

ROZILDA PULQUÉRIO SALLES

**IDENTIFICAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GENE β^S E ASPECTOS
HEMATOLÓGICOS EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME EM
CAMPO GRANDE, MS**

**CAMPO GRANDE
2011**

ROZILDA PULQUÉRIO SALLES

**IDENTIFICAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GENE β^S E ASPECTOS
HEMATOLÓGICOS EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME EM
CAMPO GRANDE, MS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a D.^{ra} Maria Lúcia Ivo

**CAMPO GRANDE
2011**

FOLHA DE APROVAÇÃO

ROZILDA PULQUÉRIO SALLES

**IDENTIFICAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GENE β^s E ASPECTOS
HEMATOLÓGICOS EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME EM
CAMPO GRANDE, MS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,
para obtenção do título de Mestre.

Resultado:

Campo Grande, MS, de de 2011.

BANCA EXAMINADORA

.....
Prof.^a D.^{ra} Maria Lúcia Ivo (Orientadora/UFMS)

.....
Prof. Dr. Paulo Henrique da Silva (1º Examinador/UFPR)

.....
Prof. Dr. Wander Fernando de Oliveira Filiu (2º Examinador/UFMS)

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus queridos pais **Waldemiro** e **Ramona** (*in memoriam*), pelo amor, carinho e ensinamentos, que serviram de alicerce para minha formação pessoal e profissional.

Ao meu irmão **Ulademir** (*in memoriam*), amigo e companheiro de todas as horas.

Aos meus irmãos, cunhados(as) e sobrinhos(as), pelo apoio e incentivo em todas as fases de minha vida e pela compreensão de minha ausência em determinados momentos.

À minha querida sobrinha e afilhada **Waléria**, pela paciência e por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, presença diária em minha vida, por iluminar todos os meus caminhos.

Aos pacientes e seus responsáveis, razão da realização desse estudo, meus sinceros agradecimentos pela valiosa colaboração.

À coordenação, na pessoa do **Prof. Dr. Ricardo Aydos**, bem como todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação, Saúde e Desenvolvimento na Região do Centro Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela transmissão de seus conhecimentos e experiências.

À Direção do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, na pessoa de seu Diretor Geral **Dr. Carlos Dorsa Vieira Pontes**, e pela permissão para a coleta de dados junto aos participantes da pesquisa.

À **Direção do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul**, uma relevante contribuição, pela permissão de acesso para coleta das amostras de sangue junto aos participantes da pesquisa, e também à Direção e funcionários do **Centro de Tratamento Onco Hematológico Infantil (CETOHI)** do Hospital, pelo acolhimento junto às crianças com alterações hematológicas.

A **Prof.^a D.^{ra} Maria Lúcia Ivo**, pela orientação, profissionalismo, compreensão e amizade e por todos os ensinamentos transmitidos durante os anos de convívio. Um exemplo a ser seguido, não só pela sua dedicação ao ensino, mas também pelo seu caráter, simplicidade e humildade. A ela, todo o meu reconhecimento e gratidão.

Aos médicos hematologistas: **Luiz Henrique Mascarenhas**, **Sandra Kiomido Maia**, **Rosania Maria Bessagio**, **Luiza Alves** e em especial à **Eveny Cristini Luna de Oliveira**, que em meio aos seus compromissos profissionais estiveram dispostos a ajudar e cuja contribuição para este trabalho foi de grande importância. Meus sinceros agradecimentos.

À Mestre **Maria Aparecida Rogado Brum**, “Prof.^a Mariazinha”, pela experiência e conhecimento transmitido desde a época de graduação até o decorrer desta pesquisa. Minha Mestra, obrigada.

À minha amiga **Tatiana Mary Sakamoto**, farmacêutica e bioquímica, que confiou e acreditou na realização deste trabalho e nunca mediu esforços em ajudar em tudo o de que precisei. Sua valiosa contribuição, com certeza, foi muito importante nesta conquista. Obrigada!

Ao **Dr. Marcos André Cavalcante Bezerra**, pela grandiosa colaboração na identificação dos haplótipos. Serei eternamente grata. Obrigada!

À **Prof.^a D.^{ra} Elenir Rose Tanom Cury Pontes**, pelo valioso auxílio nos temas voltados à estatística.

Aos **funcionários do Ambulatório de Hematologia do HU/UFMS**, em especial a **Marilza**, pela receptividade e apoio junto aos pacientes.

À Farmacêutica e Bioquímica, **Luciana M. Marangoni Iglecias**, responsável pelo Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFMS, pelo apoio e compreensão nos momentos em que precisei.

À equipe de técnicos e auxiliares do laboratório de Análises Clínicas do HU/UFMS, pela atenção e auxílio na coleta das amostras, em especial a **Alcina** e a **Vera**, companheiras de todas as horas.

Aos amigos farmacêuticos e bioquímicos do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFMS, que estiveram sempre ao meu lado nessa difícil jornada, cada um contribuindo de uma forma ou de outra. Obrigada pelo apoio e torcida, em especial a **Sandra Maura Agüena**, **Maína Oliveira Nunes**, **Glaucia M. Espíndola Lima**, **Antônio José Paniago** e **Hátino Hokama**.

À amiga **Giselle Mocellin Peruzzu**, pelo incentivo e colaboração em todos os momentos dessa caminhada.

À **Marly Marques de Oliveira**, técnica de laboratório, pela amizade e dedicação nesses longos anos de convívio na sala de hematologia. Também aos técnicos **Elvis, Lucília, Agamenon e Valdeir** meus sinceros reconhecimentos.

À **Liliane de Souza Martins**, do Departamento de Farmácia e Bioquímica (NHU/UFMS), pela amizade, disposição e ajuda a qualquer momento que fosse necessário.

À Assistente Social **Maria Socorro da Silva** e à secretária **Suely de Oliveira Ferreira Alves** do Hospital Regional, pela ajuda e dedicação na abordagem aos pacientes.

Ao amigo de Pós-graduação **Luis Bernardino Lima da Silva**, pela amizade e companheirismo nas incansáveis busca aos pacientes.

Aos colegas de Pós-graduação, em especial a **Olinda, Eveny, Eliny e Ieda**, que estiveram comigo nas horas difíceis e alegres desta caminhada.

À **Vera do Nascimento e Silva** e aos demais funcionários da Secretaria do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste da UFMS, por estarem sempre dispostos em auxiliar os alunos.

RESUMO

Salles RP. Identificação dos haplótipos do gene β^S e aspectos hematológicos em indivíduos com anemia falciforme em Campo Grande, MS. Campo Grande, 2011. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

A anemia falciforme é uma doença genética determinada pela homozigose da hemoglobina S (HbS). Essa doença é marcada por variabilidade clínica dependente de fatores hereditários e adquiridos. Três características têm importância na gravidade da evolução clínica: os níveis de hemoglobina fetal (HbF), a concomitância de talassemia alfa e os haplótipos associados ao gene da globina β^S . Os haplótipos constituem importante fonte para estudos antropológicos sobre a origem étnica de uma população, além de contribuir para melhor entendimento e prognóstico da anemia falciforme. Objetivo: Identificar os haplótipos do gene β^S e dados hematológicos em indivíduos com anemia falciforme em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Material e métodos: Estudo transversal desenvolvido em indivíduos com anemia falciforme atendidos no Ambulatório de Hematologia de duas instituições públicas. A partir dos leucócitos obtidos do sangue total dos pesquisados foi extraído DNA pelo método fenol/clorofórmio e utilizado para a identificação dos haplótipos por PCR/RFLP. No sangue total foi feita a determinação dos dados hematológicos em contador de células automatizado. A HbF foi quantificada por HPLC. As variáveis analisadas consistiram em dosagem da hemoglobina fetal, eritrograma, contagem de reticulócitos, avaliação dos indicadores de hemólise e identificação dos haplótipos. Resultados: Das 47 amostras sanguíneas, 26 provieram de indivíduos do sexo feminino e 21 do masculino, a idade variou de 3 a 63 anos, com média de $(23 \pm 12,2)$ anos. Em relação ao número de cromossomos, houve predomínio de haplótipo República Centro-Africana (CAR) ou Bantu, (69,1%), seguido de Benin (21,3%), de Atípico (8,5%) e de Camarões (1,1%). Houve diferença significativa quando realizada a associação entre níveis de HbF e os tipos de haplótipos. Os parâmetros laboratoriais analisados apresentaram diferença significativa nos indivíduos que fazem uso de hidroxiureia. A média da HbF ($15,6 \pm 7,4\%$; $n=35$) foi significativamente maior nos indivíduos com a terapêutica de hidroxiureia em comparação com os que não fazem uso do medicamento ($6,8 \pm 5,1\%$; $n=12$). Conclusão: Verificou-se neste estudo pioneiro em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, que o haplótipo CAR foi o mais frequente, corroborando dados obtidos em outras regiões brasileiras.

Palavras-chave: Anemia falciforme. Haplótipos. Hidroxiureia.

ABSTRACT

Salles RP. Identification of β^S gene haplotypes and hematological features in individuals with sickle-cell anemia in Campo Grande, MS, Brazil. Campo Grande, 2011. [Master's thesis – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Sickle-cell anemia, a genetic disease caused by homozygous hemoglobin S (HbS), is characterized by clinical variability contingent on both inherited and acquired traits. Three factors play key roles in determining the severity of the disease's clinical outcome: fetal hemoglobin (HbF) levels, coexistence of α -thalassemia, and presence of haplotypes associated with the β^S -globin gene. Haplotypes are a rich source for anthropological studies on the ethnic origins of a given population, which contribute to improved understanding and better prognosis of sickle-cell anemia. Objective: To identify β^S gene haplotypes and hematological features in individuals with sickle-cell anemia in Campo Grande, the capital city of Mato Grosso do Sul state, in West-Central Brazil. Method: This cross-sectional study was conducted on individuals with sickle-cell anemia receiving treatment at the hematology outpatient clinics of two public healthcare institutions. Using the phenol-chloroform method, DNA was extracted from leukocytes obtained from whole blood and employed for identification of haplotypes by PCR-RFLP. Hematological data from whole blood were determined using an automated cell counter. HbF was quantified by HPLC. The variables investigated were fetal hemoglobin levels, erythrogram data, reticulocyte counts, hemolysis indicators, and haplotypes. Results: Of the 47 blood samples investigated, 26 were from females and 21 from males. Ages ranged from 3 to 63 years (mean, 23 ± 12.2 years). With regard to chromosome number, the CAR (or Bantu) haplotype predominated (69.1%), followed by Benin (21.3%), atypical (8.5%), and Cameroon (1.1%) haplotypes. Significant differences were found in the association between HbF levels and haplotypes. Significant differences in laboratory measurements were detected in individuals who were on hydroxyurea. Mean HbF levels ($15.6 \pm 7.4\%$, $n=35$) were significantly higher in subjects undergoing hydroxyurea therapy than in those not using the drug ($6.8 \pm 5.1\%$, $n=12$). Conclusion: This pioneering study in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, showed CAR to be the most frequent haplotype, corroborating data obtained from other regions in Brazil.

Keywords: Sickle-cell disease. Haplotypes. Hydroxyurea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção das cadeias de globinas.....	19
Figura 2 - Fisiopatologia da anemia falciforme.	23
Figura 3 - HPLC de hemoglobinas. Cromatograma referente ao HPLC de hemoglobina de um portador de anemia falciforme.....	
Figura 4 - <i>Cluster</i> β , mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação de regiões do <i>cluster</i> β (localização referente ao <i>cluster</i> β no cromossomo 11) depositados no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (ID U01317)	38
Tabela 2 - Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina β	38
Tabela 3 - Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina β	38
Tabela 4 - Tamanhos dos produtos amplificados e após clivagem com endonucleases de restrição.....	39
Tabela 5 - Número e porcentagem de indivíduos com anemia falciforme, segundo sexo, faixa etária e naturalidade. Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 ($n=47$)	40
Tabela 6 - Número e porcentagem de indivíduos com anemia falciforme, segundo a terapêutica. Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 ($n=47$).....	41
Tabela 7 - Número e porcentagem de indivíduos com anemia falciforme, segundo genótipos. Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 ($n=47$).....	41
Tabela 8 - Número e porcentagem de cromossomos ($n=94$) de indivíduos com anemia falciforme, segundo haplótipos. Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 ($n=47$)	42
Tabela 9 - Média e desvio padrão das variáveis laboratoriais de indivíduos com anemia falciforme, segundo genótipos. Ambulatórios de	

Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 ($n=47$)	42
Tabela 10 - Média e desvio-padrão de parâmetros laboratoriais de indivíduos com anemia falciforme, segundo o uso ou não de hidroxiureia, Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 ($n=47$).	43
Tabela 11 - Média e desvio padrão dos valores da HbF (%) de indivíduos com anemia falciforme, segundo os genótipos e uso ou não de hidroxiureia, Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 ($n=47$).	44

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

Atp	- Atípico
Ben	- Benin
Bi	- Bilirrubina indireta
bp	- Pares de base
Cam	- Camarões
CAR	- Bantu ou República Centro-Africana
CHCM	- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DHL	- Desidrogenase láctica
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
Hb	- Hemoglobina
HbAS	- Hemoglobinas A e S
HbF	- Hemoglobina fetal
HbS	- Hemoglobina S
HbSS	- Homozigose para hemoglobina S
HCM	- Hemoglobina Corpuscular Média
He	- Hemácias
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Performance
HRMS	- Hospital Regional de Mato Grosso do Sul
HU	- Hospital Universitário
ICAM	- Molécula de adesão intercelular
IL	- Interleucina
kDa	- Quilodalton

MS	- Mato Grosso do Sul
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
Ret	- Reticulócitos
RFLP	- Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
Sen	- Senegal
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
UFMS	- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VCAM	- Molécula de adesão vascular
VCM	- Volume Corpuscular Médio
VG	- Volume Globular
VLA-4	- Antígeno de ativação tardio tipo 4
α	- Alfa
β	- Beta
β^S	- Alelo beta S
γ	- Gama
δ	- Delta
ϵ	- Épsilon
ζ	- Zeta
ψ	- Pseudogene

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 HEMOGLOBINOPATIAS	18
2.2 A MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA	18
2.3 HEMOGLOBINA S	20
2.4 ANEMIA FALCIFORME	21
2.4.1 Fisiopatologia da anemia falciforme	22
2.4.2 Manifestações clínicas	24
2.5 HAPLÓTIPOS E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	24
2.6 INTERFERENTES QUE PODEM MINIMIZAR AS CRISES FALCIFORMES	27
2.6.1 Hemoglobina fetal	28
2.6.2 Hidroxiureia	28
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 TIPO DE ESTUDO	31
4.2 VARIÁVEIS	31
4.3 POPULAÇÃO/AMOSTRA	31
4.3.1 Critérios de inclusão	31
4.3.2 Critérios de exclusão	32
4.4 ASPECTOS ÉTICOS	32
4.4.1 Comunicado aos profissionais de saúde	32
4.4.2 Abordagens aos participantes da pesquisa	32
4.4.3 Resultados dos exames	33
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4.6 PROCEDIMENTO DE ANÁLISE	33
4.6.1 Eritrograma	34

4.6.2	Contagem de reticulócitos.....	34
4.6.3	Dosagem de hemoglobina fetal	34
4.6.4	Dosagem da desidrogenase láctica (LDH) e bilirrubina total e frações	35
4.6.5	Técnica para a extração de DNA	35
4.6.6	Determinação dos Haplótipos β^S – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	37
4.6.7	Análise de Restrição – Restriction Fragment Length Polymorphism	39
5	RESULTADOS	40
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	APÊNDICES	57
	ANEXO	67

1 INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias são distúrbios genéticos resultantes de alterações dos genes da síntese da globina que determinam as hemoglobinas (Hb) variantes e/ou talassemias. São as doenças hereditárias mundialmente mais comuns e causam considerável morbimortalidade (STEINBERG et al., 1997).

Entre as hemoglobinopatias, a anemia falciforme é a forma que apresenta maior gravidade clínica e hematológica, além de ser a mais prevalente (NAOUM, 2000; SILVA; RAMALHO, CASSORLA, 1993). Com base nos dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal, calcula-se que nasçam por ano, no Brasil, cerca de 3.500 crianças com doença falciforme e 200 mil de portadoras de traço falciforme, condições estas que configuram um importante problema de saúde pública (SIMÕES et al., 2010).

As características clínicas e hematológicas dos indivíduos com anemia falciforme são influenciadas por fatores genéticos, tais como a concentração de hemoglobina fetal (HbF), a presença simultânea de α -talassemia e os haplótipos do *cluster* da globina β (FALUSI; OLATUNGI, 1994; POWARS; HITI, 1993; STEINBERG, 1996).

A HbF constitui um dos marcadores genéticos de grande relevância para o indivíduo portador do gene da globina S. Em concentrações elevada, inibe a polimerização da hemoglobina S (HbS), com consequente redução de crises álgicas e de crises hemolíticas (STEINBERG, 2005).

A hidroxiureia é um agente terapêutico aprovada pela Food and Drug Administration para tratamento das doenças falciformes de moderada a severa gravidade. Sua principal função é estimular a síntese de HbF (FATHALLAH; ATWEH, 2006). Segundo Davies e Gilmore (2003), a hidroxiureia também influencia os parâmetros hematológicos, como evidenciado pelo aumento da concentração de Hb e do volume corpuscular médio (VCM) e pela redução da contagem de reticulócitos, levando a diminuição dos fenômenos vaso-oclusivos e de hemólise, consequentemente proporcionando melhor qualidade de vida.

Os haplótipos são importantes para estudos antropológicos. Sua investigação também tem permitido correlacionar sua presença com o prognóstico clínico dos indivíduos com anemia falciforme. Cinco haplótipos foram identificados para o gene da globina beta S (β^S), com denominações vinculadas ao local de sua origem. São eles: haplótipo República Centro-Africana (CAR), também chamado Bantu; Benin (Ben); Senegal (Sen); Camarões (Cam); e Árabe-Indiano. Estes estão associados a um quadro clínico e níveis de HbF variados, sendo que o haplótipo CAR está associado a níveis diminuídos de HbF (<5%) e quadro clínico mais grave; o haplótipo Ben, a níveis medianos de HbF (5% a 15%) e curso clínico intermediário; e o haplótipo Sen a níveis elevados de HbF (>15%) e curso clínico menos grave da doença. Os portadores do haplótipo Árabe-Indiano apresentam níveis elevados de HbF e curso clínico heterogêneo (NAGEL, 1984; POWARS, 1991).

O estudo dos haplótipos do gene β^S contribui para melhor entendimento da variabilidade clínica e prognóstico da anemia falciforme e trás indicadores para a condução terapêutica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HEMOGLOBINOPATIAS

As hemoglobinopatias são afecções hereditárias que afetam os genes responsáveis pela síntese de cadeias de globinas da Hb. Dois defeitos principais podem ocorrer: os estruturais e os de ritmo de síntese, que levam a menor sobrevivência das hemácias (He) e conseqüentemente à anemia crônica (STEINBERG et al., 1997).

Segundo Higgs e Weatherall (2009), aproximadamente 7% da população mundial são portadores de hemoglobinopatias e a cada ano 300.000 a 500.000 crianças nascem com alguma forma homozigota ou heterozigota da doença.

2.2 A MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA

A Hb é uma proteína presente no interior dos eritrócitos com peso molecular aproximado de 64 kDa. Sua função é absorver, transportar e distribuir oxigênio aos diversos tecidos do organismo. A molécula de hemoglobina é globular, tetramérica e formada por quatro cadeias de globinas (duas do tipo α e duas do tipo β) e o grupo heme, que é composto pelo complexo ferroprotoporfirina IX (NAOUM, 1997; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

A síntese das cadeias de globinas α é realizada por um grupo de genes localizados no braço curto do cromossomo 16, grupo este constituído por genes α estruturais (α_1 , α_2), gene zeta (ζ_2) e três pseudogenes ($\psi\zeta$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$). Os pseudogenes (ψ) apresentam sequência homóloga à de genes estruturais ativos, porém contendo mutações que inibem sua expressão (NAOUM, 1997; ZAGO, 2004).

Os genes que codificam as cadeias de globinas β estão localizados no braço do cromossomo 11, numa região com 60.000 pares de bases (60 kbp) e compreendem cinco genes funcionais: épsilon (ϵ), gama (γ^A , γ^G), delta (δ), β e um pseudogene ($\psi\beta$) (ZAGO, 2004).

Em cada estágio do desenvolvimento humano, diferentes cadeias de globinas são sintetizadas e como consequência há diferença no tipo de Hb durante os períodos embrionário, fetal e de vida adulta. No período embrionário, a Hb Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$) predomina nas quatro semanas iniciais da gestação e a Hb Gower II ($\zeta_2\gamma_2$) e a Hb Portland ($\alpha_2\varepsilon_2$) estão presentes até a 12.^a semana. No período fetal, os pares de cadeias α e γ ($\alpha_2\gamma_2$) formam a HbF, cuja produção inicia-se a partir da 12.^a semana de gestação e predomina até o sexto mês após o nascimento. Na 25.^a semana de gestação, tem início a síntese da HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), que, assim como a HbF, se estabiliza no sexto mês de vida extrauterina, com níveis que variam de 2,0% a 3,5%. A HbA₁ ($\alpha_2\beta_2$) é sintetizada a partir da 10.^a semana de gestação, mantendo-se com níveis próximos a 10% e passando a predominar na vida adulta com níveis de 96% a 98% (Figura 1) (NAOUM, 1997; GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003; HIGGS; WEATHERALL, 2009).

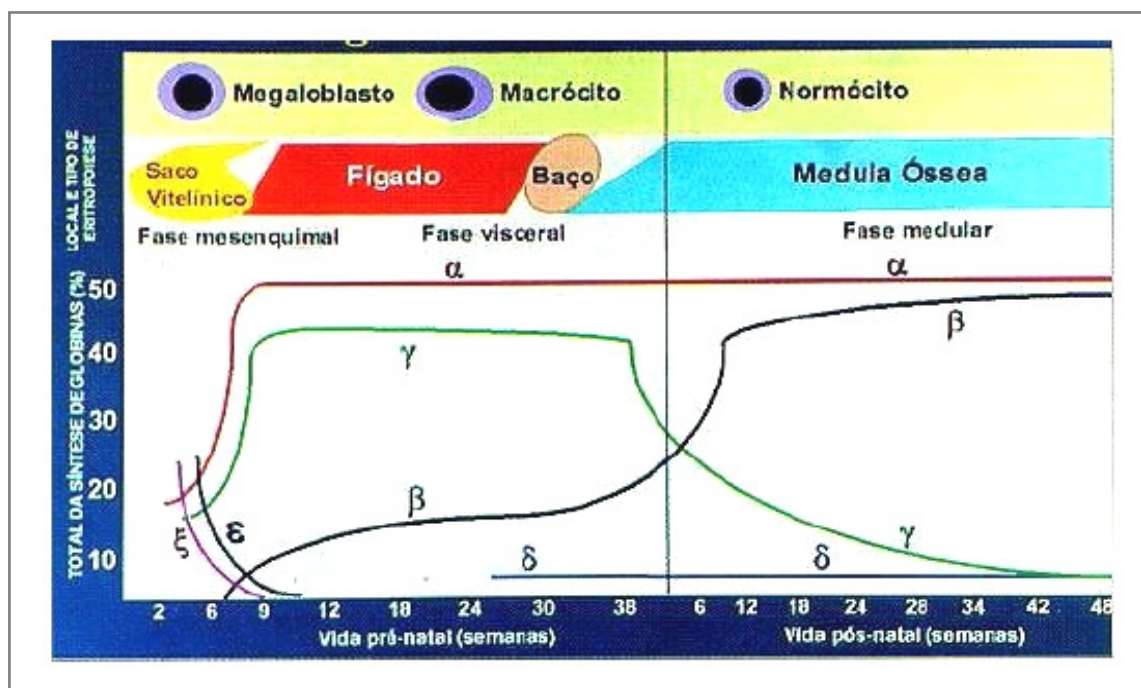


Figura 1 - Produção das cadeias de globinas.

Fonte: Adaptado de Weatherall e Clegg (1981).

2.3 HEMOGLOBINA S

A HbS é decorrente de uma mutação pontual (GAG → GTG) no sexto códon do gene da globina β , levando à substituição do ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia polipeptídica, causando uma alteração estrutural na molécula da Hb (GONÇALVES et al., 2003; ZAGO; PINTO, 2007; SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009; THEIN; MENZEL, 2009).

O gene da HbS foi introduzido nas Américas pelo tráfico de escravos africanos, do século XVI ao XIX (ZAGO; FIGUEIREDO; OGO, 1992). No Brasil, os africanos que entraram na condição de escravos no período de 1550 a 1850 provinham das regiões da Costa da Mina e de Angola, estendendo até Cabo Verde. Regiões africanas como Cacheu, Cabo Verde, Moçambique e Madagascar também contribuíram para a presença de indivíduos negros no Brasil (NAOUM; NAOUM, 2004).

A distribuição do gene β^S na população brasileira é heterogênea. Nas regiões Norte e Nordeste, a prevalência de heterozigoto para HbS varia de 6% a 10%; nas regiões Sul e Sudeste de 2% a 3% (CANÇADO; JESUS, 2007); na região Centro-Oeste de 3,1% de heterozigotos para HbS (NAOUM, 2000).

Em um estudo realizado por Brum et al. (1997) em Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS), entre as 1.271 amostras de sangue de pessoas consideradas sadias foi identificada a presença de 3,15% de heterozigotos para HbS. Em outro estudo epidemiológico, Brum (2001) analisou 463 indivíduos de quatro comunidades afro-brasileiras em Mato Grosso do Sul (Furnas de Dionísio, Furnas da Boa Sorte, Morro do Limão e São Benedito) encontrando frequência de hemoglobinopatias de 3,85% de HbAS na comunidade de São Benedito e 28,8% de HbAC em Furnas de Dionísio. Nas demais comunidades não foram encontradas alteração da Hb.

Trabalho realizado por Holsbach et al. (2008) sobre resultados de triagem neonatal para hemoglobinopatias de 190.809 indivíduos no Instituto de Pesquisas, Ensino e Diagnósticos da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (IPED/APAE) de Mato Grosso do Sul no período de 2000 a 2005, foi observado a

presença de 2.624 casos (1,38%) de alterações para o gene β^S .

Na pesquisa realizada por Sakamoto (2008) no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU/UFMS), entre as 233 amostras sanguíneas de gestantes atendidas no serviço ambulatorial de ginecologia foi verificada a presença de 3% de HbAS.

2.4 ANEMIA FALCIFORME

Anemia falciforme é uma doença genética determinada pela homozigose para hemoglobina S (HbSS). Este genótipo apresenta maior gravidade clínica e hematológica em relação à morbidade e mortalidade no indivíduo acometido. O quadro clínico é caracterizado por anemia hemolítica crônica e episódios vaso-oclusivos de repetição (NAOUM; NAOUM, 2004).

Os exames laboratoriais nas anemias hemolíticas evidenciam sinais de aumento da destruição eritrocitária, observada pela elevação da bilirrubina sérica bilirrubina indireta (Bi) e do urobilinogênio e pela ausência de haptoglobinas séricas, além de sinais de aumento da produção de eritrócitos, como reticulocitose (policromatofilia) e hiperplasia eritróide da medula óssea (PETTIT; HOFFBRAND; MOSS, 2006).

Nas doenças falciformes, a destruição dos eritrócitos é acelerada. A vida média normal das hemácias, de 120 dias, é reduzida entre 5 a 15 dias na anemia falciforme. Dessa maneira o indivíduo apresenta anemia hemolítica crônica, com concentração de Hb de 6 a 9 g/dL, volume globular (VG) de 18% a 32% e contagem de reticulócitos (Ret) entre 5% a 15% (STEINBERG, 2008). Essa variação na sobrevivência dos eritrócitos reflete-se em alterações dos marcadores de hemólise, incluindo contagem elevada de reticulócitos e aumento dos níveis de bilirrubinas de desidrogenase láctica (DHL) (SCHIFFMAN, 2004; STEINBERG, 2008).

2.4.1 Fisiopatologia da anemia falciforme

O mecanismo fisiopatológico primário da anemia falciforme consiste na mutação de ponto (GAG → GTG) no gene da globina β , originando formação de HbS, que quando desoxigenada sofre polimerização, resultando em uma série de alterações na morfologia e função da He, levando a acentuada redução de sua deformabilidade, o qual abrevia o tempo de vida da célula, levando a anemia crônica, além de provocar fenômenos vaso-oclusivos (STEINBERG, 1999; ZAGO; PINTO, 2007).

O processo de vaso-oclusão é determinado por uma complexa interação de diferentes tipos celulares. Dentre eles estão: células falcizadas densas e desidratadas, reticulócitos, células endoteliais anormalmente ativadas, leucócitos, plaquetas e fatores do plasma (SOLOVEY et al., 1997).

Os eritrócitos falciformes expressam número maior de moléculas de adesão na superfície externa da membrana celular (fosfatidilserina, CD36, CD47, CD49d e BCAM/LU), que em células normais encontram-se restritas à superfície interna da membrana. Essas moléculas favorecem a interação com o endotélio e com outras células, propagando o processo vaso-oclusivo (ZAGO; PINTO, 2007; SONATI; COSTA, 2008).

Os reticulócitos expressam uma quantidade maior dos antígenos CD36 e VLA-4, como estão elevados nos indivíduos com doença falciforme, podem também, promover adesão ao endotélio e contribuir para o fenômeno vaso-oclusivo (SONATI; COSTA, 2008).

O endotélio de indivíduos com doença falciforme apresenta expressão aumentada de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1), de moléculas de adesão vascular (VCAM-1) e do fator tecidual, devido aos níveis elevados de citocinas inflamatórias. Elas interagem com moléculas de adesão presentes nos eritrócitos falciformes e leucócitos, contribuindo para a ocorrência do fenômeno de vaso-oclusão (FRENETTE; ATWEH, 2007; SONATI; COSTA, 2008).

A vaso-oclusão recorrente, com consequente ativação e dano de células endoteliais vasculares, induz uma resposta inflamatória contínua nos indivíduos com anemia falciforme, que se propaga por elevados níveis de citocinas inflamatórias (IL, TNF- α), estresse oxidativo e uma diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (CONRAN; COSTA; 2009).

O óxido nítrico é sintetizado principalmente pelas células endoteliais a partir do aminoácido L-arginina por ação da enzima óxido-nítrico-sintetase. É um regulador do tônus da musculatura lisa vascular e sua principal função é promover a vasodilatação pelo relaxamento da musculatura do vaso. É também importante inibidor da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e da ativação de leucócitos. A redução de sua biodisponibilidade resulta em vasoconstrição, com aumento de ativação plaquetária e de expressão das moléculas de adesão nos leucócitos e nas células endoteliais, contribuindo assim para o processo vaso-oclusivo, como ilustrado na Figura 2 (FIGUEIREDO, 2007; CONRAN; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009; STYPULKOWSKI; MANFREDINI, 2010).

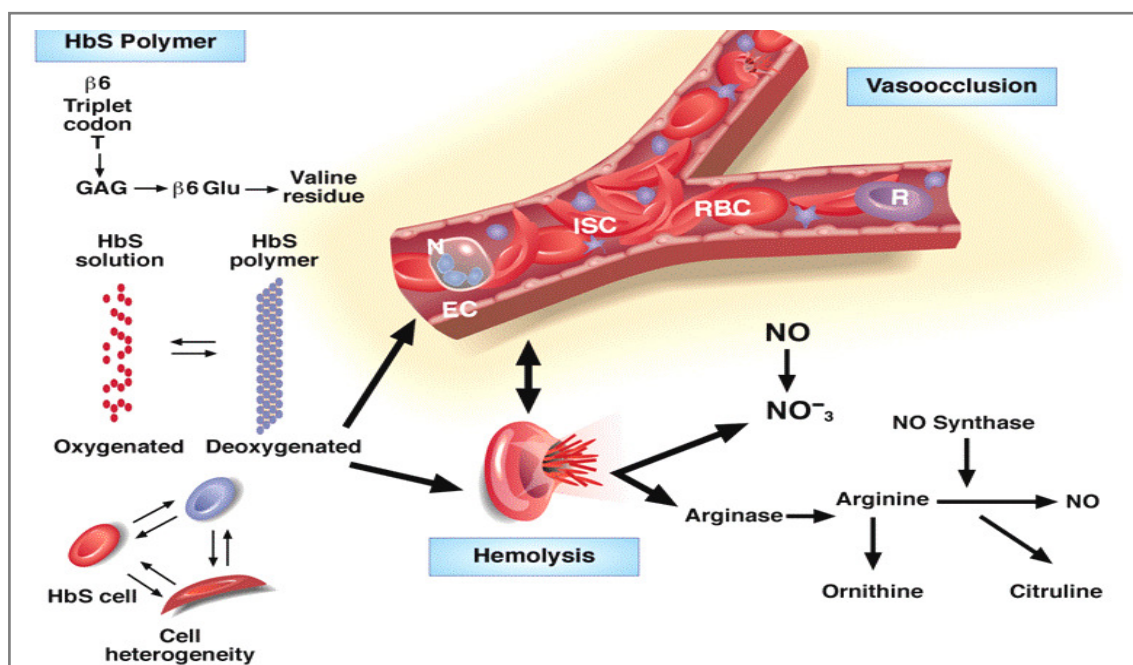


Figura 2 - Fisiopatologia da anemia falciforme.

Fonte: Steinberg (2008).

2.4.2 Manifestações clínicas

Em indivíduos com anemia falciforme, as constantes crises hemolíticas levam a um quadro de anemia crônica, icterícia, esplenomegalia, hepatomegalia e alterações ósseas. A vaso-oclusão representa o evento fisiopatológico determinante na origem da maioria dos sinais e sintomas no quadro clínico desses indivíduos, incluindo artralgias, dactilite, úlcera de membros inferiores, síndrome torácica aguda, sequestro esplênico, priapismo, necrose asséptica da cabeça do fêmur, hipostenúria, hematúria, acidente vascular cerebral, hipertensão pulmonar e retinopatia. Além disso, pode levar à destruição progressiva do baço e consequentemente à autoesplenectomia, sendo responsável pela alta suscetibilidade a infecções graves, que estão entre as principais causas de morte em todas as idades nesse grupo de indivíduos (BALLAS; MOHANDAS, 1996; KAUL; FABRY; NAGEL, 1996; SERJEANT, 1997).

Das complicações que afetam os indivíduos com anemia falciforme, algumas predominam ou se restringem a determinada faixa etária. Complicações tardias, como insuficiência cardíaca e renal, retinopatia e cálculos biliares, demandam uma evolução da lesão tissular para se manifestarem, ao passo que a dactilite (síndrome de mão-pé) se restringe aos primeiros dois anos de idade (ZAGO; PINTO, 2007).

2.5 HAPLÓTIPOS E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O primeiro trabalho que identificou o polimorfismo genético em sítios de clivagem de endonucleases de restrição no gene β foi realizado por Kan e Dozy (1978), que observaram a existência de um sítio polimórfico relacionado com a HbS na região flanqueadora do gene da globina β . Estudos posteriores analisaram indivíduos de diferentes regiões africanas e concluíram que cada população apresentava alta frequência de um tipo específico de haplótipo. Na Península Árabe e na Índia revelou a presença de um haplótipo que diferiu daqueles encontrados na África (PAGNIER et al., 1984)..

Os haplótipos são associados com grupos étnicos. Os cinco principais haplótipos no gene β^S foram denominadas de acordo com a área geográfica em que foram encontrados: o haplótipo Ben predomina no ocidente centro-africano (Togo, Benin, Burkina Fasso e Nigéria); o haplótipo CAR (República da África Central), na África Central (Gabão, República Centro-Africana, Congo, Zaire e Angola); o haplótipo Sen prevalece no litoral atlântico africano (Senegal, Gâmbia, Guiné, Guiné-Bissau, Serra Leoa e Libéria); o haplótipo Cam é encontrado no grupo étnico Eton, em Camarões; e o Árabe-Indiano ocorre na Índia e na Península Arábica (NAOUM, 1997; RODRIGUEZ ROMERO; SÁENZ RENAULD; CHAVES VILLALOBOS, 1998).

A maioria dos cromossomos do gene β^S apresenta um dos cinco haplótipos comuns, uma minoria (5% a 10%) está associada com haplótipos menos comuns, referidos como haplótipos Atípicos (Atp). Estes, provavelmente, são gerados por diversos mecanismos genéticos, que incluem mutações pontuais nos sítios polimórficos de restrição; simples ou duplas trocas entre dois haplótipos β^S típicos e um haplótipo β^A diferente presente numa população; e conversões gênicas (ZAGO; SILVA JR., DALLE, 2000).

Embora os haplótipos apresentem efeito modulador na doença, têm pouca influência na sobrevivência de indivíduos com anemia falciforme (STEINBERG, 2005; THEIN, 2008). Cardoso e Guerreiro (2006) não encontraram diferença significativa na sobrevivência relacionada aos haplótipos β^S , uma vez que a frequência dos diferentes haplótipos foi similar nos grupos etários por eles analisados (1-10 anos, 11-20 anos e acima de 20 anos).

A distribuição dos haplótipos da globina β mostra o perfil geográfico de origem africana no Brasil. Foi introduzido por meio do tráfico escravo nos séculos XVII e XVIII, com alta proporção do haplótipo CAR ou Bantu em várias regiões brasileiras. Estudos relatam que cerca de 2,4 milhões de escravos africanos, foram trazidos para o Brasil, 70% dos quais originários de Angola, do Congo e de Moçambique, onde o haplótipo CAR é predominante (NAOUM, 1997; CURTIN (1969).

Um estudo de Pante-de-Sousa et al. (1999), realizado em três comunidades de descendentes de escravos na região amazônica, revelou 60% de haplótipo CAR, 30% de Sen e 10% de Ben.

Pante-de-Sousa et al. (1998), em Belém, região Norte, analisaram haplótipos de 30 indivíduos com anemia falciforme, obtendo 66% de haplótipo CAR, 30% de Ben e 3% Sen. Esses resultados contradizem os relatos históricos do tráfico de escravos para a região Norte, já que tais relatos afirmam que a maioria dos escravos seria proveniente do oeste da África, onde o haplótipo Sen é prevalente, e uma menor porcentagem proviria de Benin. Tal discrepância provavelmente se deve ao tráfico doméstico e também às migrações internas.

Cardoso e Guerreiro (2006) analisaram os haplótipos de 130 indivíduos portadores de anemia falciforme também em Belém, PA, região Norte, e a distribuição da frequência foi 66% para o haplótipo CAR, 21,8% para Ben, 10,9% para Sen e 1,3% para Cam. A alta frequência do haplótipo Sen encontrada nesse estudo está de acordo com os dados históricos sobre o tráfico de escravos provenientes do Oeste da África para o norte do Brasil.

No Ceará, região Nordeste, Galiza Neto et al. (2005) investigaram 22 indivíduos em homozigose para HbS, revelou 55,9% Ben, constatando 41,2% de CAR e 2,95% de Sen.

Em Fortaleza, CE, também foram analisados os haplótipos de 34 indivíduos com anemia falciforme, revelando-se a presença de 66,2% de CAR, 22% de Ben e 11,8% de Atp (SILVA; GONÇALVES; RABENHORST, 2009).

Cabral et al. (2010) constataram predomínio do haplótipo CAR (75,5%) frente ao haplótipo Benin (11,3%) em estudo realizado no Rio Grande do Norte em indivíduos com anemia falciforme.

Bezerra et al. (2007), em Pernambuco, avaliaram 74 indivíduos pediátricos com doença falciforme triados pelo programa de triagem neonatal daquele estado, a fim de verificar a frequência dos haplótipos β^S . Encontraram 53 indivíduos com anemia falciforme. Dos 106 cromossomos avaliados, 84 (79,2%) eram de haplótipos CAR, 16 (15,1%) de Ben, 1 (1%) de Cam e 5 (4,7%) de Atp. Nesse estudo não foram encontrados os haplótipos Sen e Árabe-indiano.

Em estudo realizado na Bahia por Adorno et al. (2004) em 80 indivíduos com anemia falciforme, encontraram-se 48,8% de haplótipo Ben, 46,2% de CAR, 1,9% de Cam, 0,6% Sen e 0,6% de Árabe-Indiano. Em outro estudo realizado por Adorno et

al. (2008) foi observada predominância do haplótipo Ben (55,2%) na Bahia.

No Rio de Janeiro, região Sudeste, Fleury (2007) determinou o haplótipo de 74 indivíduos homozigotos para HbS, obtendo 54,0% de CAR, 44,6% de Ben e 1,4% de Sen. Em 2010, outro trabalho no Rio de Janeiro, com 105 indivíduos com HbS, demonstrou que 65,9% apresentavam haplótipo CAR e 23,7% Bem. Não foram encontrados os haplótipos Cam, Árabe-Indiano e Sen nesse estudo (SILVA FILHO et al., 2010).

Zago, Figueiredo e Ogo (1992) investigaram em Ribeirão Preto, SP, a origem da migração negra para o Brasil com base nos haplótipos, constatando predominância de CAR (73%), seguido de Ben (25%) e Sen (1%).

Gonçalves et al. (1994), estudando 74 indivíduos com anemia falciforme em São Paulo, obtiveram 62,2% de haplótipo CAR, 33,85 % de Ben e 4% de Atp. Também em São Paulo, Figueiredo et al. (1996) confirmaram a predominância (61,76%) de haplótipo CAR em relação a Ben (34,71%) em indivíduos com anemia falciforme.

No Vale do Rio Ribeira, numa população de 1.058 indivíduos de 11 comunidades negras denominadas quilombos, foi observada prevalência de 81,4% de haplótipos CAR, seguidos de 8,1% de Ben, 8,1% de Sen e 2,3% de Cam (DE MELLO AURICCHIO, 2007).

Wagner et al. (1996), em Porto Alegre, região Sul, constataram em sua pesquisa predomínio do haplótipo CAR.

2.6 INTERFERENTES QUE PODEM MINIMIZAR AS CRISES FALCIFORMES

Os indivíduos portadores de anemia falciforme apresentam quadro clínico heterogêneo, apesar de possuir a mesma alteração genética. Fatores genéticos e ambientais podem interferir no curso clínico da doença. Dentre os fatores genéticos, destacam-se os níveis de HbF, a interação com α -talassemia e os haplótipos. As condições sociais, econômicas e climáticas e o acesso à assistência médica são

fatores ambientais que também contribuem para as diferentes complicações clínicas da doença (RODRIGUEZ ROMERO; SÁENZ RENAULD; CHAVES VILLALOBOS, 1998; NAOUM, 2000; NAOUM; NAOUM, 2004;).

2.6.1 Hemoglobina fetal

A HbF tem sido o modulador genético mais estudado na anemia falciforme e é considerada o mais potente modificador da doença, diminuindo a polimerização da HbS quando em estado desoxigenado (STEINBERG, 2005).

Geralmente, a HbF mantém-se com níveis de 1% após o sexto mês do nascimento, podendo permanecer aumentada na persistência hereditária da HbF. Essa condição genética é clinicamente benigna e caracteriza-se pela síntese contínua de HbF na vida adulta (WOOD; CLEGG; WEATHERALL, 1979). A condição adquirida se deve ao uso de determinadas drogas, como a hidroxiureia, que é um efetivo agente estimulador de sua síntese (CHARACHE et al., 1992).

A HbF em indivíduos com anemia falciforme está relacionada com a variabilidade das manifestações clínicas e hematológicas da doença. Sua elevação se associa com redução de eventos vaso-oclusivos, de sequestro esplênico e de mortalidade precoce, além de redução do número de transfusões e hospitalizações (MOUSINHO-RIBEIRO et al., 2008).

2.6.2 Hidroxiureia

A hidroxiureia é uma droga que tem a função de bloquear a síntese de DNA pela inibição da ribonucleotídeo-redutase, mantendo as células em fase S do ciclo celular (DAVIES; GILMORE, 2003; FATHALLAH; ATWEH, 2006). Foi primeiramente aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de doenças neoplásicas, posteriormente passando a fazer parte da terapêutica de indivíduos com doença falciforme, sendo o primeiro medicamento que comprovadamente previne complicações clínicas (CANÇADO et al., 2009).

O Multicenter Study of Hydroxyurea (MSH), estudo multicêntrico cujo objetivo era avaliar a eficácia do tratamento com hidroxiureia em indivíduos com anemia falciforme, mostrou redução na frequência de crises vaso-oclusivas e episódios da síndrome torácica aguda, bem como redução do número de transfusões e hospitalizações em indivíduos com (CHARACHE et al., 1995). Outro estudo demonstrou a eficácia clínica e a segurança da terapêutica em criança com doença falciforme (KINNEY et al., 1999).

A hidroxiureia apresenta diversos efeitos nos parâmetros hematológicos dos indivíduos com anemia falciforme, promovendo elevação no nível de HbF, da concentração da Hb, do VCM e redução do número de reticulócitos (CHARACHE et al., 1992).

Outra resposta deste agente terapêutico é a diminuição de moléculas de adesão e de proteínas receptoras localizadas em células endoteliais, contribuindo para a redução das crises vaso-oclusivo (SILVA; SHIMAUTI, 2006). Sobre a membrana dos eritrócitos e plaquetas, a hidroxiureia induz redução da expressão das moléculas de adesão. Estudo mostra que a hidroxiureia causa uma redução significativa da fosfatidilserina, principal determinante da adesão eritrocitária alterada na anemia falciforme, fato que pode explicar o efeito benéfico dessa terapêutica, uma vez que as moléculas de adesão são consideradas um fator determinante no fenômeno de vaso-oclusão (COVAS et al., 2004).

A hidroxiureia é de fácil administração por apresentar na forma oral. O efeito mielossupressor é facilmente detectado e reversível com suspensão da droga (CANÇADO et al., 2009).

Esta pesquisa, de identificação dos haplótipos do gene β^S , em indivíduos com anemia falciforme, vem a ser a pioneira em determinar a sua frequência no Estado de Mato Grosso do Sul, e associado com dados laboratoriais, colabora na condução, acompanhamento e avaliação do tratamento com hidroxiureia em indivíduos com a doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os haplótipos do gene β^S e aspectos hematológicos em indivíduos com anemia falciforme em Campo Grande, MS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar os tipos de haplótipos do gene β^S em pacientes com anemia falciforme.

Verificar associação entre haplótipos e dados hematológicos.

Determinar associação dos parâmetros laboratoriais entre uso ou não de hidroxureia.

Determinar associação entre haplótipos e o uso de hidroxureia.

Determinar associação entre haplótipos e os níveis de HbF.

Determinar associações entre haplótipos e dados laboratoriais indicadores de hemólise.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo transversal em indivíduos com anemia falciforme.

4.2 VARIÁVEIS

Anemia falciforme, idade, sexo, uso ou não de hidroxiureia, concentração total de Hb, VG, He, VCM, hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), DHL, Bi, Ret, HbF e haplótipos.

4.3 POPULAÇÃO/AMOSTRA

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 47 indivíduos com anemia falciforme que estavam sob tratamento nos Ambulatórios de Hematologia do Hospital Universitário, Maria Aparecida Pedrossian, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU/UFMS) e do Hospital Regional, Rosa Pedrossian, de Mato Grosso do Sul (HRMS) no período de dezembro de 2009 a maio de 2010.

4.3.1 Critérios de inclusão

Indivíduos com anemia falciforme (confirmada por eletroforese de Hb em pH alcalino e pH ácido).

4.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos indivíduos com heterozigose para HbS; HbS em interação com outras hemoglobinopatias e indígenas.

4.4 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, de acordo com a Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996 (Conselho Nacional de Saúde), sob o Protocolo 1.608 (ANEXO), e pelo Comitê de Ética do Hospital Regional (ANEXO). A declaração de uso de material biológico foi adequadamente preenchida (ANEXO).

4.4.1 Comunicado aos profissionais de saúde

Um comunicado a respeito da pesquisa, com os devidos documentos de aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa, foi enviado aos profissionais dos Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS (APÊNDICE A e B).

4.4.2 Abordagens aos participantes da pesquisa

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética, foram contatados e abordados individualmente pela pesquisadora os indivíduos com anemia falciforme (e/ou os responsáveis por estes) que recebem acompanhamento ambulatorial com médicos hematologistas no HU/UFMS e no HRMS. Dos que aceitaram participar da pesquisa, foi solicitada assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE C). A seguir, foi aplicado um formulário pela pesquisadora (APÊNDICE D) e posteriormente realizado coleta de amostra sanguínea.

4.4.3 Resultados dos exames

Os resultados dos exames foram anexados aos prontuários dos participantes da pesquisa.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa BioEstat, versão 5.0. Para comparação entre os haplótipos (amostras independentes) foi utilizado o teste Kruskal–Wallis, seguido do teste de Student–Newman–Keuls. Para comparação dos grupos que usavam ou não hidroxiureia (amostras independentes) foram empregados o teste *t* ou o de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição (paramétrica ou não). Para comparação das médias da concentração de hemoglobina (uso de transfusão sanguínea) foi utilizada ANOVA. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4.6 PROCEDIMENTO DE ANÁLISE

Após autorização e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo participante da pesquisa ou pelo responsável (no caso de menores de idade), foram coletados cerca de 8 mL de sangue periférico por punção venosa por meio de coleta a vácuo, sendo 2 mL utilizados para análises hematológicas e 4 mL para identificação dos haplótipos, em ambos os frascos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-K3). Os outros 2 mL foram coletados em frasco sem anticoagulante para dosagens bioquímicas.

As amostras foram submetidas aos seguintes exames laboratoriais: eritrograma, contagem de reticulócitos, dosagem de HbF, dosagem de DHL e dosagem de bilirrubina total e frações. Os exames foram realizados no laboratório de Análises Clínicas do HU/UFMS. As amostras para determinação de haplótipos foram encaminhadas, devidamente acondicionadas sob refrigeração, ao Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas.

4.6.1 Eritrograma

Para a determinação da contagem de He; determinação da concentração de Hb, do volume globular e índices hematimétricos, foi utilizado método automatizado em aparelho Sysmex, modelo XT-1800i.

4.6.2 Contagem de reticulócitos

Uma amostra de 100 μ L do sangue colhido com anticoagulante (EDTA) foi misturada com igual quantidade de corante supravital azul de cresil brilhante (APÊNDICE E) e em seguida homogeneizada e colocada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. A seguir, o tubo foi retirado e homogeneizado novamente para confecção de distensão sanguínea. Logo depois, utilizando microscópio com objetiva de imersão (100 $\times$), a distensão foi examinada e contaram-se os reticulócitos em 1.000 eritrócitos. Foi realizada correção dos reticulócitos conforme o volume globular.

4.6.3 Dosagem de hemoglobina fetal

A quantificação de HbF por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) foi realizada no Laboratório de Hematologia do Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. A metodologia de HPLC permite a separação das frações de Hb por eluição em coluna de troca iônica com injeção de tampões em sistema de alta pressão. As Hb são diferenciadas por apresentarem tempos de retenção característicos, que correspondem ao tempo transcorrido entre a injeção da amostra e o ápice do pico da Hb. A quantificação das diferentes frações de Hb em uma amostra é realizada a partir dos valores de porcentagem e tempo de retenção, comparados com valores de calibração específicos (CLARKE; HIGGINS, 2000).

Para quantificação das Hb, utilizou-se o programa β -Thalassemia Short Program (VARIANT, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). No cromatograma resultante

do HPLC, o primeiro pico de retenção corresponde a HbF (por volta de 1 minuto) enquanto o último pico corresponde a Hb A2 (cerca de 3,5 minutos). Para indivíduos com aumento nos níveis de HbF, a análise apresenta um pico na janela de HbF com porcentagem superior a 1%. A Figura 3 apresenta um cromatograma de indivíduo com níveis de HbF de 18.6%.

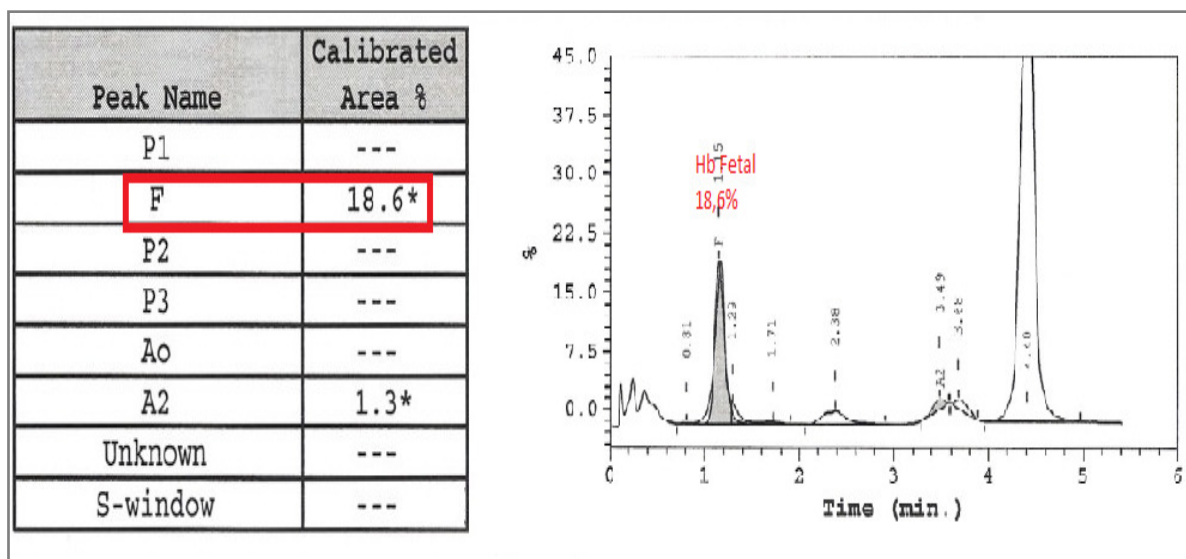


Figura 3 - HPLC de hemoglobinas. Cromatograma referente ao HPLC de hemoglobina de um portador de anemia falciforme.

4.6.4 Dosagem da desidrogenase láctica (LDH) e bilirrubina total e frações

As determinações do LDH, da bilirrubina total e frações foram realizadas em equipamento automatizado, da marca COBAS 400 (Roche), com reagentes, calibradores e controles especificados pelo fabricante.

4.6.5 Técnica para a extração de DNA

Para a extração de DNA foi utilizado o método fenol/clorofórmio. O sangue total coletado em EDTA (4 mL) foi centrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos e o plasma desprezado.

Foi feita a lise das hemácias acrescentando cinco vezes o volume das células de cloreto de amônio/bicarbonato de amônio, homogeneizado suavemente por inversão e centrifugado a 2.200 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e repetido o procedimento de lise mais uma vez. Foi acrescentado 5 mL de TKM1 e uma gota de Triton. Agitado por inversão até completa dissolução do Triton e centrifugado a 2.200 rpm por 15 minutos. Foi desprezado o sobrenadante e após o acréscimo de 1 mL de TKM1, o volume resultante foi homogeneizado e centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga. O sobrenadante foi desprezado e nessa etapa pôde-se congelar o *pellet* ou continuar a extração. O *pellet* foi ressuspensionado suavemente com 400 µL de TKM2 e adicionado 25 µL de SDS a 10%. Em seguida o volume foi homogeneizado e incubado em banho-maria a 55 °C por 30 a 45 minutos. Foi adicionado 180 µL de NaCl 5M, e após a homogeneização, o volume foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga. Foi retirado o sobrenadante contendo o DNA e este foi transferido em tubo de Eppendorf. Foi adicionado 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico e 500 µL de fenol saturado. Para completa homogeneização, a amostra foi submetida a vórtex. O volume foi então centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga. O sobrenadante contendo o DNA foi retirado e transferido para outro Eppendorf e foi acrescentado 1.000 µL de clorofórmio/álcool isoamílico sob vórtex. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado e transferido para novo Eppendorf. Foi acrescentado acetato de sódio 3M em pH 5,2 correspondente a 10% do volume do sobrenadante e adicionado 1.000 µL de etanol absoluto gelado. O Eppendorf foi agitado por inversão para precipitação do DNA e centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos para que o DNA aderisse à parede do tubo. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1.000 µL de etanol 70% gelado, misturando-se até o DNA se soltar da parede do tubo. Após centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado. O Eppendorf foi deixado em repouso e secado à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em água deionizada ou tampão TE e armazenado em geladeira, sendo no dia seguinte congelado em *freezer* a -20° C até o momento do uso. O preparo das soluções para a técnica é descrito no Apêndice F.

4.6.6 Determinação dos Haplótipos β^S – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

As análises dos polimorfismos de restrição foram realizadas por meio da amplificação de cada região do DNA que contém os sítios de interesse pelo método PCR. A determinação dos haplótipos foi realizada por PCR seguida de análise de restrição (RFLP). Para os haplótipos β^S foram analisados seis sítios polimórficos (5' γ^G -*Xmn* I, γ^G -*Hind* III, γ^A -*Hind* III, $\psi\beta$ -*Hinc* II, 3' $\psi\beta$ -*Hinc* II, 5' β -*Hinf* I) (Figura 4, Tabela 1) (SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989).

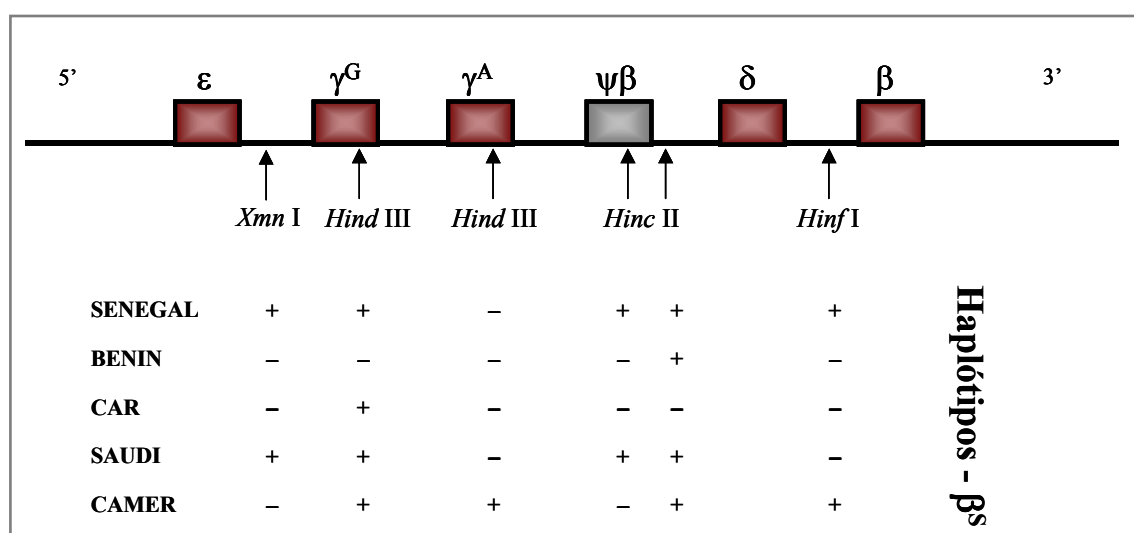


Figura 4 - *Cluster* β , mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S .

A composição das reações e as condições de amplificação variaram, dependendo da região a ser amplificada, e estão representadas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 1 - *Primers* utilizados para amplificação de regiões do *cluster* β (localização referente ao *cluster* β no cromossomo 11) depositados no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (ID U01317)

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

Legenda: (→) *sense*; (←) *anti-sense*.

Tabela 2 - Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina β

<i>Componentes</i>	<i>Volumes (μL)</i>					
	<i>Xmn I</i>	<i>Hind III</i>	<i>Hind III</i>	<i>Hinc II</i>	<i>Hinc II</i>	<i>Hinf I</i>
	5' γ^G	γ^G	γ^G	$\psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' β
Tampão (10X)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
MgCl ₂ (50 mM)	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5
dNTPs (10 mM)	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0
<i>Primer</i> 5' (10 μ M)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>Primer</i> 3' (10 μ M)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>Taq</i> DNA polimerase (5U/ μ L)	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
DNA (200 ng)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
dH ₂ O	37,75	38,0	38,0	38,0	38,0	38,25
Volume final (μL)	50	50	50	50	50	50

Fonte: Sutton, Bouhassira e Nagel (1989).

Tabela 3 - Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina β

<i>Região</i>	<i>Desnaturação inicial</i>		<i>35 ciclos</i>						<i>Extensão final</i>	
	<i>Desnaturação</i>		<i>Desnaturação</i>		<i>Anelamento</i>		<i>Extensão</i>		<i>Extensão final</i>	
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
5' γ^G	94	5 min	94	45 s	60	45 s	72	1 min 30 s	72	7 min
γ^G	94	5 min	94	30 s	55	1 min	72	1 min	72	7 min
γ^A	94	5 min	94	30 s	55	1 min	72	1 min	72	7 min
$\psi\beta$	94	5 min	94	30 s	55	1 min	72	1 min	72	7 min
3' $\psi\beta$	94	5 min	94	30 s	55	1 min	72	1 min	72	7 min
5' β	94	5 min	94	45 s	57	45 s	72	1 min 30 s	72	7 min

Fonte: Sutton, Bouhassira e Nagel (1989).

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

4.6.7 Análise de Restrição – Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

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

Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição. Como controle foi utilizada amostra de um indivíduo heterozigoto para cada sítio polimórfico. Os tamanhos dos produtos de amplificação e após a clivagem podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Tamanhos dos produtos amplificados e após clivagem com endonucleases de restrição

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

De acordo com perfil de restrição para as regiões polimórficas do *cluster* da globina β, é possível definir os haplótipos β^S.

5 RESULTADOS

Dos 47 indivíduos com anemia falciforme, 26 (55,3%) eram do sexo feminino e 21 (44,7%) do masculino. A idade da população estudada variou de 3 a 63 anos, com média de 23 anos ($\pm 12,2$). A classificação da faixa etária mostrou que 29 (61,7%) dos indivíduos tinham idades de 11 a 30 anos e um indivíduo apresentou idade superior a 50 anos (2%) (Tabela 5).

Com relação ao local de nascimento, 35 (74,5%) eram naturais de Mato Grosso do Sul e 12 (25,5%) de outros estados brasileiros. Vinte (42,6%) eram nascidos em Campo Grande, capital sul-mato-grossense.

Tabela 5 - Número e porcentagem de indivíduos com anemia falciforme, segundo sexo, faixa etária e naturalidade. Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 ($n=47$)

Variáveis	<i>n</i>	%
Sexo:		
Feminino	26	55,3
Masculino	21	44,7
Faixa etária:		
Até 10 anos	6	12,8
11 a 20 anos	16	34,0
21 a 30 anos	13	27,7
31 a 40 anos	9	19,1
41 a 50 anos	2	4,3
Acima de 50 anos	1	2,1
Naturalidade:		
Capital de MS	20	42,6
Interior de MS	15	31,9
Outros estados	12	25,5

A Tabela 6 mostra que 35 (74,5%) dos participantes faziam uso de hidroxiureia e 30 (63,8%) haviam recebido transfusão mais de 120 dias antes.

Tabela 6 - Número e porcentagem de indivíduos com anemia falciforme, segundo a terapêutica. Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 ($n=47$)

Variáveis	<i>n</i>	%
Uso de hidroxiureia:		
Sim	35	74,5
Não	12	25,5
Transfusão sanguínea*:		
Menos de 1 mês	4	8,5
1 a 4 meses	13	27,7
Mais de 4 meses	30	63,8

*Tempo transcorrido entre a última transfusão sanguínea e a coleta de sangue para a pesquisa.

As médias ($\pm$ desvio padrão) da concentração de Hb dos indivíduos, de acordo com o período transcorrido entre a transfusão sanguínea e a coleta de sangue para a pesquisa, foram as seguintes: até 1 mês, $7,93 \pm 1,73$ g/dL; de 1 a 4 meses, $8,58 \pm 0,87$ g/dL; acima de 4 meses, $8,66 \pm 1,23$ g/dL. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias ($p=0,513$, ANOVA).

Com relação aos genótipos da globina β^S , foram encontrados 22 casos (46,8%) de CAR/CAR, 14 (29,8%) de CAR/Ben, 7 (14,9%) de CAR/Atp, 2 (4,3%) de Ben/Ben, um (2,1%) de Ben/Cam e 1 (2,1%) de Ben/Atp (Tabela 7). Os haplótipos Sen e Árabe-Indiano não foram identificados neste estudo. De acordo com os 94 cromossomos analisados, o haplótipo CAR foi predominante, ocorrendo em 65 casos (69,1%), seguido de Ben em 20 (21,3%), de Atp em 8 (8,5%) e de Cam em um caso (1,1%) (Tabela 8).

Tabela 7 - Número e porcentagem de indivíduos com anemia falciforme, segundo genótipos. Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 ($n=47$)

Genótipos	<i>n</i>	%
CAR/CAR	22	46,8
CAR/Bem	14	29,8
CAR/ATP	7	14,9
Ben/Bem	2	4,3
Ben/ATP	1	2,1
Ben/Cam	1	2,1
Total	47	100,0

Tabela 8 - Número e porcentagem de cromossomos (n=94) de indivíduos com anemia falciforme, segundo haplótipos. Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 (n=47)

Haplótipo	n	%
CAR	65	69,1
Ben	20	21,3
ATP	8	8,5
Cam	1	1,1
Total	94	100,0

As médias e os desvios-padrão dos parâmetros laboratoriais entre os genótipos são apresentados na Tabela 9. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados, exceto para HbF ($p=0,008$). A análise comparativa da HbF entre indivíduos de genótipos CAR/CAR, CAR/Atp e Ben/Ben revelou resultados estatisticamente significativos, onde CAR/CAR apresentou média elevada de HbF ($16,8\pm 8,1\%$). O mesmo ocorreu na comparação entre os genótipos CAR/Ben, CAR/Atp e Ben/Ben, em que a HbF mostrou-se significativamente mais elevada no genótipo CAR/Ben ($12,6\pm 7,2\%$). Quanto aos grupos Ben/Atp e Ben/Cam, por ter sido observado um caso de cada genótipo, as comparações não foram incluídas nesta análise.

Tabela 9 - Média e desvio padrão das variáveis laboratoriais de indivíduos com anemia falciforme, segundo genótipos. Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 (n=47)

Variáveis	CAR/CAR (n=22)	CAR/Ben (n=14)	CAR/Atp (n=7)	Ben/Ben (n=2)	Ben/Atp (n=1)	Ben/Cam (n=1)	p
HbF (%)	^a 16,8±8,1	^a 12,6±7,2	^b 7,7±4,0	^b 3,3±2,1	8,7	12,0	0,008
Hb (g/dL)	8,6±1,2	8,6±1,2	8,8±1,0	7,0±0,1	7,5	10,1	0,198
He($10^{12}/L$)	2,5±0,4	2,6±0,5	3,0±0,8	2,3±0,1	2,7	2,8	0,210
VG (%)	25,1±3,5	24,9±3,5	26,0±3,1	21,0±0,0	22	29	0,227
VCM (fL)	99,8±12,4	98,8±11,7	88,8±15,6	93,4±2,9	81,5	103,6	0,441
HCM (pg)	34,3±4,5	34,0±4,4	30,2±5,6	30,9±0,6	27,7	36,1	0,307
CHCM(g/dL)	34,3±0,5	34,2±0,6	33,9±0,7	33,1±0,4	34,1	34,8	0,092
DHL (UI)	531± 213	516± 242	604± 384	422± 93	520	515	0,926
Ret (%)	5,3±2,7	6,2±3,0	6,2±2,9	4,7±5,5	1,4	3,9	0,754
Bi (mg/dL)	3,1±4,3	2,0±0,8	1,6±0,8	2,0±1,1	1,81	1,96	0,697

Nota: Se $p\leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa (letras diferentes) – Teste Kruskal–Wallis seguido por Student–Newman–Keuls, calculado sem os genótipos Ben/Atp e Ben/Cam (apenas um indivíduo cada).

Cabe mencionar que, entre os 22 indivíduos CAR/CAR, 18 (81,8%) faziam uso de hidroxiureia. Dos 14 indivíduos CAR/Ben e dos sete CAR/Atp, 11(78,6%) e 5

(71,4%) usavam essa droga, respectivamente. O único indivíduo do genótipo Ben/Cam fazia uso de hidroxiureia, enquanto, os Ben/Ben e Ben/Atp não a utilizavam.

Na associação entre parâmetros laboratoriais e terapêutica com hidroxiureia (Tabela 10), foi observado que a média da HbF ($15,6 \pm 7,4\%$) apresentou diferença significativa ($p=0,001$) nos indivíduos que faziam uso da droga, em comparação com a HbF ($6,8 \pm 5,1\%$) daqueles que não a utilizavam. As médias da concentração de Hb ($8,9 \pm 1,1$ g/dL), do VG ($26,1 \pm 3,1\%$), do HCM ($34,4 \pm 5,0$ pg) e do VCM ($99,9 \pm 13,5$ fL) revelaram-se estatisticamente mais elevada com o uso dessa terapêutica.

Quanto aos parâmetros indicadores de hemólise (Tabela 10), apresentou significância o nível de DHL ($p=0,008$) e o nível de Bi ($p=0,026$) quando comparados os indivíduos que faziam uso ou não de hidroxiureia. Quanto aos reticulócitos, não houve diferença significativa ($p=0,751$) na comparação entre os que usavam com os que não utilizavam o medicamento.

Tabela 10 - Média e desvio-padrão de parâmetros laboratoriais de indivíduos com anemia falciforme, segundo o uso ou não de hidroxiureia, Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 ($n=47$).

Parâmetros	Hidroxiureia		p
	Sim ($n=35$)	Não ($n=12$)	
HbF (%)	$15,6 \pm 7,4$	$6,8 \pm 5,1$	⁽²⁾ $<0,001$
Hb (g/dl)	$8,9 \pm 1,1$	$7,5 \pm 0,9$	⁽¹⁾ $<0,001$
He ($\times 10^{12}$)	$2,7 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,3$	⁽¹⁾ $0,106$
VG (%)	$26,1 \pm 3,1$	$22,0 \pm 2,5$	⁽¹⁾ $<0,001$
VCM (fl)	$99,9 \pm 13,5$	$89,7 \pm 5,4$	⁽²⁾ $<0,001$
HCM (pg)	$34,4 \pm 5,0$	$30,5 \pm 1,9$	⁽¹⁾ $<0,001$
CHCM (g/dl)	$34,2 \pm 0,6$	$34,0 \pm 0,6$	⁽²⁾ $0,298$
DHL (UI)	$469,0 \pm 176,1$	$717,3 \pm 311,1$	⁽²⁾ $0,008$
Ret (%)	$5,5 \pm 2,8$	$5,8 \pm 3,3$	⁽²⁾ $0,751$
BI (mg/dL)	$1,8 \pm 0,8$	$4,5 \pm 5,4$	⁽²⁾ $0,026$

Nota: Se $p \leq 0,05$, diferença estatisticamente significativa.

⁽¹⁾ Teste de Mann-Whitney.

⁽²⁾ Teste *t*.

Comparando-se os valores da HbF de acordo com os genótipos (Tabela 11), foi verificado diferença significativa ($p=0,018$) entre os indivíduos que faziam uso de hidroxiureia. O genótipo CAR/CAR e CAR/Ben apresentaram nível elevado de HbF,

com significância estatística em relação ao genótipo CAR/Atp.

Quanto à HbF dos que não usavam hidroxiureia, observou-se que não houve diferença significativa ($p=0,576$) entre os genótipos. Os indivíduos CAR/CAR apresentaram média ($\pm$ desvio padrão) de HbF de $8,9\pm4,6\%$. O haplótipo Ben/Ben foi identificado em dois indivíduos (um deles com 46 anos de idade), ambos apresentaram HbF inferior a 5% e não faziam uso de hidroxiureia.

Tabela 11 - Média e desvio padrão dos valores da HbF (%) de indivíduos com anemia falciforme, segundo os genótipos e uso ou não de hidroxiureia, Ambulatórios de Hematologia do HU/UFMS e do HRMS, dezembro de 2009 a maio de 2010 ($n=47$).

Genótipos	HbF (%)	
	Com hidroxiureia (n)	Sem hidroxiureia (n)
CAR/CAR	^a $18,5\pm7,7$ (18)	$8,9\pm4,6$ (4)
CAR/Ben	^a $13,9\pm6,8$ (11)	$7,9\pm7,9$ (3)
CAR/Atp	^b $9,4\pm2,5$ (5)	$3,6\pm4,5$ (2)
Ben/Ben	-	$3,3\pm2,1$ (2)
Ben/Atp	-	$8,7$ (1)
Ben/Cam	$12,0$ (1)	-
<i>p</i>	⁽¹⁾ $0,018$	⁽²⁾ $0,576$

Nota: Se $p\leq0,05$, diferença estatisticamente significativa (letras diferentes).

Teste de Kruskal–Wallis seguido por Student–Newman–Keuls.

⁽¹⁾Calculado entre CAR/CAR, CAR/Ben e CAR/Atp.

⁽²⁾Calculado entre CAR/CAR, CAR/Ben, CAR/Atp e Ben/Ben.

6 DISCUSSÃO

Os achados obtidos neste trabalho representam a primeira análise dos haplótipos da anemia falciforme em indivíduos oriundos de Mato Grosso do Sul. A população estudada é composta por indivíduos de ambos os sexos com predominância do sexo feminino e adultos jovens provenientes principalmente da capital do estado que recebem acompanhamento em dois hospitais da rede pública de referência: o HU/UFMS e o HRMS.

Nesta pesquisa, a distribuição dos haplótipos mostra que CAR (69,1%) foi o mais prevalente, seguido de Ben (21,3%). Comparando-se esses resultados com outros obtidos em diferentes regiões do Brasil, constata-se semelhança quanto ao tipo de haplótipo predominante.

Estudo realizado em Ribeirão Preto, SP, revelou predomínio do haplótipo CAR (66,2%) em relação a Ben (23%) em indivíduos portadores do gene β^S (ZAGO; FIGUEIREDO; OGO, 1992). Essa predominância também foi observada em outras pesquisas realizadas em São Paulo em indivíduos com anemia falciforme (GONÇALVES et al., 1994; FIGUEIREDO et al., 1996). No Rio de Janeiro, o haplótipo CAR (54%) foi mais frequente que Ben (44,6%) (FLEURY, 2007), assim como verificado na cidade de Porto Alegre (WAGNER et al., 1996).

Na região Nordeste, verificou-se predomínio do haplótipo Ben (48,8%) na Bahia (ADORNO et al., 2004) e de haplótipo CAR (79,1%) em Pernambuco (BEZERRA et al., 2007) e Fortaleza (66,2%) (SILVA; GONÇALVES; RABENHORST, 2009). Um estudo realizado no Rio Grande do Norte revelou a presença de 75,5% de haplótipos CAR (CABRAL et al., 2010).

O haplótipo Cam, neste estudo, apresentou baixa frequência (1,1%) assim como em outros trabalhos (ADORNO et al., 2004; LYRA et al., 2006; BEZERRA et al., 2007; DE MELLO AURICCHIO, 2007).

É interessante mencionar que o indivíduo portador do genótipo Ben/Cam observado neste estudo, embora natural de São Paulo, tem pais nascidos na Bahia,

estado em que o haplótipo Camarões foi observado pela primeira vez em estudos brasileiros (ADORNO et al., 2004).

Os haplótipos Sen e Árabe-Indiano não foram observados no presente estudo. Resultados semelhantes foram encontrados em outras regiões brasileiras (BEZERRA et al., 2007; SILVA; GONÇALVES; RABENHORST, 2009; SILVA FILHO et al., 2010). Difere destes, porém, o estudo de Cardoso e Guerreiro (2006), que revelou 10,9% de haplótipos Sen em Belém, região Norte, assim como a pesquisa realizada por De Mello Auricchio (2007) em uma população de quilombo no Vale do Ribeira, no estado de São Paulo, na qual identificaram 8,1% de casos desse haplótipo.

Verificou-se no presente estudo, que a concentração total de Hb não apresentou diferença significativa ($p=0,198$) quando associada aos haplótipos, assim como aos demais parâmetros laboratoriais analisados, com exceção da HbF. Os haplótipos do gene da globina β parecem não influenciar a concentração de Hb de indivíduos com anemia falciforme (FIGUEIREDO et al., 1996).

Cabe salientar que na análise desses parâmetros laboratoriais, acima citados, estão inclusos os que faziam uso de hidroxureia e os que haviam recebido transfusão sanguínea. Dos 47 participantes desta pesquisa, 17 haviam se submetido à transfusão sanguínea nos 120 dias que antecederam a coleta. Justifica-se a inclusão dos transfundidos, na comparação das médias da concentração da hemoglobina pela análise de variância paramétrica (ANOVA) que não revelou diferença estatisticamente significativa ($p=0,513$) na comparação da média de Hb ($7,93 \pm 1,73$), dos quatro indivíduos com transfusão até 30 dias antes da coleta, com a média de Hb ($8,58 \pm 0,87$), dos 13 transfundidos entre 30 a 120 dias, e com a média ($8,6 \pm 1,23$) de Hb dos 30 indivíduos sem transfusão.

A hidroxureia, cuja ação principal está no aumento da síntese de HbF, pode também, influenciar os índices hematimétricos e dosagens bioquímicas. Nestas últimas, foram observadas redução do DHL, bilirrubina total e frações (CHARACHE et al., 1992). Portanto, justifica-se no presente estudo, a separação dos indivíduos em dois grupos (o grupo que usa e o que não usa hidroxureia) para comparação dos parâmetros hematológicos entre os grupos, bem como para avaliar os níveis de

HbF entre os haplótipos.

Analizando o grupo em tratamento com hidroxiureia, verificou-se diferença estatisticamente significativa na média de todos os parâmetros hematológicos, exceto nos valores de He e de CHCM, em comparação com o grupo que não usa esse medicamento. Em estudo realizado por Charache et al. (1992), também não foi observado variação de CHCM e He em indivíduos submetidos a essa terapêutica, em comparação com os que dela não faziam uso.

Nesta pesquisa, as médias de concentração de Hb ($8,9 \pm 1,1$), do VG ($26,1 \pm 3,1$), do VCM ($99,9 \pm 13,5$) e do HCM ($34,4 \pm 5,0$) apresentaram valores significativamente elevados no grupo de indivíduos com a terapêutica de hidroxiureia. Estes dados estão em concordância com outros estudos realizados com portadores da HbSS (CHARACHE et al., 1992; DAVIES; GILMORE, 2003; COVAS et al., 2004).

Com relação à variação da média de HbF, quanto ao uso ou não de hidroxiureia, obteve-se neste trabalho as médias de $15,6 \pm 7,4\%$ e $6,8 \pm 5,1\%$, respectivamente. Os achados apontaram diferença estatisticamente significativa nos níveis médios de HbF quando comparado o grupo de indivíduos em tratamento com o grupo que não fazia uso do medicamento. A média ($6,8 \pm 5,1\%$) de HbF encontrada nesta análise em indivíduos sem a terapêutica revela concordância com os demais estudos da literatura. No Rio de Janeiro, Fleury (2007) obteve concentração média de HbF de $6,66 \pm 4,61\%$. Em Fortaleza, Silva et al. (2010) encontraram uma média de HbF de $6,72 \pm 3,73\%$. No trabalho realizado por Figueiredo et al. (1996), a média de HbF foi de $6,6 \pm 4,1\%$. Galiza Neto et al. (2005) obtiveram média de $7,61 \pm 1,0\%$ de HbF em indivíduos com anemia falciforme.

No presente estudo, para verificar a variação dos níveis de HbF de acordo com os haplótipos, foram comparadas as médias de HbF entre os genótipos dos indivíduos do grupo que usava hidroxiureia, e também, comparadas as médias de HbF entre os genótipos do grupo que não usava. Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa ($p=0,018$) nos indivíduos submetidos a terapêutica de hidroxiureia, onde o homozigoto CAR/CAR apresentou média elevada ($18,5 \pm 7,7\%$) de HbF em comparação com os heterozigotos CAR/Ben e CAR/Atp.

Mesmo não havendo diferença significativa ($p=0,576$) nas médias de HbF, com relação aos genótipos, no grupo que não usava hidroxiureia, notou-se que a menor média ($3,3\pm 2,1\%$) foi encontrada nos indivíduos Ben/Ben. Segundo Powars (1991), o haplótipo Ben está associado a níveis de HbF que variam de 5% a 15%. No presente estudo, o achado assemelha-se ao desenvolvido por Adorno et al. (2008) na Bahia, que identificou três indivíduos de genótipo Ben/Ben com HbF menor que 5%, diferentemente de outros trabalhos em que se obtiveram níveis elevados de HbF em indivíduos com esse genótipo (GONÇALVES et al., 1994; FIGUEIREDO et al., 1996; GONÇALVES et al., 2003; FLEURY, 2007; SILVA et al., 2010).

Nesta pesquisa, nos indivíduos CAR/CAR que não usavam hidroxiureia, a média de HbF encontrada foi de $8,9\pm 4,6\%$. Achado semelhante é descrito em estudo realizado com 116 indivíduos homozigotos para o haplótipo CAR, evidenciado uma média de $8,8\pm 5,8\%$ (MOUÉLÉ et al., 1999). Outros trabalhos realizados com indivíduos com anemia falciforme também encontraram haplótipo CAR associado a níveis elevados de HbF (FIGUEIREDO et al., 1996; GONÇALVES et al., 2003).

Percebe-se no presente estudo que, dos 35 indivíduos em uso terapêutico de hidroxiureia, 34 possuíam pelo menos um cromossomo CAR. Rodriguez Romero, Sáenz Renauld e Chaves Villalobos (1998) relatam que a herança de pelo menos um cromossomo CAR está ligada a manifestação clínica mais grave que em casos com presença de outro haplótipo. Figueiredo et al. (1996) não encontraram relação entre haplótipo CAR e severidade da anemia falciforme.

Nesta pesquisa, o haplótipo Ben/Ben foi identificado em dois indivíduos, um deles adulto com 46 anos de idade, ambos não faziam uso de hidroxiureia, o mesmo ocorrendo com um genótipo Ben/Atp. Um indivíduo com genótipo Ben/Cam, embora faça uso de hidroxiureia, recebeu diagnóstico de anemia falciforme já adulto.

Foi observado, neste trabalho, que dos quatro indivíduos com genótipo CAR/CAR que não usavam hidroxiureia, dois apresentaram $HbF > 10\%$. Em estudo realizado por Mouélé et al. (1999) com indivíduos homozigotos para o haplótipo CAR, verificou-se que portadores do mesmo haplótipo apresentavam níveis diferentes de HbF, com variação de 1 a 28%.

Dois indivíduos CAR/Ben, dos três que não utilizam a terapêutica de hidroxiureia, também diferiram nos níveis de HbF, um apresentou HbF>15% e outro HbF<5%. Com base em estudo desenvolvido no Líbano, Inati et al. (2003) consideram que haplótipo pode não ser o único determinante na elevação do nível de HbF.

Nas análises deste estudo, comparando as médias encontradas dos indicadores de hemólise (reticulócito, DHL e Bi) de acordo com os haplótipos, revela que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles. No entanto, na comparação das médias dos parâmetros laboratoriais entre os grupos que usavam ou não hidroxiureia, foi verificado que os níveis de Bi e DHL foram significativamente menores no grupo em tratamento. Este achado é similar ao obtido por Charache et al. (1992).

Nesta pesquisa, o valor para bilirrubina indireta no grupo em uso de hidroxiureia revelou menor média $1,8 \pm 0,8$, em comparação com $4,5 \pm 5,4$ no grupo que não utilizava a terapêutica, ocorrendo o mesmo com DHL, que apresentou média de $469,0 \pm 176,1$ no grupo que faz uso de hidroxiureia, quando comparado a $717,3 \pm 311,1$ no grupo que não a utiliza. Estes dados laboratoriais mostraram que a hidroxiureia reduziu o quadro hemolítico dos indivíduos com anemia falciforme nesta amostra estudada. Estes achados estão em concordância com os obtidos por Charache et al. (1992).

Com relação à contagem de reticulócitos, não houve diferença significativa entre o uso ou não de hidroxiureia nos indivíduos pesquisados, apesar de apresentarem elevados. Trabalhos deverão ser realizados por método de automação, pelo qual se observa a fração imatura dos reticulócitos, para que se faça uso deste parâmetro laboratorial como indicador de crise de hemólise.

7 CONCLUSÃO

- Dos 47 indivíduos com anemia falciforme, 69,1% apresentaram haplótipo CAR, 21,3% Ben, 8,5% Atp e 1,1% Cam.
- Não houve diferença significativa entre haplótipos e dados laboratoriais (Hb, He, VG, VCM, HCM, CHCM, DHL, Ret e Bi), exceto a HbF ($p=0,008$).
- Os parâmetros laboratoriais analisados (VG, Hb, VCM, HCM, HbF, DHL, Bi) apresentaram melhores resultados nos indivíduos que faziam uso de hidroxiureia com diferença significativa, exceto para He, CHCM e Ret.
- O estudo demonstrou que dos 35 indivíduos que possuíam pelo menos um cromossomo CAR, 34 faziam uso da hidroxiureia.
- O genótipo CAR/CAR apresentou média elevada de HbF, quando comparado com os demais genótipos, tanto com uso ou não de hidroxiureia, com diferença significativa entre os que fazem uso da terapêutica.
- Não houve diferença significativa dos dados laboratoriais indicadores de hemólise de acordo com os haplótipos. A significância dos indicadores foi relevante com relação aos indivíduos que usavam hidroxiureia, com menor média de Bi e de DHL. Demonstrando, laboratorialmente, que essa terapêutica reduz as crises de hemólise em indivíduos com anemia falciforme.

A identificação dos haplótipos e parâmetros hematológicos nos indivíduos com anemia falciforme em Campo Grande, MS, estudo pioneiro nesta região, traz contribuição para o prognóstico e acompanhamento clínico da doença. Além disso, fornecerá elementos para um banco de dados que auxiliará em estudo da composição étnica da população de nosso estado, uma vez que os fundadores provieram de diferentes regiões brasileiras e muitos deles eram descendentes de escravos.

REFERÊNCIAS

- Adorno EV, Zanette A, Lira I, Seixas MA, Reis MG, Gonçalves MA. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. *Genet Mol Biol*. 2008; 31(3):621-5.
- Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Souza CC, Santos LF, Menezes JF, et al. The β -Globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: A clinical and molecular view. *Hemoglobin*. 2004; 28(3): 267-71.
- Ballas SK, Mohandas N. Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1996; 10(6):1.221-39.
- Bezerra MAC, Santos MNN, Araujo AS, Gomes YM, Abath FGC, Bandeira FMGC. Molecular variations linked to the grouping of β - and α -Globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the State of Pernambuco, Brazil. *Hemoglobin*. 2007; 31(1):83-8.
- Brum MAR, Ávalos AH, Matos MFC, Azato N, Moreira LHM, Tsutsumi MT, et al. Hemoglobinas anormais em Campo Grande – MS. *Laes & Haes*. 1997; 107:86-92.
- Brum MAR. Hemoglobinopatias em comunidade Afro-Brasileiras em Mato Grosso do Sul [dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2001.
- Cabral CHK, Serafin ESS, Medeiros WRDB, Fernandes TAAM, Kimura EM, Rebecchi IMM, et al. Determinação de haplótipos do gene β S em pacientes com anemia falciforme no estado do Rio Grande do Norte. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010; 32(Supl 4):205-6.
- Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007; 29(3):203-6.
- Cançado RD, Lobo C, Ângulo IL, Araujo PIC, Jesus JA. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. *Rev Bras Hemato Hemoter*. 2009; 31(5):361-6.
- Cardoso GM, Guerreiro JF. African gene flow to North Brazil as revealed by HBB*S Gene Haplotypes Analysis. *Am J Hum Biol*. 2006; 18(1):93-8.
- Charache S, Dover GJ, Moore RD, Eckert S, Ballas SK, Koshy M, et al. Hydroxyurea: Effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 1992; 79(10):2555-65.
- Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the multicenter study of Hydroxiurea in sickle cell anemia. *N Eng J Med*. 1995; 332(20):1317-22.

Clarke MG, Higgins NT. Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and update. Clin Chem. 2000; 46(8B):1284-90.

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

Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. Clin Biochem. 2009; 42(18):1824-38.

Covas DT, Ângulo IL, Palma PVB, Zago MA. Effects of Hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. Haematologica. 2004; 89(3):273-80.

Curtin, PD. The Atlantic slave trade: A census. Madison: University of Wisconsin Press, 1969.

Davies SC, Gilmore A. The role of Hydroxyurea in management of sickle cell disease. Blood Rev. 2003; 17(2):99-109.

De Mello Auricchio MT, Vicente JP, Meyer D, Mingroni-Netto RC. Frequency and origins of hemoglobin S mutation in African-derived Brazilian populations. Hum Biol. 2007; 79(6):667-77.

Falusi AG, Olatungi PO. Effects of alpha thalassaemia and haemoglobin F (HbF) level on the clinical severity of sickle-cell anaemia. Eur J Haematol. 1994; 52(1):13-5.

Fathallah H, Atweh GF. Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2006:58-62.

Figueiredo MS, Kerbauy J, Gonçalves MS, Arruda VR, Saad ST, Sonati MF, et al. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. Am J Hematol. 1996; 53(2):72-6.

Figueiredo MS. Fatores moduladores da gravidade da evolução clínica da anemia falciforme. Rev Bras Hematol Hemoter. 2007; 29(3):215-7.

Fleury MK. Haplótipos do cluster da globina em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro. Rev Bras Anal Clin. 2007; 38(2):88-93.

Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. J Clin Invest. 2007; 117(4): 850-858.

Galiza Neto GC, Pitombeira MS, Vieira HF, Vieira MLC, Faria DAB. Análise dos haplótipos do gene da β S globina no Ceará. Bras Patol Med Lab. 2005; 41(5):315-21.

Galiza Neto GC, Pitombeira MS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. J Bras Patol Med Lab. 2003; 39(1):51-6.

Gonçalves MS, Bonfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A, et al. β S-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36(10):1283-8.

Gonçalves MS, Nechtman JF, Figueiredo MS, Kerbaux J, Arruda VR, Sonati MF, et al. Sickle cell disease in a Brazilian population from São Paulo: A study of the β S haplotypes. *Hum Hered*. 1994; 44(6):322-7.

Higgs DR, Weatherall DJ. The alpha Thalassaemias. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(7):1154-62.

Holsbach DR, Ivo ML, Honer MR, Rigo L, Botelho CAO. Ocorrência de hemoglobina S no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *J Bras Patol Med Lab*. 2008; 44(4):277-82.

Inati A, Taher A, Bou Alawi W, Koussa S, Kaspar H, Shbaklo H, Zalloua PA. β -Globin gene cluster haplotypes and HbF levels are not the only modulators of sickle cell disease in Lebanon. *Eur J Haematol*. 2003; 70(2):79-83.

Kan YW, Dozy AM. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β -globin structural gene: Relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1978; 75(11):5631-5.

Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL. The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes. *Blood Rev*. 1996; 10(1):29-44.

Kinney TR, Helms RW, O'Branski EE, Ohene-Frempong K, Wang W, Daeschner C, 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*. 1999; 94(5):1550-4.

Lyra IM, Gonçalves MS, Braga JA, Gesteira MF, Carvalho MH, Saad ST, et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2005; 21(4):1287-90.

Mouélé R, Galactéros F, Feingold J. Haemoglobin F (HbF) levels em sickle-cell anaemia patients homozygous for the Bantu haplotypes. *Eur J Haematol*. 1999; 63(2):136-7.

Mousinho-Ribeiro RC, Cardoso GL, Sousa IEL, Martins PKC. Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008; 30(2):136-41.

Nagel RL. The origin of the hemoglobin S gene: Clinical, genetic and anthropological consequences. *Einstein Q J Biol Med*. 1984; 2:53-62.

Naoum PC, Naoum FA. Doenças das células falciformes. São Paulo: Sarvier; 2004.

Naoum PC. Hemoglobinopatias e talassemias. São Paulo: Sarvier; 1997.

Naoum PC. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2000; 22(1):5-22.

Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1984; 81(6):1771–3.

Pante-de-Sousa G, Mousinho-Ribeiro RC, Santos EJ, Guerreiro JF. β -Globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West África. *Ann Hum Biol.* 1999; 26(4):365-73.

Pante-de-Sousa G, Mousinho-Ribeiro RC, Santos EJM, Zago MA, Guerreiro JF. Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: The combined effects of slave trade and internal migrations. *Genet Mol Biol.* 1998; 21(4):427-30.

Pettit JE, Hoffbrand AV, Moss PAH. *Fundamentos em hematologia*. Porto Alegre: Artmed; 2006.

Powars DR, Hiti A. Sickle cell anemia: β^S gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *Am J Dis Child.* 1993;147(11):1197-202.

Powars DR. β^S gene cluster haplotypes in sickle cell anemia: Clinical and hematologic features. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1991; 5(3):475-93.

Rodriguez Romero W, Sáenz Renauld, GF, Chaves Villalobos, MA. Haplótipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica. *Rev Panam Salud Publica.* 1998; 3(1):1-8.

Sakamoto TM. Hemoglobinopatias e anemias em gestantes no Hospital Universitário de Campo Grande - MS [Dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2008.

Schiffman JF. *Fisiopatologia hematológica*. São Paulo: Santos; 2004.

Serjeant GR. Sickle-cell disease. *Lancet.* 1997; 350(9079):725-30.

Silva PH, Hashimoto Y, Alves HB. *Hematologia laboratorial*. Rio de Janeiro: Revinter; 2009.

Silva Filho IL, Ribeiro GS, Pimenta-Bueno LM, Serpa MJA. The frequency of β -Globin gene haplotypes, α -thalassemia and genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase, factor V Leiden and prothrombin genes in children with sickle cell disease in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(1):76-8.

Silva LB, Gonçalves RP, Rabenhorst SHB. Análise dos haplótipos da anemia falciforme em Fortaleza revela as origens étnicas da população cearense. *J Bras Patol Med Lab.* 2009; 45(2):115-8.

Silva MC, Shimauti EL. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006; 28(2):144-8.

Silva RBP, Ramalho AS, Cassorla RMS. A anemia falciforme como problema de Saúde Pública no Brasil. *Rev Saúde Pública.* 1993; 27(1): 54-8.

Simões BP, Pieroni F, Barros GMN, Machado CL, Cançado RD, Salvino MA, et al. Consenso brasileiro de transplante de células-tronco hematopoéticas: Comitê de Hemoglobinopatias. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010; 32(Supl 1):46-53.

Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 1997; 337(22):1584-90.

Sonati MF, Costa FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *J Pediatr (Rio J)*. 2008; 84(4 Suppl):S40-51.

Steinberg MH, Lu ZH, Barton FB, Terrin ML, Charache S, Dover GJ. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Determinants of response to hydroxyurea. *Blood*. 1997; 89(3):1078-88.

Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1999; 340(13):1021-30.

Steinberg MH. Modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. *Hemoglobin*. 1996; 20(1):1-19.

Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2005; 129(4):465-81.

Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal*. 2008; 8:1295-324.

Stypulkowski JB, Manfredini V. Alterações hemostáticas em pacientes com doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010; 32(1):56-62.

Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol*. 1989; 32(1):66-9.

Thein SF, Menzel S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *Br J Haematol*. 2009; 145(4):455-67.

Thein SL. Genetic modifiers of the β -haemoglobinopathies. *Br J Haematol*. 2008; 141(3):357-66.

Wagner S, Friedrish J, Job F, Hutz M. Caracterização molecular de pacientes com anemia falciforme de Porto Alegre. *Ann Genet Mol Biol*. 1996; 19(Supl):244. (abstract).

Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem. *Bull World Health Organ*. 2001; 79(8):704-12.

Weatherall DL, Clegg JB. Inherited disorders of haemoglobin. The hemoglobinopathies. In: Weatherall DJ, Clegg JB, editores. *The thalassaemia syndromes*. London: Blackwell Scientific Publications; 1981. p. 85-132.

Wood WG, Clegg JB, Weatherall DJ. Hereditary persistence of fetal haemoglobin (HPFH) and delta beta thalassaemia. *Br J Haematol*. 1979; 43(4):509-20.

Zago MA, Figueiredo MS, Ogo SH. Bantu beta s cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. *Am J Phys Anthropol*. 1992; 88(3):295-8.

Zago MA, Pinto ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007; 29(3):207-14.

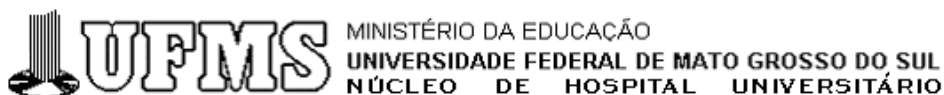
Zago MA, Silva WA Jr, Dalle B, Gualandro S, Hutz MH, Lapoumeroulie C, et al. Atypical β S haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *Am J Hematol*. 2000; 63(2):79-84.

Zago MA. Defeitos hereditários das hemoglobinas. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R, editores. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 279-87.

APÊNDICES

.

APÊNDICE A



Da: Rozilda Pulquério Salles
Para: Chefia do Ambulatório de Hematologia – HU/UFMS

CI n. 01/ 2009

Via: Direta
Data: 10/11/2009
Assunto: Projeto de Mestrado

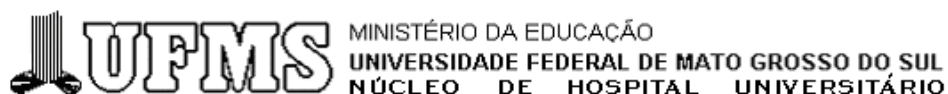
Prezado Senhor (a)

Solicito autorização dessa chefia para desenvolvimento de pesquisa do meu projeto de mestrado **“Identificação dos haplótipos do gene β^S e aspectos hematológicos em indivíduos com anemia falciforme em Campo Grande, MS”** junto aos pacientes com anemia falciforme desse ambulatório, sob orientação da Prof.^a D.^{ra} Maria Lúcia Ivo.

Atenciosamente,

.....
Rozilda Pulquério Salles
Farmacêutica e Bioquímica/NHU

APÊNDICE B



Da: Rozilda Pulquério Salles (Mestranda)
Para: Ambulatório de Hematologia do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul.

Via: Direta
Data: 22/10/2009
Assunto: Projeto de Mestrado

Prezados Senhores,

Solicito autorização desse setor para desenvolvimento de pesquisa do meu projeto de mestrado **“Identificação dos haplótipos do gene β^S e aspectos hematológicos em indivíduos com anemia falciforme em Campo Grande, MS”** junto aos pacientes com anemia falciforme atendidos no Ambulatório de Hematologia desse Hospital, sob orientação da Prof.^a D.^{ra} Maria Lúcia Ivo.

Atenciosamente,

.....
Rozilda Pulquério Salles
Farmacêutica e Bioquímica

APÊNDICE C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto de pesquisa: “*Identificação dos haplótipos do gene β^S e aspectos hematológicos em indivíduos com anemia falciforme em Campo Grande, MS*”.

Como voluntário(a) o senhor(a) está sendo convidado(a) participar de uma pesquisa. Você decide se quer participar ou não.

É importante que o (a) senhor (a) leia cuidadosamente o que se segue:

1. A sua participação é inteiramente voluntária;
2. Sua saída da pesquisa pode ser feita a qualquer momento, sem nenhuma consequência para você ou sua família e nem no seu tratamento;
3. Esta pesquisa está sendo coordenada, pela Prof.^a D.^{ra} Maria Lúcia Ivo, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. Pergunte a ela ou a pesquisadora Rozilda Pulquério Salles qualquer dúvida que você possa ter;
4. Telefone: (67) 8401-4752 (Dra. Maria Lúcia); (67) 9983-9406 (Rozilda);
5. O sangue coletado será utilizado somente nesta pesquisa;
6. Os resultados da pesquisa serão publicados em revistas científicas, no entanto, sua identidade será mantida em sigilo, não sendo revelada em momento algum;
7. Qualquer reclamação sobre o procedimento do estudo poderá procurar a secretaria do Comitê de Ética da UFMS: 3345-7187.

Objetivo e informações gerais da pesquisa:

A população brasileira apresenta genes para as hemoglobinas anormais com frequências variáveis e influenciadas por seus grupos étnicos formadores.

A anemia falciforme é uma doença genética causada por alterações do gene na produção da cadeia de hemoglobina. Estas alterações, quando em baixa tensão de oxigênio, provocam deformação nos glóbulos vermelhos (hemácias em foice) e consequente obstrução dos vasos sanguíneos, anemia hemolítica crônica além de constantes crises de dores. O presente trabalho tem por objetivo identificar essas alterações (haplótipos) a fim de determinar a frequência com que elas acontecem em nossa região e comparar com os estudos já realizados em diversas cidades brasileiras.

Participantes da pesquisa:

Participarão da pesquisa crianças e adultos com anemia falciforme atendidas no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário da UFMS e Hospital Regional de Mato do Sul que assinarem este Termo de Compromisso Livre e Esclarecido.

Quando o participante for menor de idade, os pais ou responsáveis serão consultados sobre a autorização para participar da pesquisa.

Como será sua participação:

Será realizada uma coleta de sangue (8 mL) para a dosagem de hemoglobina fetal, identificação dos haplótipos, realização de hemograma e dosagem bioquímica

Inconvenientes:

A coleta de sangue, às vezes pode ser seguida de dor e/ou hematoma (roxidão) no local da punção, que pode durar de três a cinco dias. Até o momento não foram identificados outros riscos para a sua saúde, com este procedimento.

Benefícios:

O resultado deste estudo trará ao médico responsável informações que possam colaborar na conduta e prevenção dos sinais e sintomas por meio de adequada assistência orientação, tratamento e acompanhamento do paciente, proporcionando-lhe uma melhora na qualidade de vida.

Lembramos que o(a) senhor(a) não receberá qualquer recurso financeiro para participar desta pesquisa.

Declaro estar ciente do teor deste documento, bem como que minha identidade será preservada, não sendo meu nome citado em publicações científicas, nem em apresentações dos resultados da pesquisa.

Declaro ainda, ter recebido uma cópia deste consentimento e de estar ciente que outra cópia permanecerá no Laboratório de Análise Clínicas do Hospital Universitário da UFMS em Campo Grande, MS.

.....
Assinatura do participante da pesquisa (maior de idade)

.....
Assinatura dos pais e/ou responsável pelo(a) menor

.....
Assinatura e telefone do pesquisador (67) 3345-3173

Campo Grande, MS, / /

APÊNDICE D

Identificação dos haplótipos do gene β^S e aspectos hematológicos em indivíduos com anemia falciforme em Campo Grande, MS.

Formulário: **Data da coleta:**

1- INFORMAÇÕES GERAIS

Data de nascimento:

Onde nasceu:

Etnia: [] caucasoide [] não caucasoide

Naturalidade dos pais:

Mãe:

Pai:

Faz uso de hidroxiureia: sim [] não []

Data de início:

Data da última dose:

Faz transfusão sanguínea: sim [] não []

Data da última transfusão:

2- DADOS LABORATORIAIS

GV VG Hb VCM

HCM CHCM BT BD

BI DHL RET HbF

Haplótipos:

Eletroforese de hemoglobina:

APÊNDICE E

Azul de cresil brilhante	1,00 g
Citrato de sódio	0,40 g
Cloreto de sódio	0,85 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

APÊNDICE F

Preparação das soluções:Tampão de lise:

NH_4Cl (cloreto de amônio) → pesar 15,4 g para 2.000 mL de água destilada.

NH_4HCO_3 (bicarbonato de amônio) → pesar 0,79 g para 1.000 mL de água destilada.

Autoclavar as soluções.

TKM1

10 mM TRIZ-HCl pH 7,6		2,5 mL de 2 M
10 mM KCl		5 mL de 1 M
10 mM MgCl_2		5 mL de 1 M
20 mM EDTA		5 mL de 0,2 M
q.s.p.		500 mL

TKM2

10 mM TRIZ-HCl, pH 7,6		2,5 mL de 2 M
10 mM KCl		5 mL de 1 M
0,4 M NaCl		40 mL de 5 M
10 mM MgCl_2		5 mL de 1 M
20 mM EDTA		5 mL de 0,2 M
q.s.p.		500 mL

Soluções de estoque:

TRIS-HCl, pH 7,6, 2 M

PM: 121,1 g/mol.

Pesar 121,1 g para 500 mL de água destilada. Autoclavar.

KCl 1 M

PM: 74,55 g/mol.

Pesar 3,727 g para 50 mL de água destilada. Autoclavar.

MgCl_2 1 M

PM: 203,30 g/mol

Pesar 10,165 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ para 50 mL de água destilada. Autoclavar.

EDTA 0,2 M

PM - 372,24 g/mol.

Pesar 7,44 g para 100 mL de água destilada. Autoclavar.

NaCl 5 M

PM: 58,44 g/mol.

Pesar 292,2 g para 1.000 mL de água destilada. Autoclavar.

SDS 10%

Pesar 10 g para 100 mL de água destilada. (Autoclavar somente a água, pois o SDS se precipita.)

Acetato de sódio 3 M, pH 5,2

Merck → PM - 136,08 g/mol.

Pesar 163,29 g para 400 mL de água destilada.

Sigma → PM - 82,03 g/mol.

Pesar 98,436 g para 400 mL de água destilada.

Acertar o pH e autoclavar.

TE – Tampão TRIS-EDTA

Pesar:

1,211 g de TRIS

0,372 g de EDTA

q.s.p. 1.000 mL

Autoclavar.

Clorofórmio/álcool isoamílico

Misturar 24 partes de clorofórmio para 1 parte de álcool isoamílico ((960 mL de clorofórmio + 40 mL de álcool isoamílico)

Guardar em geladeira.

ANEXO

AUTORIZAÇÕES PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

*Carta de Aprovação*

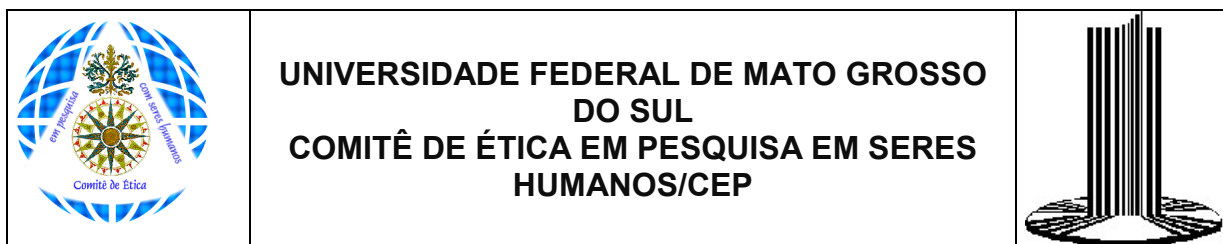
A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1608 da Pesquisadora Rozilda Pulquério Salles intitulado "Identificação dos haplótipos do gene beta S na anemia falciforme em Campo Grande-MS", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 26 de novembro de 2009, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos

Coordenador em exercício do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 27 de novembro de 2009.

 GOVERNO DO Mato Grosso do Sul RUMO AO DESENVOLVIMENTO	GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE FUNDAÇÃO SERVIÇOS DE SAÚDE DE MS UNIDADES: HRMS – PERÍCIA MÉDICA	 FUNSAU FUNDAÇÃO DE SAÚDE DE MS
AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, declara estar informado da metodologia que será desenvolvida no projeto de pesquisa intitulado “IDENTIFICAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GENE BETA S NA ANEMIA FALCIFORME EM CAMPO GRANDE MS”. Desenvolvido por Rozilda Pulquério Salles, a título de mestrado, sob orientação da Professora Dr^a Maria Lúcia Ivo, pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Ciente de que sua metodologia será desenvolvida conforme a resolução CNS 196/96 e das demais resoluções complementares autorizo a realização da pesquisa nesta instituição.  Dr^a Magali da Silva Sanches Machado Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa		



DECLARAÇÃO DE USO DE MATERIAL BIOLÓGICO E DADOS COLETADOS

Declaramos, para os devidos fins, que o material biológico (sangue periférico), os dados e as informações coletadas serão usados exclusivamente para os fins previstos no protocolo intitulado: **“Identificação dos haplótipos do gene β^S e aspectos hematológicos dos indivíduos com anemia falciforme em Campo Grande, MS”** e as amostras, após a realização dos testes, serão desprezadas de acordo com o POP (Procedimento Operacional Padrão) do laboratório.

Campo Grande, 1º de outubro de 2009.

.....
ROZILDA PULQUÉRIO SALLES