro ciclos: Guiné (século XVI), Angola e Congo (século XVII), Costa da Mina (século XVIII), e Baía de Benin, entre 1770 e 1850. A partir de 1815, a Bahia foi o único estado brasileiro que restringiu o tráfico de escravos pelo Equador, fato que demonstra correlação entre as frequências genotípicas encontradas na Bahia e na África Ocidental, principalmente da região Benin (FLORENTINO, 1997). Encontramos concentrações elevadas de HbF e diminuídas de HbS em pacientes com haplótipo BEN. Pacientes portadores do haplótipo CAR apresentam

concentrações diminuídas de HbF, com até 5 %, enquanto que portadores do haplótipo BEN possuem concentrações intermediárias de HbF, variando de 5 a 15 % (POWARS, 1991).

No Brasil, a prevalência de talassemia alfa está relacionada diretamente aos diferentes grupos étnicos que formam a população. A Tal- $\alpha^{3.7Kb}$  predomina quase que exclusivamente em todas as regiões brasileiras já estudadas (HARTEVELD e HIGGS, 2010; FIGUEIREDO et al., 1996). Observamos a presença alélica da talassemia - $\alpha^{3.7Kb}$  em 9 % da população em estudo. Estima-se que na população brasileira a frequência do traço alfa talassêmico esteja aproximadamente 1 e 3 %. Ao considerarmos a descendência africana, esta frequência pode atingir de 20 a 25 % (FIGUEIREDO et al., 1996).

Na análise das características do perfil hematológico com a presença ou ausência da Tal- $\alpha^{3.7Kb}$ , evidenciamos concentrações elevadas de hemoglobina e hematócrito, apesar de microcitose, hipocromia. A talassemia alfa homozigótica e heterozigótica corresponde à perda de genes alfa (- $\alpha$ / $-\alpha$  e -/ $\alpha\alpha$ , respectivamente), caracterizada por apresentar anemia leve, com hemácias hipocrômicas microcíticas. Contudo, o aumento do hematócrito contribui para a viscosidade sanguínea, levando ao surgimento de vaso-oclusão e ocorrência de eventos clínicos (ADORNO et al., 2005; LYRA et al., 2005).

Vários estudos têm demonstrado mecanismos fisiopatológicos envolvidos na AF e HbSC. Os pacientes com AF apresentaram perfil hemolítico mais expressivo quando comparado aos pacientes HbSC, que apresentaram contagem diminuída de hemácias, concentração de hemoglobina e aumento nos níveis de LDH. O tempo de vida da hemácia é reduzido na circulação em decorrência do aumento da hemólise, sendo possível verificar redução na concentração de hemoglobina, contribuindo para a redução no transporte de oxigênio ao tecido (STEINBERG, 2001). Mais recentemente, foi demonstrado que três outros fatores são importantes para a polimerização da Hb, a composição e concentração, estado de hidratação celular e alterações na membrana celular dos eritrócitos (GROSSE et al., 2011; KATO et al., 2009).

A polimerização da HbS em pacientes com AF ocorre devido à exposição a baixa tensão de oxigênio e contribui, principalmente, para o aumento de hemólise intravascular. Além disso, há um quadro mais significativo de crises vaso-oclusivas e surgimento de processos patológicos secundários (RAPHAEL et al., 2009; MORRIS et al., 2005). Já os pacientes com HbSC apresentam quadro maior de viscosidade quando comparados aos

pacientes com AF. A viscosidade surge em decorrência da fisiopatologia de vaso-oclusão que consiste em retenção física de eritrócitos falciformes irreversíveis, levando a adesão na microcirculação e viscosidade, bem como resulta no recrutamento de leucócitos (GLADWIN et al., 2008). A HbSC é uma co-herança que também caracteriza DF, na qual os pacientes são heterozigoto duplo, uma vez que herdam o alelo  $\beta^S$  de um dos pais e  $\beta^C$  do outro, com coexistência de concentrações semelhantes de HbC e HbS em seus eritrócitos (BUNN et al., 1982; COLELLA et al., 2015). Deste modo, a hemoglobina C tem a capacidade de induzir a desidratação do eritrócito, levando à formação de polímeros de Hb causando o processo de falcização. Pacientes com HbSC demonstram menos sintomas clínicos em relação aos pacientes com AF, devido a concentração diminuída de HbS (GOLDBERG et al., 1982). No entanto, a reidratação dos eritrócitos pode reverter estes eventos. Assim, a expressiva viscosidade decorre da presença do genótipo heterozigoto por eritrócitos falciformes irreversíveis envolvendo obstrução do micro ambiente vascular, causando danos ao tecido e inflamação local (SCHNOG et al., 2004).

Além disso, observamos aumento na contagem de reticulócitos em pacientes com AF em resposta à condição hemolítica, relacionado com a compensação da medula óssea, que libera hemácias imaturas. Por conseguinte, o aumento do número de reticulócitos, aumenta também as propriedades adesivas na corrente sanguínea e, nas células endoteliais, uma vez que os reticulócitos também expressam moléculas de adesão. No que se refere à análise do biomarcador NO, foi observado valor ligeiramente mais baixo em pacientes com HbSC. A lise de eritrócitos promove liberação de Hb no plasma, contribuindo para efeitos inflamatórios e oxidativos, levando à disfunção endotelial. Os pacientes com DF apresentam resistência à dilatação dos vasos e aumento da adesão celular ao endotélio (KATO, GLADWIN E STEINBERG, 2007; BELANGER et al., 2015). Devido a este processo, a porção heme e as espécies reativas de oxigênio (ROS) são liberadas na corrente sanguínea, aumentando o estresse oxidativo e diminuindo a biodisponibilidade de NO (VILAS BOAS et al., 2010; DUTRA et al., 2014).

O perfil hemolítico reduzido observado nos pacientes com HbSC, demonstra contagem diminuída de leucócitos e, conseqüente, redução nas modificações do endotélio, ao contrário do que acontece nos pacientes com AF, onde é observado recrutamento maior de leucócitos, refletindo em lesão endotelial. O recrutamento de leucócitos observado resulta em



disfunção endotelial, desta forma, os monócitos medeiam à ativação endotelial pela produção de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG et al., 2016; BELCHER et al., 2000).

Por conseguinte, verificamos contagem elevada de plaquetas nos pacientes com AF, contudo, o volume plaquetário médio (VPM) não mostrou diferença entre genótipos. As plaquetas são descritas na regulação da hemostasia, mas também são responsáveis pela indução de processos inflamatórios. Uma ativação plaquetária maior tem sido descrita em pacientes com DF durante eventos vaso-oclusivos (WUN et al., 1997). Estudos sugerem que a ativação pode promover a adesão de eritrócitos falciformes ao endotélio vascular pela secreção de trombospondina, podendo contribuir para a trombose e hipertensão pulmonar, sendo mais expressiva no genótipo da AF (NAVAB et al., 2001).

Quanto ao perfil lipídico foi observado mais expressivamente em pacientes com AF. De acordo com os resultados, verificamos níveis diminuídos de colesterol total e HDL-C nos pacientes com AF quando comparado aos pacientes HbSC; embora ambos estejam abaixo do valor de referência estabelecido. A fração HDL-C corresponde a um marcador de risco importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (VILLAGRA et al., 2007). A hipertrigliceridemia e aumento de VLDL-C pode ser observado em pacientes com AF neste estudo, embora não estatisticamente significante. Indivíduos com AF apresentam estresse oxidativo elevado, com produção de radicais livres em associação com hipocolesterolemia, redução significativa de HDL-C, hipertrigliceridemia e aumento da fração VLDL-C, constituindo-se em marcador potencial de gravidade da DF (SEIXAS et al., 2010). Outros estudos evidenciaram que indivíduos com DF apresentam diminuição dos níveis plasmáticos de lipídios quando associados ao estresse hemolítico e comparados a indivíduos normais (RAHIMI et al., 2006).

As manifestações clínicas são consideradas como fatores que influenciam a vida do paciente, incluindo crise de dor, VOE e a coexistência de comorbidades que afetam órgãos, tais como, úlceras maleolares, infecção, colelitíase, esplenomegalia, retinopatia, necrose vascular, doenças neurológicas, que apresentam efeito negativo limitando o desenvolvimento cognitivo desses pacientes (STEINBERG, 2005; PIZZO et al., 2015). Como demonstrado em nossos resultados verificamos aumento na frequência de hospitalizações em pacientes com AF, que pode refletir no custo elevado para o serviço de saúde. O custo para o Sistema Único de Saúde (Sistema Único de Saúde - SUS) é uma consideração importante, visto que, o

cuidado aos pacientes com DF ainda é complicado. Todas estas possibilidades devem ser consideradas no desenvolvimento de estratégias governamentais voltadas no intuito de melhorar o sistema de saúde oferecido aos pacientes com DF (REES e GIBSON, 2012; KANTER e KRUSE-JARRES, 2013).

Encontramos número significativo de pacientes que fizeram uso de penicilina profilática, incluindo a benzatina, sendo observada em pacientes com até sete (7) anos de idade. Tal medida profilática reduz significativamente o risco de sepse e morte devido à infecção pneumocócica (GASTON et al., 1986). No entanto, no mesmo esquema profilático, pudemos observar em nosso estudo, a ocorrência de pneumonia entre pacientes pediátricos com DF. Isto pode estar relacionado ao clima da região, que se caracteriza por períodos chuvosos e umidade. Outro medicamento observado consiste no ácido fólico, de acordo com nossos dados verificamos frequência alta diária no uso de ácido fólico em pacientes de todas as faixas etárias. O ácido fólico é utilizado em casos de aumento da atividade secundária à hemólise crônica que resulta em elevada destruição de hemácias, resultando no consumo de ácido fólico e consequente déficit (DIXIT et al., 2016; MARTYRES et al., 2016). A HU é um medicamento utilizado no tratamento da DF e possui ação de induzir o aumento da concentração de HbF, reduzindo episódios de hemólise e crises vaso-oclusivas (REES e GIBSON, 2012; NWENYI et al., 2014). Há vários relatórios que mostram que o uso de HU em crianças, além de um diagnóstico precoce, atua sinergicamente na promoção de uma resposta positiva na vida desses pacientes (NWENYI et al., 2014).

Dessa forma, nossos dados destacam diferenças entre AF e HbSC, com base na caracterização laboratorial, perfil genético e manifestações clínicas de ambos os genótipos, além de encontramos maior número de hospitalização associados ao perfil hemolítico em pacientes com AF. Nesse caminho, torna-se essencial o estabelecimento de terapia profilática para melhor manejo terapêutico da DF, enfatizando a necessidade de implementar serviços especializados para AF e pacientes com HbSC, especialmente pela heterogeneidade clínica observada.

No segundo manuscrito, avaliamos dados laboratoriais em associação com os níveis dos biomarcadores LDH, NO e HDL-C em pacientes com AF do Sul da Bahia acompanhados no Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna, Bahia. Os indivíduos estavam em estado estável, sem uso de HU e ausência de terapia transfusional. Foram evidenciadas

associações relacionadas com mecanismos de hemólise, vaso-oclusão, disfunção endotelial, dislipidemia e inflamação. Deste modo, observamos que níveis elevados de LDH estiveram associados ao aumento de bilirrubinas total e indireta, redução na contagem de hemácias e concentração de hematócrito; além disso, foi verificado aumento discreto no VCM e HCM, corroborando o perfil hemolítico na AF.

O LDH é um biomarcador de lise celular, a ruptura dos eritrócitos apresenta liberação simultânea de hemoglobina, heme e arginase no plasma (KATO, GLADWIN e STEINBERG, 2007). Com relação ao perfil leucocítico, a contagem de monócitos foi significativamente maior em pacientes com níveis maiores de LDH, bem como foi evidenciado nas análises de correlação positiva, sugerindo disfunção endotelial em decorrência do quadro hemolítico. Estes resultados também mostraram aumento dos níveis de NO, e embora não foi estatisticamente significante, contribuindo para alteração do endotélio, sendo corroborado com o aumento na contagem de monócitos (SAFAYA, STEINBERG e KLINGS, 2012). Os monócitos de pacientes com DF são capazes de influenciar ativação endotelial através da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (SAFAYA, STEINBERG e KLINGS, 2012).

As células endoteliais demonstram um fenótipo ativado na AF (WUN, 2001). A translocação do NF- $\kappa$ B em células endoteliais, leva a ativação da via responsável por aumentar a expressão das moléculas de adesão, incluindo E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (BELCHER et al., 2000; ZHANG et al., 2016), desencadeando a adesão dos leucócitos mononucleares às células endoteliais. Estudos mostram que essa ativação pelos monócitos requer um contato célula-célula, no entanto, pode ser modulada também através de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos próprios monócitos (ZHANG et al., 2016). A adesão dos eritrócitos falcizados ao endotélio também é induzida, existindo também produção de grande carga de espécies reativas de oxigênio que são capazes também de ativar o NF- $\kappa$ B, promovendo transmigração dos monócitos (SULTANA, et al., 1998). Na análise dos metabólitos de NO observamos concentrações menores de bilirrubina direta em pacientes com níveis menores de NO, além da diminuição na contagem de reticulócitos. O nitrito é o metabólito central da hemostase do NO e, atua como importante molécula de sinalização (BRYAN et al., 2005). O equilíbrio hemostático de NO mostra diferentes efeitos, tais como o aumento da permeabilidade vascular, prevenção de lesões ateroscleróticas, inibição da agregação de plaquetas, ativação e, repressão transcricional de VCAM-1, ICAM-1, P-

selectina e E-selectina, em níveis fisiológicos. Por outro lado, o ambiente hemolítico presente na AF, libera Hb e arginase de eritrócitos falciformes, contribuindo para limitação da sua biodisponibilidade (KATO, GLADWIN e STEINBERG, 2007, SCHAER et al., 2013, WANG et al., 2014).

A biodisponibilidade menor de NO aumenta a ativação endotelial e, deste modo, a bilirrubina direta pode exercer propriedades antioxidantes. Segundo a literatura, dados mostram que o NO e espécies relacionadas induzem degradação tempo-dependente de bilirrubina *in vitro*, por isso, é possível que concentrações diminuídas de nitrito e nitrato sejam consequência de atividades potenciais na eliminação de bilirrubina em relação às espécies reativas de oxigênio (LANONE et al., 2005).

Verificamos nos pacientes com AF níveis diminuídos de NO, associados ao aumento dos níveis de colesterol total, HDL-C e LDL-C; no entanto, os níveis de HDL-C se encontravam abaixo do valor de referência em ambos os grupos de NO. O HDL-C consiste de algumas frações como, por exemplo, a fração proHDL-C, que é observada em pacientes com doenças inflamatórias (MCMAHON et al., 2006). De acordo com alguns estudos, o HDL-C pode não ser funcional, uma vez que, não é capaz de evitar a formação e/ou falha na oxidação e inativação do LDL-C; ou pró-inflamatório, aumentando a formação de fosfolípidos oxidados (VAN LENTEN, et al., 1995). O aumento dos níveis de proHDL-C foi observado em pacientes com DF, que provavelmente auxilia na manutenção do estado pró-coagulatório através do aumento de LDL-C oxidada, podendo contribuir para a fisiopatologia da doença vascular pulmonar (ATAGA et al., 2015).

No grupo de pacientes com valores elevados de HDL-C acima de 40,0 mg/dL, encontramos contagem maior de hemácias, concentrações de hemoglobina e hematócrito, contribuindo para melhoria do perfil hematológico. Esses dados corroboram o papel protetor da fração HDL-C. Assim, sugerimos que estes biomarcadores estão contribuindo para a melhora clínica e redução da ativação endotelial, respectivamente. Além disso, podemos verificar associação entre os concentrações de HbF e níveis de HDL-C. A HbF desempenha papel importante na modulação da patogênese da AF, e suas concentrações são geralmente inversamente associadas com a gravidade para determinado subfenótipo. Portanto, o aumento da concentração de HbF reduz o processo de polimerização da HbS e, conseqüentemente, leva a redução dos VOE, crise de dor e hospitalização.

O HDL-C apresenta função anti-inflamatória, antioxidante, antiagregação plaquetária, anticoagulantes e de pró fibrinólise (NOFER et al., 2002). Níveis elevados de HDL-C promovem redução no risco de hemólise intravascular, lesão endotelial, incluindo contagens menores de reticulócitos e eritrócitos, além da concentração de HbS (SEIXAS et al., 2010). Acredita-se que pacientes com níveis elevados de HDL-C também demonstrem contagens menores de leucócitos, monócitos e plaquetas. No entanto, alguns estudos em pacientes com AF mostraram associação com perfil dislipidêmico, juntamente com aumento de triglicérides e VLDL-C (SEIXAS et al., 2010; NOFER et al., 2002). De acordo com os resultados encontrados nesse estudo, níveis de HDL-C superiores a 40 mg/dL demonstraram aumento nos níveis de LDL-C e triglicérides, sugerindo perfil dislipidêmico associado a doença inflamatória, uma vez que o biomarcador de LDL-C é uma molécula pró-inflamatória, conforme observado em associação aos níveis de NO.

Na análise genética do marcador talassemia  $-\alpha^{3,7Kb}$  nos pacientes com AF foi encontrado frequência alélica de 0,14. Na cidade de Salvador, Bahia, estudo realizado de 590 recém-nascidos demonstrou prevalência de 0,19 para talassemia  $-\alpha^{3,7kb}$  (ADORNO et al., 2005). Em geral, estima-se que 5,0 % da população mundial apresente um alelo para talassemia alfa (WEATHERALL, 2008). Assim, podemos observar observamos que em Salvador e também na região sul da Bahia, a talassemia  $-\alpha^{3,7kb}$  é significativamente encontrada entre os pacientes com AF.

A coexistência de talassemia  $-\alpha^{3,7kb}$  em pacientes com AF está associada à melhora da anemia, demonstrando contagem maior de hemácias e níveis de hemoglobina, além de níveis menores de bilirrubina total e indireta. No entanto, foram observadas microcitose e hipocromia através de parâmetros hematológicos de MCV e MHC, respectivamente. Alguns estudos mostram aumento dos níveis de bilirrubina, enquanto outros não encontram esta associação. A partir dos resultados obtidos, verificamos redução significativa de bilirrubina total e indireta, enfatizando melhora do perfil de hemolítico (RUMANNEY et al., 2014). Os eritrócitos falciformes são mais susceptíveis a danos mecânicos, provavelmente devido à menor deformabilidade e diminuição da estabilidade da membrana (RUMANNEY et al., 2014). Indivíduos com AF em co-herança com talassemia  $-\alpha^{3,7kb}$  tem contagem diminuída de células densas, provavelmente devido a fragilidade mecânica menor das hemácias. Pacientes com AF e co-herança de talassemia alfa demonstram menos anemia (RUMANNEY et al., 2014). O

aumento do hematócrito em associação com a presença de talassemia alfa contribui para viscosidade e adesão célula-célula no endotélio. A viscosidade está associada com o surgimento de VOE; e a presença de talassemia alfa também pode trazer efeitos adversos para pacientes com AF (RUMANEY et al., 2014). Também foi observado contagem menor de linfócitos, corroborado pelo estudo anterior, que observou redução no número de células dessa população em co-herança à talassemia  $-\alpha^{3,7kb}$  (ADORNO et al., 2005). Verificamos contagem reduzida de plaquetas nos pacientes com AF em co-herança com talassemia  $-\alpha^{3,7kb}$ . Até o momento, não foram encontrados estudos que mostrem influência de talassemia  $-\alpha^{3,7kb}$  na contagem de plaquetas em pacientes com AF (RUMANEY et al., 2014).

As plaquetas são essenciais para a hemóstase, mas podem contribuir para o processo inflamatório (SEMPLE, ITALIANO e FREEDMAN, 2011). Com base em nossos resultados, sugerimos que a contagem diminuída de plaquetas possibilite diminuição da adesão de eritrócitos falciformes. Estudos recentes sobre a presença de  $\beta$ -talassemia e hemoglobina E (HbE) mostraram aumento no estresse oxidativo, resultando na ativação plaquetária, contribuindo para o estado de hipercoagulabilidade e gravidade da AF (KARMAKAR, BANEJEE e CHAKRABARTI, 2016).

Considerando os resultados encontrados, estudos corroboram e descrevem que estes sub-fenótipos são dinâmicos, associados a biomarcadores e várias alterações podem ocorrer simultaneamente na AF, enfatizando as associações conhecidas sobre os processos fisiopatológicos presentes na doença.

Dessa forma, biomarcadores de LDH, NO e HDL-C foram associados com a caracterização laboratorial permitindo classificar os subfenótipos hemolítico e dislipidêmico, respectivamente. O co-herança da AF com talassemia  $-\alpha^{3,7Kb}$  melhora a anemia e apresenta contagem menor de plaquetas; no entanto, contribui para a viscosidade do sangue. Os parâmetros laboratoriais auxiliaram a descrever os processos hemolíticos, vaso-oclusivo/viscoso e dislipidêmico, porém a AF apresenta diversidade fenotípica peculiar, tornando difícil estabelecer separadamente os mecanismos da fisiopatologia da doença. Por isso, mais estudos devem ser desenvolvidos visando contribuir para a compreensão dos processos envolvidos em associação com biomarcadores sistêmicos e marcadores genéticos da AF.

No terceiro manuscrito, avaliamos pacientes com AF em estado estável e ausência de terapia transfusional acompanhados pelo Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna e Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia. Desta forma, pudemos encontrar fatores que podem influenciar na gravidade ou melhorar a clínica da AF. Alterações genéticas atuam de forma a modular níveis de HbF e constituem preditores importantes do perfil hemolítico na AF. Dentre as modificações que modulam os níveis de HbF estão incluídos os diferentes haplótipos ligados ao gene da globina- $\beta$ , uso de HU e polimorfismos nos locus de característica quantitativa (QTLs).

No presente estudo observamos que pacientes em uso de HU apresentavam concentrações elevadas de HbF e, conseqüentemente concentrações diminuídas de HbS, que corresponde a diminuição da polimerização. Nesses pacientes pudemos evidenciar aumento de VCM, hemoglobina e hematócrito e níveis séricos diminuídos de bilirrubina, assim o conjunto desses parâmetros, denotam melhor condição hemolítica quando comparados a pacientes com AF sem uso de HU. A HU pertence à classe de compostos dos ácidos hidroxâmicos, que possuem capacidade de se ligar a metais. O efeito citotóxico primário da HU corresponde à sua capacidade de inibir a ribonucleotideo-redutase (YARBRO, 1992 GOLKAR et al., 2013). Este efeito reduz a produção de eritrócitos com HbS, com conseqüente aumento nos níveis de HbF proporcionado pelo aumento do número de precursores que favorecem a produção de glóbulos vermelhos, que contêm concentração elevada de HbF, surgindo a partir de células progenitoras que possuem menor taxa de divisão celular, gerando aumento na produção de NO e redução na expressão de moléculas de adesão (WARE et al., 2011; SUMMARELL e SHEERAN, 2016). Em estudo realizado na Índia com 24 pacientes com AF em uso de HU foi observado contagem elevada de eritrócitos, concentração elevada de hemoglobina e hematócrito, com redução significativa de HbS e crise de dor (SHOME et al., 2016). O estudo de Orah e Platt (2008) observou que duas semanas após o tratamento com HU há uma redução significativa no número de leucócitos e plaquetas, além do aumento de VCM.

A terapia com HU leva ao aumento da concentração de HbF, reduzindo o número de crises vaso-oclusivas, acidente vascular cerebral, sequestro esplênico, STA, hospitalizações e transfusões, melhorando a qualidade de vida e, reduzindo o custo geral do tratamento (PLATT et al., 1994, STEINBERG et al., 2003; CREARY et al., 2016). Estes efeitos também têm sido

observados em modelos animais. De acordo com a literatura, poucos pacientes não respondem de forma satisfatória ao uso da HU e, esse mecanismo ainda necessita de melhor elucidação da sua ação no organismo do paciente com AF, visto que a HU é responsável por aumentar concentração de HbF em aproximadamente metade dos pacientes com AF, reduzindo a morbidade e mortalidade (CHARACHE et al., 1995 , STEINBERG et al., 2003; STEINBERG, 1997).

Os pacientes tratados com HU neste estudo apresentaram redução na contagem de leucócitos, com conseqüente redução do número de eosinófilos, linfócitos e monócitos, que podem resultar em ativação endotelial menor, uma vez que, os monócitos são células especializadas na ativação de células endoteliais que atuam como um gatilho para o NF- $\kappa$ B (BELCHER et al., 2000; ZHANG et al., 2016). Ao observar ativação menor do endotélio vascular, com menor expressão de ICAM-I, VCAM-I, P-selectina, E-selectina, e do fator tecidual, é notório o desempenho importante na fisiopatologia de pacientes com AF e vaso-oclusão (ZHANG et al., 2016). Desta forma, nossos resultados confirmam os benefícios gerados pelo uso da HU, induzindo redução do número de leucócitos e, conseqüentemente, menor ativação do endotélio, reduzindo a ocorrência de eventos vaso-oclusivos e infecções.

Entre os pacientes com AF em uso de HU houve frequência elevada da administração de doses de 15 miligramas por quilograma de peso corporal por dia (mg/kg/dia), seguido por 25 mg/kg/dia e 20 mg/kg/dia. A associação das diferentes dosagens da HU (15 mg/kg/dia, 20 mg/kg/dia e 25mg/kg/dia) com o perfil laboratorial permitiu verificar que a maior dose administrada influenciou significativamente para menor contagem de plaquetas e VPM. A HU é administrada por via oral diariamente e as cápsulas são prontamente absorvidas pelo corpo (MONTALEMBERT et al., 2006; WARE et al., 2011). Existe uma formulação líquida adequada para crianças e adolescentes, porém ainda se encontra em fase de teste (WANG et al., 2001; HANKINS et al., 2005; THORNBURG, CALATRONI e PANEPINTO., 2011). No Brasil, a única formulação encontrada corresponde a cápsulas de 500mg. A dose inicial da maioria dos pacientes é de 15 mg/kg/dia, sendo ajustada gradualmente em doses escalonadas e, a dose máxima tolerada (DMT) deve ser inferior a 35 mg/kg/dia, sendo definida como a maior dose capaz de promover a melhora no curso clínico e laboratorial do paciente sem a ocorrência de toxicidade hematológica (PLATT et al., 1994; ZIMMERMAN et al., 2004; MONTALEMBERT et al., 2006; PLATT, 2008; ESTEPP et al., 2016). O tempo de uso



encontrado entre os pacientes do presente estudo variou de 2 meses a 4 anos e 2 meses, assim foi possível observar que os pacientes com maior tempo de uso de HU apresentaram contagem menor de reticulócitos e níveis elevados de bilirrubina direta em relação aos pacientes com menor tempo de uso, resultando em menor lesão vascular, permitindo maior vasodilatação resultando, além de demonstrar resposta à condição hemolítica (STEINBERG, 2003). Deve-se ter cuidado na prescrição pediátrica, devido à ausência da dosagem líquida da HU (FERSTER et al., 2001; HEENEY e WARE, 2008).

Na análise dos haplótipos para o gene da globina beta observou-se maior frequência do genótipo BEN/CAR, seguido pelo genótipo CAR/CAR e BEN/BEN, sendo o haplótipo CAR o mais comum entre os pacientes com AF. Há cinco principais haplótipos do gene da globina beta no mundo: quatro na África (Senegal, Benin, Bantu ou República Centro-Africano e Camarões) e um na Ásia (Arábia-indiano). A história do tráfico de escravos na Bahia relata a presença de escravos provenientes da República Africano Central (haplótipo CAR) e da África Oriental (haplótipo BEN) que são os haplótipos de maior ocorrência no estado, evidenciando a grande influência Nagô-Yorubá do Golfo de Benin. Em contrapartida, em outras localidades do Brasil, tivemos maior contribuição vinda do Congo e Angola, também com a participação do haplótipo CAR (VERGER et al., 1968). Nos Estados Unidos e na Jamaica é verificada maior prevalência do haplótipo BEN, resultante do tráfico de escravos que eram trazidos do Centro-Oeste africano (WAINSCOAT et al., 1983; POWARS et al., 1991), no entanto, em Cuba e Porto Rico há a predominância do haplótipo BANTU, demonstrando diferentes origens africanas destas populações (BARALT, 1982; CURTIN, 1969; NAGEL, 1984; MUNIZ et al., 1995). Em alguns estados brasileiros foi observada a presença do haplótipo CAR, como em São Paulo (62,2 %) e Pará (65,9 %) (COSTA et al., 1984; FIGUEIREDO et al., 1996). No estado da Bahia, o genótipo BEN/CAR (42,6 %) foi evidenciado como o mais frequente (ADORNO et al., 2005). Corroborando os dados históricos do estado da Bahia, a partir dos nossos resultados foi verificada prevalência do haplótipo CAR com 69,5 % (137/197) nos pacientes com AF, seguido pelo haplótipo BEN com 30,5 % (60/197), confirmando influência africana proveniente da África Sul e Central para o comércio de escravos. De acordo com nossos resultados, o haplótipo CAR apresentou entre os pacientes com AF, concentração maior de HbS e concentração menor de HbF

(POWARS, 1991; ADORNO et al., 2005). Nossos resultados corroboram com dados da literatura, demonstrando que o haplótipo CAR contribui para gravidade da DF.

Elementos do agrupamento de genes do receptor olfatório (OR) localizados no cromossomo 11p podem desempenhar papel regulador na expressão do gene da globina  $\gamma$  e consequente modulação da HbF (SOLOVIEFF et al., 2010; BARBOSA et al., 2013). Encontramos frequência significativa de *OR51B5/6* rs7483122 C>T, *BCL11A* rs6732518 C>T e *HMIP* rs35959442 C>G, com 0,90, 0,59 e 0,30 do alelo variante, respectivamente. A região do cromossomo 11, que contém SNPs nos genes *OR51B5* e *OR51B6* contribui para a expressão da HbF, além do SNPs no gene *BCL11A* (SOLOVIEFF et al., 2010; BAUER et al., 2013). Em outros estudos foi demonstrado que as células precursoras humanas de indivíduos com alta e baixa expressão de gene *MYB* apresentavam contagens mais baixas de eritrócitos, porém com maior VCM e contagem de plaquetas (JIANG et al., 2006). Assim, as variantes genéticas da região intergênica *HBSIL-MYB* localizadas no cromossomo 6q mostraram-se altamente associadas não só com os níveis de HbF, mas também com outros parâmetros hematológicos. Dados da literatura forneceram a base funcional para esta associação e apoiam a descoberta do gene *HMIP* localizado na região *HBSIL-MYB* que é descrito por estar associado a níveis elevados de HbF, além de contribuir com efeitos pleiotrópicos em vários parâmetros hematológicos como identificados em estudos de associação genética (WAHLBERG et al., 2009).

A hemoglobina fetal é o maior modulador genético da AF (DRISS et al., 2009). SNPs associados à QTLs identificados na região intergênica *HBSIL-MYB* localizada no cromossomo 6q23 e, no gene *BCL11A* localizado no cromossomo 2p16 estão envolvidos na modulação da síntese de HbF (GARNER et al., 2004; THEIN et al., 2007; NGUYEN et al., 2010). Nos pacientes em estudo foi encontrada frequência do alelo variante T (0,59) do gene *BCL11A* (rs6732518) e do alelo variante C (rs766432) com frequência de 0,27. No grupo de pacientes homocigotos para o alelo mutante (C) do SNP (rs766432) em associação aos parâmetros laboratoriais foi observada alteração no perfil hematológico (hemácia, hemoglobina, hematócrito e HbF), contagem de plaquetas reduzida e níveis menores de bilirrubina direta indireta, demonstrando que pacientes em uso do medicamento e na presença do alelo variante homocigoto do gene *BCL11A* (rs766432 A>C) apresentam melhor quadro

hemolítico, menor vaso-oclusão, menor adesão plaquetária, e níveis reduzidos de bilirrubina direta, contribuindo para a melhora clínica da doença e taxas de hospitalizações menores.

O gene *BCL11A* tem sido descrito como gene que exerce forte influência sobre os níveis de HbF em populações normais e pacientes com AF e talassemia (MENZEL et al., 2007; SEDGEWICK et al., 2008). A proteína *BCL11A* é regulada durante o desenvolvimento humano, sendo que nas células eritroides humanas adultas é necessário manter o silenciamento da HbF (SANKARAN et al., 2008). Outros SNPs do gene *BCL11A* também estão relacionados com a expressão da HbF como o SNP rs461393 que demonstrou presença de 10 % do alelo variante entre indivíduos com AF no nordeste do Brasil (CARDOSO et al., 2014). Outros estudos obtiveram resultados semelhantes, como estudos realizados em pacientes com AF afro-americanos, tanzanianos e britânicos (LETTRE et al., 2008; MAKANI et al., 2011). No Brasil, um estudo realizado com 622 pacientes com HbSC e AF sem uso de HU avaliou polimorfismos nos genes *BCL11A*, *HMIP* e *OR51B5/6* semelhantes aos avaliados neste estudo e encontraram associação com a indução de HbF, especialmente nos genes *BCL11A* e *HMIP*, além de verificar frequência maior do haplótipo CAR (BARBOSA et al., 2013). Um estudo de coorte realizado na Tanzânia em pacientes com AF avaliou SNPs na região intergênica *HBSIL-MYB* e gene *BCL11A* que demonstraram ter impacto significativo na modulação da HbF (BAUER et al., 2013). Em outro estudo foi observada associação da variação genética no gene *BCL11A* e a concentração de HbF, sequências não codificantes são associadas como atenuador de cromatina eritróide; desta, o gene *BCL11A*, por atuar como atenuador de HbF, tornando-se alvo atrativo para a concepção de possível estratégia terapêutica (MAKANI et al., 2011).

Em relação à caracterização clínica dos pacientes com o alelo variante (C) do SNP rs766432 gene *BCL11A* em tratamento com HU, foi verificada frequência menor de eventos clínicos em pacientes tratados com HU. No entanto, a litíase, foi mais observada nesse grupo de pacientes, sugerindo que esse evento clínico ocorra independentemente do efeito benéfico produzido pela farmacocinética da HU e presença do alelo variante (C), de SNP rs766432 gene *BCL11A*. De acordo com o trabalho realizado em *Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia (MSH)*, que observou a redução de eventos clínicos decorrentes da vaso-oclusão em pacientes tratados com HU, esta reflete na redução global da mortalidade estimada em 40 % até aos 9 anos (WONKAM et al., 2014). A HU está relacionada a redução

das complicações vaso-oclusivas da AF (CHARACHE et al., 1995). Tais resultados corroboram nossos resultados, visto que entre os mecanismos associados a HU está o aumento na expressão dos níveis de HbF, contribuindo para redução de eventos clínicos e mortalidade.

Com isso, diversos estudos demonstram que o conjunto de associações de polimorfismos nos genes *Xmm1-158*, *OR51B5/6*, *HBS1L-MYB* e *BCL11A* explicam o aumento de 20 % a 50 % da variância entre indivíduos em relação a modulação da HbF (THEIN et al., 2009; WONKAN et al., 2014). A partir dos nossos resultados, a análise multivariada linear evidenciou que as variáveis de polimorfismos, idade, sexo, VCM, hemoglobina, bilirrubina indireta, hidroxúria, contagem de leucócitos e haplótipo CAR contribuíram significativamente para modulação da concentração de HbF em pacientes com AF. Desta forma, a compreensão dos QTLs em associação a modulação da HU e de parâmetros laboratoriais pode expandir o conhecimento acerca dos mecanismos de regulação da HbF, podendo elucidar possíveis estratégias de indução da expressão aumentada que pode propiciar melhoria do perfil clínico do paciente, uma vez que, o aumento da concentração de HbF pode contribuir para diminuir a frequência e intensidade de eventos clínicos (STEINBERG et al., 2005).

## 8 CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a população de pacientes com doença falciforme do Sul da Bahia, com HbSC e AF, além da evidência de que os genótipos da DF diferem em relação aos parâmetros laboratoriais, genéticos e ocorrência de eventos clínicos, refletindo na gravidade da doença. Apesar dos biomarcadores encontrados na AF foram encontradas associações entre os parâmetros laboratoriais e fisiopatologia da doença. Portanto, os subfenótipos estabelecidos, de fato, exercem papel importante na hemólise, vaso-occlusão e dislipidemia. Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos, o biomarcador LDH é sugerido estar associado ao subfenótipo hemolítico, o NO apresentou influência maior na ativação endotelial e dislipidemia, o HDL-C demonstrou possível associação ao quadro inflamatório observado nos pacientes com AF. O marcador genético da talassemia  $-\alpha^{3,7kb}$  em co-herança com AF esteve associado a melhora do quadro hemolítico e diminuição da ativação plaquetária; no entanto, este marcador contribuiu para viscosidade sanguínea e vaso-occlusão. O estabelecimento dos subfenótipos na AF sugeriu que os mecanismos fisiopatológicos envolvidos não ocorrem de forma separada, necessitando de mais estudos para compreensão da doença. Foi evidenciado papel relevante na modulação da HbF através dos haplótipos ligados ao gene da globina  $\beta^S$ , em especial, pelo haplótipo BEN e CAR e, polimorfismos localizados nos genes *BCL11A*, *HMIP*, *OR51B5/6* que demonstrou influência maior na expressão da HbF e parâmetros laboratoriais, principalmente o SNP rs766432 do gene *BCL11A* quando em associação ao uso de HU. Concluímos que a caracterização da população em estudo e o estabelecimento dos biomarcadores laboratoriais e genéticos norteiam os mecanismos fisiopatológicos da DF e gravidade clínica, proporcionando subsídios para acompanhamento e tratamento adequado aos pacientes.

## 9 REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, S. A.; ADEODU, O. O.; ADEKILE, A. D. Sick cell disease clinical phenotypes in children from South-Western, Nigeria. **Niger J. Clin. Pract.**, v. 18, n. 1, p. 95-101, 2015.
- ADEKILE A. Risk of cerebral haemorrhage in children with sickle cell disease. **Dev Med Child Neurol.**, v. 57, n. 2, p. 116-117, 2015.
- ADEKILE, A. D. et al. Clinical and Molecular Characteristics of Non-Transfusion-Dependent Thalassemia in Kuwait. **Hemoglobin**, v. 39, n. 5, p. 320-326, 2015.
- ADISA, O. A. et al. Association between plasma free haem and incidence of vaso-occlusive episodes and acute chest syndrome in children with sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 162, n. 5, p. 702-705, 2013.
- ADORNO, E. V. et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cad. Saude Publ.**, v. 21, n. 1, p. 292-298, 2005.
- ADORNO, E. V. et al. Sequence change in the HS2-LCR and Ggamma-globin gene promoter region of sickle cell anemia patients. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, n. 2, p. 95-98, 2008.
- AKINSHEYE, I. et al. Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia: Molecular Characterization of the Unusually High Fetal Hemoglobin Phenotype in African Americans. **Am. J. Hematol.**, v. 87, n. 2, p. 217 – 219, 2012.
- AKINSHEYE, I. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, v. 7, n. 118, p. 19-27, 2011.
- ALEEM, A. Renal Abnormalities in Patients with Sickle Cell Disease: A Single Center Report from Saudi Arabia. **Saudi J. Kidney Dis. Transpl.**, v. 19, p. 194-199, 2008.
- ALELUIA, M. M. et al. The origin of HTLV-1 in southern Bahia by phylogenetic, mtDNA and  $\beta$ -globin analysis. **Viol. Rep. Elsevier**, v. 5, p. 63–74, 2015.
- AMORIM, T.; PIMENTEL, H.; FONTES, M. I. M. M. Avaliação do Programa de Triagem Neonatal da Bahia entre 2007 – 2009 – As Lições da Doença Falciforme. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 80, n. 3, p. 10-13, 2010.
- ANTONARAKIS, S. E. et al. Origin of the  $\beta$ S-globin gene in blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 81, p. 853-856, 1984.

- ASNANI, M. R.; LYNCH, O.; REID, M. E. Determining glomerular filtration rate in homozygous sickle cell disease: utility of serum creatinine based estimating equations. **PLoS One**. v. 8, n. 7, p. 699-722, 2013.
- ATAGA, K. I. et al. Association of pro-inflammatory high-density lipoprotein cholesterol with clinical and laboratory variables in sickle cell disease. **Hematology**, v. 20, n. 5, p. 289-296, 2015.
- AZEVEDO, S. E. et al. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v. 53, p. 509-512, 1980.
- BALLAS, S. K. et al. Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. **Scien.World J.**, v. 2012, p. 949535, 2012.
- BARALT, A. G. **Slave Revolts in Puerto Rico: Conspiracies and Uprisings, 1795-1873**. Princeton, NJ: Markus Wiener Publishers, 1982.
- BARBOSA, C. G. et al. Genetic modulation of HbF in Brazilians with HbSC disease and sickle cell anemia. **Am. J. Hematol.**, v. 88, n. 10, p. 923-924, 2013.
- BAUER, D. E. et al. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. **Science**, v. 342, n. 6155, p. 253-257, 2013.
- BELANGER, A. M. et al. Effects of nitric oxide and its congeners on sickle red blood cell deformability. **Transfusion**, 2015.
- BELCHER, J. D. et al. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. **Blood**, v. 96, n. 7, p. 2451-2459, 2000.
- BHANUSHALI, A. A. et al. Genetic variant in the BCL11A (rs1427407), but not HBS1-MYB (rs6934903) loci associate with fetal hemoglobin levels in Indian sickle cell disease patients. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 54, n. 1, p. 4-8, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. **Doença falciforme: Hidroxiureia: uso e acesso da Saúde**. Brasília, DF, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº822, de 6 de Junho de 2001. Instituto no Sistema Único de Saúde. Programa Nacional de Triagem Neonatal/PNTN. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doença Falciformes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p.33, col. 2, 7 de junho de 2001.
- BROUSSE, V.; BUFFET, P.; REES, D. The spleen and sickle cell disease: the sick (led) spleen. **Br. J. Haematol.**, v. 166, n. 2, p. 165 – 176, 2014.

BRYAN, N. S. et al. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. **Nat. Chem. Biol.**, v. 1, n. 5, p. 290-967, 2005.

BULGER, M. et al. Comparative structural and functional analysis of the olfactory receptor genes flanking the human and mouse beta-globin gene clusters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 14560-14565, 2000.

BUNN, H. F. et al. Molecular and cellular pathogenesis of hemoglobin SC disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, n. 23, p. 7527-7531, 1982.

CAMUS, S. M. et al. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vaso occlusions in sickle cell disease. **Blood**, v. 125, n. 24, p. 3805-3814, 2015.

CANÇADO, R. D. Talassemias alfa. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 2, p. 86-87, 2006.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 3, 2007.

CARDOSO, G. L. et al. DNA polymorphisms at BCL11A, HBS1L-MYB and Xmn1-HBG2 site loci associated with fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia patients from Northern Brazil. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 53, n. 4, p. 176-179, 2014.

CARROLL, P. C. et al. A preliminary study of psychiatric, familial, and medical characteristics of high-utilizing sickle cell disease patients. **Clin. J. Pain**, v. 29, n. 4, p. 317-323, 2013.

CERQUEIRA, B. A.V. et al. Associação de marcadores laboratoriais ao perfil clínico em pacientes com anemia falciforme de Salvador- Bahia laboratory markers associated with clinic aspects on sickle cell anemia patients. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 80, n. 3, p. 24-28, 2010.

CHARACHE, S. et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **N. Engl J. Med.**, v. 332, n. 20, p. 1317-1322, 1995.

CHARACHE, S. et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 79, p. 2555-2565, 1992.

CHARACHE, S. Fetal hemoglobin, sickling, and sickle cell disease. **Adv. Pediatr.** v. 37, p. 1-31, 1990.

COLELLA, M. P. et al. Elevated hypercoagulability markers in hemoglobin SC disease. **Haematologica**, v. 100, n. 4, p. 466-471, 2015.



COSTA, F. F. et al. Beta S-gene-cluster haplotype in sickle cell anemia patients from two regions of Brazil. **Am J. Hematol.**, v. 45, p. 96-97, 1994.

CRAIG, J. E. et al. Dissecting the loci controlling fetal haemoglobin production on chromosomes 11p and 6q by the regressive approach. **Nat. Genet.**, v. 12, p. 58-64, 1996.

CREARY, S. E. et al. Hydroxyurea use in Children with Sickle Cell Disease: Do Severely Affected Patients Use It and Does It Impact Hospitalization Outcomes? **Pediatr. Blood Cancer**, v. 63, n. 5, p. 844-847, 2016.

CURTIN, P. D. **The Atlantic Slave Trade: A Census**. University of Wisconsin Press, Madison, 1969.

DARBARI, D. S. et al. Severe painful vaso-occlusive crises and mortality in a contemporary adult sickle cell anemia cohort study. **PLoS One**. v. 8, p. 799-723, 2013.

DI-NUZZO, D. V.; FONSECA, S. F. Anemia falciforme e infecções. **J. Pediatr.** v. 80, p. 347-354, 2004.

DIXIT, R. et al. Folate supplementation in people with sickle cell disease. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 2, p. Cd011130, 2016.

DRAWZ, P. et al. Kidney Disease among Patients with Sickle Cell Disease, Hemoglobin SS and SC. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 11, n. 2, p. 207-215, 2016.

DRISS, A. et al. Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. **Genomics Insights**, v. 2009, n. 2, p. 23-48, 2009.

DRISS, F. et al. Regular automated erythrocytapheresis in sickle cell patients. **Br. J. Haematol.**, v. 154, n. 5, p. 656-659, 2011.

DUTRA, F. F. et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 111, n. 39, p. E4110-4118, 2014.

EMBURY, S. H. Age-dependent changes in the membrane surface area: sickle red blood cell volume may account for differential clinical effects of coinherited alpha thalassemia on sickle cell anemia. **Eur. J. Haematol.**, v. 88, n. 4, p. 363-364, 2012.

ESTEPP, J. H. et al. Pharmacokinetics and bioequivalence of a liquid formulation of hydroxyurea in children with sickle cell anemia. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 56, n. 3, p. 298-306, 2016.

FAUROUX, B. Respiratory distress and drepanocytosis. **Arch. Pediatr.**, v. 82, p. 82-86, 2000.

- FERSTER, A. et al. Five years of experience with hydroxyurea in children and young adults with sickle cell disease. **Blood**, v. 97, n. 11, p. 3628-3632, 2001.
- FIGUEIREDO, M. S. et al. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. **Am. J. Hematol.**, v. 53, n. 2, p. 72-76, 1996.
- FLORENTINO, M. **Em Costas Negras**. Companhia das Letras Press. Rio de Janeiro, Brasil, 1997.
- FRANCIS, R. B., Jr.; HAYWOOD, L. J. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 84, n. 7, p. 611-615, 1992.
- GALANELLO, R. A thalassemic child becomes adult. **Rev. Clin. Exp. Hematol.**, v. 7, n. 1, p. 4-21, 2003.
- GALIZA NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme Molecular aspects for sickle cell anemia **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.
- GARNER, C. et al. Quantitative trait locus on chromosome 8q influences the switch from fetal to adult hemoglobin. **Blood**, v. 104, n. 7, p. 2184-2186, 2004.
- GASTON, M. H. et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. A randomized trial. **N. Engl. J. Med.**, v. 314, n. 25, p. 1593-1599, 1986.
- GEBRESELASSIE, S.; SIMMONS, M. N.; MONTAGUE, D. K. Genitourinary manifestations of sickle cell disease. **Cleve Clin. J. Med.**, v. 82, n. 10, p. 679-683, 2015.
- GHUGRE, N. R. et al. Patterns of hepatic iron distribution in patients with chronically transfused thalassemia and sickle cell disease. **Am. J. Hematol.**, v. 84, n. 8, p. 480-483, 2009.
- GLADWIN, M. T.; KATO, G. J. Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: the plot (and blood) thickens! **Haematologica**, v. 93, n. 1, p. 1-3, 2008.
- GOLDBERG, M. A. et al. Effects of red cell membrane on the polymerization of sickle hemoglobin. **Blood Cells**, v. 8, n. 2, p. 237-243, 1982.
- GOLKAR, O. S. et al. Intracellular deoxyribonucleotide pool imbalance and DNA damage in cells treated with hydroxyurea, an inhibitor of ribonucleotide reductase. **Mutagenesis**, v. 28, n. 6, p. 653-660, 2013.
- GONÇALVES, M. S. et al. Sickle cell disease in a brazilian population from São Paulo: a study of the  $\beta$ S haplotype. **Hum. Hered.**, v. 44, p. 322-327, 1984.

GONÇALVES, M. S. et al. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n. 10, p. 1283-1288, 2003.

GOSMANOVA, E. O. et al. Prevalence and progression of chronic kidney disease in adult patients with sickle cell disease. **J. Investig. Med.**, v. 62, n.5, p. 804-807, 2014.

GREEN, N. S. et al. Candidate sequence variants and fetal hemoglobin in children with sickle cell disease treated with hydroxyurea. **PLoS One**. v. 8, p. e55709–e55709, 2013.

GROSSE, S. D. et al. Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. **Am. J. Prev. Med.**, v. 41, n. 6 Suppl 4, p. S398-405, 2011.

GUMIERO, A. P. S. et al. Colelitíase no paciente pediátrico portador de doença falciforme. **Rev. Paul. Pediatr.** v. 25, n. 4, p. 377-381, 2007.

GUMIERO, dos S. A. A.; BELLOMO-BRANDÃO, A. M.; da COSTA PINTO, L. A. E. Gallstones in children with sickle cell disease followed up at a Brazilian hematology center. **Arq. Gastroenterol.** v. 45, n. 4, 2008.

HABARA, A.; STEINBERG, M. H. Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Exp. Biol. Med.**, 2016.

HANKINS, J. S. et al. Long-term hydroxyurea therapy for infants with sickle cell anemia: the HUSOFT extension study. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2269-75, 2005.

HANNEMANN, A. et al. The Properties of Red Blood Cells from Patients Heterozygous for HbS and HbC (HbSC Genotype). **Anemia**, p. 248-527, 2011.

HARTEVELD, C. L.; HIGGS, D. R. Alpha-thalassaemia. **Orphanet J. Rare Dis.**, v. 5, p. 13, 2010.

HEENEY, M. H. et al. Chemical and functional analysis of hydroxyurea oral solutions. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 26, p. 179–184, 2004.

HEENEY, M. M.; WARE, R. E. Hydroxyurea for children with sickle cell disease. **Pediatr. Clin. North Am.**, v. 55, n. 2, p. 483-501, 2008.

HIDALGO, A. et al. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. **Nat. Med.**, v. 15, n. 4, p. 384-391, 2009.

HIGGS, D. R. et al. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. **Blood**, v. 73. n. 5, p. 1081-1104, 1989.

HIRSCHBERG, R. Glomerular hyperfiltration in sickle cell disease. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 5, n. 5, p. 748–749, 2010.

IKUTA, T.; AUSENDA, S.; CAPPELLINI, M. D. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, 1847–1852, 2001.

JIANG, J. et al. cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults. **Blood**, v. 108, n. 3, p. 1077-1083, 2006.

KANTER, J. E.; BORNFELDT, K. E. Inflammation and diabetes-accelerated atherosclerosis: myeloid cell mediators. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 24, n. 3, p. 137-144, 2013.

KANTER, J.; KRUSE-JARRES, R. Management of sickle cell disease from childhood through adulthood. **Blood Rev.**, v. 27, n. 6, p. 279-287, 2013.

KARMAKAR, S.; BANERJEE, D.; CHAKRABARTI, A. Platelet proteomics in thalassemia: Factors responsible for hypercoagulation. **Proteomics Clin. Appl.**, v. 10, n. 3, p. 239-247, 2016.

KATO, G. J. et al. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **Am. J. Hematol.**, v. 84, n. 9, p. 618-625, Sep 2009.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Rev.**, v. 21, n. 1, p. 37-347, 2007.

KEOGHANE, S. R.; SULLIVAN, M. E.; MILLER, M. A. The aetiology, pathogenesis and management of priapism. **BJU Int.**, v. 90. n. 2, p. 149-154, 2002.

KHATIB, R.; RABAH, R.; SARNAIK, S. A. The spleen in the sickling disorders: an update. **Pediat. Radiol.**, v. 39, n. 1, p. 17 – 22, 2009.

KIM, H. C. Red cell exchange: special focus on sickle cell disease. **Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, v. 5, n. 1, p. 450-456, 2014.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K.H. **Color Atlas of Biochemistry**. New York: Thieme, 2nd ed., 2005.

KULOZIK, A. E. et al. Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 39, n. 2, p. 239-244, 1986.

LANONE, S. et al. Bilirubin decreases nos2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats. FASEB journal : official publication of the **Fed. Am. Soc. Exp. Biol.**, v. 19 n. 13, p. 1890-1892, 2005.

LAWRENCE, C.; WEBB, J. Sickle Cell Disease and Stroke: Diagnosis and Management. **Curr. Neurol. Neurosci. Rep.**, v. 16, n. 3, p. 27, 2016.

LÊ, P. Q. et al. Survival among children and adults with sickle cell disease in Belgium: benefit from hydroxyurea treatment. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 62, p. 1956–1961, 2015.

LETTRE, G. et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 33, p. 11869-11874, 2008.

LOU, T. F. et al. Hydroxyurea generates nitric oxide in human erythroid cells: mechanisms for  $\gamma$ -globin gene activation. **Exp. Biol. Med.**, v. 234, p. 1374–1382, 2009.

LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S. Epidemiology of sickle cell disease hospital admissions in Brazil. **Rev. Saude Publ.**, v. 39, n. 6, p. 943-949, 2005.

LYRA, I.M. et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Cad. Saúde Públ.**, v. 21, n. 4, p. 1287-1290, 2005.

MAKANI, J. et al. Genetics of fetal hemoglobin in Tanzanian and British patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 117, n. 4, p. 1390-1392, 2011.

MARTYRES, D. J. et al. Nutrient Insufficiencies/Deficiencies in Children With Sickle Cell Disease and Its Association With Increased Disease Severity. **Pediatr. Blood Cancer**, Feb 8 2016.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annu Rev. Pathol.**, v. 9, p. 181-218, 2014.

MCMAHON, M. et al. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Arth. Rheum.**, v. 54, n. 8, p. 2541-2549, 2006.

MENZEL, S. et al. The HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23.3 influences erythrocyte, platelet, and monocyte counts in humans. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3624-3626, 2007.

MENZEL, S. et al. QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. **Nat. Genet.**, v. 39, n. 10, p. 1197-1199, 2007.

MINNITI, C. P.; KATO, G. J. How we treat sickle cell patients with leg ulcers. **Am. J. Hematol.**, 2015.

MITIKO M. H. C. F. Diagnosis of sickle cell disease in the neonate and after the sixth month of life. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 218-222, 2007.

MOHAMMED, A. O. et al. Relationship of the sickle cell gene to the ethnic and geographic groups populating the Sudan. **Commun. Genet.**, v. 9, n. 2, p. 113-120, 2006.

MONTALEMBERT, M. de. et al. Pharmacokinetics of hydroxyurea 1,000 mg coated breakable tablets and 500 mg capsules in pediatric and adult patients with sickle cell disease. **Haematologica**, v. 91, n. 12, p. 1685-1688, 2006.

MONTALEMBERT, M. de. et al. Long-term hydroxyurea treatment in children with sickle cell disease: tolerance and clinical outcomes. **Haematologica**. v. 91, p. 125–128, 2006.

MORRIS, C. R. et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. **JAMA**, v. 294, n. 1, p. 81-90, 2005.

MORRIS, C. R. Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. **Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program**. p. 177-185, 2008.

MUNIZ, A. et al. Sickle cell anemia and beta-gene cluster haplotypes in Cuba. **Am. J. Hematol.**, v. 49, n. 2, p. 163-164, 1995.

MYINT K, T. et al. Laser therapy for retinopathy in sickle cell disease. **The Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 10, 2015.

NAGEL, R. L. The Origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. **Einstein Q. J. Biol. Med.**, v. 2, p. 53-62, 1984.

NAGEL, R. L.; FABRY, M. E. Sickle cell anemia as a multigenetic disease: new insights into the mechanism of painful crisis. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 165, p. 93-102, 1984.

NAGEL, R.L.; STEINBERG, M.H. Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. **Pediatr. Pathol. Mol. Med.**, v. 20, n. 2, p. 123-136, 2001.

NANSSEU N, R. J. et al. The Acute Chest Syndrome in Cameroonian children living with sickle cell disease. **BMC Pediatrics**, v. 15, p. 131, 2015.

NAOUM, P. C. **Diagnóstico das Hemoglobinopatias**. São Paulo, Sarvier. Ed. Livros Médicos, 1987. p. 12-17.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n. 1, p. 5-22, 2000.

NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nat. Immunol.**, v. 15, n. 7, p. 602-611, 2014.

- NAVAB, M. et al. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. **J. Lipid Res.**, v. 42, n. 8, p. 1308-1317, 2001.
- NGUYEN, T. K. et al. The XmnI (G)gamma polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to BCL11A and HBS1L-MYB SNPs in a cohort of 57 beta-thalassemia intermedia patients. **Blood Cells Mol. Di.s**, v. 45, n. 2, p. 124-127, 2010.
- NOFER, J. R. et al. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. **Atherosclerosis**, v. 161, n. 1, p. 1-16, 2002.
- NOGUCHI, C. T. et al. Alpha thalassemia changes erythrocyte heterogeneity in sickle cell disease. **J. Clin. Invest.**, v. 75, n. 5, p. 1632-1637, 1985.
- NUINOON, M. et al. A genome-wide association identified the common genetic variants influence disease severity in beta0-thalassemia/hemoglobin E. **Hum. Genet.**, v. 127, n. 3, p. 303-314, 2010.
- NWENYI, E. et al. Differences in quality of life between pediatric sickle cell patients who used hydroxyurea and those who did not. **Int. J. Health Care Qual. Assur.**, v. 27, n. 6, p. 468-481, 2014.
- OBARO, S. K.; IROH TAM, P. Y. Preventing Infections in Sickle Cell Disease: The Unfinished Business. **Pediatr Blood Cancer**, v. 63, n. 5, p. 781-785, 2016.
- OJWANG, P. J. et al. beta S-haplotypes and alpha-thalassemia along the coastal belt of Kenya. **East Afr. Med. J.**, v. 66, n. 6, p. 377-380, 1989.
- ORAH, S.; PLATT, M.D. Hydroxyurea for the Treatment of Sickle Cell Anemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, n. 1362-1369, 2008.
- OSIÈVRE, M. H. et al. Modulation of erythroid adhesion receptors expression of hydroxyurea in children with sickle cell disease. **Haematologica**. v. 93, p. 502–510, 2008.
- OZTAS, Y. E. et al. Hypocholesterolemia is associated negatively with hemolysate lipid peroxidation in sickle cell anemia patients. **Clin. Exp. Med.**, v. 11, n. 3, p. 195-198, 2011.
- PALADINO, F. S. Úlcers de membros inferiores na anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 288–290, 2007.
- PAULA, P. R. de. et al. Glomerular filtration rate is altered in children with sickle cell disease: a comparison between Hb SS and Hb SC. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 35, n. 5, p. 349 – 351, 2013.
- PEREIRA, S. A. et al. Sickle Cell Disease: quality of life in patients with hemoglobin SS and SC disorders. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 35, n. 5, p. 325-331, 2013.

- PIZZO, E. et al. A retrospective analysis of the cost of hospitalizations for sickle cell disease with crisis in England, 2010/11. **J. Publ. Health (Oxf)**, v. 37, n. 3, p. 529-539, 2015.
- PLATT, O. S. et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, n. 23, p. 1639-1644, 1994.
- PLATT, O. S. et al. Pain in sickle cell disease: rates and risk factors. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, n. 1, p. 11-16, 1991.
- PLATT, O. S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, n. 13, p. 1362-1369, 2008.
- POWARS, D. R. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 5, n. 3, p. 475-493, 1991.
- POWARS, D. R. et al. Chronic renal failure in sickle cell disease: risk factors, clinical course, and mortality. **Ann. Intern. Med.**, v. 115, n. 8, p. 614-620, 1991.
- RAHGOZAR, S. et al.  $\beta$ S gene in Central Iran is in linkage disequilibrium with the Indian-Arabian Haplotype. **Am. J. Hematol.**, v. 65, p. 192-195, 2000.
- RAHIMI, Z. et al. Plasma lipids in Iranians with sickle cell disease: Hypocholesterolemia in sickle cell anemia and increase of HDL-cholesterol in sickle cell trait. **Clin. Chim. Acta**, v. 365, p. 217-220, 2006.
- RAMALHO, A. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. **Soc. Bras. Genet.**, v. 1, n. 2, p. 160, 1986.
- RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; PAIVA-SILVA, R. B. A portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Cad Saúde Públ.**, v. 19, p. 1195-1199, 2003.
- RAPHAEL, J. L. et al. Healthcare utilization and expenditures for low income children with sickle cell disease. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 52, n. 2, p. 263-267, 2009.
- RAPHAEL, R. I. Pathophysiology and treatment of sickle cell disease. **Clin. Adv. Hematol. Oncol.**, v. 3, n. 6, p. 492-505, 2005.
- REES D.C.; WILLIAMS T.N.; GLADWIN M.T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018-2031, 2010.
- REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 156, n. 4, p. 433-445, 2012.



RUMANNEY, M. B. et al. The co-inheritance of alpha-thalassemia and sickle cell anemia is associated with better hematological indices and lower consultations rate in Cameroonian patients and could improve their survival. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e100516, 2014.

SAFAYA, S.; STEINBERG, M. H.; KLINGS, E. S. Monocytes from sickle cell disease patients induce differential pulmonary endothelial gene expression via activation of NF-kappaB signaling pathway. **Mol. Immunol.**, v. 50, n. 1-2, p. 117-123, 2012.

SAIKI, Y. et al. Human EVI9, a homologue of the mouse myeloid leukemia gene, is expressed in the hematopoietic progenitors and down-regulated during myeloid differentiation of HL60 cells. **Genomics**, v. 70, p. 387-391, 2000.

SANKARAN, V. G. et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. **Science**, v. 322, n. 5909, p. 1839-1842, 2008.

SCHAER, D. J. et al. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. **Blood**, v. 121, n. 8, p. 1276-1284, 2013.

SCHNOG, J. B. et al. Sickle cell disease; a general overview. **Neth. J. Med.**, v. 62, n. 10, p. 364-374, 2004.

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

SEIXAS, M. O. et al. Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. **Lipids Health Dis**, v. 9, p. 91, 2010.

SEMPLE, J. W.; ITALIANO, J. E., JR.; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, n. 4, p. 264-724, 2011.

SERJEANT, B. E. et al. Effect of alpha thalassaemia on the rheology of homozygous sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 55, n. 3, p. 479-486, 1983.

SERJEANT, G. R. Screening for sickle cell disease in Brazil. **Lancet**. v. 356, p. 168-169, 2000.

SERJEANT, G.; HAMBLETON, I. Priapism in Homozygous Sickle Cell Disease: A 40-year Study of the Natural History. **West Ind. Med. J.**, v. 64, n. 3, p. 175-180, 2015.

SHOME, D. K. et al. The Effect of Hydroxyurea Therapy in Bahraini Sickle Cell Disease Patients. **Ind. J. Hematol. Blood Transfus.**, v. 32, n. 1, p. 104-109, 2016.

SILVA, D. G. H. et al. Genetic and biochemical markers of hydroxyurea therapeutic response in sickle cell anemia. **BMC Med. Genet.**, v. 14, p. 108, 2013.

SILVA FILHO, I. L. da. Sickle cell disease: acute clinical manifestations in early childhood and molecular characteristics in a group of children in Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 34, n. 3, p. 196-201, 2012.

SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme (Effectiveness and toxicity of hydroxyurea in children with sickle cell anemia) **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 2, p. 144-148, 2006.

SILVA, W. dos. S. et al.  $\beta$ -lobin haplotypes in normal and hemoglobinopathic individuals from Reconcavo Baiano, State of Bahia, Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, v. 33, n. 3, p. 411-417, 2010.

SOLOVEY, A. A. et al. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. **Blood**, v. 97, n. 7, p. 1937-1941, 2001.

SOLOVIEFF, N. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5' olfactory receptor gene cluster. **Blood**, v. 115, n. 9, p. 1815-1822, 2010.

SONATI, M. F.; COSTA, F. F. Talassemias alfa. In: LOPES, A. C. **Tratado de Clínica Médica**. São Paulo: Roca, 2006. p. 1932-1938.

STEINBERG, H. M. Genetic modulation of sickle cell anemia. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 9, p. 1-13, 1995.

STEINBERG, M. H. et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. **JAMA**, v. 289, n. 13, p. 1645-1651, Apr 2 2003.

STEINBERG, M. H. et al. Interaction between HBS-beta-o-thalassemia and alpha-thalassemia. **Am. J. Med. Sci.**, v. 288, n. 5, p. 195-199, 1984.

STEINBERG, M. H. Determinants of fetal hemoglobin response to hydroxyurea. **Semin. Hematol.**, v. 34, n. 3 Suppl 3, p. 8-14, 1997.

STEINBERG, M. H. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. **Blood**. v. 89, p. 1078-1088, 1997.

STEINBERG, M. H. et al. Investigators of the multicenter study of hydroxyurea in sickle cell anemia and MSH patients' follow-up. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: a 17.5 year follow-up. **Am. J. Hematol.**, v. 85, p. 403-408, 2010.

STEINBERG, M. H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **Scient. World J.**, v. 9, p. 46-67, 2009.

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

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

STEINBERG, M. H. Therapies to increase fetal hemoglobin in sickle cell disease. **Curr. Hematol. Rep.**, v. 2, n. 2, p. 95-101, 2003.

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

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364, n. 9442, p. 1343-1360, 2004.

SULTANA, C. et al. Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. **Blood**, v. 92, n. 10, p. 3924-3935, 1998.

SUMMARELL, C. C.; SHEEHAN, V. A. Use of hydroxyurea and phlebotomy in pediatric patients with hemoglobin sickle cell disease. **Exp. Biol. Med.**, Mar 17 2016.

SWERDLOW, P. S. Red cell exchange in sickle cell disease. **Hematology**, p. 48-53, 2006.

TAYLOR, J. G. et al. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. **PLoS One**. v. 3, n. 5, p. e2095, 2008.

THEIN, S. L. et al. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. **Hum. Mol. Genet.**, v. 18, n. R2, p. R216-23, 2009.

THEIN, S. L. et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 27, p. 11346-11351, 2007.

THEIN, S. L.; SAMPIETRO, M.; ROHDE, K. Detection of a major gene for heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin after accounting for genetic modifiers. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 54, n. 2, 1994.

THORNBURG, C. D.; CALATRONI, A.; PANEPINTO, J. A. Differences in health-related quality of life in children with sickle cell disease receiving hydroxyurea. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 33, n. 4, p. 251-254, 2011.

TRAINA, F.; SAAD, S.T.O. Hepatic complications in sickle cell disease. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 299-303, 2007.

TURHAN, A. et al. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, n. 5, p. 3047-3051, 2002.

UDA, M. et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 5, p. 1620-1625, 2008.

VAN LENTEN, B. J. et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. **J. Clin. Investig.**, v. 96, n. 6, p. 2758-2767, 1995.

VERGER. Flux et Reflux de la Traite des Nègres Entre le Golfe de Benin et Bahia de Todos os Santos. **Mouton Press, Paris, France**, 1968.

VILAS BOAS, W. et al. Citocinas e associação com eventos clínicos na anemia falciforme cytokines and clinical events in the sickle cell anemia. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 80, n. 3, p. 53-55, 2010.

VILLAGRA, J. et al. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. **Blood**, v. 110, n. 6, p. 2166-2172, 2007.

WAHLBERG, K. et al. The HBS1L-MYB intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. **Blood**, v. 114, n. 6, p. 1254-1262, 2009.

WAINSCOAT, J. S. et al. Multiple origins of the sickle mutation: evidence from beta S globin gene cluster polymorphisms. **Mol. Biol. Med.**, v. 1, n. 2, p. 191-197, 1983.

WALTERS, M. C. Update of hematopoietic cell transplantation for sickle cell disease. **Curr. Op. Hematol.**, v. 22, n. 3, p. 227-233, 2015.

WANG, C.W.; LUKENS J.N. Sickle cell anemia and other sickling syndromes. In: LEE, G.R. et al. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10th. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. cap. 51, p. 1346-1404.

WANG, W. C. et al. A two-year pilot trial of hydroxyurea in very young children with sickle-cell anemia. **J. Pediatr.**, v. 139, n. 6, p. 790-796, 2001.

WANG, X. et al. Heme-bound iron activates placenta growth factor in erythroid cells via erythroid Kruppel-like factor. **Blood**, v. 124, n. 6, p. 946-954, 2014.

WARE, R. E. et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of

hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 118, p. 4985–4891, 2011.

WEATHERALL, D. J. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. **Curr. Mol. Med.**, v. 8, n. 7, p. 592-599, 2008.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bull. World Health Org.**, v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.

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

WONG, T. E. et al. Update on the use of hydroxyurea therapy in sickle cell disease. **Blood**, v. 124, p. 3850–3857, 2014.

WONKAM, A. et al. Association of variants at BCL11A and HBS1L-MYB with hemoglobin F and hospitalization rates among sickle cell patients in Cameroon. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92506, 2014.

WOOD, K. C.; HEBBEL, R. P.; GRANGER, D. N. Endothelial cell P-selectin mediates a proinflammatory and prothrombotic phenotype in cerebral venules of sickle cell transgenic mice. **Am. J. Physiol. Heart Cir. Physiol.**, v. 286, n. 5, p. H1608-1614, 2004.

WUN, T. et al. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 129, n. 5, p. 507-516, 1997.

WUN, T. The Role of Inflammation and Leukocytes in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease; Haemoglobinopathy. **Hematology**, v. 5, n. 5, p. 403-412, 2001.

YARBRO, J. W. Mechanism of action of hydroxyurea. **Semin. Oncol.**, v. 19, n. 3 Suppl 9, p. 1-10, 1992.

ZAGO, M. A.; FIGUEIREDO, M. S.; OGO, S. H. Bantu beta S cluster haplotype predominant among Brazilian blacks. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v. 88, p. 295-298, 1992.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

ZARBOCK, A.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. K.; LEY, K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. **Blood Rev.**, v. 21, n. 2, p. 99-111, 2007.

ZHANG, D. et al. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 801-809, 2016.

ZIMMERMAN, S. A. et al. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2039-2045, 2004.

**APÊNDICE A: Produções científicas durante o período de doutorado que não fizeram parte da tese.**

**Carta aberta submetida:**

Bruno Antônio Veloso Cerqueira, Milena Magalhães Aleluia, Caroline Conceição da Guarda, Teresa Cristina Cardoso Fonseca, Fábila Idalina Neves, Regiana Souza Quinto, Felipe A. Pimenta, Luiz Carlos Júnior Alcantara, Dalila L. Zanette e Marilda de Souza Gonçalves. **The dangerous association between dengue fever and sickle cell disease: a warning to the medical and scientific community.** Journal: *Journal of Medical Virology*, 2016.

**Artigo original submetido:**

Sètondji Cocou Modeste Alexandre Yahouédéhou, Magda Seixas Carvalho, Rodrigo Mota Oliveira, Rayra Pereira Santiago, Suellen Pinheiro Carvalho, Júnia Raquel Dutra Ferreira, Milena Magalhães Aleluia, Elisângela Vitória Adorno and Marilda de Souza Gonçalves. **Influence of *CYP2E1* -1293G>C/-1053C>T, *NQO1* 609C>T, *MPO* -463G>A and *GSTT1/GSTMI*-null polymorphisms on laboratory parameters in sickle cell anemia patients in use of Hydroxyurea.** *American Journal of Hematology*, 2016.



**The dangerous association between dengue fever and sickle cell disease: a warning to the medical and scientific community**

Journal:	<i>Journal of Medical Virology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Cerqueira, Bruno; Universidade do Estado da Bahia, Ciências da Vida Alaluia, Milena; FIOCRUZ, Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional da Guarda, Caroline; FIOCRUZ, Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional Fonseca, Teresa ; Centro de Referência em Anemia Falciforme Neves, Fábila ; Centro de Referência em Anemia Falciforme Quinto, Regiana ; Centro de Referência em Anemia Falciforme Pimenta, Felipe; Universidade Estadual de Santa Cruz, Ciências Biológicas Alcantara, Luiz Carlos; Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Gonçalo Moniz Research Center (CPqGM) Zanette, Dalila; FIOCRUZ, Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional Gonçalves, Marilda; FIOCRUZ, Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional
Keywords:	Dengue virus < Virus classification, Inflammation < Immune responses, Flavivirus < Virus classification

SCHOLARONE™  
Manuscripts

John Wiley & Sons



American Journal of Hematology



American Journal of Hematology

**Sickle cell anemia patients in use of Hydroxyurea: influence of genetic variants in genes of metabolizing drug enzyme on laboratory parameters**

Journal:	<i>American Journal of Hematology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Yahouédéhou, Sètonджи; Centro de Pesquisas Goncalo Moniz Carvalho, Maqda; Centro de Pesquisas Goncalo Moniz Oliveira, Rodrigo ; Centro de Pesquisas Goncalo Moniz Santiago, Rayra ; Centro de Pesquisas Goncalo Moniz Carvalho, Suellen ; Faculdade de Farmácia - UFBA Ferreira, Júnia ; Centro de Pesquisas Goncalo Moniz Aleluia, Milena ; Centro de Pesquisas Goncalo Moniz Adorno, Elisângela ; Faculdade de Farmácia-UFBA Goncalves, Marilda; Fiocruz/CPqGM, ; UFBA/FF, Toxicology and Clinical Analyses
Keywords:	Sickle cell anemia, Hydroxyurea, Genetic polymorphisms, Drug metabolizing enzymes

SCHOLARONE™  
Manuscripts

John Wiley & Sons

## **APÊNDICE B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Responsável Legal do Paciente**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEL LEGAL DE MENOR DE 18 ANOS**

Você está sendo convidado a permitir com a participação do menor \_\_\_\_\_, em pesquisas realizadas no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ - BA, cujo título a seguir, uma vez que oficialmente é o seu representante legal.

#### **“Caracterização Molecular e Análise Fenotípica dos Marcadores de Prognóstico em Portadores de Doença Falciforme na Região Sul da Bahia”.**

A doença falciforme é uma doença genética bastante conhecida da população da Região Sul da Bahia, sendo que a pessoa com esta doença tem crise de dor, devido ao entupimento das veias pelas células vermelhas que possuem o formato de foice ou meia-lua, podendo também ter infecções e alterações clínicas nos olhos, rins, coração, pulmão e cérebro.

Nessa pesquisa serão investigadas pessoas com doença falciforme, alteração que muda a forma das células vermelhas que ficam duras, facilitando o entupimento de veias e, juntamente com as células brancas participam das crises de dor e, podem contribuir para a ocorrência de derrame, problemas no coração, nos olhos, nervos e pulmões. Por isso, é importante realizar estudos que possam ajudar a entender melhor esta doença e também ajudar para a criação de um novo tipo de tratamento. O sangue coletado será destinado ao estudo das células e algumas substâncias que ajudam na caracterização da doença falciforme, além das respostas fornecidas ao questionário, no qual o menor será submetido, que fornecerão bases para melhor prognóstico dos pacientes. Os resultados obtidos nesta pesquisa poderão posteriormente servir para planejamentos futuros na fabricação de remédios novos e desenvolvimento de tratamentos.

A participação do menor é totalmente voluntária e a sua permissão para que o menor participe do estudo pode ser retirada a qualquer momento, não resultando em nenhum problema.

**O objetivo deste trabalho é identificar e analisar marcadores de prognóstico, descrevendo os principais mecanismos envolvidos, pela caracterização dos pacientes com doença falciforme (SS e SC) na região Sul da Bahia.**

Os registros da participação do menor no estudo serão mantidos em absoluto segredo, sendo do conhecimento apenas da equipe participante do projeto e do médico que o acompanha. As amostras coletadas serão identificadas por código, bem como os dados individuais dos exames e testes, que serão do conhecimento somente dos pesquisadores envolvidos na pesquisa. Desta forma, a sua identidade será mantida em segredo e nenhum outro grupo terá acesso às

informações coletadas, tais como seguradoras, empregadores ou superiores, de acordo com a resolução CNS 340/2004, item V.1.e.

A permissão para que o menor participe deste estudo não implicará na retirada de sangue adicional, de modo que será utilizada uma quantidade da mesma amostra coletada para a realização dos exames solicitados pelo médico. Também consultamos se você quiser, concordar que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em estudos no futuro, desde que estes estudos adicionais sejam analisados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções vigentes do Conselho Nacional de Saúde. Informo que é opcional ao participante autorizar a manutenção de sua amostra para estudos futuros, ficando garantido ter conhecimento do uso específico, no qual, o estudo futuro poderá fazer uso da amostra.

Eu \_\_\_\_\_ concordo na manutenção da amostra para utilização em estudos futuros, conforme explicitado acima.

Comunicamos que serão coletados 10 mL de sangue no braço com materiais novos, estéreis e descartáveis, por Milena Magalhães Aleluia, profissional habilitada e especializada. As amostras para análise serão retiradas das mesmas amostras coletadas, sem a necessidade de outras coletas.

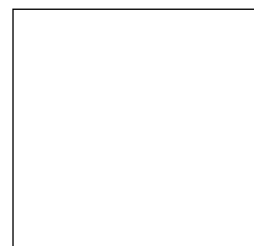
Neste estudo o menor é peça importante para o entendimento e compreensão desta doença. Sua participação no estudo não trará benefícios neste momento, mas possibilitará a coleta de dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento de indivíduos que apresentam a doença e na criação de medidas na saúde que visem melhoria.

Caso tenha alguma dúvida você pode perguntar à Milena Magalhães Aleluia, responsável pela pesquisa ou à Dra. Tereza Cardoso, médica responsável pelo Centro de Referência de Anemia Falciforme de Itabuna (CERDOFI).

Assinatura do responsável \_\_\_\_\_

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

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



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

Endereço \_\_\_\_\_

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

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

Nome Testemunha

2 \_\_\_\_\_

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

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

**CEP/ CpqGM/FIOCRUZ** - Comitê de Ética em Pesquisa – Centro de Pesquisa Professor Gonçalo Moniz/FIOCRUZ – Tel:71 31762327, e-mail:cep@bahia.fiocruz.br

**Dra. Marilda de Souza Gonçalves** – Coordenadora do projeto –Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ  
Tel: 71-3176-2226

**Dra. Teresa Cristina Cardoso Fonseca** - Médica – Centro de Referência em Doenças Falciformes de Itabuna  
Tel: 73-32148218

**Dr. Bruno Cerqueira**- Centro de Biologia e Biotecnologia (CBG) e Laboratório de Farmacogenômica e Epidemiologia Molecular (LAFEM) da Universidade Estadual de Santa Cruz.

**Milena Magalhães Aleluia** – Biomédica responsável pelo desenvolvimento do projeto noCPqGM – FIOCRUZ e na FAC-FAR-UFBA. Tel : 3176-2226 e no Laboratório LAFEM – UESC, tel: 88674995/99642309–

## **APÊNDICE C: Termo de Assentimento Informado**

### **TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO PARA MENOR DE 18 ANOS**

O assentimento informado para a criança/adolescente não substitui a necessidade de consentimento informado dos pais ou guardiães. O assentimento assinado pela criança demonstra a sua cooperação na pesquisa.

#### **Assentimento informado para \_\_\_\_\_**

Este formulário de assentimento informado é para crianças/adolescentes entre as idades de 12 a 17 anos que comparecerão ao Centro de Anemia Falciforme de Itabuna e que estamos convidando a participar da pesquisa: “**Caracterização Molecular e Análise Fenotípica de Marcadores de Prognóstico em Indivíduos com Doença Falciforme da Região Sul da Bahia**”.

#### **Introdução**

Meu nome é Milena Magalhães Aleluia e o meu trabalho consiste em estudar pessoas com doença falciforme. Esta doença acontece por uma mudança na forma das células vermelhas que ficam endurecidas, ocorrendo entupimento de veias que participam junto com as células vermelhas das crises de dor, podendo contribuir com a ocorrência de problemas no coração, nos olhos, nervos e pulmões. É importante realizar estudos que possam ajudar a entender melhor esta doença e também colaborar para a descoberta de um novo tratamento. Os resultados obtidos nesta pesquisa darão conhecimentos que poderão ser usados na pesquisa de novas formas de tratamento. Pode haver algumas palavras que não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais detalhadamente porque você ficou mais interessado ou preocupado. Por favor, peça que pare a qualquer momento e eu explicarei.

#### **Objetivos**

Identificar e analisar possíveis situações que ajudem no tratamento antes que o sintoma apareça, dizendo as principais formas envolvidas, pela caracterização dos indivíduos com doença falciforme (SS e SC) na região Sul da Bahia.

#### **Escolha dos participantes**

Estamos realizando esta pesquisa com você para entender sobre situações que podem acontecer com esta doença. Por isso precisamos avaliar tudo da doença falciforme desde o seu início, que compreende em crianças/adolescentes que são da sua idade, entre 12 e 17 anos de idade, visto que os sintomas provavelmente acabaram de surgir ou ainda não apareceram e, achamos que sua participação nesta pesquisa pode nos ajudar a esclarecer melhor isso.

#### **Voluntariedade de Participação**

Você não precisa participar desta pesquisa se não quiser. É você quem decide. Se decidir não participar da pesquisa, é seu direito e nada mudará no seu tratamento de saúde. Mesmo assim,

este serviço de saúde estará disponível para você. Até mesmo se disser "sim" agora, poderá mudar de ideia depois, sem nenhum problema.

**Procedimentos**

Serão coletados 2 colheres de sopa de sangue no braço com materiais novos, limpos e seguros, por pessoal treinado. As amostras para análise mais completa serão retiradas das mesmas amostras coletadas, sem a necessidade de novas coletas. Você pode me pedir que eu explique a qualquer momento mais informações sobre como será a coleta. Vou fazer umas perguntas sobre o que você sente e a doença e tudo o que me disser vou anotar no seu questionário e depois vou colocar no computador, mas não preocupe que tudo ficará em segredo.

**Riscos**

Quanto há possíveis riscos, a equipe de pesquisa minimizará, uma vez que as amostras serão coletadas para as análises de rotina e por pessoal treinado, sem a ocorrência de danos aos pacientes, utilizando-se tubos novos para coleta de sangue. Você terá direito aos resultados dos exames realizados com o sangue que foi colhido.

**Desconfortos**

Há algumas outras coisas que eu gostaria que você soubesse. A coleta de sangue poderá doer por alguns segundos, devido a picada da agulha, mas logo depois de ter sido colhido o sangue no seu braço, você não sentirá nenhuma dor. Se sentir mais alguma coisa, fale sobre isso com seus pais ou comigo. Eu conferi se a criança/adolescente entendeu os riscos e desconfortos da pesquisa:

\_\_\_ SIM \_\_\_ NÃO.

**Benefícios**

Neste estudo você é peça importante para o entendimento e compreensão desta doença. Sua participação no estudo não trará benefícios neste momento, mas possibilitará a coleta de dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento de indivíduos que apresentam a doença e na criação de medidas na saúde que visem melhoria.

**Confidencialidade**

Não falaremos para outras pessoas que você está nesta pesquisa e também não vamos dar informação sobre você para qualquer um que não trabalha na pesquisa. Depois que a pesquisa acabar, os resultados serão informados para você e para seus pais. As informações sobre você serão coletadas na pesquisa e ninguém, exceto os investigadores poderão ter acesso a elas. Qualquer informação sobre você terá um número ao invés de seu nome. Só os investigadores saberão qual é o seu número e manteremos em sigilo (segredo). Ela só será compartilhada com quem tem permissão de acesso à informação, tais como: pesquisadores e o seu médico.

**Direito de recusa ou retirada do assentimento informado**

Você não tem que estar nesta pesquisa. Ninguém estará furioso ou desapontado com você se você disser não, a escolha é sua. Você pode pensar nisto e falar depois se você quiser. Você pode dizer "sim" agora e mudar de ideia depois, tudo continuará bem.

## Contato

Você pode me perguntar agora ou depois fazer as perguntas para a médica, Dra. Teresa Cristina. Eu escrevi um número de telefone e endereço onde você pode nos localizar ou, se você estiver por perto, você poderá vir e nos ver. Se você quiser falar com outra pessoa tal como o seu professor ou doutor ou tia, não tem problema.

**CEP/ CpqGM/FIOCRUZ - Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – Centro de Pesquisa Professor Gonçalo Moniz/FIOCRUZ – Tel:71 31762327, e-mail:cep@bahia.fiocruz.br**

**Dra. Marilda de Souza Gonçalves** – Coordenadora do projeto –Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ  
Tel: 71-3176-2226

**Dra. Teresa Cristina Cardoso Fonseca** - Médica – Centro de Referência em Doenças Falciformes de Itabuna  
Tel: 73-32148218

**Dr. Bruno Cerqueira**- Centro de Biologia e Biotecnologia (CBG) e Laboratório de Farmacogenômica e Epidemiologia Molecular (LAFEM) da Universidade Estadual de Santa Cruz.

**Milena Magalhães Aleluia** – Biomédica responsável pelo desenvolvimento do projeto no CPqGM – FIOCRUZ e na FAC-FAR-UFBA. Tel : 3176-2226 e no Laboratório LAFEM – UESC, tel: 73 88674995/73 99642309/71 91925104

## Certificado do Assentimento

Eu entendi que a pesquisa é sobre marcadores de prognóstico para doença falciforme e que através da minha participação eu poderei contribuir para um melhor prognóstico desta doença. Eu entendi que eu darei uma amostra de sangue através de uma picada no braço para realização dos testes.

Assinatura da criança/adolescente: \_\_\_\_\_

Ass. Pesquisador: \_\_\_\_\_

Dia/mês/ano: \_\_\_\_\_

## **APÊNDICE D: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Paciente**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA VOLUNTÁRIOS COM 18 ANOS OU MAIS ANOS COMPLETOS**

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa realizado no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ - BA, cujo título está especificado a seguir:

#### **“Caracterização Molecular e Análise Fenotípica dos Marcadores de Prognóstico em Portadores de Doença Falciforme na Região Sul da Bahia”.**

A doença falciforme é uma doença genética bastante conhecida da população da Região Sul da Bahia, sendo que a pessoa com esta doença tem crise de dor, devido ao entupimento das veias pelas células vermelhas que possuem o formato de foice ou meia-lua, podendo também ter infecções e alterações clínicas nos olhos, rins, coração, pulmão e cérebro.

Nessa pesquisa serão investigadas pessoas com doença falciforme, alteração que muda a forma das células vermelhas que ficam duras, facilitando o entupimento de veias e, juntamente com as células brancas participam das crises de dor e, podem contribuir para a ocorrência de derrame, problemas no coração, nos olhos, nervos e pulmões. Por isso, é importante realizar estudos que possam ajudar a entender melhor esta doença e também ajudar para a criação de um novo tipo de tratamento. O sangue coletado será destinado ao estudo das células e algumas substâncias que ajudam na caracterização da doença falciforme, além das respostas fornecidas ao questionário, no qual você será submetido, que fornecerão bases para melhor prognóstico dos pacientes. Os resultados obtidos nesta pesquisa poderão posteriormente servir para planejamentos futuros na fabricação de remédios novos e desenvolvimento de tratamentos.

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

**O objetivo deste trabalho é identificar e analisar marcadores de prognóstico, descrevendo os principais mecanismos envolvidos, pela caracterização dos pacientes com doença falciforme (SS e SC) na região Sul da Bahia.**

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

A permissão para que você participe deste estudo não implicará na retirada de sangue adicional, de modo que será utilizada uma quantidade da mesma amostra coletada para a



realização dos exames solicitados pelo médico. Também desejamos que você concorde que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em estudos no futuro, desde que estes estudos adicionais sejam analisados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções vigentes do Conselho Nacional de Saúde. Informo que é opcional ao participante autorizar a manutenção de sua amostra para estudos futuros, ficando garantido ter conhecimento do uso específico, no qual, o estudo futuro poderá fazer uso da amostra.

Eu \_\_\_\_\_ concordo na manutenção da amostra para utilização em estudos futuros, conforme explicitado acima.

Comunicamos que serão coletados 10 mL de sangue no braço com materiais novos, estéreis e descartáveis, por Milena Magalhães Aleluia, profissional habilitada e especializada. As amostras para análise molecular serão retiradas das mesmas amostras coletadas, sem a necessidade de outras coletas.

Neste estudo você é peça importante para o entendimento e compreensão desta doença. Sua participação no estudo não trará benefícios neste momento, mas possibilitará a coleta de dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento de indivíduos que apresentam a doença e na criação de medidas na saúde que visem melhoria.

Caso tenha alguma dúvida você pode perguntar à Milena Magalhães Aleluia, responsável pela pesquisa ou à Dra. Tereza Cardoso, médica responsável pelo Centro de Referência de Anemia Falciforme de Itabuna (CERDOFI).

Assinatura do voluntário \_\_\_\_\_

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

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



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

Endereço \_\_\_\_\_

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

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

Nome Testemunha

2 \_\_\_\_\_

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

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

**CEP/ CpqGM/FIOCRUZ** - Comitê de Ética em Pesquisa – Centro de Pesquisa Professor Gonçalo Moniz/FIOCRUZ – Tel:71 3176-2327, e-mail:cep@bahia.fiocruz.br

**Dra. Marilda de Souza Gonçalves** – Coordenadora do projeto –Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ  
Tel: 71-3176-2226

**Dra. Teresa Cristina Cardoso Fonseca** - Médica – Centro de Referência em Doenças Falciformes de Itabuna  
Tel: 73-32148218

**Dr. Bruno Cerqueira**- Centro de Biologia e Biotecnologia (CBG) e Laboratório de Farmacogenômica e Epidemiologia Molecular (LAFEM) da Universidade Estadual de Santa Cruz.

**Milena Magalhães Aleluia** – Biomédica responsável pelo desenvolvimento do projeto no CPqGM – FIOCRUZ e na FAC-FAR-UFBA. Tel : 3176-2226 e no Laboratório LAFEM – UESC, tel: 88674995/99642309–

## APÊNDICE E: Questionário Epidemiológico para Paciente ou Responsável Legal



**Caracterização Molecular e Análise Fenotípica de Marcadores de Prognóstico em Portadores de Doença Falciforme na Região Sul da Bahia**



### QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES OU RESPONSÁVEIS

Nome: \_\_\_\_\_ Sigla: \_\_\_\_\_ Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Registro: \_\_\_\_\_ Nº Pront. CERDOFI: \_\_\_\_\_ Data de Nasc.: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Gênero: ( ) Masculino [0] ( ) Feminino [1]

01. Qual a sua cor? ( ) Branca[0] ( ) Negra[1] ( ) Parda[2] ( ) Amarela[3]

02. Você estuda? ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

03. Nível de escolaridade: ( ) Analfb/FM1. Incomp.[0] ( ) fm1.c/fm 2.i[1] ( ) FM2.Comp/ M.Incomp[2] ( ) M.Comp/S .Incomp[3] ( ) S.Comp [4]

04. Número de irmãos: ( ) 0 [0] ( ) 1 [1] ( ) 2 [2] ( ) 3 [3] ( ) 4 ou + [4]

05. Familiares com DF? ( ) Nenhum[0] ( ) Pai [1] ( ) Mãe [2] ( ) Irmão [3]

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

07. Já esteve internado? ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

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

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

08. Já teve pneumonia? ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

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

Se SIM, teve febre? ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

09. Teve ou tem esplenomegalia? ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Em que período? ( ) <6m[0] ( ) 6m-1ano [1] ( ) 2-3a [2] ( ) 4-5a [3] ( ) >6a [4]

Teve crise de seqüestro esplênico? ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Se SIM, quantas vezes? \_\_\_\_\_

10. Faz uso profilático de Penicilina? ( ) NÃO[0] ( ) SIM [1]

Se SIM, qual? ( ) Penicilina V oral [0] ( ) Penicilina benzatina [1]

Se Sim, há quanto tempo? ( ) até 1 ano [0] ( ) + de 1 ano a 3 anos [1] ( ) + 3 anos a 5 anos [2] ( ) + 5 anos a 7 anos [3] ( ) + de 7 anos [4]

11. Já teve AVC? ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

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

Se SIM, seqüelas do AVC? ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

12. Espectomizado? ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Esplenectomia: ( ) Total [0] ( ) Parcial [1]

13. Apresenta asma? ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Se SIM, quantas crises nos últimos 06 meses? ( ) 0[0] ( ) 1-3[1] ( ) 4-7[2] ( ) 8ou+[3]

Faz uso regular de nebulização? ( ) [0] NÃO ( ) SIM [1]

14. Tem crises de dor?  [0] NÃO  SIM [1]  
 Se SIM, quantas crises nos últimos 06 meses?  0[0]  1-3[1]  4-7[2]  8ou+[3]  
 Quando foi a última crise?  <1mês [0]  1-3m [1]  4m ou+[2]  
 Usa medicação para a dor?  NÃO [0]  SIM [1]  
 Prescrita por um médico?  NÃO [0]  SIM [1]  
 Assistido por especialista em dor?  NÃO [0]  SIM [1]  
 Faz tratamento com hidroxiúria?  NÃO [0]  SIM [1]
15. Faz uso de alguma medicação?  NÃO [0]  SIM [1]  
 Se SIM, qual?  
 Com que frequência?  Diário [0]  Dias alternados[1]  Semanal[2]  
 Quinzenal[3]  Mensal [4]  Bimestral[5]  Semestral [6]
16. Infecções:  NÃO[0]  SIM [1]  
 Quais?  Rinite [0]  Sinusite [1]  Otite [2]  
 Faringite [3]  Amigdalite [4]  Outros [5]  
 Fez uso de alguma medicação?  SIM [0]  NÃO [1]
17. Priapismo:  NÃO [0]  SIM [1]  
 Nº de vezes:  Até 4 [0]  05-09 [1]  10 ou +[2]  
 Fez uso de alguma medicação?  NÃO [0]  SIM [1]
18. Úlcera maleolar:  NÃO [0]  SIM [1] Quantas vezes? \_\_\_\_\_  
 Idade da primeira úlcera:  Até 4 anos [0]  5-9 [1]  10 ou + [2]  
 Tratou a úlcera?  NÃO [0]  SIM [1]  
 Qual tratamento? \_\_\_\_\_  
 Meningo [2]  Haemophilus [3]
19. Vaso-Oclusão:  NÃO [0]  SIM [1] Quantas vezes? \_\_\_\_  
 20. Retinopatia:  NÃO [0]  SIM [1]  
 21. Alterações ósseas:  NÃO [0]  SIM [1]
22. Alterações cardíacas:  NÃO [0]  SIM [1]  
 NÃO [0]  SIM [1]
23. Litíase biliar:  NÃO [0]  SIM [1]  
 Cirurgia:  NÃO [0]  SIM [1]
24. Faz uso de hemoderivados?  NÃO [0]  SIM [1]  
 Se SIM, quantas vezes ao ano? \_\_\_\_\_
25. Possui outra patologia?  NÃO [0]  SIM [1]  
 Quais?  Hipertensão [0]  Diabetes [1]  Obesidade [2]  Outras [3]