



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Análise in silico e diversidade genética e populacional em variantes dos genes *SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1* associados ao metabolismo da hidroxiuréia em uma população da Amazônia Brasileira.

Carlos Fabrício Pinto de Medeiros

Belém
Dezembro/2025



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Análise *in silico* e diversidade genética e populacional em variantes dos genes *SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1* associados ao metabolismo da hidroxiuréia em uma população da Amazônia Brasileira.

Carlos Fabrício Pinto de Medeiros

Tese 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 Farias Guerreiro

Belém

Dezembro/2025

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo
com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará**

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D278a de Medeiros, Carlos Fabrício Pinto.
Análise in sílico e diversidade genética e populacional em
variantes dos genes SLC14A1, SLC14A2 e SLCO1B1 associados
ao metabolismo da hidroxiruéia em uma população da Amazônia
Brasileira. / Carlos Fabrício Pinto de Medeiros. — 2025.
75 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. João Farias Guerreiro
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular, Belém, 2025.

1. Hidroxiruéia. 2. SLC14. 3. SLCO1B1. 4. Bancos de
dados genéticos. 5. População amazônica. I. Título.

CDD 576.5809811

Carlos Fabrício Pinto de Medeiros

Análise *in silico* e diversidade genética e populacional em variantes dos genes *SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1* associados ao metabolismo da hidroxiuréia em uma população da Amazônia Brasileira.

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

Orientador: Prof. Dr. João Farias Guerreiro

Belém (PA), 11 de dezembro de 2025.

Banca Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. João Farias Guerreiro. ICB-UFPA

Prof^a. Dra. Susanne Suely Santos da Fonseca

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

Prof. Dr. Fabiano Cordeiro Moreira

Prof. Dr. Pablo Diego do Carmo Pinto

INSTITUIÇÃO E FONTE FINANCIADORA

- Universidade Federal do Pará (UFPA)
- Instituto de Ciências Biológicas (ICB)
- Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a minha família, a minha mãe Antônia Pinto e ao meu Pai Ronaldo Medeiros pelo apoio e dedicação dados durante a minha vida, ao meu tio Robson Medeiros e sua esposa Lana Santos pelo apoio dado principalmente nos últimos anos e por presentear com meu primo e afilhado André, aos meus avós Otacília e Raimundo Medeiros que assim como os demais membros da minha família foram importantes para a minha criação e formação como pessoa.

Ao meu orientador João Guerreiro pela orientação desde o meu ingresso no mestrado, as professoras Greice Costa e Fernanda Figueiredo pelo suporte e contribuições durante o desenvolvimento da tese.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Humana e Médica Mauro, Adriane e Isabela por suas contribuições e amizade e trocas de ideias durante a trajetória da pós graduação.

Lista de abreviaturas

β	Beta
ABraOM	Arquivo Brasileiro de Online de Mutações
AF	Anemia Falciforme
ExAC	Exome Aggregation Consortium
GnomAD	Genome Aggregation Database
Hb	Hemoglobina
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HU	Hidroxiúreia
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
PROVEAM	Protein Variation Effect Analyzer
FATHHM	Functional Analysis Through Hidden Markov Models
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SLC	Transportador de Solutos
SLCO	Transportador de Solutos Orgânicos
OATP	Polipeptídios Transportadores de Ânions Orgânicos
OCT	Transportador de Cátions Orgânico
OCTN	Transportador de Cátions/Carnitína Orgânico
UTA	Transportador de Ureia A
UTB	Transportador de Ureia B

SUMÁRIO	
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Genes da Família Transportadores de Soluto (Slc)	11
1.1.1 Classificação e Função dos Transportadores SLC.....	11
1.1.2 Transportadores relacionadas à HU.....	12
1.1.3 Genes <i>SLC14A1</i> , <i>SLC14A2</i> e <i>SLCO1B1</i>	13
1.2 βhemoglobinopatias	14
1.3 Hidroxiúrea (HU)	16
1.3.1 Benefícios do Tratamento com HU.....	17
1.3.2 Supressão Medular e Efeitos Adversos	18
1.4 Preditores de Patogenicidade	19
1.4.1 Clinvar.....	19
1.4.2 PolyPhen-2	20
1.4.3 FATHMM	20
1.4.4 SIFT.....	20
1.4.6 PANTHER	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 CAPÍTULO I.....	24
Abstract	25
Introduction	26
Material and Methods	29
Results	30
Discussion.....	34
4 CAPÍTULO II.....	42
Abstract	43
Introduction	44
Material and Methods	46
Results.....	49
Discussion.....	53
5 DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÃO	68
7. REFERENCIAS	70

RESUMO

A hidroxiureia (HU) é um fármaco utilizado no tratamento da anemia falciforme por sua capacidade de induzir a produção de hemoglobina fetal (HbF). Entretanto, a resposta clínica ao medicamento apresenta grande variabilidade entre indivíduos, influenciada por fatores genéticos relacionados ao metabolismo e ao transporte da HU. Nesse contexto, os genes *SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1* desempenham papel relevante na farmacocinética da droga. O presente estudo investigou variantes genéticas nesses genes por meio de análises *in silico* e de genética populacional. Inicialmente, foram selecionadas variantes do tipo missense disponíveis no banco gnomAD e analisadas em diferentes algoritmos de predição de patogenicidade, incluindo PANTHER, PolyPhen-2, FATHMM e SIFT, complementadas por consultas ao Ensembl VEP. Essa etapa identificou variantes com possível impacto funcional sobre as proteínas transportadoras, destacando o potencial das ferramentas *in silico* como triagem prévia em farmacogenômica. Na segunda etapa, foram analisadas quatro variantes específicas: duas no gene *SLC14A1* (rs1058396 e rs2298720), uma no *SLC14A2* (rs9960464) e uma no *SLCO1B1* (rs2291075). Para essas variantes, compararam-se as frequências alélicas em três populações: dados internacionais do gnomAD, a população brasileira do banco AbraOM e uma amostra de exomas da cidade de Belém (N=95). As análises estatísticas incluíram testes de qui-quadrado e exato de Fisher, com correção de Bonferroni, além da estimativa de diferenciação genética por *Fst* no software Arlequin. Os resultados mostraram diferenças significativas nas frequências alélicas entre as populações, sendo a população de Belém mais próxima da africana em alguns loci e mais distante das populações europeias e sul-asiáticas em outros. Esses achados sugerem que a diversidade genética nos genes estudados pode contribuir para diferenças na resposta à HU, destacando a importância de considerar a variabilidade genética brasileira em estudos farmacogenômicos. Assim, este trabalho fornece subsídios relevantes para a compreensão da farmacogenômica da HU e requerendo estudos clínicos que possam esclarecer e ajudar em futuras aplicações em medicina personalizada no tratamento da anemia falciforme.

Palavras-chave: Hidroxiureia; SLC14; *SLCO1B1*; Bancos de dado genético; População amazônica.

ABSTRACT

Hydroxyurea (HU) is a drug used to treat sickle cell anemia due to its ability to induce fetal hemoglobin (HbF) production. However, clinical response to the drug varies greatly among individuals, influenced by genetic factors related to HU metabolism and transport. In this context, the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* genes play a relevant role in the drug's pharmacokinetics. This study investigated genetic variants in these genes through *in silico* and population genetic analyses. Initially, missense variants available in the gnomAD database were selected and analyzed using different pathogenicity prediction algorithms, including PANTHER, PolyPhen-2, FATHMM, and SIFT, complemented by queries to Ensembl VEP. This step identified variants with a possible functional impact on transporter proteins, highlighting the potential of *in silico* tools as prescreening in pharmacogenomics. In the second stage, four specific variants were analyzed: two in the *SLC14A1* gene (rs1058396 and rs2298720), one in *SLC14A2* (rs9960464), and one in *SLCO1B1* (rs2291075). For these variants, allele frequencies were compared in three populations: international data from gnomAD, the Brazilian population from the AbraOM database, and an exome sample from the city of Belém (N=95). Statistical analyses included chi-square and Fisher's exact tests with Bonferroni correction, in addition to the estimation of genetic differentiation by *Fst* in the Arlequin software. The results showed significant differences in allele frequencies between the populations, with the Belém population being closer to the African population at some loci and more distant from the European and South Asian populations at others. These findings suggest that genetic diversity in the genes studied may contribute to differences in response to HU, highlighting the importance of considering Brazilian genetic variability in pharmacogenomic studies. Thus, this work provides relevant insights into the pharmacogenomics of HU and calls for clinical studies that can clarify and inform future personalized medicine applications in the treatment of sickle cell anemia.

Key words: Hydroxyurea; *SLC14A1*; *SLC14A2*; *SLCO1B1*; Genetic databases; Amazonian population.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Genes da Família Transportadores de Solutos (Slc)

1.1.1 Classificação e Função dos Transportadores SLC

A superfamília de transportadores de soluto (SLC), corresponde a segunda maior família de proteínas transportadoras de membrana, sendo a maior a família de transportadores ABC (ATP-binding cassette) (SCHALLER; LAUSCHKE, 2019). Esses transportadores têm função de controlar o fluxo de endobióticos e xenobióticos pela membrana celular, assim como disposição e eliminação, incluindo muitos fármacos ajudando na farmacocinética dessas substâncias (ROTH; OBAIDAT; HAGENBUCH, 2012; WALKER *et al.*, 2013).

A superfamília do SLC é constituída de 65 famílias, apresentando ao todo 465 genes codificadores de proteínas de membrana, que se baseiam nas suas sequências e homologia (SCHALLER; LAUSCHKE, 2019; YEE; GIACOMINI, 2022). Dentre todas as famílias, a *SLC22* é a que apresenta o maior número de membros, sendo agrupados por definição filogenética e de especificidade, contendo atualmente 28 grupos de proteínas de transporte de membrana (YEE; GIACOMINI, 2022). Dentre as 65 famílias, as do *SLC35*, *SLCO1*, *SLCO2* e do *SLCO4* que possuem duas ou mais subfamílias diferentes das outras 61 famílias (HE; VASILIOU; NEBERT, 2009).

As proteínas de membrana codificadas pelos genes *SLC* apresentam diferentes tipos de especificação para o transporte celular, como membros das famílias *SLC4*, *SLC8*, *SLC9*, *SLC34*, que são famílias que atuam como transportadores de íons e cátions inorgânicos. Outras famílias tem função de transporte de glicose e açúcares, outras no transporte de aminoácidos, assim como transporte de íons de metal, aminoácidos e oligopeptídeos, transporte de neurotransmissores, de nucleosídeos e nucleotídeos (HE; VASILIOU; NEBERT, 2009; NAKANISHI, 2007).

Na família *SLC14*, os dois membros, *SLC14A1* e *SLC14A2* são responsáveis pela síntese dos transportadores de ureia, UTB e UTA respectivamente (HE; VASILIOU; NEBERT, 2009; NAKANISHI, 2007). As proteínas da família do gene *SLC22* são responsáveis pelo transporte de ânions e cátions orgânicos e carnitina, e apresentam função importante no metabolismo de fármacos (HE; VASILIOU; NEBERT, 2009; NAKANISHI, 2007; YEE; GIACOMINI, 2022). Os membros da família *SLCO1* que são responsáveis pela síntese dos polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos e

tem importante função no transporte de fármacos e seu metabolismo (HE; VASILIOU; NEBERT, 2009; NAKANISHI, 2007; ROTH; OBAIDAT; HAGENBUCH, 2012).

1.1.2 Transportadores relacionadas à HU

Estudos têm evidenciado a participação de transportadores da família SLC no metabolismo da hidroxiuréia (HU), sendo identificados sete transportadores específicos associados ao transporte desse fármaco. Entre eles, destacam-se dois transportadores de cátions/carnitinas orgânicos (OCTNs): OCTN1, codificado pelo gene *SLC22A4*, e OCTN2, codificado pelo gene *SLC22A5*. Também foram descritos dois transportadores de ureia (UTs): UTA, codificado pelo gene *SLC14A2*, e UTB, pelo gene *SLC14A1*. Além disso, participam três polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs) estão envolvidos: OATP1A2, codificado pelo gene *SLCO1A2*; OATP1B1, pelo gene *SLCO1B1*; e OATP1B3, pelo gene *SLCO1B3* (TAN; MEIER-ABT, 2021; WALKER *et al.*, 2011; WALKER; OFORI-ACQUAH, 2017).

Esses transportadores são bastante distribuídos pelo organismo, principalmente pelos rins e pelo fígado, sendo importantes por modular a farmacocinética da HU (WALKER *et al.*, 2011). Porém, apenas dois dos transportadores relacionados a HU são expressos na medula óssea: o OCTN1 e o UTB, tendo a expressão do UTB sendo em eritrócitos maduros, enquanto OCTN1 tem sua expressão em células mais novas da linhagem hematopoética, como mostrado em estudos de Walker e Ofori-Acquah, 2017.

Tabela 1: Genes da família SLC relacionados ao metabolismo da hidroxiúreia e os respectivos transportadores de membrana codificados por eles.

Gene	Transportador
<i>SLCO1A2</i>	OATP1A2
<i>SLCO1B1</i>	OATP1B1
<i>SLCO1B3</i>	OATP1B3
<i>SLC22A4</i>	OCTN1
<i>SLC22A5</i>	OCTN2
<i>SLC14A1</i>	UTB
<i>SLC14A2</i>	UTA

Alguns estudos mostraram a participação de quatro SNPs em três genes diferentes que tem influência no metabolismo de HU, sendo eles os rs1058396 (GINETE *et al.*, 2023) e rs2298720 (ANGONA *et al.*, 2013; YAHOUÉDÉHOU *et al.*, 2018) do gene *SLC14A1*, o rs9960464 para o gene *SLC14A2* (ANGONA *et al.*, 2013) e o rs2291075 do gene *SLCO1B1* (GINETE *et al.*, 2023).

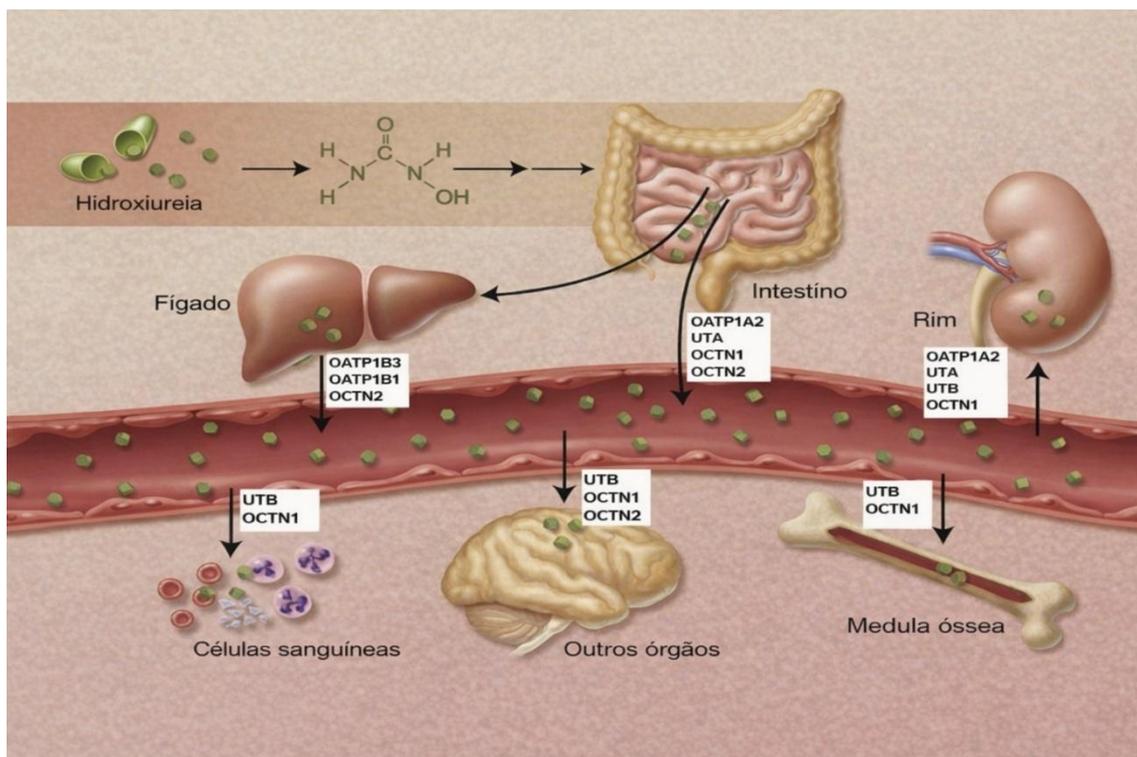


Figura 1. Localização dos transportadores SLC relacionados ao metabolismo da HU (adaptado de WALKER *et al.*, 2011).

1.1.3 Genes *SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1*

O gene *SLC14A1* (*solute carrier Family 14 member 1*) codifica a proteína de membrana transportadora de ureia B (UTB), importante na reabsorção e excreção da ureia nos rins e trato urinário, importante na regulação da concentração de urina (SHAYAKUL; HEDIGER, 2004).

Além de ureia, esses transportadores facilitam os transportes de outras moléculas como metilureia, formamida, metilformamida, acetamida e acrilamida, sendo que esse transporte pode ser inibido pela concentração de phloretin e alguns análogos de ureia

como tioureia e dimetilureia (SHAYAKUL; HEDIGER, 2004; YAHOUÉDÉHOU *et al.*, 2020).

Esse gene está localizado no cromossomo 18 (18q12.3), possui o tamanho de 30 quilobases (kb) com um tamanho de 65,5 quilobases (kb) e possuindo 13 exons. É bastante expresso nos rins, medula óssea, bexiga, cérebro e nas células sanguíneas (WALKER *et al.*, 2011; YAHOUÉDÉHOU *et al.*, 2018)

O gene *SLC14A2* (*solute carrier Family 14 member 2*) codifica uma proteína de membrana transportadora de ureia A (UTA). Devido a processos de *splicing*, esse gene codifica seis isoformas dessa proteína, denominadas de UT-A1 até UT-A6, e tem importância no equilíbrio hídrico do organismo, contribuindo com a concentração de ureia no organismo (GENG *et al.*, 2020; SHAYAKUL; HEDIGER, 2004; SMITH; FENTON, 2006).

Esse gene possui a mesma localização do *SLC14A1* no cromossomo 18 (18q12.3) possuindo 27 exons e com um tamanho de 470,7 kb, é expresso principalmente nos rins (em específico em células do ducto coletor, no ramo descendente das alças de Henle, nos néfrons de alça curta e em segmentos iniciais na medula interna) e no intestino (GENG *et al.*, 2020; SMITH; FENTON, 2006; WALKER *et al.*, 2011).

O gene *SLCO1B1* (*solute carrier organic anion transporter family member 1B1*) codifica a proteína transportadora de ânions orgânicos 1B1 (OATP1B1), e tem grande importância no influxo de substratos para o interior das células, tendo destaque na absorção, distribuição e eliminação de fármacos como estatinas, rifampicina e bromossulfaleína (STEWART, 2013; WU *et al.*, 2021).

O gene está localizado no cromossomo 12 (12p12.1), com o tamanho de 108,6 kb e possuindo 15 exons, sua expressão é predominante em células hepáticas, sendo de grande importância no metabolismo de fármacos (WALKER *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2021).

As variantes rs1058396 e rs2298720 que estão associadas ao gene *SLC14A1*, rs9960464 relacionada à *SLC14A2* e rs2291075 de *SLCO1B1*, foram descritas como tendo relação com o metabolismo da HU e com influência na resposta desse medicamento no tratamento das βhemoglobinopatias (ANGONA *et al.*, 2013; GINETE *et al.*, 2023; YAHOUÉDÉHOU *et al.*, 2020).

1.2 βhemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são distúrbios genéticos e hereditários que alteram a morfologia da hemoglobina, podendo ser citadas a anemia falciforme e as talassemias (RAMALHO; MAGNA; PAIVA-E-SILVA, 2003). Entre as principais formas, destacam-se a anemia falciforme e as talassemias, ambas amplamente estudadas devido à sua relevância clínica e epidemiológica no Brasil e no mundo.

A anemia falciforme (AF) é a doença monogênica hereditária mais comum no Brasil. Ocorre por uma mutação de troca de bases no sexto códon do gene da cadeia beta da hemoglobina, na qual uma adenina é trocada por uma timina (GAG -> GTG), levando à mudança de um ácido glutâmico por uma valina na cadeia polipeptídica (CANÇADO; JESUS, 2007; GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003; MOUSINHO-RIBEIRO *et al.*, 2008). Essa alteração faz com que as hemácias assumam a forma de foice (drepanócitos) quando estão desoxigenadas ou em condições de hipóxia, tornando a superfície celular mais rígida e dificultando a passagem por pequenos vasos sanguíneos, ocasionando obstrução desses vasos (vaso-oclusão) e uma hemólise dessas células, levando a uma anemia hemolítica (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003; ZAGO; PINTO, 2007).

A β talassemia se caracteriza pela redução ou ausência da síntese da cadeia β da hemoglobina, o portador de talassemia pode ser homocigoto ou heterocigoto e pode ter vários níveis de gravidade da doença, sendo a mais grave denominada de talassemia maior, intermediária, e talassemia menor com o quadro mais leve (ROSENFELD *et al.*, 2019; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

Em dados de uma Pesquisa Nacional em Saúde realizada por Rosenfeld e colaboradores, em 2019, sobre prevalência de hemoglobinopatias na população brasileira, analisando dados entre 2014 e 2015, apontou-se que 3,7% da população adulta apresenta algum tipo de hemoglobinopatia, entre as mais comuns estão o traço falciforme e a talassemia (menor e suspeita de talassemia maior), 2,4 % apresentou traço falciforme, 0,8% com suspeita de talassemia maior e 0,3 % com talassemia menor (1,1% com talassemia). Na região norte, foi apontado que 3,1% da população apresenta traço falciforme e 0,6% com talassemia.

Dados do ministério da saúde estimam que existam mais de dois milhões de portadores do gene HbS no Brasil, e que existam entre 25 e 50 mil pessoas com a forma homocigota para a HbS.

Mesmo com o conhecimento amplo sobre a doença não existe um tratamento específico, sendo que é indicado que os pacientes façam acompanhamentos periódicos

com uma equipe multidisciplinar, caso necessite tratar os sintomas e crises quando aparecerem, prevenir e tratar infecções, realização de transfusões sanguíneas quando necessário, controle das crises dolorosas por meio de analgésicos e manter uma boa hidratação (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

Contudo o transplante de medula óssea se mostra como uma alternativa curativa para a doença, porém é indicada em casos que sejam graves e apresenta a dificuldade de encontrar doadores compatíveis (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014). Uma opção terapêutica que é bem utilizada é a terapia com hidroxíúrea (HU), o tratamento com HU proporciona a elevação do nível de HbF na circulação e com seu aumento promove um efeito protetiva em relação a doença, pois diminui a ocorrência da falcização das hemácias e conseqüentemente as manifestações da doença (MOUSINHO-RIBEIRO et al., 2008; NAOUM, 2000; ZAGO; PINTO, 2007).

Diante dessa alta prevalência e do impacto clínico da doença, diversas abordagens terapêuticas têm sido estudadas com o objetivo de reduzir as complicações e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Entre elas, destaca-se o uso da hidroxíúrea (HU), considerada atualmente o principal fármaco no manejo da anemia falciforme.

1.3 Hidroxíúrea (HU)

A Hidroxíúrea é um fármaco utilizado para o tratamento de AF por promover um aumento na concentração dos níveis de HbF, sendo uma droga aprovada para esse tratamento que permite uma melhora nos sintomas da doença.

A HU foi sintetizada pela primeira vez na Alemanha por Dresler e Stein, em 1869. Sendo um agente citotóxico, mutagênico, recombinogênico e antineoplásico, atua como um inibidor de ribonucleotídeo redutase, interferindo, assim, na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, impedindo a divisão celular, atuando principalmente na fase S do ciclo celular (CANÇADO *et al.*, 2009; IYAMU *et al.*, 2005; SILVA; SHIMAUTI, 2006).

A ribonucleotídeo redutase é uma enzima responsável por converter ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos (dNTPs), que servem como blocos para a síntese e reparo do DNA, com a inibição dessa enzima ocorre um esgotamento em reservas de dNTPs intracelulares paralisando a síntese do DNA (HANFT *et al.*, 2000; SHAW *et al.*, 2024).

Em 1967, a HU passou a ser utilizada para o tratamento de síndromes mieloproliferativas, como é o caso da anemia mieloide crônica e a Policitemia vera. Na

década de 1980, passou ser utilizada nos protocolos de tratamento da AF em adultos e, posteriormente, liberada para o uso em crianças. Paralelamente, com a realização de estudos sobre sua eficácia no tratamento, no final da década de 1990, a FDA, nos EUA, aprovou o uso da HU para o tratamento da AF. No Brasil, foi aprovado o uso pela portaria nº 872 do Ministério da Saúde, de 6 de novembro de 2002 (BANDEIRA; PERES; CARVALHO, 2004; CANÇADO *et al.*, 2009; FIGUEIREDO, 2007; SILVA; SHIMAUTI, 2006).

A HU é um fármaco de fácil utilização, sendo administrado por via oral, e apresenta poucos efeitos tóxicos e mielossupressores, facilmente reversíveis (BANDEIRA; PERES; CARVALHO, 2004). É necessário o acompanhamento dos valores hematimétricos para avaliar o nível de supressão medular durante o tratamento, com o objetivo de alcançar a dose máxima tolerada (DMT), que é a maior dose que causa melhores manifestações clínicas sem causar mielosupressão (SILVA; SHIMAUTI, 2006).

1.3.1 Benefícios do Tratamento com HU

A elevação dos níveis de HbF é um dos fatores que se destaca no tratamento da HU em pacientes com AF, porém não é o único benefício que é observado (CANÇADO *et al.*, 2009; DAVIES; GILMORE, 2003). O aumento da HbF reduz a tendência de polimerização da hemoglobina, uma vez que a presença de maior quantidade de HbF em relação à HbS dentro dos eritrócitos dificulta esse processo.

Como consequência a elevação dos níveis de HbF, pode-se observar a diminuição nos processos de polimerização da hemoglobina (uma vez que, apresentando mais HbF que HbS no interior dos eritrócitos, dificulta esse processo), assim como o aumento nos níveis de Hb no sangue, que também leva a um aumento no hematócrito e consequente aumento no volume corpuscular médio (VCM) (DAVIES; GILMORE, 2003). Com menos polimerização das moléculas de Hb, diminui-se o processo de falcização, o que leva a menos hemólises e a consequente diminuição dos níveis de reticulócitos, e a menos episódios de vaso-oclusão (DAVIES; GILMORE, 2003).

A HU apresenta outros benefícios como, promover a hidratação eritrocitária, diminuição dos níveis de neutrófilos; age como doadora de óxido nítrico aumentando sua biodisponibilidade através da ativação da enzima guanilil ciclase e,

consequentemente, aumento de GMP cíclico intraeritrocitário e endotelial (ajudando a promover a vasodilatação e dificultando os processos de vaso-oclusão); reduz a exposição de moléculas de adesão ao endotélio vascular (tais como fosfatidilserina e anexia V), que estão presentes nas membranas dos eritrócitos, plaquetas e leucócitos; além de reduzir os níveis de leucócitos e plaquetas na circulação, diminuindo a viscosidade do sangue, melhorando a circulação e diminuindo os processos de vaso-oclusão (CANÇADO *et al.*, 2009; SILVA; SHIMAUTI, 2006).

Ao analisar a literatura, pode-se verificar que, após o início do tratamento com HU, muitos pacientes apresentam melhoras nos seus quadros clínicos, como diminuição de crises vaso-oclusivas, menos crises álgicas, diminuição de transfusões sanguíneas e consequente redução de internações, como pode ser percebido no estudo clínico realizado por (Bandeira *et al.*, 2004) (Bandeira *et al.*, 2004). Vale ressaltar que em torno de 25% dos pacientes não demonstra resposta ao tratamento com HU (CANÇADO *et al.*, 2009; FIGUEIREDO, 2007). Contudo a HU também apresenta efeitos adversos que podem afetar os pacientes.

1.3.2 Supressão Medular e Efeitos Adversos

Podem ser observados alguns efeitos adversos sendo os mais frequentes. Entre eles dermatológicos como hiperpigmentação das unhas, palmas e plantas dos pés, alopecia, pele seca e ulceração de pelo. Gastrointestinais, náuseas, constipação e vômitos. Neurológicos como letargia, cefaleia, desorientações e alucinações. Renais, sendo elevação sérica de ureia e creatinina.

Em nível hepatológicos com aumento dos níveis de TGO e TGP. Também há efeitos teratogênicos, esses observados apenas em animais (CANÇADO *et al.*, 2009; DAVIES; GILMORE, 2003; FIGUEIREDO, 2007; SILVA; SHIMAUTI, 2006).

Os efeitos na medula são observados por taxas de neutrófilos $< 2 \times 10^9$, hemoglobina $< 4,5$ g/dL, plaquetas $< 80 \times 10^9$ e reticulócitos $< 80 \times 10^9$. A supressão da medula por HU é facilmente reversível após a descontinuação do tratamento, assim como as reações adversas, e devem ser retomadas após a recuperação medular em uma dose menor (CANÇADO *et al.*, 2009; DAVIES; GILMORE, 2003; FIGUEIREDO, 2007; SILVA; SHIMAUTI, 2006).

Uma porcentagem de 25% dos pacientes de anemia falciforme não apresenta resposta ao tratamento com HU, o que pode estar relacionada ao mecanismo de

absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco realizados por transportadores de solutos (SLC) em nível celular, sendo a participação de genes da família *SLC* (do inglês *solute carrier*) os que modulam esses transportadores (WALKER *et al.*, 2013).

Graças ao avanço tecnológico e o sequenciamento do genoma humano, juntamente com o progresso do sequenciamento de nova geração (NGS), muitos desses genes estão disponíveis em bancos de dados genéticos e que permitem um acesso a dados genéticos de várias populações pelo mundo.

1.4 Preditores de Patogenicidade

Uma vez gerados dados de sequenciamento de genoma e exoma, houve a necessidade de associar as variações descritas a doenças, o que foi possibilitado com a ajuda do desenvolvimento de ferramentas de predição de patogenicidade (WALTERS-SEN *et al.*, 2014). Com ajuda de algoritmos, esses programas atribuem uma classificação de patogenicidade para variantes *missenses* (ou sentido trocado) a partir da utilização de componentes relativos à evolução da sequência e à estrutura da proteína (WALTERS-SEN *et al.*, 2014).

Muitas ferramentas que ajudam em estudos *in silico* estão disponíveis e podem auxiliar na interpretação de variantes para as quais ainda não há informações sobre estrutura e função de seus produtos. Os algoritmos usados por cada ferramenta podem diferir entre si, porém, todos podem contribuir para determinar o efeito da variante na sequência de nucleotídeos e aminoácidos (PSHENNIKOVA *et al.*, 2019).

Várias ferramentas de predição foram desenvolvidas com base no princípio evolutivo de que posições com sequências de aminoácidos conservados são funcionalmente importantes e, portanto, uma alteração nessas sequências pode resultar em efeitos potencialmente deletérios (CHOI *et al.*, 2012). Desse modo, essas ferramentas obtêm informações da conservação evolutiva da sequência de aminoácidos por meio de alinhamento com sequências homólogas e distantes, a partir de um bando de dados de sequências conhecidas (CHOI *et al.*, 2012; SHIHAB *et al.*, 2013).

1.4.1 Clinvar

O banco de dados ClinVar é composto por publicações de variantes gênicas humanas e seus fenótipos, o que facilita a interpretação de um determinado estado de

saúde observado em um indivíduo. Esse banco é formado a partir de submissões com descrição de variantes fenotípicas que possuem um significado clínico (LANDRUM *et al.*, 2014).

1.4.2 PolyPhen-2

O PolyPhen-2 é uma ferramenta desenvolvida para a anotação de SNPs não-sinônimos de codificação, utilizando oito recursos preditivos baseados em sequência e três baseados em estrutura, sendo selecionados automaticamente por um grande algoritmo iterativo. Essas funcionalidades envolvem a comparação de uma propriedade do alelo selvagem com a sua correspondente no alelo mutante (ADZHUBEI *et al.*, 2010).

O programa usa um pipeline de alinhamento para selecionar sequências homologas através de um algoritmo de agrupamento, e com isso construir e refinar seu alinhamento múltiplo. Para a predição, é vista a probabilidade de dois alelos ocuparem o mesmo local na sequência de alinhamento, o quão distante está o desvio ocorrido na proteína do alelo selvagem para a proteína analisada, e se o alelo mutante se originou em um sítio hipermutável. E analisar a importância funcional do alelo mutado considerando suas características estruturais e funcionais (ADZHUBEI *et al.*, 2010).

1.4.3 FATHMM

O FATHMM (*Functional Analysis Through Hidden Markov Models*) é uma ferramenta que usa os modelos ocultos de Markov (HMMs) para prever efeitos funcionais das mutações *missenses* em proteínas, combinando conservação de sequências. Esse modelo representa o alinhamento de sequências homólogas e domínios de proteínas conservadas, representando a tolerância geral da proteína às mutações, representados por “pesos de patogenicidade” (SHIHAB *et al.*, 2013).

1.4.4 SIFT

O SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) é uma ferramenta que prevê se uma substituição de aminoácidos afeta a função de uma proteína se baseando na homologia de sequências e nas propriedades físicas dos aminoácidos. A premissa do SIFT se baseia na conservação evolutiva dos aminoácidos dentro das famílias de proteínas. As posições que apresentam alto grau de conservação têm uma tendência a serem intolerantes a

variações, enquanto as que apresentam baixo grau de conservação apresentam tendência a tolerar melhor as variações (KUMAR; HENIKOFF; NG, 2009).

1.4.6 PANTHER

O PANTHER funciona como uma base de dados fornecendo informações abrangentes sobre a evolução das famílias de genes codificadores de proteínas, como filogenia das proteínas, função e variação genética que afeta essa função. O PANTHER é composto por dois componentes a biblioteca PANTHER (PANTHER/LIB) e o *index* (PANTHER/X), a biblioteca é uma representação de “livros” de cada família de proteína, sendo cada um como um alinhamento de múltiplas sequências, um HMM e uma árvore genealógica. As diferenças funcionais dentro de uma família são representadas pela divisão da árvore em subárvores. O PANTHER/X é uma ontologia abreviada para resumir e navegar funções moleculares e processos biológicos associados às famílias e subfamílias (THOMAS *et al.*, 2003).

Diante dessa análise e caracterização de variantes dos genes *SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1*, que estão relacionadas ao metabolismo da HU, em uma população não representada em bancos de dados populacionais como GnomAD e AbraOM, mostrando as características locais de uma população, com isso sugerir possíveis implicações farmacogenômicas relacionando a metabolização da HU e guiando pra investigações futuras.

Partindo-se do pressuposto de que a resposta terapêutica à hidroxiureia é modulada por múltiplos determinantes genéticos que influenciam a absorção, o transporte e a eliminação do fármaco, esta tese sustenta a hipótese de que variantes específicas nos genes *SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1* apresentam distribuição diferencial na população amazônica em relação a outras populações globais, e que tais diferenças podem impactar a farmacocinética e a farmacodinâmica da hidroxiureia. Essa hipótese operacional fundamenta-se na combinação de duas abordagens complementares: (i) análises *in silico* para predição funcional de variantes missenses, que permitem estimar seu potencial efeito estrutural e bioquímico sobre proteínas transportadoras; e (ii) análise comparativa de frequências alélicas e genótípicas em uma amostra miscigenada de Belém, contrastada com bancos genômicos internacionais (gnomAD) e nacionais (AbraOM). Dessa integração, espera-se gerar evidências sobre o papel da diversidade genética regional na resposta terapêutica e no metabolismo da

hidroxiureia, contribuindo para a construção de referenciais farmacogenômicos aplicáveis à medicina personalizada em populações brasileiras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar variantes genéticas nos genes *SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1*, identificadas em banco de dados públicos e em exomas de indivíduos da população miscigenada de Belém, com o propósito de avaliar seu potencial impacto funcional e sua distribuição populacional, considerando implicações farmacogenômicas na resposta à hidroxiureia.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar as variantes do tipo missense nos genes *SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1* utilizando o banco de dados gnomAD.
- Estimar o potencial impacto funcional das variantes missenses identificadas por meio de múltiplos preditores adotando regra de consenso entre as classificações obtidas.
- Comparar as frequências alélicas e genotípicas das variantes de interesse entre a população de Belém, as populações continentais do gnomAD e a população brasileira do AbraOM, aplicando testes exatos de significância e o índice de diferenciação genética F_{st} para avaliar o grau de divergência populacional.

3 CAPÍTULO I

Este capítulo corresponde ao manuscrito intitulado “*In silico* analysis of variants in the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* genes found in the gnomAD database using three pathogenicity prediction programs” submetido ao periódico “Genetics and Molecular Biology” em 20 de novembro de 2025, (GMB-2025-0262).

In silico analysis of variants in the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* genes found in the gnomAD database using three pathogenicity prediction programs

Carlos Fabrício Pinto de Medeiros¹, Mauro Lucio Ferreira Sousa Junior¹, Adriane Maria Bezerra da Silva¹, Isabela Guerreiro Diniz¹, Susanne Suely Santos da Fonseca¹, Fernanda Andreza de Pinho Lott Figueiredo¹, Greice de Lemos Cardoso Costa¹, João Farias Guerreiro¹

¹ Laboratory of Human and Medical Genetics - Federal University of Pará - Belém/Pará

Correspondence should to be addressed to Carlos Fabrício Medeiros; fabriciomedeiros92@gmail.com . ORCID: 0009-0000-2290-2310

Abstract

The solute carrier (SLC) superfamily is fundamental in pharmacokinetics by mediating the transport of molecules across cell membranes, including drugs. Hydroxyurea, used in the treatment of β -thalassemia and sickle cell anemia, increases fetal hemoglobin levels and improves clinical prognosis. This study investigated missense variants in the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* genes, involved in urea metabolism and drug transport, using data from gnomAD. The variants were evaluated by PolyPhen-2, PANTHER, and FATHMM predictors. In total, 2,876 missense variants were identified: 625 in *SLC14A1*, 1,267 in *SLC14A2*, and 984 in *SLCO1B1*; 61% had rsID. The most frequent variants included p.Arg4Trp, p.Asp280Asn, and p.Glu44Lys in *SLC14A1*; p.Ile132Val and p.Arg510Gln in *SLC14A2*; and p.Asn130Asp and p.Val174Ala in *SLCO1B1*. There were divergences among predictors, especially FATHMM, which

classified most variants as benign, while PANTHER assigned a higher number of pathogenic variants. This discordance highlights the need to integrate different methods in functional interpretation. It is concluded that *in silico* predictions, although useful, often remain inconclusive, reinforcing the importance of functional analyses and the use of genomic databases to contextualize genetic variation and drug response.

Keywords: Databases , Hydroxyurea, Predictors, *SLC*, *SLCO*.

Introduction

Hydroxyurea (HU) was initially a drug used in the treatment of myeloproliferative syndromes. Currently, it is widely employed in the management of sickle cell anemia (SCA) as well as beta-thalassemia, due to its ability to increase fetal hemoglobin (HbF) levels. This increase reduces vaso-occlusive crises, inhibits hemoglobin S polymerization, decreases painful crises and hemolysis, and improves erythrocyte survival (Galiza Neto and Pitombeira 2003; Zago and Pinto 2007; Silva et al. 2009).

Research has investigated genes involved in HU metabolism, seeking to understand how genetic variations can influence its clinical efficacy. Walker et al. (2011) identified seven genes from the SLC superfamily (*SLCO1B1*, *SLCO1A2*, *SLCO1B3*, *SLC22A4*, *SLC22A5*, *SLC14A1*, and *SLC14A2*) associated with HU metabolism. Subsequent studies pointed to specific variations in the *SLCO1B1*, *SLC14A1*, and *SLC14A2* genes as possibly related to the drug's mechanism of action (Ware et al. 2011; Angona et al. 2013; Yahouédéhou et al. 2018; Ginete et al. 2023).

The solute carrier (SLC) transporter superfamily is the second largest family of membrane transporter proteins, second only to the ABC (ATP-binding cassette) transporter family (Schaller and Lauschke 2019). These proteins play crucial roles in controlling the flow of endo and xenobiotics across cell membranes, including drug

disposition and elimination, contributing to their pharmacokinetics (Roth et al. 2012; Walker et al. 2013).

The *SLCO1B1* gene encodes the OATP1B1 (Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1) protein, expressed mainly in hepatocytes, where it transports various organic anions, including drugs such as statins, as well as hormones and metabolites. Alterations in this gene can influence hepatic drug uptake, increasing its level in circulation and potentiating adverse effects, such as statin toxicity (Walker et al. 2011; Roth et al. 2012; Stewart 2013; Zhang and Lauschke 2019; Zhang et al. 2021).

The *SLC14A1* and *SLC14A2* genes encode the urea transporters UTB (Urea Transporter-B) and UTA (Urea Transporter-A), respectively. These transporters perform essential functions in urea transport across cell membranes, including its reabsorption in the kidneys and balance in non-renal tissues (Shayakul and Hediger 2004). The transport mechanism performed by UTA and UTB occurs passively, independent of Na⁺ and Cl⁻ (Shayakul and Hediger 2004). Genetic variants in these genes can affect the renal capacity to concentrate urine, as well as osmotic processes and the transport of associated molecules, such as methylurea and acetamide (Shayakul and Hediger 2004; Yahouédéhou et al. 2020).

UTBs are predominantly expressed in erythrocytes, kidneys, and bone marrow, while UTAs are present in the kidneys and intestine. Variations in these genes can interfere with the kidneys' ability to concentrate urine, while UTA contributes to osmotic imbalance and UTB has an impact on urea transport (Walker et al. 2011).

Recent studies have highlighted the relevance of specific variants in HU metabolism. Ginete et al. (2023) and Yahouédéhou et al. (2018) identified the p.Asp280Asn and p.Glu44Lys mutations (in *SLC14A1*), respectively, as potentially associated with the

pharmacological effect of HU, corroborating previous data from Ware et al. (2011) that indicated the association of the p.Arg510Gln mutation (in *SLC14A2*).

With advances in sequencing technologies, genetic databases have become fundamental tools for genomic investigations. The 1000 Genomes project, with genomes from diverse populations, and the Exome Aggregation Consortium (EXAC), with more than 60,000 exomes from individuals from various regions of the world, are notable examples (Song et al. 2016; Karczewski et al. 2017). In 2020, EXAC was expanded, becoming the Genome Aggregation Database (gnomAD), encompassing data from 125,748 exomes and 15,708 complete genomes (Genet and Archive 2020).

Many genetic variants can be identified in genomic and exome sequences, and it is essential to understand their effects on the organism, including possible pathogenic impacts. These effects can be evaluated using pathogenicity prediction programs, which assign classifications based on sequence evolution analyses and protein structure, using specialized algorithms (Walters-Sen et al. 2014).

Different programs use specific approaches to perform these analyses. The FATHMM (Functional Analysis through Hidden Markov Models) predictor combines information about sequence conservation, alignments of homologous sequences, and conserved protein domains. Thus, it calculates the protein's tolerance to mutations, assigning "pathogenicity weights" to the analyzed variants (Shihab et al. 2013). PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) uses phylogenetic analysis to classify proteins into specific categories and associate them with diseases, based on their biological functions and evolution (Thomas et al. 2003). PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) focuses on the probability of two alleles occupying the same location in an aligned sequence. It evaluates how distant the mutated allele is from the wild-type allele in structural and functional terms, verifies whether the mutant allele

arose at a hypermutable site, and analyzes functional characteristics of the resulting protein (Adzhubei et al. 2010).

The present work aims to investigate frequencies of missense variants in genome data of the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* genes in genome data available in the gnomAD database. These will be analyzed in three pathogenicity prediction programs: PANTHER, FATHMM, and PolyPhen-2, to try to identify genetic variations that may influence HU metabolism.

Material and Methods

Data from the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* genes were accessed using gnomAD (genome aggregation database), version 4.1.0, on December 20, 2023, available at <https://gnomad.broadinstitute.org/>. The GRCh38/hg38 version of the genome and the GATK tool were used for sequence alignment (McKenna et al., 2010).

Subsequently, missense variants were selected, as they represent point mutations capable of generating single nucleotide polymorphism (SNP). These variants were submitted to three pathogenicity prediction programs: PolyPhen-2 (Adzhubei et al. 2010), PANTHER (Thomas et al. 2003), and FATHMM (Shihab et al. 2013), so that the *in silico* pathogenicity of these variants could be analyzed.

Variants were classified as benign, pathogenic, or inconclusive. Classification was considered if convergent between two programs. If all three diverged, the variant would be classified as inconclusive. Variants whose pathogenicity analyses could not be performed by the programs were also considered inconclusive. When submitting to the predictors, mutations were used in the formats p.Gly3Arg, p.Gly11Ser, p.Lys20Glu, which show the position of the proteins as well as the initial protein and the one that was encoded by the mutation.

Results

A total of 625 (22%) missense variants were found for the *SLC14A1* gene, 1,267 (44%) for the *SLC14A2* gene, and 984 (34%) for the *SLCO1B1* gene, totaling 2,879 variants. 393 (63%) variants of the *SLC14A1* gene, 793 (63%) of the *SLC14A2* gene, and 580 (59%) of the *SLCO1B1* gene had rsID identification as show in Table 1.

Table 1: Number of missense mutations and rsID found in gnomAD.

GENE	MISSENSSES VARIANTS	rsID
<i>SLC14A1</i>	625	393
<i>SLC14A2</i>	1267	793
<i>SLCO1B1</i>	984	580
TOTAL	2878	1766

Among the variants of the *SLC14A1* gene, 253 (40.5%) were classified as benign, 233 (37.3%) as pathogenic, and 139 (22.2%) as inconclusive. Considering the program used, FATHMM identified 485 as benign, 1 as pathogenic, and 139 as inconclusive; PANTHER identified 180 as benign, 306 as pathogenic, and 139 as inconclusive; and PolyPhen-2 identified 226 as benign, 123 as pathogenic, and 276 as inconclusive represented in Table 2 and Table 3.

In the *SLC14A2* gene, consolidation resulted in 573 variations (45.2%) as benign, two (0.2%) as pathogenic, and 692 (54.6%) as inconclusive. Individually, the FATHMM program classified 1,265 as benign and two as pathogenic; PANTHER classified 20 as benign, 1 as pathogenic, and 1,246 as inconclusive; and PolyPhen-2 classified 558 as benign and 709 as pathogenic represented in Table 2 and Table 3.

For the *SLCO1B1* gene, consolidation indicated 516 (52.4%) as benign and 468 (47.6%) as pathogenic. For this gene, FATHMM indicated 978 variants as benign and 6 as

pathogenic; PANTHER indicated all 984 variants as pathogenic; and PolyPhen-2 indicated 516 as benign and 468 as pathogenic represented in Table 2 and Table 3.

Table 2: Classification of predictions by gene.

Prediction	<i>SLC14A1</i>	<i>SLC14A2</i>	<i>SLCO1B1</i>
Benign	253	573	516
Pathogenic	233	2	468
Inconclusive	139	692	--
Total	625	1267	984

Table 3: Distribution of predictions according to gene for each predictor.

Predictors	Classification	<i>SLC14A1</i>	<i>SLAC14A2</i>	<i>SLCO1B1</i>
FATHMM	Benign	485	1265	978
	Pathogenic	1	2	6
	Inconclusive	139	-	-
PANTHER	Benign	180	20	-
	Pathogenic	306	1	984
	Inconclusive	139	1246	-
PolyPhen-2	Benign	226	558	516
	Pathogenic	123	709	468
	Inconclusive	276	-	-

The p.Arg4Trp (rs11877062) variant of the *SLC14A1* gene showed the highest frequency (0.476), followed by p.Asp280Asn (rs1058396) and p.Glu44Lys (rs2298720), with frequencies of 0.469 and 0.102, respectively. Among them, only the p.Asp280Asn variant is described in ClinVar and is identified as benign, as suggested in our results. The p.Glu44Lys variant was also identified by the predictors as benign; however, p.Arg4Trp was classified as inconclusive.

Regarding the *SLC14A2* gene, the highest frequency (0.93) was of the p.Ile132Val (rs1484873) variant, followed by p.Arg510Gln (rs9960464) with an estimated frequency of 0.45. Both are not described in ClinVar, and both received the classification of benign from the predictors.

For the *SLCO1B1* gene, the highest frequency (0.42) was of p.Asn130Asp (rs2306283), followed by p.Val174Ala (rs4149056) with a frequency of 0.14. Both variations were reported by ClinVar, with p.Asn130Asp having benign significance and p.Val174Ala having drug response significance. In our results, the latter was classified as pathogenic as show in table 4.

Table 4: Frequencies of variations and classification by ClinVar and consolidation by predictors.

Gene	Variations	Frequenci	ClinVar	Predictors
<i>SLC14A1</i>	p.Arg4Trp	0,476	Not reported	Inconclusiva
	p.Asp280Asn	0,469	Benign	Benign
	p.Glu44Lys	0,102	Not reported	Benign
<i>SLC14A2</i>	p.Ile132Val	0,93	Not reported	Benign
	p.Arg510Gln	0,45	Not reported	Benign
<i>SLCO1B1</i>	p.Asn130Asp	0,42	Benign	Benign
	p.Val174Ala	0,14	Drug response	Pathogenic

Among the 2,878 variations, summing the three genes studied, 1,112 have no SNP identification, showing that there is still a large amount of unknown genetic variation. The variations with the highest frequencies in the gnomAD world populations already have SNP identification.

In continental populations for the *SLC14A1* gene, the p.Asp280Asn variant showed the highest frequency in the African (AFR) and American (AMR) populations, 0.267 and

0.505, respectively. For the European (EUR), South Asian (SAS), and East Asian (EAS) populations, the highest frequency was of the p.Arg4Trp variation, 0.492, 0.426, and 0.539, respectively, with the highest frequency of this variant in the East Asian population.

In continental populations of the *SLC14A2* gene, the p.Ile132Val variation showed the highest frequency in all populations: AFR (0.88), AMR (0.854), EAS (0.835), EUR (0.946), and SAS (0.938), presenting higher frequency than the wild-type form in both populations and showing the highest frequencies in the EUR and SAS populations.

In the *SLCO1B1* gene, the p.Asn130Asp variation had the highest frequency in continental populations: AFR (0.774), AMR (0.445), EAS (0.707), EUR (0.373), and SAS (0.469). In the African and East Asian populations, its frequency is higher than that of the wild-type form; in the others, all are below, with the lowest in the European population.

With the exception of the AFR and AMR populations in the *SLC14A1* gene, which has p.Asp280Asn as the highest frequency among variants in the other populations of this gene, as well as in the continental populations of the *SLC14A2* and *SLCO1B1* genes, all the most frequent variations are the same as those of the gnomAD world population for each of the genes.

Even though both genes present a large number of variants, many of them have very low frequencies in populations, both worldwide and continental. Even being among the three or four most frequent, they have frequencies lower than 0.1.

The differences in reading among predictors should be highlighted, as each has its analysis method. Regarding these discrepancies, we can observe that the method used by the FATHMM predictor showed more variations as benign or tolerable (as described by the predictor itself). The PANTHER predictor showed a greater tendency to indicate

variations as pathogenic, with the exception of the *SLC14A2* gene, whose analysis showed only one as pathogenic, with an indication of most variations (1,246) as invalid by the program. In the FATHMM and PolyPhen-2 predictors, all had scores for this gene, with the former indicating only two as pathogenic and the rest (1,265) as benign, while the latter indicated most variations as pathogenic (709 versus 558 benign).

The *SLC14A1* gene showed the highest number of inconclusive predictions, with the highest indication in the PolyPhen-2 predictor with 276, while for the *SLCO1B1* gene, all variations submitted to the PANTHER predictor were considered pathogenic.

Discussion

Among the most frequent variations found for the *SLC14A1* gene, two are not reported in ClinVar (p.Arg4Trp and p.Glu44Lys). P.Arg4Trp was associated by Rafnar et al. (2011) with a greater propensity for bladder cancer. The predictors classified it as inconclusive, both in individual analyses and in joint analyses. As for p.Glu44Lys, classified as pathogenic by PANTHER and as benign by FATHMM and PolyPhen-2, this variant is described as influential in hydroxyurea (HU) metabolism. Studies indicate that it hinders HU elimination, which increases its bioavailability. This effect, described as potentially beneficial for patients, suggests a functional impact that is not adequately captured by pathogenicity predictors (Yahouédéhou et al. 2020). The p.Asp280Asn is the only variant of the *SLC14A1* gene reported in ClinVar, being classified as benign by both the database and the three predictors used. However, a study conducted by Ginete et al. (2023) associated this variant with a poor response to HU, showing how pathogenicity classification may not be sufficient to predict pharmacogenetic impacts, especially in membrane surface genes.

The p.Asp280Asn variant, analyzed in the study by Ginete et al. (2023), was classified as benign by pathogenicity predictors but is also reported in ClinVar as associated with poor response to hydroxyurea (HU). This fact shows that pathogenicity classifications do not always reflect the functional impact of variants in specific contexts, such as drug response, especially in genes encoding membrane surface proteins. Small changes in the function of these proteins can significantly influence processes such as drug transport or metabolism, which may not be captured by predictors.

On the other hand, the p.Glu44Lys variant, although also classified as benign by predictors, is associated in studies with difficulty in HU elimination, resulting in greater drug bioavailability. This effect, described by Yahouédéhou et al. (2018), brings clinical benefits to patients, demonstrating that benign variants can still have important and contextually positive functional impacts.

The *SLC14A1* gene is expressed in blood cells, kidneys, and bone marrow, which makes it of great importance for HU elimination and distribution, and its presence in bone marrow may have great influence on the elevation of HbF levels directly in hematopoiesis.

For the *SLC14A2* gene, the variant that stands out is the one that appears with the second highest frequency in the gnomAD world population, the p.Arg510Gln variation, which is indicated in the study by Ware and collaborators (2011) as participating in HU metabolism; however, its function in relation to drug metabolism is not specified by the study, nor is it reported in other studies with HU. This variation is not classified in the ClinVar database; the PANTHER predictor was the only one that did not indicate a classification for this variant, while in the others it was classified as benign. As the *SLC14A2* gene is expressed in kidney and liver cells and is of great importance in drug

metabolism and elimination, we can infer that in these functions the variation may influence both a worsening and an improvement in HU response.

The most frequent variants in the *SLCO1B1* gene are described in ClinVar and have specific relationships with drug metabolism. P.Asn130Asp, despite being classified as benign by FATHMM, PolyPhen-2, and ClinVar, was indicated as pathogenic by PANTHER. This discrepancy reflects the differences in the analysis algorithms used by the predictors, but to date, the variant is considered clinically irrelevant in the context of this study.

As for p.Val174Ala, classified as associated with drug response by ClinVar, with specific evidence for rosuvastatin (Lehtisalo et al. 2023), the predictors diverge: FATHMM considers it benign, while PANTHER and PolyPhen-2 classify it as pathogenic. Previous studies suggest that this variant reduces hepatic absorption of rosuvastatin, increasing the risk of toxicity (Stewart 2013; Zhang et al. 2021). The expression of the *SLCO1B1* gene in liver cells makes it of great importance for drug metabolism, and variations in this gene can hinder (p.Val174Ala) or facilitate drug absorption.

The differences in classifications show the differences in the analysis methods of each predictor. FATHMM, for example, broadly considers evolutionary conservation, while PANTHER uses phylogenetic and functional analyses. PolyPhen-2, on the other hand, combines various characteristics, such as the probability of substitutions and location at functional sites, which may explain its higher rate of inconclusive classifications.

The results emphasize the importance of integrating different predictive approaches for the interpretation of genetic variants. Despite the divergences, the consolidated data offer valuable insights, highlighting variants of clinical interest that may be targets of future functional studies. The inclusion of additional information, such as population

data and functional studies, is essential to improve the accuracy of these analyses and allow a better understanding of the impact of these variants in the genomic and clinical context.

In conclusion this study revealed the presence of several variations within genes not yet described, reported, or analyzed, a fact that may be related to population groups that do not have genomes and exomes in gnomAD databases. This expansion of population groups can help increase the number of variations that may appear. Regarding the differences in data presented by the predictors, experimental validation is important to help understand the real effect of each variation, especially among those that are not described, to have a more robust understanding of genetic variations and their practical applicability.

Acknowledgements

This study had support by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Authors Contributions

CFPM and JFG conceptualization; CFPM and MLFSJ methodology; CFPM formal analysis; CFPM writing – original draft; CFPM, MLFSJ, AMBS, IGD, SSSF, FAPLF, GLCC and JFG writing-review & editing; JFG resources and supervision, ; CFPM, MLFSJ, SSSF, FAPLF, GLCC and JFG this manuscript has been read and approved by all authors.

Referencias

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS and Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7:248–249.

Angona A, Bellosillo B, Alvarez-Larrán A, Martínez-Avilés L, Camacho L, Pairet S, Fernández-Rodríguez MC, Ancochea À and Besses C (2013) Genetic predisposition to molecular response in patients with myeloproliferative neoplasms treated with hydroxycarbamide. *Leuk Res* 37:917–921.

Galiza Neto GC De and Pitombeira MDS (2003) Aspectos moleculares da anemia falciforme. *J Bras Patol Med Lab* 39:51–56.

Genet H and Archive EG (2020) The Gnomad Consortium Releases First Studies of Human Genetic Variation. *Am J Med Genet A* 182:1999–2000.

Ginete C, Delgadinho M, Santos B, Pinto V, Silva C, Miranda A and Brito M (2023) Are Genetic Modifiers the Answer to Different Responses to Hydroxyurea Treatment?—A Pharmacogenetic Study in Sickle Cell Anemia Angolan Children. *Int J Mol Sci* 24:8792.

Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B, Solomonson M, Ruderfer DM, Kavanagh D, Hamamsy T, Lek M, Samocha KE, Cummings BB et al. (2017) The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Res* 45:D840–D845.

Lehtisalo M, Taskinen S, Tarkiainen EK, Neuvonen M, Viinamäki J, Paile-Hyvärinen M, Lilius TO, Tapaninen T, Backman JT, Tornio A et al. (2023) A comprehensive

pharmacogenomic study indicates roles for *SLCO1B1*, *ABCG2* and *SLCO2B1* in rosuvastatin pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol* 89:242–252.

Rafnar T, Vermeulen SH, Sulem P, Thorleifsson G, Aben KK, Witjes JA, Grotenhuis AJ, Verhaegh GW, van de Kaa CAH, Besenbacher S et al. (2011) European genome-wide association study identifies *SLC14A1* as a new urinary bladder cancer susceptibility gene. *Hum Mol Genet* 20:4268–4281.

Roth M, Obaidat A and Hagenbuch B (2012) OATPs, OATs and OCTs: The organic anion and cation transporters of the *SLCO* and *SLC22A* gene superfamilies. *Br J Pharmacol* 165:1260–1287.

Schaller L and Lauschke VM (2019) The genetic landscape of the human solute carrier (SLC) transporter superfamily. *Hum Genet* 138:1359–1377.

Shayakul C and Hediger MA (2004) The *SLC14* gene family of urea transporters. *Pflugers Arch* 447:603–609.

Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Stenson PD, Barker GLA, Edwards KJ, Day INM and Gaunt TR (2013) Predicting the Functional, Molecular, and Phenotypic Consequences of Amino Acid Substitutions using Hidden Markov Models. *Hum Mutat* 34:57–65.

Silva LB, Gonçalves RP and Martins MF (2009) Estudo da correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e o prognóstico dos pacientes com anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter* 31:417–420.

Song W, Gardner SA, Hovhannisyan H, Natalizio A, Weymouth KS, Chen W, Thibodeau I, Bogdanova E, Letovsky S, Willis A et al. (2016) Exploring the landscape

of pathogenic genetic variation in the ExAC population database: Insights of relevance to variant classification. *Genetics in Medicine* 18:850–854.

Stewart A (2013) *SLCO1B1* Polymorphisms and Statin-Induced Myopathy. *PLoS Curr* 5:ecurrents.eogt.d21e7f0c58463571bb0d9d3a19b82203.

Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A and Narechania A (2003) PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 13:2129–2141.

Walker AL, Franke RM, Sparreboom A and Ware RE (2011) Transcellular movement of hydroxyurea is mediated by specific solute carrier transporters. *Exp Hematol* 39:446–456.

Walker AL, Lancaster CS, Finkelstein D, Ware RE and Sparreboom A (2013) Organic anion transporting polypeptide 1B transporters modulate hydroxyurea pharmacokinetics. *Am J Physiol Cell Physiol* 305:1223–1229.

Walters-Sen LC, Hashimoto S, Thrush DL, Reshmi S, Gastier-Foster JM, Astbury C and Pyatt RE (2014) Variability in pathogenicity prediction programs: impact on clinical diagnostics. *Mol Genet Genomic Med* 3:99–110.

Ware RE, Despotovic JM, Mortier NA, Flanagan JM, He J, Smeltzer MP, Kimble AC, Aygun B, Wu S, Howard T et al. (2011) Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia. *Blood* 118:4985–4991.

Yahouédéhou SCMA, Adorno EV, da Guarda CC, Ndidi US, Carvalho SP, Santiago RP, Aleluia MM, de Oliveira RM and Gonçalves M de S (2018) Hydroxyurea in the

management of sickle cell disease: pharmacogenomics and enzymatic metabolism. *Pharmacogenomics Journal* 18:730–739.

Yahouédéhou SCMA, Neres JS dos S, da Guarda CC, Carvalho SP, Santiago RP, Figueiredo CVB, Fiuza LM, Ndidi US, de Oliveira RM, Fonseca CA et al. (2020) Sickle Cell Anemia: Variants in the *CYP2D6*, *CAT*, and *SLC14A1* Genes Are Associated With Improved Hydroxyurea Response. *Front Pharmacol* 11:1–10.

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

Zhang B and Lauschke VM (2019) Genetic variability and population diversity of the human *SLCO* (OATP) transporter family. *Pharmacol Res* 139:550–559.

Zhang L, Sarangi V, Ho MF, Moon I, Kalari KR, Wang L and Weinshilboum RM (2021) *SLCO1B1*: Application and Limitations of Deep Mutational Scanning for Genomic Missense Variant Function. *Drug Metabolism and Disposition* 49:395–404.

4 CAPÍTULO II

Este capítulo corresponde ao manuscrito intitulado “Genetic Diversity of the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* Genes in the Brazilian Amazon: Implications for Hydroxyurea Pharmacogenomics”, submetido ao periódico “Genetics and Molecular Biology” em 20 de novembro de 2025, (GMB- 2025-0263).

Genetic Diversity of the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* Genes in the Brazilian Amazon: Implications for Hydroxyurea Pharmacogenomics

Carlos Fabrício Pinto de Medeiros¹, Mauro Lucio Ferreira Sousa Junior¹, Susanne Suely Santos da Fonseca¹, Greice de Lemos Cardoso Costa¹, Fernanda Andreza de Pinho Lott Figueiredo¹, and João Farias Guerreiro¹

¹ Laboratory of Human and Medical Genetics - Federal University of Pará - Belém/Pará

Correspondence should to be addressed to Carlos Fabrício Medeiros; fabriciomedeiros92@gmail.com . ORCID: 0009-0000-2290-2310

Abstract

Hydroxyurea (HU) is used in the treatment of hemoglobinopathies, such as sickle cell anemia, by increasing fetal hemoglobin (HbF) levels. This study investigated the frequency and functional impact of variants in the *SLC14A1* (rs1058396, rs2298720), *SLC14A2* (rs9960464), and *SLCO1B1* (rs2291075) genes in global populations and in an admixed population from the Brazilian Amazon (Belém, n = 95). Data from gnomAD, AbraOM, and SIFT, PolyPhen-2, FATHMM, and PANTHER predictors were analyzed. The Belém population showed rs1058396A allele frequency (0.29) similar to African (0.27) and rs2298720A (0.07) close to European (0.066). The rs9960464A and rs2291075T variants were less frequent in Belém (0.14 and 0.12) than in continental populations. Genetic differentiation (F_{st}) revealed moderate to high values, especially between Belém and South Asian (0.1921) and African (0.1585) populations. In functional predictions, rs1058396 was considered benign, while rs2298720 presented

conflicting classifications, highlighting the need for experimental studies. It is concluded that the genetic diversity of the Belém population may influence HU response and deserves consideration in clinical and pharmacogenomic studies. These findings contribute to the development of personalized medicine strategies for hemoglobinopathies in the Amazon.

Keywords: Sickle cell anemia; hydroxyurea; SLC; pharmacogenomics; admixture; Brazilian Amazon.

Introduction

Hydroxyurea (HU) was initially developed for the treatment of myeloproliferative syndromes, but its clinical use gained relevance after demonstration of efficacy in the management of hemoglobinopathies, particularly sickle cell anemia (SCA) (Davies and Gilmore 2003). In the context of SCA, its therapeutic action results primarily from the ability to induce fetal hemoglobin (HbF) production, whose presence decreases the propensity for hemoglobin S (HbS) polymerization, managing to attenuate the clinical manifestations of the disease (Ware et al. 2011).

Despite proven benefits, the therapeutic response to HU is highly variable among individuals, suggesting that genetic factors play a determining role in this process (Yahouédéhou et al. 2018). In this context, genes of the SLC (solute carrier) superfamily stand out, which encode fundamental transporter proteins in the absorption, distribution, and excretion of various compounds, including HU (Walker et al. 2011).

Among the transporters associated with HU pharmacokinetics, the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* genes have been identified as potential modulators of therapeutic response, by directly influencing its cellular bioavailability (Angona et al. 2013; Ginete et al. 2023). Previous studies have identified specific variants in these genes, such as

rs1058396 and rs2298720 (*SLC14A1*), rs9960464 (*SLC14A2*), and rs2291075 (*SLCO1B1*), associated with differences in HbF levels or clinical response to HU.

The characterization of the frequency of these variants in different human populations has been possible thanks to population genomic databases, such as gnomAD (Karczewski et al. 2020) and AbraOM (Naslavsky et al. 2022), which gather data from individuals of diverse ethnic and geographic origins. Such investigations are particularly relevant for highly admixed populations, such as those of the Brazilian Amazon, whose complex genetic composition reflects European, African, Amerindian, and, to a lesser extent, Asian ancestral contributions (Rodrigues et al. 2020).

Understanding how genetic variability impacts HU pharmacogenomics in populations underrepresented in global studies is essential for the development of more personalized therapeutic strategies, in addition to contributing to equity in the implementation of precision medicine in the context of the Brazilian Unified Health System (SUS).

Given this scenario, this study aims to characterize the genetic diversity of variants in the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* genes in the admixed population of Belém (Pará, Brazil), comparing it with global reference populations. Furthermore, it seeks to evaluate the potential functional impact of these variants, based on *in silico* prediction tools, and discuss their possible implications for HU pharmacogenomics. The genomic composition of the Belém (PA) population shows a complex admixture pattern, with predominance of European ancestry, followed by Amerindian and African contributions. In a broad study, Pena et al. (2011) found that individuals self-identified as "brown" in the North region showed, on average, 68.6% European ancestry, 20.9% Amerindian, and 10.6% African, highlighting the heterogeneous character of the Amazonian genetic base. In a complementary way, more recent data from the "DNA do Brasil" project confirmed the predominance of European ancestry in the Brazilian

population as a whole (about 60%), but with higher proportions of African ancestry in the North and Northeast regions, which reinforces the need to consider individual ancestry in pharmacogenomic analyses (Nunes et al. 2025).

It is believed that the admixed population of Belém (PA) presents a distinct genetic profile in relation to continental populations, with variations in the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* genes that can significantly influence the therapeutic response to hydroxyurea. This hypothesis is based on the unique genomic composition of the Amazon region, marked by intense admixture among European, African, Amerindian, and Asian ancestors (Rodrigues et al. 2020).

Material and Methods

This study is exploratory and descriptive. The variants rs1058396 and rs2298720 (in the *SLC14A1* gene), rs9960464 (in the *SLC14A2* gene), and rs2291075 (in the *SLCO1B1* gene) were selected based on previous literature review, prioritizing polymorphisms previously associated with the pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxyurea (HU), as well as with the modulation of fetal hemoglobin (HbF) levels in patients with sickle cell anemia. Previous studies indicate that these variants may influence the activity or expression of urea and endogenous drug transporters, interfering with bioavailability and therapeutic response to HU (Angona et al. 2013; Yahouédéhou et al. 2020; Ginete et al. 2023).

Variants located in coding regions, with potential functional impact according to *in silico* predictors, and that presented frequencies documented in global populations, available in the gnomAD and AbraOM databases, were prioritized, which enabled comparative analyses with the Amazonian population. The genomic coordinates of the selected variants, according to the GRCh38/hg38 assembly, are as follows:

- rs1058396 (*SLC14A1*): Chr18: 53,964,979, G>A alteration (p.Asp280Asn);
- rs2298720 (*SLC14A1*): Chr18: 53,972,398, G>A alteration (p.Glu44Lys);
- rs9960464 (*SLC14A2*): Chr18: 54,216,149, G>A alteration (p.Arg510Gln);
- rs2291075 (*SLCO1B1*): Chr12: 21,178,606, C>T alteration (p.Phe199Phe).

This information was obtained from the Ensembl Variant Table (<https://www.ensembl.org>) and is aligned with version GRCh38.p13 of the reference genome, ensuring traceability and reproducibility.

Data from the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* genes were extracted from the gnomAD (Genome Aggregation Database) database, version 4.1.0 (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), using the GRCh38/hg38 assembly as reference. Sequence alignment was performed using the Genomic Analysis Toolkit (GATK) (McKENNA et al., 2010). Data from the Brazilian population were obtained from the AbraOM database (<https://abraom.ib.usp.br/index.php>), while exome data from the admixed population of Belém (n = 95) were from the database of Rodrigues et al. (2020).

This study was approved by the National Research Ethics Committee (CONEP) and by the Research Ethics Committee of the Tropical Medicine Center of the Federal University of Pará (CAAE 20654313.6.0000.5172).

The exome had an average coverage of 46.8X, with 89% of bases in target regions showing at least 10X coverage and 77% of bases reaching $\geq 20X$. Variants were submitted to the Variant Effect Predictor (VEP) (<https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>) for functional predictive analysis.

Statistical analyses were performed in R software. Fisher's Exact Test ($p \leq 0.05$) was used to compare allelic frequencies among continental populations, the Brazilian

population (AbraOM), and the admixed population of Belém. The choice for this test is justified by the presence of low allelic frequencies and reduced sample size, conditions in which the chi-square test may be inadequate. The genetic fixation index (F_{st}) was estimated in ARLEQUIN 3.5 software, with application of the analysis of molecular variance (AMOVA) method with 10,000 permutations, followed by graphical representation in heatmap format.

For inference of the functional impact of variants, the SIFT, PolyPhen-2, FATHMM, and PANTHER prediction tools were used, in addition to queries to the ClinVar and EnsemblVEP databases. Classification as "damaging," "benign," or "inconclusive" was considered valid when there was agreement among at least three predictors.

To avoid increasing the type I error rate due to multiple comparisons, Bonferroni correction was applied, with adjustment of the significance level (α) according to the total number of tests.

Despite relevant findings, the limitation related to the absence of direct clinical validation is recognized, which prevents definitive conclusions about the therapeutic impact of variants on individual HU response. As this is an exploratory study, based on *in silico* predictions and population analyses, the functional and pharmacodynamic effects of variants remain hypothetical until confirmation by prospective clinical studies. Additionally, the sample size of the Belém population ($n = 95$) does not allow stratified analyses by individual ancestry, an especially relevant aspect in contexts of high admixture, such as the Amazonian population. The absence of control by ancestry proportions may introduce bias in comparisons with other populations. Future studies should include individual ancestry analysis with SNP panels and functional validations *in vitro* and *in vivo*, in order to consolidate the clinical applicability of the investigated markers.

Results

The literature review identified four variants associated with metabolism and response to HU treatment: rs1058396 and rs2298720 (*SLC14A1* gene), rs9960464 (*SLC14A2* gene), and rs2291075 (*SLCO1B1* gene) (Angona et al. 2013; Yahouédéhou et al. 2020; Ginete et al. 2023).

In the *SLC14A1* gene, variant rs1058396 (p.Asp280Asn) was classified as benign by all pathogenicity predictors, in agreement with ClinVar. However, variant rs2298720 (p.Glu44Lys) presented divergent results among tools: SIFT indicated deleterious effect, PolyPhen-2 classified it as benign, FATHMM considered it tolerable, and PANTHER pointed to a possible harmful effect. This discrepancy suggests that different algorithms employ distinct methodologies (e.g., structural modeling, evolutionary conservation analyses) and reinforces the need for additional experimental validations to clarify its functional impact.

Variant rs9960464 (p.Arg510Gln), in the *SLC14A2* gene, was predominantly considered benign, although PANTHER did not present a conclusive result, possibly due to limitations in its training database for this context.

Finally, variant rs2291075 (p.Phe199Phe), in the *SLCO1B1* gene, is synonymous and, as expected, was considered without relevant effect by most tools. However, PANTHER pointed to a possible harmful effect, suggesting that synonymous variants, although they do not alter the protein sequence, may affect processes such as splicing or RNA stability, justifying complementary investigations.

Table 1 presents the pathogenicity classifications of variants in a consolidated manner.

Table 1. Classification of variants by pathogenicity predictors and ClinVar.

Variant	FATHMM	PANTHER	SIFT	PolyPhen-2	Consolidation	ClinVar
rs1058396	Benign	Benign	Benign	Benign	Benign	Benign
rs2298720†	Benign	Damaging	Deleterious	Benign	Inconclusive†	Not reported
rs9960464†	Benign	Inconclusive	Benign	Benign	Benign†	Not reported
rs2291075†	Synonymous	Damaging	Synonymous	Synonymous	Synonymous†	Benign

† rs2298720: Presented contradictory classifications among predictors — SIFT and PANTHER pointed to potential deleterious effect, while FATHMM and PolyPhen-2 considered it benign. This justifies the "inconclusive" classification.

† rs9960464: Classified as "Inconclusive" by PANTHER, while other predictors indicated benign profile. Consolidation was maintained as "benign," but should be interpreted with caution.

† rs2291075: Despite being a synonymous variant, PANTHER indicated potential damaging effect. The divergence between this predictor and the others led to consolidation as "synonymous," but with reservations.

The allelic frequencies of variants were summarized in Table 2. It was observed that some variants presented frequencies in Belém similar to those of continental populations, while others showed significant differences show in Table 3. To avoid redundancies, we chose not to repeat numerical values in the text, as they are properly detailed in the tables.

Table 2. Allelic frequencies of variants by population and their confidence interval.

Variant	Gene	Population	Allele	Frequency	IC 95%
RS1058396	<i>SLC14A1</i>	Belém	A	0,29	0,22-0,36
		AFR	A	0,27	0,267-0,273
		AMR	A	0,505	0,501-0,509
		EAS	A	0,54	0,535-0,545
		EUR	A	0,48	0,479-0,481
		SAS	A	0,43	0,427-0,433
		BRA	A	0,44	0,42-0,46
RS2298720	<i>SLC14A1</i>	Belém	A	0,07	0,034-0,106
		AFR	A	0,198	0,195-0,201
		AMR	A	0,21	0,207-0,213
		EAS	A	0,39	0,385-0,395
		EUR	A	0,066	0,066-0,066
		SAS	A	0,25	0,247-0,253
		BRA	A	0,12	0,107-0,133
RS9960464	<i>SLC14A2</i>	Belém	A	0,14	0,091-0,189
		AFR	A	0,32	0,317-0,323
		AMR	A	0,51	0,506-0,514
		EAS	A	0,35	0,346-0,354
		EUR	A	0,45	0,449-0,451
		SAS	A	0,44	0,437-0,443
		BRA	A	0,39	0,37-0,41
RS2291075	<i>SLCO1B1</i>	Belém	T	0,12	0,074-0,166
		AFR	T	0,55	0,546-0,554
		AMR	T	0,3	0,296-0,304
		EAS	T	0,45	0,445-0,455
		EUR	T	0,39	0,389-0,391
		SAS	T	0,19	0,187-0,193
		BRA	T	0,44	0,420-0,460

Statistical analyses showed some similarities and differences among populations. For example, the Belém population presented frequencies similar to the African population for variant rs1058396 ($p=1$) and to the European population for rs2298720 ($p=0.1$). In other variants, there were statistically significant differences ($p<0.05$), evidencing regional genetic diversity.

Table 3. Results of Fisher's Exact Test between the Belém population and other populations for the variants studied.

Comparison between populations	Rs1058396	Rs2298720	Rs9960464	Rs2291075
BEL x AbraOM	0,0008960088	0.4675734	3.218146e-07	5.228149e-14
BEL x AFR	1	7.5597e-05	0.0003107001	9.606777e-25
BEL x AMR	6.623029e-08	0.03457665	1.313616e-14	1.851731e-05
BEL x EAS	2.547099e-10	1.294965e-19	1.681011e-05	6.751552e-15
BEL x EUR	2.207617e-06	1	4.3457e-11	1.192872e-10
BEL x SAS	0.00151655	2.549462e-08	1.760768e-10	0.2966014

The genetic differentiation analysis (F_{st}) revealed values ranging from low to moderate/high in Table 4 and Figure 1. In general, the Belém population showed lower genetic differentiation in relation to the Brazilian population (AbraOM) and European ($F_{st} \approx 0.13-0.15$), and greater differentiation in relation to South Asian ($F_{st} = 0.1921$), American ($F_{st} = 0.1523$), and African ($F_{st} = 0.1585$) populations. These F_{st} values suggest moderate genetic differentiation between Belém and these populations (an F_{st} value around 0.15 indicates that approximately 15% of genetic variation is due to population structure, while the other 85% occurs within populations), which may reflect historical processes of migration, admixture, and regional genetic isolation.

Table 4 — Comparison of F_{st} between continental populations of the 1000 Genomes project, Brazilian (AbraOM), and Belém population.

	AFR	AMR	SAS	EAS	EUR	BRA	BEL
AFR	0						
AMR	0.09346	0					
SAS	0.09249	0.02969	0				
EAS	0.07012	0.04697	0.06870	0			
EUR	0.07939	0.01001	0.05702	0.06614	0		
BRA	0.04369	0.01747	0.05297	0.05026	0.00521	0	
BEL	0.15853	0.15225	0.09637	0.19210	0.14940	0.13369	0

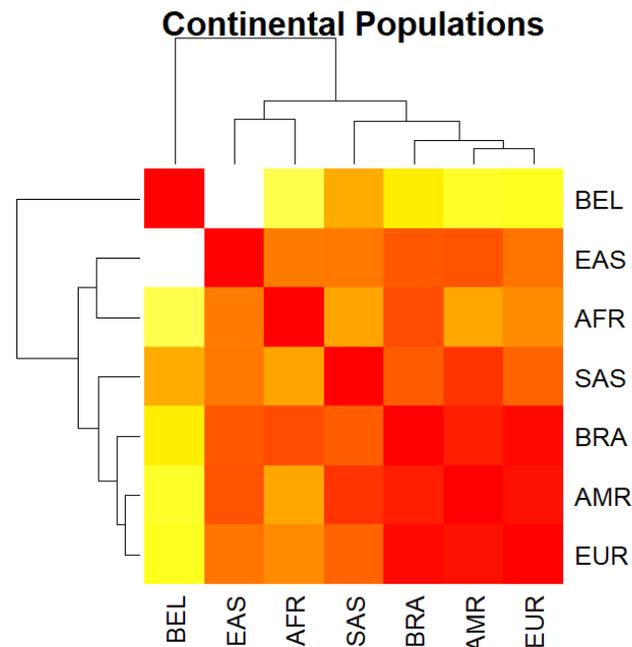


Figure 1: Heatmap illustrating the distance between the Belém population and continental populations of GnomAD (AFR, AMR, EAS, EUR, SAS) and the Brazilian population AbraOM.

Discussion

The results of this study revealed different profiles of functional prediction for the analyzed variants, which is in line with the literature that highlights the heterogeneity of pharmacogenomics in genetically diverse populations (Angona et al. 2013; Ginete et al. 2023). Variant rs1058396 (p.Asp280Asn), of the *SLC14A1* gene, was consistently classified as benign by all prediction tools and by the ClinVar database (Ware et al. 2011). This result is aligned with functional studies, which indicate that conservative substitutions in this protein region do not affect its activity as a urea transporter (Walker et al. 2011).

In contrast, variant rs2298720 (p.Glu44Lys) presented conflicting profiles among predictors, without ClinVar record: SIFT and FATHMM indicated deleterious effect,

while PolyPhen-2 and PANTHER classified it as probably benign. These divergences are expected, given that each algorithm uses distinct analysis criteria (Kumar et al. 2009; Adzhubei et al. 2010). Studies on homologous transporters of the *SLCO* family indicate that alterations in charged residues in the region close to the central pore can modulate substrate affinity, significantly interfering with the pharmacokinetics of endogenous and exogenous substrates (Huttunen et al. 2022). Therefore, experimental validations directed at this variant are recommended.

Variant rs9960464 (p.Arg510Gln), in the *SLC14A2* gene, remained predominantly classified as benign by predictors and has no clinical records available in ClinVar. Although there are no specific studies on this variant, mutations in coding regions of the *SLC14A2* gene have been associated with modulation of urea transport efficiency in renal epithelial cells (Shayakul and Hediger 2004). Its low frequency in the Belém population reinforces the need to monitor its clinical relevance in future pharmacogenetic studies.

Finally, variant rs2291075 (p.Phe199Phe), of the *SLCO1B1* gene, was classified as potentially damaging only by the PANTHER tool, although it is a synonymous variant. Despite being traditionally considered neutral, synonymous variants have been recognized for their indirect effects, including alterations in splicing, messenger RNA stability, and translation efficiency (Plotkin and Kudla 2011; Sarkar et al. 2022). More recent studies confirm that synonymous mutations can disturb mRNA structure, influence the binding of regulatory proteins, or alter protein folding time, resulting in relevant functional consequences (Plotkin and Kudla 2011; Sarkar et al. 2022).

Although variant rs2291075 has not yet been specifically investigated regarding its influence on hydroxyurea metabolism, studies in *SLCO1B1* associate variants, including synonymous ones, with alterations in OATP1B1 transporter expression and

modifications in the pharmacokinetics of drugs such as statins (Romaine et al. 2010; Ramsey et al. 2014). Thus, it is plausible that rs2291075 may impact hepatic uptake of hydroxyurea, modulating its bioavailability. However, given the absence of direct functional validation of this variant in the context of HU treatment, caution is recommended when proposing its clinical use as a pharmacogenomic marker, since its therapeutic implications still remain speculative.

The findings of this study have direct clinical implications for the management of patients with sickle cell anemia in the Amazon. The high frequency of variant rs1058396, shared with African populations, suggests that part of the Amazonian population may present pharmacokinetic profiles similar to those described in patients of African descent, for whom there is a greater database in the literature on the response to hydroxyurea (Ware et al. 2011; Yahouédéhou et al. 2020).

On the other hand, the differentiated frequencies of variants such as rs9960464 and rs2291075 indicate the existence of a unique pharmacogenetic profile in the Amazonian population, which may generate distinct therapeutic responses, both in efficacy and in risk of adverse effects. This may explain, in part, the clinical variability observed in practice among patients with sickle cell anemia in the region, such as insufficient response to HbF increase, higher frequency of vaso-occlusive crises, or hematological toxicity.

Thus, it becomes essential to consider this genetic diversity when prescribing HU, since the standard dose or titration strategies used in national and international protocols may not be the most appropriate for this population.

The data presented here reinforce the urgent need for development of regionalized therapeutic protocols, which incorporate pharmacogenomics as a clinical decision

support tool in the treatment of sickle cell anemia in the Amazon. Specifically, the findings can be applied in the following areas:

1. Development of specific pharmacogenetic panels, designed to screen variants in the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* genes, in addition to genes that modulate fetal hemoglobin expression, such as *BCL11A* and *HBSIL-MYB*.
2. Individualized adjustment of hydroxyurea dose, considering the genetic profile of patients, with the objective of optimizing therapeutic efficacy and minimizing the occurrence of adverse events.
3. Population pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling, integrating regional genomic data with clinical, biochemical, and laboratory variables, for better prediction of therapeutic response.
4. Training of reference services, such as blood centers and medical genetics units, for adoption of practices associated with precision medicine, focusing on pharmacogenomics applied to hemoglobinopathies.
5. Subsidy for formulation of public health policies, allowing the Unified Health System (SUS) to incorporate specific guidelines related to hydroxyurea pharmacogenomics for genetically diverse populations of the Amazon.

Furthermore, multicenter studies involving patients from the North region of Brazil should be prioritized, including joint evaluation of genetic, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical outcome data. This approach will allow the construction of robust predictive models applicable to clinical practice, effectively contributing to the improvement of therapeutic strategies and promotion of health equity in the Amazonian context.

In conclusion this study presented a detailed analysis of genetic variants associated with hydroxyurea metabolism in the *SLC14A1*, *SLC14A2*, and *SLCO1B1* genes, investigating

their distributions in different continental populations, in the AbraOM database, and in an exome sample composed of admixed individuals from the Brazilian Amazon. The results showed that, in general, variant frequencies in the Belém population were lower compared to continental populations, except for variants rs1058396 and rs2298720, whose frequencies resembled those of African and European populations, respectively. These findings reinforce the genetic complexity resulting from Amazonian admixture and its relevance for regional pharmacogenomics. Genetic differentiation analysis (F_{st}) demonstrated moderate to high variability values between the Belém population and other evaluated populations, highlighting the importance of considering local population structure in planning therapeutic strategies. Functional prediction analyses of variants revealed different impact profiles, with some classified as benign and others presenting conflicting results among the algorithms used, which highlights the need for additional experimental validations to determine their real clinical implications. It is emphasized that the present work has an exploratory character, based on population and bioinformatics analyses, not having directly demonstrated the relationship between genetic variants and therapeutic response to HU. To fully achieve this objective, subsequent clinical studies are necessary that integrate genetic, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical outcome data in patients with hemoglobinopathies. Only then will it be possible to robustly prove the influence of these variants on the efficacy and safety of HU treatment. Such studies may support the development of more individualized therapeutic strategies, contributing to advances in precision medicine and improvement of care in genetically diverse regions such as the Brazilian Amazon.

Acknowledgements

This study had support by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Authors Contributions

CFPM, GLCC and JFG conceptualization; CFPM, GLCC and MLFSJ methodology; CFPM and formal analysis; CFPM writing – original draft; CFPM, MLFSJ, SSSF, FAPLF, GLCC and JFG writing-review & editing; JFG resources, supervision and funding acquisition, ; CFPM, MLFSJ, SSSF, FAPLF, GLCC and JFG this manuscript has been read and approved by all authors.

Referencias

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS and Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7:248–249.

Angona A, Bellosillo B, Alvarez-Larrán A, Martínez-Avilés L, Camacho L, Pairet S, Fernández-Rodríguez MC, Ancochea À and Besses C (2013) Genetic predisposition to molecular response in patients with myeloproliferative neoplasms treated with hydroxycarbamide. *Leuk Res* 37:917–921.

Davies SC and Gilmore A (2003) The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. *Blood Rev* 17:99–109.

Ginete C, Delgadinho M, Santos B, Pinto V, Silva C, Miranda A and Brito M (2023) Are Genetic Modifiers the Answer to Different Responses to Hydroxyurea Treatment?—A Pharmacogenetic Study in Sickle Cell Anemia Angolan Children. *Int J Mol Sci* 24:8792.

Huttunen J, Adla SK, Markowicz-Piasecka M and Huttunen KM (2022) Increased/Targeted Brain (Pro)Drug Delivery via Utilization of Solute Carriers (SLCs). *Pharmaceutics* 14:1234.

Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP et al. (2020) The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 581:434–443.

Kumar P, Henikoff S and Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4:1073–1081.

Naslavsky MS, Scliar MO, Yamamoto GL, Wang JYT, Zverinova S, Karp T, Nunes K, Ceroni JRM, de Carvalho DL, da Silva Simões CE et al. (2022) Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from São Paulo, Brazil. *Nat Commun*. doi: 10.1038/s41467-022-28648-3

Nunes K, Castro e Silva MA, Rodrigues MR, Lemes RB, Pezo-Valderrama P, Kimura L, de Sena LS, Krieger JE, Varela MC, de Azevedo LO et al. (2025) Admixture's impact on Brazilian population evolution and health. *Science* (1979). doi: 10.1126/SCIENCE.ADL3564/SUPPL_FILE/SCIENCE.ADL3564_MДАР_REPRODUCIBILITY_CHECKLIST.PDF

Plotkin JB and Kudla G (2011) Synonymous but not the same: The causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet* 12:32–42.

Ramsey LB, Johnson SG, Caudle KE, Haidar CE, Voora D, Wilke RA, Maxwell WD, McLeod HL, Krauss RM, Roden DM et al. (2014) The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for *SLCO1B1* and Simvastatin-Induced Myopathy: 2014 Update. *Clin Pharmacol Ther* 96:423–428.

Rodrigues JCG, Souza TP de, Pastana LF, Ribeiro dos Santos AM, Fernandes MR, Pinto P, Wanderley AV, Souza SJ de, Kroll JE, Pereira AL et al. (2020) Identification of *NUDT15* gene variants in Amazonian Amerindians and admixed individuals from northern Brazil. *PLoS One* 15:e0231651.

Romaine SPR, Bailey KM, Hall AS and Balmforth AJ (2010) The influence of *SLCO1B1* (*OATP1B1*) gene polymorphisms on response to statin therapy. *Pharmacogenomics Journal* 10:1–11.

Sarkar A, Panati K and Narala VR (2022) Code inside the codon: The role of synonymous mutations in regulating splicing machinery and its impact on disease. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 790:108444.

Shayakul C and Hediger MA (2004) The SLC14 gene family of urea transporters. *Pflugers Arch* 447:603–609.

Walker AL, Franke RM, Sparreboom A and Ware RE (2011) Transcellular movement of hydroxyurea is mediated by specific solute carrier transporters. *Exp Hematol* 39:446–456.

Ware RE, Despotovic JM, Mortier NA, Flanagan JM, He J, Smeltzer MP, Kimble AC, Aygun B, Wu S, Howard T et al. (2011) Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia. *Blood* 118:4985–4991.

Yahouédéhou SCMA, Adorno EV, da Guarda CC, Ndidi US, Carvalho SP, Santiago RP, Aleluia MM, de Oliveira RM and Gonçalves M de S (2018) Hydroxyurea in the management of sickle cell disease: pharmacogenomics and enzymatic metabolism. *Pharmacogenomics Journal* 18:730–739.

Yahouédéhou SCMA, Neres JS dos S, da Guarda CC, Carvalho SP, Santiago RP, Figueiredo CVB, Fiuza LM, Ndidi US, de Oliveira RM, Fonseca CA et al. (2020) Sickle Cell Anemia: Variants in the *CYP2D6*, *CAT*, and *SLC14A1* Genes Are Associated With Improved Hydroxyurea Response. *Front Pharmacol* 11:1–10.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta análises *in silico* de variações genéticas em três genes da família SLC, com foco na sua relação com o metabolismo da hidroxiureia (HU). Parte-se da hipótese de que variantes nos genes *SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1*, associadas ao metabolismo da HU, apresentam características particulares em uma população Amazônica ainda não representada em grandes bancos de dados, o que pode ter implicações farmacogenômicas futuras.

A integração entre predição funcional e distribuição populacional permite propor cenários farmacocinéticos/farmacodinâmicos hipotéticos. Alterações em *SLC14A1* e *SLC14A2* podem afetar o transporte de HU nos eritrócitos e túbulos renais, impactando sua reabsorção e eliminação, enquanto variantes em *SLCO1B1* podem modificar a captação hepática, alterando a concentração plasmática e o tempo de exposição ao fármaco. Essa variação interindividual pode contribuir para diferenças observadas em resposta terapêutica, produção de hemoglobina fetal (HbF) e incidência de efeitos adversos. Embora os resultados aqui apresentados não sustentem inferências clínicas diretas, eles delineiam um panorama inicial de susceptibilidade genética que poderá ser testado em modelos farmacocinéticos e estudos de associação.

O primeiro capítulo apresenta análises *in silico* de variações genéticas em três genes da família SLC. A análise de variações missenses, encontradas no banco, mostrou uma grande quantidade de mutações para os três genes, 625 para o gene *SLC14A1*, 1267 para o gene *SLC14A2* e 984 para o gene *SLCO1B1*, sendo algumas nem estudadas ou não relatadas. Nos genes *SLC14A1* (rs1058396 e rs2298720) e *SLC14A2* (rs9960464), as variantes relatadas como tendo relação ao metabolismo da HU estão entre as mais frequente na população mundial do banco *gnomAD*.

A quantidade de variantes encontradas nesses genes indica um potencial de investigações para esses genes em relação a metabolismo de fármacos, incluindo a HU, a qual pode ter interferentes dentro dos próprios genes. Dos sete genes indicados por Walker *et al.* (2011), em quatro deles não foram encontradas variações que pudessem estar relacionadas ao metabolismo da HU na literatura, o que pode abranger ainda mais as possibilidades de investigação para os demais genes dessa família de genes.

Não foram encontrados estudos envolvendo esses genes em bancos de dados genéticos que possibilitassem comparações diretas, embora ainda exista um número considerável de variações não caracterizadas. Entre eles, destaca-se o gene *SLCO1B1*,

amplamente associado à farmacologia por sua relevância no transporte de estatinas, especialmente a suvastatina. Esse gene contém 15 éxons e apresenta 984 variantes do tipo missense, das quais 404 (41%) ainda não foram investigadas.

Em relação aos estudos com HU, os estudos com os genes *SLC* ainda são bem escassos, tendo poucos dados. Em uma revisão de Sales *et al.* (2022), foi analisado genes que estão relacionados ao aumento direto dos níveis de HbF no tratamento com HU. Contudo, não está listado nenhum dos genes das famílias *SLC*, é apenas citado o rs2298720 como uma variação que atua reduzindo o metabolismo de eliminação do fármaco, deixando-o mais tempo biodisponível como relatado por Yahouédéhou *et al.* (2020)

O rs1058396 é relatado no estudo de Ginete *et al.* (2023) como expresso em grande quantidade nos eritrócitos, facilitando a distribuição de HU. Porém, é relatado que está relacionado a uma resposta pobre ao tratamento. O único estudo que aponta a ação do rs9960464 é o de Angona *et al.* (2013), que indica assim como observado para o rs2298720 como disparando um efeito mínimo na resposta molecular para ambos, sendo um estudo realizado em pacientes com Policitemia Vera (PV), uma das síndromes mieloproliferativas que pode ser tratada com HU.

O rs2291075 é bastante relatado em relação a outros fármacos, tanto como tratamento de leucemia como antimalárico (DRENBERG *et al.*, 2016; PERNAUTE-LAU *et al.*, 2021). Para HU, relatado no estudo de Ginete *et al.* (2023), indica-se essa variação como uma vantagem, porém, sem entrar em detalhes dos seus mecanismos de ação.

O número reduzido de estudos sobre a relação desses genes com o mecanismo de ação da HU ainda não nos permite compreender a ação completa deles na melhora ou resposta sobre o assunto. Dos sete genes da família *SLC*, indicados por Walker *et al.* (2011), apenas três (*SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1*) tem variantes relatadas na literatura com relação ao metabolismo de HU, enquanto os demais (*SLCO1A2*, *SLCO1B3*, *SLC22A2* e *SLC22A5*), até o presente momento, não encontram relatos sobre variantes relacionadas a esses genes que possam estar ligadas ao metabolismo da HU, abrindo uma grande possibilidade de estudos futuros para investigar.

Embora outros trabalhos mencionem muitos outros genes relacionados com a melhora no quadro clínico em tratamentos com HU, principalmente em relação a anemia falciforme, seus objetivos focam mais no efeito direto da elevação da HbF (MA *et al.*, 2007; SALES *et al.*, 2022). Embora não acrescentem os genes da família *SLC* nos

estudos, por seus efeitos serem mais relacionados ao metabolismo, mesmo não tendo um efeito direto, eles participam de mecanismos que ajudam no aumento dos níveis de HbF, como indicado por Yahouédéhou *et al.* (2020), que mostra como a variação rs2298720 dificulta a eliminação do fármaco, permitindo ficar mais tempo circulando no organismo.

As discrepâncias entre classificações dos preditores também merece destaque. O FATHMM apresentou maior tendência em indicar variante benignas, enquanto o PANTHER classificou todas as variantes do *SLCO1B1* como patogênicas e 98% das variantes de *SLC14A2* como inconclusivas. Essas diferenças decorrem dos distintos métodos de análise utilizados. O FATHMM considera conservação evolutiva, o PANTHER emprega abordagens filogenéticas e o PolyPhen-2 combina múltiplos parâmetros estruturais e funcionais, explicando as variações nas classificações.

Tais diferenças entre os preditores se dá pelo fato de terem métodos de análises distintos entre si. O FATHMM, por exemplo, considera amplamente a conservação evolutiva, enquanto o PANTHER utiliza análises filogenéticas e funcionais. Já o PolyPhen-2, combina diversas características, como a probabilidade de substituições e a localização em sítios funcionais, o que pode explicar sua maior taxa de classificações inconclusivas.

Os dados de uma análise de dados *in silico* não são completamente abrangentes, levando-se em consideração integração entre os dados gerados entre os preditores e dados de estudos clínicos para ter uma real ideia de como essas variações podem estar se manifestando na população.

O segundo capítulo explorou as frequências alélicas dos SNPs selecionados em diferentes populações: Belém, AbraOM e populações continentais do gnomAD. Em geral, a população de Belém apresentou frequências menores das variantes em relação às demais, com exceções pontuais, como a semelhança com a população africana para o rs1058396 e com as populações europeia e brasileira (AbraOM) para o rs2298720.

Os dados da população de Belém, composta por 95 indivíduos, representam a menor amostra entre as comparadas. A população do banco AbraOM, com 1171 indivíduos, também representa uma população miscigenada, oriunda de São Paulo (Naslavsky *et al.*, 2022). Já as populações do gnomAD possuem tamanhos amostrais muito maiores, variando de dezenas a centenas de milhares de indivíduos.

Os índices *Fst* revelaram graus de diferenciação moderados a grandes entre Belém e as demais populações, com maior proximidade em relação às populações sul-

asiática e europeia, e maior afastamento em relação à leste-asiática. Esse padrão reforça a singularidade genética da população de Belém e a necessidade de ampliar a representatividade regional em bancos populacionais.

A leitura integrada dos dois capítulos permite uma interpretação mais ampla. O Capítulo I evidenciou o potencial funcional das variantes selecionadas, destacando seu papel no metabolismo da HU segundo preditores e literatura. O Capítulo II demonstrou que essas mesmas variantes apresentam frequências diferenciadas na população de Belém, em comparação a populações brasileiras e continentais. Essa convergência é central: as variantes que podem influenciar a farmacocinética da HU são justamente aquelas em que a população amazônica apresenta padrões particulares de frequência.

De forma mais específica, o gene *SLC14A1*, que codifica o transportador UT-B expresso em eritrócitos, apresentou as variantes rs1058396 e rs2298720 como potenciais moduladoras do transporte e eliminação da HU. A predição *in silico* indica que ambas podem alterar a dinâmica estrutural da proteína, ainda que classificadas como benignas. A variante rs1058396, associada à distribuição eritrocitária de HU, mostrou frequência mais elevada em populações africanas e europeias, enquanto Belém se aproxima desse perfil, sugerindo possível semelhança farmacocinética no transporte eritrocitário do fármaco. Já o rs2298720, associado à redução da taxa de eliminação da HU, apresentou frequência menor em Belém do que nas populações de referência, o que pode refletir menor persistência plasmática do fármaco — hipótese a ser testada experimentalmente.

O gene *SLC14A2*, que codifica o transportador renal UTA, está implicado na regulação da excreção da HU. A variante rs9960464 apresentou discrepâncias entre preditores, o que, aliado à sua posição em região conservada do gene, sustenta sua priorização para estudos funcionais. Sua frequência mais baixa em Belém pode implicar diferenças potenciais na depuração renal da HU, afetando a exposição sistêmica e a eficácia terapêutica.

No caso do *SLCO1B1*, que codifica o transportador hepático OATP1B1, a variante rs2291075 surge como de interesse particular. Embora classificada como benigna pela maioria dos preditores, sua alta conservação estrutural e o papel central do gene na captação hepática de xenobióticos sugerem possível influência na biodisponibilidade da HU. A frequência reduzida dessa variante em Belém, em contraste com AbraOM e europeus, pode refletir diferenças na taxa de captação e metabolismo hepático do fármaco.

Consideradas em conjunto, essas observações ilustram como variantes aparentemente benignas podem, em contexto farmacogenômico, impactar o transporte, distribuição e eliminação da HU reforçando que classificações “benignas” não são sinônimo de irrelevância funcional.

Os achados reforçam a relevância de desenvolver painéis farmacogenéticos regionais, que incorporem variantes específicas dos genes *SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1*, além de outros loci moduladores da HbF como *BCL11A* e *HBSIL-MYB*. No contexto do SUS, a implementação de estratégias de medicina de precisão pode ajustar doses de HU de forma individualizada, maximizando eficácia e minimizando efeitos adversos.

Além disso, a sub-representação de populações amazônicas em bancos genéticos reforça a importância de ampliar a diversidade em estudos populacionais, de modo a evitar vieses que dificultem a aplicação universal de descobertas farmacogenômicas.

Este estudo apresenta limitações, incluindo o tamanho amostral reduzido da população de Belém, a ausência de controle por ancestralidade individual e a falta de validação clínica ou funcional dos achados. Tais fatores podem introduzir vieses e limitam a extrapolação dos resultados.

Uma limitação adicional diz respeito à ausência de controle por ancestralidade individual. Considerando que a população amazônica apresenta alta miscigenação e ampla heterogeneidade genética, essa ausência pode introduzir vieses na interpretação das diferenças alélicas observadas entre grupos populacionais. Em futuras análises, recomenda-se o uso de abordagens baseadas em componentes principais (PCA-based ancestry inference) ou de marcadores informativos de ancestralidade (AIMs), que permitem ajustar as análises genéticas à estrutura populacional. Essa incorporação contribuirá para estimativas mais precisas e maior robustez estatística na identificação de associações genéticas potencialmente relevantes no contexto farmacogenômico da HU.

Em síntese, ao integrar análises preditivas e populacionais, este estudo propõe um modelo conceitual de farmacogenômica regional aplicada à HU, no qual diferenças genéticas locais nos transportadores SLC podem contribuir para variações na absorção, distribuição e eliminação do fármaco.

Em conjunto, os resultados apresentados nos dois capítulos convergem para um mesmo ponto: a caracterização genética dos genes *SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1* na população de Belém revela tanto um grande número de variantes ainda não exploradas

quanto particularidades de frequência que distinguem a região de outras populações brasileiras e globais. Assim, este trabalho amplia o conhecimento sobre a diversidade genética regional e sua possível relação com a farmacogenômica da HU. Mais do que descrever variantes, os achados ressaltam a importância de incluir populações sub-representadas nos esforços internacionais de pesquisa, promovendo uma medicina de precisão mais equitativa e efetiva

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou uma análise abrangente de variantes missenses nos genes *SLC14A1*, *SLC14A2* e *SLCO1B1*, integrando abordagens de predição *in silico* e análises populacionais comparativas. A partir do levantamento de variantes nos bancos gnomAD, AbraOM e em uma população de Belém, foram identificados padrões consistentes de frequências alélicas que distinguem o grupo amazônico das demais populações de referência. Os resultados de *Fst* indicaram diferenciação genética moderada a alta entre Belém e as populações Leste Asiática e Africana, e valores mais baixos com as populações Europeia e Brasileira, refletindo o componente de ancestralidade mista da população local. As análises de predição funcional evidenciaram consensos e divergências entre algoritmos, destacando variantes com potencial impacto sobre o transporte de solutos e a farmacocinética da hidroxiureia (HU).

Esses achados sustentam hipóteses farmacogenômicas plausíveis, especialmente quanto à influência das variantes nos transportadores UTA e UTB (*SLC14A2* e *SLC14A1*) e OATP1B1 (*SLCO1B1*) sobre a biodisponibilidade e resposta à HU. A heterogeneidade observada entre populações pode se traduzir em diferenças regionais de eficácia e tolerabilidade, reforçando a necessidade de considerar o contexto genético local em estratégias terapêuticas e protocolos de monitoramento clínico. Embora os resultados não permitam inferências clínicas diretas, eles delineiam um panorama genético-funcional consistente e biologicamente plausível para orientar futuras investigações em farmacogenômica da anemia falciforme e de outras hemoglobinopatias tratadas com HU.

Como sugestão de estudos futuros para melhor complementar esses dados

- A realização de ensaios funcionais *in vitro* de transporte para variantes priorizadas, incluindo rs1058396 e rs2298720 (*SLC14A1*), rs9960464 (*SLC14A2*) e rs2291075 (*SLCO1B1*);
- Estudos clínicos regionais em pacientes em uso de HU, avaliando a correlação genótipo–dose–exposição–HbF–eventos adversos;
- Controle de ancestralidade genética por painéis SNP/ADMIXTURE em coortes amazônicas;
- Modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) populacional que incorpore genótipos e variáveis clínicas.

A integração entre dados genômicos, funcionais e clínicos proposta neste trabalho representa um passo inicial, porém decisivo, para a consolidação de uma abordagem farmacogenômica aplicada à HU no contexto brasileiro. Os resultados aqui apresentados contribuem para preencher uma lacuna de conhecimento sobre a diversidade genética regional e sua relevância na resposta terapêutica, estabelecendo bases concretas para o desenvolvimento de estratégias de medicina personalizada voltadas à população amazônica.

7. REFERENCIAS

ADZHUBEI, Ivan A.; SCHMIDT, Steffen; PESHKIN, Leonid; RAMENSKY, Vasily E.; GERASIMOVA, Anna; BORK, Peer; KONDRASHOV, Alexey S.; SUNYAEV, Shamil R. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 248–249, 2010. DOI: 10.1038/nmeth0410-248. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nmeth0410-248>.

ANGONA, Anna; BELLOSILLO, Beatriz; ALVAREZ-LARRÁN, Alberto; MARTÍNEZ-AVILÉS, Luz; CAMACHO, Laura; PAIRET, Silvia; FERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, Maria Concepción; ANCOCHEA, Àgueda; BESSES, Carles. Genetic predisposition to molecular response in patients with myeloproliferative neoplasms treated with hydroxycarbamide. *Leukemia Research*, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 917–921, 2013. DOI: 10.1016/j.leukres.2013.03.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2013.03.013>.

AUTON, Adam; ABECASIS, Gonçalo R.; ALTSHULER, David M.; DURBIN, Richad M.; ABECASIS, Gonçalo R.; BENTLEY, David R. A global reference for human genetic variation. *Nature*, [S. l.], v. 526, n. 7571, p. 68–74, 2015. DOI: 10.1109/EMBC.2016.7590696.Upper.

BANDEIRA, F.; PERES, JC; CARVALHO, EJ. Hidroxiuréia em pacientes com síndromes falciformes acompanhados no Hospital Hemope, Recife-PE. *Rev bras hematol ...*, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 189–194, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/0D/rbhh/v26n3/v26n3a08.pdf>. Acesso em: 7 dez. 2015.

CANÇADO, Rodolfo D.; JESUS, Joice A. A doença falciforme no Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 204–206, 2007. DOI: 10.1590/s1516-84842007000300002.

CANÇADO, Rodolfo D.; LOBO, Clarisse; ANGULO, Ivan L.; ARAÚJO, Paulo I. C.; JESUS, Joice A. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, [S. l.], v. 31, p. 361–366, 2009. DOI: 10.1590/S1516-84842009005000076. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000500015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

CHOI, Yongwook; SIMS, Gregory E.; MURPHY, Sean; MILLER, Jason R.; CHAN, Agnes P. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE*, [S. l.], v. 7, n. 10, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0046688.

DAVIES, Sally C.; GILMORE, Annette. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. *Blood Reviews*, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 99–109, 2003. DOI: 10.1016/S0268-960X(02)00074-7.

DRENBERG, C. D. *et al.* Inherited variation in OATP1B1 is associated with treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, [S. l.], v.

99, n. 6, p. 651–660, 2016. DOI: 10.1002/CPT.315. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cpt.315>. Acesso em: 14 mar. 2025.

FIGUEIREDO, Maria Stella. Agentes indutores da síntese de hemoglobina fetal. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 313–315, 2007. DOI: 10.1590/s1516-84842007000300024.

GALIZA NETO, Gentil Claudino De; PITOMBEIRA, Maria Da Silva. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 51–56, 2003. DOI: 10.1590/S1676-24442003000100011.

GENG, Xiaoqiang; ZHANG, Shun; HE, Jinzhao; MA, Ang; LI, Yingjie; LI, Min; ZHOU, Hong; CHEN, Guangping; YANG, Baoxue. The urea transporter UT-A1 plays a predominant role in a urea-dependent urine-concentrating mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, [S. l.], v. 295, n. 29, p. 9893–9900, 2020. DOI: 10.1074/jbc.ra120.013628. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7380188/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/330188/). Acesso em: 24 set. 2022.

GINETE, Catarina; DELGADINHO, Mariana; SANTOS, Brígida; PINTO, Vera; SILVA, Carina; MIRANDA, Armandina; BRITO, Miguel. Are Genetic Modifiers the Answer to Different Responses to Hydroxyurea Treatment?—A Pharmacogenetic Study in Sickle Cell Anemia Angolan Children. *International Journal of Molecular Sciences*, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 8792, 2023. DOI: 10.3390/ijms24108792. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/10/8792>.

GUDMUNDSSON, Sanna; SINGER-BERK, Moriel; WATTS, Nicholas A.; PHU, William; GOODRICH, Julia K.; SOLOMONSON, Matthew; REHM, Heidi L.; MACARTHUR, Daniel G.; O'DONNELL-LURIA, Anne. Variant interpretation using population databases: Lessons from gnomAD. *Human Mutation* John Wiley & Sons, Ltd, , 2022. DOI: 10.1002/humu.24309.

HANFT, Valerie N.; FRUCHTMAN, Steven R.; PICKENS, Chrisley V.; ROSSE, Wendell F.; HOWARD, Thad A.; WARE, Russell E. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. *Blood*, [S. l.], v. 95, n. 11, p. 3589–3593, 2000. DOI: 10.1182/blood.V95.11.3589. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/95/11/3589/253341/Acquired-DNA-mutations-associated-with-in-vivo>.

HE, Lei; VASILIOU, Konstandinos; NEBERT, Daniel W. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Human genomics*, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 195–206, 2009. DOI: 10.1186/1479-7364-3-2-195.

IYAMU, Efemwonkiewie W.; CECIL, Renee; PARKIN, Leslie; WOODS, Gerald; OHENE-FREMPONG, Kwaku; ASAKURA, Toshio. Modulation of erythrocyte arginase activity in sickle cell disease patients during hydroxyurea therapy. *British Journal of Haematology*, [S. l.], v. 131, n. 3, p. 389–394, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05772.x.

KARCZEWSKI, Konrad J. *et al.* The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Research*, [S. l.], v. 45, n. D1, p. D840–D845, 2017. DOI: 10.1093/nar/gkw971. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw971>.

KARCZEWSKI, Konrad J. *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, [S. l.], v. 581, n. 7809, p. 434–443, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2308-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>.

KUMAR, Prateek; HENIKOFF, Steven; NG, Pauline C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, [S. l.], v. 4, n. 7, p. 1073–1081, 2009. DOI: 10.1038/nprot.2009.86. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nprot.2009.86>.

LANDRUM, Melissa J.; LEE, Jennifer M.; RILEY, George R.; JANG, Wonhee; RUBINSTEIN, Wendy S.; CHURCH, Deanna M.; MAGLOTT, Donna R. ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Research*, [S. l.], v. 42, n. D1, p. 980–985, 2014. DOI: 10.1093/nar/gkt1113.

MA, Q.; WYSZYNSKI, D. F.; FARRELL, J. J.; KUTLAR, A; FARRER, L. a; BALDWIN, C. T.; STEINBERG, M. H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic determinants of response to hydroxyurea. *The pharmacogenomics journal*, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 386–94, 2007. DOI: 10.1038/sj.tpj.6500433. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17299377>.

MOUSINHO-RIBEIRO, Rita de Cassia; CARDOSO, Greice L.; SOUSA, Ítallo E. L.; MARTINS, Priscila K. C. Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. *Rev. bras. hematol. hemoter.*, [S. l.], v. 30(2), n. 91, p. 136–141, 2008. DOI: 10.1590/S1516-84842008000200012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v30n2/a12v30n2.pdf>.

NAKANISHI, Takeo. Drug transporters as targets for cancer chemotherapy. *Cancer Genomics and Proteomics*, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 241–254, 2007.

NASLAVSKY, Michel S. *et al.* Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from São Paulo, Brazil. *Nature Communications*, [S. l.], v. 13, n. 1, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-28648-3.

PERNAUTE-LAU, Leyre; ADEGNKA, Ayola Akim; ZHOU, Yitian; ZINSOU, Jeannot F.; GIL, Jose Pedro; KRISHNA, Sanjeev; KREMSNER, Peter G.; LAUSCHKE, Volker M.; VELAVAN, Thirumalaisamy P. Pharmacogene Sequencing of a Gabonese Population with Severe Plasmodium falciparum Malaria Reveals Multiple Novel Variants with Putative Relevance for Antimalarial Treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [S. l.], v. 65, n. 7, p. e00275-21, 2021. DOI: 10.1128/AAC.00275-21. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8218688/>. Acesso em: 14 mar. 2025.

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). *Scientific World Journal*, [S. l.], v. 2019, 2019. DOI: 10.1155/2019/5198931.

RAMALHO, Antonio Sérgio; MAGNA, Luís Alberto; PAIVA-E-SILVA, Roberto Benedito De. A Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 1195–1199, 2003. DOI: 10.1590/S0102-311X2003000400040. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/xcyh4WjSfT3jVPxfZNYtPhP/?lang=pt&format=html>. Acesso em: 13 nov. 2025.

ROSENFELD, Luiz Gastão; BACAL, Nydia Strachman; CUDER, Maria Alice Martins; DA SILVA, Alanna Gomes; MACHADO, Ísis Eloah; PEREIRA, Cimar Azereido; DE SOUZA, Maria de Fátima Marinho; MALTA, Deborah Carvalho. Prevalence of hemoglobinopathies in the brazilian adult population: National health survey 2014-2015. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, [S. l.], v. 22, 2019. DOI: 10.1590/1980-549720190007.supl.2.

ROTH, Megan; OBAIDAT, Amanda; HAGENBUCH, Bruno. OATPs, OATs and OCTs: The organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *British Journal of Pharmacology*, [S. l.], v. 165, n. 5, p. 1260–1287, 2012. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x.

SALES, Rahyssa Rodrigues; NOGUEIRA, Bárbara Lisboa; TOSATTI, Jéssica Abdo Gonçalves; GOMES, Karina Braga; LUIZON, Marcelo Rizzatti. 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*, [S. l.], v. 12, p. 779497, 2022. b. DOI: 10.3389/FPHAR.2021.779497/FULL. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8814522/>. Acesso em: 14 mar. 2025.

SCHALLER, Lena; LAUSCHKE, Volker M. The genetic landscape of the human solute carrier (SLC) transporter superfamily. *Human Genetics*, [S. l.], v. 138, n. 11–12, p. 1359–1377, 2019. DOI: 10.1007/S00439-019-02081-X.

SHAW, Alisa E.; MIHELICH, Mattias N.; WHITTED, Jackson E.; REITMAN, Hannah J.; TIMMERMAN, Adam J.; TEHSEEN, Muhammad; HAMDAN, Samir M.; SCHAUER, Grant D. Revised mechanism of hydroxyurea-induced cell cycle arrest and an improved alternative. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [S. l.], v. 121, n. 42, p. e2404470121, 2024. DOI: 10.1073/PNAS.2404470121. Disponível em: </doi/pdf/10.1073/pnas.2404470121?download=true>. Acesso em: 21 set. 2025.

SHAYAKUL, Chairat; HEDIGER, Matthias A. The SLC14 gene family of urea transporters. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, [S. l.], v. 447, n. 5, p. 603–609, 2004. DOI: 10.1007/s00424-003-1124-x.

SHIHAB, Hashem A.; GOUGH, Julian; COOPER, David N.; STENSON, Peter D.; BARKER, Gary L. A.; EDWARDS, Keith J.; DAY, Ian N. M.; GAUNT, Tom R. Predicting the Functional, Molecular, and Phenotypic Consequences of Amino Acid

Substitutions using Hidden Markov Models. *Human Mutation*, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 57–65, 2013. DOI: 10.1002/humu.22225. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.22225>.

SILVA, Michelle C.; SHIMAUTI, Eliana L. T. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2006. DOI: 10.1590/S1516-84842006000200016.

SMITH, C. P.; FENTON, R. A. Genomic organization of the mammalian *SLC14A2* urea transporter genes. *Journal of Membrane Biology*, [S. l.], v. 212, n. 2, p. 109–117, 2006. DOI: 10.1007/s00232-006-0870-z.

SONG, Wei *et al.* Exploring the landscape of pathogenic genetic variation in the ExAC population database: Insights of relevance to variant classification. *Genetics in Medicine*, [S. l.], v. 18, n. 8, p. 850–854, 2016. DOI: 10.1038/gim.2015.180.

STEWART, Alison. *SLCO1B1* Polymorphisms and Statin-Induced Myopathy. *PLoS Currents*, [S. l.], v. 5, n. DEC, p. ecurrents.eogt.d21e7f0c58463571bb0d9d3a19b82203, 2013. DOI: 10.1371/CURRENTS.EOGT.D21E7F0C58463571BB0D9D3A19B82203. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3871416/>. Acesso em: 28 nov. 2024.

THOMAS, Paul D.; CAMPBELL, Michael J.; KEJARIWAL, Anish; MI, Huaiyu; KARLAK, Brian; DAVERMAN, Robin; DIEMER, Karen; MURUGANUJAN, Anushya; NARECHANIA, Apurva. PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Research*, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 2129–2141, 2003. DOI: 10.1101/gr.772403. Disponível em: www.genome.org.

WALKER, Aisha L.; FRANKE, Ryan M.; SPARREBOOM, Alex; WARE, Russell E. Transcellular movement of hydroxyurea is mediated by specific solute carrier transporters. *Experimental Hematology*, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 446–456, 2011. DOI: 10.1016/j.exphem.2011.01.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2011.01.004>.

WALKER, Aisha L.; LANCASTER, Cynthia S.; FINKELSTEIN, David; WARE, Russell E.; SPARREBOOM, Alex. Organic anion transporting polypeptide 1B transporters modulate hydroxyurea pharmacokinetics. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, [S. l.], v. 305, n. 12, p. 1223–1229, 2013. DOI: 10.1152/ajpcell.00232.2013.

WALKER, Aisha L.; OFORI-ACQUAH, Solomon F. Sustained enhancement of OCTN1 transporter expression in association with hydroxyurea induced γ -globin expression in erythroid progenitors. *Experimental Hematology*, [S. l.], v. 45, p. 69–73.e2, 2017. DOI: 10.1016/J.EXPHEM.2016.09.001.

WALTERS-SEN, Lauren C.; HASHIMOTO, Sayaka; THRUSH, Devon Lamb; RESHMI, Shalini; GASTIER-FOSTER, Julie M.; ASTBURY, Caroline; PYATT, Robert E. Variability in pathogenicity prediction programs: impact on clinical diagnostics. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 99–110, 2014. DOI: 10.1002/mgg3.116.

WU, Yi; FANG, Fang; WANG, Zhaowen; WEN, Peihao; FAN, Junwei. The influence of recipient *SLCO1B1* rs2291075 polymorphism on tacrolimus dose-corrected trough concentration in the early period after liver transplantation. *European Journal of Clinical Pharmacology*, [S. l.], v. 77, n. 6, p. 859, 2021. DOI: 10.1007/S00228-020-03058-W. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8128732/>. Acesso em: 17 nov. 2024.

YAHOUÉDÉHOUE, Sètonджи Cocou Modeste Alexandre *et al.* Sickle Cell Anemia: Variants in the *CYP2D6*, *CAT*, and *SLC14A1* Genes Are Associated With Improved Hydroxyurea Response. *Frontiers in Pharmacology*, [S. l.], v. 11, n. September, p. 1–10, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.553064.

YAHOUÉDÉHOUE, Sètonджи Cocou Modeste Alexandre; ADORNO, Elisângela Vitória; DA GUARDA, Caroline Conceição; NDIDI, Uche Samuel; CARVALHO, Suellen Pinheiro; SANTIAGO, Rayra Pereira; ALELUIA, Milena Magalhães; DE OLIVEIRA, Rodrigo Mota; GONÇALVES, Marilda de Souza. Hydroxyurea in the management of sickle cell disease: pharmacogenomics and enzymatic metabolism. *Pharmacogenomics Journal*, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 730–739, 2018. DOI: 10.1038/s41397-018-0045-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41397-018-0045-1>.

YEE, Sook Wah; GIACOMINI, Kathleen M. Emerging Roles of the Human Solute Carrier 22 Family. *Drug Metabolism and Disposition*, [S. l.], v. 50, n. 9, p. 1193–1210, 2022. DOI: 10.1124/dmd.121.000702. Disponível em: <http://dmd.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/dmd.121.000702>.

ZAGO, Marco Antônio.; PINTO, Ana Cristina Silva. Fisiopatologia das doenças falciformes : da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 207–214, 2007. DOI: 10.1590/S1516-84842007000300003.

ZAGO, Marco Antônio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo. *Tratado de Hematologia*. [s.l.] : Atheneu, 2014. v. 148