



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**VARIANTES GENÉTICAS, HAPLÓTIPOS β S E NÍVEIS DE HbF EM
PACIENTES COM β -HEMOGLOBINOPATIAS DO ESTADO DO PARÁ.**

ADRIANE MARIA BEZERRA DA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO FARIAS GUERREIRO

BELÉM/PA
AGOSTO/2022

ADRIANE MARIA BEZERRA DA SILVA

**VARIANTES GENÉTICAS, HAPLÓTIPOS β S E NÍVEIS DE HBF EM
PACIENTES COM β -HEMOGLOBINOPATIAS DO ESTADO DO PARÁ.**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA como requisito para obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. João Guerreiro

BELÉM/PA
AGOSTO/2022

DEDICATÓRIA

À minha família e àqueles que de alguma maneira, possam ser beneficiados com este estudo.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos,

A Deus pelo dom da vida, por me dar forças para enfrentar as dificuldades durante esta jornada, e Nossa Senhora por sua intercessão a qual depositei minhas esperanças.

A minha amada família por ser meu porto seguro: minha mãe, Olga Maria, que é meu apoio, minha inspiração, minha conselheira e por fazer de mim o que sou hoje; meu pai, Cesar Roberto, que está sempre presente na minha vida e é meu exemplo de perseverança, o qual me apoia para realização dos meus sonhos. A minha irmã Andresa Maria, parceira de todas as horas, que me mostra que com a persistência e dedicação podemos alcançar nossos sonhos. Obrigada família pelas orações de cada dia, amo vocês.

Ao meu orientador, Dr. João Farias Guerreiro, pela confiança e apoio.

Às professoras Dra. Greice Cardoso e Dra. Fernanda Figueiredo, pelo apoio e conselhos acadêmicos.

Aos colegas/amigos da pesquisa que encontrei no LGHM. A Jacileia e ao Danilo, que compartilharam seus conhecimentos sobre citogenética. À Patricia Jeanne, Mauro Junior e Ewerton que deixaram a vivência acadêmica mais leve. À Aylla e ao Mauro que me ajudaram na fase final deste trabalho, meu muito obrigada.

Ao Ministério Universidades Renovadas, em especial o Grupo de Oração Universitário Maranató, por ser muitas vezes meu apoio no meio acadêmico, permitindo sonhar com uma universidade em que o amor de Deus se faça presente: “A fé e a razão (*fides et ratio*) constituem como que as duas asas pelas quais o espírito humano se eleva para a contemplação da verdade. (São João Paulo II)”.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos do Laboratório de Genética Humana e Médica: professores e alunos que fizeram parte desta jornada.

“Sonhar e crer que Deus fará tudo, mesmo que a gente não saiba como acontecerá”
(Sonhar é Crer – Ministério Universidades Renovadas – MUR)

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 HEMOGLOBINA	1
1.1.1 Estrutura e gênese da Hemoglobina	1
1.1.2 Famílias gênicas das globinas α e β.....	2
1.2 HEMOGLOBINOPATIAS	4
1.2.1 β-Hemoglobinopatias	5
1.2.1.1 Distribuição geográfica das β -hemoglobinopatias	5
1.2.1.2 β -Talassemia	7
1.2.1.2.1 Genética e Fisiopatologia	7
1.2.1.2.2 Manifestações clínicas	9
1.2.1.3 Anemia Falciforme	10
1.2.1.3.1 Genética e Fisiopatologia	10
1.2.1.3.2 Manifestações clínicas	11
1.2.1.3.3 Haplótipos do gene da β s-globina.	12
1.2.2.4 Diagnóstico da β -Talassemia e Anemia Falciforme	13
1.3 MODULADORES GENÉTICOS DAS β -HEMOGLOBINOPATIAS.....	15
1.3.1 HbF	16
1.3.1.1 Gene <i>KLF1</i>	18
1.3.1.2 Gene <i>KLF10</i>	20
1.3.1.3 Gene <i>FLT1</i>	21
1.3.1.4 Gene <i>AQP9</i>	23
1.3.1.5 Gene <i>PDE7B</i>	24
1.4 PESQUISA DE VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS A β - HEMOGLOBINOPATIAS.	25
1.4.1 Bancos de anotação de variantes genéticas.....	26
1.4.1.1 Clinvar.....	26

1.4.1.2 Banco de Dados de Agregação de Genoma (gnomAD)	26
1.4.1.3 AbraOM	28
1.4.1.4 SELAdb database.....	29
1.4.2 Preditores de Patogenicidade.....	29
1.4.3 Validação experimental	31
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3 METODOLOGIA	34
3.1 TIPO DE ESTUDO	34
3.2 TIPO DE AMOSTRAGEM.....	34
3.3 POPULAÇÃO ESTUDADA	34
3.4. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	36
3.5. EXTRAÇÃO DE DNA.....	36
3.6 VARIANTES GENÉTICAS SELECIONADAS	37
3.7 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS	37
3.8 CÁLCULO DO ESCORE DE GRAVIDADE.....	38
3.9 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS ASSOCIADOS AO GENE DA HEMOGLOBINA S.....	38
3.10 PESQUISA EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS	38
3.10.1 GnomAd database	38
3.10.2 AbraOM.....	39
3.10.3 SELAdb database	39
3.10.4 ClinVar	39
3.11 ANÁLISE EM PROGRAMAS DE PREDIÇÃO DE PATOGENICIDADE....	39
3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.	40
4 RESULTADOS.....	42
4.1 β - TALASSEMIA	42
4.1.1 Frequências alélicas e genotípicas das variantes nos genes <i>AQP9</i>, <i>FLT1</i>, <i>PDE7B</i>, <i>KLF1</i> e <i>KLF10</i> nos pacientes com β-talassemia.....	43

4.1.2	Comparação da média dos níveis de HbF entre os genótipos de cada SNP em pacientes beta talassêmicos.....	44
4.1.3	Associação dos níveis de HbF com as variantes investigadas no loci <i>AQP9</i>, <i>FLT1</i>, <i>PDE7B</i>, <i>KLF1</i> e <i>KLF10</i> nos pacientes com β-talassemia.....	45
4.1.4	Associação das variantes nos genes <i>AQP9</i>, <i>FLT1</i>, <i>PDE7B</i>, <i>KLF1</i> e <i>KLF10</i> com a clínica dos pacientes com β-talassemia.....	46
4.2	ANEMIA FALCIFORME	47
4.2.1	Associação da concentração de hemoglobina fetal com os dados laboratoriais e clínicos nos indivíduos com anemia falciforme.....	49
4.2.2	Frequências alélicas e genótípicas das variantes investigadas no loci <i>AQP9</i>, <i>FLT1</i>, <i>PDE7TB</i>, <i>KLF1</i> e <i>KLF10</i> nos pacientes com anemia falciforme, e suas associações com os parâmetros laboratoriais.....	51
4.2.3	Análise da distribuição das variantes genéticas (rs1867380, rs3751395, rs9376173, rs2072597 e rs3191333) e suas associações com a concentração de hemoglobina fetal e manifestações clínicas.....	52
4.3	HAPLÓTIPOS DO GENE DA βs-GLOBINA.....	57
4.3.1	Análise dos haplótipos ligados ao gene da globina beta e sua associação com a concentração de hemoglobina fetal, e manifestações clínicas nos indivíduos com anemia falciforme.....	57
4.4	PESQUISA DAS VARIANTES GENÉTICAS EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS.....	61
4.5	ANÁLISE IN SILICO.....	63
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÃO	75
7	REFERÊNCIAS.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU SÍMBOLOS

AF	Anemia falciforme
AbraOM	Arquivo online de mutações brasileiras
$\beta 0$	Beta zero talassemia
$\beta +$	Beta mais talassemia
BAN	Haplótipo Bantu
BEN	Haplótipo Benin
CAM	Haplótipo Camarões
DF	Doença falciforme
gnomAD	Banco de dados de agregação do genoma
Hb	Hemoglobina
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Ht	Hematócrito
SELAdb	Banco de dados de sequenciamento de larga escala
SEN	Haplótipo Senegal
SNP	Single Nucleotide Polimorphisms
QTL	Quantitative trait loci
VCM	Volume Corpuscular Médio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura das hemoglobinas embrionárias, fetal e adultas.

Figura 2 - Switch na expressão gênica da β -globina.

Figura 3 - Diagrama das famílias gênicas de α e β -globina e produção de moléculas de hemoglobina.

Figura 4 - Representação estrutural do gene HBB.

Figura 5 - Mutações comuns da β -talassemia em diferentes regiões do mundo

Figura 6 - Mapa dos números estimados de recém-nascidos com anemia falciforme por 100.000 nascimentos por país em 2015.

Figura 7 - Representação esquemática do processo fisiopatológico da beta talassemia

Figura 8 - Padrões de distribuição dos haplótipos na África e no Brasil

Figura 9 - Regulação da γ -globina pelo gene *KLF1*

Figura 10 - Representação da interação proteica entre *KLF10*, *KLF1*, *SIN3A* e *HDAC1* predita pelo banco de dados STRING

Figura 11 - Esquema de genes onde SNPs foram relatados como significativamente implicados em diferentes fenótipos de DF e em qual população ele foi descrito.

FIGURA 12 - Acesso do banco de dados gnomAD.

LISTA DE QUADROS E TABELAS.

Quadro 1 - Parâmetros diagnóstico das Talassemias.

Quadro 2 - Variantes genéticas relatadas como significativamente associadas a β hemoglobinopatias.

Quadro 3 - Índices laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) dos pacientes diagnosticados com anemia falciforme.

Quadro 4. Índices laboratoriais dos pacientes beta talassêmicos.

Quadro 5 - Frequência das mutações β -talassêmicas identificadas nos pacientes β -talassêmicos.

Tabela 1. Frequência, na população de Belém, das variantes genéticas investigadas.

Tabela 2. Frequência genotípicas e alélicas dos SNP's nos genes *AQP9*, *FLT1*, *PDE7B*, *KLF1* e *KLF10* associados com a variação nos níveis de HbF em pacientes beta talassêmicos do estado do Pará.

Tabela 3. Comparação dos níveis de HbF entre a combinação genotípica.

Tabela 4. Associação dos níveis de HbF com as variantes investigadas no presente estudo (regressão linear múltipla).

Tabela 5. Associação entre os genótipos das variantes rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*) e a clínica do pacientes com β -talassemia.

Tabela 6. Manifestações clínicas nos pacientes com anemia falciforme.

Tabela 7. Associação entre concentração média de HbF e os dados laboratoriais em indivíduos com anemia falciforme.

Tabela 8. Associação entre a concentração média de HbF e os dados clínicos em pacientes com anemia falciforme

Tabela 9. Frequências genotípicas e alélicas dos SNP's nos genes *AQP9*, *FLT1*, *PD7TB*, *KLF1* e *KLF10*.

Tabela 10. Associação das variantes genéticas com os parâmetros laboratoriais.

Tabela 11. Associação entre as variantes e a concentração média de HbF em pacientes com anemia falciforme.

Tabela 12. Associação da variante *AQP9* rs1867380 com as manifestações clínicas da anemia falciforme.

Tabela 13. Associação da variante rs3751395 (*FLT1*) com as manifestações clínicas da anemia falciforme.

Tabela 14. Associação da variante rs9376173 (*PDE7B*) com as manifestações clínicas da anemia falciforme.

Tabela 15. Associação da variante rs2072597 (*KLF1*) com as manifestações clínicas da anemia falciforme.

Tabela 16. Associação da variante rs3191333 (*KLF10*) com as manifestações clínicas da anemia falciforme.

Tabela 17. Associação dos genótipos da variante rs3751395 no gene *FLT1* com as manifestações clínicas algias e crise vaso oclusivas.

Tabela 18. Frequência da combinação haplotípica nos pacientes com anemia falciforme.

Tabela 19. Associação da concentração de HbF com a combinação haplotípica

Tabela 20. Análises multivariadas com modelos específicos, associando a concentração de HbF e a combinação haplotípica com variáveis dependentes (manifestações clínicas).

Tabela 21. Frequência alélica das variantes rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*) e rs2072597 (*KLF1*) no banco de dados gnomAD.

Tabela 22. Frequência alélica das variantes rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (rs9376173), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*) em banco de dados nacionais.

Tabela 23. Comparação das frequências alélicas das variantes investigadas no presente estudo e os bancos de dados públicos (gnomAD, AbraOM e SELAdb).

Tabela 24. Variantes com significado clínico no CLINVAR e sua comparação com o padrão de patogenicidade após análise *in silico* de cinco preditores (FATHMM, SIFT, PROVEAN, POLYPHEN-2 e PANTHER).

RESUMO

O estudo de variantes genéticas associadas aos níveis de hemoglobina fetal (HbF) em pacientes com β -hemoglobinopatias tem sido foco de estudos em genética molecular, visto que a HbF apresenta um efeito global sobre os fenótipos da anemia falciforme (AF) e da β -talassemia, distúrbios monogênicos mais comuns. Dentre essas variantes estão rs3751395 (*FLT1*), rs2072597 (*KLF1*), rs1867380 (*AQP9*), rs9376173 (*PDE7B*) e rs3191333 (*KLF10*) e haplótipos β s que estão associados aos níveis de HbF. Além disso, pesquisa em banco de dados públicos e análise de preditores de patogenicidade auxiliam na interpretação dessas variantes genéticas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência das variantes rs3751395 (*FLT1*), rs2072597 (*KLF1*), rs1867380 (*AQP9*), rs9376173 (*PDE7B*) e rs3191333 (*KLF10*) e dos haplótipos β s nos níveis de HbF e nas manifestações clínicas dos indivíduos diagnosticados com β -hemoglobinopatias no estado do Pará, além de investigar a frequência alélica dessas variantes na presente população e investigar suas respectivas classificações de patogenicidade. A população estudada foi composta por 160 indivíduos com AF e 30 indivíduos com β -talassemia. Foi realizada a genotipagem para a população investigada, determinado os haplótipos β s nos indivíduos com anemia falciforme, investigado as frequências alélicas em banco de dados internacionais e nacionais e o padrão de patogenicidade das variantes não sinônimas por meio de cinco ferramentas de previsão diferentes (FATHMM, SIFT, PROVEAN, POLYPHEN-2 e PANTHER). Em β -talassêmicos foi observado diferença significativa dos níveis de HbF para as variantes rs3751395 (*FLT1*) e rs9376173 (*PDE7B*), nos quais a presença do alelo selvagem possui uma associação positiva para os níveis de HbF em beta talassêmicos. Em indivíduos com anemia falciforme, observou-se associação do genótipo heterozigoto da variante rs3751395 (*FLT1*) com as manifestações clínicas: crise vaso oclusivas e algias, demonstrando que esse genótipo possivelmente é um fator de risco para essas manifestações. Em relação aos haplótipos β s, o genótipo Bantu/Bantu apresentou relação com a diminuição dos níveis de HbF e os genótipos Bantu/Senegal e Bantu/Camarões relação com o aumento dos níveis de HbF, além disso, observou-se associação entre o Bantu/Benin com as manifestações clínicas: síndrome do tórax agudo e edemas. A pesquisa em bancos de dados públicos internacionais (gnomAD e Clinvar) permitiu observar que a população brasileira está sub representada, principalmente quando se compara a região norte do Brasil que possui maior contribuição de ameríndios quando comparado as demais regiões do país. As frequências alélicas observadas para cada variante investigada no presente estudo apresentou alguns resultados divergentes quando comparados aos bancos de dados nacionais (AbraOM e SELAdb), podendo ser justificado pelo fato da população brasileira ser altamente miscigenada. Do total das variantes missenses investigadas pelos preditores de patogenicidade, todas foram classificadas como benignas. Assim, esses achados enfatizam que tanto a anemia falciforme quanto a β -talassemia apresentam uma rede complexa que envolvem variantes associadas com níveis de HbF e manifestações clínicas, além dos haplótipos β s em indivíduos com anemia falciforme que em conjunto com fatores não-genéticos (questões sociais, culturais, econômicas e ambientais) podem influenciar na evolução clínica da doença, e que bancos de dados públicos e preditores de patogenicidade podem auxiliar na orientação da interpretação das variantes genéticas investigadas.

Palavras-chave: β -Hemoglobinopatias; variantes genéticas; haplótipos β s; HbF

ABSTRACT

The study of genetic variants associated with fetal hemoglobin (HbF) levels in patients with β -hemoglobinopathies has been the focus of studies in molecular genetics, since HbF has a global effect on the phenotypes of sickle cell anemia (SCA) and β -thalassemia, most common monogenic disorders. Among these variants are rs3751395 (*FLT1*), rs2072597 (*KLF1*), rs1867380 (*AQP9*), rs9376173 (*PDE7B*) and rs3191333 (*KLF10*) and β s haplotypes that are associated with HbF levels. In addition, research in public databases and analysis of pathogenicity predictors help in the interpretation of these genetic variants. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of the variants rs3751395 (*FLT1*), rs2072597 (*KLF1*), rs1867380 (*AQP9*), rs9376173 (*PDE7B*) and rs3191333 (*KLF10*) and of β s haplotypes in HbF levels and clinical manifestations of individuals diagnosed with β -hemoglobinopathies in the state of Pará, in addition to investigating the allelic frequency of these variants in this population and investigating their respective pathogenicity classifications. The population studied consisted of 160 individuals with SCA and 30 individuals with β -thalassemia. Genotyping was performed for the investigated population, β s haplotypes were determined in individuals with sickle cell anemia, allele frequencies were investigated in international and national databases, and the pattern of pathogenicity of non-synonymous variants was investigated using five different prediction tools (FATHMM, SIFT, PROVEAN, POLYPHEN- 2 and PANTHER). In β -thalassemics, a significant difference in HbF levels was observed for the rs3751395 (*FLT1*) and rs9376173 (*PDE7B*) variants, in which the presence of the wild-type allele has a positive association for HbF levels in beta-thalassemic individuals. In individuals with sickle cell anemia, there was an association of the heterozygous genotype of the rs3751395 variant (*FLT1*) with the clinical manifestations: vaso-occlusive crisis and pain, demonstrating that this genotype is possibly a risk factor for these manifestations. Regarding the β s haplotypes, the Bantu/Bantu genotype was related to the decrease in HbF levels and the Bantu/Senegal and Bantu/Cameroon genotypes were related to the increase in HbF levels, in addition, there was an association between Bantu/Benin and the clinical manifestations: acute chest syndrome and edema. Research in international public databases (gnomAD and Clinvar) allowed us to observe that the Brazilian population is underrepresented, especially when comparing the northern region of Brazil, which has a greater contribution of Amerindians when compared to other regions of the country. The allele frequencies observed for each variant investigated in the present study showed some divergent results when compared to the national databases (AbraOM and SELAdb), which may be justified by the fact that the Brazilian population is highly mixed. Of the total of missense variants investigated by pathogenicity predictors, all were classified as benign. Thus, these findings emphasize that both sickle cell anemia and β -thalassemia present a complex network involving variants associated with HbF levels and clinical manifestations, in addition to β s haplotypes in individuals with sickle cell anemia, which together with non-genetic factors (social, cultural, economic and environmental issues) can influence the clinical course of the disease, and that public databases and pathogenicity predictors can help guide the interpretation of the investigated genetic variants.

Keywords: β -Hemoglobinopathies; genetic variants; β s haplotypes; HbF

1 INTRODUÇÃO

1.1 HEMOGLOBINA

1.1.1 Estrutura e gênese da Hemoglobina

A hemoglobina (Hb), proteína globular presente no interior dos eritrócitos, tem como principal função o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos do corpo humano. É um tetrâmero, constituído por quatro cadeias polipeptídicas: um par de cadeias do tipo α e outro de cadeias do tipo não α . Cada cadeia contém um grupo heme que contém ferro e pode se ligar a uma molécula de oxigênio (VINJAMUR *et al.*, 2018).

O par de cadeias do tipo α podem ser alfa (α) ou zeta (ζ), e as cadeias do tipo não α , podem ser beta (β), delta (δ), gama (γ) e épsilon (ϵ), sendo suas diferentes combinações determinantes para os seis tipos de Hb humanas produzidas nas diferentes fases do desenvolvimento humano, desde o período embrionário até a fase adulta, a saber: Gower1, Gower2, Portland, fetal (HbF), HbA e HbA2 (Figura 1) (IVALDI *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2016; TAHER *et al.*, 2018; VINJAMUR *et al.*, 2018).

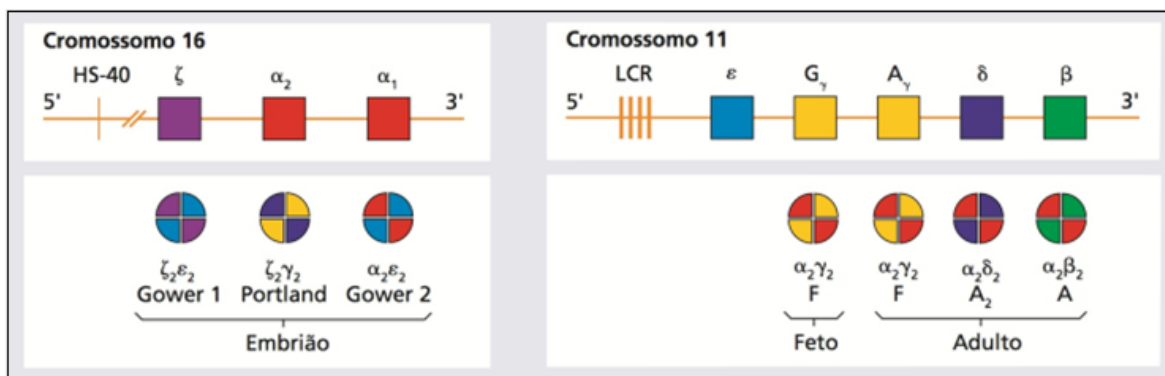


Figura 1- Estrutura das hemoglobinas embrionárias, fetal e adultas. Aglomerados (clusters) do gene de globina nos cromossomos 16 e 11. Na vida embrionária, fetal e adulta, diferentes genes são ativados ou suprimidos. As distintas cadeias de globina são sintetizadas independentemente e, então, combinam-se entre si para produzir as diferentes hemoglobinas (Fonte: HOFFBRAND E MOSS, 2018).

A expressão dos genes da β -globina passam por duas trocas (*switch*) essenciais. A primeira durante o período gestacional (ϵ para γ), e a segunda no período pós-natal (γ para β), a qual o mecanismo de troca inclui a supressão do gene da globina fetal (γ -globina, HbF) e ativação da transcrição do gene da

globina adulta (β -globina, HbA) (PAPADOPOULOS *et al.*, 2020) (Figura 2). Os principais tipos de Hb encontradas em adultos são a HbA ($\alpha_2\beta_2$) e HbA2 ($\alpha_2\delta_2$), que representam 95-98% e 2-3% do total de moléculas de hemoglobina, respectivamente (CUI e ENGEL, 2017). A HbF também pode ser sintetizada em adultos compreendendo níveis entre 0,8% e 2% do total de moléculas de hemoglobina (CUI e ENGEL, 2017) podendo sua persistência ser variável e controlado geneticamente (STAMATOYANNOPOULOS, 2005).

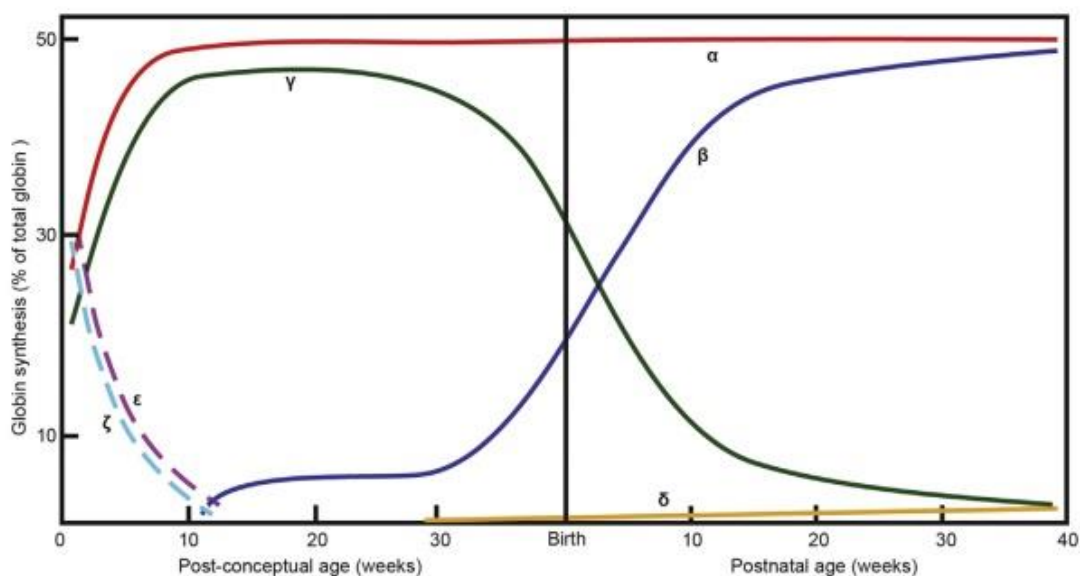


Figura 2- Switch na expressão gênica da β -globina (Fonte: METTANANDA E HIGGS, 2018).

1.1.2 Famílias gênicas das globinas α e β .

As cadeias globínicas, que são codificadas por genes estruturais pertencentes a clusters ou famílias gênicas, incluem genes funcionais e pseudogenes localizados em cromossomos diferentes (WAYE e CHUI, 2001). A síntese de hemoglobina, a nível molecular, é controlada por duas famílias gênicas que codificam as α -globinas localizada no cromossomo 16 e as β -globinas no cromossomo 11 (Figura 3).

O cluster da globina α contém os genes ζ , $\alpha 1$ e $\alpha 2$ que codificam proteínas funcionais e são organizados na ordem de 5'- $\zeta 2$ - $\alpha 2$ - $\alpha 1$ -3' em cada cromossomo 16 (WAYE e CHUI, 2001) dispostos na ordem de sua ativação durante o desenvolvimento, além de três pseudogenes ($\psi\zeta 1$, $\psi\alpha 1$ e $\psi\rho$) e dois genes expressos com função desconhecida (μ e $\theta 1$) (VOON e VADOLAS, 2008). A

região controladora que se localiza a 40 Kb do gene ζ é denominada HS-40 e contém sítios hipersensíveis a Dnase I e sítios de ligação de fatores de transcrição (DEVILLE *et al.*, 2004).

O complexo da globina beta inclui cinco genes funcionais denominados epsilon, gama alanina, gama glicina, delta e beta (ϵ , γ A, γ G, δ e β), dispostos na sua ordem de ativação e um pseudogene ($\psi\beta$) (FU *et al.*, 2002; ORIGA, 2017). A região reguladora da globina beta é denominada Região Controladora do Locus (LCR), consistindo de cinco sítios hipersensíveis a Dnase I, a qual é responsável pelo controle da expressão balanceada dos genes da globina beta e exerce atividades de estimulação e inibição gênica (STAMATOYANNOPOULOS, 2005).

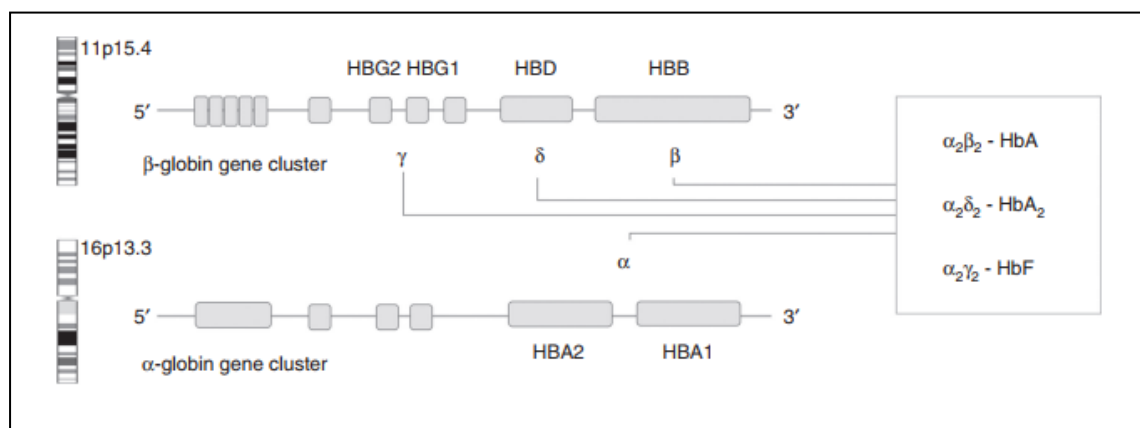


Figura 3 - Diagrama das famílias gênicas de α e β -globina e produção de moléculas de hemoglobina. Os genes que codificam para as moléculas β - (*HBB*), δ - (*HBD*) e γ -globina (*HBG1* e *HBG2*) estão localizados no cromossomo 11 (cluster da β -globina), enquanto os genes α -globina (*HBA1* e *HBA2*) estão localizados em cromossomo 16 (cluster da α -globina) (ALIYEVA *et al.*, 2018).

Alterações gênicas nos clusters das globinas, provenientes das mutações e/ou deleções nos genes α - ou β -globina podem causar manifestações clínicas conhecidas como hemoglobinopatias (KOHNE, 2011). Seu diagnóstico precoce torna-se fundamental na garantia do tratamento adequado, acompanhamento oportuno e contínuo (ROSENFELD *et al.*, 2019), e permite que os indivíduos diagnosticados com hemoglobinopatias participem de pesquisas científicas relacionadas a identificação de variantes genéticas que possam estar associadas à essas doenças.

1.2 HEMOGLOBINOPATIAS

As hemoglobinopatias são uma das doenças de saúde pública mais assoladoras no mundo e classificadas como as doenças monogênicas mais comuns que afetam aproximadamente 2-7% da população mundial (KARAMPERIS *et al.*, 2021). O termo “hemoglobinopatia”, que inclui todos os distúrbios genéticos da hemoglobina, se divide em dois grupos principais: síndromes talassêmicas e variantes estruturais de hemoglobina, ambos causados por mutações e/ou deleções nos genes da globina (KOHNE, 2011).

As talassemias ou síndromes talassêmicas, hemoglobinopatias hereditárias que acarretam alterações quantitativas na síntese das cadeias polipeptídicas, incluem eritropoese ineficaz, anemia hemolítica crônica, hipocromia e microcitose (DA SILVA *et al.*, 2016; TAHER *et al.*, 2018). São caracterizadas pela síntese alterada nas diferentes cadeias de globina que formam as hemoglobinas (DEGANDT *et al.*, 2018), sendo encontrada com maior frequência as talassemias alfa (α) e talassemias beta (β) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

As variantes estruturais de hemoglobina são caracterizadas por alteração da estrutura de uma das frações da hemoglobina (DEGANDT *et al.*, 2018). A maioria é resultante principalmente das substituições nas cadeias α - e β -globinas, sendo comuns e clinicamente significativos as HbS, HbC e HbE (PIEL, 2016), as quais causam o mau funcionamento da hemoglobina (SHAFIQUE *et al.*, 2021). Deve-se ressaltar que existem também muitas formas que combinam características de ambos os grupos (KOHNE, 2011), com uma variedade de condições heterozigóticas compostas de hemoglobina falciforme com outras mutações β -globinas (VINJAMUR *et al.*, 2018).

Dentre as hemoglobinopatias, a β -talassemia e a doença falciforme (DF), ambas causadas por mutações que afetam o gene *HBB* da β -globina, localizado no braço curto do cromossomo 11, (THEIN, 2017) e conhecidas como β -hemoglobinopatias, representam os distúrbios monogênicos mais comuns com uma carga global cada vez maior de doenças (VINJAMUR *et al.*, 2018).

1.2.1 β -Hemoglobinopatias

As β -Hemoglobinopatias resultam de mutações no gene *HBB*, o qual abrange 1600 pares de bases distribuídos em três éxons separados por dois íntrons, e codifica 146 aminoácidos (THEIN, 2005) como observado na Figura 4, sendo denominado β -hemoglobinopatia devido ser específico da β -globina.

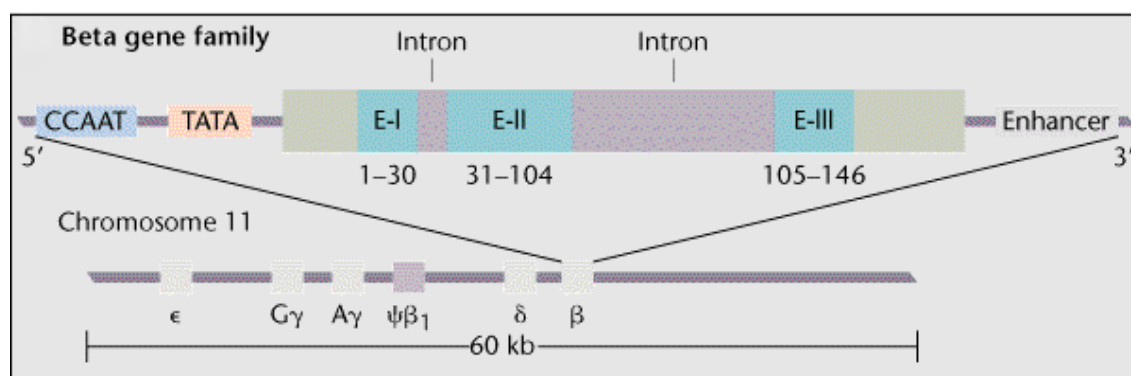


Figura 4 - Representação estrutural do gene HBB, mostrando seus dois íntrons e seus três éxons E-I, E-II e E-III (http://www.mun.ca/biology/scarr/Fg17_19.gif).

Essas hemoglobinopatias encontram-se disseminadas pelo mundo, com aproximadamente, 270 milhões de portadores de hemoglobinas anormais e talassemias (DE SANCTIS *et al.*, 2017). São as doenças hematológicas hereditárias mais comuns e difundidas pelo mundo, devido a β -talassemia e a doença falciforme, as β -hemoglobinopatias mais comuns, serem caracterizadas por uma extrema heterogeneidade genética e clínica (LETTRE, 2012; STRATOPOULOS *et al.*, 2019).

1.2.1.1 Distribuição geográfica

Dentre as talassemias, cerca de 80 a 90 milhões de indivíduos são portadores de β -talassemia (ORIGA, 2017) dentre os quais aproximadamente, 1,5% são heterozigotos (DE SANCTIS *et al.* 2017). A migração das populações e o casamento entre diferentes grupos étnicos permitiu a introdução dos alelos β -talassêmicos em diversas regiões do mundo, com mutações específicas (mais comuns) em cada região, como observado na Figura 5.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, ocorre anualmente o nascimento de 20 a 40 mil crianças com β -talassemia homozigótica. Atualmente, a prevalência de portadores de β -talassemia no Brasil é baixa, com 1,3% da

população brasileira caucasóide portadora, conforme observado no banco de dados IthaGenes, o qual coleta dados sobre hemoglobinopatias provenientes de literatura revisada por pares utilizando PubMed (KOUNTOURIS *et al.*, 2014). Do total de portadores beta talassêmicos, 90% são classificados com talassemia menor, segundo a Associação Brasileira de Talassemia (MARTINO, 2020). Os dados mais recentes coletados no Brasil, os quais comparam as regiões do Brasil, se referem ao período de 2013 a 2015, e mostram que os maiores números de pessoas com talassemia beta grave (maior e intermediária) foram evidenciados nas regiões Sudeste (60%), seguidos pelas regiões Nordeste (17%), Sul (10,4%), Centro-Oeste (7,3%) e Norte (5,3%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

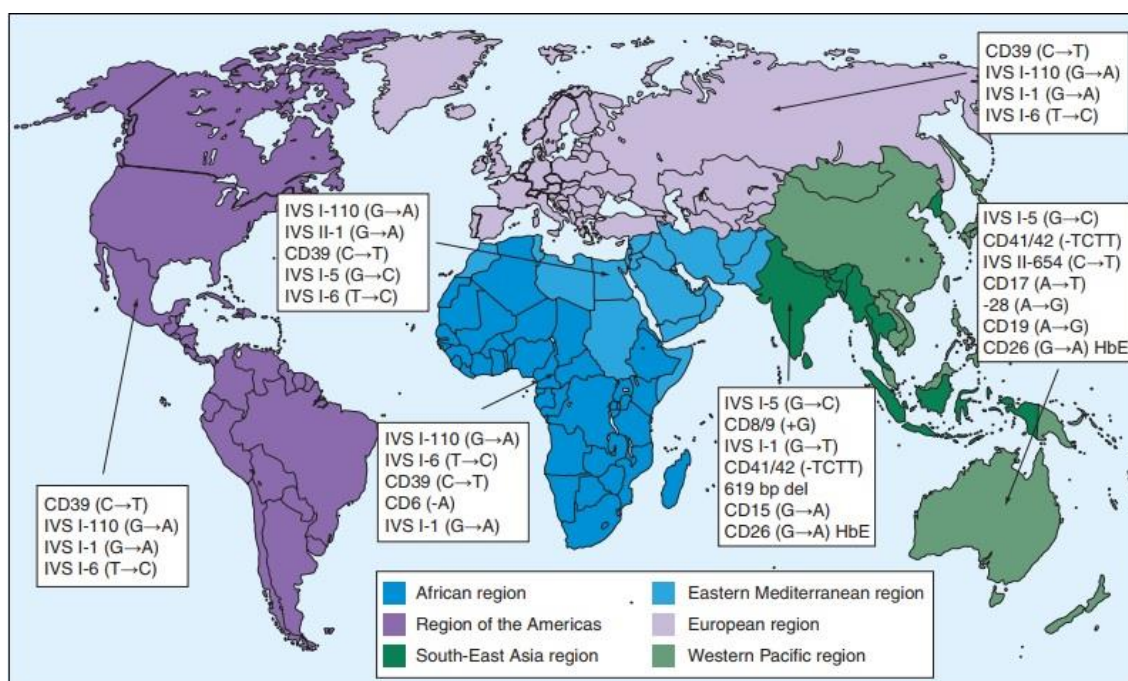


Figura 5 - Mutações comuns da β -talassemia em diferentes regiões do mundo (Fonte:COLAH,GORAKSHAKAR e NADKARNI, 2010).

A doença falciforme, globalmente, possui uma incidência estimada entre 300.000-400.000 recém-nascidos a cada ano, com maior prevalência na África Subsaariana (Figura 6). Em 2010, na África o número estimado de nascimentos com Anemia Falciforme (AF) foi de ~230.000, o que correspondeu a ~75% dos nascimentos com AF em todo o mundo (KATO *et al.*, 2018). A incidência de DF varia por estado, raça e etnia.

Segundo o banco de dados IthaGenes, a prevalência de portadores de doença falciforme no Brasil é de 4% na população (KOUNTOURIS *et al.*, 2014).

Estima-se que 30.000 indivíduos estão diagnosticados com DF em todo o país (KATO *et al.*, 2018). Entre os estados brasileiros, a incidência de DF em recém-nascidos varia substancialmente, devido o resultado da heterogeneidade étnica de sua população. Em 2014, a incidência de DF foi de 1 em 650 recém-nascidos no estado da Bahia, 1 em 1.300 no estado do Rio de Janeiro, 1 em 1.800 no estado do Espírito Santo e 1 em 13.500 nos estados do Paraná e Santa Catarina (Ministério da Saúde, 2014). Na região norte, onde a população de pardos é mais comum, a frequência do traço falciforme tende a ser maior, uma vez que há maior prevalência de traço falciforme na população negra e parda (ROSENFELD *et al.*, 2019).

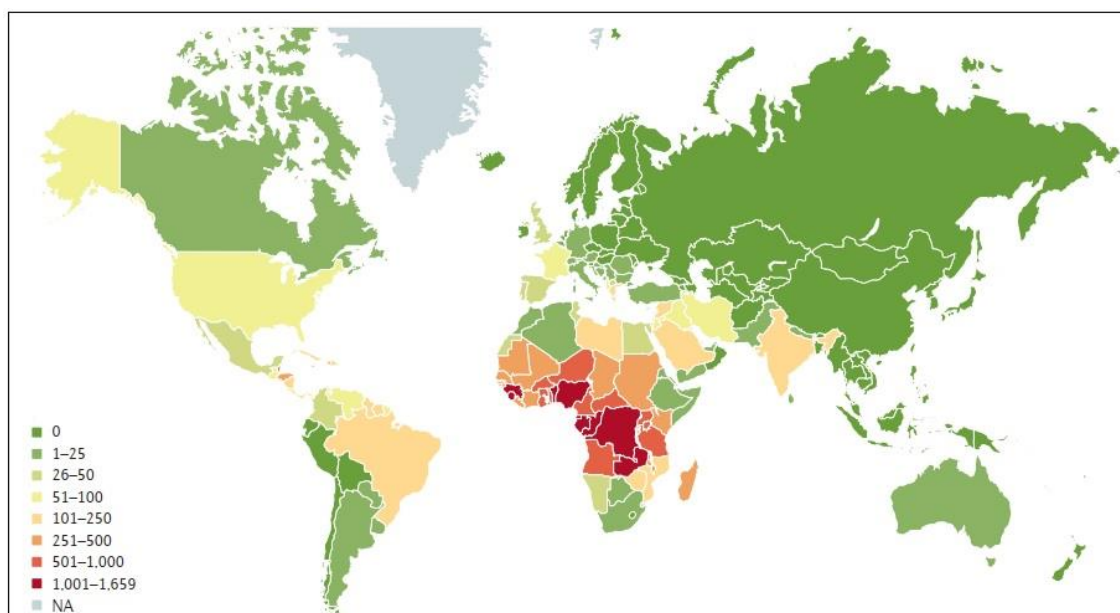


Figura 6 - Mapa dos números estimados de recém-nascidos com anemia falciforme por 100.000 nascimentos por país em 2015. NA, não aplicável (Fonte: KATO *et al.*,2018).

1.2.1.2 β -Talassemia

1.2.1.2.1 Genética e Fisiopatologia

A β -talassemia, deficiência na síntese de globinas do tipo β (localizadas no cromossomo 11 (11p 15.15), causada pela síntese reduzida (β^+) ou ausente (β^0) das cadeias de β -globina da hemoglobina (ORIGA, 2017), decorrem em sua maioria por mutações pontuais que afetam a qualidade ou a quantidade do RNAm produzido por pequenas deleções ou inserções no gene da globina β (THEIN,

2013) e, raramente, por grandes deleções (THEIN, 2013; GOLDMAN e SCHAFER, 2018).

Para nomenclatura das β -talassemia o β^+ representa a produção diminuída da proteína, enquanto a representação β^0 indica a ausência total na expressão do gene beta (DA SILVA *et al.*, 2016). Nos casos de β^+ -talassemia, a quantidade de síntese residual varia de menos 5% a quase 90% em relação ao normal (ZAGO *et al.*, 2013), e ainda pode ocorrer uma diminuição bastante discreta na produção do gene, o que é conhecido como portador silencioso (DA SILVA *et al.*, 2016). Deve-se ressaltar que o determinante primário da gravidade da β -talassemia é o tipo de alelo β encontrado (β^0 , β^+ , β^{++}), que pode ser amenizado pela co-herança de interação com a α -talassemia e capacidade inata de aumentar a produção de cadeias γ (JAING *et al.*, 2021).

Os indivíduos com β -talassemia podem ser heterozigotos (tem somente um gene β -talassêmico, como β/β^+ ou β/β^0) ou homozigotos (tem dois genes β -talassêmicos, como β^0/β^0 ou β^+/β^+), podendo os homozigotos serem heterozigotos compostos, pois possuem dois genes β -talassêmicos com defeitos moleculares diferentes (ZAGO *et al.*, 2013). Dessa forma a gravidade da β -talassemia se refere ao número de cópias do gene afetado pela mutação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A fisiopatologia da β -talassemia está diretamente relacionada com o desequilíbrio entre as sínteses de α - e β -globina, causada pela produção insuficiente da molécula de β -globina. Esse desequilíbrio resulta num excesso de cadeias de α -globina não pareadas, o que ocasiona na precipitação destas cadeias dentro dos precursores eritróides, prejudicando sua maturação e podendo levar a morte celular e conseqüentemente a uma anemia (SANKARAN e ORKIN, 2013), mostrando assim, que a β -talassemia resulta de uma combinação de eritropoiese ineficaz, anemia hemolítica e sobrecarga de ferro (Figura 7).

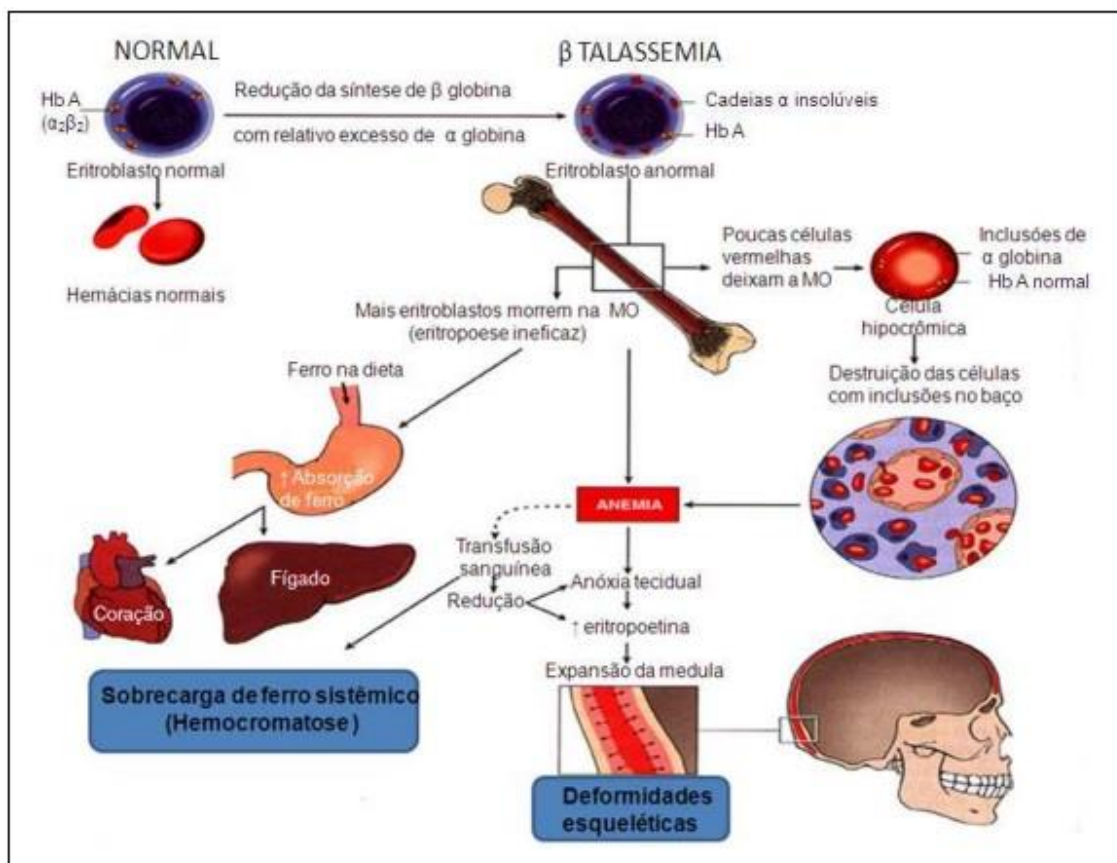


Figura 7 - Representação esquemática do processo fisiopatológico da beta talassemia (Fonte: Martins, 2010)

1.2.1.2.2 Manifestações clínicas

A classificação da β -talassemia possui as seguintes denominações de acordo com a gravidade: β -talassemia menor /traço talassêmico beta, β -talassemia intermediária e β -talassemia maior (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; ORIGA, 2017). As manifestações clínicas da β -talassemia são variadas, abrangendo do estado assintomático (β -talassemia menor) ao estado dependente de transfusão sanguínea (β -talassemia maior) (THEIN, 2005). As complicações clínicas como a esplenomegalia, problemas esqueléticos, endócrino, cardíaco e hepático estão relacionadas com o estado anêmico e sobrecarga de ferro decorrente da absorção aumentada de ferro e transfusões sanguíneas (NIENHUIS e NATHAN, 2012).

Indivíduos com β -talassemia menor são principalmente heterozigotos, com mutação presente em uma das cadeias da β -globina (β^+ ou β^0) (ORIGA, 2017). São clinicamente assintomáticos na maioria dos casos, podendo apresentar uma

leve anemia microcítica e hipocrômica, e denominados como portadores silenciosos (CHOUDHRY, 2017). Indivíduos com β -talassemia intermediária, apresentam uma severidade intermediária, com uma variedade fenotípica que se estende de uma leve anemia a uma anemia severa (BORGNA-PIGNATTI, MARSELLA e ZANFORLIN *et al.*, 2010), e são em sua maioria homozigotos ou heterozigotos compostos (ORIGA, 2017). Por outro lado, na β -talassemia maior, também chamada de anemia de Cooley, as manifestações clínicas começam a aparecer nos indivíduos entre 6 e 24 meses, sendo caracterizada com uma anemia grave, hemólise e eritropoiese ineficaz (SAYANI, 2015). Os indivíduos diagnosticados com β -talassemia maior, são homozigotos ou heterozigotos compostos para os genes β^0 ou β^+ , sendo na maioria dos casos homozigotos para β^0 (β^0/β^0) (ORIGA, 2017). Este amplo espectro de variações das manifestações clínicas presentes nas talassemias, os diferentes alelos afetados e a associação desses com outras hemoglobinopatias tornam a talassemia uma doença complexa e de difícil diferenciação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

1.2.1.3 Anemia Falciforme

1.2.1.3.1 Genética e Fisiopatologia

A doença falciforme, termo que define um grupo de doenças hereditárias, como anemia falciforme (AF), HbSC e HbS β -talassemia, é caracterizada por mutações no gene que codifica a subunidade β da hemoglobina (*HBB*) e pela presença do alelo β^s da Hb falciforme (HbS), ou seja, ocorre quando ambos os alelos *HBB* estão mutados e pelo menos um deles é o alelo β^s . O genótipo mais comum da DF é a anemia falciforme, o qual apresenta dois alelos β^s (β^s/β^s) (KATO *et al.*, 2018).

A anemia falciforme é causada por uma substituição de uma única base (A->T) no sétimo códon da cadeia de β -globina resultando na presença de valina no lugar do ácido glutâmico (Glu7Val) (VINJAMUR *et al.*, 2018), ocasionando o surgimento da chamada hemoglobina falciforme (HbS, $\alpha_2\beta^s_2$). Esta hemoglobina polimeriza no estado desoxi-hemoglobina induzindo os eritrócitos a assumir a forma de foice - marca registrada da doença (EATON & BUNN, 2017).

A falcização dos eritrócitos afeta a homeostasia celular, pois causa desidratação celular, lesão de membrana e até depuração prematura de eritrócitos (VINJAMUR *et al.*, 2018), acarretando anemia hemolítica crônica, episódios imprevisíveis de dor e danos generalizados aos órgãos, dentre outros sintomas clínicos da anemia falciforme (KATO *et al.*, 2018). Caso não diagnosticada e tratada desde o início, pode levar a uma cascata fisiológica em que é observado interações anormais de leucócitos, plaquetas e células endoteliais, inflamação, suscetibilidade infecciosa, vaso-oclusão, crises de dor recorrentes, lesão de órgãos, que resultarão em mortalidade precoce (VINJAMUR *et al.*, 2018).

1.2.1.3.2 Manifestações clínicas

A anemia falciforme é uma condição que apresenta manifestações variáveis (ROBERTS-HAREWOOD, 2009), como as crises vaso-oclusivas, a síndrome torácica aguda, infecções, acidente vascular cerebral, algias e edemas que variam consideravelmente em frequência e gravidade entre os indivíduos (DRISS *et al.*, 2009; BALLAS *et al.*, 2012). As crises vaso-oclusivas (CVO) são umas das principais características clínicas da anemia falciforme, provocando dor isquêmica, de intensidade variável, geralmente intensa, com recorrência imprevisível que pode durar por toda a vida (BALLAS *et al.*, 2012). Essa manifestação clínica resulta da oclusão microvascular que impede o fluxo sanguíneo e conseqüentemente leva a isquemia, edema, dor, necrose e danos nos órgãos dos indivíduos diagnosticados com anemia falciforme (INUSA *et al.*, 2019).

A síndrome torácica aguda (STA), segunda causa de hospitalizações dos pacientes com AF, se caracteriza por um infiltrado pulmonar com dor torácica aguda e intensa febre, tosse e dispnéia (GALARNEAU *et al.*, 2013). Está associada a infecções pulmonares, e tem causas multifatoriais como infecção, embolia pulmonar gordurosa decorrente do infarto da medula óssea e sequestro pulmonar, sendo precedida na maioria dos casos por CVO (BALLAS *et al.*, 2012; NOVELLI e GLADWIN, 2016).

As infecções estão associadas a redução da função esplênica decorrente dos processos de vaso-oclusão que obstruem os cordões esplênicos do baço, reduzindo sua capacidade imunológica e tornando os pacientes suscetíveis a infecções (CANNAS *et al.*, 2019). O acidente vascular cerebral (AVC), síndrome neurológica aguda, resulta em isquemia focal acompanhada de sinais neurológicos e atinge aproximadamente 10% dos pacientes com AF. Sua incidência em crianças com AF é cerca de 300 vezes maior do que na população pediátrica em geral (KATO *et al.*, 2018).

As algias podem ser ocasionadas pela vaso-oclusão e dificuldade de circulação do sangue causada pela obstrução de pequenos vasos (FIGUEIREDO, 2007). Na infância é frequente a dactilite, conhecida como “síndrome mão-pé”, decorrente da isquemia da medula óssea das mãos e/ou pés, resultando em edemas e dor nas áreas afetadas; e na fase adulta as algias podem ocorrer por toda a extensão do corpo (INUSA *et al.*, 2019). Essas diferentes manifestações clínicas mostram que a anemia falciforme apresenta uma grande variabilidade clínica, a qual pode estar associada a interferentes genéticos distintos.

1.2.1.3.3 Haplótipos do gene da β s-globina.

Paralelamente à mutação pontual que dá origem a HbS, existem os haplótipos do gene da β -globina que também são possíveis indicadores da variação fenotípica da anemia falciforme (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013), uma vez que estão relacionados ao nível de HbF (ZAGO e SILVA PINTO 2007). A pesquisa dos haplótipos β s pode ser realizada na discriminação entre os eventos epistáticos ligados ao alelo β s que modulam a expressão fenotípica da AF e no monitoramento do fluxo do alelo β s nas diferentes populações humanas (LAPOUMEROUILLIE *et al.*, 1992).

Cinco principais haplótipos foram observados e denominados de acordo com sua origem étnica e geográfica onde são mais frequentes (Figura 8): Benin (BEN) associado à África Ocidental; Bantu ou República Centro Africana (CAR) à África Oriental e Centro-Sul; Senegal à África Atlântico-Occidental; Árabe-Indiano à

Índia e Península Arábica e o Camarões à Costa Ocidental Africana (LINDENAU *et al.*, 2016).

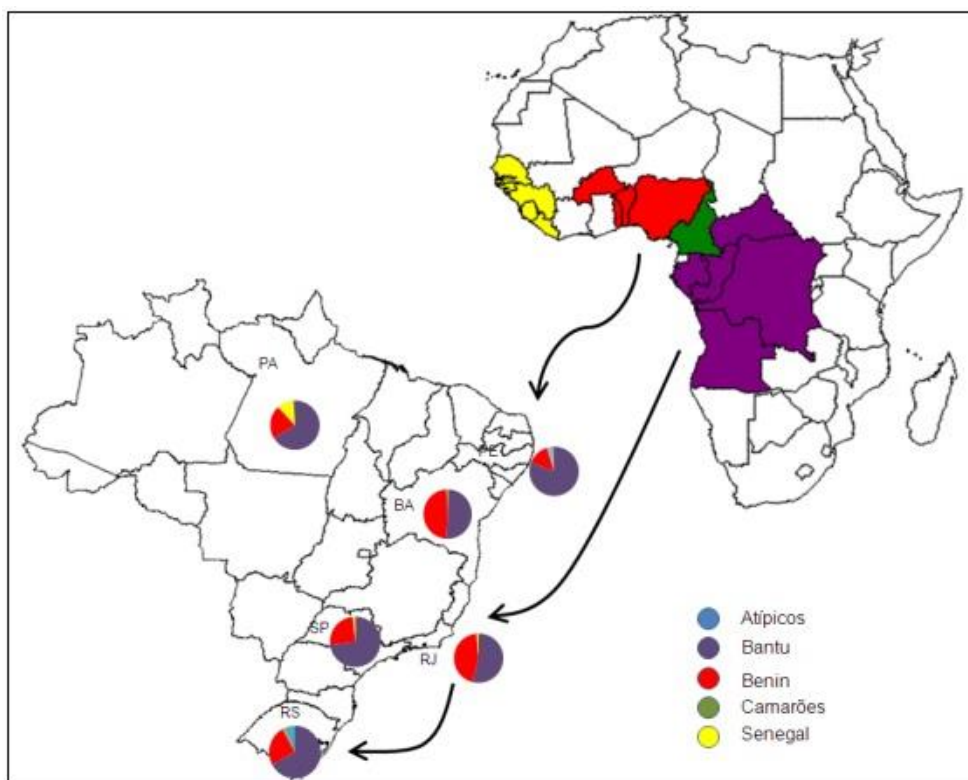


Figura 8 - Padrões de distribuição dos haplótipos na África e no Brasil (Fonte: LINDENAU, 2009)

A característica fenotípica dos pacientes com AF é também influenciada pelo padrão de haplótipos encontrados. Ao correlacionar a clínica dos pacientes com AF e os haplótipos β s foi observado que os pacientes com o haplótipo Senegal apresentam curso clínico mais brando quando comparado com os demais. Por outro lado, o haplótipo tipo Bantu, apresenta curso clínico grave, iniciando crises vaso-oclusivas mais precocemente, e os haplótipos Benin e Camarões, apresentam uma clínica intermediária (POWARS e HITI, 1993; STEINBERG, 2009).

1.2.1.4 Diagnóstico da β -Talassemia e Anemia Falciforme

A separação da hemoglobina em suas diferentes frações fisiológicas com medição de HbA2 e HbF para diagnóstico de talassemia e detecção de frações de hemoglobinas anormais para o diagnóstico de variantes de hemoglobina servem

como triagem analítica para hemoglobinopatias (DEGANDT *et al.*, 2018). No Brasil, indivíduos que não fizeram exame de triagem neonatal podem realizar a eletroforese de hemoglobina em suas diferentes metodologias, como triagem diagnóstica para doença falciforme e outras hemoglobinopatias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O diagnóstico para β -talassemia é estabelecido com os achados hematológicos de anemia microcítica hipocrômica, hemácias nucleadas no esfregaço sanguíneo, níveis diminuídos de HbA, níveis aumentados de HbF e confirmado com a análise molecular de *HBB* (ORIGA, 2017). Na β -talassemia, o padrão de Hb varia de acordo com cada classificação talassêmica. Níveis de HbA2 encontra-se aumentada em β -talassemia menor e variável em β -talassemia homozigótica e heterozigótica composta. Em homozigotos β^0 observa-se ausência completa de produção de cadeia β -globina e o nível de HbF constitui 92-95% da Hb total. Em homozigotos β^+ e β^+/β^0 compostos os níveis de HbF se encontram entre 70-90% e HbA entre 10-30% variando de acordo com a redução da síntese de β -globina apresentada (ORIGA, 2017).

Atualmente, os métodos que se baseiam nos padrões de hemoglobina são utilizados para triagem (Quadro 1) e são seguidos pelo teste molecular para confirmação diagnóstica da β -talassemia (ALIYEVA *et al.*, 2018). É observado que as percentagens de HbA2 e HbF são as principais características diagnósticas da talassemia (SATTA *et al.*, 2017).

Conforme observado no Quadro 1, os portadores de β -talassemia apresentam nível de HbA2 elevada, e os níveis de HbF estão geralmente dentro da faixa de normalidade. Porém, os níveis de HbF podem ser elevados devido a co-herança com outras variações do gene da globina, haplótipos específicos do cluster gênico de β -globina ou variantes de genes não globínicos que afetam a transcrição do gene da γ -globina (TRAEGER-SYNODINOS *et al.*, 2015).

Quadro 1. Parâmetros diagnóstico das Talassemias.

Talassemias	Índices hematemétricos	Padrões de hemoglobina
Portadores de β -talassemia	\downarrow VCM \downarrow HCM, \uparrow RBC	\uparrow HbA2
β -talassemia maior/intermediária	\downarrow Hb	\uparrow HbF
α^+ -Talassemia	Normal	Normal
α^0 -Talassemia	\downarrow VCM, \downarrow HCM	Normal ou \downarrow HbA2
$\delta\beta$ -Talassemia	\downarrow VCM, \downarrow HCM	Normal ou \downarrow HbA2 \uparrow HbF

Fonte: adaptado de Aliyeva *et al.*, 2018.

Para o diagnóstico da DF, existem quatro períodos de testagem: pré-concepção, pré-natal, neonatal e pós-neonatal (KATO *et al.*, 2018). No geral, para anemia falciforme o diagnóstico é estabelecido conforme resultado hematológico do esfregaço sanguíneo, resultado do hemograma, contagem de reticulócitos, teste de solubilidade de Hb e análise do perfil de Hb por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ou eletroforese de zona capilar (review in RISOLUTI *et al.*, 2020). Os resultados geralmente apresentam anemia hemolítica, com resultados de eritrócitos e hemoglobina baixos, contagem de reticulócitos variáveis dependendo da hemólise das células, esfregaço apresentando células falciformes, teste de solubilidade de Hb positivo, HPLC com HbF elevada e presença de HbS na eletroforese de hemoglobina (ARISHI, ALHADRAMI e ZOUROB, 2021).

Deve-se ressaltar que os métodos de triagem para o diagnóstico de hemoglobina normalmente não apontam mutações, o que causa problemas na precisão diagnóstica, obstáculo este que o diagnóstico molecular por sequenciamento de nova geração pode ser capaz de superar (KARAMPERIS *et al.*, 2021). Além do mais, a heterogeneidade fenotípica das β -hemoglobinopatias necessita das abordagens genômicas para identificar modificadores genéticos que poderão ser explorados terapêuticamente (NGO e STEINBERG, 2015).

1.3 MODULADORES GENÉTICOS DAS β -HEMOGLOBINOPATIAS

Durante mais de um século, as β -hemoglobinopatias têm sido o foco de estudos em genética molecular, porém as estratégias de tratamento permanecem

sendo elucidadas (VINJAMUR *et al.*, 2018), pois apesar da aparente simplicidade genética, como no caso da anemia falciforme e β -talassemia, exibem um espectro notável de gravidade fenotípica (THEIN, 2017).

Fatores que afetam o mecanismo central subjacente à fisiopatologia da anemia falciforme e da β -talassemia tem um efeito global sobre o fenótipo da doença (THEIN, 2013). Dois principais modificadores genéticos são compartilhados por essas β -hemoglobinopatias: genótipo da α -globina e capacidade de produzir hemoglobina fetal (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) (THEIN, 2017). Na opinião de especialistas a HbF é considerada o modelador mais forte da anemia falciforme (NGO e STEINBERG, 2015; STEINBERG *et al.*, 2019), e seus níveis elevados melhoram as complicações clínicas das β -hemoglobinopatias (KARAMPERIS *et al.*, 2021).

Na β -talassemia, a indução da síntese HbF pode reduzir a gravidade, melhorando o desequilíbrio entre α -globina e cadeias não- α -globina, ou seja, compensa a produção defeituosa da β -globina (ORIGA, 2017). E na anemia falciforme, exerce um efeito protetor anti-falciforme, onde a γ -globina reduz a falcização nos eritrócitos reduzindo a concentração geral de hemoglobina falciforme (EATON e BUNN, 2017).

1.3.1 HbF

A HbF é formada quando as cadeias de γ -globina se combinam com a α -globina. Ela torna-se a hemoglobina predominante durante o período gestacional (TAHER *et al.*, 2018). Após o nascimento, ocorre a troca de globinas para expressão de hemoglobina do adulto (SANKARAN e ORKIN, 2013), com níveis normais de HbF, após a idade de 2 anos, geralmente entre 0,8% e 2% (CUI e ENGEL, 2017). Deve-se ressaltar que essa mudança da HbF ($\alpha_2\gamma_2$) para a Hb adulta ($\alpha_2\beta_2$) depende da repressão ou silenciamento do gene γ -globina (WANG e THEIN, 2018), e sua concentração não é pancelular, concentrando-se nas denominadas células F (DEMIRCI, LEONARD e TISDALE, 2020)

O estudo da concentração de HbF e sua regulação em adultos já leva décadas de estudo (THEIN, 2013). A troca de globinas, que é uma transição

normal do desenvolvimento da produção de hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$; HbF) para a adulta ($\alpha_2\beta_2$; HbA) é uma área de interesse no contexto das abordagens terapêuticas relacionadas à β -hemoglobinopatias (KARAMPERIS *et al.*, 2021), devido a sua importância clínica (BORG *et al.*, 2012). A manifestação das complicações da β -talassemia e anemia falciforme ocorre após a mudança da expressão do gene γ -globina para β -globina após o nascimento (FARD *et al.*, 2013). Foi observado que apenas quando os níveis de HbF diminuem, os distúrbios da β -hemoglobina se manifestam clinicamente (WATSON, 1948) e que mesmo uma modesta elevação dos níveis de HbF em adultos pode melhorar a gravidade clínica das β -hemoglobinopatias (VINJAMUR *et al.*, 2018).

A expressão elevada de hemoglobina fetal nas β -talassemias e anemia falciforme melhora o diagnóstico de seus portadores, o que motiva ainda mais as investigações sobre os mecanismos de troca de hemoglobina (VINJAMUR *et al.*, 2018). Na β -talassemia, a expressão de HbF diminui o acúmulo e a precipitação das cadeias α -globina, o que reduz a eritropoiese ineficaz, compensando a subprodução de β -globinas; e na anemia falciforme sua expressão pode interromper a polimerização da hemoglobina falciforme (CUI e ENGEL, 2017).

A HbF afeta diretamente o nível primário da doença falciforme, reduzindo a propensão para a polimerização de HbS e atenuando a concentração intracelular de HbS (THEIN, 2013), o que leva à hipótese de que γ -globina fetal tem um efeito de melhora na anemia falciforme. Fato este que ocasionou, nas últimas três décadas, a esforços de tentar identificar uma maneira eficaz de induzir a síntese de HbF como uma terapia potencial para doença falciforme (CUI e ENGEL, 2017).

A genética preditiva de HbF tem vantagens, como o conhecimento prévio sobre o impacto clínico da HbF (THEIN, 2013). O avanço da tecnologia genética vem permitindo que seja investigado a interação entre os atores moleculares necessários para o silenciamento da γ -globina (HBG1/HBG2) (VINJAMUR *et al.*, 2018). A compreensão dos repressores e co-repressores da γ -globina e a troca de HbF para HbA no desenvolvimento forneceu informações estratégicas para ativar a expressão dos genes da globina fetal no tratamento de β -talassemia e DF em adultos (THEIN, 2018).

O esclarecimento de mecanismos moleculares relacionados a troca globínica de HbF para HbA tem sido objeto de estudo há mais de 40 anos, uma vez que a reativação da γ -globina seria uma intervenção terapêutica para pacientes com β -hemoglobinopatias (BORG *et al.*, 2012). Esforços conjuntos têm sido feitos, nas últimas décadas, para identificação de uma maneira eficaz de induzir a síntese de HbF em células eritroides adultas, e assim encontrar uma forma de auxiliar na terapia das β -hemoglobinopatias (CUI e ENGEL, 2017), como ocorre na terapia gênica que representa atualmente uma nova promessa terapêutica (JAING *et al.*, 2021).

Além do mais, a pesquisa de biomarcadores surge com intuito de revelar a correlação de genes específicos e variantes genômicas que possam auxiliar no desenvolvimento de terapia personalizada para indivíduos diagnosticados com β -hemoglobinopatias. É importante ressaltar que já foram detectadas variantes em genes localizados dentro e fora do locus do gene da β -globina humana com importante papel no aumento dos níveis de HbF (PAPADOPOULOS *et al.*, 2020; KARAMPERIS *et al.*, 2021; SALES *et al.*, 2021.). Dentre os modificadores genéticos não ligados ao locus do gene da β -globina, estão variantes dos genes *KLF1*, *KLF10*, *FLT1*, *AQP9* e *PDE7B* que serão descritos posteriormente.

1.3.1.1 Gene *KLF1*

O gene *Kruppel-like factor 1* (*KLF1*), também conhecido por *EKLF* (*Erythroid Kruppel-like fator*) ou *EKLF/KLF1*, codifica um fator de transcrição que regula a expressão da eritropoiese, desempenhando papéis importantes na troca de genes da globina, no comprometimento da linhagem eritroide e na maturação eritrocitária (SIATECKA M, BIEKER, 2011; GNANAPRAGASAM, 2018), sendo considerado um dos mais importantes fatores de transcrição que se liga e regula a função do gene *HBB* (ORIGA, 2017).

KLF1 está localizado no cromossomo 19p13.2, tem aproximadamente 3 kb de DNA genômico e consiste de três exons que codificam uma proteína de 362 aminoácidos (WAYE, 2015). Regula a troca genética de γ -globina para β -globina, recrutando o gene da β -globina durante a fase adulta para substituir o gene da γ -globina dentro do centro ativo da cromatina; e atua como ativador direto de genes

que codificam repressores da expressão do gene da γ -globina (TALLACK e PERKINS, 2013). Observa-se, assim, que o gene *KLF1* ativa o gene *HBB* diretamente, proporcionando uma vantagem competitiva e também silencia indiretamente a γ globina por meio da ativação do gene *BCL11A* (THEIN, 2018). Deve-se ressaltar que ambos os genes são os principais reguladores envolvidos no processo de troca globinica da γ - para β -globinas (LAMSFUS-CALLE *et al.*, 2020) (Figura 9).

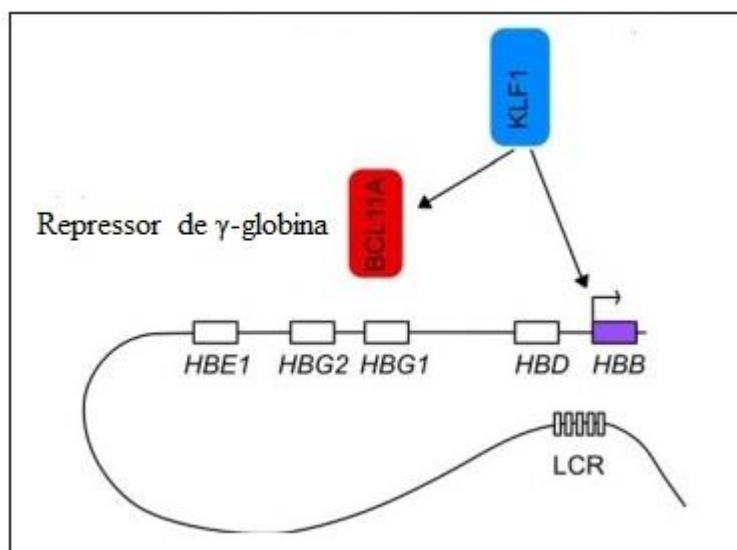


Figura 9 - Regulação da γ -globina pelo gene *KLF1* (Fonte: adaptado de Vinjamur *et al.*, 2018).

Recentemente o gene *KLF1* é considerado um regulador mestre na troca de γ - para β -globina (PAPADOPOULOS *et al.*, 2020), e tem sido proposto como um potencial gene estratégico para o tratamento das β -hemoglobinopatias, visto que sua expressão reduzida consequentemente leva ao aumento de HbF, o qual melhora os sintomas de β -talassemia e doença falciforme (HESHUSIUS *et al.*, 2022). Porém, apesar da modulação de sua expressão resultar em níveis elevados de HbF, ainda é necessário vários estudos, pois além deste gene ter um papel chave na regulação dos eritróides, há dificuldade em alcançar especificidade devido à ampla gama de atividade eritroide (VINJAMUR *et al.*, 2018).

Desde 2010, mais de 65 variantes do gene *KLF1* foram descritas, e seu sequenciamento está sendo recomendado para casos de talassemia com níveis de HbA2 limítrofe/elevado, especialmente se acompanhada por HbF elevado

(PERKINS *et al.*, 2016). Achados de Liu e colaboradores (2014) sugerem que essas variantes ocorrem na presença da β -talassemia para aumentar a produção de HbF, o que conseqüentemente irá diminuir a gravidade clínica da doença. Porém muitas variantes deste gene ainda possuem significado desconhecido (PERKINS *et al.*, 2016), o que pode ser devido à falta de pesquisas mais aprofundadas.

1.3.1.2 Gene *KLF10*.

O gene *Kruppel-like factor 10 (KLF10)*, também conhecido como TGF- β *Inducible Early Gene-1 (TIEG1)* e classificado como um membro da família dos fatores de transcrição Krüppel-like, possui um papel importante na regulação da proliferação celular, apoptose e reação inflamatória em células do carcinoma humano (WU *et al.*, 2021).

O *KLF10* está localizado no cromossomo 8q22.2, abrange 6,5 kb e consiste de quatro éxons que codificam uma proteína de 480 aminoácidos. Foi identificado como supressor de tumor quando seus níveis foram correlacionados com os estágios do câncer de mama, e outros cânceres, além de desempenhar um papel na ativação da resposta inflamatória, sendo relacionado à diferenciação celular e considerado um gene alvo para uma variedade de vias de sinalização (SUBRAMANIAM *et al.*, 2010).

O gene *KLF10* pode ativar ou reprimir a transcrição de vários genes (SUBRAMANIAM *et al.*, 2010). Foi associado pela primeira vez à eritropoiese por Borg e colaboradores (2012), agindo através do gene *SIN3A* correpessor, o qual reprime a atividade de *KLF1*, resultando em uma síntese reprimida de HbA e síntese aumentada de HbF. Também é relatado que o gene *SIN3A*, em conjunto com o gene *HDAC1*, se liga a *KLF1* e reprime a atividade de *KLF1*, o que iria reprimir a síntese de β -globina e, conseqüentemente, levar a um aumento na síntese de globina fetal (GRAVIA *et al.*, 2016). No banco de dados STRING, no qual é possível analisar a relação das interações proteicas, é observada interação entre *KLF1*, *KLF10*, *SIN3A* e *HDAC1* (GRAVIA *et al.*, 2016), conforme observado na Figura 10.

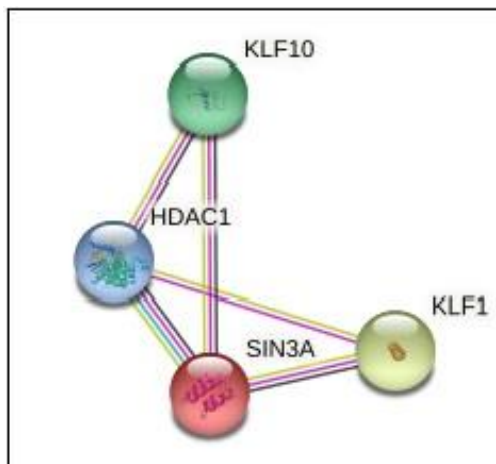


Figura 10 - Representação da interação proteica entre *KLF10*, *KLF1*, *SIN3A* e *HDAC1* predita pelo banco de dados STRING. As linhas coloridas correspondem a dados conhecidos (azul claro: bancos de dados curados; rosa: determinados experimentalmente), previstos (verde: vizinhança genômica; vermelho: fusão gênica; azul: co-ocorrência gênica) e outros (verde claro: mineração de dados na literatura; preto: co-expressão na mesma ou em outras espécies).

Percebe-se, assim, que o *KLF10* de forma indireta pode modificar a produção da γ -globina, o que conseqüentemente irá afetar no nível de HbF e melhorar o fenótipo das β -hemoglobinopatias (ELALFY *et al.*, 2017). Forte candidato a marcador farmacogenômico, a análise do gene *KLF10* possibilita distinguir respondedores e não-respondedores ao tratamento com hidroxiureia (HU), medicamento indutor transitório da expressão do gene da γ -globina responsável por melhorar o fenótipo da doença falciforme, aumentando o nível de HbF (BORG *et al.*, 2012; ELALFY *et al.*, 2017).

1.3.1.3 Gene *FLT1*

O receptor-1 do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGFR-1/FLT-1*) está localizado no cromossomo 13q12.3, consiste de 33 éxons, e é estruturalmente um receptor de tirosina quinase típico de cerca de 180 kDa (SHIBUYA, 2001). Sua expressão é encontrada em células endoteliais vasculares, células trofoblásticas placentárias, incluindo células tronco hematopoiéticas e monócitos do sangue periférico, promovendo a função de

macrófagos, metástase de câncer, doenças inflamatórias e aterosclerose devido sua atividade quinase (SHIBUYA, 2006).

O *FLT1* possui uma característica importante: expressa dois tipos de RNAm, um para um receptor de comprimento total (*full-length receptor*) e outro para uma proteína curta solúvel conhecida como VEGFR-1 solúvel (sFlt-1); consiste em 1.338 aminoácidos e pode ser separado em quatro porções: domínio extracelular, domínio transmembranar, domínio tirosina quinase (TK) e região carboxi terminal (SHIBUYA, 2006). O sFlt-1 leva à perda da porção transmembrana do Flt-1, se liga as moléculas de VEGF circulantes e impede com que fatores angiogênicos se liguem ao seus receptores comuns na membrana celular (OLIVEIRA, KARUMANCHI e SASS, 2010).

O gene *FLT1* desempenha um papel fundamental na angiogênese (SHIBUYA, 2011), desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias (PARADOWSKA-GORYCKA *et al.*, 2017), além de estar envolvido na proliferação e diferenciação celular, e possuir associação significativa com a mudança nos níveis de HbF (MA *et al.*, 2007; BORG *et al.*, 2012; YAHOUÉDÉHOU *et al.*, 2018), tornando-se um importante alvo no desenvolvimento de novas estratégias para suprimir diversas doenças (SHIBUYA, 2006). Os SNPs do gene *FLT1* estão associados com a alteração nos níveis de HbF, apresentando resultados significativos como observado por Ma e colaboradores (2007) e Kolliopoulou e colaboradores (2019), e podendo ser considerados biomarcadores para descrever a gravidade da doença em pacientes com β -hemoglobinopatias (Figura 11).

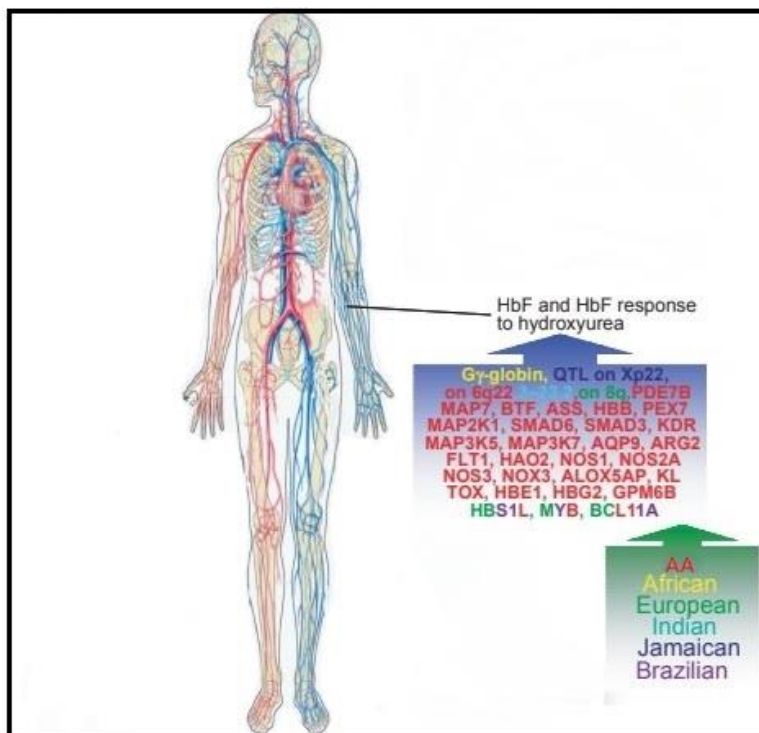


Figura 11 - Esquema de genes onde SNPs foram relatados como significativamente implicados em diferentes fenótipos de DF e em qual população ele foi descrito. (AA = afro-americano) (Fonte: DRISS *et al.*, 2009)

1.3.1.4 Gene AQP9

As aquaporinas (AQPs) são proteínas intrínsecas de membrana, subdivididas em três grupos principais: (i) aquaporinas ortodoxas (*AQP0*, *AQP1*, *AQP2*, *AQP4*, *AQP6* e *AQP8*), que transportam água, (ii) aquagliceroporinas (*AQP3*, *AQP7*, *AQP9* e *AQP10*), isoformas que permitem a permeação de pequenos solutos, principalmente glicerol, além de água, e (iii) superaquaporinas (*AQP11* e *AQP12*), dois homólogos que se caracterizam por sua via evolutiva distinta e localização intracelular, cuja seletividade de substrato ainda está sendo objeto de estudo (TESSE *et al.*, 2021). Os AQPs estão relacionados à várias doenças, como câncer, catarata, edema cerebral, cálculos biliares, e no desenvolvimento de obesidade e doença renal policística, entre outras que estão sendo estudadas (JEYASEELAN *et al.*, 2006).

O gene *AQP9* está localizado no cromossomo 15q21.3, consiste de sete éxons que codificam uma proteína de 295 aminoácidos e é encontrado principalmente nos hepatócitos, osteoclastos, astrócitos e leucócitos (ABIR-AWAN

et al., 2019). Sua superexpressão foi encontrada em cânceres de cérebro, fígado e ovário (AIKMAN *et al.*, 2018) e tem sido associado a resposta de HbF com a HU (BELINI JÚNIOR, 2014) sendo considerado determinante genético de resposta à hidroxiureia em pacientes com doença falciforme (MA *et al.*, 2007) (Figura 11), apesar de não ter uma conexão conhecida com a síntese de HbF ou eritropoiese e não ser um QTL conhecido associado à HbF (SEBASTIANI *et al.*, 2008). Além disso, este gene apresenta-se diferencialmente expresso em pacientes com β -talassemia e anemia falciforme (TAGHAVIFAR, HAMID E SHARIATI, 2019).

1.3.1.5 Gene *PDE7B*

Os fosfodiesterases (PDEs) são conhecidas como nucleotídeos cíclicos, que regulam os níveis intracelulares de cAMP e cGMP e desempenham um papel importante como segundos mensageiros em múltiplos processos fisiológicos, incluindo regulação da resistência vascular, débito cardíaco, resposta imune, inflamação, neuroplasticidade, visão e reprodução (HETMAN, *et al.*, 2000).

As PDEs são categorizadas em 11 famílias e compostas por 21 genes (OMORI e KOTERA, 2007). A família PDE7 é dividida em *PDE7A* e *PDE7B*, e apesar das semelhanças possuem diferenças quando a distribuição tecidual é comparada (HETMAN *et al.*, 2000). A *PDE7B* pode ser encontrada nos tecidos do pâncreas, cérebro, coração, tireóide, músculo esquelético, olho, ovário, glândula submaxilar e epidídimo (HETMAN *et al.*, 2000).

O gene *PDE7B* (fosfodiesterase 7B) está localizado no cromossomo 6q23 (OMORI e KOTERA, 2007), e pode ser um modulador da HbF, visto ser um gene membro de uma via cuja ativação inibe a expressão de mRNA da γ -globina induzida por hemina diminuindo a transcrição no promotor da γ -globina (STEINBERG e ADEWOYE, 2006). Variantes no gene *PDE7B* associadas à resposta de HbF a HU (MA *et al.*, 2007) já foram observadas (Figura 11).

1.4 PESQUISA DE VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS A β -HEMOGLOBINOPATIAS.

O genoma humano contém em torno de 4 milhões de variantes e suas frequências populacionais podem variar de acordo com as origens étnicas (MARIAN, 2020), visto que não são distribuídas de forma uniforme no mundo. Essas variantes diferem entre as populações devido as migrações, deriva genética e seleção natural, e como consequência a frequência alélica de uma determinada variante pode diferir entre as populações ou não estão presentes em todas elas (LETTRE, 2012).

A identificação de novas variantes nos genes da globina vem sendo realizada por meio do sequenciamento de DNA para estudos populacionais, bem como a sua relação com o ambiente e influência de fatores como clima, história ou cultura que interferem na ocorrência dessas variantes (WEATHERALL, 2010). Deve-se ressaltar que o sequenciamento do genoma e/ou exoma está sendo utilizado como alternativa quando não são encontradas variantes nos genes candidatos, o que permite um painel maior de genes que poderá ser analisado (PERKINS *et al.*, 2016; MARIAN, 2020).

Nos últimos anos, ocorreu um crescente aumento na quantidade de informações genéticas relacionadas à hemoglobinopatias, com intuito de identificar genes candidatos com fortes efeitos modificadores (STEPHANOU *et al.*, 2019). Dentre essas pesquisas, está a identificação de possíveis determinantes moleculares na produção de HbF que possam ser desenvolvidos como alvos terapêuticos para β -hemoglobinopatias (LIU *et al.*, 2016), uma vez que esta hemoglobina é um dos principais contribuintes para a heterogeneidade clínica observada em pacientes com distúrbios da β -globina, como a anemia falciforme e a β -talassemia (HAMID *et al.*, 2018)

Os dados de estudos de associação provenientes de resultados obtidos no sequenciamento e que são significativos para vários fenótipos de β -hemoglobinopatias (STEPHANOU *et al.*, 2019) têm sido descrito no portal ITHANET, que faz um monitoramento rigoroso da literatura de hemoglobinopatias e tem acurado e anotado os genes modificadores e suas variantes (KOUNTOURIS *et al.*, 2017). O ITHANET também integra o banco de dados de variações (IthaGenes), epidemiologia (IthaMaps) e dados de HPLC (IthaChrom).

Além disso, os bancos de dados, sobretudo público, disponibilizam informações geradas a respeito de variantes genéticas compiladas e interpretadas de acordo com dados clínicos. Esses bancos de dados populacionais são referência e essenciais na interpretação dos genes e suas variantes genéticas (GUDMUNDSSON *et al.*, 2021) que permitem filtrar variantes genéticas comuns presentes na população (LERARIO, *et al.*, 2020). Dentre esses, estão os bancos de dados internacionais Clinvar e gnomAD, e os bancos de dados brasileiros AbraOM e SELAdb que foram utilizados no presente estudo.

1.4.1 Bancos de anotação de variantes genéticas

1.4.1.1 Clinvar

ClinVar é um banco de dados público que compartilha interpretações de variantes com suas respectivas evidências, representando 430.000 variantes únicas. Foi criado no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) para fornecer um banco de dados de acesso aberto com intuito de auxiliar na interpretação das variantes e seu significado clínico, além de agregar dados de várias fontes, facilitando a busca por informações das variantes (LANDRUM e KATTMAN, 2018).

O ClinVar aceita submissões de diferentes centros e laboratórios e inclui as variantes observadas nos 59 genes recomendados pelo American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) para o relato de achados eventuais (KALIA *et al.*, 2017). É um banco de dados que tem como principal função arquivar as interpretações de variantes que são submetidas (LANDRUM e KATTMAN, 2018), além de ser um banco de anotação da patogenicidade de variantes que vem crescendo gradualmente na quantidade de informações patogênicas validadas (WIEL *et al.*, 2019).

1.4.1.2 Banco de Dados de Agregação de Genoma (gnomAD)

O Banco de Dados de Agregação do Genoma (gnomAD) é atualmente o maior banco de dados de exoma disponível publicamente no mundo. Reúne dados de sequências de exoma e sequências de genoma completo de indivíduos não relacionados provenientes de projetos de sequenciamento de larga escala,

disponibilizando dados de variantes genéticas de diferentes grupos étnico-raciais, incluindo europeus, africanos e afro-americanos, latinos, leste e sul-asiáticos, judeus asquenazes e outras populações (KARCZEWSKI *et al.*, 2020).

O gnomAD é o conjunto de dados populacional de referência mais acessado, com mais de 150.000 visualizações por semana (Figura 12). Consiste em duas versões, v2.1.1 e v3.1.2 (referido como v2 e v3), sendo o gnomAD v2, com 125.748 exomas e 15.708 genomas alinhados a GRCh37, preferível a v3 para interpretar variantes de codificação, embora a versão v3 atual possua 76.156 genomas alinhados ao GRCh38, fornecendo mais dados para regiões não codificantes ou regiões codificantes não bem cobertas em exomas (GUDMUNDSSON, *et al.*, 2021).

O acesso ao gnomAD torna possível explorar os padrões de variantes gênicas e obter a estimativa de frequência alélica (GUDMUNDSSON, *et al.*, 2021). Desde seu lançamento, em 2016, provou ser um excelente recurso genético na identificação e interpretação de variantes causadoras de doenças e potenciais alvos terapêuticos (KOCH, 2020).

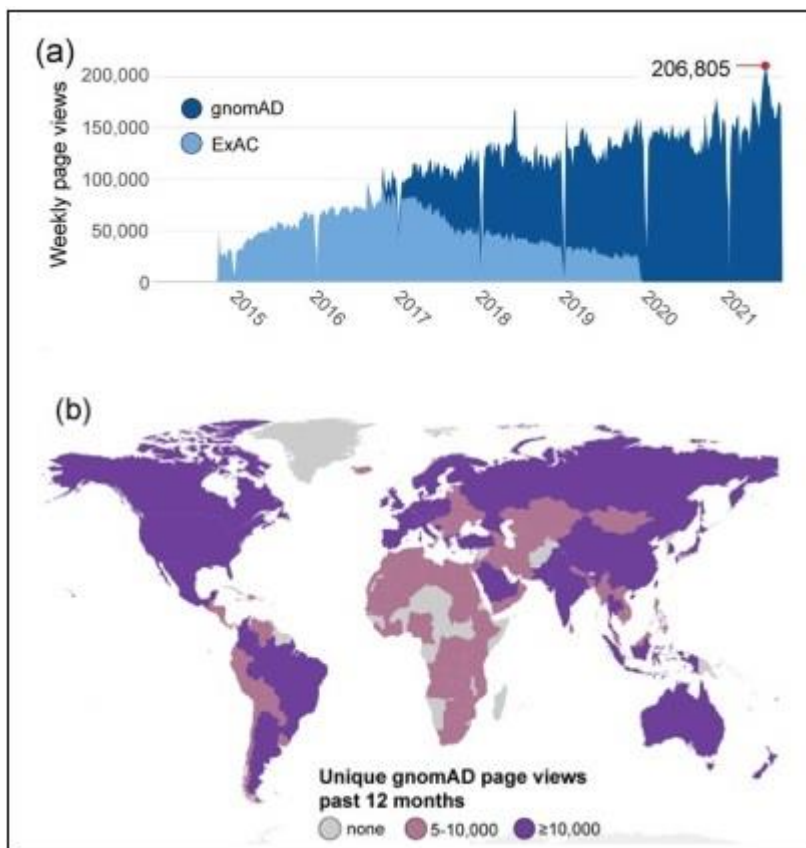


FIGURA 12 - Acesso do banco de dados gnomAD. (a) Visualizações de página semanais do gnomAD (azul escuro) e ExAC (azul claro) desde o lançamento em outubro de 2014 até meados de 2021. (b) Número de visualizações de página exclusivas do gnomAD em cada país nos últimos 12 meses (desde 14-06-2020). (Fonte: GUDMUNDSSON *et al.*, 2021).

1.4.1.3 AbraOM

O AbraOM (Arquivo Online de Mutações Brasileiras) é um banco de dados público brasileiro que armazena dados de frequência de variantes de indivíduos idosos, e é representativo da população brasileira uma vez que idosos são menos propensos a mutações patogênicas de início precoce e adulto, sendo, dessa forma, de grande interesse para estudo (NASLAVSKY *et al.*, 2017). Este repositório contém variantes obtidas através do sequenciamento do exoma total e do genoma total do estudo SABE (Saúde, Bem-estar e Envelhecimento), uma amostra baseada no censo de idosos de São Paulo (NASLAVSKY *et al.*, 2020).

1.4.1.4 SELAdb database.

SELAdb, banco de dados de Sequenciamento em Larga Escala, é um banco de dados público que pode representar a prevalência de variantes patogênicas na população da região sudeste do Brasil. Em contraste ao AbraOM, este banco de dados possui resultados de uma população de pacientes ou familiares com supostos distúrbios genéticos, os quais foram identificados espectro de variantes patogênicas conhecidas e potencialmente novas (LERARIO *et al.*, 2020).

1.4.2 Preditores de Patogenicidade

Identificar a patogenicidade das variantes genéticas por meio de testes genéticos e fenótipo clínico é desafiador (MARIAN, 2020), pois a interpretação das variantes ainda é complexa, visto que variam de acordo com o contexto genético no qual está inserida (SANTOS, 2018). Devido a isto, os preditores *in silico* começaram a ser utilizados para análise das variantes, além de pesquisas em banco de dados públicos.

Os preditores de patogenicidade são programas de predição computacional (*in silico*) que podem auxiliar na interpretação das variantes genéticas. Esses preditores, embora utilizem diferentes algoritmos, podem auxiliar na determinação do efeito da variante a nível de nucleotídeo e aminoácido, transcrito primário e transcritos alternativos, assim como o potencial impacto da variante sobre a proteína. A classificação de patogenicidade baseia-se conforme o guia de classificação do *American College of Medical Genetics (ACMG)*, o qual orienta que essas variantes devem ser classificadas como: (i) patogênica, (ii) provavelmente patogênica, (iii) significado incerto, (iv) benigna ou (v) provavelmente benigna (RICHARDS *et al.*, 2015). Um desafio são as variantes que apresentam interpretações conflitantes de patogenicidade, quando duas ou mais análises dos preditores discordam em sua análise (NASLAVSKY, *et al.*, 2021).

Percebe-se assim, que esses preditores surgem com intuito de atribuir uma classificação de patogenicidade principalmente para variantes desconhecidas. Walters-Sen e colaboradores (2015) investigaram o desempenho de 17 preditores

de mutação. Desses, cinco preditores que apresentaram resultados mais consistente foram utilizados no presente estudo: (i) FATHMM (SHIHAB *et al.*, 2013), (ii) PROVEAN (CHOI *et al.*, 2012); (iii) SIFT (KUMAR *et al.*, 2009), (iv) POLYPHEN-2 (ADZHUBEI *et al.*, 2010); e (v) PANTHER (MI *et al.*, 2012):

- i) FATHMM (Functional Analysis Through Hidden Markov Models) é um software que permite avaliar a patogenicidade de uma mutação através do alinhamento da combinação de sequências conservadas da proteína. Este preditor utiliza alinhamento de sequências homólogas e domínios conservados da proteína para prever os impactos das mutações na função da proteína (SHIHAB *et al.*, 2013);
- ii) PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) é um algoritmo que fornece scores que se correlacionam com o nível de atividade biológica, podendo ser utilizado como indicadores do grau do impacto funcional de uma variação na proteína (CHOI *et al.*, 2012);
- iii) SIFT (Sorting Tolerant From Intolerant) é um algoritmo que prevê se uma substituição de aminoácido afeta a proteína. Para avaliar o efeito dessa substituição, este preditor assume que posições importantes em uma sequência de proteína foram conservadas ao longo da evolução e, substituições nessas posições podem afetar a função da proteína (KUMAR *et al.*, 2009).
- iv) POLYPHEN-2 é um preditor baseado no número de características que compreendem a sequência, a informação estrutural e filogenética que caracterizam a substituição dos aminoácidos, sendo capaz de predizer o possível impacto dessas substituições na estrutura e função das proteínas (ADZHUBEI *et al.*, 2010).
- v) PANTHER possui anotação da família e subfamília do gene, a classe de proteínas e função do gene e a árvore filogenética de cada família, sendo capaz de predizer as consequências de mutações na estrutura e função de uma proteína, além de permitir dedução de função para genes não caracterizados (MI *et al.*, 2013).

Dessa forma, o uso de preditores se tornou um apoio na análise de variantes, visto que o crescente aumento de sequenciamento em laboratórios de pesquisa e diagnóstico aumentou o desafio de interpretação das variantes, uma

vez que estas surgem em ritmo mais acelerado do que os experimentos de validação (NASLAVSKY *et al.*, 2017).

1.4.3 Validação experimental

Definir quais variantes possuem efetivamente o verdadeiro alelo causador de determinada doença em pesquisa clínica é desafiador (LERARIO *et al.*, 2020). Uma maneira de superar esse obstáculo é filtrar em banco de dados genômicos as variantes mais comuns em determinada população. Porém, essa abordagem é limitada devido determinadas populações estarem sub-representadas nesses bancos de dados (LERARIO *et al.*, 2020) o que torna necessário à validação experimental para identificação dessas variantes na população pesquisada.

A validação experimental é uma abordagem eficaz na dedução de modificadores genéticos (STEPHANOU *et al.*, 2019), a qual pode ser feita através da genotipagem, que traz um melhor entendimento da estrutura genética da população e melhora a análise de estudos de associação (GIOLO *et al.*, 2012). A validação experimental por meio da genotipagem foi realizada na presente pesquisa, a partir da escolha de variantes associadas ao aumento de HbF em β -hemoglobinopatias. Os marcadores genéticos que modulam a produção de HbF são investigados constantemente, visto que o nível de HbF é um importante preditor em hemoglobinopatias (STEPHANOU *et al.*, 2019).

Deve-se ressaltar que embora existam estudos que investigam a estrutura genéticas da população não-caucasiana, como africanos, afro-americanos, asiáticos e nativo-americanos, a cobertura da população humana global permanece incompleta com a população da América do Sul, sendo esta sub-representada nos bancos de dados globais (GIOLO *et al.*, 2012). Dessa forma, esta pesquisa irá por meio da análise *in silico* investigar em pacientes com β -hemoglobinopatias da população da Amazônia brasileira os genes associados a variações em níveis de HbF.

As variantes selecionadas foram (Quadro 2): rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*) identificadas em estudo de exoma em população miscigenada da Amazônia brasileira, sem descrição em bancos genômicos públicos. Essa população habita

na cidade de Belém, região nordeste da Amazônia, e é caracterizada por três componentes genéticos (população trihíbrida): indígena, europeu e africano (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Quadro 2. Variantes genéticas relacionadas como significativamente associadas a β -hemoglobinopatias.

Gene	Cromossomo	SNP	Fenótipo	p-valor	Referência
<i>AQP9</i>	15q22.1–q22.2	rs1867380	Nível de HbF em DF e resposta da HbF à hidroxiureia	0.044	SEBASTIANI <i>et al.</i> , 2008
<i>FLT1</i>	13q12	rs3751395	Nível de HbF em DF e resposta da HbF à hidroxiureia	0.039	MA <i>et al.</i> , 2007
<i>PDE7B</i>	6q23-q24	rs9376173	Nível de HbF em DF e resposta da HbF à hidroxiureia	0.049	MA <i>et al.</i> , 2007
<i>KLF1</i>	19p13.2	rs2072597	Aumento do nível de HbF em β -talassêmicos	P<0,05	HAMID <i>et al.</i> , 2018
<i>KLF10</i>	8q22.2	rs3191333	Nível de HbF em DF e resposta da HbF à hidroxiureia, e nível de HbF em β -talassemia	0,04	BORG <i>et al.</i> , 2012 ELALFY <i>et al.</i> , 2017

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência das variantes rs3751395 (*FLT1*), rs2072597 (*KLF1*), rs1867380 (*AQP9*), rs9376173 (*PDE7B*), rs3191333 (*KLF10*), haplótipos β S, níveis de HbF e manifestações clínicas nos indivíduos diagnosticados com β -hemoglobinopatias no Estado do Pará.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a existência da associação entre as variantes rs3751395 (*FLT1*), rs2072597 (*KLF1*), rs1867380 (*AQP9*), rs9376173 (*PDE7B*) e rs3191333 (*KLF10*) e os níveis de HbF;

Associar as variantes rs3751395 (*FLT1*), rs2072597 (*KLF1*), rs1867380 (*AQP9*), rs9376173 (*PDE7B*) e rs3191333 (*KLF10*) com as manifestações clínicas nos pacientes com β -hemoglobinopatias (β -talassemia e anemia falciforme);

Associar os níveis de HbF com os dados laboratoriais e clínicos nos pacientes com anemia falciforme;

Relacionar as variantes genéticas rs3751395 (*FLT1*), rs2072597 (*KLF1*), rs1867380 (*AQP9*), rs9376173 (*PDE7B*) e rs3191333 (*KLF10*) e os níveis de HbF com os escores de gravidade encontrados nos pacientes com anemia falciforme;

Investigar a distribuição genotípica dos haplótipos β S nos indivíduos com anemia falciforme;

Verificar a associação entre a combinação haplotípica β S com os níveis de HbF e manifestações clínicas nos indivíduos com anemia falciforme;

Pesquisar nos bancos de dados públicos internacionais: gnomAD e Clinvar, as variantes genéticas (rs3751395, rs2072597, rs1867380, rs9376173 e rs3191333) e comparar suas respectivas frequências alélicas com os dados observados em banco de dados nacionais AbraOM e SELAdb e o presente estudo; e

Utilizar os preditores in silico: FATHMM, SIFT, PROVEAN, POLYPHEN-2 e PANTHER) para estabelecer o grau de patogenicidade das variantes rs3751395 (*FLT1*), rs2072597 (*KLF1*), rs1867380 (*AQP9*), rs9376173 (*PDE7B*) e rs3191333 (*KLF10*).

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo descritivo do tipo transversal com objetivos de verificar e investigar as variantes rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*) em pacientes diagnosticados com β -hemoglobinopatias do Estado do Pará, associando com os níveis de HbF e manifestações clínicas, além de classificar o grau de patogenicidade dessas variantes genéticas mediante análise *in silico* de cinco preditores, e investigar os haplótipos em pacientes com anemia falciforme.

3.2 TIPO DE AMOSTRAGEM

A seleção da amostra foi realizada por conveniência.

3.3 POPULAÇÃO ESTUDADA

A população estudada foi composta por 160 pacientes com anemia falciforme e 30 pacientes com β -talassemia. Esses foram atendidos na Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará (HEMOPA), centro de referência em diagnóstico e tratamento para β -hemoglobinopatias, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que permitiu a coleta de material biológico e o acesso às informações clínicas em nível de prontuário. O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará com o número CAAE 79638117.4.0000.0018.

Para os pacientes com doença falciforme, o critério de inclusão adotado foi a investigação molecular de pacientes de ambos os sexos, com genótipo homocigoto para o alelo HBB*S, e o critério de exclusão adotado foi idade inferior a um ano. A caracterização laboratorial da população investigada (pacientes com anemia falciforme) está descrita no Quadro 3.

Quadro 3 - Índices laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) dos pacientes diagnosticados com anemia falciforme.

Índices laboratoriais	N	Média ± Desvio-padrão	Percentil (25%)	Mediana	Percentil (75%)
Hb, g/dL	160	8,3 ± 1,4	7,4	8,0	8,8
HbF, (%)	160	9,1 ± 6,5	4,6	7,9	11,9
HbS, (%)	147	72,6 ± 15,5	67,3	76,7	83,0
Ht, (%)	155	22,9 ± 4,3	20,2	22,4	24,9
VCM, fL	159	90,1 ± 9,2	86,0	89,6	93,9
HCM, pg	155	32,1 ± 4,2	29,9	32,5	34,2
Plaquetas, x10 ⁹ /L	142	396,4 ± 151,8	303,3	381,0	457,0
TGP, U/L	67	34,6 ± 33,7	18,0	26,0	38,0
TGO, U/L	67	57,4 ± 67,4	36,0	45,0	62,0

Para os pacientes β -talassêmicos, o critério de inclusão adotado foi a investigação molecular de mutações beta-talassêmicas (Silva *et al.*, 2015) nos pacientes de ambos os sexos, e o critério de exclusão adotado foi idade inferior a um ano. A caracterização laboratorial está descrita no Quadro 4, e a caracterização molecular para o total de 34 cromossomos (pacientes com β -talassemia) está descrita no Quadro 5.

Quadro 4. Índices laboratoriais dos pacientes beta talassêmicos.

Índice laboratorial	N	Média ± Desvio- padrão	Mediana
HBF	30	4,8 ± 6,6	2,4
HBA2	30	4,9 ± 1,3	5,3
HB	27	9,6 ± 2,1	9,9
HT	26	29,9 ± 5,8	31,4
VCM	25	68,9 ± 12,0	65,0
HCM	25	21,8 ± 4,7	20,6
CHCM	26	31,8 ± 3,7	32,4
RDW	25	19,9 ± 5,8	18,7
FERRITINA	23	175,9 ± 334,8	52,0

Quadro 5 - Frequência das mutações β -talassêmicas identificadas nos pacientes β -talassêmicos.

Mutação	Fenótipo	Número	Frequência
CD39	$\beta 0$	6	0,176
CD77-78	$\beta 0$	1	0,029
-88	$\beta +$	6	0,176
IVSI-1	$\beta 0$	4	0,118
IVSI-5	$\beta +$	9	0,264
IVSI-6	$\beta +$	5	0,147
IVSI-110	$\beta +$	1	0,029
IVSII-1	$\beta 0$	1	0,029
IVSII-2	$\beta 0$	1	0,029

O levantamento clínico dos pacientes foi realizado em nível de prontuário médico incluindo histórico das manifestações clínicas, evolução e condutas terapêuticas adotadas para cada paciente. Em relação ao perfil hematológico foi considerado o último exame documentado no prontuário dos pacientes. Esse levantamento foi importante para propor associações isoladas de variantes genéticas e manifestações clínicas e parâmetros hematológicos.

3.4. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

De cada indivíduo foram obtidos 5 mL de sangue periférico, em sistema de coleta a vácuo, utilizando EDTA como anticoagulante.

3.5. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi feita segundo método descrito por Old e Higgs (1993) com algumas modificações. A técnica consistiu em adicionar sangue total (5 mL) em um tubo de 15 mL e completar com solução salina (9g/L de NaCl) até 14 mL; centrifugar (3000 rpm/10'); desprezar o sobrenadante e adicionar ao "pellet" 5mL de tampão de lise de hemácias (5mmol/L de MgCl₂, 20mmol/L de Tris-HCl, pH: 7,8); centrifugar (3000 rpm/10'); desprezar o sobrenadante e adicionar ao "pellet" 5 mL de lise de leucócitos (0,2 mol/L de NaCl, 1mmol/L de EDTA e 10 mmol/L de Tris-HCl, pH: 7,8); adicionar 500 μ L de SDS a 10% e 10 μ L de proteinase K (20mg/mL); agitar o material durante 2h a temperatura ambiente; adicionar um volume de fenol, agitar 10 minutos; centrifugar (3000 rpm/ 10') e transferir o sobrenadante para um outro tubo; adicionar um volume de clorofórmioisopropanol (24:1); agitar por 10'; centrifugar (3000 rpm/10') e transferir o sobrenadante para um outro tubo de 15 mL; adicionar 2,5x o volume de

isopropanol e misturar por inversão até a precipitação do DNA; retirar o DNA precipitado e transferir para um outro tubo; deixar o DNA secando a temperatura ambiente por aproximadamente 12h e em seguida adicionar água para hidratar. Após a hidratação, é importante deixar o DNA durante 12 h em banho-maria (37° C) ou em temperatura ambiente até que sua dissolução seja completa.

3.6 VARIANTES GENÉTICAS SELECIONADAS

As variantes genéticas investigadas, no presente trabalho, em indivíduos com β -hemoglobinopatias foram selecionadas a partir do resultado de exoma realizado em população miscigenada da Amazônia brasileira, sem descrição em bancos genômicos públicos (RODRIGUES *et al.*, 2020). As variantes selecionadas foram: rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*), que apresentam associação com os níveis de HbF em indivíduos com β -hemoglobinopatias (MA *et al.*, 2007; BORG *et al.*, 2012; SEBASTIANI *et al.*, 2008; ELALFY *et al.*, 2017; HAMID *et al.*, 2018).

3.7 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

Para a determinação das variantes localizadas nos genes *AQP9* (rs1867380), *FLT1* (rs3751395), *PDE7B* (rs9376173), *KLF1* (rs2072597) e *KLF10* (rs3191333) foi utilizada a metodologia de PCR em tempo real (RQ-PCR), que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação de PCR (GINZINGER, 2002). Foi utilizado o sistema de discriminação alélica TaqMan® (Life Technologies) de PCR em Tempo Real.

Durante a RQ-PCR, o acúmulo de amplicons é detectado em "tempo real", para cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas sequência-específicas ou primers usados na reação (FADERL *et al.*, 2004). A metodologia TaqMan utiliza a atividade de exonuclease da Taq DNA Polimerase (HOLLAND *et al.*, 1991; LEE, 1993), em que a enzima digere uma sonda marcada que anela especificamente na parte interna do seguimento a ser amplificado entre dois primers. A sonda TaqMan possui na extremidade 5' uma molécula fluorescente cuja função é denominada "reporter" e, na extremidade 3',

outra molécula que pode ou não ser fluorescente, cuja função é chamada de "quencher". Enquanto a sonda está íntegra, o "quencher" oculta o sinal fluorescente do "reporter". Esse efeito desaparece quando a sonda, anelada entre os primers, é clivada pela atividade exonucleásica da enzima Taq DNA Polimerase. Enquanto a reação de PCR se processa, a polimerase sintetiza novas cadeias a partir dos primers e cliva a sonda correspondente, resultando em aumento do sinal fluorescente que é captado a cada ciclo até atingir um limiar (threshold), no qual todas as amostras são comparadas.

3.8 CÁLCULO DO ESCORE DE GRAVIDADE

Para classificação da gravidade da anemia falciforme foi utilizada a “Calculadora da Gravidade da Doença falciforme”, ferramenta desenvolvida por Sebastiani *et al.* (2007), que utiliza o método Bayesiano, para modelar as relações entre as variáveis clínicas e laboratoriais da doença falciforme em relação ao risco de morte. Essa calculadora foi validada por Silva (2020) nas amostras de pacientes com anemia falciforme do estado do Pará, e permite classificar os pacientes em leve/intermediário e grave por meio do escore de gravidade atribuído pela calculadora.

3.9 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS ASSOCIADOS AO GENE DA HEMOGLOBINA S.

A identificação de haplótipos foi realizada de acordo com Lemos Cardoso e Farias Guerreiro (2006): os haplótipos foram determinados por análises dos seguintes locais de restrição polimórfica: HincII-5'ε; HindIII-γG; HindIII-γA; HincII-ψβ e HincII-3'ψβ.

3.10 PESQUISA EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS

3.10.1 GnomAd database

A pesquisa das variantes rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*) disponíveis no gnomAD 2.1 foram baixados em 13 de janeiro de 2022 em <https://gnomad.broadinstitute.org/>. O gnomAD, também conhecido como Genome Aggregation Database Consortium, foi desenvolvido por uma coalizão internacional de pesquisadores para agregar e harmonizar dados de sequenciamento de exoma e genoma de

uma ampla gama de projetos de sequenciamento em larga escala e disponibilizar resumos de dados para a comunidade científica. O genoma de referência utilizado para alinhamento de sequências foi GRCh37/hg19 (referência), e o alinhamento foi realizado usando a ferramenta GATK (McKenna et al., 2010).

3.10.2 AbraOM

As consultas das variantes pesquisadas foram realizadas por identificador dbSNP (rs_) em 20 de janeiro de 2022, disponível em <http://abraom.ib.usp.br/>. Este repositório contém variantes obtidas através do sequenciamento do exoma total e do genoma total do estudo SABE (Saúde, Bem-estar e Envelhecimento) (NASLAVSKY *et al.*, 2020). O download do resultado da consulta foi feito no formato .xls.

3.10.3 SELAdb database

Os dados das variantes rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*) foram acessados gratuitamente em <http://intranet.fm.usp.br/sela>, em 20 de janeiro de 2022. O banco de dados SELAdb mostra a importância dos bancos de dados populacionais regionais em representar melhor os indivíduos de diversas origens (LERARIO *et al.*, 2020).

3.10.4 ClinVar

A pesquisa das variantes rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*) foram feitas no Clinvar, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, em 20 de janeiro de 2022. Esse banco de dados, facilita a interpretação das variantes e seu significado clínico, sendo aplicado para análise de mutações clínicas e patológicas (LANDRUM *et al.*, 2014).

3.11 ANÁLISE EM PROGRAMAS DE PREDIÇÃO DE PATOGENICIDADE

As variantes foram analisadas usando os seguintes programas de predição de patogenicidade disponíveis publicamente: FATHMM (SHIHAB *et al.*, 2013),

PROVEAN (CHOI *et al.*, 2012), SIFT (KUMAR *et al.*, 2009), POLYPHEN-2 (ADZHUBEI *et al.*, 2010) e PANTHER (THOMAS *et al.*, 2003). As variantes submetidas à análise de preditores seguiram essa conformação: p.Val103Ile, p.Ile251Leu, p.Ile269Asn e assim por diante. Mutações sinônimas foram excluídas das análises, assim como variantes em regiões intrônicas. As mutações do tipo c.-60C>T, c.-56dupG, c.-48C>T também foram excluídas. Os critérios utilizados para classificar a natureza das variantes foram os seguintes: benigna, quando três ou mais preditores classificaram a variante como benigna; patogênica, quando três ou mais preditores classificaram a mutação como patogênica; e inconclusivos, quando pelo menos um preditor não conseguiu analisar a variante, dois a classificaram como patogênica e outros dois a classificaram como benigna ou quando nenhuma previsão foi feita por múltiplos preditores.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.

Para testar a normalidade das variáveis quantitativas (Hb, HbF, HbS, Ht, VCM, HCM, plaquetas e idade) foram realizados os testes estatísticos de Shapiro-Wilk ($n > 100$) e Kolmogorov-Smirnov ($n < 100$).

O teste não paramétrico de Mann-Whitney para variáveis que não apresentaram uma distribuição normal foi utilizado para determinar se havia diferenças significativas entre a distribuição dos níveis de HbF de acordo com a presença da mutação para cada variante genética investigada *AQP9* (rs1867380), *FLT1* (rs3751395), *PDE7B* (rs9376173), *KLF1* (rs2072597) e *KLF10* (rs3191333) em pacientes β -talassêmicos.

Para os pacientes com anemia falciforme foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para verificar se havia diferença entre os níveis dos parâmetros laboratoriais com os valores $<$ e \geq a média HbF. Para verificar a associação entre as variáveis clínicas e os valores $<$ e \geq a média HbF, e a associação entre as variantes genéticas e os valores $<$ e \geq a média de HbF foi aplicado o teste do χ^2 de independência.

O teste do qui-quadrado foi utilizado para verificar associação entre os genótipos das variantes investigadas com a classificação clínica nos pacientes β -

talassêmicos, e verificar associação entre esses genótipos com as manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme.

As frequências alélicas e genóticas, e probabilidade de equilíbrio de Hardy Weinberg foram feitas utilizando-se o programa ARLEQUIN 3,5 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35>) (EXCOFFIER e LISCHER, 2010).

Uma análise multivariada (regressão linear múltipla) foi realizada para investigar a associação entre os níveis de HbF e as variantes genéticas nos indivíduos β -talassêmicos. Em indivíduos com anemia falciforme foi realizada a análise de regressão logística univariada (simples) para investigar a associação entre o genótipo da variante genética rs3751395 (*FLT1*) e a predisposição aos eventos clínicos algias e crise vaso oclusivas. A razão de chances (OR) foi calculada com intervalo de confiança de 95% para estimar o risco relativo e a força da associação, sendo a OR acima de 1 associado com aumento de chance de uma determinado evento ocorrer e OR menor que 1, o contrário.

Para verificar associações da concentração de HbF com a combinação haplotípica foi realizada uma análise multivariada (regressão linear). Em seguida foi realizada a análise de regressão logística multivariada para investigar a associação entre a concentração de HbF e a combinação haplotípica com as manifestações clínicas, por meio de criação de modelos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa softwares S.P.S.S. for Windows versão 20. O nível de significância estabelecido para os testes foi 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

O presente estudo investigou variantes genéticas observados em estudo de exoma em população miscigenada da Amazônia brasileira (RODRIGUES *et al.*, 2020) (Tabela 1), os quais estão associados a variações dos níveis de HbF em indivíduos diagnosticados com β -hemoglobinopatias (β -talassemia ou anemia falciforme).

Tabela 1. Frequência, na população de Belém, das variantes genéticas investigadas.

Gene	SNP_ID	Frequência observada na População de Belém (%)
<i>AQP9</i>	rs1867380	25,26
<i>FLT1</i>	rs3751395	10,53
<i>PDE7B</i>	rs9376173	17,89
<i>KLF1</i>	rs2072597	13,68
<i>KLF10</i>	rs3191333	1,05

Os resultados serão apresentados de acordo com as investigações realizadas: genotipagem para β -talassemia e anemia falciforme; haplótipos do gene da β -globina e sua associação com os níveis de HbF e as manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme; pesquisa das variantes genéticas em banco de dados públicos internacionais e comparação com banco de dados nacionais; e análise *in silico* para pesquisa de patogenicidade das variantes genéticas investigadas.

4.1 β - TALASSEMIA

O presente estudo investigou 30 indivíduos diagnosticados com β -talassemia no estado do Pará, cuja caracterização molecular foi realizada por Silva e colaboradores (2015). Destes, 13 (43,3%) são do sexo masculino e 17 (56,7%) do sexo feminino, com idade média de 23 anos. A genotipagem para esses indivíduos foi realizada para as variantes: rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*), que estão associadas ao nível de HbF em β -hemoglobinopatias.

4.1.1 Frequências alélicas e genótípicas das variantes nos genes *AQP9*, *FLT1*, *PDE7B*, *KLF1* e *KLF10* nos pacientes com β -talassemia.

Para as variantes associadas com níveis de HbF, a variante rs1867380 (*AQP9*) apresentou frequência alélica e genotípica de 100% para o alelo selvagem. Em contrapartida, as variantes rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*) apresentaram frequências para os alelos selvagens, mutantes e em heterozigose, conforme observado na Tabela 2.

A variante rs3751395 (*FLT1*) apresentou maior frequência alélica para o alelo A (67%), seguida de 33% para o alelo C, sendo mais frequente o genótipo heterozigoto AC (59,4%) em comparação aos genótipos AA e CC (37,5% e 3,1%), respectivamente. Para a variante rs9376173 localizada no gene *PDE7B*, a maior frequência alélica observada foi para o alelo A (66%), e a maior frequência genotípica para o alelo selvagem em homozigose AA (52,9%), seguida pelo genótipo AC e CC (26,5% e 20,6%), respectivamente.

Para as variantes pesquisadas localizadas nos genes da família KLF, a variante rs2072597 (*KLF1*) apresentou maior frequência alélica para o alelo mutante G (94%), e a variante rs3191333 (*KLF10*) para o alelo selvagem G (75%). Em relação a frequência genotípica, a maior frequência na variante rs2072597 (*KLF1*) foi observada para o genótipo homozigoto mutante GG (87,5%), seguida pelo genótipo heterozigoto GA (12,5%), não sendo observado genótipo homozigoto selvagem. E para a variante rs3191333 (*KLF10*) foi observada uma frequência de 55,9% para o genótipo homozigoto selvagem, seguida pelo genótipo GA (38,2%) e AA (5,9%), respectivamente.

Tabela 2. Frequência genotípicas e alélicas dos SNP's nos genes *AQP9*, *FLT1*, *PDE7B*, *KLF1* e *KLF10* associados com a variação nos níveis de HbF em pacientes beta talassêmicos do estado do Pará.

Locus	SNP's	Genótipo	Frequência genotípica %	Frequência alélica
<i>AQP9</i>	rs1867380 G>A	GG (n=34)	100	G= 1,0
<i>FLT1</i>	rs3751395 A>C	AA (n=12) AC (n=19) CC (n=1)	37,5 59,4 3,1	A= 0,67 C= 0,33
<i>PDE7B</i>	rs9376173 A>C	AA (n=18) AC (n=9) CC (n=1)	52,9 26,5 20,6	A= 0,66 C= 0,34
<i>KLF1</i>	rs2072597 A>G	GA (n=3) GG (n=21)	12,5 87,5	A= 0,06 G= 0,94
<i>KLF10</i>	rs3191333 G>A	GG (n=19) GA (n=13) AA (n=2)	55,9 38,2 5,9	G= 0,75 A= 0,25

4.1.2 Comparação da média dos níveis de HbF entre os genótipos de cada SNP em pacientes beta talassêmicos.

O teste de Mann-whitney foi aplicado para determinar se existem diferenças significativas entre a distribuição dos níveis de HbF de acordo com a presença da mutação para cada uma das variantes investigadas (rs1867380, rs3751395, rs9376173, rs2072597 e rs3191333). A tabela 3 revela que houve diferença significativa dos níveis de HbF para as variantes rs3751395 (*FLT1*) e rs9376173 (*PDE7B*), quando comparado o genótipo homocigoto selvagem com o genótipo heterocigoto e mutante, demonstrando uma maior média dos níveis de HbF nos homocigotos selvagens dessas variantes. A variante do gene *AQP9* (rs1867380) apresentou apenas o genótipo GG (selvagem) na população investigada, e a variante rs2072597 (*KLF1*) não apresentou o genótipo AA (selvagem).

Tabela 3. Comparação dos níveis de HbF entre a combinação genotípica.

Locus	SNP/genótipo	N	Mean rank	Mann–Whitney U	P
<i>FLT1</i>	rs3751395				
	AA	12	23,13	40.500	0,002
	CA+CC	20	12,53		
<i>PDE7B</i>	rs9376173				
	AA	18	21,03	80.500	0,028
	CA+CC	16	13,53		
<i>KLF1</i>	rs2072597				
	GA	3	8,67	20.000	0,314
	GG	21	13,05		
<i>KLF10</i>	rs3191333				
	GG	19	20,00	95.000	0,099
	GA+AA	15	14,33		

4.1.3 Associação dos níveis de HbF com as variantes investigadas no loci *AQP9*, *FLT1*, *PDE7B*, *KLF1* e *KLF10* nos pacientes com β -talassemia.

Foi realizada uma análise de regressão linear múltipla para buscar possíveis associações das variantes investigadas com os aumentos de HbF nos pacientes com β -talassemia. A análise das variantes rs3751395 (*FLT1*) e rs9376173 (*PDE7B*) resultou em um modelo estatisticamente significativo, no qual foi observado uma associação positiva entre o alelo A e os níveis de HbF, em que a presença desse alelo aumenta os níveis de HbF dos pacientes beta talassêmicos. A presença do alelo selvagem na variante rs3751395 ($\beta = 0,596$; $t = 3,948$; $p < 0,001$) e na variante rs9376173 ($\beta = 0,407$; $t = 2,522$; $p = 0,017$) pode estar associado ao aumento dos níveis de HbF entre os pacientes beta talassêmicos, conforme observado na Tabela 4. Para as demais variantes não foram observadas associações estatisticamente significativas.

Tabela 4. Associação dos níveis de HbF com as variantes investigadas no presente estudo (regressão linear múltipla).

Chr	Gene	SNP	Mudança Alélica	*Frequência alélica	**Beta	Erro padrão	Variância explicada	P
13	<i>FLT1</i>	rs3751395	A>C	0,67 (A)	0,596	0,154	35,5%	<0,001
06	<i>PDE7B</i>	rs9376173	A>C	0,66 (A)	0,407	0,162	16,6%	0,017
19	<i>KLF1</i>	rs2072597	A>G	0,94 (G)	-0,186	0,297	3,5%	0,385
08	<i>KLF10</i>	rs3191333	G>A	0,25 (A)	-0,117	0,370	1,4%	0,508

* Frequência alélica: frequência encontrada no presente estudo.

**Beta: coeficiente de correlação.

4.1.4 Associação das variantes nos genes *AQP9*, *FLT1*, *PDE7B*, *KLF1* e *KLF10* com a clínica dos pacientes com β -talassemia.

Dos 30 pacientes beta talassêmicos, 18 (60,0%) eram portadores de mutações beta-talassêmicas do tipo β^+ ou β^+/β^+ , 11 (36,7%) portadores de mutações do tipo β^0 ou β^0/β^0 e um indivíduo (3,3%) do tipo β^0/β^+ . Do total, 28 foram classificados clinicamente e dois não tinham classificação quanto à clínica, sendo 21/28 (75,0%) classificados como β -talassemia menor, 5/28 (17,9%) como β -talassemia intermediária e 2/28 (7,1%) como β -talassemia maior.

O teste do qui-quadrado utilizado na investigação da associação entre as combinações genotípicas das variantes e a clínica dos pacientes com β -talassemia, não apresentou significância estatística. Entretanto, foi observado que as variantes rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*) e rs3191333 (*KLF10*) apresentaram uma maior frequência dos genótipos selvagens nos indivíduos classificados com clínica mais branda – talassemia menor, conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 5. Associação entre os genótipos das variantes rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*) e a clínica do pacientes com β -talassemia.

GENÓTIPO PARA CADA VARIANTE	CLASSIFICAÇÃO DA CLÍNICA			TOTAL	*p valor
	TALMENOR	INTER/MAIOR			
rs3751395 (<i>FLT1</i>)	AA	6 (60,0%)	4 (40%)	10	0,278
	AC+CC	15 (78,9%)	4 (21,1%)	19	
rs9376173 (<i>PDE7B</i>)	AA	11 (73,3%)	4 (26,7%)	15	0,916
	AC+CC	12 (75,0%)	4 (25,0%)	16	
rs2072597 (<i>KLF1</i>)	GA	3 (100%)	-	3	0,237
	GG	12 (66,7%)	6 (33,3%)	18	
rs3191333 (<i>KLF10</i>)	GG	11 (64,7%)	6 (35,3%)	17	0,183
	GA+AA	12 (85,7%)	2 (14,3%)	14	

*Qui-quadrado

4.2 ANEMIA FALCIFORME

O presente estudo investigou 160 indivíduos HbSS, sendo 84 (52,5%) do sexo feminino e 76 (47,5%) do sexo masculino. A análise da distribuição da idade demonstrou uma média de idade dos pacientes de $21,03 \pm 10,57$ anos.

A média de HbF observada foi de $9,1 \pm 6,5\%$, e o escore de gravidade apresentou média de 0,4 classificando os pacientes com anemia falciforme com fenótipo leve, independente da idade do indivíduo. As manifestações clínicas observadas nos pacientes com anemia falciforme foram crises vaso-oclusivas, algias, acidente vascular encefálico (AVC), síndrome do tórax agudo (STA), edemas, infecções e hepatomegalia, cuja frequências estão apresentadas na Tabela 6, onde é possível observar que as mais frequentes foram as algias em 143/160 (89,4%) pacientes, seguida pela crise vaso-oclusiva em 128/160 (80,0%), e a menos frequente foi o AVC em 4/160 (2,5%).

Tabela 6. Manifestações clínicas nos pacientes com anemia falciforme.

Manifestações clínicas	Frequências observadas	
	NÃO	SIM
Crises vaso-oclusivas	32 (20%)	128 (80%)
Algias	17 (10,6%)	143 (89,4%)
AVC	156 (97,5%)	4 (2,5%)
STA	85 (53,1%)	75 (46,9%)
Edemas	132 (82,5%)	28 (17,5%)
Infecções	119 (74,4%)	41 (25,6%)
Hepatomegalia	124 (77,5%)	36 (22,5%)

De acordo com o levantamento de dados, 20 pacientes (12,5%) estavam em tratamento com hidroxiuréia (HU), e 140 (87,5%) ainda não tinham feito uso do medicamento. Em relação a transfusão de sangue, a maioria dos pacientes foram transfundidos, correspondendo a 78,1% (125/160). Do total dos pacientes investigados 72,5% (116/160) foram classificados com fenótipo de gravidade leve/intermediário e 27,5% (44/160) classificados com fenótipo grave, após análise da calculadora da Gravidade da Doença falciforme (Gráfico 1).

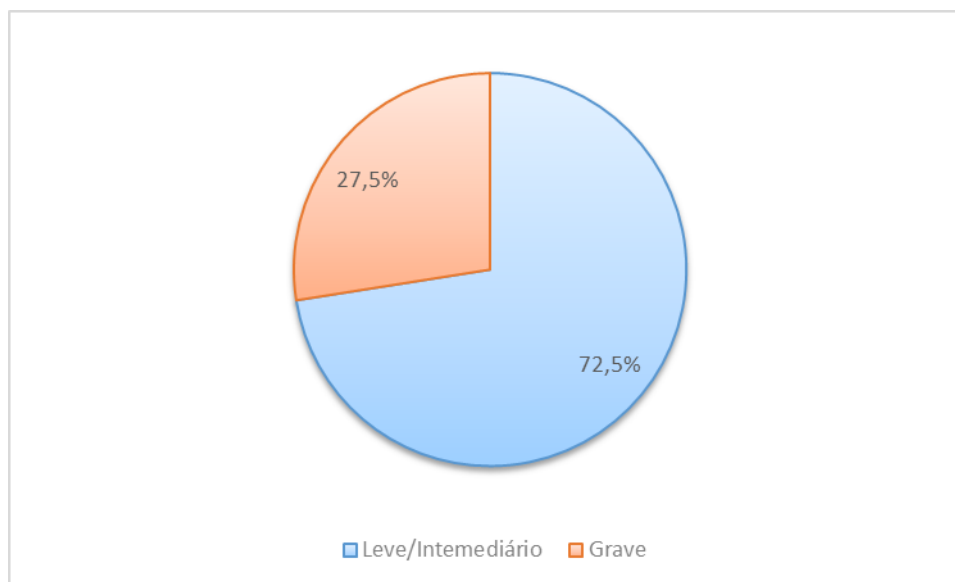


Gráfico 1. Classificação do fenótipo de gravidade de acordo com a Calculadora de Gravidade da Doença falciforme, ferramenta descrita por Sebastiane *et al.* (2007).

4.2.1 Associação da concentração de hemoglobina fetal com os dados laboratoriais e clínicos nos indivíduos com anemia falciforme.

As análises realizadas de acordo com os valores \geq e $<$ a média HbF (8,0%) dos 140 pacientes que não fizeram uso da hidroxiuréia demonstraram associação estatisticamente significativa para a concentração de Hb e Ht, com valores maiores para os indivíduos do grupo com HbF \geq que a média, conforme observado na Tabela 7. Por outro lado, as análises estatísticas para verificar a associação das concentrações diferenciadas de HbF com as manifestações clínicas, não mostraram significância (Tabela 8).

Tabela 7. Associação entre concentração média de HbF e os dados laboratoriais em indivíduos com anemia falciforme.

Dados laboratoriais	HbF<8,0	HbF \geq 8,0	*p
Hb, g/dL	8,1 \pm 1,4	8,4 \pm 1,3	0,046
HbS, (%)	70,4 \pm 17,9	73,8 \pm 12,9	0,624
HT, (%)	22,3 \pm 4,1	23,6 \pm 3,9	0,015
VCM, fL	88,7 \pm 7,7	89,5 \pm 9,3	0,262
HCM, pg	32,4 \pm 4,6	31,6 \pm 3,5	0,177
Plaquetas, x10 ⁹ /L	420,6 \pm 157,3	388,5 \pm 126,1	0,658
TGP, U/L	29,4 \pm 15,4	37,9 \pm 45,8	0,889
TGO, U/L	47,6 \pm 15,5	62,3 \pm 95,8	0,508
Escore de gravidade	0,4 \pm 0,4	0,3 \pm 0,3	0,496

* Mann-Whitney

Tabela 8. Associação entre a concentração média de HbF e os dados clínicos em pacientes com anemia falciforme

Dados clínicos		HbF<8,0	HbF≥8,0	*p
Crises vaso-oclusivas	Não	17 (23,0%)	14 (21,2%)	0,802
	Sim	57 (77,0%)	52 (78,8%)	
Algias	Não	8 (10,8%)	8 (12,1%)	0,935
	Sim	66 (89,2%)	58 (87,9%)	
AVC	Não	73 (98,6%)	1 (1,4%)	0,808
	Sim	65 (98,5%)	1 (1,5%)	
STA	Não	40 (54,1%)	38 (57,6%)	0,675
	Sim	34 (45,9%)	28 (42,4%)	
Edemas	Não	64 (86,5%)	52 (78,8%)	0,069
	Sim	10 (13,5%)	14 (21,2%)	
Infecções	Não	52 (70,3%)	55 (83,3%)	0,228
	Sim	22 (29,7%)	11 (16,7%)	
Hepatomegalia	Não	55 (74,3%)	55 (83,3%)	0,195
	Sim	19 (25,7%)	11 (16,7%)	
Transfusão	Não	13 (17,6%)	20 (30,3%)	0,076
	Sim	61 (82,4%)	46 (69,7%)	
Escore de gravidade	Leve/Intermediário	50 (67,6%)	53 (80,3%)	0,088
	Grave	24 (32,4%)	13 (19,7%)	

*Qui-quadrado

4.2.2 Frequências alélicas e genótípicas das variantes investigadas no loci *AQP9*, *FLT1*, *PDE7TB*, *KLF1* e *KLF10* nos pacientes com anemia falciforme, e suas associações com os parâmetros laboratoriais.

As frequências genótípicas e alélicas para todos os 160 pacientes com anemia falciforme estão detalhados na Tabela 9. Para a análise hematológica foram retirados os que fazem uso de HU, onde foi observada significância estatística para a variante rs3191333 (*KLF10*) quando associada aos valores de VCM e TGP, conforme observado na Tabela 10.

Tabela 9. Frequências genótípicas e alélicas dos SNP's nos genes *AQP9*, *FLT1*, *PD7TB*, *KLF1* e *KLF10*.

SNP's	Genótipo	Frequência genotípica	Frequência alélica	HWE
<i>AQP9</i> rs1867380 G>A	GG (n=126)	90,6%	G=0,9532	$\chi^2=0,3345$ P=0,5630
	GA (n=13)	9,4%	A=0,0468	
<i>FLT1</i> rs3751395 A>C	AA (n=57)	41,6%	A=0,6387	$\chi^2=0,1704$ P=0,6798
	CA (n=61)	44,5%	C=0,3613	
	CC (n=19)	13,9%		
<i>PDE7B</i> rs9376173 A>C	AA (n=51)	36,7%	A=0,6331	$\chi^2=2,9607$ P=0,0853
	AC (n=74)	53,2%	C=0,3669	
	CC (n=14)	10,1%		
<i>KLF1</i> rs2072597 A>G	AA (n=1)	0,8%	A=0,1429	$\chi^2=1,3071$ P=0,2529
	GA (n=34)	27,0%	G=0,8571	
	GG (n=91)	72,2%		
<i>KLF10</i> rs3191333 G>A	GG (n=81)	58,3%	G=0,7626	$\chi^2=0,0060$ P=0,9382
	GA (n=50)	36,0%	A=0,2374	
	AA (n=8)	5,8%		

Tabela 10. Associação das variantes genéticas com os parâmetros laboratoriais.

Parâmetros laboratoriais	AQP9 rs1867380			FLT1 rs3751395			PDE7B rs9376173			KLF1 rs2072597			KLF10 rs3191333		
	GG	GA	*p	AA	AC+ CC	*p	AA	AC+ CC	*p	AA	AG+ GG	*p	GG	GA+ AA	*p
HbF	126 (90,6 %)	13 (9,4%)	0,58 2	57 (41,6 %)	80 (58,4 %)	0,96 2	51 (36,7 %)	88 (63,3 %)	0,25 4	91 (72,2 %)	35 (27,7 %)	0,07 4	81 (58,3 %)	58 (41,7 %)	0,441
Hb	126 (90,6 %)	13 (9,4%)	0,65 4	57 (41,6 %)	80 (58,4 %)	0,52 8	51 (36,7 %)	88 (63,3 %)	0,29 2	91 (72,2 %)	35 (27,7 %)	0,84 9	81 (58,3 %)	58 (41,7 %)	0,824
HbS	117 (90,7 %)	12 (9,3%)	0,23 5	54 (42,5 %)	73 (57,5 %)	0,21 4	46 (35,7 %)	83 (64,3 %)	0,93 7	85 (72,0 %)	33 (28,0 %)	0,72 4	77 (59,7 %)	52 (40,3 %)	0,606
Ht	122 (90,4 %)	13 (9,6%)	0,68 2	55 (41,4 %)	78 (58,6 %)	0,94 5	49 (36,0 %)	87 (64,0 %)	0,57 7	89 (72,4 %)	34 (27,6 %)	0,94 4	81 (59,6 %)	55 (40,4 %)	0,493
VCM	125 (90,6 %)	13 (9,4%)	0,79 3	57 (42,0 %)	79 (58,%)	0,37 5	51 (37,0 %)	87 (63,0 %)	0,05 6	90 (72,0 %)	35 (28,7 %)	0,21 3	81 (58,7 %)	57 (41,3 %)	0,022
HCM	122 (91,0 %)	12 (9,0%)	0,85 2	56 (42,4 %)	76 (57,6 %)	0,12 0	50 (37,3 %)	84 (62,7 %)	0,20 7	87 (71,3 %)	35 (28,7 %)	0,47 0	78 (58,2 %)	56 (41,8 %)	0,360
PLAQUETA S	112 (91,8 %)	10 (8,2%)	0,62 4	49 (40,8 %)	71 (59,2 %)	0,65 8	42 (34,1 %)	81 (65,9 %)	0,35 5	81 (72,3 %)	31 (27,7 %)	0,59 8	70 (56,9 %)	53 (43,1 %)	0,753
TGP	50 (87,7 %)	7 (12,3 %)	0,85 5	21 (36,8 %)	36 (63,2 %)	0,14 1	25 (43,1 %)	33 (56,9 %)	0,64 3	40 (72,7 %)	15 (27,3 %)	0,75 5	34 (58,6 %)	24 (41,4 %)	0,005
TGO	50 (87,7 %)	7 (12,3 %)	0,30 1	21 (36,8 %)	36 (63,2 %)	0,24 7	25 (43,1 %)	33 (56,9 %)	0,65 4	40 (72,7 %)	15 (27,3 %)	0,18 3	34 (58,6 %)	24 (41,4 %)	0,360

* Mann-Whitney

4.2.3 Análise da distribuição das variantes genéticas (rs1867380, rs3751395, rs9376173, rs2072597 e rs3191333) e suas associações com a concentração de hemoglobina fetal e manifestações clínicas.

Apesar das variantes genéticas rs1867380 (AQP9), rs3751395 (FLT1), rs9376173 (PD7TB), rs2072597 (KLF1) e rs3191333 (KLF10) estarem associadas ao nível de HbF em diferentes pesquisas, no presente estudo não foi observada significância estatística dessas variantes em paciente com anemia falciforme (Tabela 11). Esta análise foi realizada de acordo com os valores \geq e $<$ a média HbF (8,0%) dos 140 pacientes que não fizeram uso da hidroxiuréia. Por outro lado, quando as variantes foram associadas as manifestações clínicas (Tabelas

12, 13, 14, 15 e 16) foi observada significância estatística para a variante rs3751395 (*FLT1*), nos quais as algias e crise vaso oclusivas apresentaram $p < 0,05$ com valores maiores em indivíduos com pelo menos um alelo mutante (Tabela 13).

Tabela 11. Associação entre as variantes e a concentração média de HbF em pacientes com anemia falciforme.

Variantes		HbF < 8,0	HbF ≥ 8,0	*p
<i>AQP9</i> rs1867380	GG	65 (89,0%)	61 (92,4%)	0,494
	GA	8 (11,0%)	5 (7,6%)	
<i>FLT1</i> rs3751395	AA	33 (45,8%)	24 (36,9%)	0,290
	AC+ CC	39 (54,2%)	41 (63,1%)	
<i>PDE7B</i> rs9376173	AA	32 (43,2%)	19 (29,2%)	0,087
	AC+ CC	42 (56,8%)	46 (70,8%)	
<i>KLF1</i> rs2072597	AA	52 (77,6%)	39 (66,1%)	0,150
	AG+ GG	15 (22,4%)	20 (33,9%)	
<i>KLF10</i> rs3191333	GG	43 (58,1%)	38 (58,5%)	0,966
	GA+ AA	31 (41,9%)	27 (41,5%)	

*Qui-quadrado

Tabela 12. Associação da variante *AQP9* rs1867380 com as manifestações clínicas da anemia falciforme.

Manifestações clínicas		<i>AQP9</i> rs1867380		*p
		GG	GA	
Algias	NÃO	15 (88,2%)	2 (11,8%)	0,735
	SIM	128 (90,8%)	13 (9,2%)	
Crises vaso-oclusivas	NÃO	28 (87,5%)	4 (12,5%)	0,516
	SIM	115 (91,3%)	11 (8,7%)	
AVC	NÃO	139 (90,3%)	15 (9,7%)	0,512
	SIM	4 (100%)	-	
STA	NÃO	74 (87,1%)	11 (12,9%)	0,111
	SIM	69 (94,5%)	4 (5,5%)	
Infecções	NÃO	103 (88,0%)	14 (12,0%)	0,073
	SIM	40 (97,6%)	1 (2,4%)	
Hepatomegalia	NÃO	109 (88,6%)	14 (11,4%)	0,129
	SIM	34 (97,1%)	1 (2,9%)	
Edemas	NÃO	116 (89,2%)	14 (10,8%)	0,239
	SIM	27 (96,4%)	1 (3,6%)	

*Qui-quadrado

Tabela 13. Associação da variante rs3751395 (*FLT1*) com as manifestações clínicas da anemia falciforme.

Manifestações clínicas		<i>FLT1</i> rs3751395		*p
		AA	AC+ CC	
Algias	NÃO	13 (81,2%)	3 (18,8%)	0,002
	SIM	57 (40,4%)	84 (59,6%)	
Crises vaso-oclusivas	NÃO	21 (70,0%)	9 (30,0%)	0,002
	SIM	49 (38,6%)	78 (61,4%)	
AVC	NÃO	68 (44,4%)	85 (55,6%)	0,825
	SIM	2 (50,0%)	2 (50,0%)	
STA	NÃO	40 (47,6%)	44 (52,4%)	0,412
	SIM	30 (41,1%)	43 (58,9%)	
Infecções	NÃO	57 (49,1%)	59 (50,9%)	0,054
	SIM	13 (31,7%)	28 (68,3%)	
Hepatomegalia	NÃO	54 (44,6%)	67 (55,4%)	0,984
	SIM	16 (44,4%)	20 (55,6%)	
Edemas	NÃO	60 (46,2%)	70 (53,8%)	0,386
	SIM	10 (37,0%)	17 (63,0%)	

*Qui-quadrado

Tabela 14. Associação da variante rs9376173 (*PDE7B*) com as manifestações clínicas da anemia falciforme.

Manifestações clínicas		<i>PDE7B</i> rs9376173		*p
		AA	AC+ CC	
Algias	NÃO	6 (35,3%)	11 (64,7%)	0,741
	SIM	56 (39,4%)	86 (60,6%)	
Crises vaso-occlusivas	NÃO	14 (43,8%)	18 (56,2%)	0,135
	SIM	48 (37,8%)	79 (62,2%)	
AVC	NÃO	59 (38,1%)	96 (61,9%)	0,135
	SIM	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
STA	NÃO	34 (40,5%)	50 (59,5%)	0,685
	SIM	28 (37,3%)	47 (62,7%)	
Infecções	NÃO	49 (41,5%)	69 (58,5%)	0,267
	SIM	13 (31,7%)	28 (68,3%)	
Hepatomegalia	NÃO	45 (36,6%)	78 (63,4%)	0,250
	SIM	17 (47,2%)	19 (52,8%)	
Edemas	NÃO	54 (41,2%)	77 (58,8%)	0,213
	SIM	8 (28,6%)	20 (71,4%)	

*Qui-quadrado

Tabela 15. Associação da variante rs2072597 (*KLF1*) com as manifestações clínicas da anemia falciforme.

Manifestações clínicas		<i>KLF1</i> rs2072597		*p
		AA	AG+ GG	
Algias	NÃO	11 (73,3%)	4 (26,7%)	0,862
	SIM	98 (75,4%)	32 (24,6%)	
Crises vaso-occlusivas	NÃO	23 (79,3%)	6 (20,7%)	0,564
	SIM	86 (74,1%)	30 (25,9%)	
AVC	NÃO	106 (75,2%)	35 (24,8%)	0,533
	SIM	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
STA	NÃO	58 (77,3%)	17 (22,7%)	0,533
	SIM	51 (72,9%)	19 (27,1%)	
Infecções	NÃO	80 (74,8%)	27 (25,2%)	0,849
	SIM	29 (76,3%)	9 (23,7%)	
Hepatomegalia	NÃO	82 (73,9%)	29 (26,1%)	0,513
	SIM	27 (79,4%)	7 (20,6%)	
Edemas	NÃO	90 (75,0%)	30 (25,0%)	0,916
	SIM	19 (76,0%)	6 (24,0%)	

*Qui-quadrado

Tabela 16. Associação da variante rs3191333 (*KLF10*) com as manifestações clínicas da anemia falciforme.

Manifestações clínicas		<i>KLF10</i> rs3191333		*p
		GG	GA+ AA	
Algias	NÃO	12 (70,6%)	5 (29,4%)	0,251
	SIM	79 (56,0%)	62 (44,0%)	
Crises vaso-occlusivas	NÃO	18 (56,2%)	14 (43,8%)	0,863
	SIM	73 (57,9%)	53 (42,1%)	
AVC	NÃO	90 (58,4%)	64 (41,6%)	0,182
	SIM	1 (25,0%)	3 (75,0%)	
STA	NÃO	48 (57,1%)	36 (42,9%)	0,902
	SIM	43 (58,1%)	31 (41,9%)	
Infecções	NÃO	67 (57,3%)	50 (42,7%)	0,887
	SIM	24 (58,5%)	17 (41,5%)	
Hepatomegalia	NÃO	70 (57,4%)	52 (42,6%)	0,919
	SIM	21 (58,3%)	15 (41,7%)	
Edemas	NÃO	76 (58,5%)	54 (41,5%)	0,635
	SIM	15 (53,6%)	13 (46,4%)	

*Qui-quadrado

Após a análise da associação de cada variante com as principais manifestações clínicas, verificou-se a possível associação alélica da variante rs3751395 (*FLT1*) com as manifestações clínicas que apresentaram resultado significativo (Tabela 17). Uma análise univariada de regressão logística simples foi realizada para verificar se a presença dos alelos mutantes na variante possui efeito na clínica. O genótipo homozigoto selvagem da variante rs3751395 (AA) no gene *FLT1* foi considerada como o genótipo de referência (OR=1).

A variante rs3751395 foi associada como fator de risco para algias e crise vaso oclusivas. A frequência do menor alelo (C) foi significativamente ($p < 0,05$) mais elevada no grupo que apresentou algias dos que não apresentaram (97,2% vs 2,8%), assim como no grupo que apresentou crise vaso oclusivas dos que não apresentaram (88,9% vs 11,1%). O genótipo heterozigoto AC individualmente foi associado significativamente com algias, aumentando o risco em 4,7 vezes para desenvolver esta manifestação clínica. O mesmo foi observado para o genótipo

heterozigoto quando associado a crise vaso oclusivas, o qual mostrou que aumenta o risco em 4,4 vezes, conforme observado na Tabela 17.

Tabela 17. Associação dos genótipos da variante rs3751395 no gene FLT1 com as manifestações clínicas algias e crise vaso oclusivas.

rs3751395	Manifestação clínica		p	OR	IC95%
	Algias				
	Sim	Não			
(C)	105 (97,2%)	3(2,8%)	0,000	8,7	(2,56-29,31)
AA	57 (40,4%)	13(81,2%)	0,063	1 (referência)	1,0
AC	63 (44,7%)	3(18,8%)	0,019	4,7	(1,67-29,17)
CC	21 (14,9%)	0	0,999	0	0
	CVO				
	Sim	Não			
(C)	96 (88,9%)	12 (11,1%)	0,009	2,4	1,22-4,80
AA	49 (38,6%)	21 (70%)	0,009	1 (referência)	1,0
AC	60 (47,2%)	6 (20,0%)	0,003	4,4	1,66-12,04
CC	18 (14,2%)	3 (10,0%)	0,163	2,5	0,68-9,68

4.3 HAPLÓTIPOS DO GENE DA β S-GLOBINA.

4.3.1 Análise dos haplótipos ligados ao gene da globina beta e sua associação com a concentração de hemoglobina fetal, e manifestações clínicas nos indivíduos com anemia falciforme.

Os haplótipos ligados ao grupo de genes da β s-globina foram investigados em 156 pares de cromossomos, sendo o mais frequente o haplótipo Bantu, presente em 190/312 (60,9%), seguido pelo Benin em 80/312 (25,6%) (Gráfico 2).

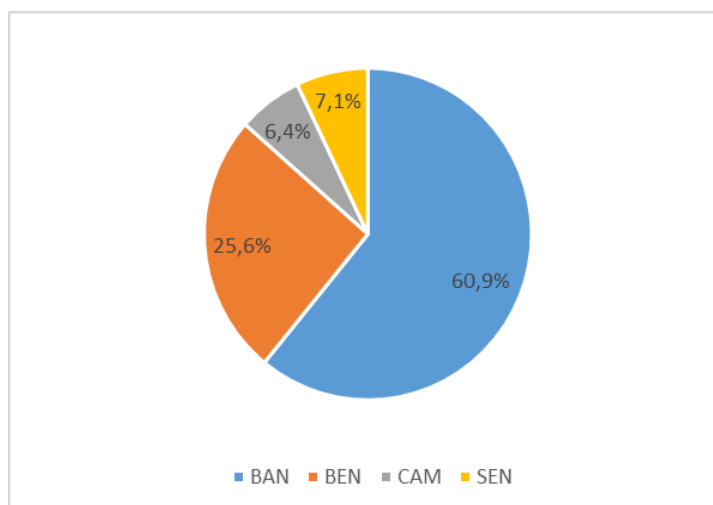


Gráfico 2. Frequência dos haplótipos nos pacientes com anemia falciforme.

Foi feita a combinação haplotípica dos pacientes que não fizeram uso de HU, e a estatística descritiva com intuito de verificar a distribuição genotípica e a média dos níveis de HbF encontrados. Observou-se que o genótipo mais frequente foi o BAN/BAN, seguido do BAN/BEN, conforme observado na Tabela 18.

Tabela 18. Frequência da combinação haplotípica nos pacientes com anemia falciforme.

Combinação haplotípica	N	Frequência (%)	Média de HbF
BAN/BAN	57	41,6%	7,8
BAN/BEM	33	24,1%	8,8
BAN/SEM	8	5,8%	11,7
BAN/CAM	15	11,0%	12,4
BEN/BEM	14	10,2%	8,0
BEN/SEM	7	5,1%	9,5
BEN/CAM	1	0,7%	2,6
SEN/SEM	2	1,5%	5,1

Para verificar associações dos haplótipos com os níveis de HbF foi realizada uma regressão linear multivariada (Tabela 19), a qual mostrou que as combinações haplotípicas BAN/BAN, BAN/SEN e BAN/CAM apresentam significância estatística. O genótipo BAN/BAN está relacionado a diminuição nos níveis de HbF, e os genótipos BAN/SEN e BAN/CAM relacionados com o aumento de HbF.

Tabela 19. Associação da concentração de HbF com a combinação haplotípica.

Combinação haplotípica	Coeficientes não padronizados		Coeficiente Padronizado Beta	Valor de p	IC95%	
	B	Erro padrão			Limite Inferior	Limite superior
BANBAN	-0,116	0,055	-0,176	0,037	-0,224	-0,007
BANBEN	0,087	0,068	0,115	0,205	-0,048	0,221
BANSEN	0,257	0,118	0,186	0,031	0,023	0,490
BANCAM	0,239	0,090	0,231	0,009	0,060	0,417
BENBEN	0,044	0,092	0,041	0,634	-0,139	0,227
BENSEN	0,144	0,125	0,098	0,252	-0,104	0,392
BENCAM	-0,345	0,313	-0,091	0,273	-0,964	0,275
SENSEN	-0,324	0,225	-0,120	0,153	-0,770	0,122

IC, intervalo de confiança

Além disso, foi realizada uma regressão logística multivariada para investigar a associação entre a combinação haplotípica e os níveis de HbF a predisposição aos eventos clínicos (Tabela 20). Para essa análise, foi estabelecido modelos que contemplaram variáveis que poderiam de determinada maneira influenciar na ocorrência da variável dependente. Para cada modelo, a variável dependente foi uma manifestação clínica. Foi observado que os níveis de HbF influenciam no escore de gravidade e para o surgimento de infecções, e o haplótipo BAN/BEN influencia como fator de risco para síndrome do tórax agudo e edemas.

Tabela 20. Análises multivariadas com modelos específicos, associando a concentração de HbF e a combinação haplotípica com variáveis dependentes (manifestações clínicas).

Variáveis	B	S.E.	Wald	p	Exp(B)	IC95% EXP(B)
Modelo 1 – Escore de gravidade						
HbF	- 2,295	0,696	10,860	0,001	0,101	0,026 - ,395
Haplótipo	-	-	4,027	0,855	-	-
Modelo 2 - Crises vaso- oclusivas						
HbF	- 0,628	0,744	0,712	0,399	0,533	0,124 - 2,295
Haplótipo	-	-	3,386	0,847	-	-
Modelo 3 – Algias						
HbF	- 1,002	0,951	1,110	0,292	0,367	0,057 - 2,368
Haplótipo	-	-	0,037	1,000	-	-
Modelo 4 – AVC						
HbF	0,143	2,247	0,004	0,949	1,153	0,014 - 94,378
Haplótipo	-	-	1,018	0,995	-	-
Modelo 5 – STA						
HbF	- 0,086	0,597	0,021	0,885	0,918	0,285- 2,957
Haplótipo BANBEN	2,115	0,912	5,375	0,020	8,289	1,387- 49,542
Modelo 6 – Edemas						
HbF	0,018	0,840	0,000	0,983	1,018	0,196 - 5,281
Haplótipo BANBEN	1,822	0,880	4,291	0,038	6,186	1,103 – 34,689
Modelo 7 – Infecções						
HbF	- 2,615	0,770	11,540	0,001	0,073	0,016 - 0,331
Haplótipo	-	-	3,673	0,826	-	-
Modelo 8 - Hepatomegalia						
HbF	- 0,379	0,728	0,270	0,603	0,685	0,164 - 2,854
Haplótipo	-	-	4,649	0,703	-	-

4.4 PESQUISA DAS VARIANTES GENÉTICAS EM BANCO DE DADOS PÚBLICOS.

As variantes genéticas rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*) foram investigadas em bancos de dados públicos internacionais que disponibilizam informações fundamentais sobre variantes genéticas. O Clinvar, mais comumente aplicado para a análise clínica e patológica de mutações, foi o primeiro banco de dados pesquisado e apresentou apenas a variante rs2072597 (*KLF1*), catalogada em seu banco como uma variante de nucleotídeo único classificada como benigna.

Do total das variantes pesquisadas, no banco de dados gnomAD foram identificadas as variantes rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*) e rs2072597 (*KLF1*). Dessas, apenas a última possui classificação clínica nesse banco de dados e é classificada como benigna, visto que o gnomAD fornece o significado clínico das mutações disponibilizados pelo banco de dados Clinvar. A frequência de cada variante genética em diferentes grupos populacionais – africanos/afro-americanos, latinos, judeus, leste e sul asiáticos, e europeus (finlandeses e não finlandeses) são observadas na Tabela 21.

Tabela 21. Frequência alélica das variantes rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*) e rs2072597 (*KLF1*) no banco de dados gnomAD.

Frequência	rs1867380 (<i>AQP9</i>)	rs3751395 (<i>FLT1</i>)	rs2072597 (<i>KLF1</i>)
Frequência global	0,92	0,53	0,36
Africanos/afro-americanos	0,78	0,64	0,44
Latinos	0,92	0,67	0,37
Judeus	0,96	0,41	0,25
Europeus (finlandeses)	0,94	0,36	0,37
Europeus (não finlandeses)	0,95	0,44	0,30
Leste asiáticos	0,84	0,63	0,61
Sul asiáticos	0,86	-	0,43

As variantes genéticas também foram pesquisadas em banco de dados nacionais (Tabela 22). No banco de dados AbraOM, foram identificadas todas as variantes, as quais apresentaram as seguintes frequências alélicas: rs1867380 frequência de 0,91; rs3751395 frequência de 0,56; rs9376173 frequência de 0,31; rs2072597 frequência de 0,32 e rs3191333 frequência de 0,30. Por outro lado, o

banco de dados SELAdb não identificou a variante presente no gene *PDE7B*. A frequência observada para as demais variantes foram: 0,91 para a variante rs1867380; 0,54 para a variante rs3751395; 0,35 para a variante rs2072597; e 0,31 para a variante rs3191333. Além disso, as frequências alélicas encontradas no presente estudo foram comparadas com as frequências observadas nos bancos de dados públicos investigados nesta pesquisa (Tabela 23).

Tabela 22. Frequência alélica das variantes rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*rs9376173*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*) em banco de dados nacionais.

Variante Genética	AbraOM	SELAdb
<i>AQP9</i>		
rs1867380	0,91	0,91
<i>FLT1</i>		
rs3751395	0,56	0,54
<i>PDE7B</i>		
rs9376173	0,31	-
<i>KLF1</i>		
rs2072597	0,32	0,35
<i>KLF10</i>		
rs3191333	0,30	0,31

Tabela 23. Comparação das frequências alélicas das variantes investigadas no presente estudo e os bancos de dados públicos (gnomAD, AbraOM e SELAdb).

Variante Genética	gnomAD (Latinos)	AbraOM	SELAdb	Presente estudo
<i>AQP9</i>				
rs1867380	0,92	0,91	0,91	0,98
<i>FLT1</i>				
rs3751395	0,67	0,56	0,54	0,65
<i>PDE7B</i>				
rs9376173	-	0,31	-	0,65
<i>KLF1</i>				
rs2072597	0,37	0,32	0,35	0,10
<i>KLF10</i>				
rs3191333	-	0,30	0,31	0,76

4.5 ANÁLISE IN SILICO

Foram selecionados para a análise de patogenicidade as variantes do tipo *missense*: variantes rs1867380 (*AQP9*) e rs2072597 (*KLF1*), as quais foram investigadas mediante análise *in silico* de cinco preditores (FATHMM, SIFT, PROVEAN, POLYPHEN-2 e PANTHER).

A classificação do grau de patogenicidade seguiu os critérios pré-estabelecidos: benigna, quando três ou mais preditores classificou a variante como benigna, provavelmente benigna, neutra e/ou tolerada; patogênica, quando três ou mais preditores classificou a variante como patogênica, provavelmente patogênica e/ou deletéria; e significado incerto, quando pelo menos um preditor não conseguiu analisar a variante e dois a classificaram como patogênica e dois outros a classificaram como benigna ou quando nenhuma predição foi feita por múltiplos preditores. Assim, após análise dos preditores as variantes rs1867380 (*AQP9*) e rs2072597 (*KLF1*) foram classificadas como benignas (Tabela 24).

Tabela 24. Variantes com significado clínico no CLINVAR e sua comparação com o padrão de patogenicidade após análise *in silico* de cinco preditores (FATHMM, SIFT, PROVEAN, POLYPHEN-2 e PANTHER).

Variante genética	FATHMM	PANTHER	SIFT	PROVEAN	POLYPHEN-2	Classificação da Patogenicidade
AQP9 rs1867380	Patogênica	Incerto	Tolerada	Neutra	Benigna	Benigna
KLF1 rs2072597	Tolerada	Provavelmente patogênica	Tolerada	Neutra	Benigna	Benigna

5 DISCUSSÃO

O estudo de variantes genéticas associadas ao aumento dos níveis de HbF tem sido foco de interesse nos últimos anos, na medida em que a indução da síntese de HbF melhora os sintomas clínicos das β -hemoglobinopatias, como a β -talassemia e anemia falciforme (BORG *et al.*, 2010; LETTRE, 2012; He *et al.*, 2018). A diversidade genética em humanos causa a variabilidade interindividual na suscetibilidade a doenças, na resposta ao tratamento e nos resultados clínicos (MARIAN, 2020), nesse sentido, as variantes genéticas podem apresentar diferentes resultados (BORG *et al.*, 2012). No presente estudo observou-se que pacientes da região norte do Brasil diagnosticados com β -hemoglobinopatias apresentaram heterogeneidade em relação aos resultados obtidos na pesquisa das variantes rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*), embora pesquisas comprovem que estas variantes estão associadas ao nível de HbF em β -hemoglobinopatias (MA *et al.*, 2007; SEBASTIANI *et al.*, 2008; ELALFY *et al.*, 2017; HAMID *et al.*, 2018).

Em β -talassêmicos foi observado diferença significativa nos níveis de HbF para as variantes rs3751395 (*FLT1*) e rs9376173 (*PDE7B*). Essas variantes, que são associadas as alterações nos níveis de HbF em indivíduos com AF tratados com hidroxiureia (SALES *et al.*, 2021), no presente estudo mostrou que a presença do alelo selvagem (A), em ambas variantes, possui uma associação positiva para os níveis de HbF em beta talassêmicos: a presença deste alelo aumenta os níveis de HbF, sendo observado em maior frequência em indivíduos com uma clínica mais branda – talassemia menor.

Borg e colaboradores (2012) associam a ausência da variante genética rs3191333 (*KLF10*) ao aumento dos níveis de HbF em indivíduos com β -talassemia intermediária em comparação aos indivíduos com β -talassemia maior e indivíduos sem diagnóstico de talassemia, tornando essa variante um possível biomarcador genético em termos de gravidade da β -talassemia. O presente estudo não corrobora com tal achado, visto que todos os indivíduos beta talassêmicos apresentaram tal variante, não apresentando significância estatística entre essa variante e os níveis de HbF. Os resultados apresentados em relação a

clínica mostraram que o alelo mutante é encontrado com menos frequência nos indivíduos diagnosticados com β -talassemia intermediária.

Os achados de Stratopoulos e colaboradores (2019) relataram que a variante rs3191333 (*KLF10*) é indicativa do resultado clínico da β -talassemia, no qual o genótipo homocigoto mutante apresenta uma frequência genotípica baixa (5%) e uma frequência de 63% para homocigoto selvagem em indivíduos β -talassêmicos. O presente estudo corroborou com tal achado, pois apresentou uma frequência de 5,9% para o genótipo homocigoto mutante e 55,9% para homocigoto selvagem.

Com relação ao gene *KLF1*, Lamsfus-Calle e colaboradores (2020) afirmam que apesar desse gene estar envolvido na repressão de HbF, a análise comparativa de diferentes estratégias de edição de genes indutores de HbF concluiu que esse gene não desempenha um papel importante na clínica. De fato, no presente estudo, a variante rs2072597 não apresentou significância estatística na comparação entre os genótipos e os níveis de HbF em pacientes β -talassêmicos e entre os genótipos e clínica dos pacientes. Entretanto, deve-se ressaltar que o homocigoto selvagem não foi observado nas amostras investigadas, o que pode ser justificado devido baixa amostragem no presente estudo.

Além do mais, foi observado que os parâmetros hematológicos dos pacientes β -talassêmicos demonstram perfil clássico associado a doença. Os níveis de HbA2 e HbF são os primeiros a serem analisados. A medição precisa da HbA2 é a primeira etapa na detecção de portadores de talassemia- β , sendo seus valores aumentados considerados o achado hematológico mais confiável para a identificação de portadores talassêmicos- β (DENIC *et al.*, 2013; WAJCMAN *et al.*, 2017; ALIYEVA, *et al.*, 2018; JIANG *et al.*, 2018; TAMADDONI *et al.*, 2019) e de valor fundamental para distinguir os traços de β e talassemia- α (WAYE, 2015). Os exames laboratoriais no diagnóstico da talassemia- β , em geral, mostram níveis de HbA2 acima de 3,5% como valor de corte para traço beta talassêmico (STEPHENS *et al.*, 2015; TRAEGER-SYNODINOS *et al.*, 2015), o que foi observado neste estudo que apresentou uma média de 4,9% para os níveis de HbA2.

Em portadores β -talassemicos com nível de HbA2 elevado, os níveis de HbF estão geralmente dentro da faixa de normalidade (TRAEGGER-SYNODINOS *et al.*, 2015). No presente estudo, os níveis de HbF apresentaram uma média de 4,8%, valor considerado aumentado em relação à normalidade, o que pode ser justificado devido a presença de variantes de genes não globínicos afetar a transcrição do gene da γ -globina (TRAEGGER-SYNODINOS *et al.*, 2015), conforme foi observado: o alelo selvagem nas variantes rs3751395 (*FLT1*) e rs9376173 (*PDE7B*) podem estar aumentando os níveis de HbF em pacientes β -talassêmicos.

Por outro lado, a pesquisa das variantes em indivíduos diagnosticados com anemia falciforme não apresentou significância estatística associada ao nível de HbF, mas observou-se associação da variante rs3751395 (*FLT1*) com as manifestações clínicas: crise vaso oclusivas e algias, que pode ser explicado devido o gene *FLT1*, também conhecido como receptor-1 do fator de crescimento endotelial vascular, desempenhar um papel fundamental na angiogênese (SHIBUYA, 2011) visto que, um dos antagonistas primários e reguladores da função do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o sFlt-1.

As crises vaso oclusivas em anemia falciforme causam hipóxia tecidual, que conseqüentemente pode ocasionar uma resposta angiogênica rápida com intuito de melhorar o fluxo sanguíneo, e conseqüentemente promover o estímulo para a produção do VEGF (MACHADO *et al.*, 2010). As concentrações de sFlt-1 normalmente acompanham o aumento da concentração de VEGF, porém na anemia falciforme este aumento não é observado, afetando o equilíbrio da angiogênese (MOHAN *et al.*, 2005), prejudicando assim a manutenção da homeostase no organismo dos pacientes, que pode ser observado no presente estudo o qual encontrou associação entre a variante rs3751395 (*FLT1*) e crises vaso oclusivas: o genótipo heterozigoto pode aumentar o risco em 4,4 vezes de desenvolver esta manifestação clínica.

Nos pacientes com anemia falciforme, uma das manifestações clínicas mais frequentes observadas foram as algias, com uma frequência de 89,4%, a qual representa a causa mais comum de procura de emergência por esses pacientes (SOUZA *et al.*, 2020). A variante rs3751395 (*FLT1*) também apresentou

associação como fator de risco para esta manifestação clínica, onde observou-se que o genótipo heterozigoto AC pode aumentar o risco em 4,7 vezes para desenvolver algias. Percebeu-se assim, que as manifestações clínicas mais frequentes observadas no presente estudo (crise vaso oclusivas e algias) estão associadas a variante rs3751395 (*FLT1*), na qual a presença do alelo mutante foi significativamente ($p < 0,05$) mais elevada nos pacientes que apresentaram tais manifestações, sugerindo assim que na região norte do Brasil o alelo mutante desta variante está associada a uma maior gravidade clínica em indivíduos com anemia falciforme.

Apesar do genótipo heterozigoto AC apresentar associação como fator de risco, foi observado que a associação do genótipo mutante com as manifestações clínicas não apresentou significância, o que sugere que deve ocorrer possíveis interações na variante rs3751395 (*FLT1*). Essas interações podem ser do tipo epistasia - efeito de um gene em um fenótipo é modificado por um ou vários genes diferentes - e podem ser classificadas como sinérgicas/aditivas com efeitos positivos, cujos efeitos dos alelos de diferentes loci juntos produzem efeitos fenotípicos mais pronunciados do que o alelo sozinho (STANFILL e STARLARD-DAVENPORT, 2018), conforme observado no presente estudo.

Todas as variantes investigadas também foram associadas aos parâmetros laboratoriais nos pacientes com anemia falciforme, mas apenas a variante rs3191333 (*KLF10*) apresentou significância estatística quando associada aos valores de VCM (volume corpuscular médio) e TGP (transaminase pirúvica) ou ALT (alanina aminotransferase), marcador específico de dano hepático. Os valores observados mostraram que o VCM nos indivíduos com genótipo selvagem apresentaram a média abaixo da normalidade quando comparados aos indivíduos que apresentaram genótipo com pelo menos um alelo mutante (A), os quais estavam com valores dentro da normalidade. Por outro lado, a média observada no índice TGP estavam dentro da normalidade, porém com valores maiores para os genótipos dos indivíduos que apresentaram pelo menos um alelo mutante (A), quando comparado com o genótipo homozigoto selvagem (GG).

Outra análise realizada foi a associação entre a concentração de HbF e os parâmetros laboratoriais em pacientes com anemia falciforme. Ao comparar os

valores desses índices hematimétricos nos grupos de pacientes \geq e $<$ que a média de HbF, foram observados valores maiores no grupo de pacientes com HbF acima da média, e significância na associação com Hb e Ht. Embora tenha sido observado que esses valores estavam aumentados para um dos grupos, a média encontrada estava abaixo do valor de referência, o que pode ser devido esses pacientes ainda não fazerem uso de hidroxiureia, medicamento que promove o aumento do hematócrito e da hemoglobina (BISPO, 2013).

Do total de pacientes com anemia falciforme, a maioria (78,1%) foi classificada com fenótipo de gravidade leve/intermediário, segundo a calculadora de gravidade da anemia falciforme (CGDF) desenvolvida por Sebastiani e colaboradores (2007) e validada por Silva (2020) em amostras de pacientes com anemia falciforme em pacientes da região norte do Brasil. No presente estudo, a média do escore encontrada foi de 0,4, o que sugere que tais pacientes apresentam uma evolução clínica mais branda quando comparada com outros estados do Brasil (BELINI JUNIOR *et al.*, 2015; PURIM, 2017), enfatizando que a existência da grande variedade fenotípica no Brasil é devido a diferente incidência e gravidade clínica observadas nas diferentes regiões do país.

A variabilidade fenotípica em indivíduos com anemia falciforme, que pode ser decorrente da concentração de HbF e presença simultânea de β -talassemia, também têm nos haplótipos um papel relevante na gravidade das manifestações clínicas (STEINBERG *et al.*, 2019), sugerindo que estes podem ser úteis como preditores da gravidade da doença (ZAGO, FIGUEIREDO e OGO, 1992). Neste estudo, observou-se que o haplótipo mais frequente foi o Bantu, presente em 60,9% dos 156 pares de cromossomos investigados nos pacientes com anemia falciforme, seguido pelo tipo Benin, com 25,6%. Este achado corrobora com outras pesquisas que relatam que no Brasil estes haplótipos são os mais prevalentes (FIGUEIREDO *et al.*, 1994; LEMOS e FARIAS GUERREIRO, 2006; (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2013).

Na população de Belém foi observada também a presença dos haplótipos Senegal (7,1%) e Camarões (6,4%). Dados históricos, no Brasil, referentes ao tráfico de escravos procedente da região do Atlântico-Oeste africano, com predominância do haplótipo Senegal mostram maior prevalência no norte do

Brasil (HOLSBACH *et al.*, 2010), e raro ou ausente em amostras de outras regiões brasileiras já estudadas (LEMOS e FARIAS GUERREIRO, 2006). O presente estudo corrobora com tal informação, visto que este haplótipo está de acordo com o esperado.

Percebe-se, então, que a análise dos haplótipos é uma fonte importante para estudos antropológicos em relação a origem étnica de cada população, e colabora para a compreensão da gravidade clínica em indivíduos com anemia falciforme (CABRAL, 2010), visto que os diferentes tipos de haplótipos estão relacionados ao nível de HbF. Os haplótipos Benin e Bantu estão associados a níveis reduzidos de HbF, apresentando uma clínica intermediária (5% a 15% de Hb F) e grave (<5% de HbF), respectivamente. Por outro lado, o haplótipo Senegal está associado com níveis elevados de HbF (>15%) e a um curso clínico mais brando (POWARS, D. *et al.*,1991). Essa variação pode ser explicada pelo achado de que indivíduos com o haplótipo Bantu, sem tratamento, possuem níveis mais baixos de HbF quando comparados aos portadores de outros haplótipos β s nas mesmas condições (NAGEL, 1984).

As combinações haplotípicas mais frequentes observadas foram de homozigose Bantu/Bantu (41,6%), seguida da heterozigose Bantu/Benin com média de 7,8% e 8,8% para os níveis de HbF, respectivamente. Algumas dessas combinações apresentaram associação com a concentração de HbF: o genótipo Bantu/Bantu mostrou relação com a diminuição nos níveis de HbF, e o Bantu/Senegal com o aumento nos níveis de HbF, assim como o genótipo Bantu/Camarões. Os resultados encontrados enfatizam que os haplótipos associados a níveis intermediários e aumentados de HbF melhoram os níveis de HbF nos indivíduos heterozigotos, embora a análise das características de grupos de genótipos formados por haplótipos diferentes seja dificultada em heterozigose (STEINBERG, 1996).

As combinações haplotípicas foram associadas às manifestações clínicas, e o presente estudo apresentou relação do genótipo Bantu/Benin com a síndrome do tórax agudo e edemas. Apesar desse resultado apresentar uma associação significativa devido o haplótipo Bantu estar associada a uma clínica grave, o papel desses genótipos ainda é controverso, pois existe heterogeneidade clínica entre

indivíduos de mesmo haplótipo e em heterozigose, além de outros determinantes genéticos que podem estar associados ao nível de HbF que influenciam diretamente na manifestação clínica em indivíduos com anemia falciforme (HATZLHOFER, 2017), como as variantes genéticas em genes localizados fora do locus do gene da β -globina.

A identificação das variantes genéticas através da utilização dos banco de dados populacionais orientam e apoiam a descoberta de novas relações entre o gene e doença (GUDMUNDSSON *et al.*, 2021). Na população brasileira, existe uma grande variação genética interna, devido sua diferente miscigenação em diversas regiões do país (GIOLO, *et al.*, 2012). Assim, a pesquisa das variantes se torna uma abordagem limitada, visto que algumas populações são sub-representadas em alguns bancos de dados populacionais e as frequências alélicas clinicamente relevantes permanecem não caracterizadas (LERARIO *et al.*, 2020), como foi observado na presente trabalho, ao ser feito a pesquisa das variantes rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*), rs2072597 (*KLF1*) e rs3191333 (*KLF10*) no banco de dados gnomAD.

Lerario e colaboradores (2020) relatam que em banco de dados mais utilizados como o gnomAD há uma sub-representação de diversos indivíduos de origem sul-americana, visto que este banco de dados inclui a população de latinos de forma geral, onde a população brasileira está incluída. O Brasil é altamente miscigenado, com ancestrais provenientes da Europa, África, América e Ásia (NASLAVSKY *et al.*, 2017). Do total das variantes genéticas pesquisadas em indivíduos com β -hemoglobinopatias no norte do Brasil, foram identificadas no banco de dados gnomAD as variantes rs1867380 (*AQP9*), rs3751395 (*FLT1*) e rs2072597 (*KLF1*), que apresentaram frequência alélica global de 0,92, 0,53 e 0,36, respectivamente, e frequência em latinos de 0,92, 0,67 e 0,37, respectivamente. Entretanto, existem variantes genéticas que estão ausentes no gnomAD (GUDMUNDSSON *et al.*, 2021), como foi observado no presente trabalho ao pesquisar as variantes rs9376173 (*PDE7B*) e rs3191333 (*KLF10*) que não foram encontradas nesse banco de dados, embora esse reúna além de sequências de exoma, sequências de genoma completo.

A pesquisa realizada no banco de dados Clinvar mostrou que apenas a variante rs2072597 (*KLF1*) está catalogada, sendo caracterizada como uma variante de nucleotídeo único classificada como benigna. Percebe-se, dessa forma, que embora o Clinvar facilite a busca por informações das variantes genéticas (LANDRUM e KATTMAN, 2018), muitas variantes não são observadas em seu banco de dados, o que pode ser devido a sub-representação de frequências de variantes específicas nas população não-europeias (NASLAVSKY *et al.*, 2021).

Como foi observado, a população brasileira está sub-representada nos bancos de dados genômicos internacionais, que são amplamente disponíveis (LERARIO *et al.*, 2020), como foi observado após pesquisa no gnomAD e Clinvar. Segundo a American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), a análise de indivíduos com ascendência sub-representada será afetada criticamente se depender dos bancos de dados populacionais (NASLAVSKY *et al.*, 2021). Naslavsky e colaboradores (2020) relataram que aproximadamente 2 milhões de variantes identificadas e anotadas no banco de dados brasileiro AbraOM estavam ausentes de grandes bancos de dados públicos, confirmando a sub-representação das populações parentais brasileiras entre os estudos internacionais.

No presente estudo, todas as variantes genéticas investigadas foram encontradas no AbraOM, apresentando as seguintes frequências alélicas: rs1867380 frequência de 0,91; rs3751395 frequência de 0,56; rs9376173 frequência de 0,31; rs2072597 frequência de 0,32 e rs3191333 frequência de 0,30, resultados esses que corroboram com a frequência das variantes encontradas no gnomAD, embora esteja sub-representada nesse banco de dados internacional. O SELAdb, outro banco de dados brasileiro, não apresentou a variante genética presente no gene *PDE7B*. A frequência observada para as variantes nesse último banco de dados foram: 0,91 para a variante rs1867380; 0,54 para a variante rs3751395; 0,35 para a variante rs2072597; e 0,31 para a variante rs3191333, resultados esperados para a população brasileira, conforme observado no AbraOM.

A variante rs9376173 (*PDE7B*) pode não ter sido encontrada no SELAdb devido esse banco de dados representar a prevalência de variantes patogênicas na população da região sudeste do Brasil (LERARIO *et al.*, 2020), e o presente estudo representar parte da população norte do país. Por outro lado, como observado, todas as variantes genéticas investigadas foram encontradas no AbraOM, o qual pode ser justificado em razão desse banco de dados ser representativo da população brasileira de forma mais abrangente, uma vez que armazena dados de frequência de variantes em indivíduos idosos, os quais são menos propensos a abrigar mutações patogênicas de início precoce e adulto (NASLAVSKY *et al.*, 2017).

Dessa forma, percebe-se que conhecer as frequências alélicas de várias populações para distúrbios mendelianos raros como no caso de AF e talassemia é importante para escolha de variantes clínicas (NASLAVSKY *et al.*, 2020). E que os banco de dados brasileiros até o momento existentes, apesar de representarem populações regionais podem facilitar estudos genéticos em indivíduos brasileiros (LERARIO *et al.*, 2020) permitindo comparações com outras pesquisas realizadas em diferentes regiões do país, como observado na presente pesquisa realizada na região norte, a qual apresentou as seguintes frequências alélicas para cada variante investigada: rs1867380 frequência de 0,98; rs3751395 frequência de 0,65; rs9376173 frequência de 0,65; rs2072597 frequência de 0,10 e rs3191333 frequência de 0,76.

As frequências alélicas encontradas nos pacientes com β -hemoglobinopatias apresentaram alguns resultados divergentes quando comparados a frequência observada nos bancos de dados AbraOM e SELAdb, o que pode ser devido ao fato que o número de variantes genéticas varia de acordo com a ancestralidade e pode ser influenciado pela taxa de heterozigidade (GUDMUNDSSON *et al.*, 2021), e que no Brasil o alto grau de miscigenação pode contribuir para combinação particular de variantes raras e comuns (NASLAVSKY *et al.*, 2017). Deve-se considerar que a patogenicidade das variantes depende do contexto e podem ser influenciadas pelas variantes genéticas modificadoras e também de fatores não-genéticos (MARIAN, 2020), e

normalmente, se uma variante é comum em uma população, ela pode ser considerada benigna em todas as populações (GUDMUNDSSON, *et al.*, 2021).

Dentre as evidências para estabelecer o grau de patogenicidade de cada variante são utilizados os preditores *in silico* (Richards *et al.* 2015). No presente estudo, para as variantes missense pesquisadas foram utilizados cinco preditores de patogenicidade *in silico*: FATHMM, SIFT, PROVEAN, POLYPHEN-2 e PANTHER), considerados preditores que apresentam melhor desempenho, segundo Walters-Sen e colaboradores (2015). Dessa forma, foi possível classificar apenas as variantes rs1867380 (AQP9) e rs2072597 (KLF1), que são variantes missenses, e comparar os resultados aos dados disponíveis no Clinvar. Após análise *in silico*, essas variantes foram classificadas como benignas, corroborando com o Clinvar em relação ao resultado encontrado para a variante rs2072597 (KLF1), única variante encontrada nesse banco de dados, do total das cinco variantes pesquisadas.

Dessa forma, foi possível observar que os resultados de diferentes preditores computacionais variam em seus métodos e capacidade de prever a patogenicidade de uma determinada mudança de sequência genética, observando-se uma discordância na identificação do impacto mutacional e patogenicidade (Walters-Sen *et al.*, 2015; PSHENNIKOVA *et al.*, 2019], conforme esperado e observado na análise dos cinco preditores. Deve-se ressaltar que o critério utilizado para classificação da variante no presente estudo (quando pelo menos três programas preditivos tinham a mesma classificação) surgiu com o intuito de reduzir a discrepância dos resultados. Após análise dos preditores as variantes rs1867380 (AQP9) e rs2072597 (KLF1) foram classificadas como benignas, corroborando com Niroula e Vihinen (2019), que enfatizam que as variantes genéticas que ocorrem em altas frequências em uma população são, em sua maioria, classificadas como benignas, uma vez que são toleradas e assim herdadas por gerações, apresentando uma frequência alélica >1%.

Assim, de acordo com o exposto e tendo como base os resultados descritos no presente estudo, é possível deduzir que as variantes genéticas investigadas estão associadas as β -hemoglobinopatias, podendo estar associadas aos níveis de HbF, como as variantes rs3751395 (FLT1), rs9376173

(*PDE7B*) em pacientes com β -talassemia, ou associadas a manifestações clínicas, como a variante rs3751395 (*FLT1*) em pacientes com anemia falciforme. Essa última variante, foi classificada como benigna após análise dos preditores de patogenicidade, corroborando com os resultados encontrados, uma vez que o alelo selvagem dessa variante mostrou uma associação positiva com os níveis de HbF, e o alelo mutante mostrou-se associado como fator de risco para algias e crises vasos oclusivas.

Além disso, em anemia falciforme, a combinação haplotípica BAN/BEN mostrou associação com as manifestações clínicas síndrome do tórax agudo e edemas, e a maioria dos pacientes investigados apresentou fenótipo de gravidade classificado como leve/intermediário. Dessa forma, enfatizamos que embora as β -hemoglobinopatias, estejam entre os distúrbios hereditários mais bem caracterizados, o conhecimento sobre elas ainda é incompleto, visto que apresentam uma rede complexa que interligam marcadores genéticos e as β -hemoglobinopatias, como haplótipos β s, variantes associadas com níveis de HbF e variantes associadas a manifestações clínicas que envolvem interações do tipo epistasia; além de questões sociais, culturais, econômicas e ambientais que em conjunto estão relacionadas a evolução clínica da doença. Assim, o que foi descrito no presente estudo enfatiza que compreender a heterogeneidade específica de cada população é um fator importante para um melhor acompanhamento clínico e tratamento das β -hemoglobinopatias.

6 CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo demonstraram que as variantes genéticas rs3751395 (*FLT1*) e rs9376173 (*PDE7B*) estão associadas as β hemoglobinopatias em pacientes do estado do Pará, podendo estar associadas aos níveis de HbF, como as variantes rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*) em pacientes diagnosticados com β -talassemia, ou associadas às manifestações clínicas, como a variante rs3751395 (*FLT1*) em pacientes com anemia falciforme.

A presença do alelo selvagem (A) nas variantes rs3751395 (*FLT1*), rs9376173 (*PDE7B*) possui uma associação positiva para os níveis de HbF em beta talassêmicos, aumentando os níveis de HbF. Por outro lado, o genótipo heterozigoto (AC) da variante rs3751395 (*FLT1*) foi associada como fator de risco para crises vaso oclusivas e edemas em pacientes com anemia falciforme.

Os pacientes com anemia falciforme, em sua maioria, foram classificados com fenótipo de gravidade leve/intermediário, e possui o haplótipo Bantu como mais frequente. Os genótipos Bantu/Bantu, Bantu/Senegal e Bantu/Camarões apresentaram associação com a concentração de HbF, sendo o Bantu/Bantu relacionado com a diminuição dos níveis de HbF, e Bantu/Senegal e Bantu/Camarões relacionados ao aumento dos níveis de HbF. Em contrapartida o genótipo Bantu/Benin apresentou associação com as manifestações clínicas edema e síndrome do tórax agudo.

A análise *in silico* realizada para classificar o grau de patogenicidade permitiu classificar as variantes missenses rs1867380 (*AQP9*) e rs2072597 (*KLF1*) como benignas. Essas variantes apresentaram na população investigada uma frequência alélica >1%, enfatizando que as variantes genéticas que ocorrem em alta frequência em uma população são, em sua maioria, classificadas como benignas.

As frequências alélicas de cada variante investigada comparada com os resultados dos bancos de dados públicos internacionais e nacionais mostraram que a população brasileira, em particular a população da região norte do Brasil, está sub representada em banco de dados públicos internacionais e diverge em alguns resultados quando comparado a banco de dados nacionais (AbraOM e

SELAdb), uma vez que a população da região norte também é composta por ameríndios.

Portanto, deve-se ressaltar que os resultados encontrados no presente estudo podem contribuir para um melhor entendimento sobre as β -hemoglobinopatias no estado do Pará, contribuindo com o delineamento do perfil genético desses pacientes. Além disso, estes achados precisam ser associados aos fatores não genéticos para um melhor acompanhamento clínico e tratamento dos pacientes β -talassêmicos e com anemia falciforme.

7 REFERÊNCIAS

- ADZHUBEI, Ivan A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature methods**, v. 7, n. 4, p. 248-249, 2010.
- ABIR-AWAN, Mohammed et al. Inhibitors of mammalian aquaporin water channels. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 7, p. 1589, 2019.
- AIKMAN, Brech et al. Aquaporins in cancer development: Opportunities for bioinorganic chemistry to contribute novel chemical probes and therapeutic agents. **Metallomics**, v. 10, n. 5, p. 696-712, 2018.
- ALIYEVA, Gunay et al. Thalassemia in the laboratory: pearls, pitfalls, and promises. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 57, n. 2, p.165-174, 2018.
- ARISHI, Wjdan A.; ALHADRAMI, Hani A.; ZOUROB, Mohammed. Techniques for the Detection of Sickle Cell Disease: A Review. **Micromachines**, v. 12, n. 5, p. 519, 2021.
- BELINI JÚNIOR, Édis. **Determinantes genéticos, bioquímicos e clínicos na resposta ao uso de hidroxiureia na doença falciforme**. Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto, 2014.
- BISPO IMGP. **Avaliação dos parâmetros hematológicos e incidência de episódios decorrentes de vaso oclusão na pessoa com anemia falciforme, antes e depois do tratamento com hidroxiureia**. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. **Doença falciforme: o que se deve saber sobre herança genética** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. **Doença falciforme: diretrizes básicas da linha de cuidado** / Ministério da Saúde, Secretariade Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Orientações para diagnóstico e tratamento das Talassemias Beta** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. – 1. ed., atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.
- BORG, Joseph et al. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Nature genetics**, v. 42, n. 9, p. 801-805, 2010.
- BORG, Joseph et al. Erythroid phenotypes associated with KLF1 mutations. **haematologica**, v. 96, n. 5, p. 635, 2011.

- BORG, Joseph et al. KLF10 gene expression is associated with high fetal hemoglobin levels and with response to hydroxyurea treatment in β -hemoglobinopathy patients. **Pharmacogenomics**, v. 13, n. 13, p. 1487-1500, 2012.
- CABRAL, Cynthia Hatsue Kitayama. Determinação de haplótipos do gene beta S em pacientes com anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 491-492, 2010.
- CHOI Y, SIMS GE, MURPHY S, MILLER JR, CHAN AP. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. **PLoS One**. 2012; 7(10):e46688.
- COLAH, Roshan; GORAKSHAKAR, Ajit; NADKARNI, Anita. Global burden, distribution and prevention of β -thalassemias and hemoglobin E disorders. **Expert Review of Hematology**, v. 3, n. 1, p. 103-117, 2010.
- CUI, Shuaiying; ENGEL, James Douglas. Reactivation of fetal hemoglobin for treating β -thalassemia and sickle cell disease. In: **Gene and Cell Therapies for Beta-Globinopathies**. Springer, New York, NY, 2017. p. 177-202.
- DA SILVA, Paulo Henrique et al. **Hematologia laboratorial: teoria e procedimentos**. Artmed Editora, 2016.
- DE SANCTIS, Vincenzo et al. β -thalassemia distribution in the old world: an ancient disease seen from a historical standpoint. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 9, n. 1, 2017.
- DEGANDT, Simon et al. Evaluation of four hemoglobin separation analyzers for hemoglobinopathy diagnosis. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 32, n. 1, p. e22224, 2018.
- DEMIRCI, Selami; LEONARD, Alexis; TISDALE, John F. Genome editing strategies for fetal hemoglobin induction in beta-hemoglobinopathies. **Human molecular genetics**, v. 29, n. R1, p. R100-R106, 2020.
- DENIC, Srdjan et al. Hemoglobin A2 lowered by iron deficiency and α -thalassemia: should screening recommendation for β -thalassemia change?. **ISRN hematology**, v. 2013, 2013.
- DEVILLE, Marie-Alice et al. Disruption of the mechanism of long range activation within the human α -globin complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 21, p. 21793-21801, 2004.
- DOS SANTOS, André Mauricio Ribeiro. **Variabilidade genética humana: aplicações populacionais, funcionais e médicas**. Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará. Belém, 2018.
- DRISS, A. et al. Sickle cell disease in the post genomic era: a monogenic disease with a polygenic phenotype. **Genomics insights**, v. 2, p. GEI. S2626, 2009.
- EATON, William A.; BUNN, H. Franklin. Treating sickle cell disease by targeting HbS polymerization. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 129, n. 20, p. 2719-2726, 2017.
- ELALFY, Mohsen S. et al. Klf10 gene, a secondary modifier and a pharmacogenomic biomarker of hydroxyurea treatment among patients with hemoglobinopathies. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 39, n. 3, p. e155-e162, 2017.

- EXCOFFIER, Laurent; LISCHER, Heidi EL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.
- FARD, Ali Dehghani et al. Evaluation of novel fetal hemoglobin inducer drugs in treatment of β -hemoglobinopathy disorders. **International journal of hematology-oncology and stem cell research**, v. 7, n. 3, p. 47, 2013.
- FIGUEIREDO, M. S. et al. The heterogeneity of the beta s cluster haplotypes in Brazil. **Gene geography: a computerized bulletin on human gene frequencies**, v. 8, n. 1, p. 7-12, 1994.
- FU, Xiang-Hui; LIU, De-Pei; LIANG, Chih-Chuan. Chromatin structure and transcriptional regulation of the β -globin locus. **Experimental cell research**, v. 278, n. 1, p. 1-11, 2002.
- GIOLO, Suely R. et al. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. **European Journal of Human Genetics**, v. 20, n. 1, p. 111-116, 2012.
- GRAVIA, Aikaterini et al. Correlation of SIN3A genomic variants with β -hemoglobinopathies disease severity and hydroxyurea treatment efficacy. **Pharmacogenomics**, v. 17, n. 16, p. 1785-1793, 2016.
- GNANAPRAGASAM, Merlin Nithya et al. Survey and evaluation of mutations in the human KLF1 transcription unit. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.
- GOLDMAN, Lee; SCHAFER, Andrew I. Goldman-Cecil Medicina: Adaptado à realidade brasileira. 25ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.
- GUDMUNDSSON, Sanna et al. Variant interpretation using population databases: lessons from gnomAD. **Human mutation**, 2021.
- HAMID, Mohammad et al. Mutation screening of the Krüppel-like factor 1 gene in individuals with increased fetal hemoglobin referred for hemoglobinopathy investigation in south of Iran. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 40, n. 3, p. 192-195, 2018.
- HATZLHOFER, B.L.D. **Influência dos haplótipos β s e da alfa talassemia no perfil clínico da anemia falciforme em Pernambuco, Brasil**. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Genética). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2017.
- HE, Yunyan et al. ARHGAP18 is a novel gene under positive natural selection that influences HbF levels in β -thalassaemia. **Molecular genetics and genomics**, v. 293, n. 1, p. 207-216, 2018.
- HESHUSIUS, Steven et al. Epigenomic analysis of KLF1 haploinsufficiency in primary human erythroblasts. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2022.
- HETMAN, J. M. et al. Cloning and characterization of PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 1, p. 472-476, 2000.
- HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia de Hoffbrand**. Artmed Editora, 2018.
- HOLSBACH, Denise Rodrigues et al. Investigação bibliográfica sobre a hemoglobina S de 1976 a 2007. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 23, p. 119-124, 2010.
- IVALDI, Giovanni et al. HbA2 measurements in β -thalassemia and in other conditions. **Thalassemia Reports**, 2014.

- JAING, Tang-Her et al. Molecular genetics of β -thalassemia: A narrative review. **Medicine**, v. 100, n. 45, 2021.
- JEYASEELAN, Kandiah et al. Aquaporins: a promising target for drug development. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 10, n. 6, p. 889-909, 2006.
- JIANG, Fan et al. Analysis of the Genotypes in a Chinese Population with Increased Hb A2 and Low Hematological Indices. **Hemoglobin**, v. 42, n. 3, p. 154-158, 2018.
- JUNIOR, Edis Belini et al. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 54, n. 4, p. 321-327, 2015.
- KATO, Gregory J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-22, 2018.
- KALIA, Sarah S. et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2. 0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. **Genetics in medicine**, v. 19, n. 2, p. 249-255, 2017.
- KARAMPERIS, Kariofyllis et al. Genome-based therapeutic interventions for β -type hemoglobinopathies. **Human Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2021.
- KARCZEWSKI, Konrad J. et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. **Nature**, v. 581, n. 7809, p. 434-443, 2020.
- KOCH, Linda. Exploring human genomic diversity with gnomAD. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 8, p. 448-448, 2020.
- KOHNE, Elisabeth. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. **DeutschesÄrzteblatt International**, v. 108, n. 31-32, p. 532, 2011.
- KOLLIPOULOU, Alexandra et al. Role of genomic biomarkers in increasing fetal hemoglobin levels upon hydroxyurea therapy and in β -thalassemia intermedia: a validation cohort study. **Hemoglobin**, v. 43, n. 1, p. 27-33, 2019.
- KOUNTOURIS, Petros et al. IthaGenes: an interactive database for haemoglobin variations and epidemiology. **PloSone**, v. 9, n. 7, p. e103020, 2014.
- KOUNTOURIS, Petros et al. ITHANET: Information and database community portal for haemoglobinopathies. **bioRxiv**, p. 209361, 2017.
- KUMAR, Prateek; HENIKOFF, Steven; NG, Pauline C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nature protocols**, v. 4, n. 7, p. 1073-1081, 2009.
- LAMSFUS-CALLE, Andrés et al. Comparative targeting analysis of KLF1, BCL11A, and HBG1/2 in CD34+ HSPCs by CRISPR/Cas9 for the induction of fetal hemoglobin. **Scientificreports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.
- LANDRUM, Melissa J. et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D980-D985, 2014.
- LANDRUM, Melissa J.; KATTMAN, Brandi L. ClinVar at five years: Delivering on the promise. **Human mutation**, v. 39, n. 11, p. 1623-1630, 2018.
- LE MOS CARDOSO, Greice; FARIAS GUERREIRO*, João. African gene flow to North Brazil as revealed by HBB* S gene haplotype analysis. **American Journal of Human Biology**, v. 18, n. 1, p. 93-98, 2006.

- LERARIO, Antonio Marcondes et al. SELAdb: A database of exonic variants in a Brazilian population referred to a quaternary medical center in São Paulo. **Clinics**, v. 75, 2020.
- LETTRE, Guillaume. The search for genetic modifiers of disease severity in the β -hemoglobinopathies. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 10, p. a015032, 2012.
- LIU, Dun et al. KLF1 mutations are relatively more common in a thalassemia endemic region and ameliorate the severity of β -thalassemia. **Blood**, v. 124, n. 5, p. 803-811, 2014.
- LIU, Li et al. A case-control genome-wide association study identifies genetic modifiers of fetal hemoglobin in sickle cell disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 7, p. 706-718, 2016.
- MA, Q. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic determinants of response to hydroxyurea. **The pharmacogenomics journal**, v. 7, n. 6, p. 386-394, 2007.
- MACHADO, P.D.C. et al. O VEGF na doença falciforme: Revisão de Literatura. **Revista De Ciências Médicas E Biológicas**, 9(1), 83–88, 2010.
- MARTINS, Michelle Freitas. Caracterização clínica, hematológica e molecular dos adultos com β talassemia no Ceará. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2010.
- MARIAN, Ali J. Clinical interpretation and management of genetic variants. **Basic to Translational Science**, v. 5, n. 10, p. 1029-1042, 2020.
- METTANANDA, Sachith; HIGGS, Douglas R. Molecular basis and genetic modifiers of thalassemia. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 32, n. 2, p. 177-191, 2018.
- MI, Huaiyu; MURUGANUJAN, Anushya; THOMAS, Paul D. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D377-D386, 2013.
- MCKENNA, Aaron et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome research**, v. 20, n. 9, p. 1297-1303, 2010.
- MOHAN, J. S. et al. The angiopoietin/Tie-2 system in proliferative sickle retinopathy: relation to vascular endothelial growth factor, its soluble receptor Flt-1 and von Willebrand factor, and to the effects of laser treatment. **British journal of ophthalmology**, v. 89, n. 7, p. 815-819, 2005.
- NASLAVSKY, Michel Satya et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Human mutation**, v. 38, n. 7, p. 751-763, 2017.
- NASLAVSKY, Michel et al. Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil). 2020.
- NASLAVSKY, Michel S. et al. Biased pathogenic assertions of loss of function variants challenge molecular diagnosis of admixed individuals. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2021. p. 357-363.
- NGO, Duyen A.; STEINBERG, Martin H. Genomic approaches to identifying targets for treating β hemoglobinopathies. **BMC medical genomics**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2015.

- NIROULA, Abhishek; VIHINEN, Mauno. How good are pathogenicity predictors in detecting benign variants?. **PLoS computational biology**, v. 15, n. 2, p. e1006481, 2019.
- OMORI, Kenji; KOTERA, Jun. Overview of PDEs and their regulation. **Circulation research**, v. 100, n. 3, p. 309-327, 2007.
- OLIVEIRA, Leandro Gustavo de; KARUMANCHI, Ananth; SASS, Nelson. Pré-eclâmpsia: estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, p. 609-616, 2010.
- ORIGA, Raffaella. β -Thalassemia. **Genetics in Medicine**, v. 19, n. 6, p. 609-619, 2017.
- PARADOWSKA-GORYCKA, Agnieszka et al. FLT-1 gene polymorphisms and protein expression profile in rheumatoid arthritis. **PloSone**, v. 12, n. 3, p. e0172018, 2017.
- PAPADOPOULOS, Petros et al. Mild dyserythropoiesis and β -like globin gene expression imbalance due to the loss of histone chaperone ASF1B. **Human genomics**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2020.
- PERKINS, Andrew et al. Krüppeling erythropoiesis: an unexpected broad spectrum of human red blood cell disorders due to KLF1 variants. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 127, n. 15, p. 1856-1862, 2016.
- PIEL, Frédéric B. The present and future global burden of the inherited disorders of hemoglobin. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 30, n. 2, p. 327-341, 2016.
- PSHENNIKOVA, Vera G. et al. Comparison of predictive in silico tools on missense variants in GJB2, GJB6, and GJB3 genes associated with autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A). **The Scientific World Journal**, v. 2019, 2019.
- PURIM, C. **Caracterização clínica e demográfica de pacientes com doença falciforme acompanhados na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM**. Dissertação de mestrado (Programa de pós graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia). Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2017.
- RICHARDS, Sue et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in medicine**, v. 17, n. 5, p. 405-423, 2015.
- RISOLUTI, Roberta et al. Innovative screening test for the early detection of sickle cell anemia. **Talanta**, v. 219, p. 121243, 2020.
- RODRIGUES, Juliana Carla Gomes et al. Identification of NUDT15 gene variants in Amazonian Amerindians and admixed individuals from northern Brazil. **PloSone**, v. 15, n. 4, p. e0231651, 2020.
- SALES, Rahyssa Rodrigues et al. Do Genetic Polymorphisms Affect Fetal Hemoglobin (HbF) Levels in Patients With Sickle Cell Anemia Treated With Hydroxyurea? A Systematic Review and Pathway Analysis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 779497-779497, 2021.
- SANKARAN, Vijay G.; ORKIN, Stuart H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 1, p. a011643, 2013.

- SATTA, Stefania et al. Changes in HbA2 and HbF in alpha thalassemia carriers with KLF1 mutation. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 64, p. 30-32, 2017.
- SEBASTIANI, Paola et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Bayesian modeling of genetic associations. **American journal of hematology**, v. 83, n. 3, p. 189-195, 2008.
- SHAFIQUE, F. et al. Thalassemia, a human blood disorder. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2021.
- SHIBUYA, Masabumi. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 33, n. 4, p. 409-420, 2001.
- SHIBUYA, Masabumi. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 9, n. 4, p. 225-230, 2006.
- SHIBUYA, Masabumi. Involvement of Flt-1 (VEGF receptor-1) in cancer and preeclampsia. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 87, n. 4, p. 167-178, 2011.
- SHIHAB, Hashem A. et al. Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. **Human mutation**, v. 34, n. 1, p. 57-65, 2013.
- SIATECKA, Mirosława; BIEKER, James J. The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. **Blood**, v. 118, n. 8, p. 2044-2054, 2011.
- SILVA, Aylla NLM et al. The spectrum of β -thalassemia mutations in a population from the Brazilian Amazon. **Hemoglobin**, v. 40, n. 1, p. 20-24, 2016.
- SILVA, A.N.L.M. **Determinantes genéticos associados à evolução clínica da anemia falciforme em pacientes do estado do Pará**. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2020.
- SOUZA, Rhalliete et al. O enfrentamento do tratamento da doença falciforme: desafios e perspectivas vivenciadas pela família. **Enfermería Actual de Costa Rica**, n. 39, p. 27-37, 2020.
- STAMATOYANNOPOULOS, George. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. **Experimental hematology**, v. 33, n. 3, p. 259-271, 2005.
- STANFILL, Ansley Grimes; STARLARD-DAVENPORT, Athena. Primer in genetics and genomics, Article 7—Multifactorial concepts: Gene–gene interactions. **Biological Research For Nursing**, v. 20, n. 3, p. 359-364, 2018.
- STEINBERG, M. H et al. A β -globin gene haplotype in Hb SC disease. **American Journal. Hematology**, v. 52, p. 189-191, 1996.
- STEINBERG, Martin H.; ADEWOYE, Adeboye H. Modifier genes and sickle cell anemia. **Current opinion in hematology**, v. 13, n. 3, p. 131-136, 2006.
- STEINBERG, Martin H. et al. Sickle cell disease in the era of precision medicine: looking to the future. **Expert review of precision medicine and drug development**, v. 4, n. 6, p. 357-367, 2019.
- STEPHANOU, Coralea et al. Genetic modifiers at the crossroads of personalised medicine for haemoglobinopathies. **Journal of clinical medicine**, v. 8, n. 11, p. 1927, 2019.

- STEPHENS, A. D. et al. ICSH recommendations for assessing automated high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis equipment for the quantitation of HbA2. **International journal of laboratory hematology**, v. 37, n. 5, p. 577-582, 2015.
- STRATOPOULOS, Apostolos et al. Genomic variants in members of the Krüppel-like factor gene family are associated with disease severity and hydroxyurea treatment efficacy in β -hemoglobinopathies patients. **Pharmacogenomics**, v. 20, n. 11, p. 791-801, 2019.
- SUBRAMANIAM, Malayannan et al. Functional role of KLF10 in multiple disease processes. **Biofactors**, v. 36, n. 1, p. 8-18, 2010.
- TAGHAVIFAR, Forough; HAMID, Mohammad; SHARIATI, Gholamreza. Gene expression in blood from an individual with β -thalassemia: An RNA sequence analysis. **Molecular genetics&genomic medicine**, v. 7, n. 7, p. e00740, 2019.
- TAHER, Ali T.; WEATHERALL, David J.; CAPPELLINI, Maria Domenica. Thalassaemia. **The Lancet**, v. 391, n. 10116, p. 155-167, 2018.
- TALLACK, Michael R.; PERKINS, Andrew C. Three fingers on the switch: Krüppel-likefactor 1 regulation of γ -globin to β -globin gene switching. **Current opinion in hematology**, v. 20, n. 3, p. 193-200, 2013.
- TAMADDONI, Ahmad et al. Krüppel-Like Factor 1 Gene Mutations in Thalassemia Patients from North Iran: Report of a New Mutation Associated with β -Thalassemia Intermedia. **Hemoglobin**, p. 1-6, 2019.
- TESSE, Angela et al. Ablation of aquaporin-9 ameliorates the systemic inflammatory response of Lps-induced endotoxic shock in mouse. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 435, 2021.
- THEIN, Swee Lay. Genetic modifiers of beta-thalassemia. **haematologica**, v. 90, n. 5, p. 649-660, 2005.
- THEIN, Swee Lay. The molecular basis of β -thalassemia. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 5, p. a011700, 2013.
- THEIN, Swee Lay. Genetic association studies in β -hemoglobinopathies. **Hematology 2013, the American Society of Hematology Education Program Book**, v. 2013, n. 1, p. 354-361, 2013.
- THEIN, Swee Lay. Genetic basis and genetic modifiers of β -Thalassemia and sickle cell disease. In: **Gene and Cell Therapies for Beta-Globinopathies**. Springer, New York, NY, 2017. p. 27-57.
- THEIN, Swee Lay. Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, p. 54-65, 2018.
- THOMAS, Paul D. et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. **Genome research**, v. 13, n. 9, p. 2129-2141, 2003.
- TRAEGER-SYNODINOS, Joanne et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecularand haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of thehaemoglobinopathies. **European Journal of Human Genetics**, v. 23, n. 4, p. 426, 2015.
- VINJAMUR, Divya S.; BAUER, Daniel E.; ORKIN, Stuart H. Recent progress in understanding and manipulating haemoglobin switching for the haemoglobinopathies. **British journal of haematology**, v. 180, n. 5, p. 630-643, 2018.

- VOON, Hsiao Phin Joanna; VADOLAS, Jim. Controlling α -globin: a review of α -globin expression and its impact on β -thalassemia. **Haematologica**, v. 93, n. 12, p. 1868-1876, 2008.
- WAJCMAN, H. et al. Hemoglobinopathy testing: the significance of accuracy and pitfalls in HbA2 determination. **International journal of laboratory hematology**, v. 39, n. 1, p. e23-e27, 2017.
- WALTERS-SEN, Lauren C. et al. Variability in pathogenicity prediction programs: impact on clinical diagnostics. **Molecular genetics & genomic medicine**, v. 3, n. 2, p. 99-110, 2015.
- WANG, Xunde; THEIN, Swee Lay. Switching from fetal to adult hemoglobin. **Nature genetics**, v. 50, n. 4, p. 478, 2018.
- WATSON, C. J. Fundamental and clinical aspects of hemoglobin and bile pigment metabolism. **Boletín de la Asociación Médica de Puerto Rico**, v. 40, n. 3, p. 83-89, 1948.
- WAYE, John S.; CHUI, David HK. The alpha-globin gene cluster: genetics and disorders. **Clinical and investigative medicine**, v. 24, n. 2, p. 103-109, 2001.
- WAYE, J. S.; ENG, B. Krüppel-like factor 1: hematologic phenotypes associated with KLF1 gene mutations. **International journal of laboratory hematology**, v. 37, p. 78-84, 2015.
- WEATHERALL, David J. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 115, n. 22, p. 4331-4336, 2010.
- WIEL, Laurens et al. MetaDome: Pathogenicity analysis of genetic variants through aggregation of homologous human protein domains. **Human Mutation**, v. 40, n. 8, p. 1030-1038, 2019.
- WU, Tongde et al. Krüppel like factor 10 prevents intervertebral disc degeneration via TGF- β signaling pathway both in vitro and in vivo. **Journal of orthopaedic translation**, v. 29, p. 19-29, 2021.
- YAHOUÉDÉHOU, SètonjiCocouModesteAlexandre et al. Hydroxyurea in the management of sickle cell disease: pharmacogenomics and enzymatic metabolism. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 18, n. 6, p. 730-739, 2018.
- ZAGO, M. A.; FIGUEIREDO, M. S.; OGO, S. H. Bantu β S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 88, n. 3, p. 295-298, 1992.
- ZAGO, M. A.; SILVA PINTO, A. C. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, n.3, p.207-214, 2007.
- ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. In: COSTA, F. F.; CONRAN, N.; FERTRIN, K. Y. **Anemia Falciforme**. 1ªed. São Paulo: Atheneu. cap 27, p. 205–223, 2013.