

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-graduação em Genética

BETÂNIA LUCENA DOMINGUES HATZLHOFFER

**INFLUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS β^S E DA ALFA TALASSEMIA NO PERFIL
CLÍNICO DA ANEMIA FALCIFORME EM PERNAMBUCO, BRASIL**

Recife
2017

BETÂNIA LUCENA DOMINGUES HATZLHOFFER

**INFLUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS β^S E DA ALFA TALASSEMIA NO PERFIL
CLÍNICO DA ANEMIA FALCIFORME EM PERNAMBUCO, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo

Recife
2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Haltzhofer, Betânia Lucena Domingues
Influência dos haplótipos β s e da alfa talassemia no perfil clínico da anemia falciforme em Pernambuco, Brasil. / Recife: O Autor, 2017.

107 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Antonio Roberto Lucena de Araújo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Genética, 2017.

Inclui referências, apêndice e anexos

- 1. Anemia falciforme 2. Polimorfismo (genética) 3. Talassemia I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (orient.) II. Araújo, Antonio Roberto Lucena de (coorient.) III. Título**

616.1527

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 486

BETÂNIA LUCENA DOMINGUES HATZLHOFFER

**INFLUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS β^S E DA ALFA TALASSEMIA NO PERFIL
CLÍNICO DA ANEMIA FALCIFORME EM PERNAMBUCO, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Genética.

Aprovada em: 20/09/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra/UFPE

Dr. Aderson da Silva Araújo/HEMOPE

Dra. Paula Loureiro/UPE

Dra. Neide Santos/UFPE

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos/FIOCRUZ

Ao meu querido filho Igor,
fonte de inspiração do meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda benção que recebi na vida. Por sempre me indicar o melhor caminho a seguir e por ter colocado pessoas que são verdadeiros anjos em minha vida.

Aos meus pais, Alberto e Laurene, pelo incentivo, pelo cuidado e dedicação, e por me ensinarem, dentre tantas lições, o quanto é importante a educação. A minha irmã Bianca, por estar sempre ao meu lado nessa jornada, por ser a melhor conselheira e melhor amiga. A Júlia e a Roberto, que são como pais, obrigada pelo apoio e pelas orações. A toda a minha família, sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu querido marido, Caio, meu porto seguro. Meu amor, amigo e companheiro, obrigada por toda a paciência nessa jornada, pela boa vontade em me ajudar dia e noite, por tudo o que faz por mim e por Igor, todos os dias. Obrigada por me aguentar nos momentos difíceis e todos os momentos de alegria proporcionados. Minhas conquistas também são suas.

Ao meu orientador Dr. Marcos André, pela contribuição na minha carreira científica, pelo carinho, paciência e grande confiança que sempre demonstrou. Ao meu coorientador Dr. Antonio Roberto pelos conselhos e disponibilidade em contribuir com este trabalho. Aos amigos do NHCL, em especial a Diego Martins, Igor, Diego Falcão, Rayssa, Luana, Isabela, Jéssica, Mariana e Aleide pela ajuda neste trabalho, pelo convívio, momentos de descontração e por todas as experiências trocadas.

A UFPE e ao PPGG, meus sinceros agradecimentos aos funcionários, professores e coordenadores pelo convívio, conhecimento e espaço cedido. Ao HEMOPE e toda a sua equipe, por estarem sempre disponíveis em ajudar durante o desenvolver dos nossos trabalhos, em especial as amigas da UNILABE. A Dr. Aderson por todo conhecimento compartilhado e contribuições neste estudo e em tantos outros. A todos os pacientes que concordaram em participar neste trabalho.

Aos meus queridos amigos e amigas que estiveram comigo durante toda a minha jornada acadêmica, desde a graduação, compartilhando as dificuldades e alegrias.

“Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança, a sua melhor amiga; da experiência, o seu sábio conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança, o seu anjo guardião.”

Joseph Addison

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença monogênica caracterizada por um fenótipo variável, com complicações clínicas graves e grande heterogeneidade clínica. Evidências mostram que fatores genéticos podem estar envolvidos como moduladores desta doença. A coexistência com a alfa talassemia e os haplótipos do *cluster* β^S são considerados os principais determinantes na expressão dos múltiplos fenótipos da AF, no entanto a real influência desses marcadores ainda é uma questão controversa. O estudo teve como objetivo, avaliar a influência da alfa talassemia e dos haplótipos β^S nas manifestações clínicas da AF em 714 pacientes provenientes do Estado de Pernambuco. Diversas variáveis clínicas, como crises vaso-oclusiva, colelitíase, síndrome torácica aguda, úlcera de perna, osteonecrose, acidente vascular cerebral (AVC) e priapismo foram investigadas. A deleção $-\alpha^{3.7}$ da alfa talassemia e os haplótipos do *cluster* β^S foram genotipados por gap-PCR e PCR-RFLP, respectivamente. O haplótipo Bantu esteve presente na maioria dos pacientes (92,4%), com uma alta frequência alélica (74,3%) e genotípica (56,5%). A análise comparativa dos haplótipos não mostrou associação com nenhuma das manifestações clínicas estudadas. A alfa talassemia esteve presente em 23,7% dos pacientes e foi associada a um menor risco para o desenvolvimento das manifestações clínicas hemolíticas: AVC, priapismo e colelitíase. A alfa talassemia não foi associada com úlcera de perna, complicações vaso-oclusivas e sobrevida global dos pacientes. Nossos resultados mostram que a alfa talassemia é um modulador fenotípico para a maioria das manifestações clínicas hemolíticas da AF e os haplótipos β^S não estão associados à heterogeneidade clínica da doença no Estado de Pernambuco.

Palavras-chave: Anemia falciforme. Talassemia alfa. Polimorfismo. Fenótipo.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a monogenic disease characterized by a variable phenotype, with severe clinical complications and significant clinical heterogeneity. Evidences show that genetic factors may be involved in the disease modulation. Alpha thalassemia coexistence and β^S cluster haplotype are considered the main determinants of SCA phenotypes, however the real role of these markers is still controversial. The aim of this study was to evaluate the influence of alpha thalassemia and β^S haplotypes on SCA clinical manifestations in 714 patients from Pernambuco state. Several clinical variables, such as vaso-occlusive crisis, cholelithiasis, acute chest syndrome, leg ulcers, osteonecrosis, stroke and priapism were investigated. The $-\alpha^{3.7}$ deletion of alpha-thalassemia and β^S -globin cluster haplotype were genotyped by PCR-RFLP and gap-PCR respectively. The Bantu haplotype was present in most patients (92.4%) with a high allele (74.3%) and genotypic (56.5%) frequency. The comparative analysis of haplotypes was not associated with any studied clinical manifestations. Alpha thalassemia was present in 23.8% of patients and it was related to a protective effect on the development of hemolytic clinical manifestations, such as stroke, cholelithiasis and priapism. Alpha thalassemia was not associated with leg ulcers, vaso-occlusive complications and overall survival. Our results indicate that alpha thalassemia is a phenotypic modulator for most hemolytic clinical manifestations of SCA. In addition, β^S haplotypes are not associated with clinical heterogeneity of the disease in Pernambuco state.

Key-words: Sickle cell anemia. Alpha thalassemia. Polymorphism. Phenotype.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição Geográfica do Traço e da Anemia Falciforme no Brasil.	15
Figura 2 - O processo de vaso-oclusão induzido pela forma alterada e rígida do eritrócito devido a polimerização da HbS.	17
Figura 3 - <i>Cluster</i> β mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S	27
Figura 4 - Padrões de distribuição dos haplótipos β^S na África e sua herança no Brasil.	28
Figura 5 - Representação do pareamento anormal com <i>crossing-over</i> desigual que ocorre entre os seguimentos homólogos Z do grupamento do gene α e resulta em cromossomos com $-\alpha_2^{3.7}$ e $\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$	31
Figura 6 - Modelo de sobreposição de subfenótipos da doença falciforme. Pacientes com anemia falciforme e níveis elevados de hemoglobina apresentam uma maior frequência de complicações vaso-oclusiva. Em contraste, um conjunto distinto de complicações envolvendo hemólise com disfunção endotelial está associado a baixos níveis de hemoglobina. O espectro de prevalência e gravidade de cada um destes subfenótipos se sobrepõe. A presença de alfa talassemia tende a diminuir a incidência de eventos hemolíticos e aumentar eventos vaso-oclusivos.	32
Figura 7 - Reação de gap-PCR para a deleção $-\alpha^{3.7Kb}$	41
Figura 8 - Probabilidade de surgimento do Acidente Vascular Cerebral em pacientes com anemia falciforme, de acordo com a mutação $\alpha^{3.7kb}$	46
Figura 9 - Impacto da alfa talassemia (mutação $\alpha^{3.7kb}$) no tempo de desenvolvimento da Colelitíase e Priapismo em portadores de anemia falciforme.....	47
Figura 10 – Curva de sobrevida global para pacientes portadores de alfa talassemia	48
Quadro 1 - Complicações clínicas da doença falciforme.....	18
Quadro 2 - Resumo dos estudos realizados no Brasil com frequências dos haplótipos β^S Bantu e Benin.....	30
Quadro 3 - Critérios de inclusão e diferentes manifestações clínicas apresentadas nos pacientes portadores de Anemia Falciforme.	36
Quadro 4 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação de regiões do <i>cluster</i> β e localização referente ao <i>cluster</i> β no cromossomo 11 depositados no banco de dados NCBI (ID: U01317).....	38

Quadro 5 - Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina β	39
Quadro 6 - Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina β	39
Quadro 7 - Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.....	40
Quadro 8 - Sequências dos <i>primers</i> para pesquisa da deleção $\alpha^{3,7Kb}$. Localização referente ao gene α no cromossomo 16 depositados no banco de dados NCBI (ID: J00153).	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínico-laboratoriais de pacientes com anemia falciforme	43
Tabela 2 - Frequência da alfa talassemia (deleção $\alpha_2^{3.7 \text{ kb}}$) e dos haplótipos β^S em portadores de anemia falciforme.....	44
Tabela 3 - Análise da deleção $\alpha^{3.7\text{kb}}$ e dos Haplótipos β^S de acordo com a ocorrência de diferentes manifestações clínicas na anemia falciforme.....	45
Tabela 4 - Dados laboratoriais de acordo com os genótipos da alfa talassemia e haplótipos β^S na anemia falciforme.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	– Alfa
$\alpha^{3.7Kb}$	– Deleção alfa 3.7Kb
A	– Adenina
AF	– Anemia falciforme
ATP	– Atípico
AVC	– Acidente vascular cerebral
BEN	– Benin
BSA	– Albumina bovina sérica
β	– Beta
BI	– Bilirrubina indireta
C	– Citosina
CAM	– Camarões
CAR	– República Centro-Africana
CEP	– Comitê de Ética em Pesquisa
cm/s	– Centímetro por segundo
CNS	– Conselho Nacional de Saúde
CSSCD	– <i>Cooperative study of sickle cell disease</i>
CVO	– Crise vaso-oclusiva
D	– Direto
DMSO	– Dimetil sulfóxido
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
dNTP	– Desorribonucleotídeo trifosfatado
DTC	– <i>Doppler</i> transcraniano
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetracético
FVW	– Fator de von Willebrand
γ	– Gama
G	– Guanina
HAP	– Hipertensão arterial pulmonar
Hb	– Hemoglobina
HbA	– Hemoglobina A
HbA ₂	– Hemoglobina A ₂
<i>HBB</i>	– Gene da hemoglobina subunidade beta
<i>HBG2</i>	– Gene da hemoglobina subunidade gama 2
HbF	– Hemoglobina fetal
HbS	– Hemoglobina S
HCl	– Ácido clorídrico
HEMOPE	– Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HPLC	– <i>High performance liquid chromatography</i>
Ht	– Hematócrito

IC	– Intervalo de confiança
Kb	– Kilobases
LDH	– Lactato desidrogenase
mM	– Milimolar
MgCl ₂	– Cloreto de magnésio
mL	– Mililitro
NCBI	– <i>National center for biotechnology information</i>
ng	– Nanograma
(NH ₄) ₂ SO ₄	– Sulfato de Amônio
O ₂	– Oxigênio
OR	– <i>Odds ratio</i>
ON	– Óxido nítrico
P	– Significância
pb	– Pares de base
PCR	– Do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
pH	– Potencial hidrogeniônico
PUSH	– <i>The Pulmonary Hypertension and Hypoxic Response in Sickle Cell Disease</i>
R	– Reverso
RFLP	– <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	– Ácido ribonucleico
SAUDI	– Saudi-Árabe ou Árabe-índiano
SDS	– Dodecil sulfato de sódio
SEN	– Senegal
SNP	– <i>Single nucleotide polymorphism</i>
STA	– Síndrome Torácica Aguda
STOP	– <i>Stroke Prevention in Sickle Cell Anemia</i>
T	– Timina
TCLE	– Termo de consentimento livre e esclarecido
Tris	– Hidroximetil aminometano
μM	– Micromolar
μL	– Microlitro
UFPE	– Universidade Federal de Pernambuco
WBC	– <i>White blood cells</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 ANEMIA FALCIFORME: DEFINIÇÃO E PREVALÊNCIA.....	14
2.2 FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME	16
2.3 COMPLICAÇÕES CLÍNICAS	17
2.3.1 Crise Vaso-oclusiva	20
2.3.2 Síndrome Torácica Aguda	20
2.3.3 Osteonecrose	21
2.3.4 Acidente Vascular Cerebral	22
2.3.5 Priapismo	23
2.3.6 Úlcera de Perna	24
2.4 MODULADORES GENÉTICOS DA ANEMIA FALCIFORME.....	25
2.4.1 Haplótipos do gene da globina β^S	26
2.4.2 Alfa Talassemia	30
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 DESENHO DO ESTUDO E LOCAL DE DESENVOLVIMENTO	35
4.2 PACIENTES	35
4.3 ASPECTOS ÉTICOS	35
4.4 DADOS CLÍNICOS	36
4.5 DADOS LABORATORIAIS	37
4.6 ANÁLISE MOLECULAR	37
4.6.1 Coleta de Sangue	37
4.6.2 Extração do DNA genômico	37
4.6.3 Reação de Amplificação (PCR)	38
4.6.4 Determinação dos Haplótipos β^S	38
4.6.5 Pesquisa do Genótipo α	40
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5 RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE A – ARTIGO A SER SUBMETIDO	69
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	87
ANEXO B - CURRICULUM VITAE (LATTES)	88

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) foi a primeira doença monogênica humana a ser caracterizada ao nível molecular. É uma hemoglobinopatia autossômica recessiva de distribuição mundial, resultante de uma mutação pontual no gene da globina beta. Essa mutação é suficiente para modificar a síntese da hemoglobina A normal do adulto (HbA), para a síntese de uma hemoglobina anormal, denominada de hemoglobina S (HbS). Em condições de baixa biodisponibilidade de oxigênio, a HbS polimeriza tornando as hemácias rígidas e em formato de foice.

Os eritrócitos falcizados são mais susceptíveis a hemólise e a vaso-oclusão, e podem provocar lesão vascular, seguida de inflamação e ativação das células endoteliais. Apesar de ser uma condição monogênica, os pacientes apresentam grande heterogeneidade fenotípica entre si. Dentre as diferentes manifestações clínicas relacionadas com a AF estão: crises de dor ou vaso-oclusivas, colelitíase, síndrome torácica aguda (STA), priapismo, acidente vascular cerebral (AVC), úlceras de perna e osteonecrose.

No entanto alguns pacientes apresentam um quadro com pouca ocorrência clínica e outros necessitam de constantes internamentos ou apresentam complicações que podem comprometer consideravelmente a qualidade de vida. Essa variabilidade está, em parte, associada a fatores ambientais e a condição socioeconômica, mas somado a isso, vários indicadores moleculares foram descritos como possíveis moduladores da anemia falciforme. Dentre eles, a coexistência com a alfa talassemia, os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β e a concentração da hemoglobina fetal (HbF) são considerados os principais determinantes na variabilidade da AF.

A coexistência da alfa talassemia com a AF reduz a polimerização de Hb S e a intensidade da hemólise, deste modo este marcador parece ser um fator atenuante para complicações clínicas com perfil mais hemolítico, tais como, úlcera de perna, priapismo e AVC. Por outro lado, a elevação da taxa de hemoglobina (Hb) pode aumentar o risco de eventos clínicos relacionados com o aumento da viscosidade sanguínea, como crise vaso-oclusiva, síndrome torácica aguda e osteonecrose. No entanto, pesquisas mostram resultados contraditórios sobre o benefício da alfa talassemia na AF e, especialmente, em quais manifestações clínicas este marcador tem real influência.

Assim como ocorre na alfa talassemia, a HbF pode impactar no fenótipo da AF, neste caso pela não incorporação desta Hb ao polímero de HbS, provocando inibição da polimerização. Níveis elevados de HbF foram associados a uma diminuição na gravidade clínica da AF com menor desenvolvimento de crises vaso-oclusivas, menos transfusões e hospitalizações.

A regulação genética da HbF foi primeiramente associada aos haplótipos da globina β . Esses haplótipos foram descritos e classificados de acordo com os grupos étnicos e região geográfica onde são comumente encontrados: Bantu ou CAR (República Centro-Africano), Benin, Senegal, Camarões e Árabe-Indiano. O efeito dos haplótipos na AF é mediado pelos níveis de HbF. Alguns haplótipos apresentam níveis mais elevados (Senegal e Árabe-Indiano) e foram relacionados a um melhor prognóstico, enquanto outros (Benin e Bantu) apresentam menores níveis de Hb F e quadro clínico intermediário e grave. No entanto, o papel desse marcador nas múltiplas expressões fenotípicas da AF ainda é controverso. Estudos mostram que existe heterogeneidade clínica entre indivíduos de mesmo haplótipo, além disso, outros determinantes genéticos foram associados a Hb F. Assim, o uso preditivo dos haplótipos pode se tornar limitado.

Ainda existem controvérsias quanto a real importância da alfa talassemia e dos haplótipos β^S como marcadores moleculares para a avaliação do prognóstico da anemia falciforme e se esses marcadores podem efetivamente serem utilizados para um tratamento de forma personalizada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANEMIA FALCIFORME: DEFINIÇÃO E PREVALÊNCIA

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia autossômica recessiva decorrente da substituição de uma adenina por uma timina (GAG→GTG) no sexto códon do gene que codifica a cadeia globínica β (*HBB*), localizado no cromossomo 11p15.5. Esta mutação pontual leva a uma substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina na molécula de hemoglobina A (HbA), gerando uma hemoglobina anormal, a hemoglobina S (HbS) (Frenette & Atweh, 2007; Steinberg & Sebastiani, 2012).

Quando há homozigose para o gene da HbS, a doença é classificada como anemia falciforme. Esta condição é considerada a mais grave e foi o primeiro modelo molecular de doença descrito. A associação em heterozigose da HbS com outra hemoglobina variante ou com a beta talassemia, é denominada de doença falciforme, a qual é de gravidade variável. Quando ocorre a herança heterozigota com a HbA, a condição é classificada em traço falciforme e não necessita de acompanhamento clínico (Naoum, 2000; Nagel & Steinberg, 2001; Sonati & Costa, 2008).

Os primeiros estudos a respeito da prevalência da HbS nas populações revelaram que essa alteração hematológica ocorria preferencialmente em negróides. Essas observações pioneiras, realizadas em populações norte-americanas, foram confirmadas por estudos posteriores realizados em populações negróides de diversas partes do mundo, sobretudo da África. Assim, a prevalência da HbS de até 40% foi observada em tribos na Uganda, na Tanzânia e em Moçambique. Na Guiné, na Nigéria, no Congo, em Serra Leoa, em Gana e em Angola, foram encontrados valores entre 20% e 30% (Forget *et al.*, 2004).

A formação da população brasileira sofreu forte influência dos escravos africanos com a migração forçada pelos portugueses, sobretudo a partir do século XVIII. Esse contingente populacional negro trouxe para o Brasil o gene da Hb S (Marinho & Pereira, 1983). Entre os anos de 1701 e 1816 o Brasil recebeu cerca de 2,4 milhões de escravos, dos quais 70% vieram da Angola, do Congo e de Moçambique e os 30% restantes da região do Benin e do Senegal; sendo que estes últimos foram destinados quase que exclusivamente ao Estado da Bahia. No período

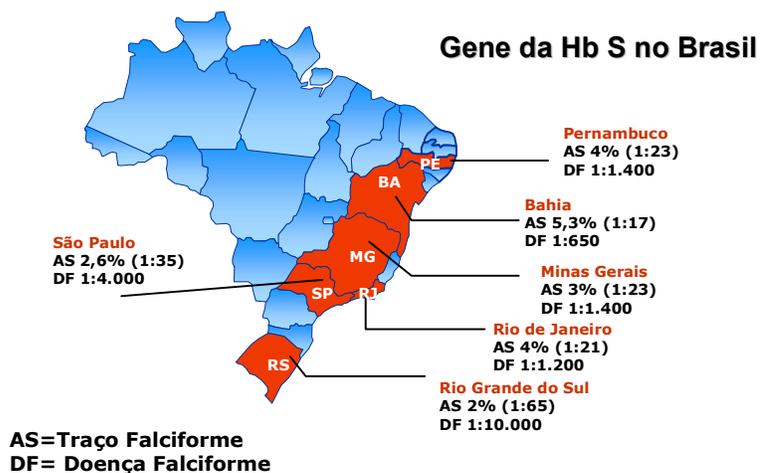
de 1817 a 1843, cerca de 90% dos 500.000 escravos aqui aportados vieram da Angola, Congo e Moçambique (Zago & Costa, 1985).

Devido ao processo histórico de colonização do Brasil, há uma distribuição heterogênea do gene β^S no país, dependendo da composição negróide ou caucasóide da população. Em caucasóides, a frequência média do alelo β^S é de 0,4%, enquanto que nas populações com maior componente negróide a frequência média é de 5,8% (Salzano & Tondo, 1982).

Segundo dados do Ministério da Saúde no Brasil, a prevalência estimada da AF é de 25.000 a 30.000 casos, com incidência de 3.500 novos casos por ano, ocorrendo predominantemente, entre afrodescendentes (Soares *et al.*, 2014). Estima-se que 2-6% da população brasileira, seja portadora do alelo β^S e que, a cada ano, nascem 700-1000 crianças portadoras da AF (Lyra *et al.*, 2005; Cançado & Jesus, 2007).

O Estado de Pernambuco possui uma frequência relativamente alta quando comparado com outras regiões brasileiras, 1 em cada 23 (1:23) nascidos vivos possuem o traço falciforme e 1 em cada 1.400 possuem a doença falciforme. Fazendo uma comparação, em São Paulo a frequência de nascidos vivos com doença falciforme é de 1 para 4.000, e no Rio Grande do Sul essa frequência é de 1 para 10.000 (Figura 1) (Cançado & Jesus, 2007).

Figura 1 - Distribuição Geográfica do Traço e da Anemia Falciforme no Brasil.



Fonte: Cançado e Jesus, 2007.

2.2 FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME

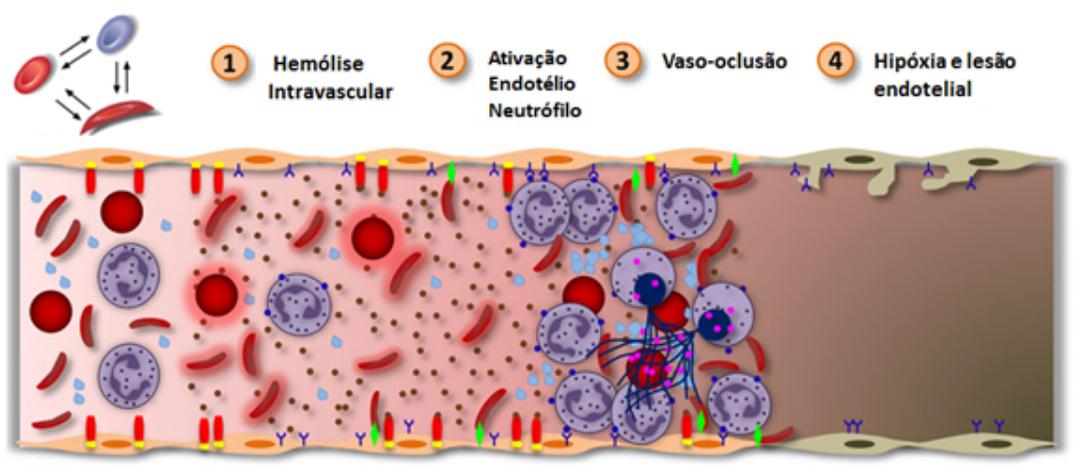
Em baixas concentrações de oxigênio, as moléculas de HbS estabelecem ligações intermoleculares hidrofóbicas, que irão promover a formação de longos polímeros de filamentos duplos, estes se organizam paralelamente em feixes de polímeros. Além da concentração de oxigênio, a polimerização é dependente de outras variáveis, como pH, concentração de HbS, temperatura, pressão, força iônica e presença de hemoglobinas normais, incluindo a HbF (Ballas & Mohandas 2004). Esta polimerização da Hb S altera o citoesqueleto da hemácia, transformando-a em uma forma alongada, conhecida por “hemácia em foice”, “drepanócito” ou “hemácia falcizada” (Antonarakis *et al.*, 1984; Serjeant, 1997; Stuart & Nagel, 2004).

A cinética da polimerização possui relação exponencial com os níveis de Hb S, assim condições de alta concentração intraeritrocitária de HbS levam a um maior processo de falcização. Isso justifica a condição clínica mais grave da AF dentre as doenças falciformes (Nagel & Steinberg, 2001).

Em condições normais, as hemácias possuem uma capacidade de deformabilidade que lhes permite circular através de vasos estreitos, carregando o O₂ para todos os tecidos do corpo. Entretanto, a hemácia falcizada sofre uma perda dessa deformabilidade, podendo provocar obstrução vascular e isquemia (Ballas & Mohandas, 2004). Além disso, as hemácias alteradas sofrem hemólise extravascular pelo reconhecimento do sistema retículo endotelial e hemólise intravascular devido à acentuada rigidez com fragilidade membranar (Kato *et al.*, 2009).

Os altos níveis de hemoglobina plasmática livre, em decorrência da hemólise intravascular, consomem e diminuem a produção de óxido nítrico (ON). O ON é um gás produzido pelo endotélio, que tem como função principal ser um potente regulador do tônus vascular. A depleção do ON provoca uma vasoconstrição, que retarda o fluxo sanguíneo e favorece a obstrução vascular (Reiter *et al.*, 2002; Mack & Kato, 2006; Kato, Gladwin & Steinberg, 2007). Somado a isso, o excesso de grupo heme livre no plasma provoca dano oxidativo e inflamação com ativação de neutrófilos e células endoteliais que expressam moléculas de adesão e fator de von Willebrand, culminando em um quadro de hipercoagulabilidade com aumento de adesão celular ao endotélio (Steinberg, 1999; Stuart & Nagel, 2004; Dutra & Bozza, 2014). Na figura 2 pode-se observar a fisiopatologia do processo vaso-oclusivo que ocorre na anemia falciforme.

Figura 2 - O processo de vaso-oclusão induzido pela forma alterada e rígida do eritrócito devido a polimerização da HbS.



Legenda: (1) Eritrócitos falcizados também levam a hemólise intravascular. A hemólise aumenta a concentração de Hb que libera grupo heme ao plasma. (2) O heme ativa neutrófilos e células endoteliais que induzem a expressão de moléculas de adesão. (3) A Hb livre consome óxido nítrico provocando vasoconstrição e células endoteliais ativam a coagulação por via FVW levando a adesão de plaquetas ao endotélio com participação de eritrócitos e neutrófilos. (4) Dependendo da extensão do vaso-oclusão, os tecidos podem apresentar hipóxia e necrose.

Fonte: Modificado de Dutra & Bozza (2014).

Vaso-oclusões recorrentes, processos de isquemia-reperfusão e consequente ativação do endotélio vascular e injúria, induzem a uma contínua resposta inflamatória na anemia falciforme, que se propaga com níveis elevados de citocinas inflamatórias, diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico e estresse oxidativo. Assim, ao nível molecular e celular, o processo vaso-oclusivo, hemolítico e inflamatório estão correlacionados e são os responsáveis pelas diversas manifestações clínicas apresentadas nos indivíduos portadores de AF (Zago & Pinto, 2007; Conran *et al.*, 2009).

2.3 COMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Apesar de ser uma doença fundamentalmente do sangue, a anemia falciforme afeta o corpo inteiro (Quadro 1) e as manifestações clínicas começam muito cedo na infância (Quinn, 2013).

Quadro 1 - Complicações clínicas da doença falciforme.

Cardíaco	Aumento do débito cardíaco Cardiomegalia Cardiomiopatia Hipertrofia ventricular esquerda Infarto agudo do miocárdio Arritmia Insuficiência cardíaca congestiva
Pulmonar	Infecção Embolia gordurosa ou de medula óssea Edema pulmonar Doença falciforme pulmonar Hipertensão pulmonar
Hepatobiliar	Hepatomegalia Sequestro hepático Coletasse intra-hepática Colelitíase Sobrecarga de ferro Hepatites virais
Esplênico	Sequestro esplênico Esplenomegalia, hipoesplenia, asplenia Infarto esplênico
Renal	Falência renal aguda e crônica Pielonefrite Carcinoma renal medular
Musculoesquelético	Infarto Necrose Mudanças degenerativas Osteomielite Artrite séptica Osteonecrose Osteopenia/Osteoporose
Neurológico	Aneurisma AVC isquêmico Ataque isquêmico transitório AVC hemorrágico Infarto silencioso
Oftalmológico	Isquemia da retina periférica Retinopatia proliferativa Hemorragia vítrea Descolamento da retina Alterações não proliferativas da retina
Endocrinológico	Hipogonadismo primário Hipopituitarismo Insuficiência hipotalâmica
Todos os sistemas e órgãos	Atraso no crescimento e desenvolvimento

Fonte: modificado de Malowany & Butany (2012).

Os sintomas da doença falciforme têm início quando a síntese de cadeias da γ -globina é substituída pela síntese de cadeias β , aumentando progressivamente a concentração relativa de Hb S. Níveis patológicos de Hb S podem ser alcançados após a oitava semana de vida em alguns indivíduos, nas quais complicações potencialmente fatais podem acontecer a partir dessa idade (Malowany & Butany, 2012; Serjeant, 2013).

A doença em si é de natureza crônica, mas muitas de suas complicações são agudas, como as crises vaso-oclusivas, a síndrome torácica aguda e o priapismo. Estas complicações variam consideravelmente em frequência e gravidade entre os pacientes, entre populações, com a idade e o sexo (Driss *et al.*, 2009; Ballas *et al.*, 2012).

As diferentes manifestações clínicas da AF podem ser categorizadas em três grandes grupos de acordo com o sistema ou órgão acometido: 1) Anemia hemolítica e sequelas, que compreende principalmente sequestro esplênico, crise aplásica e reação hemolítica pós-transfusão; 2) Síndromes de dor e eventos relacionados e 3) Complicações que afetam órgãos maiores e suas sequelas, como acidente vascular cerebral (AVC), retinopatia, hipertensão arterial sistêmica, síndrome torácica aguda, colelitíase, priapismo, sequestro esplênico, osteonecrose, úlcera de perna, dactilite, retardo no crescimento, dentre outros (Ballas *et al.*, 2010).

Algumas complicações clínicas principalmente as descritas nos grupos 1 e 2, habitualmente comprometem de modo mais grave os pacientes com AF, e apresentam elevada taxa de mortalidade. Enquanto que eventos crônicos em geral levam ao comprometimento da qualidade de vida dos pacientes podendo ocorrer mais precocemente em alguns indivíduos ou mais tardiamente (Steinberg, 2008; Habara & Steinberg, 2016).

A AF também pode ser caracterizada clinicamente segundo o modelo de subfenótipos que classifica a doença em dois grupos, um vaso-oclusivo e outro hemolítico. As complicações mais relacionadas à falcização do eritrócito e ao aumento dos níveis de hemoglobina são as crises vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda e osteonecrose, e podem ser incluídas no subfenótipo vaso-oclusivo. Enquanto o fenótipo hemolítico envolve complicações relacionadas à disfunção endotelial com vasculopatia proliferativa e inclui acidente vascular cerebral, úlcera da perna, priapismo, hipertensão pulmonar e, possivelmente, está associado aos baixos

níveis de hemoglobina e níveis elevados de marcadores hemolíticos como contagem de reticulócitos e lactato desidrogenase (LDH) (Ballas, 1991; Alexander *et al.*, 2004; Kato, Gladwin & Steinberg, 2007).

2.3.1 Crise Vaso-oclusiva

Os episódios de crises de dor ou crises vaso-oclusivas (CVO) são bastante característicos da anemia falciforme, provocam dor isquêmica, de intensidade variável, geralmente intensa, com recorrência imprevisível, que podem iniciar aos 6 meses de idade e durar por toda a vida (Ballas, 1991; Ballas *et al.*, 2012). Geralmente se instala de modo agudo, com duração de poucos dias, mas pode persistir por semanas. Frequentemente, os episódios dolorosos são mistos, além disso, complicações crônicas podem estar associadas. As características da dor aguda são de início súbito, sem explicação, com intensidade e duração variável, caráter persistente ou recorrente e migração pelo corpo (Alexander *et al.*, 2004; Forget *et al.*, 2004).

As CVOs são consideradas as causas mais comuns de hospitalização na AF e sua incidência varia de acordo com a idade, o genótipo e os parâmetros hematológicos laboratoriais (Kato, Gladwin & Steinberg, 2007; Galarneau *et al.*, 2013). A maior frequência ocorre entre 15 e 25 anos de idade e pode diminuir a partir dos 30 anos. Alguns fatores são considerados como desencadeantes da crise, dentre eles se destacam: gravidez, hematócrito elevado, infecção, febre, acidose, grandes altitudes, desidratação e exposição ao frio (Braga *et al.*, 2016).

A crise vaso-oclusiva é uma situação de risco, o tratamento consiste em hidratação e analgesia efetiva da dor. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a identificação dos fatores predisponentes, assim como a pesquisa e o tratamento das infecções associadas, são procedimentos obrigatórios. É uma complicação vascular de característica aguda e de difícil comprovação diagnóstica, por ter basicamente a dor como informação clínica (Brasil, 2002).

2.3.2 Síndrome Torácica Aguda

A segunda maior causa de hospitalizações dos pacientes com AF é a síndrome torácica aguda (STA), que se caracteriza por um infiltrado pulmonar com

dor torácica aguda e intensa febre, tosse e dispnéia moderada a grave podendo ocorrer hipoxemia (Buchanan *et al.*, 2004; Galarneau *et al.*, 2013).

É uma síndrome associada a infecções pulmonares, com difícil diagnóstico devido à dificuldade em distingui-la de outras condições que ocorrem na AF, incluindo alterações inflamatórias decorrentes de embolia gordurosa pulmonar ou infarto pulmonar por tromboembolismo. Pode manifestar-se agudamente, após dias de CVO intensa, ou como complicação de cirurgia e anestesia geral. Pode evoluir rapidamente para falência respiratória e morte (Vichinsky *et al.*, 1997; Ballas *et al.*, 2010).

A STA acomete 15 a 43% dos pacientes e pode estar relacionada ao desenvolvimento de hipertensão pulmonar. Além disso, é uma das principais causas de mortalidade na AF (Platt *et al.*, 1994; Bakanay *et al.*, 2005). Um estudo cooperativo nos Estados Unidos, demonstrou uma frequência de 25% de STA nas causas de óbitos em pacientes com AF (Vichinsky *et al.*, 1997).

2.3.3 Osteonecrose

A osteonecrose é uma complicação crônica e progressiva da AF. Caracterizada por um infarto das superfícies ósseas articulares com consequente degeneração e destruição da cartilagem articular. O dano tecidual e dor resultante, provavelmente refletem o aumento da pressão intramedular associada ao processo inflamatório característico da AF (Akinyoola *et al.*, 2009).

Esta complicação possui implicações particulares devido ao local crítico da lesão, afeta as epífises dos ossos longos, principalmente do fêmur e do úmero e também pode afetar os corpos vertebrais. O limitado suprimento de sangue terminal na região e a baixa capacidade de formação de uma circulação secundária tornam as epífises especialmente vulneráveis à vaso-oclusão e posteriormente ao dano ósseo (Almeida & Roberts, 2005; Akinyoola *et al.*, 2009).

A maior parte das osteonecroses ocorre na epífise femoral e pode ser assintomática ou causar dor no quadril. Pode haver rupturas de superfície articular, que decorrem do suporte contínuo de peso sobre a cabeça femoral amolecida. Comumente, esta complicação apresenta um diagnóstico tardio, quando existem sequelas na locomoção. Nos estágios mais avançados há reabsorção da cabeça femoral, sinais de osteoartrose e destruição óssea com fibrose e anquilose (Milner *et*

al., 1991). A osteonecrose da cabeça de fêmur é uma complicação comum e progressiva na anemia falciforme, causa dor crônica intensa e piora na qualidade de vida (Almeida & Roberts, 2005).

O tratamento consiste em analgesia paliativa ou cirurgia de prótese, a artroplastia, esta apresenta altos índices de morbimortalidade e pode requerer nova cirurgia após 5 ou 10 anos (Al-Mousawi *et al.*, 2002). O diagnóstico deve ser realizado preferencialmente por ressonância magnética, que detecta lesões no estágio inicial, e pode proporcionar medidas auxiliares para retardar a progressão da condição, como perda de peso, hidratação adequada e abstenção de algumas atividades físicas (Almeida & Roberts, 2005).

Os principais fatores descritos como risco para o desenvolvimento da osteonecrose são: Idade, recorrência de crises vaso-oclusivas, coexistência com o traço alfa talassêmico, hematócrito alto, hemoglobina total aumentada e baixo volume corpuscular médio (VCM) (Milner *et al.*, 1991; Hernigou, Bachir & Galacteros, 1993).

2.3.4 Acidente Vascular Cerebral

O AVC pode ser definido como uma síndrome neurológica aguda, secundária a oclusão de uma artéria ou hemorragia, resultando em isquemia focal acompanhada de sinais neurológicos (Driss *et al.*, 2009; Belisário *et al.*, 2015). A incidência do AVC em crianças com AF é cerca de 280 vezes maior do que na população pediátrica em geral. Na AF, o AVC é predominantemente isquêmico e ocorre em aproximadamente 11% dos pacientes até os 20 anos de vida (Driss *et al.*, 2009; Filho & Carvalho, 2009; Mena, 2013). Apresenta-se como uma manifestação clínica grave, com uma frequência de 20% de mortalidade entre adultos e crianças. Embora a recuperação possa ser completa, o AVC pode causar sequelas aos acometidos, com dano cerebral permanente (Sebastiani *et al.*, 2005; Hoppe *et al.*, 2007).

O AVC isquêmico ocorre mais predominantemente em crianças, normalmente por hiperplasia vascular com trombose de grandes artérias cerebrais, provavelmente originada de sítios de lesão recorrente das células endoteliais (Pavlakakis & Levinson, 2009). O AVC hemorrágico, por sua vez, é mais comum em adultos, geralmente é

causado pela ruptura de aneurismas devido ao dano vascular acumulado durante os anos (Ohene-Frempong *et al.*, 1998).

Um estudo multicêntrico randomizado de fase III *STOP* (estudo de prevenção para o AVC na anemia Falciforme), realizado na década de 1990, descreveu a ferramenta *doppler transcraniano* (DTC) como teste de triagem na prevenção do AVC (Adams *et al.*, 1998). Atualmente, este é o único mecanismo utilizado na prevenção primária do AVC na AF. É uma triagem periódica não invasiva da velocidade do fluxo sanguíneo nas principais artérias intracranianas. O uso do DTC levou a uma redução significativa na incidência de AVC em crianças, por promover o diagnóstico e intervenção precoce nos pacientes em maior risco ou com alteração no fluxo vascular (Adams *et al.*, 2003; Ballas *et al.*, 2012).

Crianças falciformes com DTC alterado (Velocidade de fluxo ≥ 200 cm/s) apresentam 44 vezes mais chances de desenvolver um AVC do que pacientes com AF e DTC normal (Velocidade de fluxo ≤ 170 cm/s). Entretanto, o valor de 200 cm/s não é absoluto, visto que pacientes que apresentam DTC em faixa condicional (velocidade de fluxo 170-199 cm/s) também apresentam um elevado risco de desenvolver o AVC. Além disso, o AVC ainda ocorre em até 19% dos indivíduos com DTC normal. Assim, mecanismos adicionais que possam prever o AVC seriam de grande utilidade no prognóstico da AF (Adams *et al.*, 1998; Sebastiani *et al.*, 2005; Sheehan *et al.*, 2013).

2.3.5 Priapismo

As manifestações geniturinárias mais comuns na AF são hematuria, infecção do trato urinário e priapismo. O priapismo é definido pela ereção peniana prolongada e dolorosa não acompanhada de estímulo sexual, usualmente persistente por mais de quatro horas, ocorre obstrução da drenagem venosa do pênis (Bruno *et al.*, 2001). São definidas duas formas clínicas: o priapismo agudo, caracterizado por duração prolongada (mais de 3 h), pode levar à impotência; e o priapismo intermitente crônico, caracterizado por crises repetidas, mas de curta duração (menos de 3 h), este pode evoluir para priapismo agudo. O priapismo agudo com mais de 24h de duração pode acarretar em disfunção erétil permanente (Yuan *et al.*, 2008).

O priapismo é uma complicação que ocorre mais frequentemente em crianças e adolescentes ou adultos jovens, e cerca de 30 a 45% dos pacientes homens com doença falciforme podem apresentar essa manifestação clínica (Steinberg, 2008). Na AF, 95% dos eventos de priapismo são do tipo isquêmico ou de baixo fluxo e está associado à inflamação, na ausência de tratamento adequado, pode levar à necrose tecidual e impotência (Vicari & Figueiredo, 2007).

Embora exista participação de evento vaso-oclusivo, o priapismo está associado ao nível reduzido de hemoglobina e de marcadores hemolíticos como contagem de reticulócitos, bilirrubina, LDH e aspartato aminotransferase (AST), assim é uma complicação clínica fortemente associada à hemólise. Além disso, a diminuição na biodisponibilidade de ON promove uma redução da fosfodiesterase-5 que têm seu papel ligado à inativação do cGMP, um importante agente causal de ereção peniana persistente (Nolan *et al.*, 2005b; Kato, Gladwin & Steinberg, 2007).

2.3.6 Úlcera de Perna

A úlcera de perna, úlcera maleolar ou úlcera de membros inferiores é uma das manifestações cutâneas da anemia falciforme mais comum. Ocorrem em áreas com menos gordura subcutânea, pele fina, e com diminuição do fluxo sanguíneo. Os locais mais comuns são o maléolo medial e lateral (tornozelos), muitas vezes tornando-se circunferencial se não for controlada cedo. Locais menos comuns de acometimento são a região anterior da tíbia, dorso do pé e tendão de Aquiles (Serjeant, 1997; Minniti *et al.*, 2010; Minniti *et al.*, 2014).

Ocorrem em 8% a 10% dos pacientes homozigotos para a HbS na América do Norte, atingindo percentual maior que 50% em pacientes que residem em áreas tropicais. A causa exata do surgimento do processo ulcerativo ainda não está clara, mas há um consenso de que seu surgimento é multifatorial (Serjeant *et al.*, 2005; Paladino, 2007).

A cicatrização da úlcera é lenta, evoluindo por meses ou anos, assim a qualidade de vida dos pacientes que desenvolvem essas lesões é bastante comprometida (Serjeant *et al.*, 2005). As úlceras podem ocorrer devido a traumas com infecção ou espontaneamente, surgem como uma área dolorosa na pele ainda normal, seguida de edema e vermelhidão, evoluindo rapidamente para a lesão (Steinberg, 2008; Minniti *et al.*, 2010).

As úlceras espontâneas surgem em áreas da derme que sofrem sucessivos quadros de hipóxia tecidual e danos ao endotélio. Crises hemolíticas provocam diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico, com vaso-oclusões recorrentes que resultam em infarto tecidual e necrose, além das infecções bacterianas. Com o avanço do processo inflamatório, há degradação da derme e a úlcera se instala. Sem o tratamento devido, a capacidade de cicatrização da pele é afetada, e a lesão torna-se crônica (Ladizinski *et al.*, 2012).

A recorrência das úlceras ocorre com frequência e o processo de cicatrização é lento, além disso, ainda não há tratamentos definitivos para esta complicação (Minniti *et al.*, 2010). Os motivos pelos quais as úlceras de perna surgem espontaneamente em alguns pacientes e porque se tornam crônicas na AF é objetivo de estudo por vários pesquisadores (Nolan *et al.* 2006; Halabi-Tawil *et al.* 2008; Fertrin & Costa 2010; Minniti *et al.* 2014; da Silva *et al.* 2014b).

2.4 MODULADORES GENÉTICOS DA ANEMIA FALCIFORME

Fenotipicamente, a AF apresenta-se de forma heterogênea, de modo que, diferentes pacientes podem evoluir com perfis clínicos significativamente distintos. Essa variabilidade está, em parte, associada a fatores ambientais e socioeconômicos, mas somado a isso, vários indicadores moleculares foram descritos como possíveis moduladores no desenvolvimento de complicações na anemia falciforme (Driss *et al.* 2009; Fertrin & Costa 2010; Flanagan *et al.* 2011).

Polimorfismos genéticos estão sendo investigados em genes candidatos funcionais de diferentes classes que atuam na regulação vascular, inflamação, adesão celular, hemostasia, proliferação de células endoteliais, estresse oxidativo e em outras funções relacionadas com a fisiopatologia da AF (Sebastiani *et al.*, 2005; Flanagan *et al.*, 2011; Coelho *et al.*, 2014). Os dois maiores modificadores genéticos clássicos estabelecidos na literatura são os haplótipos β^S e a coexistência de alfa talassemia. Ambos os fatores diminuem a polimerização da HbS, evento molecular fundamental na fisiopatologia da doença (Steinberg, 2005; Rees, Williams, & Gladwin, 2010; Higgs, 2013).

No entanto, ainda existem resultados contraditórios sobre o benefício da alfa talassemia na AF e, especialmente, em quais manifestações clínicas este marcador tem real influência (Platt *et al.* 1991; Castro *et al.* 1994; Gill *et al.* 1995; Davies *et al.*

2000; Nolan *et al.* 2005; Vasavda *et al.* 2007; Fertrin & Costa 2010; Darbari *et al.* 2012; Alkindi *et al.* 2015). Estudos mostram que podem existir variações nos níveis de HbF e grande heterogeneidade clínica entre indivíduos de mesmo haplótipo, além disso, outros determinantes genéticos foram associados a expressão do gene da γ globina (Chang *et al.*, 1995; Bakanay *et al.*, 2005; Thein *et al.*, 2007; Uda *et al.*, 2008; Steinberg, 2009; Loggetto, 2013; Alsultan *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016).

2.4.1 Haplótipos do gene da globina β^S

Padrões de sítios polimórficos do DNA ligados ao complexo da β -globina definem os haplótipos da anemia falciforme (Sutton, Bouhassira, & Nagel, 1989). Kan e Dozy, em 1978, publicaram a primeira descrição da existência de dois alelos distintos no *cluster* da globina β^S detectados pela ação da endonuclease *HpaI*, no sítio de restrição a 3' do gene beta, e sugeriram que a mutação surgiu em pelo menos duas vezes distintas.

Subsequentemente, estudos com polimorfismos ligados ao gene da HbS, desenvolvidos na Jamaica, América do Norte e África, identificaram outros sítios polimórficos e caracterizaram quatro haplótipos β^S , esses estudos apoiaram fortemente a hipótese de que mutação β^S surgiu de forma independente em quatro regiões na África (Pagnier *et al.*, 1984; Antonarakis *et al.*, 1984; Sutton, Bouhassira, & Nagel, 1989), um quinto padrão polimórfico foi descrito na Ásia, especificamente na Índia e leste da Arábia Saudita (Kulozik *et al.*, 1987). No entanto, essa teoria multicêntrica não é totalmente aceita, há estudos que descrevem a origem da mutação β^S como unicêntrica, com único surgimento na África ou apenas duas origens independentes (África e Ásia), posteriormente teria se espalhado para outras regiões (Srinivas *et al.*, 1988; Labie *et al.*, 1989; Bitoungui *et al.*, 2015).

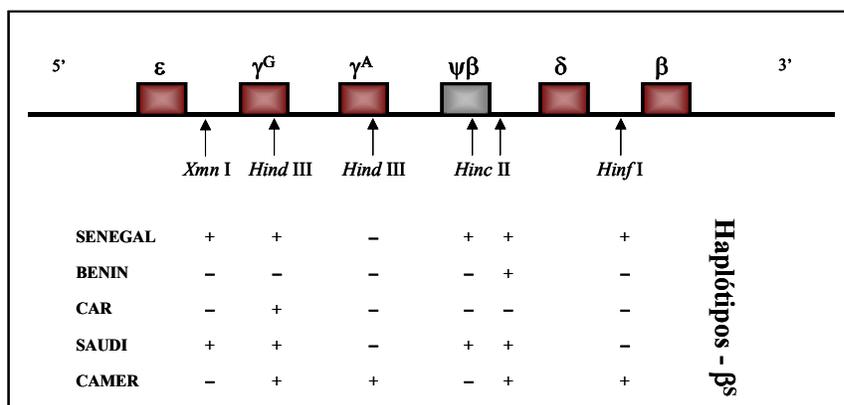
Os cinco haplótipos do gene β^S foram descritos em diferentes regiões e estão ligados a grupos populacionais específicos, recebendo a denominação de acordo com os locais de origem: Bantu ou CAR, predominante na África Central (Gabão, República Centro-Africana, Congo, Zaire e Angola), Benin no ocidente centro-africano (Togo, Benin, Burkina Fasso e Nigéria), Camarões, menos frequente, se restringe ao grupo étnico Eton na costa ocidental Africana e Sudão e Senegal prevalece no Litoral Atlântico Africano (Senegal, Gâmbia, Guiné, Guiné-Bissau, Serra Leoa e Libéria). O haplótipo Árabe-Indiano ou Índia-Arábia Saudita (SAUDI)

tem origem na Índia e península Arábica (Pagnier *et al.*, 1984; Antonarakis *et al.*, 1984; Lapouniéroulie *et al.*, 1992; Bitoungui *et al.*, 2015). A figura 3 ilustra os diferentes haplótipos descritos na literatura e seus sítios polimórficos.

Os padrões polimórficos que não correspondem a nenhum dos cinco haplótipos são classificados em haplótipos Atípicos (ATP). Os haplótipos ATP podem ocorrer por mecanismos genéticos que levem a mutações pontuais nos sítios polimórficos de restrição e, por isso, não se enquadram nos cinco padrões bem estabelecidos (Srinivas *et al.*, 1988; Zago *et al.*, 2000).

Os haplótipos β^S parecem estar associados ao prognóstico da AF. Os alelos em *cis*, herdadas juntamente com o gene β^S , podem influenciar na expressão do gene *HBG2*, consequentemente, nos níveis de HbF (Nagel *et al.*, 1985; Steinberg *et al.*, 1995). O polimorfismo presente na região -158 (C→T) do gene *HBG2*, sítio de restrição para a enzima *XmnI* (rs7482144), está relacionado com uma maior produção de cadeias globínicas γ^G , levando ao aumento da HbF (Powars, 1991; Steinberg, 2009).

Figura 3 - *Cluster* β mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S .



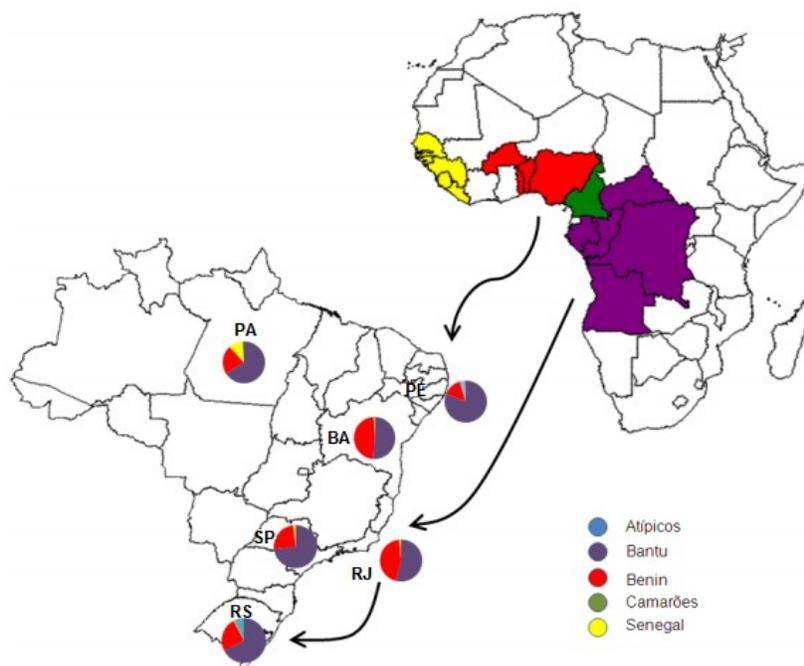
Fonte: Sutton *et al.* (1989).

Níveis elevados de HbF retardam o processo de falcização, atuando de forma benéfica para a AF. Além de reduzir a concentração de HbS, a HbF não participa da fase de polímero de HbS e atua como um inibidor da polimerização (Pauling *et al.*, 1949; Akinsheye *et al.*, 2011). Níveis elevados de HbF foram associados a uma diminuição da gravidade clínica da AF, com menos eventos

dolorosos, além de menor uso de terapia de sangue e hospitalizações (Nagel & Steinberg, 2001).

Os haplótipos Senegal e Árabe-Indiano possuem o polimorfismo *HBG2-XmnI* e apresentam níveis elevados de HbF (>15%), há evidências de que estes haplótipos estejam relacionados ao curso clínico menos grave da doença (Nagel & Steinberg, 2001; Adekile, 2005). Enquanto que os haplótipos Bantu, Benin e Camarões não apresentam o polimorfismo *HBG2-XmnI* e cursam com níveis baixos de HbF. Os pacientes que possuem o haplótipo Bantu tendem a apresentar um curso clínico mais grave, iniciando crises vaso-oclusivas mais precocemente. Por estar relacionado com menores níveis de HbF, este haplótipo é considerado o de pior prognóstico para a AF. Os haplótipos Benin e Camarões, aparentemente, apresentam fenótipos intermediários (Powars & Hiti, 1993; Quinn & Miller, 2004; Steinberg, 2009).

Figura 4 - Padrões de distribuição dos haplótipos β^S na África e sua herança no Brasil.



Fonte: Lindenau (2009).

A HbS foi introduzida no Brasil durante o tráfico de escravos Africano, que ocorreu com maior intensidade entre os séculos 16 e 19. A trajetória dos negros africanos para o Brasil foi heterogênea, uma vez que o tráfico de escravos se desenvolveu ao longo de 300 anos, levando escravos de quase toda a costa

ocidental da África. Nesse período entraram pelos portos da Bahia e Rio de Janeiro, pelo menos 3,6 milhões de negros africanos (Naoum, 2000; Filho *et al.*, 2010). Grande parte dos escravos aportados aqui veio da Angola, Congo e Moçambique, onde o haplótipo Bantu predomina, e cerca de 30% dos escravos vieram da região Benin e Senegal, estes últimos foram destinados quase exclusivamente à Bahia (Figura 4) (Zago, Figueiredo & Ogo, 1992; Salas *et al.*, 2004).

Estudos em diversas regiões do Brasil demonstram uma predominância do haplótipo Bantu no país, com frequências que variam entre 41% a 81% (Zago *et al.*, 1992; Figueiredo *et al.*, 1996; Bezerra *et al.*, 2007; Silva & Gonçalves 2009; Belisario *et al.* 2010a; Cardoso & Guerreiro, 2010; Filho *et al.*, 2010; Cabral *et al.*, 2011; Camilo-Araujo *et al.*, 2014; da Silva *et al.*, 2014a; Shimauti *et al.*, 2015; Leal *et al.*, 2016). O haplótipo Benin foi descrito em todas as regiões, com alta prevalência na Bahia (Gonçalves *et al.*, 2003; Adorno *et al.*, 2004; 2008). As frequências do haplótipo β^S observadas no Brasil, estão descritas no Quadro 2.

O efeito do haplótipo β^S na AF é mediado pela HbF e é consenso na literatura o benefício clínico que esta hemoglobina confere a doença. Entretanto, além do polimorfismo *HBG2-Xmn1* outros loci também influenciam nas características genéticas quantitativas da HbF: *HBS1L-MYB* região intergênica no cromossomo 6q23 e *BCL11A* no cromossomo 2p16. Juntos, esses polimorfismos são responsáveis por 20% a 50% da variação nos níveis de HbF em pacientes com AF, beta talassemia e em adultos saudáveis (Thein *et al.*, 2007; Uda *et al.*, 2008; Lettre *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2016). Tornando assim, o uso dos haplótipos no prognóstico da AF, de certa forma limitado.

Além disso, há heterogeneidade fenotípica entre indivíduos que apresentam haplótipos iguais, mesmo em homozigose e é comum em muitas populações a presença de haplótipos em heterozigose, com expressão diferente da HbF (Chang *et al.*, 1995; Quinn & Miller, 2004).

Estudos com pacientes adultos e haplótipo Árabe-Indiano, com níveis de HbF entre 15% a 20%, mostraram frequências de crises vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda e osteonecrose semelhantes a populações de Norte Americanos com o haplótipo Benin. Assim, apesar de estar relacionado com níveis mais altos de HbF, a AF em pacientes com haplótipo SAUDI não apresenta características benignas (Alsultan *et al.*, 2014; Italia *et al.*, 2015). Este é provavelmente um resultado da

distribuição heterogênea que ocorre nos níveis de HbF entre os eritrócitos (Thein *et al.*, 2009).

Quadro 2 - Resumo dos estudos realizados no Brasil com frequências dos haplótipos β^S Bantu e Benin.

Autor/ano	População	Nº de Pacientes	Haplótipos	
			Bantu	Benin
Da Silva <i>et al.</i> (2014)	RS	75	66,0	27,0
Lindenau (2009)	RS	110	67,3	25,0
Shimauti <i>et al.</i> (2015)	PR	47	62,0	32,0
Costa <i>et al.</i> (1984)	SP	37	61,0	38,0
Zago <i>et al.</i> (1992)	SP	37	66,2	23,0
Gonçalves <i>et al.</i> (1994)	SP	74	62,2	33,8
Figueiredo <i>et al.</i> (1996)	SP	85	61,7	34,0
Camilo-Araújo <i>et al.</i> (2014)	SP	117	57,2	33,3
Leal <i>et al.</i> (2016)	MG	61	64,8	22,1
Belisario <i>et al.</i> (2010)	MG	208	57,0	41,5
Fleury (2007)	RJ	74	54,0	44,6
Filho <i>et al.</i> (2010)	RJ	99	65,9	23,7
Costa <i>et al.</i> (1984)	BA	36	49,0	51,0
Gonçalves <i>et al.</i> (2003)	BA	80	48,1	45,6
Adorno <i>et al.</i> (2004)	BA	78	46,2	48,8
Adorno <i>et al.</i> (2008)	BA	125	41,6	55,2
Bezerra <i>et al.</i> (2007)	PE	74	81,1	14,2
Silva <i>et al.</i> (2009)	CE	47	66,2	22,0
Pante de Sousa <i>et al.</i> (1998)	PA	30	67,0	30,0
Cardoso e Guerreiro (2010)	PA	130	60,0	27,0

Fonte: Modificado de Cabral *et al.* (2011).

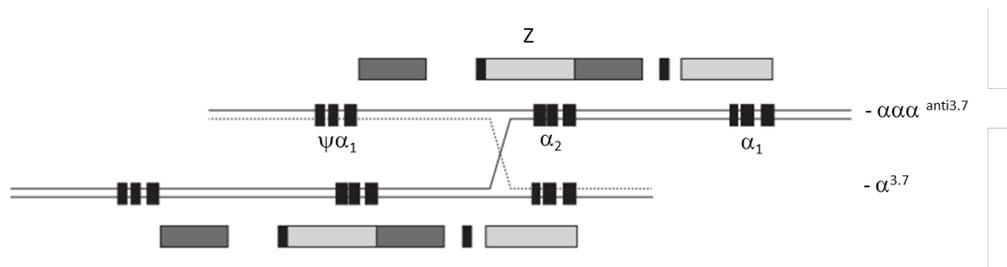
2.4.2 Alfa Talassemia

A alfa talassemia constitui um grupo heterogêneo de distúrbios genéticos, que levam a síntese incompleta de uma ou mais cadeias globínicas do tipo alfa. São descritas como as doenças monogênicas mais comuns e mais de 300.000 indivíduos nascem por ano do mundo com quadro clínico que necessitam de acompanhamento (Higgs, 2013). Assim como a AF, a alfa talassemia está relacionada com uma proteção contra a malária, conseqüentemente, regiões tropicais e subtropicais apresentam as maiores frequências no mundo (Williams & Weatherall, 2012).

Lesões nos grupamentos de genes codificadores das globinas alfa (α_1 e α_2) originam as alfa talassemias. A mutação mais comuns e mais prevalente no Brasil é a remoção de 3.700 bases nitrogenadas do complexo gênico ($-\alpha_2^{3.7}$), envolvendo a região 3' do gene α_2 e 5' do gene α_1 , que resulta em um gene alfa a menos ($-\alpha/\alpha$) com formação de um gene híbrido (α_2/α_1). Esta deleção é causada pelo pareamento

errôneo e recombinação homóloga desigual entre regiões homólogas Z não correspondentes (Figura 5) (Dodé *et al.*, 1993).

Figura 5 - Representação do pareamento anormal com *crossing-over* desigual que ocorre entre os segmentos homólogos Z do grupamento do gene α e resulta em cromossomos com $-\alpha_2^{3.7}$ e $\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$



Fonte: modificado de Higgs (2013).

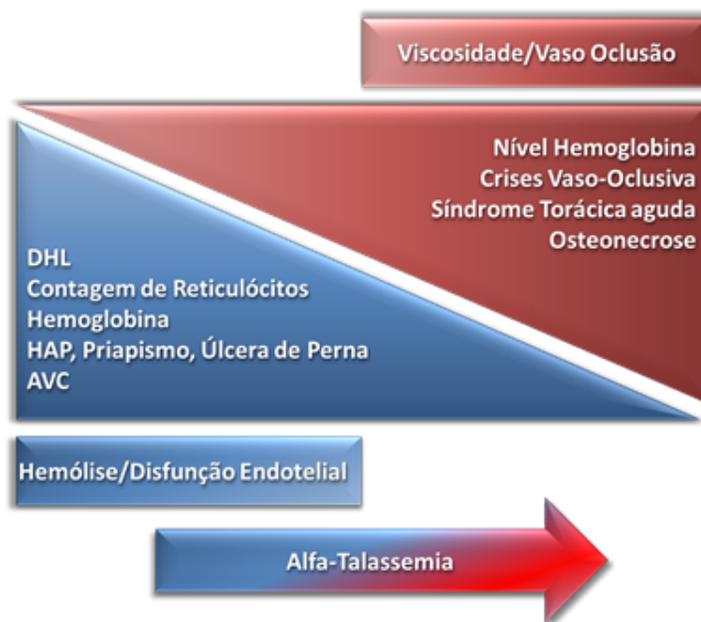
Como existem dois genes α funcionais e próximos em cada cromossomo, genotipicamente as alfas talassemias são complexas. O genótipo do indivíduo normal é representado por dois haplótipos ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), enquanto que o genótipo para o indivíduo alterado pode produzir deleções em um gene ($-\alpha/\alpha\alpha$) ou dois genes α ($--/\alpha\alpha$; $-\alpha/-\alpha$), caracterizado como portador silencioso e traço alfa talassêmico, respectivamente (Higgs, 2013). Deleção em três genes, com presença de somente um gene α funcional ($--/-\alpha$) causa uma anemia crônica, de intensidade intermediária, conhecida como doença de hemoglobina H, rara no Brasil. Já a deleção nos quatro genes α ($--/--$) é denominada de hidropsia fetal, considerada a forma mais grave das talassemias, é incompatível com a vida (Lorey *et al.*, 2001; Vichinsky, 2013).

Pacientes heterozigotos para a $\alpha^{3.7}$ talassemia ($-\alpha/\alpha\alpha$) são considerados portadores silenciosos ou traço talassêmico, não apresentam anormalidades clínicas, com mínima ou nenhuma alteração hematológica. Os pacientes homozigotos ($-\alpha/-\alpha$) apresentam fenótipo semelhante, com anemia discreta e microcitose (Vichinsky, 2013). Aproximadamente um terço dos pacientes com AF possuem alfa talassemia (Kan & Dozy, 1978; Steinberg, 2009). A frequência do portador silencioso somada ao traço alfa talassêmico em portadores de AF no Brasil varia entre 13% e 30% e foi descrita em diferentes regiões geográficas (Figueiredo *et al.*, 1996; Adorno *et al.*, 2008; Cardoso & Guerreiro, 2010; Filho *et al.*, 2010; Belisario *et al.*, 2010b; Camilo-Araujo *et al.*, 2014; Shimauti *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2016).

Apesar da alfa talassemia em hetero ou homozigose, não apresentar repercussão clínica importante e seus portadores serem assintomáticos, sua coexistência com a anemia falciforme pode representar uma modulação poderosa na heterogeneidade clínica da AF.

A diminuição da expressão de globinas α , decorrente da alfa talassemia, leva a uma redução da concentração de hemoglobinas no paciente. Na AF isso acarreta em redução da HbS, induzindo a uma menor polimerização intracorpúscular e menor hemólise. Assim, esta mutação foi descrita com um papel protetor para complicações clínicas relacionadas à hemólise que envolve vasculopatia proliferativa, como o acidente vascular cerebral, a úlcera de perna e o priapismo (Nagel & Steinberg, 2001; Steinberg & Adewoye, 2006; Kato *et al.*, 2007).

Figura 6 - Modelo de sobreposição de subfenótipos da doença falciforme. Pacientes com anemia falciforme e níveis elevados de hemoglobina apresentam uma maior frequência de complicações vaso-oclusiva. Em contraste, um conjunto distinto de complicações envolvendo hemólise com disfunção endotelial está associado a baixos níveis de hemoglobina. O espectro de prevalência e gravidade de cada um destes subfenótipos se sobrepõe. A presença de alfa talassemia tende a diminuir a incidência de eventos hemolíticos e aumentar eventos vaso-oclusivos.



Fonte: modificado de Kato *et al.* (2007).

No entanto, a redução da hemólise leva a um aumento da viscosidade sanguínea na AF e os eventos clínicos relacionados, como crises vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda e osteonecrose são minimamente afetados ou apresentam maior prevalência na coexistência da alfa-talassemia (Figura 6) (Nagel & Steinberg, 2001; Steinberg & Adewoye, 2006; Kato *et al.*, 2007).

Alguns estudos demonstraram resultados contraditórios sobre a real influência da alfa talassemia na AF, especialmente em quais manifestações clínicas este marcador atua como efeito protetor ou de risco (Higgs *et al.*, 1982; Nolan *et al.*, 2005; Parody *et al.*, 2007; Vasavda *et al.*, 2007; Steinberg, 2009; Fertrin & Costa, 2010; Pandey *et al.*, 2011; Ballas *et al.*, 2012; Darbari *et al.*, 2012; Alkindi *et al.*, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência dos haplótipos β^S e da alfa talassemia nas manifestações clínicas da anemia falciforme no Estado de Pernambuco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Descrever os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com anemia falciforme acompanhados na Fundação HEMOPE e avaliar a frequência das principais manifestações clínicas;
- b) Realizar a caracterização molecular dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S e da alfa talassemia em portadores de anemia falciforme;
- c) Correlacionar os dados clínicos e laboratoriais com os haplótipo β^S e a presença de alfa talassemia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO E LOCAL DE DESENVOLVIMENTO

Estudo analítico retrospectivo de corte transversal, realizado no período de março de 2012 a fevereiro de 2016. O estudo foi desenvolvido na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) e no Laboratório Central da Universidade Federal de Pernambuco (LABCEN/UFPE).

4.2 PACIENTES

A amostra inicialmente analisada foi composta por 747 pacientes, de ambos os sexos, portadores de Anemia Falciforme (HbSS) residentes no Estado de Pernambuco. Todos os pacientes estudados foram provenientes da Fundação HEMOPE, instituição de referência no estado de Pernambuco em diagnóstico laboratorial e tratamento das doenças do sangue.

Os pacientes foram selecionados a partir da análise de prontuários médicos e os critérios de inclusão utilizados foram: pacientes em acompanhamento regular no ambulatório do Hospital da Fundação HEMOPE e portadores do genótipo HbSS. Trinta e três pacientes foram excluídos do estudo por apresentarem erro no diagnóstico, material biológico inadequado ou insuficiente ou por não concordarem em participar da pesquisa, dessa forma a amostra final estudada compreendeu 714 pacientes no total.

4.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP Nº. 035/2010) (Anexo A). Após a aprovação, foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Os pacientes, após entrevista, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B), previamente aprovado pelo CEP.

4.4 DADOS CLÍNICOS

A coleta de dados clínicos foi realizada a partir da análise de prontuários médicos e entrevistas durante as consultas ambulatoriais. Utilizamos os critérios de frequência, importância clínica e melhor possibilidade de caracterização, para selecionarmos as manifestações clínicas do estudo (Quadro 3). Do total de 714 pacientes, foram selecionados 125 para constituir o grupo controle. Os critérios de inclusão para o grupo controle foram: pacientes portadores de AF, maiores de 18 anos de idade, sem registro de hipertensão arterial sistêmica ou pulmonar e sem suspeita clínica ou presença de dactilite, STA, úlcera de perna, osteonecrose, priapismo e AVC, com velocidades do Doppler transcraniano normais e sem outras alterações neurológicas, como crises convulsivas e síndrome Moya-Moya.

Quadro 3 - Critérios de inclusão e diferentes manifestações clínicas apresentadas nos pacientes portadores de Anemia Falciforme.

Complicação clínica	Critérios de inclusão
1 CVO/ano	Média de crises dolorosas ou eventos vaso-oclusivos agudos em um ano com necessidade de admissão hospitalar. Categorizadas em 0-2 CVO/ano; 3-5 CVO/ano e >6 CVO/ano.
2 Colelitíase	Presença de cálculos biliares confirmados por ultrassonografia, durante exames de rotina ou em pacientes sintomáticos.
3 Osteonecrose	Pacientes sintomáticos com lesão óssea em ombro ou quadril, com confirmação por registro de ressonância magnética e/ou exame radiológico.
4 STA	Doença respiratória aguda descrita no prontuário médico, com exame radiológico de tórax mostrando presença de infiltrado pulmonar.
5 Priapismo	Registro de menos um episódio de uma ereção dolorosa do pênis, com necessidade de assistência médica e duração maior do que 1 hora.
6 AVC	Confirmado por ressonância magnética / tomografia computadorizada com lesão neurológica isquêmica em pacientes sintomáticos.
7 Úlceras da perna	Registro em prontuários de ulceração da pele na parte inferior das pernas, especialmente na superfície medial ou lateral, com falha na cicatrização no período de duas semanas.

Fonte: Alsultan (2014); Nolan *et al.*, (2005, 2006); Ballas *et al.*,(2012)

No entanto, não foi possível incluir no grupo de controle, pacientes sem colelitíase, devido à alta prevalência desta complicação em nossa população. Assim a manifestação clínica colelitíase foi comparada a um grupo controle específico, com 186 pacientes portadores de AF, idade superior a 18 anos e sem suspeita ou comprovação de colelitíase. Pelo mesmo motivo, as crises vaso-oclusivas também

foram analisadas separadamente, nesse caso as análises foram realizadas frente às médias de CVO/ano, categorizadas em 0-2 CVO/ano; 3-5 CVO/ano e >6 CVO/ano.

4.5 DADOS LABORATORIAIS

Os dados laboratoriais (hematológicos, bioquímicos e quantificação de hemoglobinas) foram obtidos dos resultados de exames de rotina, fixados nos prontuários médicos. Todas as informações foram obtidas quando os pacientes encontravam-se em estado estável da doença (fora de crises álgicas e hemolíticas), sem o uso da medicação hidroxiuréia e sem transfusões recentes. A identificação das hemoglobinas foi realizada por eletroforese alcalina (pH 8,0 a 9,0) em acetato de celulose. A confirmação e quantificação das hemoglobinas (HbF, HbS e HbA₂) foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando o equipamento Variant II System da Bio-Rad Laboratórios, CA, USA, nos pacientes com idade acima de cinco anos e antes do início do tratamento com hidroxiuréia, no caso dos pacientes que faziam uso do fármaco. O hemograma foi realizado no Coulter STKS (Coulter Electronics, Hialeah, FL) e a contagem de reticulócitos, por técnica manual ou automação. Os parâmetros bioquímicos foram determinados utilizando o equipamento Cobas Mira Plus (Roche Diagnostic Systems Corporation, Indianapolis, IN, EUA).

4.6 ANÁLISE MOLECULAR

4.6.1 Coleta de Sangue

Durante as visitas de rotina ou nas convocações foram coletados 8 ml de sangue periférico, em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As amostras coletadas foram conduzidas ao laboratório de Hemoglobinopatias na Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE) do hospital HEMOPE e ao LABCEN/UFPE para análise molecular.

4.6.2 Extração do DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos do sangue periférico pela técnica de fenol-clorofórmio modificada, como descrito previamente de forma detalhada (Davis, Dibner & Battery, 2012).

4.6.3 Reação de Amplificação (PCR)

A amplificação do material genético foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A reação é catalisada pela *Taq* polimerase e utiliza *primers* que se hibridizam em fitas opostas de regiões específicas do genoma e flanqueiam a sequência a ser amplificada. Os ciclos são séries repetidas de desnaturação do DNA, anelamento e extensão dos *primers*, resultando em um acúmulo exponencial do fragmento. Foram utilizadas técnicas específicas baseadas na PCR, de acordo com os procedimentos diagnósticos.

4.6.4 Determinação dos Haplótipos β^S

As análises dos polimorfismos foram realizadas em 706 amostras pela amplificação de cada região do DNA que contém os sítios de interesse pelo método da PCR-RFLP.

Quadro 4 - *Primers* utilizados para amplificação de regiões do *cluster* β e localização referente ao *cluster* β no cromossomo 11 depositados no banco de dados NCBI (ID: U01317).

<i>Primers</i>	Sequência do <i>Primer</i>	Direção	Posição	Região
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	D	33862	5' γ^G
H1	AGGAGCTTATTGATAACTCAGAC	R	34518	
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	D	36203	γ^G
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	R	35422	
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	D	40358	γ^A
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	R	41119	
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	D	46426	$\psi\beta$
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	R	47126	
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	D	49476	3' $\psi\beta$
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	R	50089	
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	D	60906	5' β
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	R	61291	

Legenda: D = Direto; R = Reverso.

Para os haplótipos β^S foram analisados 6 sítios polimórficos (5' γ^G -*Xmn*I, γ^G -*Hind*III, γ^A -*Hind*III, $\psi\beta$ -*Hinc*II, 3' $\psi\beta$ -*Hinc*II, 5' β -*Hinf*I), como descrito no quadro 4 (Sutton, Bouhassira & Nagel, 1989). A composição das reações e condições de amplificação variaram dependendo da região polimórfica e estão representadas nos quadros 5 e 6, respectivamente.

Quadro 5 - Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina β .

Componentes	Volumes (μ l)					
	<i>Xmn</i> I 5' γ^G	<i>Hind</i> III γ^G	<i>Hind</i> III γ^G	<i>Hinc</i> II $\psi\beta$	<i>Hinc</i> II 3' $\psi\beta$	<i>Hinf</i> I 5' β
Tampão (10x)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
MgCl ₂ (50mM)	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5
dNTP's (10mM)	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0
Primer 5' (10 μ M)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer 3' (10 μ M)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Taq DNA Polimerase (5U/ μ l)	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
DNA (200 ng)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
dH ₂ O	37,75	38,0	38,0	38,0	38,0	38,25
Volume Final (μl)	50	50	50	50	50	50

Quadro 6 - Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina β .

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

Para confirmação da amplificação o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta, para posterior análise de restrição.

Para a análise de restrição, o produto da PCR foi digerido a 37°C durante 24 horas, com endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico (Quadro 7). A identificação dos padrões de restrição que determinam os haplótipos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.

Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição. Como controle foi utilizado uma amostra heterozigota e uma amostra normal para cada sítio polimórfico. O tamanho dos produtos de amplificação e os fragmentos após clivagem podem ser observados no quadro 7.

Quadro 7 - Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.

Primers	Enzima	Região	Tamanho fragmento	Fragmentos após clivagem
H0 e H1	<i>XmnI</i>	5' γ^G	650 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>HindIII</i>	γ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>HindIII</i>	γ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>HincII</i>	$\psi\beta$	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>HincII</i>	3' $\psi\beta$	590 pb	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>Hinf I</i>	5' β	380 pb	240 pb + 140 pb

De acordo com perfil de restrição para as regiões polimórficas do *cluster* da globina β , foi possível definir os haplótipos β^S (figura 3). Pacientes que apresentaram padrão de restrição diferente do perfil predeterminado na literatura foram classificados como haplótipo Atípico.

4.6.5 Pesquisa do Genótipo α

A pesquisa da mutação $-\alpha_2^{3,7Kb}$ foi investigada em 707 amostras por *gap*-PCR, utilizando os *primers* C2 e C10 (quadro 8), oligonucleotídeos iniciadores que se ligam na região que compreende a possível deleção. O produto amplificado gera um fragmento de 2,1kb para o haplótipo normal ($\alpha\alpha$) e de 1,9kb para o haplótipo mutante ($-\alpha^{3,7Kb}$), conforme previamente descrito (figura 7) (Dodé *et al.*, 1993).

Quadro 8 - Sequências dos *primers* para pesquisa da deleção $\alpha^{3,7Kb}$. Localização referente ao gene α no cromossomo 16 depositados no banco de dados NCBI (ID: J00153).

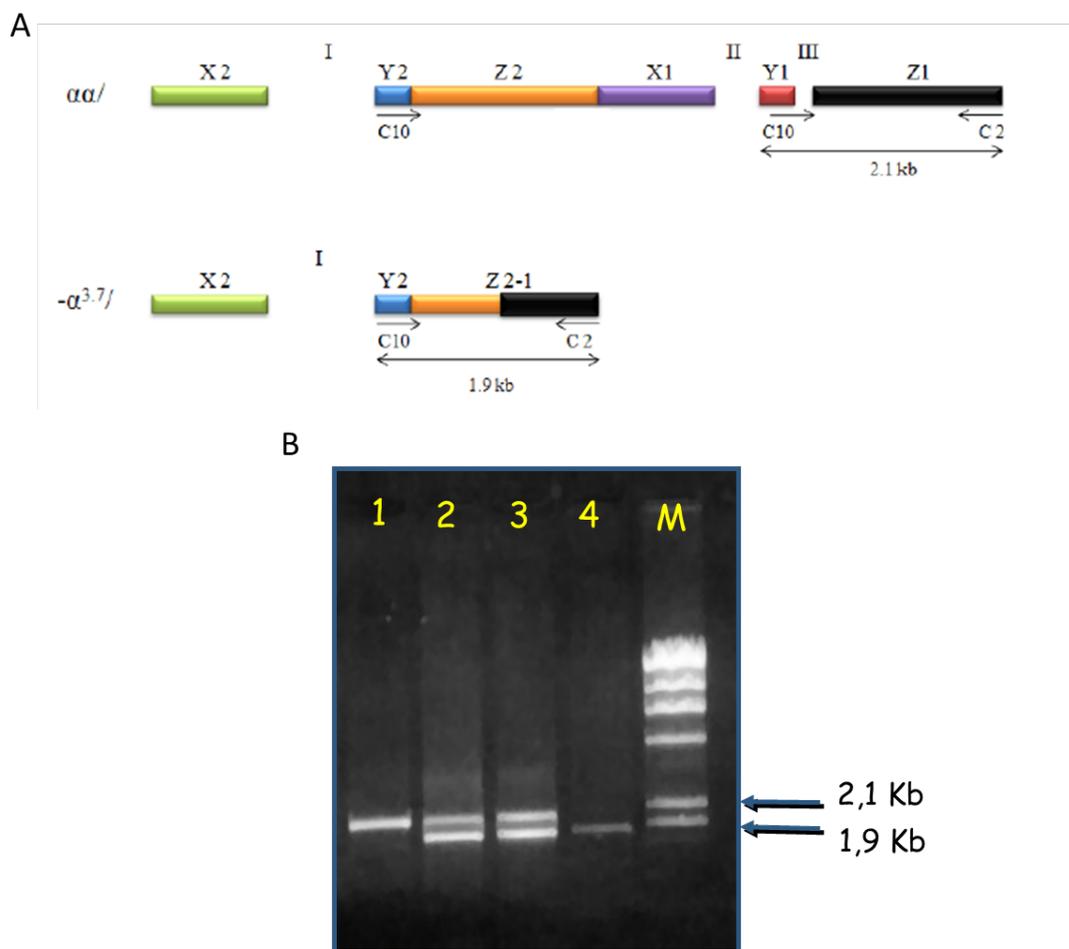
Primers	Sequencia do Primer (5'-3')	Direção	Posição
C2	CCATGCTGGCACGTTTCTGA	R	11365
C10	GATGCACCCACTGGACTCCT	D	5641

Legenda: D=Direto; R=Reverso

*Tampão α para PCR - Soluções estoque: 3,35 ml de Tris-HCl 2M (pH 8,6); 1,66 ml de $(NH_4)_2SO_4$ 1M; 250 μ l de $MgCl_2$ 1M; 33,5 μ l de Na_2EDTA 0,2M; 85 μ l de BSA-20 mg/ml; 70 μ l de β mercaptoetanol 14,3M, para um volume final de 10 ml com dH_2O . Todas as soluções estoque devem ser autoclavadas, exceto $MgCl_2$ que é filtrada.

A seguinte reação de PCR foi utilizada: 1,0 μ l de DNA (250ng); 2,5 μ l de tampão α^* ; 2,5 μ l de DMSO; 0,75 μ l de dNTP 10mM; 0,5 μ l de cada *primer* 10 μ M; 0,25 μ l de taq polimerase 5U/ μ l, em um volume final de 25,0 μ l de água. Condições de ciclagem da PCR: desnaturação inicial a 94°C - 10'; 30 ciclos de 94°C - 45", 56°C - 1' e 72°C - 1'; extensão final 72°C - 7'.

Figura 7 - Reação de gap-PCR para a deleção $-\alpha^{3,7Kb}$.



Legenda: (A) Os *primers* C2 e C10 vão se ligar a regiões homólogas Y e Z no genótipo normal ($\alpha\alpha$) e no mutante ($-\alpha^{3,7Kb}$). Entre dois blocos Z homólogos estão contidos os genes α_2 e α_1 (não ilustrados aqui). Devido ao *crossing-over* desigual que ocorre na mutação, os produtos de PCR possuem diferentes tamanhos de fragmentos (2,1Kb e 1,9Kb). (B) Os fragmentos amplificados podem ser diferenciados por gel de agarose. Os genótipos descritos na figura são: 1 ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$); 2 ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$); 3 ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$); 4 ($-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$).

Fonte: modificado de Dodé *et al.* (1993).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características clínicas e laboratoriais dos pacientes foram apresentadas descritivamente. O teste Chi-quadrado ou exato de Fisher's (quando aplicável) foi utilizado para comparações entre variáveis categóricas e o Kruskal-Wallis foi utilizado para comparações entre as variáveis contínuas. O risco para o desenvolvimento das manifestações foi avaliado a partir da análise das datas de desenvolvimento das complicações, em relação à data de nascimento.

Curvas de incidência cumulativa foram construídas refletindo o tempo para o desenvolvimento das complicações com o teste de Gray utilizado para a comparação das curvas (Kim, 2007). O risco foi definido pelo odds ratio (OR) com intervalo de confiança (CI) de 95% e nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando os softwares SPSS Statistics 19.0 (IBM corporation), Stata Statistic/Data Analysis versão 12 (Stata corporation, EUA).

5 RESULTADOS

Dos 714 pacientes portadores de anemia falciforme analisados, 589 (82,5%) desenvolveram pelo menos uma das manifestações clínicas: síndrome torácica aguda, osteonecrose, priapismo, acidente vascular cerebral e úlcera de perna. As manifestações clínicas mais frequentes foram coletitíase (57,3%) e crises vaso-oclusivas (46% apresentaram >3 CVOs ao ano), seguidos por priapismo (27,6% dos homens) e úlcera de perna (20,3%). A mediana da idade dos 714 pacientes foi de 25 anos (4-61 anos) e 347 (48,6%) eram do sexo masculino. Os 125 pacientes controles apresentaram mediana de idade de 28 anos (18-52 anos) e 43 (34%) pacientes do sexo masculino (Tabela 1).

Tabela 1 - Características clínico-laboratoriais de pacientes com anemia falciforme.

Características (n=714)	n ou Mediana	(% ou intervalo)
Idade, Anos	25	(4 – 61)
Sexo: Masculino/Feminino	347/367	(48,6/51,4)
Complicações:		
Crises Vaso-Oclusiva:		
0-2/Anos	385	(53,9)
3-5/Anos	272	(38,1)
>6/Anos	57	(8,0)
Coletitíase	409	(57,3)
Osteonecrose	84	(11,7)
STA	93	(13,0)
Priapismo	96	(27,6) ¹
AVC	69	(9,7)
Úlcera de Perna	145	(20,3)
Óbitos	51	(7,1)
Controles		
Idade, Anos	28	(18-52)
Sexo: Masculino/Feminino	43/83	(34/66)

Legenda: ¹ Apenas o sexo masculino foi considerado.

Fonte: O autor (2017).

Mais de uma manifestação clínica foi observada em 315 pacientes (44,1%). Do total de pacientes investigados, 28,1% apresentaram dois tipos de complicações, 11,7% três tipos e poucos pacientes apresentaram quatro (3,6%) ou mais (0,56%) manifestações clínicas distintas.

Os haplótipos β^S de 706 pacientes foram analisados e o mais prevalente foi o haplótipo Bantu, com uma frequência de 92% na população. Diferentes associações haplotípicas foram encontradas, com maior frequência para o genótipo Bantu/Bantu (56,5%), seguida da associação Bantu/BEN (24,8%). Nos 1412 cromossomos estudados, o haplótipo Bantu apresentou a maior frequência (74,3%), seguido do

Benin (18,4%), os demais haplótipos apresentaram uma baixa frequência na população. Em 91 (6,4%) cromossomos analisados, não foi possível caracterizar o haplótipo β^S , sendo estes classificados como Atípicos (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência da alfa talassemia (deleção $\alpha_2^{3.7 \text{ kb}}$) e dos haplótipos β^S em portadores de anemia falciforme.

Características Moleculares	N	(%)
Haplótipos β^S (n=706)		
Bantu/Bantu	399	(56,5)
Bantu/BEN	175	(24,8)
Bantu/ATP	72	(10,2)
BEN/BEN	37	(5,00)
BEN/ ATP	10	(1,40)
ATP/ATP	8	(1,10)
Bantu/CAM	2	(0,28)
Bantu/SAUDI	2	(0,28)
Bantu/SEN	1	(0,14)
BEN/SAUDI	2	(0,28)
BEN/CAM	1	(0,14)
SEN/ATP	1	(0,14)
Haplótipos β^S (1412 cromossomos)		
Bantu	1050	(74,3)
BEN	262	(18,4)
ATP	91	(6,40)
SAUDI	4	(0,56)
CAM	3	(0,42)
SEN	2	(0,28)
Deleção $\alpha^{3.7}$ (n=707)		
- α / α	19	(2,68)
- α / $\alpha\alpha$	149	(21,07)
$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	539	(76,20)

Legendas: BEN (Benin); ATP (Atípico); SAUDI (Árabe-Indiano); CAM (Camarões); SEN (Senegal).

Fonte: O autor (2017).

Nesse estudo, não houve associação entre os haplótipos β^S e as manifestações clínicas estudadas (Tabela 3). A análise comparativa foi realizada com os haplótipos Bantu/Bantu versus não Bantu/Bantu, a ausência de associação foi também observada ao analisarmos os diferentes haplótipos e as combinações genóticas separadamente.

A deleção $\alpha^{3.7\text{kb}}$ esteve presente em 168 pacientes (23,7%) (Tabela 2). A presença dessa deleção foi associada ao menor risco para o desenvolvimento de acidente vascular cerebral ($p = 0,026$; OR: 0,38; IC95%: 0,16-0,89), colelitíase ($p = 0,006$; OR: 0,56; IC95%: 0,37-0,83) e priapismo ($p = 0,050$; OR: 0,41; IC95%: 0,18-0,93) (Tabela 3). Essa deleção não foi associada às manifestações clínicas:

síndrome torácica aguda, úlcera de perna, osteonecrose e crise vaso-oclusiva. Nos pacientes normais para a deleção $\alpha^{3.7kb}$ ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), a frequência de acidente vascular cerebral, priapismo e colelitíase foi de 8,4% (60/714), 21,5% (79/367), 49,5% (328/714), respectivamente. Enquanto que os pacientes com uma ou duas deleção $\alpha^{3.7kb}$ ($-\alpha/\alpha\alpha$ ou $-\alpha/-\alpha$) apresentaram uma frequência de 1,1% (8/714) para AVC, 4,6% (17/367) para o priapismo e 11,0% (79/714) para colelitíase.

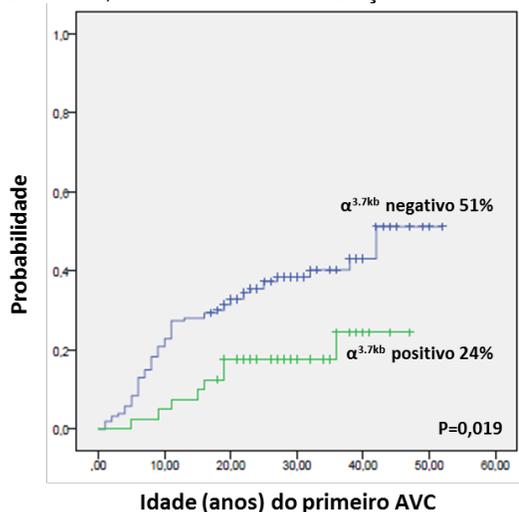
Tabela 3 - Análise da deleção $\alpha^{3.7kb}$ e dos Haplótipos β^S de acordo com a ocorrência de diferentes manifestações clínicas na anemia falciforme.

Manifestações Clínicas:	α Thalassemia				P-valor	Haplótipo β^S				P-valor
	$\alpha^{3.7}$ positivo		$\alpha^{3.7}$ negativo			Bantu/Bantu		Não Bantu/Bantu		
	N	%	n	%		n	%	n	%	
STA	22	(24,1)	69	(75,8)	0,874	54	(59,3)	37	(40,6)	0,779
OR: CI95%			0,92 (0,49-1,73)					0,91 (0,52-1,58)		
Úlcera de Perna	28	(19,4)	116	(80,5)	0,243	79	(54,8)	65	(45,1)	0,269
OR: CI95%			0,70 (0,39-1,24)					0,75 (0,46-1,23)		
Osteonecrose	24	(28,6)	60	(71,4)	0,637	49	(58,3)	35	(41,6)	0,667
OR: CI95%			1,16 (0,62-2,16)					0,87 (0,49-1,53)		
AVC	8	(11,7)	60	(88,2)	0,026	45	(66,1)	23	(33,8)	0,639
OR: CI95%			0,38 (0,16-0,89)					1,22 (0,65-2,26)		
Priapismo	17	(17,7)	79	(82,3)	0,050	59	(61,4)	37	(38,5)	1,000
OR: CI95%			0,42 (0,18-0,93)					1,00 (0,48-2,08)		
Controle	32	(25,4)	93	(74,6)		77	(61,1)	48	(38,9)	
Colelitíase	79	(19,4)	328	(80,5)	0,006	226	(50,8)	180	(47,6)	0,283
Não Colelitíase	56	(30,1)	130	(69,8)		113	(60,7)	73	(39,2)	
OR: CI95%			0,56 (0,37-0,83)					0,81 (0,57-1,15)		
CVO/ano:					0,361					0,304
0-2/Anos	82	(21,6)	297	(78,3)		214	(56,5)	165	(43,5)	
3-5/Anos	71	(26,2)	200	(73,8)		158	(58,3)	112	(41,3)	
>6/Anos	15	(26,3)	42	(73,6)		27	(47,3)	30	(52,6)	

Fonte: O autor (2017).

Avaliando o impacto da deleção $\alpha^{3.7kb}$ no tempo de desenvolvimento do AVC, a média de seguimento para o desfecho foi de 36 anos (IC95%: 33 -39 anos). Os pacientes portadores de alfa talassemia ($-\alpha/\alpha\alpha$ e $-\alpha/-\alpha$) apresentaram taxa de desenvolvimento de AVC de 24%, com média de seguimento de 40 anos (IC95%: 36-44 anos). Em contrapartida, os pacientes com genótipo normal para a deleção $\alpha^{3.7kb}$ ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) apresentaram taxa de desenvolvimento 51% com média de seguimento de 34 anos (IC95%: 31-38 anos) ($p = 0,019$; Figura 8).

Figura 8 - Probabilidade de surgimento do Acidente Vascular Cerebral em pacientes com anemia falciforme, de acordo com a mutação $\alpha^{3.7kb}$.



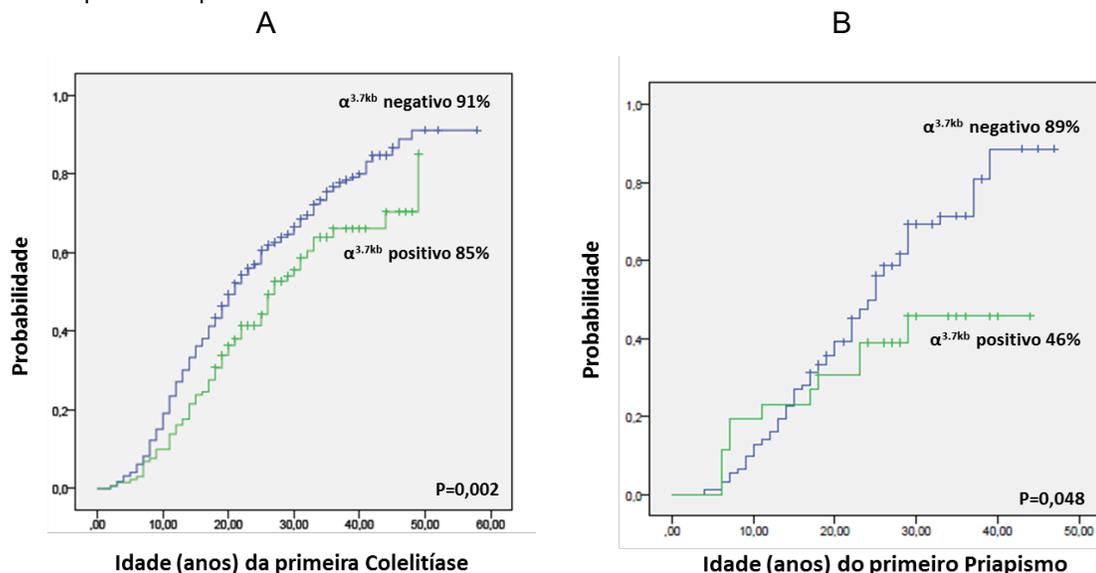
Fonte: O autor (2017).

Ao avaliar o impacto da deleção $\alpha^{3.7kb}$ no tempo de desenvolvimento de colelitíase, a média de seguimento para o desfecho foi de 22 anos (IC95%: 20-24 anos). Assim como no AVC, pacientes com alfa talassemia apresentaram uma menor taxa de desenvolvimento de colelitíase (85%), com média de seguimento de 29 anos (IC95%: 26-32 anos) quando comparados com pacientes sem a deleção $\alpha^{3.7kb}$. Os pacientes com genótipo normal para a deleção $\alpha^{3.7kb}$ ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) apresentaram taxa de desenvolvimento de 91% com média de seguimento de 25 anos (IC95%: 23-27 anos; $p=0,002$) (Figura 9).

Enquanto que a análise do impacto da mutação $\alpha^{3.7kb}$ no tempo de desenvolvimento de priapismo, mostrou uma média de seguimento para o desfecho de 26 anos (IC95%: 24-29 anos). Portadores de alfa talassemia apresentaram taxa de desenvolvimento de 46% para o priapismo, com média de seguimento de 30 anos (IC95%: 24-36 anos); pacientes com genótipo normal para a deleção $\alpha^{3.7kb}$ ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) apresentaram taxa de desenvolvimento 91% com média de seguimento de 25 anos (IC95%: 23-28 anos; $p=0,002$) (Figura 9).

A análise dos dados laboratoriais: níveis de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), leucócitos totais (WBC), contagem de reticulócitos, HbF, bilirrubina indireta (BI) e lactato desidrogenase (LDH) não mostrou associação com os diferentes genótipos da alfa talassemia estudados. Do mesmo modo, não houve diferença significativa entre os parâmetros hematológicos estudados e os haplótipos β^S (Tabela 4).

Figura 9 - Impacto da alfa talassemia (mutação $\alpha^{3.7kb}$) no tempo de desenvolvimento da Colelitíase e Priapismo em portadores de anemia falciforme.



Legenda: Portadores de AF e alfa talassemia apresentam uma menor taxa de desenvolvimento de Colelitíase (A) e para (B) Priapismo.

Fonte: O autor (2017).

Tabela 4 - Dados laboratoriais de acordo com os genótipos da alfa talassemia e haplótipos β^S na anemia falciforme.

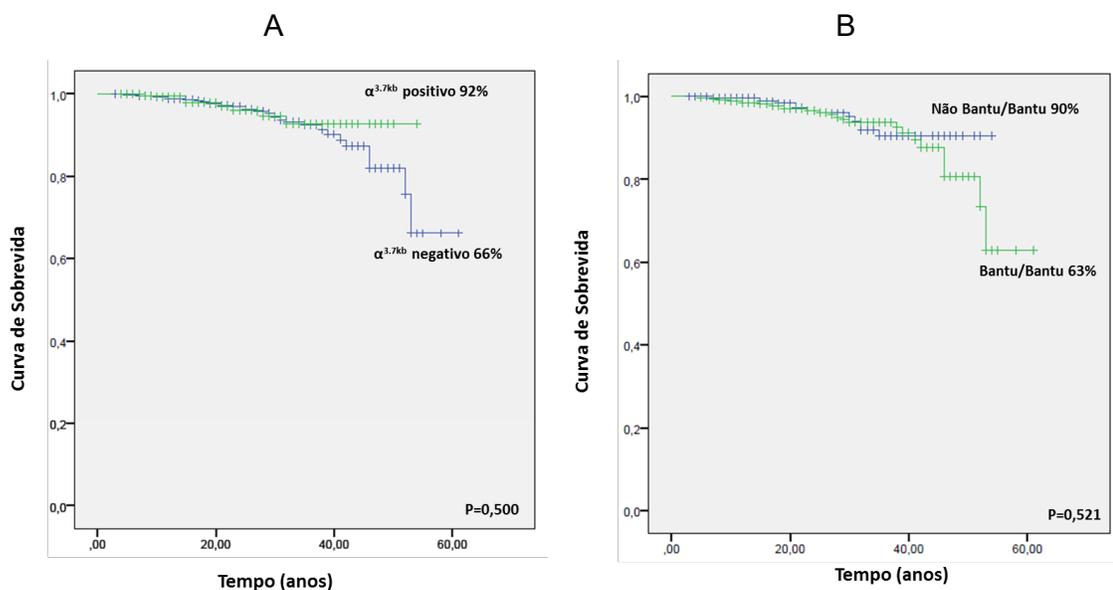
	α Thalassemia		P-valor	Haplótipo β^S		P-valor
	$\alpha^{3.7}$ positivo	$\alpha^{3.7}$ negativo		CAR/CAR	Não CAR/CAR	
	Mediana (intervalo)	Mediana (intervalo)		Mediana (intervalo)	Mediana (intervalo)	
Hb (g/dl)	7,8 (4,8,-10,9)	7,7 (4,2-11,6)	0,161	7,7 (4,2-11,5)	7,8 (4,6-11,6)	0,330
Ht (%)	23,8 (14,7-34,1)	23,4 (12,1-35,1)	0,198	23,3 (12,1-34,1)	23,6 (14,7-35,1)	0,261
WBC ($\times 10^9/l$)	12,8 (5,2-32,5)	12,9 (4,2-34,1)	0,456	13,2(5,1-32,5)	12,4 (4,2-34,1)	0,103
Reticulócitos	9,9 (0,4-25,3)	10,4 (0,5-29,2)	0,334	10,4 (0,4-28)	10,2 (1,3-29,2)	0,844
HbF (%)	7,7 (0,9-26,0)	7,3 (0,5-28,0)	0,232	7,6 (0,5-24,7)	8,0 (0,7-28,0)	0,112
BI (mg/dl)	2,8 (0,08-13,5)	2,6 (0,04-36,19)	0,730	2,6 (0,08-13,5)	2,7 (0,04-36,2)	0,831
LDH (u/l)	913 (192-3188)	930 (219-3692)	0,988	977 (233-3692)	862 (192-2756)	0,102

Fonte: O autor (2017).

A média de seguimento dos pacientes do estudo foi de 13 anos (0-34 anos), durante este período, 51 (7,14%) pacientes foram a óbito. Entretanto, 14 óbitos não estavam relacionados com a anemia falciforme ou não havia registro de causa morte no prontuário médico. Dessa forma, 37 (5,3%) pacientes foram a óbito com complicações decorrentes da anemia falciforme e foram usados para calcular o risco de morte na população.

A idade média do óbito entre pacientes com AF foi de 25 anos. A principal causa de óbito foi a infecção respiratória e septicemia associada (43,1%), nesse grupo também estão incluídos os casos de STA; a segunda maior causa de óbito foi o acidente vascular cerebral (11,7%). A análise da sobrevivência global mostrou que os pacientes portadores da deleção $\alpha^{3.7kb}$ não apresentaram melhor sobrevida na anemia falciforme. Similarmente os haplótipos β^S não apresentaram influência na sobrevida global dos pacientes (Figura 10).

Figura 10 – Curva de sobrevida global para pacientes portadores de alfa talassemia



Legenda: (A) presença ou ausência de alfa talassemia, (B) presença ou ausência do haplótipo Bantu/Bantu.

Fonte: O autor (2017)

6 DISCUSSÃO

Embora a anemia falciforme decorra de uma mutação pontual, o gene da globina β^S é pleiotrópico na sua natureza e provoca o desenvolvimento de várias complicações clínicas, que constituem as múltiplas expressões fenotípicas da anemia falciforme (Alexander *et al.*, 2004; Steinberg, 2005; Ballas *et al.*, 2012). Apresentamos aqui uma população de portadores de AF acompanhados no Estado de Pernambuco, genotipados para alfa talassemia e haplótipo β^S , clinicamente analisados, com alta frequência e grande variedade de manifestações clínicas.

Nossos resultados confirmam a alta prevalência do haplótipo Bantu no Estado de Pernambuco, com frequência total de 74,3%. O estudo de Bezerra e colaboradores (2007), também demonstrou a prevalência do haplótipo Bantu (81,1%) em Pernambuco, no entanto esse estudo foi realizado em uma amostra diferente, com 74 crianças detectadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Pernambuco (Bezerra *et al.*, 2007). Outras regiões do Brasil também mostraram a predominância do haplótipo Bantu. Estudos realizados em São Paulo encontraram uma frequência de 57,2% a 66,2% para este haplótipo (Zago, Figueiredo & Ogo, 1992; Figueiredo *et al.*, 1996; Camilo-Araujo *et al.*, 2014); o mesmo foi observado em outros estados brasileiros incluindo o Rio de Janeiro (54,0% e 56,9%), Rio Grande do Norte (75,5%), Pará (60% e 67%), Minas Gerais (57% e 61%) (Belisario *et al.*, 2010a), Paraná (62%) e Rio Grande do Sul (66% e 67,3%) (Lindenau, 2009; Silva & Gonçalves, 2009; Cardoso & Guerreiro, 2010; Cabral *et al.*, 2011; da Silva *et al.*, 2014a; Shimauti *et al.*, 2015; Leal *et al.*, 2016). Tais resultados mostram que, de fato, o haplótipo Bantu é o mais prevalente no Brasil e, atualmente, o estado de Pernambuco é o que apresenta a maior prevalência. Apenas no estado da Bahia, não se observa claramente o predomínio do haplótipo Bantu, nesta região as frequências dos haplótipos Bantu (41% a 48,1%) e Benin (45,6% a 55%) podem ser consideradas semelhantes (Gonçalves *et al.*, 2003; Adorno *et al.*, 2004; Adorno *et al.*, 2008). A distribuição de haplótipos na população mundial varia de acordo com as migrações históricas dos povos da África (Bitoungui *et al.*, 2015).

A combinação haplotípica Bantu/Bantu foi a mais frequentemente encontrada no presente estudo (56,5%). As combinações haplotípicas descritas nas populações brasileiras variam entre Estados. Bantu/Bantu também foi o haplótipo mais prevalente no Rio Grande do Sul (55,2%), Rio de Janeiro (48,8%) e Minas Gerais

(39%) (Belisario *et al.*, 2010a; Filho *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2014a), enquanto que a combinação Bantu/Benin esteve presente em maior frequência no Paraná (41,1%), em seguida Bahia (54,0%) e São Paulo (36,7%) (Adorno *et al.*, 2004; Camilo-Araujo *et al.*, 2014; Shimauti *et al.*, 2015).

Os pacientes desse estudo apresentam uma alta frequência e grande diversidade de manifestações clínicas. A maior frequência observada foi em colelitíase (57,3%) e crises vaso-oclusivas (46,1% >3 CVOs/ano). Esse resultado corrobora com dados do Estudo Cooperativo da Doença Falciforme (CSSCD), que descreveu as CVOs como a manifestação clínica mais prevalente na AF em uma grande população dos Estados Unidos (Platt *et al.*, 1991). O estudo prospectivo multicêntrico *PUSH* (Hipertensão pulmonar e resposta a hipóxia na Doença Falciforme) mostrou que 20% dos pacientes apresentavam relato de mais de 3 episódios vaso-oclusivos em um ano (Darbari *et al.*, 2012).

No presente estudo, 44,1% dos pacientes apresentaram duas ou mais manifestações clínicas e em muitos casos com reincidência. A gravidade clínica da AF encontrada na amostra poderia estar associada à alta frequência do haplótipo Bantu, considerado o haplótipo de pior prognóstico, seguido do haplótipo Benin, descrito como risco intermediário para a doença (Powars & Hiti 1993; Steinberg, 2009).

Nesta análise, foram selecionados 125 pacientes com mais de 18 anos de idade, que não desenvolveram qualquer manifestação clínica de: STA, osteonecrose, priapismo, AVC e úlcera de perna. No entanto, não podemos caracterizar esse grupo de pacientes com um perfil benigno, uma vez que 34,1% deles tiveram mais de 3 crises vaso-oclusivas/ano e 54,7% desenvolveram colelitíase. Muitos desses pacientes também apresentaram infecções recorrentes, necessitando de internamentos. Assim como o total de pacientes do estudo, esses 125 pacientes também apresentaram uma alta frequência para o haplótipo Bantu (74,3%) e combinação haplotípica Bantu/Bantu (61,1%).

Entretanto, nas análises realizadas neste estudo, não encontramos correlação entre os haplótipos β^S e as manifestações clínicas estudadas: CVO/ano, colelitíase, osteonecrose, STA, priapismo, AVC e úlceras da perna. A presença do haplótipo Bantu na grande maioria dos pacientes poderia explicar em parte a ausência de associação com os fenótipos da AF. O resultado corrobora dados da literatura brasileira em populações com perfil haplotípico semelhante ao nosso, que,

similarmente, não encontraram associação com manifestações clínicas (Figueiredo *et al.*, 1996; Belisario *et al.*, 2010a; Cardoso & Guerreiro 2010; Camilo-Araujo *et al.*, 2014; da Silva *et al.* 2014a; Shimauti *et al.*, 2015; Leal *et al.*, 2016).

Os haplótipos β^S também não apresentaram correlação com os níveis de HbF. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos com populações de portadores de AF que apresentavam elevada frequência dos haplótipos Bantu e Benin, além de não ser encontrada correlação com os níveis de HbF, também não houve associação com manifestações clínicas da AF (Rieder *et al.*, 1991; Flanagan *et al.*, 2011; Camilo-Araujo *et al.*, 2014).

Apesar dos haplótipos β^S serem descritos como importantes moduladores da HbF na anemia falciforme e associações significativas entre os haplótipos e o fenótipo da AF serem relatadas, a sua utilidade como um marcador prognóstico isolado no acompanhamento clínico é limitada (Powars & Hiti 1993; Quinn & Miller 2004; Steinberg 2009). Variações importantes nos níveis de HbF podem ocorrer nos pacientes com AF. É provável que determinantes genéticos não relacionados com os haplótipos ligados ao *cluster* β , como os polimorfismos *BCL11A* e *HBS1L-MYB* também exerçam papel de modulação na expressão da HbF (Lettre *et al.*, 2008; Akinsheye *et al.*, 2011; Ngo *et al.*, 2013). Além da HbF, não houve associação significativa entre os haplótipos e outros parâmetros hematológicos.

A alfa talassemia foi encontrada em 23,7% dos nossos pacientes. Esta frequência está de acordo com estudos prévios que encontraram uma frequência entre 20% e 35% em portadores de anemia falciforme de regiões da América do Norte e América do Sul (Steinberg & Embury 1986; Castro *et al.*, 1994; Arends *et al.*, 2000; Neonato *et al.*, 2000; Adorno *et al.*, 2008; Belisario *et al.*, 2010b). Diversos estudos tem demonstrado o papel benéfico de alfa talassemia no perfil clínico global da AF, particularmente em subfenótipos hemolíticos, incluindo a hipertensão pulmonar, úlcera de perna, acidente vascular cerebral e priapismo (Koshy *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1995; Nolan *et al.*, 2005b; Steinberg, 2009).

A presença de alfa talassemia esteve associada como fator de proteção para o desenvolvimento de AVC, colelitíase e priapismo. O efeito protetor da alfa talassemia sobre a incidência do AVC na anemia falciforme foi descrito previamente e confirmado em diferentes populações (Adams *et al.*, 1994; Ohene-Frempong *et al.*, 1998; Neonato *et al.*, 2000; Belisario *et al.*, 2010b; Domingos *et al.*, 2014). A

frequência de AVC observada no estudo (9,7%) foi similar à descrita na literatura (5%-11%) (Ohene-Frempong *et al.*, 1998; Neonato *et al.*, 2000). Dentre as diferentes complicações clínicas da AF, o AVC se destaca pela consequência catastrófica à vida do paciente (Sebastiani *et al.*, 2005). A fisiopatologia do efeito protetor que a alfa talassemia confere a este fenótipo ainda não é clara, aparentemente os portadores de alfa talassemia apresentam uma menor hemólise e melhora do processo inflamatório (Steinberg & Rodgers, 2001; Adams *et al.*, 2003; Belisario *et al.* 2010b; Fertrin & Costa, 2010).

De acordo com a literatura, a frequência do desenvolvimento da colelitíase na anemia falciforme é idade dependente, com menor frequência em crianças e maior em adultos, ficando mais elevada com o passar da idade, e apresenta uma variação de 30% a 70% (Haider *et al.*, 1998; Chaar, Diara & Clayton, 2005; Vasavda *et al.*, 2007; Curro *et al.*, 2007). A nossa população apresentou uma mediana de idade de 25 anos (4-61 anos) e uma frequência de 57,3% de colelitíase que corrobora com esses achados. O desenvolvimento de cálculos biliares normalmente é resultante da degradação da hemoglobina. Assim a coexistência com a alfa talassemia pode estar associada à uma redução do aparecimento de cálculos, visto que ocorre uma menor taxa de hemólise (Haider *et al.*, 1998). O efeito protetor da alfa talassemia que observamos em nossos pacientes com AF, está de acordo com relatos prévios (Haider *et al.*, 1998; Powars *et al.*, 2002; Vasavda *et al.*, 2007), mas alguns autores não o encontraram (Parody *et al.*, 2007; Alkindi *et al.*, 2015). Dados controversos podem ocorrer devido a estudos realizados em crianças e em pequenas populações. Somado a isso, a influência da dieta local na colelitíase, além de outros fatores genéticos moduladores como o polimorfismo UGT1A1, poderiam estar relacionados (Chaar *et al.*, 2006; Ballas *et al.*, 2012).

A alfa talassemia esteve associada como fator protetor para o desenvolvimento de priapismo no presente estudo. Esta mesma associação foi encontrada por Nolan e colaboradores em um estudo multicêntrico (CSSCD) realizado em uma população de 1737 pacientes com AF, provenientes da América do Norte ($p=0,052$). (Nolan *et al.*, 2005b). Steinberg também descreve o efeito protetor da alfa talassemia no priapismo (Steinberg, 2005; Steinberg, 2009). Apesar das associações clínicas encontradas com a alfa talassemia, não houve diferença entre os parâmetros laboratoriais marcadores de hemólise entre indivíduos com e sem a deleção $\alpha^{3.7kb}$.

Apesar da úlcera de perna também ser descrita como um subfenótipo hemolítico da anemia falciforme (Kato, Gladwin & Steinberg, 2007), não foi encontrada associação entre a alfa talassemia e esta manifestação clínica na presente população. Dados controversos são encontrados em diferentes estudos, que associam a alfa talassemia como fator de proteção para a úlcera de perna (Higgs *et al.*, 1982; Kato, Gladwin & Steinberg, 2007; Pandey *et al.*, 2011). A sua causa é desconhecida, mas de forma semelhante a outras complicações da anemia falciforme, pode estar relacionada com um menor grau de hemólise e maior nível de hemoglobina (Koshy *et al.*, 1989; Steinberg & Rodgers, 2001; Nolan *et al.*, 2006). Além disso, outras potenciais causas podem estar influenciando o desenvolvimento das úlceras de perna, como fatores socioeconômicos e ambientais, como traumas (incluindo picadas de insetos, comuns em áreas tropicais), infecção e inflamação local (Minniti *et al.*, 2010).

A menor concentração de HbS que ocorre nos pacientes com AF que apresentam alfa talassemia, leva a uma menor hemólise e conseqüentemente, pode resultar em elevação da viscosidade do sangue; além disso, a alfa-talassemia não está associada com níveis mais elevados de HbF (Driss *et al.*, 2009; Belisario *et al.*, 2010b). Assim, as manifestações clínicas com perfil mais vaso-oclusivo, como crises vaso-oclusivas, STA e osteonecrose, poderiam estar relacionadas a um maior risco de desenvolvimento nos pacientes portadores de alfa talassemia, entretanto existem resultados conflitantes (Milner *et al.*, 1991; Castro *et al.*, 1994; Gill *et al.*, 1995; Fertrin & Costa, 2010; Darbari *et al.*, 2012). Entretanto, na nossa população não foi encontrada associação de risco ou proteção para esses fenótipos vaso-oclusivos e a alfa talassemia.

A coexistência com a alfa talassemia foi relacionada com um aumento da expectativa de vida dos pacientes com anemia falciforme (Fabry *et al.*, 1984; Rumaney *et al.*, 2014). Powars e colaboradores (2002) mostraram um perfil clínico mais favorável nos pacientes com doença falciforme e alfa talassemia. Steinberg em 2005, relatou que a alfa talassemia parece ter pouco efeito no curso clínico da AF quando comparada com a influência da HbF. Embora aparentemente a alfa talassemia exerça um efeito protetor em algumas manifestações clínicas da AF, não houve impacto na sobrevida global dos pacientes. Também não houve diferença entre a sobrevida global de pacientes com base nos haplótipos ligados ao *cluster* β^S .

Resultados semelhantes foram descritos numa população de 102 pacientes da Jamaica (Bakanay *et al.*, 2005).

Diversos estudos foram descritos no Brasil com a avaliação do perfil clínico da AF e os marcadores moleculares clássicos alfa talassemia e haplótipos. Entretanto, a maioria dos trabalhos foram realizados em populações com número de pacientes limitado e/ou referentes a pacientes pediátricos (Zago *et al.*, 1992; Figueiredo *et al.*, 1996; Gonçalves *et al.*, 2003; Adorno *et al.*, 2004; Bezerra *et al.*, 2007; Adorno *et al.*, 2008; Silva & Gonçalves, 2009; Belisario *et al.*, 2010a; Cardoso & Guerreiro, 2010; Filho *et al.*, 2010; Belisario *et al.*, 2010b; Cabral *et al.*, 2011; Camilo-Araujo *et al.*, 2014; da Silva *et al.*, 2014a; Shimauti *et al.*, 2015; Leal *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2016). O presente estudo constituiu o maior levantamento populacional da alfa talassemia e haplótipos β^S na AF realizado no Brasil e um dos maiores da literatura. Nós relatamos aqui o efeito protetor da alfa talassemia no desenvolvimento de acidente vascular cerebral, priapismo e colelitíase na AF. Além disso, a população apresentou uma grande variedade de manifestações clínicas, com alta frequência para o haplótipo Bantu e não houve associação entre os haplótipos e as diferentes manifestações clínicas estudadas.

Compreender a heterogeneidade clínica específica de cada população é um passo importante e necessário para um melhor acompanhamento clínico e tratamento da anemia falciforme. Os resultados aqui descritos mostram que a investigação da alfa talassemia em pacientes com anemia falciforme pode ser uma ferramenta útil para um melhor acompanhamento clínico desses pacientes.

7 CONCLUSÃO

1. O haplótipo β^S Bantu foi descrito como o haplótipo mais frequente na população de Pernambuco;
2. Os Haplótipos β^S não mostraram associação com o desenvolvimento das manifestações clínicas CVO, colelitíase, osteonecrose, STA, priapismo, AVC e úlceras de perna;
3. A deleção $\alpha_2^{3.7kb}$ foi relacionada com uma proteção para a ocorrência de AVC, colelitíase e priapismo;
4. A deleção $\alpha_2^{3.7kb}$ não foi associada com as manifestações clínicas: CVO, osteonecrose, STA e úlceras da perna;
5. Não foi observado impacto da alfa talassemia ou dos haplótipos β^S na sobrevida global dos pacientes.

REFERÊNCIAS

Adams GT, Snieder H, McKie VC, Clair B, Brambilla D, Adams RJ, Kutlar F and Kutlar A (2003) Genetic risk factors for cerebrovascular disease in children with sickle cell disease: design of a case-control association study and genomewide screen. **BMC Med Genet** 4:6.

Adams RJ, Kutlar A, McKie V, Carl E, Nichols FT, Liu JC, McKie K and Clary A (1994) Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. **Am J Hematol** 45:279–282.

Adams RJ, McKie VC, Brambilla D, Carl E, Gallagher D, Nichols FT, Roach S, Abboud M, Berman B, Driscoll C et al. (1998) Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia. **Control Clin Trials** 19:110–129.

Adekile AD (2005) Mild-phenotype sickle cell disease: molecular basis, clinical presentation and management recommendations. **Curr Paediatr** 15:57–61.

Adorno EV, Zanette Â, Lyra I, Seixas MO, Reis MG and Gonçalves MS (2008) Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. **Genet Mol Biol** 31:621–625.

Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Souza CC, Santos LF, Menezes JF, Dupuit MF, Almeida MNT, Reis MG and Gonçalves MS (2004) The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. **Hemoglobin** 28:267–271.

Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, Chui DHK and Steinberg MH (2011) Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood** 118:19–27.

Akinyoola a L, Adediran I a, Asaleyeye CM and Bolarinwa a R (2009) Risk factors for osteonecrosis of the femoral head in patients with sickle cell disease. **Int Orthop** 33:923–6.

Al-Mousawi F, Malki A, Al-Arabi A, Al-Bagali M, Al-Sadadi A and Booz MMY (2002) Total hip replacement in sickle cell disease. **Int Orthop** 26:157–161.

Alexander N, Higgs D, Dover G and Serjeant GR (2004) Are there clinical phenotypes of homozygous sickle cell disease? **Br J Haematol** 126:606–611.

Alkindi SY, Pathare A, Zadjali S Al, Panjwani V, Wasim F and Khan H (2015) Serum Total Bilirubin, not Cholelithiasis, is Influenced by UGT1A1 Polymorphism, Alpha Thalassemia and BS Haplotype: First Report on Comparison between Arab- Indian and African BS Genes. **Mediterr J Hematol Infect Dis Orig** 1–7.

Almeida A and Roberts I (2005) Bone involvement in sickle cell disease. **Br J Haematol** 129:482–90.

Alsultan A, Alabdulaali MK, Griffin PJ, AlSuliman AM, Ghabbour HA, Sebastiani P, Albuali WH, Al-Ali AK, Chui DHK and Steinberg MH (2014) Sickle cell disease in

Saudi Arabia: the phenotype in adults with the Arab-Indian haplotype is not benign. **Br J Haematol** 164:597–604.

Antonarakis SE, Boehm CD, Serjeant GR, Theisen CE, Dover GJ and Kazazian HH (1984) Origin of the beta S-globin gene in blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. **Proc Natl Acad Sci USA** 81:853–6.

Arends A, Alvarez M, Velázquez D, Bravo M, Salazar R, Guevara JM and Castillo O (2000) Determination of b-globin gene cluster haplotypes and prevalence of a-thalassemia in sickle cell anemia patients in Venezuela. **Am J Hematol** 64:87–90.

Bakanay SM, Dainer E, Clair B, Adekile A, Daitch L, Wells L, Holley L, Smith D and Kutlar A (2005) Mortality in sickle cell patients on hydroxyurea therapy. **Blood** 105:545–7.

Baldwin C, Nolan VG, Wyszynski DF, Ma Q-L, Sebastiani P, Embury SH, Bisbee A, Farrell JJ, Farrer LA and Steinberg MH (2005) Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. **Blood** 106:372–375.

Ballas SK (1991) Sickle-Cell-Anemia with Few Painful Crises Is Characterized by Decreased Red-Cell Deformability and Increased Number of Dense Cells. **Am J Hematol** 36:122–130.

Ballas SK, Kesen MR, Goldberg MF, Luty G a, Dampier C, Osunkwo I, Wang WC, Hoppe C, Hagar W, Darbari DS et al. (2012) Beyond the Definitions of the Phenotypic Complications of Sickle Cell Disease: An Update on Management. **Sci World J** 2012:1–55.

Ballas SK, Loeff S, Benjamin LJ, Dampier CD, Heeney MM, Hoppe C, Johnson CS, Rogers ZR, Smith-Whitley K, Wang WC et al. (2010) Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **Am J Hematol** 85:6-13.

Ballas SK and Mohandas N (2004) Sickle red cell microrheology and sickle blood rheology. **Microcirculation** 11:209–225.

Belisario AR, Martins ML, Brito AMS, Rodrigues CV, Silva CM and Viana MB (2010a) b-Globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or Sb-thalassemia and their association with clinical and hematological features. **Acta Haematol** 124:162–170.

Belisário AR, Nogueira FL, Rodrigues RS, Toledo NE, Cattabriga ALM, Velloso-Rodrigues C, Duarte FOC, Silva CM and Viana MB (2015) Association of alpha-thalassemia, TNF-alpha (-308G>A) and VCAM-1 (c.1238G>C) gene polymorphisms with cerebrovascular disease in a newborn cohort of 411 children with sickle cell anemia. **Blood Cells, Mol Dis** 54:44–50.

Belisario AR, Rodrigues CV, Martins ML, Silva CM and Viana MB (2010b) Coinheritance of α -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. **Hemoglobin** 34:516–29.

Bezerra MAC, Santos MNN, Araújo AS, Gomes YM, Abath FGC and Bandeira FMGC (2007) Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the State of Pernambuco, Brazil. **Hemoglobin** 31:83–8.

Bitoungui VJN, Pule GD, Hanchard N, Ngogang J and Wonkam A (2015) Beta-Globin Gene Haplotypes Among Cameroonians and Review of the Global Distribution: Is There a Case for a Single Sickle Mutation Origin in Africa? **Omi A J Integr Biol** 19:171–179.

Braga JAP, Veríssimo MP de A, Saad STO, Cançado RD and Loggetto SR (2016) Guidelines on neonatal screening and painful vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. **Rev Bras Hematol Hemoter** 38:147–157.

Brasil (2002) Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. **ANVISA** 1:1-143

Bruno D, Wigfall DR, Ziimmerman SA, Rosoff PM and Wiener JS (2001) Genitourinary Complications Of Sickle Cell Disease. **J Urol** 166:803–811.

Buchanan GR, DeBaun MR, Quinn CT and Steinberg MH (2004) Sickle cell disease. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** 35–47.

Cabral CHK, Serafim ÉSS, Medeiros WRDB de, Fernandes TAA de M, Kimura EM, Costa FF, Sonati M de F, Rebecchi IMM and Medeiros TMD de (2011) Determination of β S haplotypes in patients with sickle-cell anemia in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Genet Mol Biol** 34:421–424.

Camilo-Araujo RF, Amancio OMS, Figueiredo MS, Cabanas-Pedro AC and Braga JAP (2014) Molecular analysis and association with clinical and laboratory manifestations in children with sickle cell anemia. **Rev Bras Hematol Hemoter** 36:334–339.

Cançado RD and Jesus JA (2007) A doença falciforme no Brasil. **Rev Bras Hematol Hemoter** 29:204–206.

Cardoso GL and Guerreiro JF (2010) Molecular characterization of sickle cell anemia in the Northern Brazilian state of Pará. **Am J Hum Biol** 22:573–577.

Castro O, Brambilla D, Thorington B, Rendorf C, Scott R, Gillette P, Vera J and Levy P (1994) The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood** 84:643–649.

Chaar V, Diara JP and Clayton J (2005) Association of UGT1A1 polymorphism with prevalence and age at onset of cholelithiasis in sickle cell anemia. **Haematologica** 90:188–193.

Chaar V, Kéclard L, Etienne-Julan M, Diara JP, Elion J, Krishnamoorthy R and

Romana M (2006) UGT1A1 polymorphism outweighs the modest effect of deletional (-3.7 kb) α -thalassemia on cholelithogenesis in sickle cell anemia. **Am J Hematol** 81:377–379.

Chang Y, Smith K, Moore R, Serjeant GR and Dover GJ (1995) An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, beta-globin haplotypes, alpha-globin gene number, gender, and age. **Blood** 85:1111–7.

Coelho A, Dias A, Morais A, Nunes B, Ferreira E, Picanço I, Faustino P and Lavinha J (2014) Genetic variation in CD36, HBA, NOS3 and VCAM1 is associated with chronic haemolysis level in sickle cell anaemia: a longitudinal study. **Eur J Haematol** 92:237–43.

Conran N, Franco-Penteado CF and Costa FF (2009) Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin** 33:1–16.

Curro G, Meo A, Ippolito D, Pusiol A and Cucinotta E (2007) Asymptomatic Cholelithiasis in Children With Sickle Cell Disease. **Ann Surg** 245:126–129.

da Silva MAL, Friedrisch JR, Bittar CM, Urnau M, Merzoni J, S. Valim V, Amorin B, Pezzi A, Chies JAB and Silla LMR (2014a) B-Globin Gene Cluster Haplotypes and Clinical Severity in Sickle Cell Anemia Patients in Southern Brazil. **Open J Blood Dis** 4:16–23.

da Silva RR, Pereira MC, Melo Rêgo MJB, Domingues Hatzlhofer BL, da Silva Araújo A, Cavalcanti Bezerra MA, da Rocha Pitta I and da Rocha Pitta MG (2014b) Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. **Cytokine** 65:143–7.

Darbari DS, Onyekwere O, Nouraie M, Minniti CP, Luchtman-Jones L, Rana S, Sable C, Ensing G, Dham N, Campbell A et al. (2012) Markers of Severe Vaso-Occlusive Painful Episode Frequency in Children and Adolescents with Sickle Cell Anemia. **J Pediatr** 160:286–290.

Davies SC, Cronin E, Gill M, Greengross P, Hickman M and Normand C (2000) Screening for Sickle Cell Disease and Thalassemia: A systematic Review with Supplementary Research. **Heal Technol Assess** 4:1–99.

Davis L, Dibner M and Battery J (2012) Basic Methods in Molecular Biology. **Elsevier** 320-323.

Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J and Rochette J (1993) Rapid analysis of - α 3.7 thalassaemia and $\alpha\alpha$ anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. **Br J Haematol** 83:105–111.

Domingos IF, Falcão DA, Hatzlhofer BL, Cunha AF, Santos MN, Albuquerque DM, Fertrin KY, Costa FF, Azevedo RC, Machado CG et al. (2014) Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. **Ann Hematol** 93:1123–1129.

Driss A, Asare K, Hibbert J, BM G, TV A and JK S (2009) Sickle cell disease in the post genomic era: a monogenic disease with a polygenic phenotype. **Genomics Insights** 2009:23–48.

Dutra FF and Bozza MT (2014) Heme on innate immunity and inflammation. **Front Pharmacol** 5:115.

Fabry ME, Mears GJ, Patel P, Schaefer-Rego K, Carmichael DL, Martinez G and Nagel RL (1984) Dense Cells in Sickle cell anemia: The effect of gene interaction. **Blood** 64:1042–1046.

Fertrin KY and Costa FF (2010) Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Rev Hematol** 3:443–458.

Figueiredo MS, Kerbauy J, Gonçalves MS, Arruda VR, Saad STO, Sonati MF, Stoming T and Costa FF (1996) Effect of α -thalassemia and β -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. **Am J Hematol** 53:72–76.

Filho EM and Carvalho WB De (2009) Stroke in children. **J Pediatr (Rio J)** 85:469–479.

Filho ILDS, Ribeiro GS, Moura PG, Vechi ML, Cavalcante AC and Andrada-Serpa MJ De (2012) 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** 34:196–201.

Filho ILS, Ribeiro GS, Pimenta-Bueno LM and Serpa MJA (2010) The frequency of β -globin gene haplotypes, α -thalassemia and genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase, factor V leiden and prothrombin genes in children with sickle cell disease in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter** 32:76–78.

Flanagan JM, Frohlich DM, Howard T a, Schultz WH, Driscoll C, Nagasubramanian R, Mortier N a, Kimble AC, Aygun B, Adams RJ et al. (2011) Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. **Blood** 117:6681–4.

Frenette PS and Atweh GF (2007) Science in medicine Sickle cell disease : old discoveries , new concepts , and future promise. **J Clin Invest** 117:850–58

Galarneau G, Coady S, Garrett ME, Jeffries N, Puggal M, Paltoo D, Soldano K, Guasch A, Ashley-Koch AE, Telen MJ et al. (2013) Gene-centric association study of acute chest syndrome and painful crisis in sickle cell disease patients. **Blood** 122:434–42.

Gill BFM, Sleeper L a, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R and Grover R (1995) Clinical Events in the First Decade in a cohort of infants with sickle cell disease. **Blood** 86:776–783.

Gonçalves MS, Bomfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A, Bomfim G, Adorno EV, Albuquerque AL, Pontes A, Dupuit MF, Fernandes GB and dos Reis MG (2003) β S-Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Brazilian J Med Biol Res** 36:1283–1288.

Habara A and Steinberg MH (2016) Minireview Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Expert Biol Med** 1–8.

Haider MZ, Ashebu S, Aduh P and Adekile AD (1998) Influence of α -thalassemia on cholelithiasis in SS patients with elevated Hb F. **Acta Haematol** 100:147–150.

Halabi-Tawil M, Lionnet F, Girot R, Bachmeyer C, Lévy PP and Aractingi S (2008) Sickle cell leg ulcers: A frequently disabling complication and a marker of severity. **Br J Dermatol** 158:339–344.

Hernigou P, Bachir D and Galacteros F (1993) Avascular necrosis of the femoral head in sickle cell disease. **J Bone Jt Surg** 75:875–80.

Higgs DR (2013) The Molecular Basis of α -Thalassemia. **Cold Spring Harb Perspect Med** 3:1–15.

Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Hayes RJ, Grandison Y, Lowrie Y, Mason KP, Serjeant BE *et al.* (1982) The Interaction of Alpha-Thalassemia and Homozygous Sickle-Cell Disease. **N Engl J Med** 306:1441–1446.

Hoppe C, Klitz W, D'Harlingue K, Cheng S, Grow M, Steiner L, Noble J, Adams R and Styles L (2007) Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Stroke** 38:2241–6.

Italia K, Kangne H, Shanmukaiah C, Nadkarni AH and Colah RB (2015) Variable phenotypes of sickle cell disease in India with the Arab-Indian haplotype. **Br J Haematol** 168:139–159.

Joly P, Pondarré C, Bardel C, Francina A and Martin C (2012) The alpha-globin genotype does not influence sickle cell disease severity in a retrospective cross-validation study of the pediatric severity score. **Eur J Haematol** 88:61–67.

Kan YW and Dozy AM (1978) Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. **Proc Natl Acad Sci USA** 75:5631–5.

Kato GJ, Gladwin MT and Steinberg MH (2007) Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Rev** 21:37–47.

Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH and Gladwin MT (2009) Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **Am J Hematol** 84:618–625.

Kim HT (2007) Cumulative Incidence in Competing Risks Data and Competing Risks Regression Analysis. **Clin Cancer Res** 13:559–565.

Koshy M, Entsuah R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, Flournot-Gill Z and Levy P (1989) Leg Ulcers in patients with sickle cell disease. **Blood** 74:1403–1408.

Kulozik a E, Kar KC, Satapathy RK, Serjeant BE, Serjeant GR and Weatherall DJ (1987) Fetal Hemoglobin Levels and BS globin Haplotype in a Indian Population With Sickle Cell Disease. **Blood** 69:1742–1746.

Ladizinski B, Bazakas A, Mistry N, Alavi A, RG S and Salcido R (2012) Sickle cell disease and leg ulcers. **Adv Skin Wound Care** 25:420–428.

Lapouniéroulie C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Mony-Lobé M, Bodo JM, Carnevale P, Labie D, Elion J and Krishnamoorthy R (1992) A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. **Hum Genet** 89:333–337.

Leal A, Martins PR, Balarin M, Pereira G and Resende GA (2016) Haplotypes β s-globin and its clinical-haematological correlation in patients with sickle-cell anemia in Triângulo Mineiro , Minas Gerais , Brazil. **J Bras Patol Med Lab** 5–10.

Lemos Cardoso G and Farias Guerreiro* J (2006) African gene flow to north Brazil as revealed by HBB*S gene haplotype analysis. **Am J Hum Biol** 18:93–98.

Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MAC, Araujo AS, Uda M, Sanna S, Cao A, Schlessinger D, Costa FF, Hirschhorn JN et al. (2008) DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proc Natl Acad Sci** 105:11869–11874.

Lindenau JD (2009) Frequência de mutações nos genes das cadeias alfa e beta da hemoglobina no Rio Grande do Sul. **Tese de doutorado**. 1-19.

Liu L, Pertsemlidis A, Ding L-H, Story MD, Steinberg MH, Sebastiani P, Hoppe C, Ballas SK and Pace BS (2016) Original Research: A case-control genome-wide association study identifies genetic modifiers of fetal hemoglobin in sickle cell disease. **Exp Biol Med** 241:706–718.

Loggetto SR (2013) Sickle cell anemia: clinical diversity and beta S-globin haplotypes. **Rev Bras Hematol Hemoter** 35:155–7.

Lorey F, Charoenkwan P, Witkowska HE, Lafferty J, Patterson M, Eng B, Wayne JS, Finklestein JZ and Chui DHK (2001) Hb H hydrops foetalis syndrome: a case report and review of literature. **Br J Haematol** 115:72–78.

Lyra IM, Gonçalves MS, Braga JAP, Gesteira M de F, Carvalho MH, Terezinha S, Saad O, Figueiredo MS and Costa FF (2005) Clinical , hematological , and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Cad Saúde Pública** 21:1287–1290.

Mack a K and Kato GJ (2006) Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? **Int J Biochem Cell Biol** 38:1237–43.

Malowany JI and Butany J (2012) Pathology of sickle cell disease. **Semin Diagn Pathol** 29:49–55.

Menea F (2013) Stroke in sickle cell anemia patients: A need for multidisciplinary approaches. **Atherosclerosis** 229:496–503.

Milner PF, Kraus AP, Sebes JI, Sleeper LA, Dukes KA, Embury SH, Bellevue R, Koshy M, Moohr JW and Smith J (1991) Sickle cell disease as cause of osteonecrosis of the femoral head. **N Engl J Med** 325:1476–1481.

Minniti CP, Delaney KH, Gorbach AM, Xu D, Lee C-CR, Malik N, Koroulakis A, Antalek M, Maivelett J, Peters-Lawrence M et al. (2014) Vasculopathy, inflammation, and blood flow in leg ulcers of patients with sickle cell anemia. **Am J Hematol** 89:1–6.

Minniti CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MH and Ballas SK (2010) Leg ulcers in sickle cell disease. **Am J Hematol** 85:831–833.

Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, Zohoun I, Wajcman H, Baudin V and Labie D (1985) Hematologically and Genetically Distinct Forms of Sickle Cell Anemia in Africa. **N Engl J Med** 312:880–884.

Nagel RL and Steinberg MH (2001) Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. **Pediatr Pathol Mol Med** 20:123–136.

Naoum PC (2000) Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter** 22:5–22.

Neonato MG, Guilloud-Bataille M, Beauvais P, Begue P, Belloy M, Benkerrou M, Ducrocq R, Maier-Redelsperger M, de Montalembert M, Quinet B et al. (2000) Acute clinical events in 299 homozygous sickle cell patients living in France. French Study Group on Sickle Cell Disease. **Eur J Haematol** 65:155–164.

Ngo D, Bae H, Steinberg MH, Sebastiani P, Solovieff N, Baldwin CT, Melista E, Safaya S, Farrer LA, Al-Suliman AM et al. (2013) Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Genetic studies of the Arab-Indian haplotype. **Blood Cells, Mol Dis** 51:22–26.

Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, Farrell JJ, Sebastiani P, Farrer L a and Steinberg MH (2006) Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. **Br J Haematol** 133:570–578.

Nolan VG, Baldwin C, Ma Q, Wyszynski DF, Amirault Y, Farrell JJ, Bisbee A, Embury SH, Farrer L a and Steinberg MH (2005a) Association of single nucleotide

polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia. **Br J Haematol** 128:266–272.

Nolan VG, Wyszynski DF, Farrer LA and Steinberg MH (2005b) Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. **Blood** 106:3264–3267.

Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper L a, Miller S, Embury S, Moohr JW, Wethers DL, Pegelow CH and Gill FM (1998) Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood** 91:288–94.

Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL and Labie D (1984) Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc Natl Acad Sci USA** 81:1771–1773.

Paladino SF (2007) Leg ulcers in sickle cell disease. **Rev Bras Hematol Hemoter** 29:288–290.

Pandey S, Pandey S, Mishra RM, Sharma M and Saxena R (2011) Genotypic influence of α -deletions on the phenotype of Indian sickle cell anemia patients. **Korean J Hematol** 46:192.

Parody R, Rabella N, Martino R, Otegui M, del Cuerpo M, Coll P and Sierra J (2007) UGT1A1 Polymorphism Outweighs the Modest Effect of Deletional (–3.7 Kb) α -Thalassemia on Cholelithogenesis in Sickle Cell Anemia Vicky. **Am J Hematol** 82:807–811.

Pauling L, Itano HA, Singer SJ and Wells IC (1949) Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. **Science** 110:543–548.

Pavlakakis SG and Levinson K (2009) Arterial ischemic stroke: common risk factors in newborns and children. **Stroke** 40:S79-81.

Platt OS, Brambilla D, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH and Klug PP (1994) Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N Engl J Med** 330:1639–1644.

Platt OS, Thorington B, Brambilla D, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E and Kinney T (1991) Pain in Sickle Cell Disease: Rates and Risk Factors. **N Engl J Med** 325:11–16.

Powars D and Hiti A (1993) Sickle Cell Anemia. BS gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. **Am J Dis Child** 147:1197–1202.

Powars DR (1991) Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. **Hematol Oncol Clin North Am** 5:475–93.

Powars DR, Hiti A, Ramicone E, Johnson C and Chan L (2002) Outcome in hemoglobin SC disease: A four-decade observational study of clinical, hematologic, and genetic factors. **Am J Hematol** 70:206–215.

Quinn CT (2013) Sickle Cell Disease in Childhood. **Pediatr Clin North Am** 60:1363–1381.

Quinn CT and Miller ST (2004) Risk factors and prediction of outcomes in children and adolescents who have sickle cell anemia. **Hematol Oncol Clin North Am** 18:1339–1354.

Rahgozar S, Poorfathollah A a, Moafi AR and Old JM (2000) BS Gene in Central Iran Is in Linkage Disequilibrium With the Indian – Arab Haplotype. **Am J Hematol** 195:192–195.

Rees DC, Williams TN and Gladwin MT (2010) Sickle-cell disease. **Lancet** 376:2018–2031.

Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN and Gladwin MT (2002) Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nat Med** 8:1383–1389.

Rieder RF, Safaya S, Gillette P, Fryd S, Hsu H, Adams JG and Steinberg MH (1991) Effect of beta-globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. **Am J Hematol** 36:184–9.

Rodrigues DOW, Ribeiro LC, Sudário LC, Teixeira MTB, Martins ML, Pittella AMOL and Junior I de OF (2016) Genetic determinants and stroke in children with sickle cell disease. **J Pediatr (Rio J)** 1–7.

Rumaney MB, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, Ramesar R, Kengne AP, Ngogang J and Wonkam A (2014) 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** 9:1–10.

Rusanova I, Escames G, Cossio G, De Borace RG, Moreno B, Chahboune M, López LC, Díez T and Acuña-Castroviejo D (2010) Oxidative stress status, clinical outcome, and β -globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. **Eur J Haematol** 85:529–537.

Salas A, Richards M, Lareu M-V, Scozzari R, Coppa A, Torroni A, Macaulay V and Carracedo A (2004) The African diaspora: mitochondrial DNA and the Atlantic slave trade. **Am J Hum Genet** 74:454–465.

Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT and Steinberg MH (2005) Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. **Nat Genet** 37:435–40.

Serjeant GR (1997) Sickle-cell disease. **Lancet** 350:725–30.

Serjeant GR (2013) The natural history of sickle cell disease. **Cold Spring Harb Perspect Med** 3:1–11.

Serjeant GR, Serjeant BE, Mohan JS and Clare A (2005) Leg ulceration in sickle cell disease: Medieval medicine in a modern world. **Hematol Oncol Clin North Am** 19:943–956.

Sheehan VA, Hansbury EN, Smeltzer MP, Fortner G, McCarville MB and Aygun B (2013) Transcranial Doppler velocity and brain MRI/MRA changes in children with sickle cell anemia on chronic transfusions to prevent primary stroke. **Pediatr Blood Cancer** 60:1499–502.

Shimauti ELT, Humberto Silva DG, Menezes de Souza E, Almeida EA De, Leal FP and Bonini-Domingos CR (2015) Prevalence of β -globin gene haplotypes, α -thalassemia (3.7 kb deletion) and redox status in patients with sickle cell anemia in the state of Paraná, Brazil. **Genet Mol Biol** 323:316–323.

Silva LB and Gonçalves RP (2009) Características fenotípicas dos pacientes com anemia falciforme de acordo com os haplótipos do gene da β S-globina em Fortaleza, Ceará. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**

Soares ACN, Samico IC, Araújo AS, Bezerra MAC and Hatzlhofer BLD (2014) Follow-up of children with hemoglobinopathies diagnosed by the Brazilian Neonatal Screening Program in the State of Pernambuco. **Rev Bras Hematol Hemoter** 36:250–5.

Sonati MDF and Costa FF (2008) The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **J Pediatr (Rio J)** 84:S40–S51.

Srinivas R, Dunda O, Krishnamoorthy R, Fabry ME, Georges A, Labie D and Nagel RL (1988) Atylical Haplotype linked to the BS gene in Africa are Likely to Be the Product of Recombination. **Mol Biol Med** 62:60–62.

Steinberg MH (1999) Management of Sickle Cell Disease. **Drug Ther (NY)** 340:1021–1030.

Steinberg MH (2008) Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. **Sci World J** 8:1295–1324.

Steinberg MH (2009) Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **Scientific World Journal** 9:46–67.

Steinberg MH (2005) Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol** 129:465–481.

Steinberg MH and Adewoye AH (2006) Modifier genes and sickle cell anemia. **Curr Opin Hematol** 13:131–6.

Steinberg MH and Embury SH (1986) Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **Blood** 68:985–90.

Steinberg MH, Hsu H, Nagel RL, Milner PF, Adams JG, Benjamin L, Fryd S, Gillette P, Gilman J and Josifovska O (1995) Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. **Am J Hematol** 48:175–81.

Steinberg MH and Rodgers GP (2001) Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. **Semin Hematol** 38:299–306.

Steinberg MH and Sebastiani P (2012) Genetic modifiers of sickle cell disease. **Am J Hematol** 87:795–803.

Stuart MJ and Nagel RL (2004) Sickle cell disease. **Lancet** 364:1343–60.

Sutton M, Bouhassira EE and Nagel RL (1989) Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. **Am J Hematol** 32:66–69.

Thein SL, Menzel S, Lathrop M and Garner C (2009) Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. **Hum Mol Genet** 18:R216–R223.

Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, Silver N, Gerovasilli A, Ping C, Yamaguchi M et al. (2007) 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** 104:11346–11351.

Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, Usala G, Busonero F, Maschio A, Albai G et al. (2008) Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of -thalassemia. **Proc Natl Acad Sci** 105:1620–1625.

Vasavda N, Menzel S, Kondaveeti S, Maytham E, Awogbade M, Bannister S, Cunningham J, Eichholz A, Daniel Y, Okpala I et al. (2007) The linear effects of α -thalassaemia, the UGT1A1 and HMOX1 polymorphisms on cholelithiasis in sickle cell disease. **Br J Haematol** 138:263–270.

Vicari P and Figueiredo MS (2007) Priapismo na doença falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter** 29:275–278.

Vichinsky EP (2013) Clinical Manifestations of α -Thalassemia. **Cold Spring Harb Perspect Med** 3:011742–a011742.

Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O and Nickerson B (1997) Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease: Clinical Presentation and Course. **Blood** 89:1787–1792.

Williams TN and Weatherall DJ (2012) World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2:1–14.

Yuan J, Desouza R, Westney OL and Wang R (2008) Insights of priapism

mechanism and rationale treatment for recurrent priapism. **Asian J Androl** 10:88–101.

Zago MA, Figueiredo MS and Ogo SH (1992) Bantu BS Cluster Haplotype Predominates Among Brazilian Blacks. **Am J Phys Anthropol** 298:295–298.

Zago MA and Pinto ACS (2007) Fisiopatologia das doenças falciformes : da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev Bras Hematol Hemoter** 29:207–214.

Zago MA, Silva WA, Dalle B, Gualandro S, Hutz MH, Lapoumeroulie C, Tavella MH, Araujo AG, Krieger JE, Elion J et al. (2000) Atypical BS haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. **Am J Hematol** 63:79–84.

APÊNDICE A – ARTIGO A SER SUBMETIDO

Revista: *British Journal of Haematology*
Fator de impacto: 5.812. Qualis CB1: A1.

INFLUENCE OF β^S HAPLOTYPE AND ALPHA-THALASSEMIA ON SICKLE CELL ANEMIA CLINICAL COURSE IN NORTHEAST BRAZIL

Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer¹, Diego Antonio Pereira-Martins², Igor de Farias Domingos², Diego Arruda Falcão², Rayssa L Borges-Medeiros², Luana Priscilla Laranjeira Prado², Isabela Cristina Cordeiro Farias², Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista², Magnun Nueldo Nunes Santos², Fernando Ferreira Costa⁴, Aderson da Silva Araújo³, Antonio Roberto Lucena-Araújo², Marcos André Cavalcanti Bezerra²

¹*Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

²*Centre of Biosciences, Post-graduation program of genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

³*Department of Internal Medicine, Haematology and Haemotherapy Foundation of Pernambuco, Recife, Brazil*

⁴*University of Campinas, Campinas, Brazil*

Correspondence: Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, PE 50670-901, Brazil.

E-mail: betanialucena@yahoo.com.br

Summary

Clinical complications diversity at the sickle cell anemia (SCA) has been associated with genetic and environment factors. Despite alpha thalassemia and β^S haplotype are considered important genetic markers associated with SCA variability, the main role of these variations in SCA clinical outcome is still controversial. To better characterize the clinical heterogeneity of SS-genotype patients, we present here a study of 714 patients followed in a single reference center in Northeast Brazil, evaluated the clinical data, correlating with alpha thalassemia genotype ($-\alpha^{3,7}$ kb) and the haplotype of the β -globin gene cluster. Overall survival and clinical severity parameters as: number of sickle cell crises per year, cholelithiasis, acute chest syndrome, leg ulcer, osteonecrosis, stroke and priapism, were investigated. Despite a high frequency of the β^S haplotype Bantu (74%) and the Bantu/Bantu genotype (57%) in our population, no association has found between the main subphenotypes and β^S haplotype composition. The univariable analysis showed $-\alpha^{3,7}$ kb mutation associated with a protective effect on the development of stroke (*Odds ratio* (OR): 0.38; 95% *Confidence Interval* (CI): 0.16-0.89; $P=0.026$), priapism (OR: 0.42; 95% CI: 0.18-0.93; $P=0.05$) and cholelithiasis (OR: 0.42; 95% CI: 0.18-0.93; $P=0.006$). Our results may provide insight into the pathogenesis of main clinical outcomes in SCA and it effort the use of genetics variations to identify individuals who are at increased risk and thus allow earlier research and treatment.

Keywords: sickle cell anemia, alpha-thalassemia, β^S haplotype.

Sickle cell anemia (SCA) was the first human monogenic disorder characterized at the molecular level (Pauling *et al*, 1949). Its results from a GAG to GTG substitution in the sixth codon in the β hemoglobin gene (*HBB*), which replaced glutamic acid by valine (Glu6Val) at β globin chain, thus making HbS instead of normal HbA (Ingram, 1956; Hunt & Ingram, 1958). Despite being caused by a single point mutation, the homozygous HbS presented great phenotypic heterogeneity (Driss *et al*, 2009; Ballas *et al*, 2012; Serjeant, 2013). For more than 30 years, the association of alpha thalassemia and beta globin gene haplotype has been studied and considered in several studies as the main determinants of SCA variability (Steinberg & Embury, 1986; Powars, 1991; Zago & Pinto, 2007; Silva & Gonçalves, 2009; Shimauti *et al*, 2015). However, actually there are few clear messages from these interactions (Serjeant & Vichinsky, 2017).

Coexistence of alpha thalassemia is considerate a powerful modulatory influence for SCA. This is due to a decreased concentration of HbS, leading to less intracorpusecular polymerization and lower hemolysis. Therefore this deletion was described as a protective factor to endothelial-hemolysis dysfunction complications involving a proliferative vasculopathy, such as stroke, leg ulcer and priapism (Steinberg, 2005; Kato *et al*, 2007). However, clinical events related to the increased blood viscosity, such as vaso-occlusive painful crisis, acute chest syndrome and osteonecrosis are minimally affected by the alpha-thalassemia coexistence or their prevalence is increased in patients with this disorder (Steinberg, 2009). Concerning the clinical manifestations in which alpha thalassemia plays a beneficial effect, several studies show conflicting results (Nolan *et al*, 2005b; Vasavda *et al*, 2007; Fertrin & Costa, 2010; Darbari *et al*, 2012; Alkindi *et al*, 2015).

As well as alpha-thalassemia, HbF impact the phenotype of disease by decreasing the HbS polymerization tendency, by the no incorporation of the HbS polymer phase, acting as an inhibitor of Hb S polymerization (Pauling *et al*, 1949; Steinberg, 2009). A high HbF level has been associated with a decrease of clinical severity with less painful events, blood therapy use and hospitalization (Adorno *et al*, 2008). The genetic regulation of HbF was first associated with the haplotype of the β -globin gene cluster (Nagel *et al*, 1985). The β^s haplotypes are defined by the nonrandom association of restriction endonuclease cleavage sites around the beta-globin gene cluster (Rusanova *et al*, 2010). Different haplotypes of SCA are described and classified according to the ethnic groups and geographic region from where the genes are most commonly found: Bantu or CAR (Central African Republic), Benin, Senegal, Cameroon, and Arab-Indian (Pagnier *et al*, 1984; Rahgozar *et al*, 2000). In Brazil, the Bantu and Benin haplotypes are mainly found (Gonçalves, 2003; Lemos Cardoso & Farias Guerreiro, 2006; Filho *et al*, 2012; da Silva *et al*, 2014).

According to the HbF levels found in different haplotypes, the SCA phenotype was related to the β^s haplotypes. The *HBB2 Xmn1* polymorphism at Chr11p15 (rs7482144) is present only in Senegal and Arab-Indian haplotypes, and it is strongly

associated with high HbF levels and with the concentration of G_γ - globin chains (Steinberg, 2009). Therefore Arab-Indian and Senegal haplotypes are associated with a mild clinical course, which has been attributed to higher HbF levels (Nagel & Steinberg, 2001; Adekile, 2005), while Bantu haplotype, with low levels of HbF, present more severe clinical manifestations, initiating vaso-occlusive painful crises earlier and these patients tend to present the worst prognosis. Benin and Cameroon apparently present intermediate phenotypes (Powars 1993; Quinn and Miller 2004; Steinberg 2009). The effect of haplotype is mediated through HbF, nevertheless other determinants can also influence the expression of this hemoglobin (Thein *et al*, 2007; Uda *et al*, 2008; Liu *et al*, 2016) and the predictive use of haplotype is limited. Therefore, there is a phenotypic heterogeneity among individuals who have the same haplotype (Chang *et al*, 1995), in addition compound heterozygosity for haplotypes is common in many populations (Quinn & Miller, 2004).

Here, we presented the molecular analysis of alpha-thalassemia and β^S haplotypes evaluating the impact in clinical outcome of patients with SCA followed in Pernambuco State, northeastern Brazil.

Material and methods

Patient cohort and study design

Between February 2012 and December 2015, 714 peripheral blood samples were collected from patients with SCA followed at a single reference center in Pernambuco, northeast Brazil. Ethical approval was obtained from the local Research Ethics Board. In accordance with the Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from all participants prior to study commencement. Patient follow-up was last updated in May 2016. The median age of the cohort was 26 years (range: 3-61), with 347 males (49%).

Clinical variables

Information about clinical data was obtained by interview and medical records. For this study, we have selected some of the SCA clinical manifestations based mainly on the frequency and clinical significance, but also based main clinical outcomes that could be best characterized in the State of Pernambuco-Brazil.

The clinical manifestations enrolled in this study were: number of sickle cell per year, defined by acute vaso-occlusive events per year required hospital admission; cholelithiasis, presence of gallstones confirmed by liver/biliary ultrasonography during routine screening or in symptomatic patients; osteonecrosis proven by radiography documented or magnetic resonance imaging (MRI) of the hip or shoulder in symptomatic patients; acute chest syndrome (ACS), related on patient's chart and defined as an acute respiratory illness with a new pulmonary infiltrate on chest x-ray; priapism, occurrence of at least one episode of a painful erection of the penis that lasted more than 1 hour and was severe enough for the patient to seek medical care; overt stroke confirmed by MRI/magnetic resonance

angiogram (MRA) in symptomatic patients. leg ulcers, an ulceration of the skin of the lower legs, especially the medial or lateral surfaces, which failed to heal within a period of two weeks (Baldwin *et al*, 2005; Nolan *et al*, 2005a, 2006; Ballas *et al*, 2012).

For comparison purposes, we selected 125 patients with SCA (18%), aged >18 years, presented normal means of transcranial doppler velocities, without the main clinical phenotype presented in SCA, or suspect (control group), except for number of sickle cell crises per year and cholelithiasis, due to high prevalence of this complication in our population.

Molecular analysis

Peripheral blood samples were collected and the genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by phenol-chloroform extraction method (Davis *et al*, 2012). The Hb S mutation was confirmed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Classic β^S -globin gene haplotypes were determined using 6 SNPs within the β -globin locus (5' γ^G -*Xmn*I, γ^G -*Hind*III, γ^A -*Hind*III, $\psi\beta$ -*Hinc*II, 3' $\psi\beta$ -*Hinc*II, 5' β -*Hinf*I) (Sutton *et al*, 1989). According to restriction profile for the polymorphic regions of the globin cluster, it was possible to characterize the 5 classic HbS gene haplotypes, including Benin, Bantu, Senegal, Arab-Indian and Cameroon. Different restriction patterns in the literature predetermined profile have its haplotype considered Atypical. The alpha thalassemia status was determined by - $\alpha^{3.7Kb}$ deletion research, using the primer C2 (5' CCATGCTGGCACGTTTCTGA 3') and C10 (5' GATGCACCCACTGGACTCCT 3'), by gap-PCR methodology as described previously (Dodé *et al*, 1993). The - $\alpha^{3.7}$ deletion is considered the most frequent alpha thalassemia observed in patients with sickle cell disease (Joly *et al*, 2012; Steinberg, 2009).

Statistical analysis

Descriptive analyses were performed for patient baseline features. Associations between categorical variables were compared with Fisher's exact test and the χ^2 test, while continuous variables were compared with Kruskal-Wallis test. Statistical analyses were performed using STATA Statistical Software 14.0 (STATA, College Station, TX, USA), with the level of significance set to 5%. The risk was defined in terms of odds ratio (OR) with confidence interval (CI), with significance levels up to 95%. Cumulative incidence curves were constructed reflecting the time for complications development, Gray's test was used to compare the curves (Kim, 2007).

Results

We analyzed 714 medical records of patients with SCA and we found 588 (82.3%) patients who developed at least one of the following clinical manifestations: cholelithiasis, osteonecrosis, priapism, stroke and leg ulcer. The found data showed that the most frequent clinical manifestations in our cohort were cholelithiasis (57%)

and the painful crisis (>3/year) with 46%, followed by priapism (28% of men) and leg ulcer (20%) (table 1).

The frequency of gender was similar in the total sample (48% of male *versus* 51% female) albeit the control group presented a higher frequency of women (66%). Three-hundred and fifteen (44%) patients showed up two clinical manifestations, among them, 28% had two types of clinical manifestations; 12%, three types; 4% four types and less than 1% five or six different types of clinical manifestations. The main baseline features have no difference compared the different β^S haplotypes composition and alpha-thalassemia mutational status.

Haplotypes of 706 patients were analyzed, of these, 74% (651 patients) had at least one Bantu allele with different combinations and 57% of patients had the homozygous Bantu genotype, while the Benin haplotype was found in 225 patients (32%) (table 2). Concerning the frequencies of Senegal, Cameroon and Saudi-Indian haplotypes, we found a low frequency for all this haplotypes, less than 1% (2 patients, 3 patients and 4 patients, respectively) in our population (all them were heterozygous). The comparative analysis of β^S haplotypes (Bantu/Bantu *versus* non-Bantu/Bantu) was not associated with any evaluated clinical manifestations (table 3).

The $-\alpha^{3.7}$ thalassemia deletion was present in 168 (24%) patients (table 2) and 19 (3%) patients were homozygous. The presence of this deletion was associated with lower frequency of stroke (OR: 0.38; 95% CI: 0.16 to 0.89; $P = 0.026$), cholelithiasis (OR: 0.56; 95% CI: 0.37 to 0.83; $P = 0.006$) and priapism (OR: 0.41; 95% CI: 0.18 to 0.93; $P = 0.050$) (table 3). For patients without $\alpha^{3.7}$ thalassemia ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), the prevalence of stroke, priapism and cholelithiasis, was 8% (60/714), 22% (79/367), 49% (328/714) respectively. While in patients with one or two $\alpha^{3.7}$ thalassemia deletion ($-\alpha/-\alpha$ or $\alpha/\alpha\alpha$), it was seen a prevalence of 1% (8/714) for stroke, 5% (17/367) to priapism and 11% (79/714) to cholelithiasis.

The impact of alpha-thalassemia on stroke, priapism and cholelithiasis was evaluated regarding their development time. The cumulative incidence of these clinical manifestations was significantly lower for patients with $\alpha^{3.7kb}$ positive status. The mean age of first stroke episode was 10 years (range: 4-39). Patients with $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ genotype had a stroke development rate of 51%, while patients with heterozygous or homozygous genotype for the $\alpha^{3.7}$ thalassemia deletion presented the development rate by 24% ($P = 0.019$). The mean age of confirmed cholelithiasis by ultrasonography was 16 years (range: 2-49), whereas the mean age of the first priapism report episode was 18 years (range: 4-39). Patients with $-\alpha^{3.7kb}$ negative status had a cholelithiasis development rate of 91% and a priapism development rate of 89%, while patients with $-\alpha^{3.7kb}$ positive status presented the cholelithiasis development rate of 85% and the development rate of 46% for priapism. Therefore, it was observed that patients with $\alpha^{3.7kb}$ positive status develop stroke, cholelithiasis and priapism manifestations in a lower median time than those with $\alpha^{3.7kb}$ negative status (table 1).

In a median of 13 years follow-up (0-34 years), 51 (7%) patients had died in this database, but 14 deaths were unrelated to SCA or had no record of death cause, so 37 (5%) patients died because of sickle cell anemia complications and this number was used to compute the overall survival. The median age of death among patients with SCA was 25 years. Respiratory infection, including STA, was the most frequent cause of death 18 (49%), followed by cerebrovascular accident 6 (16%). The analysis of overall survival showed that patients with $\alpha^{3.7\text{kb}}$ -thalassemia deletion had no improved survival than patients without $\alpha^{3.7\text{kb}}$ -thalassemia. Additionally, β^S haplotypes did not influence in overall survival of evaluated patients (Figure 2).

Discussion

The HbS was introduced in Brazil during the African slave trade from the 16th to 19th centuries. Great part of the slaves ported here came from Angola, Congo and Mozambique, where the Bantu β^S haplotype predominates and about 30% of the slaves came from Benin and Senegal region. Studies in several Brazilian states show a predominance of the Bantu haplotype in the country, with frequencies varying between 41% and 67% (Zago *et al.* 1992; Figueiredo *et al.* 1996; Silva & Gonçalves 2009; Belisario *et al.* 2010a; Cardoso & Guerreiro 2010; Filho *et al.* 2010; Cabral *et al.* 2011; Camilo-Araujo *et al.* 2014; da Silva *et al.* 2014a; Shimauti *et al.* 2015; Leal *et al.* 2016). Our results showed that the state of Pernambuco has the highest frequency of Bantu haplotype in Brazil (74%) and confirms the findings in our previous study. Furthermore, in most states of Brazil, there is a high prevalence of heterozygous for Bantu/Benin genotype, but the most frequent genotype found here was the homozygous for the Bantu haplotype (57%).

The Bantu haplotype was associated with the worst prognosis for SCA, with more prone to early death and end-organ damage (Powars & Hiti, 1993; Powars, 1990). The severity of this disease found in most of our patients, complies with the high frequency of the Bantu haplotype, furthermore, less than 1% of the population studied had better prognosis haplotype (Arab-Indian and Senegal) and it was seen in heterozygosis. It was found a high prevalence of painful crisis per year, in which 46% of individuals had more than 3 painful episodes requiring medical care. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSCD), published in 1991, described this clinical manifestation as the most prevalent of SCA (Platt *et al.*, 1991). The Pulmonary Hypertension and Hypoxic Response in Sickle Cell Disease (PUSH) study showed that 20% of patients had reported more than 3 painful episodes in a year (Darbari *et al.*, 2012). Besides the high frequency and the diversity of clinical manifestations found, many patients presented concurrently over 2 phenotypes and some patients (16%) presented 3 or more different complications or more, many of them recurrently.

We found 125 patients over eighteen years old, who did not present any clinical manifestations (dactylitis, osteonecrosis, priapism, stroke and leg ulcer), but had a high frequency of Bantu haplotype (96%) and Bantu/Bantu genotype (61%). However, we cannot affirm that 125 patients characterized as controls, have a benign

profile, since 34% of them had more than three painful crisis per year and 55% had cholelithiasis, also many of these patients had recurrent infection, requiring hospitalization.

For the studied population, the β^S haplotypes did not influence the occurrence of clinical phenotype of SCA. This may be due to the high frequency of Bantu haplotype, followed by Benin haplotype, which are associated respectively with a high and intermediate severity of the disease (Steinberg, 2009). We also found no effect of haplotype on HbF levels in our patients. This is in agreement with other studies, where no significant difference was found between haplotypes and HbF values or clinical manifestation in populations with a high frequency of Bantu and Benin haplotypes (Rieder *et al*, 1991; Flanagan *et al*, 2011; Camilo-Araujo *et al*, 2014; Nolan *et al*, 2005b). There is still a considerable HbF variability in sickle cell patients, it is probable that determinants unrelated to haplotype, like the *BCL11A*, *HBS1L-MYB* SNPs, may have effect in the levels of HbF (Akinsheye *et al*, 2011; Ngo *et al*, 2013; Lettre *et al*, 2008). Besides the HbF, there was no effect of haplotypes on other hematological features such as Hb, Ht, WBC, Reticulocyte, I-Bil and LDH.

The 23% alpha-thalassemia frequency observed in our patients is in accordance with the 20% to 35% values previously observed among Hb SS patients from North and South America (Belisario *et al*, 2010b; Adorno *et al*, 2008; Castro *et al*, 1994; Arends *et al*, 2000; Steinberg & Embury, 1986; Neonato *et al*, 2000). Several studies describe the beneficial role of alpha-thalassemia on global SCA severity, particularly on hemolysis subphenotypes, including pulmonary hypertension, leg ulcer, stroke and priapism (Nolan *et al*, 2005b; Steinberg, 2009; Chang *et al*, 1995; Koshy *et al*, 1989).

Approximately a third of patients with SCA and African Americans have alpha-thalassemia (Dozy *et al*., 1979; Steinberg, 2009). The frequency of this condition in Brazil varies according to the geographical region (13%-30%) and it is almost always a result from a 3.7 kb deletion of DNA ($-\alpha_2^{3.7}$), involving the 3' region of the α_2 gene and 5' of the α_1 gene, resulting in a hybrid gene (α_2/α_1) (Belisario *et al*, 2010b; Filho *et al*, 2012; Camilo-Araujo *et al*, 2014; Rodrigues *et al*, 2016).

We reported here a protective effect of alpha-thalassemia on the development of stroke, priapism and cholelithiasis. In a previous study, we showed the same alpha-thalassemia association with stroke subphenotype (Domingos *et al*, 2014), although a different control population was used, the association is remained. The effect of alpha-thalassemia on the incidence of stroke has been increasingly confirmed with different populations (Ohene-Frempong *et al*, 1998; Belisario *et al*, 2010a; Neonato *et al*, 2000; Adams *et al*, 1994). In our series, the frequency of strokes was 9.7%, similar to that described in the literature (5%-11%) (Neonato *et al*, 2000; Ohene-Frempong *et al*, 1998). Stroke is one of the most dramatic complications of SCD, but the pathophysiological basis for the protective effect of alpha-thalassemia is still unclear, but it seems that the decreased hemolysis, reduction in WBC count and less dense cells protect the carriers of alpha-

thalassemia (Belisario *et al*, 2010a; Fertrin & Costa, 2010; Adams *et al*, 2003; Steinberg & Rodgers, 2001).

The mean age at confirmed cholelithiasis was 16 years and 57.3% of our patients developed this complication. The frequency of cholelithiasis was similar to that described in other populations (Chaar *et al*, 2005; Powars *et al*, 2002). Nevertheless, the development of this condition in patients with sickle cell disease is age dependent, with a reported prevalence of 50% by the age of 22 (Curro *et al*, 2007). The prevalence of cholelithiasis appears to be affected by local diet and possible genetic factors (Ballas *et al*, 2012). The development of gallstones usually results from the breakdown of hemoglobin, thus coinheritance of alpha-thalassemia can be associated with a reduction of the incidence of stones due lower hemolysis rate (Haider *et al*, 1998). The protective effect of alpha-thalassemia for cholelithiasis that we observed in our SCA patients, is in accordance with previous reported results (Haider *et al*, 1998; Powars *et al*, 2002; Vasavda *et al*, 2007), but was not describe in others (Parody *et al*, 2007; Alkindi *et al*, 2015).

The statistical analysis showed an association for SCA patients who carry all α -globin genes, develop more frequently priapism. A similar result was described by Nolan *et al*. with CSSCD patients, they reported that patients with alpha-thalassemia coincident were slightly less likely to have priapism than patients without this disorder ($p=0.052$) (Nolan *et al*, 2005a). (Steinberg, 2005).

Besides leg ulcer also be described as hemolytic subphenotypes of sickle cell disease (Kato *et al*, 2007), we found no association with alpha-thalassemia. Leg ulcer is a common subphenotype of sickle cell disease, with a 20.2% frequency in our population. Its cause is unknown, but similarly to other complications of sickle cell anemia, it might be related to lower degree of hemolysis and higher hemoglobin level (Koshy *et al*, 1989; Steinberg & Rodgers, 2001; Nolan *et al*, 2006). Different studies found controversial results about the alpha thalassemia protective effect for hemolytic complications such as leg ulcers (Higgs *et al*, 1982; Kato *et al*, 2007; Pandey *et al*, 2011). Further studies need to be carried out but it is important to consider the influence of social conditions and environmental factor, since trauma (such as insect bites, common in tropical areas), infection and inflammation have all been listed as potential causes of lower extremity ulcerations in patients with SCA (Minniti *et al*, 2010). We also found a similarity in hematological markers of hemolysis data between individuals with and without $\alpha^{3.7}$ thalassemia deletion; this could indicate that hemolysis and anemia were not attenuated in our patients.

The decreased concentration of HbS, leading to lower hemolysis that occurs in SCA patients with alpha-thalassemia, consequently may result in elevated blood viscosity; besides that, alpha-thalassemia is not associated with higher HbF levels (Driss *et al*, 2009; Belisario *et al*, 2010b). Thus, there seems to be an increase in the probability of some types of vaso-occlusives complications of acute painful crisis, osteonecrosis and acute chest syndrome, although there are conflicting results among studies (Darbari *et al*, 2012; Fertrin & Costa, 2010; Gill *et al*, 1995; Castro *et*

al, 1994; Milner *et al*, 1991). In this study, we found no association of these phenotypes with alpha-thalassemia.

It had been suggested that the coexistence of alpha-thalassemia would extend life expectancy of patients with sickle cell anemia (Rumaney *et al*, 2014; Fabry *et al*, 1984). Powars *et al*, describes a more favorable outcome in patients with sickle cell disease and alpha-thalassemia (Powars *et al*, 2002). However, it has been reported that alpha-thalassemia could have a small effect in the clinical course of the disease when compared to HbF levels (Steinberg, 2005). Although we confirm an apparent better prognosis for patients with alpha-thalassemia, the overall survivals do not show association. There was also no difference between the overall survivals of patients based on β^S haplotypes. It is worth pointing that we analyzed a small sample of deaths.

The present study constituted the largest in Brazil and one of the largest literary studies that described the influence of classical molecular markers alpha-thalassemia and haplotypes β^S on SCA clinical profile. (Zago *et al*, 1992; Figueiredo *et al*, 1996; Bezerra *et al*, 2007; Silva & Gonçalves, 2009; Filho *et al*, 2010; Cabral *et al*, 2011; Camilo-Araujo *et al*, 2014; da Silva *et al*, 2014; Shimauti *et al*, 2015; Leal *et al*, 2016; Cardoso & Guerreiro, 2010; Gonçalves, 2003; Adorno *et al*, 2004, 2008, Belisario *et al*, 2010b, 2010a; Rodrigues *et al*, 2016; Bitoungui *et al*, 2015). We reported here a protective effect of alpha-thalassemia on the development of stroke, priapism and cholelithiasis in a population of SCA patients from Brazil, with a cumulative incidence significantly lower for patients with alpha-thalassemia deletion. No association was found between the hemolytic subphenotype leg ulcer and alpha-thalassemia. This mutation also does not appear to be a modulatory influence in vaso-occlusive complications and in overall survival of our SCA patients. The severity of SCA found in most of our patients complies with the high frequency of the Bantu haplotype and the Bantu/Bantu genotype; however, the β^S haplotype showed no association with clinical impact on SCA. To understand the specific clinical heterogeneity of each population is necessary and could offer the predictions to adapt the right treatments to the right patients and early preventive exam, could also guide the development of novel therapies.

Acknowledgments

The authors thank to the sickle cell anemia patients and their families who made this research possible.

References

- Adams, G.T., Snieder, H., McKie, V.C., Clair, B., Brambilla, D., Adams, R.J., Kutlar, F. & Kutlar, A. (2003) Genetic risk factors for cerebrovascular disease in children with sickle cell disease: design of a case-control association study and genomewide screen. *BMC Medical Genetics*, **4**, 6.
- Adams, R.J., Kutlar, A., McKie, V., Carl, E., Nichols, F.T., Liu, J.C., McKie, K. & Clary, A. (1994) Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*, **45**, 279–282.

- Adekile, A.D. (2005) Mild-phenotype sickle cell disease: molecular basis, clinical presentation and management recommendations. *Current Paediatrics*, **15**, 57–61.
- Adorno, E.V., Zanette, Â., Lyra, I., Seixas, M.O., Reis, M.G. & Gonçalves, M.S. (2008) Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **31**, 621–625.
- Adorno, E.V., Zanette, A., Lyra, I., Souza, C.C., Santos, L.F., Menezes, J.F., Dupuit, M.F., Almeida, M.N.T., Reis, M.G. & Gonçalves, M.S. (2004) The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. *Hemoglobin*, **28**, 267–271.
- Akinsheye, I., Alsultan, A., Solovieff, N., Ngo, D., Baldwin, C.T., Sebastiani, P., Chui, D.H.K. & Steinberg, M.H. (2011) Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*, **118**, 19–27.
- Alkindi, S.Y., Pathare, A., Zadjali, S. Al, Panjwani, V., Wasim, F. & Khan, H. (2015) Serum Total Bilirubin , not Cholelithiasis , is Influenced by UGT1A1 Polymorphism , Alpha Thalassemia and BS Haplotype : First Report on Comparison between Arab- Indian and African BS Genes. , 1–7.
- Arends, A., Alvarez, M., Velázquez, D., Bravo, M., Salazar, R., Guevara, J.M. & Castillo, O. (2000) Determination of b-globin gene cluster haplotypes and prevalence of a-thalassemia in sickle cell anemia patients in Venezuela. *Am. J. Hematol*, **64**, 87–90.
- Baldwin, C., Nolan, V.G., Wyszynski, D.F., Ma, Q.-L., Sebastiani, P., Embury, S.H., Bisbee, A., Farrell, J.J., Farrer, L.A. & Steinberg, M.H. (2005) Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. *Blood*, **106**, 372–375.
- Ballas, S.K., Kesen, M.R., Goldberg, M.F., Lutty, G. a, Dampier, C., Osunkwo, I., Wang, W.C., Hoppe, C., Hagar, W., Darbari, D.S. & Malik, P. (2012) Beyond the Definitions of the Phenotypic Complications of Sickle Cell Disease: An Update on Management. *The Scientific World Journal*, **2012**, 1–55.
- Belisario, A.R., Martins, M.L., Brito, A.M.S., Rodrigues, C.V., Silva, C.M. & Viana, M.B. (2010a) b-Globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or Sb-thalassemia and their association with clinical and hematological features. *Acta Haematologica*, **124**, 162–170.
- Belisario, A.R., Rodrigues, C.V., Martins, M.L., Silva, C.M. & Viana, M.B. (2010b) Coinheritance of α -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin*, **34**, 516–29.
- Bezerra, M.A.C., Santos, M.N.N., Araújo, A.S., Gomes, Y.M., Abath, F.G.C. & Bandeira, F.M.G.C. (2007) Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the State of Pernambuco, Brazil. *Hemoglobin*, **31**, 83–8 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17365008>.
- Bitoungui, V.J.N., Pule, G.D., Hanchard, N., Ngogang, J. & Wonkam, A. (2015) Beta-Globin Gene Haplotypes Among Cameroonians and Review of the Global Distribution: Is There a Case for a Single Sickle Mutation Origin in Africa? *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, **19**, 171–179 Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/omi.2014.0134>.
- Cabral, C.H.K., Serafim, É.S.S., Medeiros, W.R.D.B. de, Fernandes, T.A.A. de M., Kimura, E.M., Costa, F.F., Sonati, M. de F., Rebecchi, I.M.M. & Medeiros, T.M.D. de (2011) Determination of β S haplotypes in patients with sickle-cell anemia in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genetics and Molecular*

- Biology*, **34**, 421–424.
- Camilo-Araujo, R.F., Amancio, O.M.S., Figueiredo, M.S., Cabanas-Pedro, A.C. & Braga, J.A.P. (2014) Molecular analysis and association with clinical and laboratory manifestations in children with sickle cell anemia. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, **36**, 334–339.
- Cardoso, G.L. & Guerreiro, J.F. (2010) Molecular characterization of sickle cell anemia in the Northern Brazilian state of Pará. *American Journal of Human Biology*, **22**, 573–577.
- Castro, O., Brambilla, D., Thorington, B., Rendorf, C., Scott, R., Gillette, P., Vera, J. & Levy, P. (1994) The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*, **84**, 643–649.
- Chaar, V., Diara, J.P. & Clayton, J. (2005) Association of UGT1A1 polymorphism with prevalence and age at onset of cholelithiasis in sickle cell anemia Vicky. **90**,
- Chang, Y., Smith, K., Moore, R., Serjeant, G.R. & Dover, G.J. (1995) An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, beta-globin haplotypes, alpha-globin gene number, gender, and age. *Blood*, **85**, 1111–7.
- Curro, G., Meo, A., Ippolito, D., Pusiolo, A. & Cucinotta, E. (2007) Asymptomatic Cholelithiasis in Children With Sickle Cell Disease. *Annals of Surgery*, **245**, 126–129.
- Darbari, D.S., Onyekwere, O., Nouraie, M., Minniti, C.P., Luchtman-Jones, L., Rana, S., Sable, C., Ensing, G., Dham, N., Campbell, A., Arteta, M., Gladwin, M.T., Castro, O., Taylor, J.G., Kato, G.J. & Gordeuk, V. (2012) Markers of Severe Vaso-Occlusive Painful Episode Frequency in Children and Adolescents with Sickle Cell Anemia. *The Journal of Pediatrics*, **160**, 286–290.
- Davis, L., Dibner, M. & Battery, J. (2012) Basic Methods in Molecular Biology Elsevier Available at: https://books.google.com/books?hl=pt-BR&lr=&id=739enqOyW_UC&pgis=1 [Accessed January 26, 2016].
- Dodé, C., Krishnamoorthy, R., Lamb, J. & Rochette, J. (1993) Rapid analysis of - α 3.7 thalassaemia and $\alpha\alpha$ anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *British Journal of Haematology*, **83**, 105–111.
- Domingos, I.F., Falcão, D.A., Hatzlhofer, B.L., Cunha, A.F., Santos, M.N., Albuquerque, D.M., Fertrin, K.Y., Costa, F.F., Azevedo, R.C., Machado, C.G., Araújo, A.S., Lucena-Araujo, A.R. & Bezerra, M.A. (2014) Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Annals of Hematology*, **93**, 1123–1129.
- Driss, A., Asare, K., Hibbert, J., BM, G., TV, A. & JK, S. (2009) Sickle cell disease in the post genomic era: a monogenic disease with a polygenic phenotype. *Genomics Insights*, **2009**, 23–48.
- Fabry, M.E., Mears, G.J., Patel, P., Schaefer-Rego, K., Carmichael, D.L., Martinez, G. & Nagel, R.L. (1984) Dense Cells in Sickle cell anemia: The effect of gene interaction. *Blood*, **64**, 1042–1046.
- Fertrin, K.Y. & Costa, F.F. (2010) Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. *Expert Review of Hematology*, **3**, 443–458.
- Figueiredo, M.S., Kerbauy, J., Gonçalves, M.S., Arruda, V.R., Saad, S.T.O., Sonati, M.F., Stoming, T. & Costa, F.F. (1996) Effect of α -thalassemia and β -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *American Journal of Hematology*, **53**, 72–76.

- Filho, I.L.D.S., Ribeiro, G.S., Moura, P.G., Vecchi, M.L., Cavalcante, A.C. & Andrada-Serpa, M.J. De (2012) Sick cell disease: acute clinical manifestations in early childhood and molecular characteristics in a group of children in Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, **34**, 196–201.
- Filho, I.L.S., Ribeiro, G.S., Pimenta-Bueno, L.M. & Serpa, M.J.A. (2010) The frequency of β -globin gene haplotypes, α -thalassemia and genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase, factor V leiden and prothrombin genes in children with sickle cell disease in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, **32**, 76–78.
- Flanagan, J.M., Frohlich, D.M., Howard, T. a, Schultz, W.H., Driscoll, C., Nagasubramanian, R., Mortier, N. a, Kimble, A.C., Aygun, B., Adams, R.J., Helms, R.W. & Ware, R.E. (2011) Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood*, **117**, 6681–4 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3123027&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract> [Accessed May 7, 2014].
- Gill, B.F.M., Sleeper, L. a, Weiner, S.J., Brown, A.K., Bellevue, R. & Grover, R. (1995) Clinical Events in the First Decade in a cohort of infants with sickle cell disease. *Blood*, **86**, 776–783.
- Gonçalves, M.S. (2003) β S -Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador , Bahia , Northeastern Brazil. **36**, 1283–1288.
- Haider, M.Z., Ashebu, S., Aduh, P. & Adekile, A.D. (1998) Influence of α -thalassemia on cholelithiasis in SS patients with elevated Hb F. *Acta Haematologica*, **100**, 147–150.
- Higgs, D.R., Aldridge, B.E., Lamb, J., Clegg, J.B., Weatherall, D.J., Hayes, R.J., Grandison, Y., Lowrie, Y., Mason, K.P., Serjeant, B.E. & Serjeant, G.R. (1982) The Interaction of Alpha-Thalassemia and Homozygous Sickle-Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, **306**, 1441–1446.
- Hunt JA, Ingram VM (1958) Allelomorphism and the chemical differences of the human haemoglobins A, S and C, *Nature* 181 1062–1063.
- Ingram, V.M. (1956) A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature* 178, 792–794.
- Joly, P., Pondarré, C., Bardel, C., Francina, A. & Martin, C. (2012) The alpha-globin genotype does not influence sickle cell disease severity in a retrospective cross-validation study of the pediatric severity score. *European Journal of Haematology*, **88**, 61–67.
- Kato, G.J., Gladwin, M.T. & Steinberg, M.H. (2007) Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Reviews*, **21**, 37–47.
- Kim, H.T. (2007) Cumulative Incidence in Competing Risks Data and Competing Risks Regression Analysis. *Clinical Cancer Research*, **13**, 559–565.
- Koshy, M., Entsuah, R., Koranda, A., Kraus, A.P., Johnson, R., Bellvue, R., Flournot-Gill, Z. & Levy, P. (1989) Leg Ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood*, **74**, 1403–1408.
- Leal, A., Martins, P.R., Balarin, M., Pereira, G. & Resende, G.A. (2016) Haplotypes β s-globin and its clinical-haematological correlation in patients with sickle-cell anemia in Triângulo Mineiro , Minas Gerais , Brazil. *J Bras Patol Med Lab*, 5–10.
- Lemos Cardoso, G. & Farias Guerreiro*, J. (2006) African gene flow to north Brazil as revealed by HBB*S gene haplotype analysis. *American Journal of Human Biology*, **18**, 93–98.
- Lettre, G., Sankaran, V.G., Bezerra, M.A.C., Araujo, A.S., Uda, M., Sanna, S., Cao,

- A., Schlessinger, D., Costa, F.F., Hirschhorn, J.N. & Orkin, S.H. (2008) DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and γ -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 11869–11874.
- Liu, L., Pertsemlidis, A., Ding, L.-H., Story, M.D., Steinberg, M.H., Sebastiani, P., Hoppe, C., Ballas, S.K. & Pace, B.S. (2016) Original Research: A case-control genome-wide association study identifies genetic modifiers of fetal hemoglobin in sickle cell disease. *Experimental Biology and Medicine*, **241**, 706–718.
- Milner, P.F., Kraus, A.P., Sebes, J.I., Sleeper, L.A., Dukes, K.A., Embury, S.H., Bellevue, R., Koshy, M., Moohr, J.W. & Smith, J. (1991) Sickle cell disease as cause of osteonecrosis of the femoral head. *The New England Journal of Medicine*, **325**, 1476–1481.
- Minniti, C.P., Eckman, J., Sebastiani, P., Steinberg, M.H. & Ballas, S.K. (2010) Leg ulcers in sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, **85**, 831–833.
- Nagel, R.L., Fabry, M.E., Pagnier, J., Zohoun, I., Wajcman, H., Baudin, V. & Labie, D. (1985) Hematologically and Genetically Distinct Forms of Sickle Cell Anemia in Africa. *New England Journal of Medicine*, **312**, 880–884.
- Nagel, R.L. & Steinberg, M.H. (2001) Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. *Pediatr Pathol Mol Med*, **20**, 123–136.
- Neonato, M.G., Guilloud-Bataille, M., Beauvais, P., Begue, P., Belloy, M., Benkerrou, M., Ducrocq, R., Maier-Redelsperger, M., de Montalembert, M., Quinet, B., Elion, J., Feingold, J. & Girot, R. (2000) Acute clinical events in 299 homozygous sickle cell patients living in France. French Study Group on Sickle Cell Disease. *European journal of haematology*, **65**, 155–164.
- Ngo, D., Bae, H., Steinberg, M.H., Sebastiani, P., Solovieff, N., Baldwin, C.T., Melista, E., Safaya, S., Farrer, L.A., Al-Suliman, A.M., Albuali, W.H., Al Bagshi, M.H., Naserullah, Z., Akinsheye, I., Gallagher, P., Luo, H., Chui, D.H.K., Farrell, J.J., Al-Ali, A.K. & Alsultan, A. (2013) Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Genetic studies of the Arab-Indian haplotype. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **51**, 22–26.
- Nolan, V.G., Adewoye, A., Baldwin, C., Wang, L., Ma, Q., Wyszynski, D.F., Farrell, J.J., Sebastiani, P., Farrer, L. a & Steinberg, M.H. (2006) Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. *British Journal of Haematology*, **133**, 570–578.
- Nolan, V.G., Baldwin, C., Ma, Q., Wyszynski, D.F., Amirault, Y., Farrell, J.J., Bisbee, A., Embury, S.H., Farrer, L. a & Steinberg, M.H. (2005a) Association of single nucleotide polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, **128**, 266–272.
- Nolan, V.G., Wyszynski, D.F., Farrer, L.A. & Steinberg, M.H. (2005b) Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood*, **106**, 3264–3267.
- Ohene-Frempong, K., Weiner, S.J., Sleeper, L. a, Miller, S., Embury, S., Moohr, J.W., Wethers, D.L., Pegelow, C.H. & Gill, F.M. (1998) Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*, **91**, 288–94 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414296>.
- Pagnier, J., Mears, J.G., Dunda-Belkhodja, O., Schaefer-Rego, K.E., Beldjord, C., Nagel, R.L. & Labie, D. (1984) Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**, 1771–1773.
- Pandey, S., Pandey, S., Mishra, R.M., Sharma, M. & Saxena, R. (2011) Genotypic

- influence of α -deletions on the phenotype of Indian sickle cell anemia patients. *The Korean Journal of Hematology*, **46**, 192.
- Parody, R., Rabella, N., Martino, R., Otegui, M., del Cuerpo, M., Coll, P. & Sierra, J. (2007) UGT1A1 Polymorphism Outweighs the Modest Effect of Deletional (–3.7 Kb) α -Thalassemia on Cholelithogenesis in Sickle Cell Anemia Vicky. *American journal of hematology*, **82**, 807–811.
- Pauling, L., Itano, H.A., Singer, S.J. & Wells, I.C. (1949) Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. *Science*, **110**, 543–548 Available at: <http://www.sciencemag.org/content/110/2865/543>.
- Platt, O.S., Thorington, B., Brambilla, D., Milner, P.F., Rosse, W.F., Vichinsky, E. & Kinney, T. (1991) Pain in Sickle Cell Disease: Rates and Risk Factors. *The New England Journal of Medicine*, **325**, 11–16.
- Powars, D. & Hiti, A. (1993) Sickle Cell Anemia. BS gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *American Journal of Diseases of Children*, **147**, 1197–1202.
- Powars, D.R. (1990) Sickle cell anemia and major organ failure. *Hemoglobin*, **14**, 573–498 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.14773>.
- Powars, D.R. (1991) Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. *Hematology/oncology clinics of North America*, **5**, 475–93.
- Powars, D.R., Hiti, A., Ramicone, E., Johnson, C. & Chan, L. (2002) Outcome in hemoglobin SC disease: A four-decade observational study of clinical, hematologic, and genetic factors. *American Journal of Hematology*, **70**, 206–215.
- Quinn, C.T. & Miller, S.T. (2004) Risk factors and prediction of outcomes in children and adolescents who have sickle cell anemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **18**, 1339–1354.
- Rahgozar, S., Poorfathollah, A. a, Moafi, A.R. & Old, J.M. (2000) BS Gene in Central Iran Is in Linkage Disequilibrium With the Indian – Arab Haplotype. *American Journal of Hematology*, **195**, 192–195.
- Rieder, R.F., Safaya, S., Gillette, P., Fryd, S., Hsu, H., Adams, J.G. & Steinberg, M.H. (1991) Effect of beta-globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. *American journal of hematology*, **36**, 184–9.
- Rodrigues, D.O.W., Ribeiro, L.C., Sudário, L.C., Teixeira, M.T.B., Martins, M.L., Pittella, A.M.O.L. & Junior, I. de O.F. (2016) Genetic determinants and stroke in children with sickle cell disease. *Jornal de Pediatria*, 1–7.
- Rumaney, M.B., Ngo Bitoungui, V.J., Vorster, A.A., Ramesar, R., Kengne, A.P., Ngogang, J. & Wonkam, A. (2014) 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*, **9**, 1–10.
- Rusanova, I., Escames, G., Cossio, G., De Borace, R.G., Moreno, B., Chahboune, M., López, L.C., Díez, T. & Acuña-Castroviejo, D. (2010) Oxidative stress status, clinical outcome, and β -globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. *European Journal of Haematology*, **85**, 529–537.
- Serjeant, G.R. (2013) The natural history of sickle cell disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **3**, 1–11.
- Serjeant, G.R. & Vichinsky, E. (2017) Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. *Blood Cells*,

- Molecules, and Diseases*, 0–1 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979617301237>.
- Shimauti, E.L.T., Humberto Silva, D.G., Menezes de Souza, E., Almeida, E.A. De, Leal, F.P. & Bonini-Domingos, C.R. (2015) Prevalence of β -globin gene haplotypes, α -thalassemia (3.7 kb deletion) and redox status in patients with sickle cell anemia in the state of Paraná, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **323**, 316–323.
- Silva, L.B. & Gonçalves, R.P. (2009) Características fenotípicas dos pacientes com anemia falciforme de acordo com os haplótipos do gene da β S-globina em Fortaleza, Ceará. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*.
- da Silva, M.A.L., Friedrisch, J.R., Bittar, C.M., Urnau, M., Merzoni, J., S. Valim, V., Amarin, B., Pezzi, A., Chies, J.A.B. & Silla, L.M.R. (2014) B-Globin Gene Cluster Haplotypes and Clinical Severity in Sickle Cell Anemia Patients in Southern Brazil. *Open Journal of Blood Diseases*, **4**, 16–23.
- Steinberg, M.H. (2005) Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, **129**, 465–481.
- Steinberg, M.H. (2009) Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *TheScientificWorldJournal*, **9**, 46–67.
- Steinberg, M.H. & Embury, S.H. (1986) Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood*, **68**, 985–90.
- Steinberg, M.H. & Rodgers, G.P. (2001) Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. *Seminars in hematology*, **38**, 299–306.
- Sutton, M., Bouhassira, E.E. & Nagel, R.L. (1989) Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *American Journal of Hematology*, **32**, 66–69.
- Thein, S.L., Menzel, S., Peng, X., Best, S., Jiang, J., Close, J., Silver, N., Gerovasilli, A., Ping, C., Yamaguchi, M., Wahlberg, K., Ulug, P., Spector, T.D., Garner, C., Matsuda, F., Farrall, M. & Lathrop, M. (2007) 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*, **104**, 11346–11351.
- Uda, M., Galanello, R., Sanna, S., Lettre, G., Sankaran, V.G., Chen, W., Usala, G., Busonero, F., Maschio, A., Albai, G., Piras, M.G., Sestu, N., Lai, S., Dei, M., Mulas, A., Crisponi, L., Naitza, S., Asunis, I., Deiana, M., Nagaraja, R., et al (2008) Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of α -thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 1620–1625.
- Vasavda, N., Menzel, S., Kondaveeti, S., Maytham, E., Awogbade, M., Bannister, S., Cunningham, J., Eichholz, A., Daniel, Y., Okpala, I., Fulford, T. & Thein, S.L. (2007) The linear effects of α -thalassaemia, the UGT1A1 and HMOX1 polymorphisms on cholelithiasis in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, **138**, 263–270.
- Zago, M.A., Figueiredo, M.S. & Ogo, S.H. (1992) Bantu BS Cluster Haplotype Predominates Among Brazilian Blacks. *American Journal of Physical Anthropology*, **298**, 295–298.
- Zago, M.A. & Pinto, A.C.S. (2007) Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, **29**, 207–214.

Table 1. Patient's characteristics and distribution of different complications in sickle cell anemia.

Characteristics (n=714)	n or Mean	(% or range)
Age, years	25	(4 – 61)
Gender ratio: Male/Female	347/367	(48.6/51.4)
Painful Crisis:		
0-2/year	385	(53.9)
3-5/year	272	(38.1)
>6/year	57	(8.0)
Cholelithiasis	409	(57.3)
Osteonecrosis	84	(11.7)
Acute chest syndrome	93	(13.0)
Priapism	96	(27.6) ¹
Stroke	69	(9.7)
Leg ulcers	145	(20.3)
Death	51	(7.1)
Control		
Age, years	28	(18-52)
Gender ratio	43/83	(34/66)
Male/Female		

¹Considering only male patients

Table 2. Frequency of β^S chromosomes, haplotype and $-\alpha^{3.7kb}$ thalassemia mutation in sickle cell anemia patients.

β^S haplotypes	N (%)	β^S chromosomes	N (%)	$-\alpha^{3.7}$ thalassemia	N (%)
CAR/CAR	399 (56.5)	CAR	1050 (74.3)	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	539 (76.2)
CAR/Ben	175 (24.8)	Ben	262 (18.4)	$-\alpha/\alpha\alpha$	149 (21.1)
CAR/Atypical	72 (10.2)	Atypical	91 (6.4)	$-\alpha/-\alpha$	19 (2.7)
Ben/Ben	37 (5.0)	Others ²	9 (0.6)		
Ben/Atypical	10 (1.4)				
Atypical/Atypical	8 (1.1)				
Others ¹	7 (0.9)				
Total	706 (98,9)	Total	1412 (98,9)	Total	707 (99,0)

¹Heterozigous for Senegal, Cameroon or Saudi-Indian haplotypes; ²Senegal, Cameroon or Saudi-Indian.

Table 3. Alpha Thalassemia status and β^S Haplotype association with clinical manifestation in Sickle cell anemia.

	α Thalassemia					β^S Haplotype				
	$\alpha^{3.7}$ positive		$\alpha^{3.7}$ negative		<i>P-value</i>	CAR/CAR		non-CAR/CAR		<i>P-value</i>
	N	%	N	%		N	%	N	%	
Control	32	(25.4)	93	(74.6)	Ref.	77	(61.1)	48	(38.9)	
ACS	22	(24.1)	69	(75.8)	0.874	54	(59.3)	37	(40.6)	0.779
OR; CI95%	0.92 (0.49-1.73)					0.91 (0.52-1.58)				
Leg ulcer	28	(19.4)	116	(80.5)	0.243	79	(54.8)	65	(45.1)	0.269
OR; CI95%	0.70 (0.39-1.24)					0.75 (0.46-1.23)				
Osteonecrosis	24	(28.6)	60	(71.4)	0.637	49	(58.3)	35	(41.6)	0.667
OR; CI95%	1.16 (0.62-2.16)					0.87 (0.49-1.53)				
Stroke	8	(11.7)	60	(88.2)	0.026	45	(66.1)	23	(33.8)	0.639
OR; CI95%	0.38 (0.16-0.89)					1.22 (0.65-2.26)				
Priapism	17	(17.7)	79	(82.3)	0.050	59	(61.4)	37	(38.5)	1.000
OR; CI95%	0.42 (0.18-0.93)					1.00 (0.48-2.08)				

Table 4. Alpha Thalassemia status and β^S Haplotype association with cholelithiasis and painful Crisis manifestation in Sickle cell anemia.

	α Thalassemia					β^S Haplotype				
	$\alpha^{3.7}$ positive		$\alpha^{3.7}$ negative		<i>P-value</i>	CAR/CAR		non-CAR/CAR		<i>P-value</i>
	N	%	N	%		N	%	N	%	
Cholelithiasis	79	(19.4)	328	(80.5)	0.006	226	(50.8)	180	(47.6)	0.283
No cholelithiasis	56	(30.1)	130	(69.8)		113	(60.7)	73	(39.2)	
OR; CI95%	0.42 (0.18-0.93)					0.81 (0.57-1.15)				
Painful Crisis					0.361					0.304
0-2/year	82	(21.6)	297	(78.3)		214	(56.5)	165	(43.5)	
3-5/year	71	(26.2)	200	(73.8)		158	(58.3)	112	(41.3)	
>6/year	15	(26.3)	42	(73.6)		27	(47.3)	30	(52.6)	

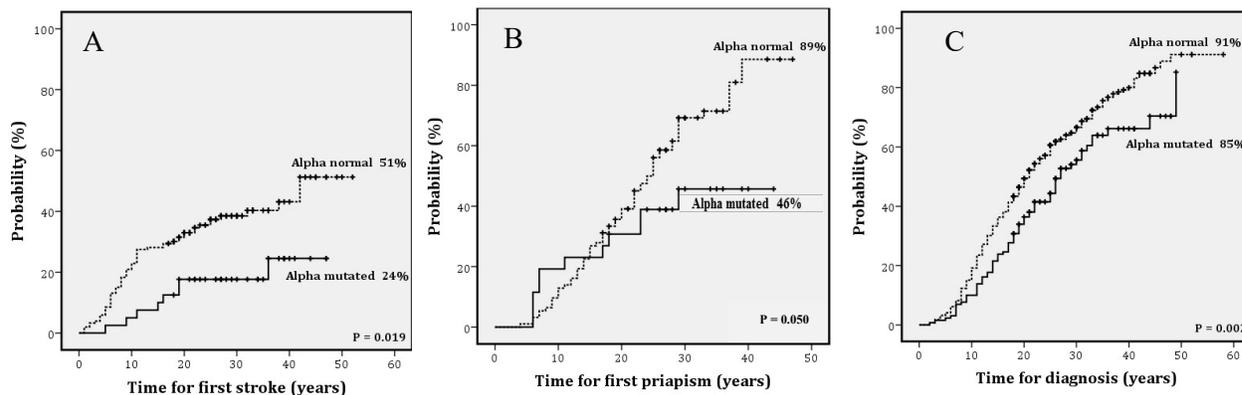


Figure 1. Cumulative Incidence of clinical manifestation according to genotype. Cumulative Incidence of dactylitis (A), leg ulcers (B); stroke (C) and priapism (D) in Sickle cell disease according to alpha thalassemia status.

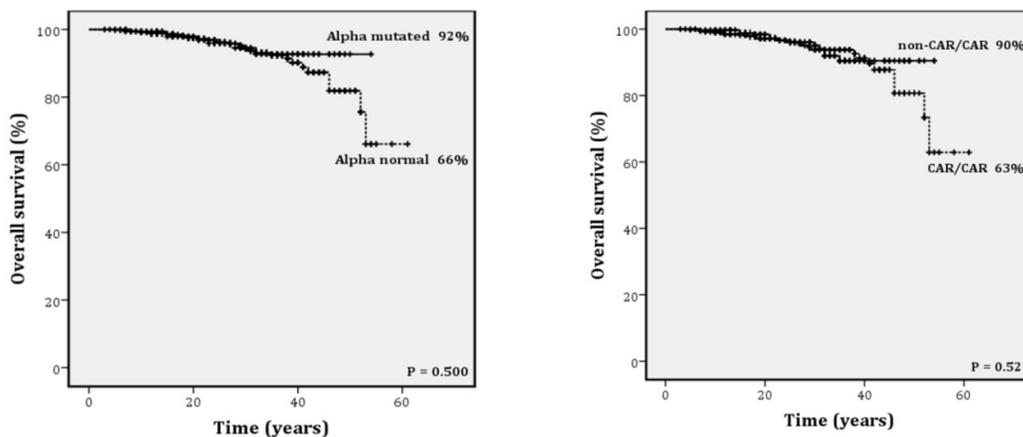


Figure 2. (A) Overall survival of patients with sickle cell disease according to the presence or absence of alpha thalassemia. (B) Overall survival of patients with sickle cell disease according to the presence or absence of the haplotype Bantu/Bantu.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 <p style="font-size: small;">Fundação HEMOPE Recife</p>	<p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</p> <p>Rua. Joaquim Nabuco, 171- Graças Recife-PE. CEP: 52011.000 Tel.: 81- 3182-4771 Fax: 81- 3182-4660 C-eletrônico: cep.hemope@gmail.com</p>	 <p style="font-size: x-small;">Estado de Pernambuco Governador do Estado de PE Secretaria de Saúde do Estado de PE</p>
--	---	--

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL: Nº. 035/2010

Título do Projeto: Moduladores genéticos das manifestações clínicas da anemia falciforme

Instituição Solicitante: Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Pesquisador: Marcos André Cavalcanti Bezerra, Ph.D.

Identidade: 5867375 **CPF:** 987.061.525-20 **Telefone:** 81 – 3182-4711

Endereço: Rua. Antonio Celso Uchoa Cavalcanti- Graças- Recife – PE – CEP: 52050-002

Local de Desenvolvimento do Projeto: Hospital de Hematologia da Fundação Hemope- UNILABE

Finalidade: Auxílio a projetos de pesquisa Edital FACEPE 10/010.

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Objetivo Geral: Determinar as bases moleculares que possam influenciar na variabilidade clínica da anemia falciforme.

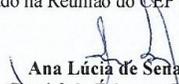
Objetivos Específicos: Determinar a co-herança de $\alpha_2^{3,7kb}$ talassemia e da triplicação do α ($\alpha\alpha\alpha$) influenciando nas manifestações clínicas do acidente vascular cerebral e priapismo na anemia falciforme; Relacionar os níveis de HbFetal e genótipos das Haplótipos β^S com o episódio de priapismo e acidente vascular cerebral; Investigar a associação do polimorfismo na região promotora do gene da eNOS (T-786C) no desenvolvimento do priapismo em pacientes com anemia falciforme; Investigar se a associação de SNPs no gene Kloto podem ser um fator de risco nas complicações vasculares, como priapismo, em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do polimorfismo na região promotora do gene TNF- α (-308) no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do SNPs rs2228088 (T- >G), localizado na região codificadora do gene TNF- α no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do SNPs rs3093665 (C- >A), localizado na região 3' não transcrita do gene TNF- α no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Comparar e relacionar os níveis de hemoglobina total, Hb S, Hb F e reticulócitos entre pacientes portadores de anemia falciforme com e sem priapismo; Comparar e relacionar os níveis de hemoglobina total, Hb S, Hb F e reticulócitos entre os pacientes portadores de anemia falciforme com e sem AVC; Compreender melhor a heterogeneidade clínica da doença falciforme nas complicações do sistema nervoso central e Compreender melhor a heterogeneidade da doença falciforme nas complicações clínicas do priapismo.

3 - PARECER DO RELATOR: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer nº. 035/2010, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.e).
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Homologado na Reunião do CEP de 20/10/2010


 Ana Lúcia de Sena
 Coordenadora - Comitê de Ética em Pesquisa -HEMOPE

ANEXO B - CURRICULUM VITAE (LATTES)**Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer**

Curriculum Vitae

Setembro 2016

Dados pessoais

Nome Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer
Filiação Alberto Borges Domingues da Silva e Laurene Aurea Lucena Tavares de Melo
Nascimento 03/05/1983 - Recife/PE - Brasil
Carteira de Identidade 6371914 SSP - PE - 03/08/2000
CPF 055.053.074-69

Endereço residencial Rua Frei Jaboatão, N-280, Apto 403-B
Torre - Recife
50710030, PE - Brasil
Telefone: 81 30319082

Endereço profissional Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia
Avenida Professor Artur de Sá - lado par, S/N
Cidade Universitária - Recife
50740525, PE - Brasil
Telefone: 81 21268510

Endereço eletrônico

E-mail para contato : betanialucena@yahoo.com.br
E-mail alternativo betania.domingues@ufpe.br

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: : Fatores Genéticos Moduladores do Acidente Vascular Cerebral na Anemia Falciforme
Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra
- 2008 - 2010** Mestrado em Ciências da Saúde.
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
Título: Estudo da influência dos polimorfismos genéticos relacionados à trombofilia nas complicações vasculares das doenças falciformes, Ano de obtenção: 2010
Orientador: Maria Tereza Cartaxo Muniz
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2003 - 2007** Graduação em Biomedicina.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: PERFIL CLÍNICO, MOLECULAR E LABORATORIAL DE
 PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME PORTADORES DE
 LESÕES OSTEO-ARTICULARES
 Orientador: Dr. Aderson da Silva Araújo

Formação complementar

- 2015 - 2015** Curso de curta duração em PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR). (Carga horária: 6h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2013 - 2013** Estágio no Laboratório de Hematologia. . (Carga horária: 40h).
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Brasil
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Capacitação de Imunotolerância. (Carga horária: 28h).
 Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE, Sao Paulo, Brasil
- 2013 - 2013** Simpósio Internacional Multidisciplinar Hemofilia. . (Carga horária: 8h).
 Baxter Hospitalar Ltda, Baxter, Sao Paulo, Brasil
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em PCR em Tempo Real: Princípios básicos e Aplicação. (Carga horária: 60h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2012 - 2012** Avaliação do Controle de Qualidade Ext -IEQAS. . (Carga horária: 12h).
 Ministério da Saúde, MS, Brasília, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Projeto: Estruturação de Laboratórios Hemostasiia. (Carga horária: 40h).
 Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE, Sao Paulo, Brasil
- 2011 - 2011** Workshop: Triagem de Hb S por HPLC. . (Carga horária: 8h).
 Nordelab, NORDELAB, Brasil
- 2011 - 2011** CIMAH. . (Carga horária: 20h).
 Novo Nordisk Farmaceutica do Brasil , NOVO NORDISK, Araucaria, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Curso de Práticas Hematológicas. (Carga horária: 19h).
 Escola Brasileira de Hematologia, EBH, Brasil

- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Curso de Hemostasia e Trombose. (Carga horária: 20h).
Escola Brasileira de Hematologia, EBH, Brasil
- 2010 - 2010** CIMAH. . (Carga horária: 8h).
Novo Nordisk Farmaceutica do Brasil , NOVO NORDISK, Araucaria, Brasil
- 2008 - 2008** Estagio no laboratório de hemoglobina e genoma. . (Carga horária: 40h).
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em VII Curso de Férias - O Hemograma: do normal ao p. (Carga horária: 20h).
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em VI Curso de Férias - Técnicas Moleculares no Diagn. (Carga horária: 20h).
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil
- 2005 - 2007** Extensão universitária em Estágio no Lab. de Hemoblobinopatias do Hemope.
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil
- 2007 - 2007** Estágio no laboratório de hemoglobina e genoma. . (Carga horária: 80h).
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Biologia Molecular Básica Avançada na Hematologia. (Carga horária: 6h).
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em III Curso de Bioética do Hemope. (Carga horária: 30h).
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em V Curso de Férias - HLA. (Carga horária: 20h).
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil
- 2005 - 2005** Extensão universitária em Monitoria na Disciplina de Microbiologia. (Carga horária: 60h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

- 2005 - 2005** Curso de curta duração em IV Curso de Férias "Citometria de Fluxo". (Carga horária: 20h).
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil, Ano de obtenção: 2005
- 2005 - 2005** Extensão universitária em Curso de Hematologia. (Carga horária: 60h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil, Ano de obtenção: 2006
- 2005 - 2005** Extensão universitária em Curso de Extensão "Hb Humanas - do Gene a Proteína. (Carga horária: 40h).
Universidade Estadual Paulista, UNESP, Presidente Prudente, Brasil, Ano de obtenção: 2005
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Curso Básico de Biossegurança em Laboratório. (Carga horária: 3h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil, Ano de obtenção: 2004
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Saúde Pública e 25 anos de regulamentação Biomédic. (Carga horária: 30h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2003 - 2003** Extensão universitária em XLVI Curso de Extensão em Hematologia. (Carga horária: 100h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil, Ano de obtenção: 2003
- 1995 - 1999** Inglês Intermediário. .
Sociedade Brasileira de Cultura Inglesa, CULTURA INGLESA, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2013 - Atual Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Professor Assistente , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações: Departamento de Ciências Farmacêuticas - CCS. Disciplina de Hematologia Clínica

Atividades

11/2015 - Atual Conselhos, Comissões e Consultoria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia

Especificação:

Membro da Comissão Diretora do Departamento de Ciências Farmacêuticas

05/2015 - Atual Conselhos, Comissões e Consultoria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia

Especificação:

Membro da Comissão de Pesquisa do Departamento de Ciências Farmacêuticas

04/2015 - 11/2015 Outra atividade técnico-científica, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia

Especificação:

Coordenador de Monitoria

03/2015 - 03/2016 Outra atividade técnico-científica, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia

Especificação:

Coordenadora da Disciplina FA 106 - Imunologia Clínica

09/2014 - Atual Outra atividade técnico-científica, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia

Especificação:

Coordenadora da Disciplina FA611 - Hematologia Clínica

10/2013 - Atual Graduação, Farmácia

Disciplinas ministradas:

Hematologia Clínica (FA611) , Análise do Hemograma (FA671) , Estágio 6 - Análises Clínicas (FA605)

10/2013 - Atual Graduação, Biomedicina

Disciplinas ministradas:

Exames Hematológicos I (BR256)

2. Ministério da Saúde - MS

Vínculo institucional

2012 - 2015 Vínculo: Assessoramento Técnico , Enquadramento funcional: Membro CAT-Hemostasia, Regime: Parcial

Atividades

11/2012 - Atual Conselhos, Comissões e Consultoria, Secretaria de Atenção a Saúde

Especificação:

Membro da Comissão de Assessoramento Técnico ao Diagnóstico Laboratorial em Hemostasia (CAT-Hemostasia)

3. Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco - HEMOPE

Vínculo institucional

- 2010 - 2013** Enquadramento funcional: Biomédica , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações: Laboratório de Hemoglobinopatias - UNILABE
- 2010 - 2013** Vínculo: Contrato Temporário , Enquadramento funcional: Biomédica , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações: Laboratório de Hemostasia - UNILABE

Atividades

- 04/2010 - 04/2010** Outra atividade técnico-científica, Fundação Hemope
Especificação:
Reunião clínica: Polimorfismos genéticos relacionados à trombofilia em complicações vasculares na Doença Falciforme
- 03/2009 - 04/2009** Treinamento, Fundação Hemope
Especificação:
no Laboratório de Hemoglobinopatias. Carga Horária 60h , Alunos de Residência Médica em Hematologia

Projetos

Projetos de pesquisa

- 2013 - Atual** Investigação de Moduladores Genéticos da Úlcera de Membros Inferiores e Osteonecrose em Pacientes Portadores de Anemia Falciforme

Descrição: A anemia falciforme é a doença hereditária monogênica mais comum do Brasil, ocorrendo, predominantemente entre afro-descendentes. A causa da doença é uma mutação de ponto (GAG - GTG) no gene da globina beta da hemoglobina (Hb), originando uma Hb anormal, a HbS, ao invés da Hb normal (HbA). Quando desoxigenada, HbS polimeriza, formando estruturas filamentosas (polímeros de HbS desoxigenada) que se depositam nas hemácias, modificando sua forma e tornando-as falciformes. As células rígidas, conhecidas como células em forma de foice, são responsáveis pela oclusão vascular, episódios de dor e lesão de órgãos alvos que representam os fenômenos principais dessa doença, tais como crises álgidas; crises hemolíticas; síndrome torácica aguda; sequestro esplênico; retinopatia; insuficiência renal crônica; autoesplenectomia; priapismo, acidente vascular cerebral, osteonecrose e úlceras de membros inferiores, entre outros. A úlcera de membros inferiores é uma complicação frequente na doença falciforme e ocorre devido a vaso-oclusão, hipóxia tecidual, hemólise e fatores genéticos,

apresentando cicatrização lenta e alta taxa de recorrência. Ocorre entre 8% a 10% dos pacientes homocigotos, atingindo percentual maior que 50% em pacientes que residem em áreas tropicais. A osteonecrose também é uma das complicações mais frequentes na anemia falciforme. Estas lesões decorrem da necrose avascular da medula óssea e as dores refletem provavelmente o aumento da pressão intramedular associada ao processo inflamatório. Na osteonecrose ocorre à degeneração progressiva dos ossos e destruição articular da cartilagem, sendo uma importante causa de morbidade na doença falciforme. Sendo a anemia falciforme uma doença multifatorial, a identificação de variáveis genéticas podem ajudar a definir mecanismos fisiopatológicos críticos não evidentes e ser útil à conduta clínica dos médicos. O objetivo principal deste trabalho é determinar as bases moleculares que possam influenciar no desenvolvimento de úlceras de membros inferiores e osteonecrose em nossa população de pacientes portadores de anemia falciforme acompanhados no Hospital da Fundação HEMOPE. A identificação de polimorfismos genéticos que possam estar associados às úlceras e lesões osteoarticulares na anemia falciforme fornecerá subsídios para um melhor atendimento e acompanhamento médico, e conseqüentemente detectar precocemente lesões que possam causar sequelas graves ou afetar a qualidade de vida desses pacientes

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (4); Mestrado acadêmico (5); Doutorado (2);

Integrantes: Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer; Patricia; Fertrin, Kleber Yotsumoto; Bezerra, Marcos Andre Cavalcanti (Responsável); Fernando Ferreira Costa; Laranjeira, Luana Priscilla Moraes; Medeiros, Fernanda Silva; Falcão, Diego Arruda; Domingos, Igor de Farias; Farias, Isabela Cristina Cordeiro; Aderson da Silva Araujo; Luydson Richardson Silva Vasconcelos; Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti; Antonio Roberto Lucena Araujo; Diego Antonio Pereira Martins; Rayssa Leal Borges Medeiros; Manuela Andrade Costa; Mariana Barros Souto de Souza

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2011 - 2013 Estudo da via Th17 em pacientes portadores de anemia falciforme com úlcera maleolar: descoberta de novos alvos terapêuticos

Descrição: A anemia falciforme é uma condição herdada causada por uma mutação de ponto no gene da globina beta; (HBB), resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina na 6ª posição do gene da cadeia beta; globínica. Essa mutação resulta em uma hemoglobina anormal (HbS) sendo denominada em homocigose (HbSS). No estado de Pernambuco, a anemia falciforme afeta 1/1.400 nascidos vivos no Estado de Pernambuco. O Hospital de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco tem cadastrado atualmente 1.500 pacientes com doença falciforme, destes estima-se que 10% desenvolvem úlcera maleolar. O presente projeto visa investigar se há uma alteração no nível de citocinas que participam da via Th17 em pacientes portadores de anemia falciforme (HbSS) com úlcera maleolar e em pacientes HbSS sem úlcera maleolar comparado aos voluntários sadios

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer; Araújo, Aderson da Silva; Maíra Galdino da Rocha Pitta (Responsável); Ivan da Rocha Pitta; Suely Lins Galdino; Maria do Carmo Alves de Lima; Silva, Rafael Ramos da; Bezerra, Marcos

Andre Cavalcanti

2010 - 2012 Fatores Genéticos Moduladores da Gravidade Clínica da Anemia Falciforme

Descrição: A anemia falciforme (AF) é caracterizada por manifestações clínicas graves como vaso-oclusão, crises dolorosas, úlcera de perna, priapismo e AVC. Complicações neurológicas ocorrem em até 25% dos pacientes com anemia falciforme. Estudos mostram que 28 a 38% dos pacientes com AF apresentam histórico de priapismo. Os fatores que predis põem os pacientes com anemia falciforme a essas complicações não estão bem estabelecidos. Existe, portanto, a necessidade de identificar marcadores que possam distinguir pacientes com essa complicação o mais precoce possível. Estudos demonstram que pacientes falciformes apresentam níveis plasmáticos elevados de TNF- α . O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que favorece a fagocitose, o recrutamento de neutrófilos e a expressão da molécula de adesão VCAM-1. Estudos in vitro mostraram que o TNF- α aumenta a aderência de hemácias falcizadas as células endoteliais dos vasos. Polimorfismos na região promotora do gene do TNF- α ; (-308) (G-->A) e os SNPs (rs)2228088 (T-->G), localizado na região codificadora, e (rs)3093665 (C-->A), localizado na região 3' não transcrita do gene TNF- α ; tem sido associados com a redução de eventos cerebrovasculares em pacientes com doença falciforme. A identificação de variáveis genéticas que são associadas com priapismo, pode portanto ajudar a definir mecanismos fisiopatológicos críticos não evidentes, assim como, identificar pacientes com risco aumentado. A presença de polimorfismos no gene da eNOS que acarreta em diminuição da atividade da enzima e conseqüente redução na biodisponibilidade de NO e portanto é de suma importância investigar uma possível associação entre o polimorfismo da eNOS e o priapismo na AF. SNPs no gene Klotho (KL) foram associados com o risco aumentado de priapismo. O objetivo geral desse trabalho é determinar as bases moleculares que possam influenciar na variabilidade de manifestações clínicas da anemia falciforme, como: o priapismo e o acidente vascular cerebral.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (8); Mestrado acadêmico (2); Doutorado (1);

Integrantes: Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer; Bezerra, Marcos André Cavalcanti (Responsável); Araújo, Aderson da Silva; Fertrin, Kleber Yotsumoto; Laranjeira, Luana Priscilla Moraes; Araújo, Nara Barbosa; Oliveira, Fernando Baltar; Medeiros, Fernanda Silva; Hirata, Ohanna Azevedo; Pereira, Tauane Mathias; Falcão, Diego Arruda; Freitas, Antônio Carlos; Pinto, Marília Siqueira A. R.; Domingos, Igor de Farias; Farias, Isabela Cristina Cordeiro; Laranjeira, Raysa Samanta Moraes

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2010 - 2012 Alterações Cerebrovasculares na Anemia Falciforme: Marcadores Moleculares

Descrição: Complicações neurológicas ocorrem em até 25% dos pacientes com anemia falciforme. Os fatores que predis põem os pacientes com anemia falciforme a essa complicação não estão bem estabelecidos. Existe, portanto, a necessidade de identificar marcadores que possam distinguir pacientes com essa complicação o mais precoce possível. A co-existência de Alfa-talassemia com AF

tem mostrado ter um efeito inibidor na formação do polímero intracelular. Há hipóteses que essa associação protege contra o desenvolvimento do AVC na AF. Uma segunda hipótese é que há uma associação do haplótipo Beta S e a incidência de AVC. Por causa da importância das complicações vasculares na fisiopatologia da doença falciforme, um número de polimorfismos genéticos associados com trombofilia tem sido estudado como potenciais modificadores genéticos da doença falciforme. Estudos demonstram que pacientes falciformes apresentam níveis plasmáticos elevados de TNF- α . O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que favorece a fagocitose, o recrutamento de neutrófilos e a expressão da molécula de adesão VCAM-1. Estudos in vitro mostraram que o TNF- α aumenta a aderência de hemácias falcizadas às células endoteliais dos vasos. Polimorfismos na região promotora do gene do TNF- α ; (-308) (G \rightarrow A) e os SNPs (rs)2228088 (T \rightarrow G), localizado na região codificadora, e (rs)3093665 (C \rightarrow A), localizado na região 3 não transcrita do gene TNF- α ; tem sido associados com a redução de eventos cerebrovasculares em pacientes com doença falciforme. Outro mecanismo importante que pode estar relacionado com o AVC na AF é a biodisponibilidade de óxido nítrico. Portanto, este trabalho tem como objetivo identificar o genótipo Alfa, haplótipos Beta S, mutações trombofílicas, polimorfismo no promotor do gene da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e polimorfismos no gene TNF- α ; e avaliar o impacto clínico destas variantes em pacientes com anemia falciforme que apresentaram quadro de acidente vascular cerebral.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (3); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer; Fertrin, Kleber Yotsumoto; Bezerra, Marcos Andre Cavalcanti (Responsável); Araújo, Nara Barbosa; Freitas, Antônio Carlos; Pinto, Marília Siqueira A. R.; Domingos, Igor de Farias; Farias, Isabela Cristina Cordeiro; Claudia Cristina Montes; Ana Cláudia Anjos; Aderson da Silva Araujo

Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE

Projeto de extensão

2015 - Atual Projeto Análises Clínicas

Descrição: O Laboratório da Unidade de Análises Clínicas caracteriza-se como órgão suplementar de apoio às atividades de ensino, pesquisa e extensão. Constitui-se em laboratório próprio para expansão das atividades de ensino e extensão, além da ministração de aulas práticas do Curso de Graduação em Ciências Farmacêuticas. Este Projeto de Extensão tem por finalidade atender o descrito anteriormente, sob a responsabilidade acadêmica de docentes das Análises Clínicas do Departamento de Ciências Farmacêuticas e a participação de técnicos farmacêuticos e de alunos de graduação em ciências farmacêuticas, estes na condição de estagiários. Os resultados almejados são: 1- Melhoria do ensino para os estudantes de graduação em ciências farmacêuticas, estimulando a sua participação no acompanhamento e co-execução (orientada pelos docentes e técnicos responsáveis) das atividades em análises clínicas, aplicando os conhecimentos teóricos adquiridos em sala de aula. 2- Maior inserção dos docentes da área das análises clínicas nas atividades de orientação acadêmica aos estudantes e de extensão, com transferência de conhecimento e assistência às comunidades interna e externa.

Situação: Em andamento Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer; Eliane Lafayette Araújo (Responsável); Samuel Daniel de Sousa Filho; Altair Vanderlei Lopes; Josineide Brandão de Paiva; Simone da Paz Leôncio Alves

Áreas de atuação

1. HEMATOLOGIA
2. Biologia Molecular
3. Hemoglobinopatias
4. HEMOSTASIA

Idiomas

Inglês	Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Bem , Lê Bem
Espanhol	Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Razoavelmente

Prêmios e títulos

- 2010** Título de Mestre em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco
- 2009** 2º lugar como DESTAQUE DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU, III Encontro de pós-graduação e pesquisa da Universidade de Pernambuco-UPE

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. LEITE, LUIZ ARTHUR CALHEIROS; FERREIRA, RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS; **Hatzlhofer, Betânia Lucena Domingues**; CORREIA, MARIA CONCEIÇÃO BARROS; BANDEIRA, ÂNGELA PONTES; OWEN, JAMES STUART; LIMA, VERA LÚCIA DE MENEZES; DOMINGUES, ANA LÚCIA COUTINHO; LOPES, EDMUNDO PESSOA

Portal vein thrombosis associated with protein C deficiency and elevated Factor VIII in hepatosplenic schistosomiasis. Blood Coagulation & Fibrinolysis. , v.27, p.210 - 212, 2016.

2. ARAUJO, NARA B.; DOMINGOS, IGOR F.; MEDEIROS, FERNANDA S.; **HATZLHOFER, BETÂNIA L.**; MENDONÇA, TACIANA F.; VASCONCELOS, LUYDSON R.; CAVALCANTI, MARIA DO SOCORRO M.; ARAUJO, ADERSON S.; OLIVEIRA, MARIA DO CARMO V.; LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO R.; BEZERRA, MARCOS A.

Lack of association between the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC)

expression and clinical outcome of children with sickle cell anemia. *Immunology Letters*. , v.166, p.140 - 142, 2015.

3. DOMINGOS, I. F.; **HATZLHOFER, B. L.**; OLIVEIRA, F. B.; ARAUJO, F. R.; ARAUJO, A. S.; LUCENA-ARAÚJO, A. R.; BEZERRA, M. A.

Prevalence and molecular defect characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazilian blood donors. *International Journal of Laboratory Hematology (Print)*. , v.-, p.n/a - n/a, 2015.

4. Fertrin, Kleber Yotsumoto; LANARO, CAROLINA; FRANCO-PENTEADO, CARLA FERNANDA; DE ALBUQUERQUE, DULCINÉIA MARTINS; DE MELLO, MARIANA REZENDE BANDEIRA; PALLIS, FLÁVIA RUBIA; Bezerra, Marcos André Cavalcanti; **HATZLHOFER, BETANIA LUCENA DOMINGUES**; OLBINA, GORDANA; OLALLA SAAD, SARA TEREZINHA; DA SILVA ARAÚJO, ADERSON; WESTERMAN, MARK; Costa, Fernando Ferreira

Erythropoiesis-driven regulation of hepcidin in human red cell disorders is better reflected through concentrations of soluble transferrin receptor rather than growth differentiation factor 15. *American Journal of Hematology (Print)*. , v.89, p.385 - 390, 2014.

5. SOARES, ANA CAROLINE NOVAES; SAMICO, ISABELLA CHAGAS; ARAÚJO, ADERSON SILVA; BEZERRA, MARCOS ANDRÉ C.; **Hatzlhofer, Betânia Lucena Domingues**

Follow-up of children with hemoglobinopathies diagnosed by the Brazilian Neonatal Screening Program in the State of Pernambuco. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Impresso)*. , v.36, p.250 - 255, 2014.

6. DOMINGOS, IGOR F.; FALCÃO, DIEGO A.; **HATZLHOFER, BETANIA L.**; CUNHA, ANDERSON F.; SANTOS, MAGNUN N.; Albuquerque, Dulcinéia M.; FERTRIN, KLEBER Y.; Costa, Fernando F.; AZEVEDO, RENATA C.; MACHADO, CÍNTIA G.; Araújo, Aderson S.; LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO R.; BEZERRA, MARCOS A.

Influence of the α -haplotype and β -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Annals of Hematology (Print)*. , v.93, p.1123 - 1129, 2014.

7. LOPES, MARIANA PEZZUTE; Santos, Magnun Nueldo Nunes; FABER, ELIEL WAGNER; Bezerra, Marcos André Cavalcanti; **Hatzlhofer, Betânia Lucena Domingues**; ALBUQUERQUE, DULCINÉIA MARTINS; Zaccariotto, Tânia Regina; RIBEIRO, DANIELA MARIA; Araújo, Aderson da Silva; Costa, Fernando Ferreira; Sonati, Maria de Fátima

The *CCR5-32* Polymorphism in Brazilian Patients with Sickle Cell Disease. *Disease Markers (Print)*. , v.2014, p.1 - 4, 2014.

8. DE OLIVEIRA FILHO, ROMÉRIO ALENCAR; SILVA, GÉSSYKA JERÔNIMO; DE FARIAS DOMINGOS, IGOR; **Hatzlhofer, Betânia Lucena Domingues**; DA SILVA ARAÚJO, ADERSON; DE LIMA FILHO, JOSÉ LUIZ; Bezerra, Marcos André Cavalcanti; MARTINS, DANYELLY BRUNESKA GONDIM; DE ARAÚJO, ROSÂNGELA FERREIRA FRADE

Association between the genetic polymorphisms of glutathione S-transferase

(GSTM1 and GSTT1) and the clinical manifestations in sickle cell anemia. *Blood Cells, Molecules & Diseases (Print)*. , v.51, p.76 - 79, 2013.

9. DA SILVA, RAFAEL RAMOS; PEREIRA, MICHELLY CRISTINY; MELO RÊGO, MOACYR JESUS BARRETO; **DOMINGUES HATZLHOFER, BETANIA LUCENA**; DA SILVA ARAÚJO, ADERSON; CAVALCANTI BEZERRA, MARCOS ANDRÉ; DA ROCHA PITTA, IVAN; DA ROCHA PITTA, MAIRA GALDINO
Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine*. , v.66, p.143 - 147, 2013.

10. GIL, GISLENE P.; ANANINA, GALINA; OLIVEIRA, MARIANA B.; Costa, Fernando F.; SILVA, MÁRCIO J.; Santos, Magnun N. N.; Bezerra, Marcos A. C.; **Hatzlhofer, Betânia L. D.**; ARAUJO, ADERSON S.; MELO, MÔNICA B.
Polymorphism in the *HMOX1* Gene is Associated with High Levels of Fetal Hemoglobin in Brazilian Patients with Sickle Cell Anemia. *Hemoglobin*. , v.37, p.315 - 324, 2013.

11. **D. HATZLHOFER, BETÂNIA L.**; BEZERRA, MARCOS ANDRÉ C.; SANTOS, MAGNUN N.N.; Albuquerque, Dulcinéia M.; FREITAS, ELIZABETE M.; Costa, Fernando F.; Araújo, Aderson S.; MUNIZ, MARIA TEREZA C.
MTHFR Polymorphic Variant C677T Is Associated to Vascular Complications in Sickle-Cell Disease. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers (Print)*. , v.16, p.1038 - 1043, 2012.

12. Silva, Rafael Ramos da; **Domingues Hatzlhofer, Betânia Lucena**; Machado, Cíntia Gonsalves de Faria; Lima, Aleide Santos de Melo; Albuquerque, Dulcinéia Martins de; Santos, Magnun Nueldo Nunes dos; Fertrin, Kleber Yotsumoto; Costa, Fernando Ferreira; Araújo, Aderson da Silva; Bezerra, Marcos Andre Cavalcanti
Mutation Prevalence in Myeloproliferative Neoplasms in Pernambuco, Brazil. *GENET TEST MOL BIOMA*. , v.XX, p.120203074333006 - , 2012.

Artigos aceitos para publicação

1. MENDONÇA, TACIANA F.; Palmeira, K; SOARES, A.; VILAR, K. A. M.; MEDEIROS, FERNANDA S.; Vasconcelos, Luydson R. Silva Vasconcelos; Anjos, A.C.; **Hatzlhofer, Betânia Lucena Domingues**; Maíra Galdino da Rocha Pitta; Bezerra, M.A.C; ARAUJO, A. S.; MELO RÊGO, MOACYR JESUS BARRETO; Cavalcanti, Maria do Socorro de Mendonça; Moura, P.
Single Nucleotide Polymorphisms at +191 and +292 of Galectin-3 Gene (LGALS3) related to lower GAL-3 serum levels are associated with frequent respiratory tract infection and vaso-occlusive crisis in children with sickle cell anemia. *Plos One*. , 2016.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BATISTA, J. V. G. F.; Martins, Diego Antonio Pereira ; DOMINGOS, I. F.; Falcao, D A; **HATZLHOFER, B. L.**; ARAÚJO, ADERSON S.; ANJOS, A. C.; CALLADO, F. M.

R. A.; LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO R.; BEZERRA, M. A.

Associação de polimorfismos genéticos em Klotho com o desenvolvimento de priapismo em pacientes com anemia falciforme In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2015, 2015, São Paulo.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2015.

2. Medeiros, Rayssa Leal Borges; Domingos, Igor de Farias; MARTINS, D. A. P.; **Hatzlhofer, Betânia L. D.**; NETO, P. L.F.; Belmont, T.F.M.; Cavalcanti M.D.S.M.; ARAÚJO, ADERSON S.; LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO R.; Bezerra, Marcos A. C.

Investigação de polimorfismos nos genes il1rn e il10 na susceptibilidade à ocorrência da doença cerebrovascular em pacientes com anemia falciforme In: HEMO - Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2014, Florianópolis.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. ELSEVIER, 2014. v.36. p.33 - 33

3. Domingos, Igor de Farias; Medeiros, Rayssa Leal Borges; MARTINS, D. A. P.; LARANJEIRAS, R. S. M.; **D. HATZLHOFER, BETÂNIA L.**; Belmont, T.F.M.; CAVALCANTI, M. D. S. M.; ARAÚJO, ADERSON S.; LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO R.; Bezerra, Marcos A. C.

Investigação dos polimorfismos sod2 (val-16ala)(rs4880) e gpx-3 t-518c (rs8177406) na susceptibilidade à ocorrência da doença cerebrovascular em pacientes com anemia falciforme. In: HEMO - Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2014, Florianópolis.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. ELSEVIER, 2014. v.36. p.33 - 33

4. Santos, J. D. R. D.; Ferreira., R. C. D. S.; **Hatzlhofer, Betânia L. D.**; Martins, J. M.; Correia, M.C.B.; Owen., J. S.; Lima., V.L.M; Lopes, E.P.A.; Domingues, A.L.C.; Leite, L.A.C.

Portal vein thrombosis associated with protein c deficiency and elevated factor VIII in hepatosplenic schistosomes – case report In: HEMO - Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2014, Florianópolis.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. ELSEVIER, 2014. v.36. p.92 - 92

5. ROMANELLO, K. S.; LOPES, K. K.; Bezerra, Marcos A. C.; **HATZLHOFER, B. L.**; DOMINGOS, IGOR F.; Araújo, Aderson da Silva; OLIVEIRA, M. A.; NETTO, L. E. S.; Costa, FF; MALAVAZI, I.; CUNHA, A. F.

The Reduction of Peroxiredoxins Activity are Corelated with the Increase of Reactive Oxygen Species (ROS) and Cell Hemolysis Observed in Patients with Hemolytic Anemias. In: 19th Congress of the European Hematology Association, 2014, Milan.

19th Congress of the European Hematology Association. , 2014.

6. VIANA, B. R.; FERREIRA, A. M. M. S.; **Domingues, Betânia L. T. B.**; Correia, M.C.B.; RILHAS, G. P.; VANDERLEI, A. M.; ARAÚJO, F. A.; ARAÚJO, M. A. A. L. Hemofilia A adquirida e HIV - Relato de caso In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2013 - HEMO 2013, 2013, Brasília.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2013. v.35.

7. MARTINS, D. A. P.; SOUZA, M. B. S.; DOMINGOS, I. F.; Pereira, T M; Falcao, D A; **Hatzlhofer, Betânia L. D.**; ARAUJO, A. S.; Bezerra, M.A.C

Influência da Talassemia alfa n desenvolvimento de osteonecrose em pacientes portadores de Anemia Falciforme no Estado de Pernambuco In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2013 - HEMO 2013, 2013, Brasília.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2013.

8. MARTINS, D. A. P.; DOMINGOS, I. F.; Falcao, D A; SILVA, J. L. C.; **Hatzlhofer, Betânia L. D.**; ARAUJO, A. S.; Bezerra, M.A.C

Influência do Polimorfismo da MTHFR C677T no desenvolvimento de osteonecrose em pacientes portadores de Anemia Falciforme no estado de Pernambuco In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2013 - HEMO 2013, 2013, Brasília.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2013.

9. Pereira, T M; MARTINS, D. A. P.; Falcao, D A; DOMINGOS, I. F.; **Hatzlhofer, Betânia L. D.**; Mendonça, T F; Vasconcelos, L R S; CAVALCANTI, M. D. S. M.; MOURA, P. M. M. F.; Bezerra, M.A.C

Influência do polimorfismo rs1225934 do gene BMP6 na fisiopatogenese da osteonecrose em pacientes portadores de Anemia Falciforme em Pernambuco In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2013 - HEMO 2013, 2013, Brasília.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2013.

10. ROMANELLO, K. S.; LOPES, K. K.; Bezerra, Marcos A. C.; DOMINGOS, IGOR F.; **HATZLHOFER, B. L.**; ARAUJO, ADERSON S.; OLIVEIRA, M. A.; NETTO, L. E. S.; Costa, F.F.; MALAVAZI, I.; CUNHA, A. F.

Peroxiredoxinas são Diferencialmente Expressas em Reticulócitos de Pacientes Beta Talassêmicos e com Anemia Falciforme e podem estar Envolvidos na Severidade das Doenças In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2013, 2013, Brasília.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2013.

11. ROMANELLO, K. S.; LOPES, K. K.; NAGAMATSU, S. T.; Bezerra, Marcos A. C.; **HATZLHOFER, B. L.**; Domingos, Igor de Farias; Araújo, Aderson da Silva; OLIVEIRA, M. A.; NETTO, L. E. S.; Costa, F.F.; MALAVAZI, I.; CUNHA, A. F.

Peroxiredoxins Play An Important Role In The Survival Of Erythroid Cells In Beta Thalassemia And Sickle Cell Disease Patients In: 18th Congress of the European Hematology Association, 2013, Stockholm.

18th Congress of the European Hematology Association. , 2013.

12. MEDEIROS, F. S.; Pereira, T M; Hirata, O A; ARAUJO, N. B.; LARANJEIRAS, L. P. M.; DOMINGOS, I. F.; LARANJEIRAS, R. S. M.; **Hatzlhofer, Betânia L. D.**; Bezerra, Marcos A. C.; ARAUJO, A. S.

Acurácia do teste bioquímico de Brewer na triagem de crianças com anemia falciforme atendidas na Fundação HEMOPE In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2012 - HEMO 2012, 2012, Rio de Janeiro.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2012. v.34. p.147 - 147

13. Pereira, T M; Mendonça, T F; Vasconcelos, L R S; **Hatzlhofer, Betânia Lucena**

Domingues; DOMINGOS, I. F.; Falcao, D A; MOURA, P.; Cavalcanti, M. S.; ARAÚJO, ADERSON S.; Bezerra, Marcos A. C.

Associação de polimorfismos no gene BMP6 em pacientes com osteonecrose portadores de anemia falciforme. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2012 - HEMO 2012, 2012, Rio de Janeiro.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, , 2012. v.34. p.144 - 144

14. Lima, A.S.M.; QUINTAS, A. S. P.; CARVALHO JUNIOR, C. H. R.; Falcao, D A; **Hatzlhofer, Betânia L. D.**; Neves, M A B; ARAUJO, A. S.; Machado, C.G.F; LUCENA-ARAUJO, A. R.; Bezerra, M.A.C

Estudo de Alterações genéticas e sua relação com dados clínico-laboratoriais em pacientes adultos com leucemia mielóide aguda da Fundação HEMOPE In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2012 - HEMO 2012, 2012, Rio de Janeiro.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia , 2012. v.34. p.255 - 255

15. Falcao, D A; DOMINGOS, I. F.; LARANJEIRAS, L. P. M.; LARANJEIRAS, R. S. M.; MARTINS, D. A. P.; SILVA, R. R.; **Hatzlhofer, Betânia L. D.**; ARAÚJO, ADERSON S.; Bezerra, M.A.C

Influência da talassemia alfa no desenvolvimento de úlceras de membros inferiores em pacientes portadores de anemia falciforme no Estado de Pernambuco In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2012 - HEMO 2012, 2012, Rio de Janeiro.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia , 2012. v.34. p.142 - 143

16. Falcao, D A; DOMINGOS, I. F.; LARANJEIRAS, L. P. M.; LARANJEIRAS, R. S. M.; MARTINS, D. A. P.; Araujo, N.B.; MEDEIROS, F. S.; **HATZLHOFER, Betânia Lucena Dominhues**; ARAUJO, A. S.; Bezerra, M.A.C

Influência do polimorfismo da região promotora do gene eNOS -786 (T-->C) no desenvolvimento de úlceras de membros inferiores em pacientes portadores de anemia falciforme no Estado de Pernambuco. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2013 - HEMO 2013, 2012, Rio de Janeiro.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia , 2012. v.34. p.143 - 143

17. MEDEIROS, F. S.; Pereira, T M; Hirata, O A; Farias, I C C; ARAUJO, N. B.; CALDAS, A. C. M.; Santos, Magnun N. N.; **Hatzlhofer, Betânia L. D.**; ARAUJO, ADERSON S.; Bezerra, Marcos A. C.

Influência do polimorfismo do gene UGT1A1 nos níveis de bilirrubina em pacientes com anemia falciforme In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2012 - HEMO 2012, 2012, Rio de Janeiro.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia , 2012. v.34. p.145 - 146

18. HIRATA, O. A.; MEDEIROS, F. S.; ARAUJO, N. B.; Lima, A.S.M.; ANJOS, A. C.; ARAUJO, F. A. R.; **Hatzlhofer, Betânia L. D.**; BEZERRA, MARCOS ANDRÉ C.; ARAÚJO, ADERSON S.

Polimorfismo G-463-A no gene da mieloperoxidase e sua associação com os quadros infecciosos em pacientes com anemia falciforme. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2012 - HEMO 2012, 2012, Rio de Janeiro.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia , 2012. v.34. p.145 - 145

Apresentação de trabalho e palestra

1. **D. HATZLHOFER, BETÂNIA L. Diagnóstico Laboratorial das Hemoglobinopatias, 2014.** (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
2. **Hatzlhofer, Betânia L. D. Importância da Fase pré-analítica sobre a qualidade dos exames de hemostasia, 2013.** (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **Hatzlhofer, Betânia Lucena Domingues I Curso de Avaliação Clínica e Laboratorial da Hemostasia, 2015.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Educação e Popularização de C&T

Curso de curta duração ministrado

1. **Hatzlhofer, Betânia Lucena Domingues I Curso de Avaliação Clínica e Laboratorial da Hemostasia, 2015.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Demais produções técnicas

1. **Hatzlhofer, Betânia Lucena Domingues I Curso de Avaliação Clínica e Laboratorial da Hemostasia, 2015.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. **Isabela Cristina Cordeiro Farias (co-orientador). Associação de polimorfismos do gene MBL2 com úlcera de membros inferiores em pacientes com Anemia Falciforme. 2016.** Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco
2. **Sarah Luanne Silva. Perfil Clínico e Laboratorial da Hemofilia A em Pernambuco. 2015.** Curso (Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco
3. **Luana Priscilla Moraes Laranjeiras (co-orientador). Associação de polimorfismo no gene TNF-ALFA com as manifestações clínicas da Anemia Falciforme. 2012.** Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco
4. **Tauane Mathias Pereira (co-orientador). Associação de Polimorfismos no Gene**

BMP6 em Pacientes com Osteonecrose Portadores de Anemia Falciforme. 2012. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

Orientação de outra natureza

1. Marina Schweizer Leite Lima. **Monitoria em Hematologia Clínica.** 2016. Orientação de outra natureza (Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco
2. Liúbica Malheiros. **Monitoria em Hematologia Clínica.** 2016. Orientação de outra natureza (Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco
3. Thaís Araújo de Santana. **Monitoria em Hematologia Clínica.** 2015. Orientação de outra natureza (Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco
4. Manoel Nascimento da Silva Neto. **Monitoria em Hematologia Clínica.** 2015. Orientação de outra natureza (Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco

Orientações e supervisões em andamento

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Elaine Rafael Germano. **Alterações Hematológicas em crianças com Leucemia Linfóide Aguda durante a administração do Metotrexato.** 2016. Curso (Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Conferencista no(a) **I Encontro de Hemofilia da Hemorrede da Paraíba,** 2013. (Encontro)
Importância da Fase pré-analítica sobre a qualidade dos exames de hemostasia.
2. **SIMH-Simpósio Internacional Multidisciplinar em Hemofilia,** 2013. (Simpósio)
3. **II Simpósio de Avaliação do Controle de Qualidade Externa Internacional - IEQAS,** 2012. (Simpósio) Controle de Qualidade Externo UK NEQAS Hemope.

Organização de evento

1. **Domingues, Betânia L. T. B.**
II Curso de Hematologia Laboratorial, 2013. (Outro, Organização de evento)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. Hatzlhofer, Betânia Lucena Domingues

Participação em banca de Marlon Fagundes Ribeiro. **Associação do polimorfismo no gene NOS3 T-786C no desenvolvimento de Síndrome torácica aguda em pacientes com Anemia Falciforme**, 2016

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

2. Hatzlhofer, Betânia Lucena Domingues

Participação em banca de Wendy Anushika Alves Cavalcanti. **Uso de Hidroxiureia na Anemia Falciforme**, 2016

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

3. HATZLHOFER, B. L.

Participação em banca de Alessandra Maria Monteiro e Silva. **Perfil Imuno-Hematológico de Puérperas e seus recém-nascidos e incidência da Doença Hemolítica do Recém-nascido no Hospital das Clínicas de Pernambuco**, 2015

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

4. Domingues, Betânia L. T. B.

Participação em banca de Diego Antonio Pereira Martins. **Investigação da Alfa Talassemia e dos Haplótipos BS no desenvolvimento de Úlcera de membros inferiores em pacientes com Anemia Falciforme**, 2013

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

5. Bezerra, M.A.C; MEDEIROS, C. S. Q.; Domingues, Betânia L. T. B.

Participação em banca de Juan Luiz Coelho da Silva. **Investigação do polimorfismos eNOS (T-786C) no desenvolvimento de úlcera de membros inferiores em pacinetes com Anemia Falciforme**, 2013

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

6. Domingues, Betânia L. T. B.

Participação em banca de Fernanda da Silva Medeiros. **Análise molecular da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e síndrome de Gilbert em crianças com Anemia Falciforme provenientes da Triagem Neonatal para Hemoglobinopatias de Pernambuco**, 2012

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

7. LUCENA-ARAUJO, A. R.; ARAUJO, A. S.; Domingues, Betânia L. T. B.

Participação em banca de Katarina Holanda Lúcio de Mello. **Associação de Polimorfismos nos genes MPO e MBL2 com a ocorrência de eventos infecciosos em pacientes com leucemia linfocítica crônica**, 2012

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

8. Domingues, Betânia L. T. B.

Participação em banca de Fabio Rodrigo Barbosa Dutra Nascimento. **Avaliação da Expressão do CD200 na Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) e outras doenças Linfoproliferativas B (DLPC)**, 2012

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

9. Domingues, Betânia L. T. B.

Participação em banca de Diego Arruda Falcão. **Avaliação de Antígenos Aberrantes na Leucemia Linfóide Aguda do adulto, em especial o CD25, correlacionando com a presença do BCR-ABL**, 2012

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

10. Domingues, Betânia L. T. B.

Participação em banca de Thiago Bruno Ferraz dos Santos. **Avaliação do perfil clínico-laboratorial e evolução de pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) da Fundação Hemope**, 2012

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

11. Machado, Cíntia Gonsalves de Faria; Bezerra, M.A.C; Domingues, Betânia L. T. B.; LUCENA-ARAUJO, A. R.

Participação em banca de Raphael Ferreira Pimentel. **Detecção da Mutação JAK2 V617F em Síndromes Mielodisplásicas**, 2012

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

12. Domingues, Betânia L. T. B.

Participação em banca de Mariana Feitosa de Melo. **Importância da Ferritina Sérica no Curso Clínico das Síndromes Mielodisplásicas**, 2012

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

13. Domingues, Betânia L. T. B.

Participação em banca de Adônis Soares Peres Quintas. **investigação de Mutantes no gene FLT3 na Leucemia Mielóide Aguda**, 2012

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

14. FERREIRA, G. A.; Domingues, Betânia L. T. B.; Lima, A.S.M.

Participação em banca de Maria Lima Sitônio. **Pesquisa de Hemoglobinas Variantes S e C em estudantes da Universidade Federal de Pernambuco**, 2012

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

Totais de produção
Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	14
Artigos aceitos para publicação.....	1
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	65
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra).....	4
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	3
Apresentações de trabalhos (Simpósio).....	5

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (extensão).....	2
Curso de curta duração ministrado (outro).....	4

Orientações

Orientação concluída (trabalho de conclusão de curso de graduação).....	11
Orientação concluída (iniciação científica).....	2
Orientação concluída (orientação de outra natureza).....	4
Orientação em andamento (trabalho de conclusão de curso de graduação).....	1
Orientação em andamento (iniciação científica).....	1

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	5
Participações em eventos (simpósio).....	5
Participações em eventos (encontro).....	1
Participações em eventos (outra).....	5
Organização de evento (outro).....	2
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação).....	23

Outras informações relevantes

1 Palestra ministrada no curso de graduação em Biomedicina da Faculdade Maurício de Nassau em 21/05/2011 com tema: Hemostasia Laboratoria.