



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS – MACPRO

SAIDE MARIA SARMENTO TRINDADE

**Variabilidade da resposta clínica e metabolismo da hidroxiureia: correlação com os  
haplótipos do gene *HB\*S*, hemoglobina fetal e gene *CYP2J2* em pessoas com Doença  
Falciforme no Estado do Pará**

BELÉM – PA

2018

SAIDE MARIA SARMENTO TRINDADE

**Variabilidade da resposta clínica e metabolismo da hidroxiureia: correlação com os haplótipos do gene HB\*S, hemoglobina fetal e gene CYP2J2 em pessoas com Doença Falciforme no Estado do Pará**

Defesa de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas - MACPRO, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas Profissionalizante.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Greice de Lemos Cardoso Costa

BELÉM – PA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na  
Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da  
Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a)

---

- T832v Trindade, Saide Maria Sarmiento  
Variabilidade da resposta clínica e metabolismo da hidroxiureia: correlação com os  
haplótipos do gene HB<sup>\*S</sup>, hemoglobina fetal e gene CYP2J2 em pessoas com Doença  
Falciforme no Estado do Pará / Saide Maria Sarmiento Trindade. — 2018  
XL, 40 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas (MACPRO),  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Greice de Lemos  
Cardoso Costa Coorientação: Prof. Dr. João  
Farias Guerreiro.
1. Doença Falciforme. 2. Haplótipos. 3. Hemoglobina Fetal. 4. Hidroxiureia. 5.  
Polimorfismo do GENE CYP2J2. I. de Lemos Cardoso Costa, Greice, *orient.* II. Título
-

FOLHA DE APROVAÇÃO

SAIDE MARIA SARMENTO TRINDADE

**Variabilidade da resposta clinica e metabolismo da hidroxiureia: correlação com os haplótipos do gene HB\*S, hemoglobina fetal e gene CYP2J2 em pessoas com Doença Falciforme no Estado do Pará**

Defesa de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas - MACPRO, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas Profissionalizante.

Data da aprovação: 29/05/2018

BANCA EXAMINADORA

-----  
Professora Dra. Ana Virginia Soares van den Berg

-----  
Professor Dr. José Ricardo dos Santos Vieira

-----  
Professor Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos

A minha mãe Maria da Paz pelo ensino, amor ao próximo e a busca constante pelo conhecimento.

As pessoas com Doença Falciforme pelo incentivo, para busca de melhores resultados terapêuticos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por esta oportunidade na vida profissional.

A minha mãe Maria da Paz (in memoriam) por toda dedicação e amor.

Aos meus irmãos José, Durval, Stélio (in memoriam) presente em todos os momentos.

A meus filhos Tiago, Igor, Filipe por fazerem parte da minha vida.

À Universidade Federal do Pará – MACPRO pelo aprimoramento na atividade acadêmica.

À Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Pará, ao “time HEMOPA” parceiros em todos os momentos desta jornada vida profissional.

A minha amiga Caroline Borges da Silva, grande incentivadora (in memoriam) para conclusão do mestrado.

À orientadora prof. Dra. Greice Lemos Cardoso Costa, por todo apoio científico e paciência.

A todos os profissionais da Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Pará em especial à Gerência de Hematologia Clínica, Gerência de Enfermagem, Gerência de Serviço Social, Gerencia de Arquivo Médico, Coordenadoria de Atendimento Ambulatorial, Coordenadoria de Hemoterapia. Em especial a equipe multiprofissional da Coordenadoria de Atendimento Ambulatorial por todo apoio durante esta jornada e disponibilidade e atenção da equipe da recepção de pacientes.

A coordenadora da doença falciforme no Brasil Maria Cândida Queiroz, por toda a parceria na melhoria nos cuidados as pessoas com doença falciforme.

Em especial as pessoas com Doença Falciforme do Estado do Pará por toda confiança e participação na conclusão desta pesquisa.

As pessoas que fazem parte da minha rotina; Wanja, Aline, Domingas, Luciene, Ester e Madalena por todo cuidado dispensado.

A equipe de apoio de pesquisa: Carolina, Patrícia, Anderson, Ana Lice, Rosilene, Roberta e Halyne.

‘De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre recomeçando, a certeza que precisamos continuar, e certeza de que seremos interrompidos antes de terminarmos. Portanto, devemos fazer sem interrupção um caminho novo. Da queda, um passo para a dança, do medo uma escada, de um sonho uma ponte e da procura um encontro’.

(Fernando Sabino)

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas mais uma alma humana”.

(Carl G. Jung)

## RESUMO

**Introdução:** A doença falciforme (DF) é a doença hereditária mais frequente no Brasil. Sua clínica é fortemente influenciada pelos níveis de hemoglobina fetal (HbF) exibido pelos pacientes, e por isso os efeitos clínicos e laboratoriais do tratamento da DF se fundamenta em grande parte, da indução dessa hemoglobina (HbF). A hidroxiureia (HU) é o principal agente farmacológico, utilizado há mais de 20 anos, para diminuir complicações associadas com a doença, sendo indiscutível a maior sobrevida e melhor qualidade que os pacientes com doença falciforme, em tratamento com HU passam a ter. Esse medicamento atua no aumento dos níveis de HbF na corrente sanguínea, embora esses níveis variem consideravelmente. A dificuldade do tratamento consiste no fato de que alguns pacientes não se beneficiarão em longo prazo, seja por causa de sua má administração ou ainda ausência de resposta devido a toxicidades causadas pelas reações adversas do farmaco. Desta forma, é necessário o investimento na compreensão adequada do metabolismo da HU e seus efeitos adversos, investigando fatores genéticos, como haplótipos do gene da HBB\*S e polimorfismo no gene CYP2J2 que possam modular a resposta ao tratamento da doença falciforme, e sua associação com níveis de HbF para contribuir com uma melhor adequação ao tratamento e, futuramente uma utilização mais personalizada do uso da HU, diminuindo, assim, os efeitos citotóxicos do fármaco e melhorando a qualidade de vida desses pacientes. **Método:** Foram investigados os prontuários de 100% dos pacientes tratados com a medicação, sendo selecionada a amostra de acordo com os critérios de elegibilidade da pesquisa. A amostra selecionada foi de 108 pacientes que tiveram seu material biológico coletado para análises de biologia molecular e toda sua avaliação clínica realizada em nível de prontuário. A análise dos dados englobou a avaliação da clínica do paciente, para enquadramento quanto à adesão ou não do paciente ao tratamento; da presença ou não de hepatotoxicidade e mielotoxicidade, e para a classificação quanto ao tipo de respondedor. **Resultados:** Os testes utilizados foram o teste G, exato de Fisher e Wilcoxon. Os resultados mostraram que não há associações entre as combinações haplotípicas do gene da HbS e o polimorfismo do gene CYP2J2 e presença de hepatotoxicidade e mielotoxicidade, e resposta ao uso de HU entre os pacientes com doença falciforme. **Discussão:** Na amostra de pacientes com doença falciforme do presente trabalho não foram observados resultados estatisticamente significativos em relação ao polimorfismo do gene CYP2J2 e efeitos adversos (hepatotoxicidade e mielotoxicidade) e resposta a HU. Deve-se considerar a hemoglobina fetal como um marcador de tratamento em longo prazo para as pessoas com doença falciforme no uso da hidroxiureia, onde o chamado bom

respondedor (BR) chega atingir níveis de HbF de 20%, podendo a partir deste resultado ser estipulada a dose máxima tolerada (DMT) evitando os efeitos indesejáveis de toxicidade da HU, que impacta diretamente ao risco maior de morbimortalidade. O importante é que o portador de DF mantenha o segmento adequado e com intervalos regulares, onde os efeitos indesejáveis podem ser identificados em tempo hábil, permitindo a readequação da dose. Destaca-se que 82% da amostra de pacientes que fazem tratamento na Fundação HEMOPA não apresentam hepatotoxicidade e 66% desses sem mielotoxicidade. **Conclusão:** Sugere-se que o tamanho amostral tenha interferido nos resultados, sendo necessário uma análise mais ampla sobre a função desse citocromo em relação ao metabolismo hepático da HU entre os pacientes.

**Palavras-chave:** Anemia falciforme. Haplótipos. Hemoglobina Fetal. GENE *CYP2J2*.

## ABSTRACT

**Introduction:** Sickle cell disease (SCD) is the most common hereditary disease in Brazil. Its clinic is heavily influenced by the fetal hemoglobin (FHb) levels exhibited by patients, and therefore the clinical and laboratory effects of SCD treatment are largely based on the induction of this hemoglobin (FHb). Hydroxyurea (HU) is the main pharmacological agent, used for over 20 years to decrease complications associated with the disease, and undoubtedly the higher survival and better quality than patients with sickle cell disease who are treated with HU. This drug works to increase FHb levels in the bloodstream, although these levels vary considerably. The difficulty of treatment is that some patients will not benefit in the long term, either because of their mismanagement or even lack of response due to toxicities caused by adverse drug reactions. Thus, it is necessary to invest in an adequate understanding of HU metabolism and its adverse effects by investigating genetic factors, such as HBB \* S gene haplotypes and CYP2J2 gene polymorphism that can modulate the response to sickle cell disease treatment, and its association with FHb levels to contribute to better treatment adequacy and, in the future, a more personalized use of HU use, thus reducing the cytotoxic effects of the drug and improving the quality of life of these patients. **Method:** The medical records of 100% of the patients treated with the medication were investigated, and the sample was selected according to the eligibility criteria of the study. The selected sample consisted of 108 patients who had their biological material collected for analyzes of molecular biology and all their clinical evaluation performed at the chart level. The analysis of the data included the evaluation of the patient's clinic, for framing the patient's adherence or not to the treatment; the presence or not of hepatotoxicity and myelotoxicity, and to the classification as to the type of responder.

**Results:** The tests used were the G test, the Fisher's and the Wilcoxon's exact test. The results showed that there are no associations between the haplotype combinations of the HbS gene and the CYP2J2 gene polymorphism and presence of hepatotoxicity and myelotoxicity, and response to the use of HU among patients with sickle cell disease. **Discussion:** In the sample of patients with sickle cell disease of the present study, no statistically significant results were observed regarding CYP2J2 gene polymorphism and adverse effects (hepatotoxicity and myelotoxicity) and response to HU. The Fetal hemoglobin should be considered as a long-term treatment marker for people with sickle cell disease in the use of hydroxyurea, where the so-called good responder (GR) reaches 20% HbF levels, and from this result can be stipulated the maximum tolerated dose (MTD) avoiding the undesirable

effects of HU toxicity, which directly impacts the greater risk of morbimortality. The important thing is that the SCD carrier maintains the appropriate segment and at regular intervals, where the undesirable effects can be identified in a timely manner, allowing the readjustment of the dose. It is noteworthy that 82% of the sample of patients who are treated at the HEMOPA Foundation do not present hepatotoxicity and 66% of them without myelotoxicity. **Conclusion:** It is suggested that the sample size interfered with the results, requiring a broader analysis on the function of this cytochrome in relation to the hepatic metabolism of HU among patients.

**Keywords:** Sickle cell anemia. Haplotypes. Fetal hemoglobin. GENE CYP2J2.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Incidência da Doença Falciforme no Brasil .....	12
Figura 2 - Fisiopatologia da Doença Falciforme .....	13
Figura 3 - Distribuição da Expressão do Gene CYP2J2 x Genótipo.....	28
Figura 4 - Hbf em 30 Meses de Tratamento com a HU .....	29
Figura 5 - Hbf em 30 Meses de Tratamento com a HU - CC.....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos 50 pacientes com doença falciforme investigados no presente trabalho. ....	24
Tabela 2 - Comparação entre a presença de hepatotoxicidade e haplótipos do gene da HbS entre os pacientes com doença falciforme do estado do Pará.....	25
Tabela 3 - Comparação entre a presença de mielotoxicidade e haplótipos do gene da HbS entre os pacientes com doença falciforme do estado do Pará.....	25
Tabela 4 - Comparação entre bons respondedores e maus respondedores em relação ao uso de HU e haplótipos do gene da HbS entre os pacientes com doença falciforme do estado do Pará. ....	26
Tabela 5 - Quantidade de transfusões sanguíneas e tempo de administração da HU entre os pacientes com doença falciforme. ....	26
Tabela 6 - Médias de HbF no início do tratamento e com período de 2 anos de administração da farmaco HU de acordo com os genótipos para o polimorfismo do gene CYP2J2 entre os pacientes com doença falciforme do estado do Pará. ....	27
Tabela 7 - Comparação entre os genótipos do polimorfismo no CYP2J2 em relação a hepatotoxicidade entre os pacientes com doença falciforme do estado do Pará. ....	27
Tabela 8 - Comparação entre os genótipos do polimorfismo do gene CYP2J2 e mielotoxicidade entre os pacientes com doença falciforme do estado do Pará.....	27
Tabela 9 - Comparação entre os genótipos do polimorfismo do gene CYP2J2 e bons e maus respondedores entre os pacientes com doença falciforme do estado do Pará. ....	28
Tabela 10 - Correlação do Genótipo da doença falciforme e expressão de HbF. ....	<b>Erro!</b>

**Indicador não definido.**

## LISTA DE SIGLAS

AF - Anemia Falciforme

BR - Bom respondedor

CAAE - Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde

CVO - Crise Vaso-Oclusiva

DF - Doença Falciforme

DMT - dose máxima tolerada

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMA - European Medicines Agency

FDA - Food and Drug Administration

HbF - Hemoglobina Fetal

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance

HU - Hidroxiureia

MR - Mau respondedor

OATP - Os transportadores de polipeptídios anion orgânico

STA - Síndrome Torácica Aguda

TCLE - Termo de Consentimento Livre e esclarecido

TGO - transaminase glutâmico-oxalacética

TGP - transaminase glutâmico-pirúvica

VCM - Volume Corpuscular Médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 A Anemia Falciforme .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Manifestações Clínicas e Tratamento da Doença Falciforme .....</b>	<b>13</b>
1.2.1 Hidroxiureia.....	14
<b>1.3 Fatores Genéticos da Anemia Falciforme .....</b>	<b>16</b>
1.3.1 Haplótipos relacionados com níveis de Hemoglobina Fetal .....	17
1.3.2 Polimorfismo na Região Promotora do Gene CYP2J2 (rs890293).....	18
<b>1.4 Objetivo Geral .....</b>	<b>21</b>
1.4.1 Objetivos Específicos .....	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A Anemia Falciforme

A doença falciforme (DF) é a doença monogênica mais frequente no Brasil. É uma doença hemolítica crônica causada pela tendência das moléculas de hemoglobina se polimerizar dentro das hemácias. Essa polimerização leva a deformação do eritrócito, que gera uma forma de foice nessas células, e resulta em eventos vaso oclusivos, e aumento dos processos de hemólise da corrente sanguínea. Cerca de 5 a 7% da população mundial são portadores de uma mutação em genes da hemoglobina (Modell e Darlison, 2008; OMS, 2008).

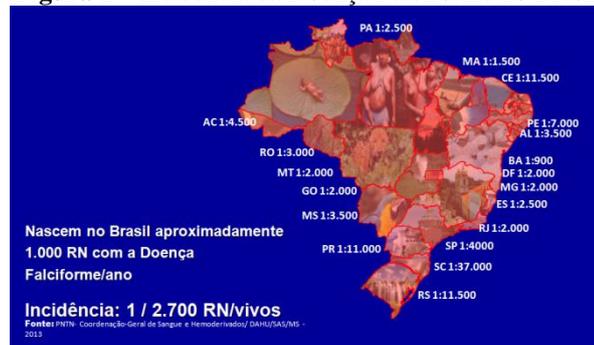
Originou-se na África, estendeu-se para a Península Arábica, sul da Itália e Índia, chegando às Américas pela imigração forçada de cerca de 3 – 4 milhões de africanos trazidos ao país como escravos. Além da África e Américas, é encontrada na Europa, em virtude da migração voluntária da África e do Caribe, principalmente para a Inglaterra, França, Bélgica, Holanda e Alemanha, e em grandes regiões da Ásia (Zago, 2001).

O termo Doença Falciforme (DF) é mais adequado, pois, refere a todos os tipos de genótipos (SS, SF, S $\beta$ , SC, SD, SE), visto que o termo Anemia Falciforme (AF) fica mais restrito ao genótipo SS.

## 1.2 Incidência

No Brasil é estimado que existam de 25.000 a 30.000 casos, sendo 3.500 novos casos por ano, onde a maior predominância é no Estado da Bahia (1:900), conforme demonstra a Figura 1.

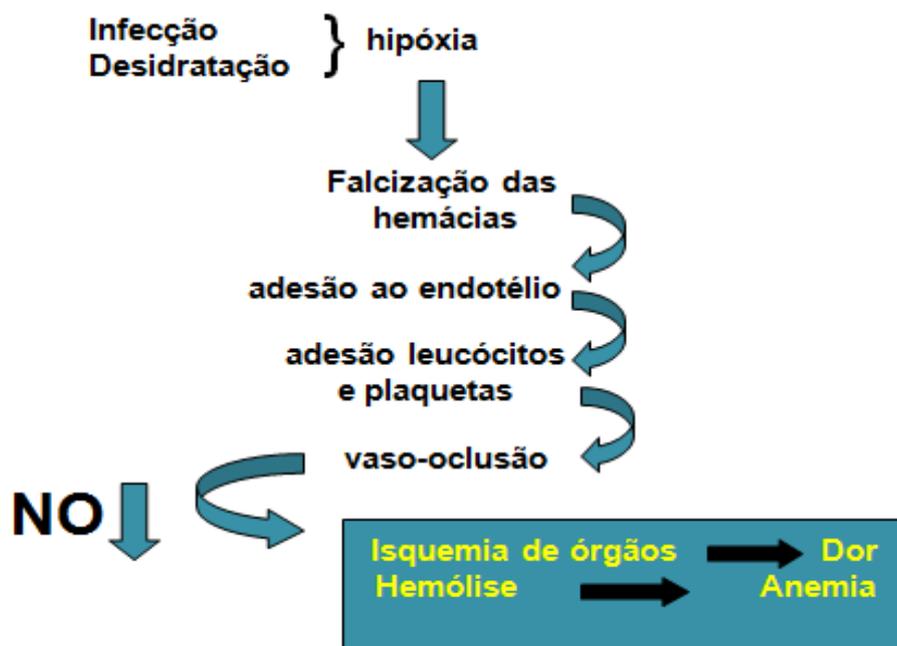
**Figura 1** – Incidência da Doença Falciforme no Brasil



Fonte: Ministério da saúde Brasil

Trata-se de uma doença monogênica, de herança autossômica recessiva devido uma mutação na sexta posição da cadeia de globina beta, onde ocorre a substituição da adenina por timina e conseqüentemente do ácido glutâmico pela valina, alterando drasticamente a forma das hemácias, tomando a forma de foice. Em condições de baixa concentração de O<sub>2</sub> organizam em longos polímeros na circulação ocasionando vaso oclusão e conseqüentemente edema do endotélio vascular dos leucócitos e plaquetas e diminuição do óxido nítrico levando a isquemia dos órgãos, como resultado dor, hemólise e anemia (Figura 2) (Zago, 2001; Modell e Darlison, 2008)

**Figura 2 - Fisiopatologia da Doença Falciforme**



**Fonte:** Adaptado pelo presente estudo.

### 1.3 Manifestações Clínicas e Tratamento da Doença Falciforme

A heterogeneidade clínica da doença está relacionada a dois principais processos patogênicos: hemólise crônica, elevada viscosidade/oclusão vascular. Episódios de infartos resultam da deposição de células falciformes em vários órgãos, principalmente naqueles onde a corrente sanguínea acontece de maneira lenta, como é o caso, por exemplo, do baço e da medula óssea. Essa deposição ocorre devido à rigidez das hemácias falcizadas e o aumento a

adesão ao endotélio vascular (Frenette, 2004, Britain et al. 2004, Britain e Parise, 2008). Também se observa retardo no crescimento e desenvolvimento infantil, palidez, icterícia, esplenomegalia, síndrome torácica aguda, crises aplásticas, doenças cerebrovasculares, úlceras dos membros inferiores, complicações esqueléticas, doenças oculares, entre outras que fazem da doença falciforme uma doença de difícil tratamento (Oredugba e Savage, 2002).

Beutler, 2006 mostrou que a cinética do afoçamento celular é bastante heterogênea e diferentes variáveis têm sido descritas afetando a taxa e o grau desses processos de falcização das hemácias.

A proporção de hemoglobina fetal (HbF) persistente no organismo tem sido, sem dúvida, o principal achado favorecendo a melhora clínica dos pacientes com Doença Falciforme (DF), uma vez que a presença desse tipo de hemoglobina, aumenta o O<sub>2</sub> nas hemácias e retarda os processos de afoçamento e tem sido associado com uma clínica mais leve da doença. E essa vantagem clínica tem sido utilizada de maneira positiva como manejo de tratamento da doença, por meio da indução de HbF nos pacientes.

Alguns fármacos e compostos podem transitoriamente induzir a expressão do gene  $\gamma$ -globina e melhorar o fenótipo clínico da doença, aumentando os níveis de hemoglobina fetal no organismo, embora os mecanismos exatos dessas farmacos e compostos químicos ainda não tenham sido completamente elucidados. Há três bem conhecidos agentes indutores de HbF: (i) butirato de sódio (um inibidor de histona-desacetilase) (Perrine et al., 2011), (ii) 5-azacitidina (um agente de desmetilação de DNA) (Mabaera et al., 2008) e (iii) hidroxureia (HU), que é a única farmaco que possui aprovação pelo FDA e EMA para tratar pacientes com hemoglobinopatias, em particular as doenças falciformes. A possibilidade dessas outras terapias ainda está em fase de investigação e observação, de acordo com sua eficácia nos processos fisiopatológicos específicos da doença, que incluem principalmente os casos de adesividade celular ao endotélio, desidratação celular e hipercoagulabilidade sanguínea (De Franceschi et al., 2004; De Franceschi, 2009).

### 1.3.1 Hidroxureia

A hidroxureia (HU) é um agente citotóxico que tem sido utilizado no tratamento de doenças mieloproliferativas: leucemia mielóide crônica, policitemia. Em pacientes com doença falciforme, esse medicamento passou a ser utilizado devido sua capacidade de indução do aumento dos níveis de produção de HbF em células falciformes, diminuindo assim as tendências de afoçamento dos glóbulos vermelhos. Além disso, a HU melhora a hidratação

celular, diminui a interação das células falciformes com o endotélio vascular e age como doador de óxido nítrico, um composto que ajuda a promover a vaso dilatação, e por isso diminui os processos vaso oclusivos. O tratamento é indicado para pacientes que apresentam manifestações clínicas de moderada a grave (Davies e Gilmore, 2003), e embora o mecanismo exato de como essa farmaco age ainda não seja completamente compreendido; sabe-se que ela atua na parada da replicação dessas células falciformes durante as diferentes fases do processo de divisão celular, o que favorece o aumento da produção de hemoglobina fetal (Lal e Vinchinsky, 2011)

A HU é o primeiro farmaco aprovado pela FDA, EMA para tratamento da Doença Falciforme (DF), em relação a eficácia, exposição e variabilidade de resposta diretamente relacionada a dose, recomendado monitoramento ao longo do tratamento, sendo a HbF (%), hemoglobina (Hb) e volume corpuscular médio (VCM) usados como biomarcadores.

Normalmente, o início do tratamento ocorre com a administração de HU na dose de 15mg/Kg, uma vez ao dia. Esses pacientes são acompanhados a cada duas semanas durante os primeiros meses. Nas próximas 8 semanas será acompanhado quinzenalmente e, se os dados hematológicos permanecerem estáveis, o acompanhamento ocorrerá mensalmente. A dosagem desse medicamento é aumentada em 2,5 a 5mg/kg a cada 12 semanas (com intervalo de 4 semanas a 6 meses) se a contagem de neutrófilos for >2000, concentração de hemoglobina >4,5g/dL, e de plaquetas >80.000mL (Beutler, 2006; Ware, 2010).

Devido o tratamento causar supressão da medula, a administração da farmaco é interrompida para permitir a recuperação medular, e então reiniciada com uma dose inferior àquela que provoca a mielosupressão (Charache et al., 1995; Davies e Gilmore, 2003). A dose limite para a terapia com HU é de 35mg/Kg, e o intervalo de tempo mínimo para avaliação da eficácia terapêutica é de 6 a 9 meses. Essas doses têm sido descritas como toleráveis pelo organismo sem que o mesmo apresente tantos efeitos adversos a sua administração. No entanto, a dose máxima deverá ser clinicada de maneira cautelosa, pois embora essa dose limite seja importante para acelerar a produção de HbF, ela só deve ocorrer sob rígido controle, uma vez que aumenta os efeitos hematológicos, por meio da diminuição de reticulócitos e neutrófilos e, conseqüentemente, os efeitos tóxicos ao organismo do paciente (Aliyu et al., 2006; Dix, 2001).

Ware et al., (2010) mostram a melhora clínica dos pacientes com anemia falciforme, quando tratados com a HU. Em crianças, os efeitos adversos são menores e por isso melhor tolerado que nos adultos. As complicações que esse tratamento pode causar incluem

mielotoxicidade, mudanças macrocíticas e megaloblásticas celulares, ulceração da boca, erupções de pele, hiperpigmentação, náuseas, entre outros.

Experiências clínicas confirmam que, em curto prazo, os efeitos tóxicos da HU mais grave é o da mielosupressão (transitória e reversível), principalmente os casos de neutropenia. A diminuição dos neutrófilos circulantes torna os pacientes mais suscetíveis a infecções bacterianas e, sem a devida atenção médica, o estado do paciente pode se tornar risco de morte. Dessa forma, a contagem absoluta dos neutrófilos é usada como limiar de toxicidade e ajuste de dose de HU durante o tratamento (Heeney e Ware, 2008).

Vosdaridou et al., (2010) mostraram que o uso prolongado do tratamento causou reticulopenia e trombocitopenia nos pacientes, com a dose mínima (15mg/kg) tendo que ser interrompido o tratamento. Outros efeitos menores de problemas gastrointestinais, náuseas, são comuns também no início do tratamento. Em longo prazo, visto que com o tratamento há uma maior expectativa de vida, é que começam as dúvidas acerca de maiores complicações, como é o caso do aparecimento de câncer devido efeitos teratogênicos, anormalidades neonatais e infertilidade.

#### 1.4 Fatores Genéticos da Anemia Falciforme

Com o advento da farmacogenética, a busca de genes que estejam associados ao metabolismo de fármacos foi fundamental para traçar novas possibilidades efetivas de rastreio, uma vez que a partir daí pode-se justificar pacientes que apresentam efeitos adversos, devido acúmulo de fármaco no organismo, pela ineficiente metabolização do medicamento, e vice-versa.

A investigação de enzimas do citocromo P450, conhecidas como CYP, é um amplo caminho de investigação, pois representa um grande número de enzimas responsáveis por oxidar várias substâncias e assim torná-las mais polares e hidrossolúveis, atuando como mediador de reações de biotransformação de fármaco com um número de substâncias exógenas (Matsumoto et al., 2002, Matsumoto e Yamazoe, 2001, Liu et al., 2006).

Embora o *CYP2J2* não seja o citocromo P450 mais altamente expresso no fígado, onde ocorre a maior parte da metabolização da HU, o produto desse gene tem sido mostrado com uma quantidade de substratos que auxiliam no metabolismo de compostos mais simples aos mais complexos nesse órgão (Matsumoto et al., 2002, Matsumoto e Yamazoe, 2001, Liu et al., 2006, Lee et al., 2010).

A razão para a intensa variação fenotípica observada em relação aos pacientes com doença falciforme que fazem tratamento com HU ainda é indefinida, mas é provável que fatores genéticos estejam interferindo em diferentes vias regulatórias envolvidas no controle da produção de globinas-gama, para indução da HbF e no metabolismo desse medicamento (Wilber et al., 2011).

#### 1.4.1 Haplótipos relacionados com níveis de Hemoglobina Fetal

Estudos moleculares pioneiros de Kan e Dozy (1978) demonstraram que a mutação que originou o gene da hemoglobina S não foi um evento único, mas ocorreu em diversos locais e em diferentes épocas, dentro e fora do continente africano, estabelecendo o conceito de origem multicêntrica para essa doença. Estudos subsequentes definiram os três principais haplótipos para a anemia falciforme: (i) Banto, (ii) Benin e (iii) Senegal, originados em regiões distintas do continente africano, e outro haplótipo, também de origem independente, foi descrito em populações provenientes da península Arábica e da Índia. A variabilidade genética em torno da mutação permitiu uma melhor compreensão da heterogeneidade clínica da doença, além de ter importância para o estudo antropológico (Zago, 1993).

Haplótipos são caracterizados por determinadas sequências de marcadores “herdadas em bloco”, observada em um cromossomo particular. Haplótipos específicos são encontrados no cromossomo portador do alelo  $\beta$ S (Bortolini; Salzano, 2002). Esses haplótipos  $\beta$ S representam diferentes origens étnicas e geográficas: (i) haplótipo Banto (BAN/CAR) originalmente identificado na República da África Central, (ii) haplótipo Benin (BEN), originado na costa oeste Africana, e (iii) haplótipo Senegal (SEN) originado no oeste da África Atlântica (Zago et al., 1999; Inati et al., 2003).

Esses haplótipos  $\beta$ S têm sido associados com a gravidade clínica da anemia falciforme, uma vez que, pelo menos dois fatores hereditários apresentam-se como interferentes: aumento da concentração de HbF, regulando de forma variável essa hemoglobina, bem como na relação final com a HbS. No haplótipo Senegal, por exemplo, a concentração de HbF está aumentada, diminuindo nos haplótipos Banto e Benin (Zago, 1993).

Abaixo estão as médias dos níveis de HbF (%) observadas entre os pacientes com anemia falciforme, de acordo com haplótipo equivalente.

- Haplótipo Bantu – HbF < 5% - Curso clínico mais grave;
- Haplótipo Benin – HbF > 5% - Curso clínico intermediário;
- Haplótipo Camarões – HbF > 5% - Curso clínico intermediário;

- Haplótipo Árabe Indiano – HbF > 5% - Curso clínico heterogêneo;
- Haplótipo Senegal – HbF > 15% - Curso clínico menos grave;

#### 1.4.2 Polimorfismo na Região Promotora do Gene *CYP2J2* (rs890293)

O papel da superfamília do citocromo p450 tem sido investigado em relação a diversas doenças humanas, ha tempos, devido apresentar um grande número de enzimas responsáveis por oxidar várias substâncias e assim torná-las mais polares e hidrossolúveis. Isso é fundamental quando se observa um grande número de doenças que apresentam diferentes respostas ao mesmo tratamento, sugerindo-se que fatores genéticos possam estar interferindo no metabolismo adequado dessas substâncias no organismo. Essas enzimas são expressas principalmente nas células do fígado e intestino delgado (Danielson, 2002).

São conhecidas cerca de 11 famílias do citocromo P450 humano, que incluem 30 enzimas ou citocromos diferentes. Apenas as famílias CYP1, CYP2 e CYP3 são importantes na biotransformação de farmacos (Audi e Pussi, 2000). A enzima do citocromo P450 2J2 (CYP2J2) humana é uma enzima que metaboliza diferentes ácidos no organismo que tem como principais funções o relaxamento do endotélio e posterior vasodilatação (Capdevila et al., 2000). Essa enzima é amplamente expressa em vários tecidos humanos, incluindo o fígado, coração, pulmão, pâncreas, bexiga e nas células endoteliais (Enayetallah et al., 2004, Fisslthaler et al., 1999, Rosolowsky et al., 1996).

A função do gene *CYP2J2* e seus metabólitos incluem a regulação da atividade dos canais iônicos (Lee et al., 1999), inibição da inflamação (Node et al., 1999), inibição da apoptose e recuperação de células endoteliais da lesão hipóxica (Yang et al., 2001).

Embora muitos estudos já tenham sido realizados com esse gene, associando-o a doenças cardíacas (Jie et al., 2010), hipertensão (Wu et al., 2007), câncer (Matsumoto et al., 2002, Matsumoto e Yamazoe, 2001, Liu et al., 2006), não se tem nada descrito em relação ao metabolismo da (HU) nas hemoglobinopatias. Desta forma, apresentam características clínicas associadas à função do gene, como inflamação, crises vaso-oclusivas, entre outras.

Embora não seja o citocromo P450 mais altamente expresso no fígado e intestino, o *CYP2J2* tem sido mostrado como mediador de reações de biotransformação de farmacos com um número de substâncias exógenas (Matsumoto et al., 2002, Matsumoto e Yamazoe, 2001, Liu et al., 2006). Lee et al., (2010) fizeram um rastreio em componentes hepáticos e identificaram cerca de oito substratos para o *CYP2J2*, incluindo agentes terapêuticos comercializados, como alendazol e ciclosporina. Devido essa diversidade de substratos de

farmacos, indo de componentes mais simples aos mais complexos, o CYP2J2 pode ser importante na mediação de respostas a medicamentos, como outros citocromos P450 amplamente estudados no metabolismo hepático de diversas farmacos, como o CYP3A4, os quais partilham vários substratos incluindo anti-histamínicos (terfenadina, astemizol e ebastina), medicamentos antineoplásicos (doxorubicina e tamoxifeno) e imunossupressores (ciclosporina).

Kaspera et al. (2014) têm mostrado a ação do CYP2J2 no metabolismo de diferentes farmacos no fígado, em comparação a outros citocromos CYP3A4/CYP3A5. Além disso, Wu et al., (2013) mostraram que o CYP2J2 e CYP2C19 foram as principais enzimas responsáveis pelo metabolismo do albendazol e fenbendazol. Por isso, embora o CYP2J2 possa ser mais expresso em outros tecidos, muitos estudos têm se empenhado em investigar sua função no fígado, tornando a pesquisa importante para avaliação desse citocromo e o metabolismo da HU entre os pacientes com anemia falciforme, que necessitam desse medicamento a vida inteira, após a decisão de realização dessa terapia.

Um polimorfismo na região promotora -50C>A (rs890293) do gene CYP2J2, conhecido como CYP2J2\*7 têm sido estudado alterando a expressão desse gene. Esta variante genética tem sido mostrada diminuindo ligações de fatores de transcrição a região promotora do gene, diminuindo, portanto, a expressão, em cerca de 50% do CYP2J2 (Spiecker et al., 2004). Em populações chinesas, essa variante aumenta o risco de doenças que têm como principais manifestações crises vasclusivas, como enfarte do miocárdio (Jie et al., 2010), doenças arteriais coronarianas (Zhu et al., 2013) e outras. Contrário a isso, estudos em populações européias, em relação a esse polimorfismo não têm mostrado suscetibilidade a essas doenças (Fava et al., 2010, Hoffmann et al., 2007). É importante ressaltar que esse tem sido o único polimorfismo no gene CYP2J2 associado com doenças.

As questões de não adesão eficiente ao tratamento com HU pelos pacientes com anemia falciforme, má administração, ou ainda ausência de resposta, muitas vezes é justificada pelo conhecimento hepatotóxico causado pelas reações adversas do medicamento, e que, em longo prazo essa medicação poderá propiciar ao organismo do paciente. Por ser a única farmaco comercializada para o tratamento das doenças falciformes, ela precisa estar adequadamente prescrita, pois sua utilização será durante a vida inteira, garantindo assim sua maior expectativa de vida.

A maioria dos pacientes que realizam o tratamento respondem de maneira satisfatória ao aumento dos níveis de HbF na corrente sanguínea, embora esses níveis variem consideravelmente entre pacientes com doença falciforme (Steinberg et al., 2013, Patrinos et

al., 2008). No entanto, cerca de 40% dos pacientes não se beneficiarão, e por isso investigar fatores genéticos e relacioná-los a parâmetros hematológicos, gravidade clínica e resposta a HU pode ser fundamentais para propiciar um tratamento mais personalizado, e com menos efeitos adversos, garantindo uma melhor qualidade e maior esperança de vida desses pacientes.

## 2 OBJETIVO GERAL

Investigar possíveis associações da resposta a hidroxiuréia com polimorfismo do gene CYP2J2, níveis de hemoglobina fetal e haplótipos do gene da hemoglobina S em pacientes com doença falciforme do estado do Pará

### 2.1 Objetivos Específicos

- Determinar as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo (rs890293) no gene CYP2J2;
- Investigar a relação desse polimorfismo com os níveis de HbF;
- Investigar a relação desse polimorfismo com a resposta ao tratamento da HU, por meio da divisão dos pacientes entre bons respondedores (BR) e maus respondedores (MR) a utilização da droga;
- Investigar a associação dos haplótipos do gene da hemoglobina S com a resposta ao tratamento da HU, por meio da divisão dos pacientes entre bons respondedores (BR) e maus respondedores (MR) a utilização da farmaco;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado na Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará – HEMOPA, referência no diagnóstico e tratamento de doenças hematológicas, em especial da Doença Falciforme, foco desta pesquisa. Os indivíduos, de cujos dados foram avaliados, e/ou seus responsáveis, foram informados e esclarecidos acerca do protocolo de pesquisa e em seguida obteve-se o consentimento para a participação no estudo mediante a assinatura do TCLE.

Garantiu-se o sigilo das informações coletadas, bem como se assegurou a privacidade e o anonimato dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Esta pesquisa contou com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade federal do Pará, CAAE 79638117.4.0000.0018 / N° 2.372.985.

Para a composição da amostra deste estudo foram avaliados 450 prontuários e selecionados inicialmente 108 pacientes com doença falciforme que realizaram tratamento com HU no período do estudo de 2014 a 2018, o que correspondia a 100% dos pacientes tratados com e HU. Na triagem da amostra, utilizaram-se os seguintes critérios de elegibilidade:

- Tratamento com HU no período mínimo de 30 meses;
- Idade a partir de 3 anos;
- Critério de uso da HU conforme protocolo do Ministério da Saúde;
- Assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e esclarecido);
- Quando menor de 18 anos o TCLE deve ser assinado pelo responsável legal;
- Condições de comparecer às consultas e de realizar exames laboratoriais periódicos;
- Teste de gravidez (beta-HCG sérico) negativo para mulheres em idade reprodutiva;
- Mulheres em idade reprodutiva devem se comprometer a usar método anticoncepcional com eficácia confirmada durante a terapia com HU.

Foram excluídos da amostra os pacientes com período de uso da HU inferior a 30 meses; e os que não apresentassem em prontuário dados para a análise da HbF no período do tratamento, bem como de outras variáveis clínicas e laboratoriais que permitissem avaliação da resposta ao tratamento com a medicação.

Desta forma, foram selecionados 50 pacientes para o estudo em tratamento com (HbF). A partir da amostra selecionada, realizou-se uma análise retrospectiva dos prontuários, buscando-se as informações seguintes, organizadas em uma planilha de Excel (2007):

- Idade, sexo, raça e tipo sanguíneo e se fenotipado;
- Hemoglobina Sérica (início do tratamento, 06, 24 e 30 meses);
- Leucócitos (início do tratamento, 06, 24 e 30 meses);
- Neutrófilos (início do tratamento, 06, 24 e 30 meses);
- Reticulócitos (início do tratamento, 06, 24 e 30 meses);
- Contagem de plaquetas (início do tratamento, 06, 24 e 30 meses);
- Hemoglobina Fetal (HbF) (início do tratamento, 06, 24 e 30 meses);
- Hemoglobina S (início do tratamento, 06, 24 e 30 meses);
- Bioquímica: TGO e TGP (início do tratamento, 06, 24 e 30 meses);
- Avaliação da necessidade transfusional e tipo de hemocomponentes transfundido (do início do tratamento até os 06, dos 18 até os 24, dos 24 até os 30 meses);
- Número de Crises vaso oclusivas (do início do tratamento até os 06, dos 18 até os 24, dos 24 até os 30 meses);

Os dados observados serviram de base para a análise quanto à adesão ou não do paciente ao tratamento e para a classificação quanto ao tipo de respondedor. Quanto ao tipo de resposta, os pacientes foram divididos entre bons (BR) e maus respondedores (MR).

De cada indivíduo foram coletados 5mL de sangue periférico utilizando EDTA como anticoagulante, para posterior extração de DNA pelo método clássico fenol-clorofórmio com adaptações. A investigação do SNP RS 890293 no GENE *CYP2J2* foi realizado pela técnica do PCR em tempo real (Real Time PCR), através da metodologia TaqMan, utilizando iniciadores e sondas desenvolvidos pelo software File Builder 3.1 da Applied Biosystems, previamente padronizados via genebank.

Os haplótipos do gene da HbS foram previamente obtidos pela análise de cinco sítios de restrição localizados na região 5' do gene  $\delta$  do complexo  $\beta$ -símile: HincII-5' $\epsilon$ ; HindIII- $\gamma$ G; HindIII- $\gamma$ A; HincII- $\psi\beta$  e HincII-3' $\psi\beta$ , de acordo com protocolo descrito por Guerreiro et al. (1992), 2: Sutton et al. (1989).

Pelas informações obtidas por meio dos prontuários, foi realizada uma análise estatística descritiva qualitativa, e elaborados tabelas conforme os objetivos da pesquisa.

Para avaliar a associação entre o genótipo (polimorfismo no gene *CYP2J2*), haplótipos do gene da HbS e variáveis hepatotoxicidade, mielotoxicidade e tipo de respondedor, foram utilizados os testes Exato de Fisher e o teste G. Para avaliar a associação do polimorfismo do gene *CYP2J2* em relação aos níveis de HbF foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para todo o

trabalho foi utilizado o nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas no programa Prisma 6.0.

#### 4 RESULTADOS

Dentre os 50 (cinquenta) pacientes incluídos no estudo que representam 100%. Onde 50% (n = 25) eram do sexo masculino e 50% (n = 25) do sexo feminino; 56% estavam na faixa etária de 11 a 20 anos (n = 28) e 28% de 21 a 30 anos (n = 14), no período analisado. A maior parte dos pacientes 56% (n = 28) apresentaram o grupo sanguíneo O+ (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização dos 50 pacientes com doença falciforme investigados no presente trabalho.

		Freq (n)	%
Sexo	Masculino	25	50,0
	Feminino	25	50,0
Idade	11-20	28	56,0
	21-30	14	28,0
	31-40	5	10,0
	41-50	2	4,0
	61-70	1	2,0
Grupo sanguíneo	A+	13	26,0
	AB+	1	2,0
	B-	1	2,0
	B+	6	12,0
	O-	1	2,0
	O+	28	56,0

Fonte: Prontuários da Fundação Hemopa

Nota: Dados trabalhados pelo autor

A comparação dos haplótipos do gene da HbS e presença de hepatotoxicidade com resposta ao uso de HU entre os pacientes com doença falciforme. Na análise, dos resultados 18% (n = 9) apresentaram hepatotoxicidade, não sendo estatisticamente significativos ( $p = 0,6141$ ,  $p = 0,8708$ ,  $p = 0,5412$ ). (Tabela 2)

Tabela 2 - Comparação entre a presença de hepatotoxicidade e haplótipos do gene da HbS entre os pacientes com doença falciforme do Estado do Pará.

Haplótipos	Hepatotoxicidade				Valor de p
	Sim	%	Não	%	
Banto Banto	1	11,1	14	34,1	0,6141
Banto Benim	5	55,6	12	29,3	
Banto Camarões	1	11,1	3	7,3	
Banto Senegal	1	11,1	4	9,8	
Benim Benim	1	11,1	5	12,2	
Benim Senegal	0	0,0	3	7,3	
	9	100,0	41	100,0	

Fonte: Prontuários da Fundação Hemopa

Nota: Dados trabalhados pelo autor

\* Teste G

A comparação dos haplótipos do gene da HbS e presença de mielotoxicidade com resposta ao uso de HU entre os pacientes com doença falciforme. Na análise, dos resultados 34% (n = 17) apresentaram mielotoxicidade, não sendo estatisticamente significativos (p = 0,6141, p = 0,8708, p = 0,5412). (Tabela 3)

Tabela 3 - Comparação entre a presença de mielotoxicidade e haplótipos do gene da HbS entre os pacientes com doença falciforme do Estado do Pará.

	Mielotoxicidade				Valor de p
	Sim	%	Não	%	
Banto Banto	6	35,3	9	27,3	0,8708
Banto Benim	6	35,3	11	33,3	
Banto Camarões	2	11,8	2	6,1	
Banto Senegal	1	5,9	4	12,1	
Benim Benim	1	5,9	5	15,2	
Benim Senegal	1	5,9	2	6,1	
	17	100,0	33	100,0	

Fonte: Prontuários da Fundação Hemopa

Nota: Dados trabalhados pelo autor

\* Teste G

A comparação dos haplótipos do gene da HbS em relação ao uso de HU (bons respondedores/BR e maus respondedores/MR) entre os pacientes com doença falciforme. Na análise, dos resultados o haplótipo Banto Banto corresponde a 38,7% (n = 12), dentro dos BR e o haplótipo Benim Senegal 6,5% (n = 2) com menor a resposta ao uso de HU, não sendo estatisticamente significativos (p = 0,6141, p = 0,8708, p = 0,5412). (Tabela 4)

Tabela 4 - Comparação entre bons respondedores e maus respondedores em relação ao uso de HU e haplótipos do gene da HbS entre os pacientes com doença falciforme do Estado do Pará.

	Respondedor				Valor de p
	Sim	%	Não	%	
Banto Banto	12	38,7	3	15,8	0.5412
Banto Benim	8	25,8	9	47,4	
Banto Camarões	3	9,7	1	5,3	
Banto Senegal	3	9,7	2	10,5	
Benim Benim	3	9,7	3	15,8	
Benim Senegal	2	6,5	1	5,3	
	31	100,0	19	100,0	

Fonte: Prontuários da Fundação Hemopa

Nota: Dados trabalhados pelo autor

\* Teste G

A Tabela 5 mostra que ao longo dos meses de administração da HU houve uma diminuição da quantidade de transfusões realizadas pelos pacientes durante os 24 meses de administração do farmaco, tendo um aumento de transfusões quando a dose de HU atinge os 30 meses de tratamento.

Tabela 5 - Quantidade de transfusões sanguíneas e tempo de administração da HU entre os pacientes com doença falciforme.

Quantidade de Transfusões	Tempo de administração da HU					
	6 meses		24 meses		30 meses	
		%		%		%
0	32	64	38	76	35	70
1 a 3	15	30	9	18	14	28
4 a 5	3	6	3	6	1	2
Total	50	100	50	100	50	100

Fonte: Prontuários da Fundação Hemopa

Nota: Dados trabalhados pelo autor

As frequências genotípicas observadas para o polimorfismo no gene *CYP2J2* (rs890293) entre os pacientes foram de 80% com genótipo CC, 18% com genótipo CA e 2% com genótipo AA, sendo 0,89 a frequência do alelo C e 0,11 do alelo A. A amostra encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p = 0,5683$ ).

As médias dos níveis de HbF antes do tratamento com HU e após a administração do medicamento, em um período de dois anos, quando a dose tende a se estabilizar estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Médias de HbF no início do tratamento e com período de 2 anos de administração do farmaco HU de acordo com os genótipos para o polimorfismo do gene *CYP2J2* entre os pacientes com doença falciforme do Estado do Pará.

Genótipos	N	Médias de HbF	
		Início	30m
CC	40	4,2%	11%
CA	9	2,8%	9,4%
AA	1	3,4%	15%

Fonte: Prontuários da Fundação Hemopa

Nota: Dados trabalhados pelo autor

A tabela 7 mostra que a comparação do metabolismo da hidroxiureia em relação à hepatotoxicidade e os genótipos polimorfismo do gene *CYP2J2* (rs890293) não foram estatisticamente significativas entre os pacientes com doença falciforme do estado do Pará ( $p = 0,2324$ ,  $p = 0,7248$  e  $p = 0,6514$ ).

Tabela 7 - Comparação entre os genótipos do polimorfismo no *CYP2J2* em relação a hepatotoxicidade entre os pacientes com doença falciforme do Estado do Pará.

Genótipo	Hepatotoxicidade				
	Sim	%	Não	%	Valor de p
CC	9	100	31	75,6	0,2324
CA	0	0	9	22	
AA	0	0	1	2,4	
Total	9	100	41	100	

Fonte: Prontuários da Fundação Hemopa

Nota: Dados trabalhados pelo autor

A tabela 8 mostra que a comparação do metabolismo da hidroxiureia em relação à mielotoxicidade e os genótipos polimorfismo do gene *CYP2J2* (rs890293), não foram estatisticamente significativas entre os pacientes com doença falciforme do Estado do Pará ( $p = 0,2324$ ,  $p = 0,7248$  e  $p = 0,6514$ ).

Tabela 8 - Comparação entre os genótipos do polimorfismo do gene *CYP2J2* e mielotoxicidade entre os pacientes com doença falciforme do Estado do Pará.

Genótipo	Mielotoxicidade				
	Sim	%	Não	%	Valor de p
CC	14	82,4	26	78,8	0,7248

CA	3	17,6	6	18,2
AA	0	0	1	3
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>100</b>	<b>33</b>	<b>100,0</b>

Fonte: Prontuários da Fundação Hemopa

Nota: Dados trabalhados pelo autor

A tabela 9 mostra que as comparações do metabolismo da hidroxureia em relação à resposta a terapia com HU (BR e MR) e os genótipos polimorfismo do gene *CYP2J2* (rs890293) não foram estatisticamente significativas entre os pacientes com doença falciforme do Estado do Pará ( $p = 0,2324$ ,  $p = 0,7248$  e  $p = 0,6514$ ).

Tabela 9 - Comparação entre os genótipos do polimorfismo do gene *CYP2J2* e bons e maus respondedores entre os pacientes com doença falciforme do Estado do Pará.

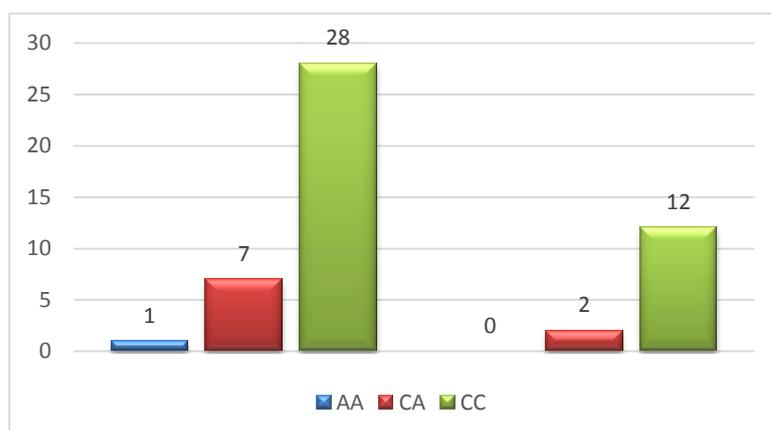
Genótipo	Resposta ao uso da HU				Valor de p
	BR	%	MR	%	
CC	25	80,6	15	78,9	0,6514
CA	5	16,1	4	21,1	
AA	1	3,2	0	0	
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>100</b>	<b>19</b>	<b>100</b>	

Fonte: Prontuários da Fundação Hemopa

Nota: Dados trabalhados pelo autor

Quanto à distribuição da expressão do gene *CYP2J2* e sua relação com o genótipo, onde AA representa o homozigoto mutante, de metabolização lenta, CA heterozigoto, de metabolização intermediária, e CC, o homozigoto selvagem, de metabolização rápida; observou-se maior relação entre o homozigoto selvagem, de metabolização rápida e o genótipo SS, contudo, o referido genótipo foi mais frequente, representando 76% da amostra (Figura 3).

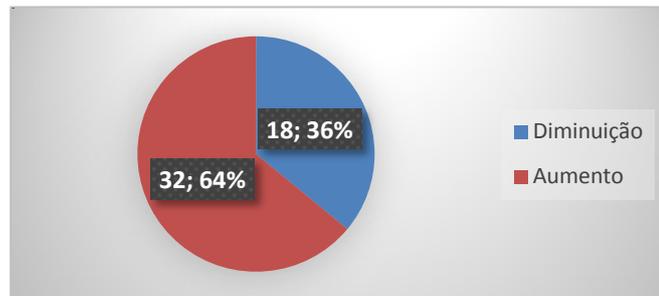
**Figura 3** - Distribuição da Expressão do Gene *CYP2J2* x Genótipo



Fonte: Hemopa

Na investigação sobre o tempo de tratamento com a HU e a indução de HbF, observou-se que após 30 meses de tratamento 32,64% dos pacientes apresentaram aumento da HbF e 18,36% diminuição (Figura 4).

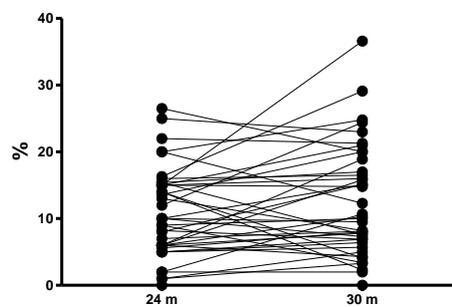
**Figura 4 - Hbf em 30 Meses de Tratamento com a HU**



**Fonte: Hemopa**

Nos pacientes os homozigotos selvagens (Figura 5), verificou-se tendência ao aumento da hemoglobina fetal após os 24 meses, com resultados significativos aos 30 meses.

**Figura 5 - Hbf em 30 Meses de Tratamento com a HU - CC**



**Fonte: Hemopa**

## 5 DISCUSSÃO

O termo “Segurança do uso da hidroxiureia” em longo prazo, em relação a toxicidade e genotoxicidade do fármaco permanece por muito como obstáculo para escolha do protocolo de tratamento para portadores de DF. Nesse estudo foram avaliados a variabilidade de resposta da HU com fatores genéticos, resposta ao tratamento da HU utilizada com tempo determinado, correlacionando com a expressão da HbF e efeitos adversos como mielotoxicidade e hepatotoxicidade dos pacientes.

Deve-se considerar a hemoglobina fetal como um marcador de tratamento em longo prazo para as pessoas com doença falciforme no uso da hidroxiureia, onde o chamado bom respondedor (BR) chega atingir níveis de HbF de 20%, podendo a partir deste resultado ser estipulada a dose máxima tolerada (DMT) evitando os efeitos indesejáveis de toxicidade da HU, que impacta diretamente ao risco maior de morbimortalidade. O importante é que o portador de DF mantenha o segmento adequado e com intervalos regulares, onde os efeitos indesejáveis podem ser identificados em tempo hábil, permitindo a readequação da dose.

Destaca-se que 82% da amostra de pacientes que faz tratamento na Fundação HEMOPA não apresentam hepatotoxicidade e 66% desses sem mielotoxicidade, efeitos adversos que dificultam a boa administração de medicamentos e terapêutica da doença. Isso provavelmente é reflexo dos cuidados de dosagens da farmaco que a equipe de saúde tem, como também pela disciplina de retorno por parte do paciente para realizar de forma adequada suas avaliações.

Os pacientes com doença falciforme necessitam de investigações genéticas para tratamento mais personalizado, visto que necessitam de tratamento ao longo de toda sua vida e tal medicamento tem alguns riscos de efeitos adversos, sendo obrigatória a parada de sua administração. Dessa forma o conhecimento das variantes genéticas que possam estar associadas às gravidades clínicas e perfil hematológico desses pacientes e estabelecer um provável prognóstico que os permita decidir sobre quais tratamentos devem ser escolhidos de acordo com esse perfil.

O polimorfismo investigado no presente trabalho está em uma região promotora do gene CYP2J2 (rs890293), diminuindo a expressão desse gene e por isso impedindo uma metabolização mais eficiente de farmacos (Spiecker et al., 2004). Em algumas populações, como na China, essa variante tem sido associada com maior gravidade clínica (Jie et al., 2010, Zhu et al., 2013) porém em outras regiões, como na Europa, essa variante não mostrou associação com nenhuma doença já estudada (Fava et al., 2010, Hoffmann et al., 2007).

As médias de HbF foram observadas antes do início do tratamento com HU e após o período de 30 meses. É importante observar que pacientes que apresentaram o alelo mutante (A) de forma heterozigota foram aqueles que tiveram menores aumentos das médias de HbF após o tratamento, o que sugere maior dificuldade de indução de HbF, devido a menor produção de enzimas do *CYP2J2* de acordo com sua diminuição de expressão dada presença da mutação. Em relação ao genótipo homozigoto, não podemos fazer nenhuma inferência.

Na amostra de pacientes com doença falciforme do presente trabalho não foram observados resultados estatisticamente significativos em relação ao polimorfismo do gene *CYP2J2* e efeitos adversos (hepatotoxicidade e mielotoxicidade) e resposta a HU. Sugere-se que isso ocorreu devido o pequeno tamanho amostral eleito para investigação do estudo. Sugere-se que a amostra seja aumentada ao total de pacientes com doença falciforme que fazem tratamento com HU no estado do Pará, para que se possa visualizar se esse polimorfismo será importante para investigações individuais sobre bons e maus prognósticos dos pacientes, e ter uma observação efetiva a respeito desse gene e HU.

## 6 CONCLUSÃO

- Não há associações entre as combinações haplótípicas do gene da HbS e presença de hepatotoxicidade e mielotoxicidade, e resposta ao uso de HU entre os pacientes com doença falciforme;

- As médias de crises vaso oclusivas e quantidade de transfusões sofreram um pequeno aumento no período de 30 meses de tratamento da HU, que pode ser devido o tipo de metabolismo do paciente, diminuindo o efeito do tratamento ou a adesão ao tratamento pelo paciente;

- O polimorfismo do gene *CYP2J2* (rs890293) não mostrou nenhuma associação com a resposta ao tratamento da HU, hepatotoxicidade, mielotoxicidade entre os pacientes com doença falciforme do estado do Pará. Isso pode ser devido o pequeno tamanho amostral utilizado no presente trabalho, sendo necessária uma investigação mais ampla do estudo.

Considerando que a AF é uma doença com riscos e sequelas e ainda pouco conhecida por muitos profissionais da área de saúde, é necessária maior divulgação nas redes de comunicação e fazer parte da matriz curricular dos cursos da área da saúde, pois todo resultado de impacto é importante para melhoria da população. Novos protocolos devem ser avaliados com a farmacogenômica, permitindo melhor resposta terapêutica e menor eventos indesejáveis, com maior adesão ao tratamento pelos portadores de doença falciforme. A medicina de precisão é um futuro permitirá o uso da dose adequada e risco menor de eventos indesejados.

## REFERÊNCIAS

- Aliyu zy, tumblin ar and kato gj. Current therapy of sickle cell disease. *Haematologica*, 91 (1): 7–11, 2006.
- Beutler e. Disorders of haemoglobin structure: sickle cell anaemia and related abnormalities. In *williams haematology*, m. A. Lichtman and w. J. Williams, eds., 47: 667–700, mcgraw-hill, new york, ny, usa, 2006.
- Brittain je and parise lv. The  $\alpha 4\beta 1$  integrin in sickle cell disease. *Transfusion clinique etbiologique*, 15(2): 19–22, 2008.
- Brittainje, han j, ataga ki, orringer ep and parise lv. Mechanism of cd47-induced  $\alpha 4\beta 1$  integrin activation and adhesion in sickle reticulocytes. *The journal of biological chemistry*, 279(41): 42393–42402, 2004.
- Capdevila jh, falck jr, harris rc. Cytochrome p450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J lipid res.* 2000;41:163–181.
- Charache s, terrin ml, moore rd et al. effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *The new england journal of medicine*, vol. 332, no. 20, pp. 1317–1322, 1995.
- Danielson p [the cytochrome p450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans](#). *Current drug metabolism*, volume 3, n° 6, pp 561-97, 2002.
- Davies sc and gilmore g. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. *Blood reviews*, 17 (2): 99–109, 2003.
- De franceschi l and corrocher r. Established and experimental treatments for sickle cell disease. *Haematologica*, 89(3): 348–356, 2004.
- De franceschi, l. Pathophysiology of sickle cell disease and new drugs for the treatment. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 1(1), 2009.
- Dix hm. New advances in the treatment of sickle cell disease: focus on perioperative significance. *Journal of the american association of nurse anesthetists*, 69 (4): 281–286, 2001.
- Elisabeth aparecida audi\* e flávia daniela pussi . Isoenzimas do cyp450 e biotransformação de farmacos. *Acta scientiarum* 22(2):599-604, 2000. Issn 1415-6814.
- Enayetallah ae, french ra, thibodeau ms, grant df. Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome p450 2c8, 2c9 and 2j2 in human tissues. *J histochem cytochem.* 2004;52:447–454. Doi: 10.1177/002215540405200403.
- Fava c, montagnana m, almgren p, hedblad b, engstrom g, berglund g, minuz p, and melander o. (2010) the common functional polymorphism -50g>t of the cyp2j2 gene is not associated

with ischemic coronary and cerebrovascular events in an urban-based sample of swedes. *J hypertens* 28:294-299.

Fisslthaler b, popp r, kiss l, potente m, harder dr, fleming i, busse r. Cytochrome p450 2c is an edhf synthase in coronary arteries. *Nature*. 1999;401:493–497. Doi: 10.1038/46816.

Frenette ps. Sickle cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion. *Microcirculation*, 11(2): 167–177, 2004.

Hassell kl, eckman jr and lane pa. Acute multiorgan failure syndrome: a potentially catastrophic complication of severe sickle cell pain episodes. *The american journal of medicine*, 96 (2):155–162, 1994.

Heeney mm, ware re. Hydroxyurea for children with sickle cell disease. *Pediatrclin north am*. 55(2):483-501, 2008.

Hoffmann mm, bugert p, seelhorst u, wellnitz b, winkelman br, boehm bo, and marz w. (2007) the -50g>t polymorphism in the promoter of the cyp2j2 gene in coronary heart disease: the ludwigshafen risk and cardiovascular health study. *Clin chem* 53:539-540.

International transporter consortium, giacomini km, huang sm, tweedie dj, benet lz, brouwer kl, chu x, dahlin a, evers r, fischer v, hillgren km, hoffmaster ka, ishikawa t, keppler d, kim rb, lee ca, niemi m, polli jw, sugiyama y, swaan pw, ware ja, wright sh, yee sw, zamek-glisczynski mj, zhang l. Membrane transporters in drug development. *Nat rev drug discov*. 2010 (3):215-36. Doi: 10.1038/nrd3028.

Jie z, hong k, jianhong t, biao c, yongmei z, and jingchuan l. (2010) haplotype analysis of the cyp2j2 gene associated with myocardial infarction in a chinese han population. *Cell biochem funct* 28:435-439.

Kalliokoski a and niemibph m. Impact of oatp transporters on pharmacokinetics.. *British journal of pharmacology* (2009), 158: 693–705.

Kan, y. M.; dozy, a. M. Polymorphism of dna sequence adjacent to human beta globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc natl acad sci*, v. 75, p. 5631-5, 1978

Kaspera r, kirby bj, sahele t, collier ac, kharasch ed, unadkat jd, and totah ra. (2014) investigating the contribution of cyp2j2 to ritonavir metabolism in vitro and in vivo. *Biochem pharmacol* 91:109118.

Kinney tr, helms rw, o'branski ee, et al. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: results of the hug-kids study, a phase i/ii trial. *Pediatric hydroxyurea group*. *Blood*. 94(5):1550-1554, 1999.

Lal a and vinchinsky ep. Sickle cell disease, in *postgraduate haematology*, a. V. Hoffbrand, d. Catovsky, e. G. D. Tuddenham, and a. R. Green, eds., vol. 7, pp. 109–125, blackwell publishing, 6th edition, 2011.

Lee ca, neul d, clouser-roche a, dalvie d, wester mr, jiang y, jones jp,3rd, freiwald s, zientek m, and totah ra. (2010) identification of novel substrates for human cytochrome p450 2j2. *Drug metab dispos* 38:347-356.

Lee hc, lu t, weintraub nl, vanrollins m, spector aa, shibata ef. Effects of epoxyeicosatrienoic acids on the cardiac sodium channels in isolated rat ventricular myocytes. *J physiol*. 1999;1:153–168. Doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0153o.x

Liu kh, kim mg, lee dj, yoon yj, kim mj, shon jh, choi cs, choi yk, desta z, and shin jg. (2006) characterization of ebastine, hydroxyebastine, and carebastine metabolism by human liver microsomes and expressed cytochrome p450 enzymes: major roles for cyp2j2 and cyp3a. *Drug metab dispos* 34:1793-1797.

Mabaera r, greene mr, richardson ca, conine sj, kozul cd, lowrey ch. Neither dna hypomethylation nor changes in the kinetics of erythroid differentiation explain 5-azacytidine's ability to induce human fetal hemoglobin. *Blood* 111(1), 411–420, 2008.

Matsumoto s and yamazoe y. (2001) involvement of multiple human cytochromes p450 in the liver microsomal metabolism of astemizole and a comparison with terfenadine. *Br j clin pharmacol* 51:133-142.

Matsumoto s, hirama t, matsubara t, nagata k, and yamazoe y. (2002) involvement of cyp2j2 on the intestinal first-pass metabolism of antihistamine drug, astemizole. *Drug metab dispos* 30:12401245.

Modell b and darlison m. “global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators,” *bulletin of the world health organization*, 86(6): 480–487, 2008.

Nagy a, sipeky c, szalai r, melegb bi, matyas p, ganczer a, toth k, melegb b. Marked differences in frequencies of statin therapy relevant slco1b1 variants and haplotypes between roma and hungarian populations. *Bmc genet*. 2015, 16:108.

Niemi m. Role of oatp transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics*. 2007, (7):787-802.

Node k, huo y, ruan x, yang b, spiecker m, ley k, zeldin dc, liao jk. Anti-inflammatory properties of cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*. 1999;285:1276–1279. Doi: 10.1126/science.285.5431.1276

Oredugba fa and savage ko. Anthropometric finding in nigerian children with sickle cell disease. *Pediatric dentistry* 24 (4): 321–325, 2002.

Patrinos gp, grosveld fg. Pharmacogenomics and therapeutics of hemoglobinopathies. *Hemoglobin* 32(1–2), 229–236,2008.

Perrine sp, wargin wa, boosalis ms et al. Evaluation of safety and pharmacokinetics of sodium 2,2 dimethylbutyrate, a novel short chain fatty acid derivative, in a phase 1, double-blind, placebo-controlled, single-dose, and repeat-dose studies in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol*. 51(8): 1186–1194, 2011.

Platt OS, Thornton BD, Brambilla DJ et al. Pain in sickle cell disease: rates and risk factors. *The New England Journal of Medicine*, 325 (1): 11–16, 1991.

Rosolowsky M, Campbell WB. Synthesis of hydroxyeicosatetraenoic (HETEs) and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1299:267–277. Doi: 10.1016/0005-2760(95)00216-2.

Santiago RP, Vieira C, Adanho CSA, Guarda CC, Santana SS, Figueiredo CVB, Aleluia MM, Pitanga TN, Fiuza LM, Maffili VV, Oliveira RM, Lyra IM, Zanette DL and Gonçalves MS. Genome wide association study of sickle cell disease individuals with stroke risk. *Blood* 2016 128:4852.

Spiecker M, Darius H, Hankeln T, Soufi M, Sattler AM, Schaefer JR, Node K, Borgel J, Mugge A, Lindpaintner K, Huesing A, Maisch B, Zeldin DC, and Liao JK. (2004) Risk of coronary artery disease associated with polymorphism of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2. *Circulation* 110:2132–2136.

Steinberg MH, Lu ZH, Barton FB, Terrin ML, Charache S, Dover GJ. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. Multicenter study of hydroxyurea. *Blood* 89(3), 1078–1088, 1997.

Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *The New England Journal of Medicine*, 340(13): 1021–1030, 1999.

Stevens NCG, Hayes RJ, and Serjeant GR. Body shape in young children with homozygous sickle cell disease. *Pediatrics*, 71(4): 610–614, 1983.

Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, 273(1):251–60.

Veith R, Galanello R, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G. Stimulation of F-cell production in patients with sickle-cell anemia treated with cytarabine or hydroxyurea. *N. Engl. J. Med.* 313(25), 1571–1575, 1985.

Vijay V, Cavenagh JD and Yate P. The anaesthetist's role in acute sickle cell crisis. *British Journal of Anaesthesia*, 80 (6): 820–828, 1998.

Voskaridou E, Christoulas D, Bilalis A, et al. The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle-cell syndromes: results of a 17-year, single center trial (LASH). *Blood*. 115(12):2354–2363, 2010.

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

Walker AL, Lancaster CS, Finkelstein D, Russell E, and Sparreboom A. Organic anion transporting polypeptide 1B transporters modulate hydroxyurea pharmacokinetics. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 304: C1223–C1229.

Ware RE. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood*, 115 (26): 5300–5311, 2010.

Wilber a, nienhuis aw, persons da. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. *Blood* 117(15), 3945–3953,2011.

World health organisation, “management of haemoglobin disorders,” in proceedings of the report of joint who-tif meeting, nicosia, cyprus, 2008.

Wu z, lee d, joo j, shin jh, kang w, oh s, lee do y, lee sj, yea ss, lee hs, lee t, and liu kh. (2013) cyp2j2 and cyp2c19 are the major enzymes responsible for metabolism of albendazole and fenbendazole in human liver microsomes and recombinant p450 assay systems. *Antimicrob agents chemother* 57:5448-5456.

Yang b, graham l, dikalov s, mason rp, falck jr, liao jk, zeldin dc. Overexpression of cytochrome p450 cyp2j2 protects against hypoxia-reoxygenation injury in cultured bovine aortic endothelial cells. *Mol pharmacol*. 2001;60:310–320.

Zago, m. A. Origem e heterogeneidade da anemia falciforme. *Boletim*, v. Xv, n 162, p. 3-8, 1993

Zhu q, fu z, ma y, yang h, huang d, xie x, liu f, zheng y, and cha e. (2013) a novel polymorphism of the cyp2j2 gene is associated with coronary artery disease in uygurpopulation in china. *Clin biochem* 46:1047-1054.

Portaria nº 55, de 29 de janeiro de 2010 – Ministério da Saúde