

ADEMILTON COSTA ALVES

**CARACTERIZAÇÃO DE HAPLÓTIPOS EM
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME NO
ESTADO DO MARANHÃO**

**SÃO LUÍS – MA
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ADEMILTON COSTA ALVES

**CARACTERIZAÇÃO DE HAPLÓTIPOS EM PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME NO ESTADO DO MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Mestrado da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Antônio Gomes
Oliveira

Co-orientador: Prof. Ms. Sônia Maria Pereira
Cruz

**SÃO LUÍS – MA
2010**

Alves, Ademilton Costa.

Caracterização de haplótipos em pacientes com anemia falciforme no Estado do Maranhão / Ademilton Costa Alves. - São Luis, 2010.

57f.

Impresso por computador (Fotocópia).

Orientador: Raimundo Antônio G. Oliveira.

Co-Orientadora: Sônia Maria P. Cruz.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2010.

1. Anemia falciforme - Incidência - Maranhão 2. PCR-RFLP 3. Haplótipos I. Título

CDU 616.155.134 (812.1)

ADEMILTON COSTA ALVES

**CARACTERIZAÇÃO DE HAPLÓTIPOS EM PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME NO ESTADO DO MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Mestrado da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Silvio Gomes Monteiro
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a Dr^a Azizedite Guedes Gonçalves
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a Dr. José Maurício Dias Bezerra
Universidade Estadual do Maranhão

A Deus, minha maior fonte de energia e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois me ensinou a aumentar minha fé e dar mais valor a vida, a partir da aprendizagem com os momentos de dificuldade. Toda honra, glória e louvor são para Ele.

Aos meus pais José de Ribamar Costa Alves e Magnólia Costa Alves, que resumiram para mim, no decorrer da vida, os sentimentos de amor, amizade, respeito, carinho e acima de tudo fé e humildade. E aos meus queridos irmãos Prof .Ms. Adilton Costa Alves e Tatyane Costa Alves, por fazerem parte da minha vida.

A todos os meus familiares e amigos, que souberam entender as minhas ausências e sempre ofereceram os seus auxílios. Em especial, a minha noiva e futura esposa Danielle Andrade Paz, que representa para mim, à vontade e o entusiasmo de querer progredir a cada dia.

Ao meu Orientador, Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira Prof. Adjunto de Hematologia Clínica do DEFAR-UFMA, Farmacêutico-Bioquímico do Hospital Universitário da UFMA, Pesquisador Clínico do CEPEC-HUUFMA Doutor em Análises Clínicas – FCF-USP, por todos os seus ensinamentos e principalmente pela oportunidade a mim conferida.

A minha co-orientadora Ms. Sônia Maria Pereira Cruz Prof^a Adjunto de Hematologia Clínica do DEMEDII-UFMA, Médica Hematologista do Hospital Universitário da UFMA, Mestre em Hematologia UNIFESP, pela disponibilidade e atenção disponibilizada ao trabalho.

À Professora Dr^a Marilene Oliveira da Rocha Borges, ex-coordenadora do mestrado em Ciências da Saúde da UFMA, por toda compreensão e atenção a mim proporcionada. E a Dr^a Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, coordenadora atual do mestrado em Ciências da Saúde da UFMA, que sempre foi prestativa com todos os alunos.

À colega de profissão e amiga Dr^a Verônica Avena Lisboa da Silva, por ter iniciado esta pesquisa com os pacientes falcêmicos e, conseqüentemente, ter possibilitado a mim a oportunidade de executar este trabalho, que foi complementar ao seu.

Aos pacientes portadores de anemia falciforme no Estado do Maranhão que fazem tratamento no HEMOMAR e seus responsáveis, que se dispuseram a participar dessa pesquisa. Que este trabalho possa ser mais uma forma de divulgar a luta desses pacientes por melhores dias.

A todos os funcionários do HEMOMAR, que de forma direta o indireta contribuíram para conclusão e êxito desta pesquisa.

Agradeço principalmente aos meus colegas do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário - UFMA (CEPEC-HUUFMA) pela amizade, respeito, carinho e ajuda desempenhada no desenvolvimento deste trabalho. Em especial ao profissional e amigo, Alexsandro dos Santos, por sua orientação e dedicação oferecida a mim, na execução deste trabalho

Aos meus amigos e colegas de trabalho do HMSVF, que sempre estiveram dispostos a cooperar com minhas atividades acadêmicas. Em especial aos Farmacêuticos-Bioquímicos: Dr. Antônio Fábio Batista Zeferino e o Dr. Afonso Abreu Gomes Junior, que foram muito amigos e prestativos nos momentos necessários.

A todos os meus colegas do Mestrado, pelo privilégio de suas presenças em um momento tão importante da minha vida.

*“Confia ao Senhor as tuas obras, e os teus
desígnios serão estabelecidos.”*

Provérbios 16:3

RESUMO

A anemia falciforme é provavelmente a doença hematológica hereditária mais prevalente na população brasileira, sendo mais freqüente nas regiões sudeste e nordeste. A hemoglobina presente nessa patologia é a HbS, resultante de uma mutação que substitui o aminoácido ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia da β globina. Os haplótipos do gene da β -globina são nomeados de acordo com a região geográfica e o grupo étnico em que eles são freqüentemente encontrados, ou seja, República da África Central (CAR), Benin (BEN), Camarões (CAM), Indo-Árabe (ARB) e Senegal (SEN). O presente estudo teve como objetivo determinar os haplótipos de pacientes portadores de anemia falciforme acompanhados em serviços públicos ambulatoriais no município de São Luís, Maranhão. Vinte e oito pacientes foram analisados nesse estudo. Para a caracterização dos haplótipos, o DNA genômico foi extraído de *buffy-coat*, submetido a PCR e posteriormente o produto foi digerido utilizando enzimas de restrição específicas, a partir de protocolos já estabelecidos. O haplótipo CAR foi o mais freqüente, com 64,28%, seguido do haplótipo BEN com 28,57%. Foram considerados haplótipos atípicos 7,15%. Dos pacientes analisados, 46,43% e 10,71% foram considerados homocigotos para o CAR e BEN, respectivamente, e 35,71% foram heterocigotos para estes haplótipos. Com base na literatura existente sobre os haplótipos do gene da β -globina, os resultados obtidos neste estudo apresentaram-se de forma semelhante aos dados brasileiros que mostram uma predominância dos cromossomos tipo CAR entre os pacientes estudados. A determinação dos haplótipos do “cluster” da β -globina é de grande importância não só para o acompanhamento e prognóstico dos pacientes de anemia falciforme, bem como serve de subsídio para estudos antropológicos que contribuam no esclarecimento da origem dos africanos que tanto contribuíram na formação etnológica, econômica, cultural e social do Brasil.

Palavras-chave: Anemia falciforme. PCR-RFLP. Haplótipos. Maranhão

ABSTRACT

Sickle cell anemia is probably hereditary hematological disease more prevalent in Brazilian population and is more frequent in the southeast and northeast of this country. Sickle cell hemoglobin (HbS) is the result of a single nucleotide change in the β -globin gene, where valine replaces glutamic acid at the sixth amino acid position of the β -globin chain. The major β -globin gene haplotypes are named according to the geographical origin and ethnic group in which they are frequently found, *i.e.*, Central African Republic (abbreviated to CAR), Benin (BEN), Cameroon (CAM), Arab-India (ARB) and Senegal (SEN). The aim of this study was to analyse six polymorphic sites in the β -globin gene cluster on a sample of 56 chromosomes of sickle cell patients from the State of Maranhão, Brazil. Genomic DNA and PCR-RFLP was done using protocols just established. PCR-RFLP showed that the CAR haplotype was predominant with a frequency of 64.28%, followed by the BEN haplotype (28.57%). Atypical haplotypes were identified with a frequency of 7.15%. Genotype was CAR/CAR in 46.43% patients, BEN/BEN in 10.71% and CAR/BEN in 35.71%. Based on records of the in Brazil, the results obtained in this study were similar to Brazilian data showing a predominance of CAR chromosomes among the patients studied. The determination of β -globin gene haplotypes has great importance not only for monitoring sickle cell disease patients but may be useful as one predictor of disease and can help anthropological studies in clarifying the origin of Africans who have contributed in ethnological, economic, cultural and social development of Brazil.

Key-words: Sickle cell disease. PCR-RFLP. Haplotypes. Maranhão

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição da frequência de haplótipos e cromossomos de pacientes com anemia falciforme em São Luís, Maranhão, em 2008.	45
Tabela 2 –	Distribuição da frequência (%) dos haplótipos encontrados no Maranhão em comparação com estudos realizados em outros estados do Brasil.	46

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO EXTENDIDA

Figura 1 –	Estruturas em 3D da hemoglobina A	15
Figura 2 –	Localização dos genes no complexo da β -globina	17
Figura 3 –	Principais haplótipos do “cluster” gênico da β -globina	25

CAPÍTULO I

Figura 1 –	Gel de agarose a 2% apresentando amplificação dos 6 sítios polimórficos analisados no gene da β -globina	48
Figura 2 –	Gel de agarose 2% a apresentando a digestão de 5 dos 6 sítios polimórficos analisados no gene da β -globina	49
Figura 3 –	Gel de agarose a 2% apresentando a digestão apenas do sítio $G\gamma$, confirmando um haplótipo CAR/CAR	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	–	Adenina
AF	–	Anemia falciforme
ARB	–	Arábia Saudita e Índia
ATP	–	Atípico
AVC	–	Acidente vascular cerebral
BEN	–	Benin
CAR	–	Central African Republic (República Central Africana)
CAM	–	Camarões
DF	–	Doenças falciformes
DNA	–	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)
Fe	–	Ferro
G	–	Guanina
Hb	–	Hemoglobina
HbF	–	Hemoglobina fetal
HPLC	–	Cromatografia líquida de alta performance
HU	–	Hidroxiuréia
Kb	–	Quilobase
MA	–	Maranhão
OMS	–	Organização Mundial da Saúde
SEN	–	Senegal
SUS	–	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

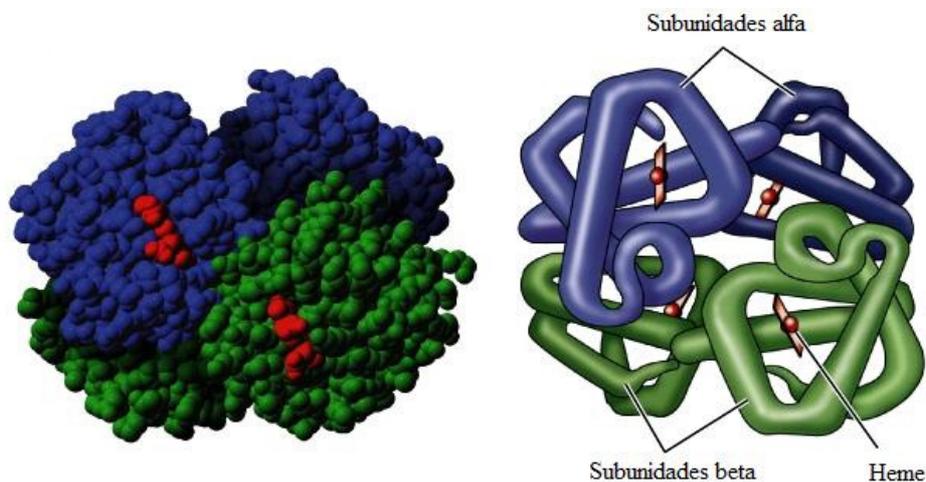
RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
SUMÁRIO.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 A HEMOGLOBINA.....	15
1.2 GENÉTICA MOLECULAR DA HEMOGLOBINA	16
1.3 HEMOGLOBINA S E A ANEMIA FALCIFORME.....	17
1.4 A HISTÓRIA DA ANEMIA FALCIFORME	18
1.5 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ANEMIA FALCIFORME.....	19
1.6 FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME.....	20
1.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME.....	21
1.8 TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME.....	22
1.9 DIAGNÓSTICO DA ANEMIA FALCIFORME.....	23
1.10 HAPLÓTIPOS DO AGRUPAMENTO (CLUSTER) DO GENE β -GLOBINA.....	24
1.11 A ANEMIA FALCIFORME E OS HAPLÓTIPOS.....	26
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 GERAL.....	28
2.2 ESPECÍFICOS.....	28

3 CAPÍTULO I.....	29
ABSTRACT.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO.....	35
AGRADECIMENTOS.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
4 CONCLUSÃO.....	51
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICES	58
ANEXOS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 A HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) humana, presente no interior dos eritrócitos, é uma proteína tetramérica de estrutura globular, com peso molecular de 64.500 dáltons, composta por quatro cadeias polipeptídicas, ou cadeias de globina, cada uma delas associada a um grupo prostético heme (Figura 1), que possui um átomo de ferro divalente (Fe^{++}) capaz de se ligar de modo reversível à molécula de oxigênio, transportando-a dos pulmões para os tecidos (BUNN; FORGET, 1986; SILVA et al., 2006).



Fonte: Adaptado de BEIGUELMAN, 2006.

Figura 1 – Estruturas em 3D da hemoglobina A

A hemoglobina normal contém na sua molécula um componente protéico, a globina, composta de um tetrâmero polipeptídico com duas cadeias alfa (α) e duas que podem ser do tipo beta (β), gama (γ) ou delta (δ), dessa forma, apresentando a hemoglobina normal as hemoglobinas HbA1 ($\alpha_2\beta_2$), HbA2 ($\alpha_2\delta_2$), HbF ($\alpha_2\gamma_2$) (hemoglobina fetal) (OLIVEIRA; POLI-NETO, 2004). E de forma semelhante, combinações entre as diferentes globinas determinam os seis tipos de hemoglobinas humanas produzidas nas fases do desenvolvimento caracterizadas como embrionária, fetal e pós-nascimento (THOMPSON et al., 1991; NAOUM, 1997; GALIZA-NETO; PITOMBEIRA; 2003).

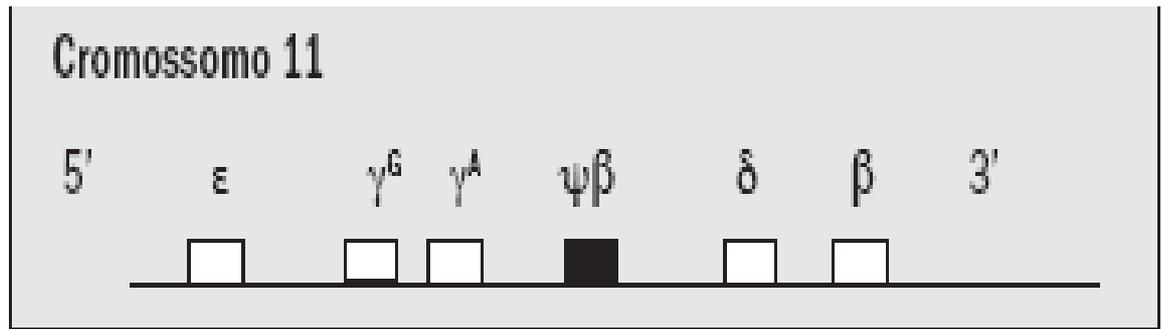
A hemoglobina fetal (HbF) predomina durante a fase fetal, acompanhada de pequena quantidade de hemoglobina do adulto (Hb A). Esta situação se inverte quando, próximo ao nascimento, a síntese de Hb A é intensamente ativada, e a produção de HbF vai sendo progressivamente desativada. No momento do nascimento, a síntese de HbF ainda constitui cerca de 60% do total, mas a substituição continua, e está quase completa entre o terceiro e o sexto mês de vida. Em adultos normais, há resquícios da produção de HbF, correspondendo a menos de 1% do total de hemoglobina (ZAGO et al., 2001).

1.2 GENÉTICA MOLECULAR DA HEMOGLOBINA

Existem pelo menos oito loci bem conhecidos comandando a síntese das globinas: alfa 1 ($\alpha 1$), alfa 2 ($\alpha 2$), beta (β), delta (δ), gama A (γA), gama G (γG), épsilon (ϵ) e zeta (ζ). Cada *locus* é responsável pela estrutura de um tipo de cadeia polipeptídica. Os genes das globinas α e β fazem parte de famílias multigênicas, que são agrupamentos de muitos genes, alguns deles não transcritos (SILVA, 2006).

A síntese das globinas do grupo alfa inclui as globinas zeta e alfa, e é obtida por um grupo de genes localizados no braço curto do cromossomo 16, na região 16p13.3. Já a síntese das globinas tipo β é mais heterogênea e abrangente do que a do tipo alfa, pois envolve a produção das globinas beta, delta, gama e épsilon. Esse grupo de genes está localizado no braço curto do cromossomo 11, em uma região com mais de 60Kb, e é constituído por cinco genes estruturais (Figura 2) (ZAGO et al., 2001; GALIZA-NETO; PITOMBEIRA, 2003).

O gene ϵ é expresso na fase embrionária, enquanto os genes γ^A (gama-alanina) e γ^G (gama-glicina) (Figura 2) são característicos do período fetal. Os genes δ e β são atuantes a partir do período fetal e se expressam por toda a vida após o nascimento. Pelo fato da espécie humana ser diplóide, podemos representar a presença normal dos diferentes genes para um indivíduo da seguinte forma: β/β , $\gamma\gamma$, δ/δ e $\alpha^1\alpha^2/\alpha^1\alpha^2$ (NAOUM, 1997; GALIZA-NETO; PITOMBEIRA, 2003).



Fonte: Adaptado (GALIZA-NETO; PITOMBEIRA, 2003)

Figura 2 – Localização dos genes no complexo da β -globina

Variantes estruturais raras se originam da deleção de um nucleotídeo, o que resulta em um desvio da fase de leitura no sentido descendente, com conseqüente alteração da seqüência de aminoácidos ou, por outro lado, extensão da cadeia polipeptídica porque o códon da terminação está alterado. Dependendo do tipo e do local onde ocorre uma substituição de aminoácido em uma cadeia de globina, esta poderá ou não alterar o comportamento da molécula de hemoglobina. Se a anormalidade estrutural produz manifestações clínicas, o indivíduo apresenta uma hemoglobinopatia. Mutações que alteram quantitativamente a síntese de uma das cadeias da globina originam as síndromes talassêmicas (RAPAPPORT, 1990; WINTROBE, 1998; SILVA, 2006).

Há quase 600 variantes de hemoglobina já descritas, porém, poucas estão associadas a manifestações clínicas e alterações hematológicas. O melhor exemplo é a hemoglobina S (OSÓRIO; ROBINSON, 1993).

1.3 HEMOGLOBINA S E A ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme é provavelmente a doença hematológica hereditária mais prevalente na população brasileira (BANDEIRA et al., 1999). A hemoglobina presente nessa patologia é a Hb S, causada pela homozigose do alelo β^S (SS), do gene da β -globina (INATI et al., 2003; ASHLEY et al., 2000; FLEURY, 2007). A hemoglobina falciforme Hb S é causada pela substituição de uma adenina (A) por uma timina (T), no sexto códon do gene da β -globina (GAG→GTG), ocasionando a substituição do ácido glutâmico pela valina na posição do

sexto aminoácido do polipeptídeo (ASHLEY et al., 2000; MAGAÑA et al., 2002; GONÇALVES et al., 2003; INATI et al., 2003).

Hb S ($\alpha_2\beta_2s$) polimeriza quando em baixa concentração de oxigênio (INATI et al., 2003; ASHLEY et al., 2000). Quando quantidades críticas de polímeros de Hb S acumulam-se dentro dos eritrócitos falcizados, ocorre lesão celular (STEINBERG e RODGERS, 2001). A Hb S é a principal hemoglobina presente nos eritrócitos anormais (GONÇALVES et al., 2003).

Indivíduos afetados que possuem uma cópia da hemoglobina variante Hb S e uma cópia de outra variante do gene β -globina, como por exemplo, Hb C, são heterozigotos compostos. Indivíduos portadores (traço falciforme) têm uma cópia da Hb S e uma cópia do alelo normal (Hb AS). Indivíduos com o traço falciforme parecem estar protegidos de infecção por malária (ASHLEY et al., 2000). Acredita-se que a alta frequência da variante Hb S em determinadas populações seja o resultado deste efeito protetor (ASHLEY et al., 2000; AIDOO et al., 2002). A ocorrência da mutação da AF e a vantagem de sobrevivência conferida ao indivíduo heterozigoto determinam a distribuição primária do alelo falciforme na África equatorial (SERJEANT, 2001).

As hemoglobinopatias são doenças da Hb oriundas de defeitos estruturais e de síntese dessa proteína. “Doenças Falciformes” (DF) é um termo genérico usado para identificar condições em que a associação da HbS com outra alteração de Hb, estrutural ou talassêmica, leva a um quadro clínico similar ao da Anemia Falciforme (AF) (homozigose do gene da HbS – SS). São exemplos mais comuns de DF: a Doença Falciforme SC, a S- β talassemia e a Hemoglobinopatia SD. Os heterozigotos da HbS (AS) são, via de regra, assintomáticos (BERTHOLO; MOREIRA, 2006)

1.4 A HISTÓRIA DA ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme surgiu nos países do centro-oeste do continente africano, na Índia e no leste da Ásia, de 50 a 100 mil anos, entre o período paleolítico e mesolítico. Há evidências de que a anemia falciforme já era conhecida pela população negra da África desde 1670 (GALIZA-NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Os primeiros relatos científicos foram feitos em 1904, por James B. Henrick que notou hemácias em forma de foice no sangue de um jovem estudante negro de medicina, em Chicago. Em 1917, Emmel observou a transformação da hemácia na sua forma original, bicôncava, para a forma de foice, *in vitro*, e, em 1922, o termo anemia falciforme foi utilizado por Manson. (WEATHERALL et al., 1989; GALIZA-NETO, 2005)

Em 1949, através dos trabalhos de Neel e Beet, é que se definiu a doença somente em estado de homozigose, sendo os heterozigotos portadores assintomáticos. Descobriu-se que a hemoglobina dos pacientes com anemia falciforme tinha uma variação no campo elétrico e mobilidade eletroforética, diferente da hemoglobina normal (GALIZA-NETO, 2005; RUIZ, 2007).

1.5 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ANEMIA FALCIFORME

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), 270 milhões de pessoas em todo o mundo são portadoras de genes que determinam distúrbios da hemoglobina, com algum grau de repercussão clínica. Cerca de aproximadamente 300.000 indivíduos com hemoglobinopatias nascem a cada ano. Desses, cerca de 200.000 casos de anemia falciforme ocorrem na África (MAGAÑA et al., 2002; BACKES et al., 2005; CANÇADO; JESUS, 2007).

A AF afeta milhões de pessoas no mundo todo, e ocorre em 1 a cada 500 nascimentos de afro-americanos e, em 1 a cada 1.000-4.000 nascimentos de hispano-americanos (GONÇALVES et al., 2003). No Brasil estima-se que existam cerca de quatro milhões de pessoas portadoras do traço falciforme, ou hemoglobina S heterozigota, e perto de 30.000 com a forma grave, incluindo AF (SS), doença Hb SC, e interação entre Hb S e talassemia β (NAOUM, 1997). Estima-se ainda, que 5,0-6,0% da população é portadora do gene da hemoglobina S, e ocorram 700 a 1000 novos casos de AF por ano (LYRA et al., 2005). Entre afro-descendentes brasileiros, o traço falciforme é encontrado em frequências que variam de 6,9 a 15% (GONÇALVES et al., 2003).

No Brasil as frequências do gene S variam enormemente conforme a influência africana na região. Em 1995, num dos maiores trabalhos de prevalência e distribuição de hemoglobinopatias já realizados no Brasil, 67.667 indivíduos de 48 cidades brasileiras foram

estudados, mostrando uma freqüência de 2,2% de portadores “AS” (FLEURY, 2007). E de acordo com a triagem neonatal, estima-se que nasçam, por ano, 3,5 mil crianças vítimas da doença falciforme, dados dos estados que aderiram ao Programa de Triagem Neonatal, que inclui o exame que detecta doença falciforme no teste do pezinho (CANÇADO; JESUS, 2007).

No Sistema Único de Saúde (SUS) já estão cadastrados cerca de 13 mil pacientes com anemia falciforme. E com base na prevalência genética da população brasileira, as estimativas apontam para a existência de 30 mil a 50 mil pessoas com a doença, em todo país. Para cada 35 pessoas que nascem no Brasil, uma registra traços de anemia falciforme. No Maranhão há um falcêmico para 1,4 mil nascidos vivos, o mesmo índice para Minas Gerais e Pernambuco, esse índice aumenta no Rio de Janeiro, sendo um para cada 1,2 mil e na Bahia onde há um falcêmico para cada 500 nascidos vivos (BRASIL, 2007).

1.6 FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME

A substituição do ácido glutâmico pela valina que caracteriza a Hb S, cria uma instabilidade que leva à polimerização da hemoglobina sob baixa saturação de oxigênio. Esse é o evento primário indispensável na patogênese molecular da AF e depende da concentração intra-eritrocitária das Hb S e Hb F, do grau de desoxigenação e do pH. A presença de concentrações elevadas de Hb F diminui a polimerização intracelular da Hb S (BUNN, 1997; STUART; NAGEL, 2004; FATHALLAH; ATHWEW, 2006).

O polímero de Hb S é uma fibra que se alinha com outras para formar um feixe, alterando o eritrócito para uma forma clássica de foice. O restabelecimento das condições físico-químicas adequadas devolve a solubilidade da hemoglobina. Células irreversivelmente falcizadas são células densas que não retornam à forma normal mesmo quando reoxigenadas, devido a dano irreversível sobre a membrana (STUART; NIGEL, 2004).

Essas células permanentemente falcizadas são destruídas prematuramente, o que caracteriza a AF como uma anemia hemolítica: aumento de bilirrubina indireta e de reticulócitos em crises hemolíticas. Podem ocorrer crises aplásticas, por exaustão da medula óssea, durante as quais há um agravamento da anemia, diminuindo a quantidade

de reticulócitos no sangue periférico (ÂNGULO, 2003).

A forma falcizada é originalmente a causa da obstrução da microcirculação, resultando em crise vaso-oclusiva. A vaso-oclusão de pequenos e algumas vezes de grandes vasos é a principal marca da AF, contribuindo muito para sua morbidade e mortalidade (ROSSE et al., 2000; STUART; NAGEL, 2004).

A vaso-oclusão e a isquemia tecidual na AF envolvem não somente a polimerização da Hb S, mas também interações entre os eritrócitos, endotélio, plaquetas, leucócitos e fatores do plasma. A polimerização da Hb S é o mais importante fator no ciclo da falcização e um aumento nos níveis de Hb fetal diminui a polimerização intracelular da Hb S (VICHINSKI, 2002).

A AF deve ser considerada uma doença inflamatória crônica, onde a gravidade das manifestações clínicas seria determinada por um estado pró-inflamatório amplificado, contribuindo para os episódios vaso-oclusivos, desempenhando assim, um importante papel na fisiopatologia da doença (CHIES; NARDI, 2001).

1.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME

É extremamente variável, a severidade das manifestações clínicas e hematológicas, podendo ir de uma doença grave a uma condição quase assintomática detectada apenas acidentalmente. Suas características hematológicas, bem como gravidade clínica, são influenciadas por variações nos níveis de hemoglobina fetal, presença simultânea de alfa talassemia, deficiência na glicose-6-fosfato desidrogenase e os haplótipos ligados ao grupamento do gene da β -globina (MORENO et al., 2002; INATI et al., 2003).

Sintomas clínicos mais leves têm sido descritos em pacientes que apresentam α -2 talassemia e altos níveis de hemoglobina fetal (Hb F), ligados à presença de haplótipos específicos (GONÇALVES et al., 2003; FLEURY, 2007).

A morbidade na AF surge de eventos vaso-oclusivos ou danos teciduais resultantes da obstrução do fluxo sangüíneo. A oclusão, principalmente em pequenos vasos, determina a grande maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes

com AF, tais como: crises álgicas, crises hemolíticas, úlceras de membros inferiores, síndrome torácica aguda, seqüestro esplênico, priapismo, necrose asséptica de fêmur, retinopatia, insuficiência renal crônica, auto-esplenectomia, AVC, entre outros (ASHLEY et al., 2000; GALIZA-NETO; PITOMBEIRA, 2003; STEINBERG, 2005).

As manifestações clínicas em pacientes árabes são geralmente mais leves que as manifestações clínicas em africanos, em parte devido à freqüente co-herança de elevados níveis de Hb F, que inibe a polimerização da Hb S (INATI et al., 2003).

Crianças com AF são particularmente mais suscetíveis a complicações sérias tais como AVC, síndrome torácica aguda, anemia aplástica severa, crises de seqüestro esplênico, infecção e falência múltipla dos órgãos (JENKINS, 2002). Asplenia funcional em pacientes jovens, autoesplectomia em adultos e defeito na opsonização, são os maiores fatores reconhecidos de predisposição a infecções bacterianas em pacientes com AF (RAGHUPATHY et al., 2000).

1.8 TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME

A expressão do fenótipo da AF varia amplamente entre diferentes pacientes. O tratamento continua a ser primariamente de natureza paliativa, sintomática e preventiva. Capacitação e educação são os maiores aspectos de um apoio cuidadoso. O tratamento sintomático inclui o controle da dor, transfusão de sangue e tratamento da falência de órgãos. O tratamento da dor segue certos princípios que incluem avaliação, individualização da terapia e utilização de analgésicos não opióides e opióides para adequado alívio (BALLAS, 2002; LOBO et al., 2007).

A síndrome respiratória aguda é uma das complicações clínicas mais comuns e seu tratamento deve ser agressivo, incluindo adequada ventilação, uso de múltiplos antibacterianos e simples transfusão de sangue ou troca transfusional, dependendo de sua severidade. A terapia preventiva inclui penicilina profilática em crianças, terapêutica transfusional em pacientes com AVC, e hidroxuriúria em pacientes com freqüentes episódios dolorosos ou complicações mais sérias (BALLAS, 2002; LOBO et al., 2007).

A inibição da falcização tem incluído agentes anti-falcizantes como o cianato e a

hidroxiuréia. A hidroxiuréia (HU) é um agente potencialmente menos tóxico que aumenta os níveis de Hb F. Ambos os aspectos clínico e laboratorial da anemia falciforme são influenciados pela concentração de Hb F. Pacientes com níveis mais altos de Hb F apresentam menos episódios de dor e maior sobrevida (SERJEANT, 2001; KLINGS, 2006; MACHADO, 2007).

1.9 DIAGNÓSTICO DA ANEMIA FALCIFORME

O diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias falciformes é relativamente simples. A eletroforese de Hb alcalina em acetato de celulose continua sendo a metodologia básica para a qualificação de grande parte das hemoglobinas mutantes. A existência de outras hemoglobinas mutantes que podem imitar as características eletroforéticas da Hb S, obriga o uso de mais de um método de análise, para assegurar a correta identificação. Métodos simples, como o teste de falcização, a prova de solubilidade ou a eletroforese ácida em ágar, podem ser utilizados para esse fim. Atualmente, a introdução de técnicas alternativas, como a focalização isoelétrica e a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) têm permitido melhor análise das hemoglobinas variantes (ZAMARO et al., 2002).

O diagnóstico da anemia falciforme baseia-se ainda nos achados do hemograma, que apresentam anemia normocrômica e normocítica, reticulocitose, presença de corpos de Howell-Jolly nos eritrócitos, eritroblastos orto e policromáticos, além de hemácias falcizadas, leucocitose, plaquetose, elevação de bilirrubinas e hemoglobina S em níveis de 85 a 100% (VERRASTRO, 2001).

Através da biologia molecular, utilizando a técnica de PCR ("Polymerase Chain Reaction"), é possível multiplicar uma seqüência do DNA no qual se encontra a mutação. Através de células sanguíneas, o diagnóstico por DNA pode também ser aplicado para triagem em sangue de cordão umbilical e para o diagnóstico de algumas hemoglobinopatias S de difícil definição, especialmente na ausência de estudos familiares (NAOUM, 1997).

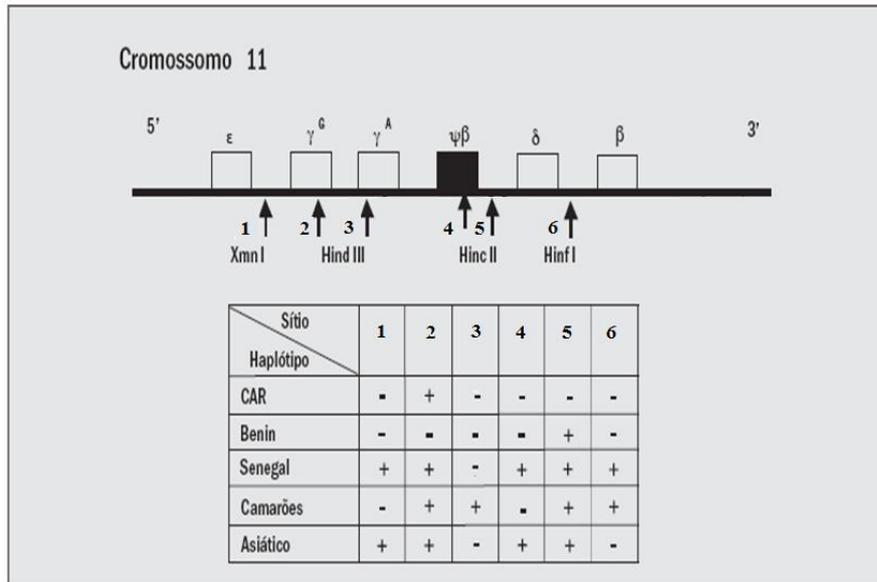
A análise direta de ácidos nucléicos oferece, em princípio, melhor abordagem para o diagnóstico de malignidade no ser humano e de doenças genéticas, uma vez que todas são causadas diretamente por mutações no genoma. Assim, a análise de ácidos nucléicos permite

o diagnóstico baseado na detecção da causa e não em sintomas ou efeitos secundários (LIMA, 2001).

1.10 HAPLÓTIPOS DO AGRUPAMENTO (CLUSTER) DO GENE β -GLOBINA

É do conhecimento geral que indivíduos são geneticamente diferentes, e que algumas das diferenças entre as pessoas representam alterações genéticas patológicas. O *locus* β está localizado no cromossomo 11, em uma região que tem sofrido uma série de transformações através do tempo. Usando uma série de enzimas de restrição, que identifica alterações específicas do DNA, é possível verificar a constituição das regiões adjacentes ao *locus* β . Uma determinada ordem de marcadores herdada em bloco, observada em um cromossomo particular é denominada haplótipo. Haplótipos específicos são encontrados no cromossomo portador do alelo β^S (Figura 3) (SALZANO; BORTOLINI, 2002).

A variabilidade clínica da anemia falciforme é influenciada por fatores genéticos que modificam a expressão da doença (COSTA et al., 2006). A utilização de técnicas de biologia molecular permite a identificação de marcadores moleculares distribuídos na região do grupo de genes β , possibilitando a subclassificação dos pacientes. O gene da hemoglobina S está diretamente ligado a cinco principais haplótipos do sítio polimórfico das endonucleases de restrição do grupo dos genes β . Os haplótipos são relatados em diferentes regiões do mundo e são relacionados com países ou áreas do continente africano ou próximo a ele, estando ligados a grupos populacionais específicos, recebendo as denominações de acordo com os locais de sua origem: Benin, República Centro-Africana, Senegal, Camarões, Arábia Saudita e Índia (GALIZA-NETO et al., 2005).



Fonte: Adaptado (GALIZA-NETO; PITOMBEIRA, 2003)

Figura 3 – Principais haplótipos do “cluster” gênico da β -globina.

Os haplótipos têm sido úteis marcadores para estudos antropológicos e para a definição do fluxo do alelo β^S em populações humanas. Em cada uma das quatro regiões da África e uma da Ásia onde o alelo β^S é altamente prevalente, o alelo anormal está associado com um haplótipo diferente do agrupamento do gene β . Isso significaria que a mutação falciforme ocorreu pelo menos cinco vezes durante a evolução humana (MAGAÑA et al., 2002; INATI et al., 2003). Essa interpretação tem sido proposta, em contradição a uma explicação alternativa de que a mutação da Hb S ocorreu uma vez na África e provavelmente uma vez na Índia. Após sua extensão inicial na África, o alelo anormal fixou-se em diferentes haplótipos pela conversão gênica sofrida pela seleção local da malária. Isto explicaria a predominância de haplótipos distintos em diferentes regiões. Exceto para a Índia e Arábia, a presença do alelo falciforme fora da África é consequência da migração voluntária ou forçada (ZAGO et al., 1999).

Os haplótipos β^S representam potencialmente diferentes origens étnicas e geográficas; o haplótipo Benin (BEN), originado na costa oeste Africana, alcança o norte da África (Argélia e Tunísia), oeste da Arábia e sul da Europa (Portugal, Sicília e Grécia). O haplótipo Bantu foi originalmente identificado na República da África Central (por essa razão, é algumas vezes conhecido como haplótipo CAR) e após, em várias populações de

dialeto Bantu, em regiões geográficas separadas do sul da África. O haplótipo Senegal (SEN) originado no oeste da África Atlântica, o Camarão (CAM) ao longo da costa oeste da África e o haplótipo Árabe-indiano (ARB) ocorre no sub-continente Indiano e a leste da península Árabe, sendo também chamado haplótipo Indo-Árabe (ZAGO et al., 1999; GONÇALVES et al., 2003; MAGAÑA et al., 2002; INATI et al., 2003).

1.11 A ANEMIA FALCIFORME E OS HAPLÓTIPOS

Nigel 1984 levantou a possibilidade que três diferentes padrões clínicos podem estar associados com os três principais haplótipos. Assim, a AF poderia ser do tipo CAR, BEN e SEN. Essa possibilidade torna a expressão clínica da AF muito variável e seqüências polimórficas podem ocorrer dentro do cluster β , que podem modular a expressão da doença. Existem evidências que o nível de hemoglobina fetal determina, em parte, o nível de células densas em pacientes com AF, por isso, a modulação da síntese da hemoglobina fetal pode ter um efeito significativo no quadro clínico. Como cada haplótipo pode estar associado com diferentes seqüências controladoras da expressão da hemoglobina fetal (NIGEL, 1984).

As diferenças hematológicas, originalmente notadas entre populações africanas com variados haplótipos, sugeriram a possibilidade de serem, estes, marcadores para a heterogeneidade fenotípica da anemia falciforme. Os haplótipos associados com níveis mais altos de hemoglobina fetal seriam acompanhados de doença menos grave (COSTA et al., 2006). Os haplótipos do tipo SEN, CAM e ARB estão comumente associados a níveis mais altos de hemoglobina fetal (acima de 15%) e a um curso clínico mais brando. No haplótipo do tipo BEN, os níveis de hemoglobina fetal são intermediários (de 5 a 15%) e os benefícios quanto ao curso clínico são menos marcantes. O tipo CAR, por sua vez, apresenta níveis mais baixos de hemoglobina fetal (abaixo de 5%) e o curso clínico mais grave (FLEURY, 2007).

Tão importante quanto o diagnóstico, é poder prognosticar e tomar decisões terapêuticas específicas para uma determinada doença. A anemia falciforme é uma patologia grave cuja evolução clínica difere bastante entre seus portadores. A determinação dos diferentes haplótipos para o gene da cadeia da β -globina de portadores de anemia falciforme é a forma mais específica de poder prognosticar e tratar de modo particular cada paciente. E como não há nenhum dado científico sobre os diferentes haplótipos em nossa população, este

trabalho que ora se apresenta poderá dar subsídios mais sólidos para conduta terapêutica diferenciada entre portadores de anemia falciforme no Maranhão. A implantação de novas técnicas que vão além do diagnóstico pode aumentar a qualidade de vida e diminuir a morbimortalidade de uma doença tão grave quanto à anemia falciforme.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

■ Determinar os haplótipos dos pacientes portadores de anemia falciforme, atendidos nos serviços ambulatoriais do Hemocentro do Maranhão (HEMOMAR), em São Luís, Maranhão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

■ Contribuir para adequação de medidas profiláticas seletivas a partir da identificação prévia dos haplótipos nos falcêmicos no Estado do Maranhão.

■ Comparar a distribuição da frequência dos haplótipos encontrados no Maranhão com estudos realizados em outros Estados do Brasil;

■ Identificar as regiões de origem africana dos ancestrais desses pacientes.

CARACTERIZAÇÃO DE HAPLÓTIPOS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO DO MARANHÃO

ADEMILTON COSTA ALVES¹

SÔNIA MARIA PEREIRA CRUZ²

RAIMUNDO ANTÔNIO GOMES OLIVEIRA³

1 – Departamento de Farmácia; Universidade Federal do Maranhão. São Luís, Maranhão,
Brasil

2 – Departamento de Medicina II; Universidade Federal do Maranhão. São Luís, Maranhão,
Brasil

3 – Departamento de Farmácia; Universidade Federal do Maranhão; São Luís, Maranhão,
Brasil.

HAPLÓTIPOS HbSS NO MARANHÃO

**PALAVRAS-CHAVE: ANEMIA FALCIFORME, PCR-RFLP, HAPLÓTIPOS,
MARANHÃO**

Autor para correspondência: Raimundo Antônio Gomes Oliveira. Rua Almirante Tamandaré,
Nº 01, São Luís – MA. CEP: 65020-600; Fone: (98) 21091294.

Email: rago@usp.br

ABSTRACT

Sickle cell hemoglobin (HbS) is the result of a single nucleotide change (GAG→GTG) in the β -globin gene, where valine replaces glutamic acid at the sixth amino acid position of the β -globin chain. Sickle cell anemia is caused by homozygosity of the β S-gene and has a worldwide distribution. Six polymorphic sites in the β -globin gene cluster were analyzed on a sample of 56 chromosomes of sickle cell patients from the State of Maranhão, Brazil. PCR-RFLP showed that the CAR haplotype was predominant with a frequency of 64.28%, followed by the BEN haplotype (28.57%). Atypical haplotypes were identified with a frequency of 7.15%. Genotype was CAR/CAR in 46.43% patients, BEN/BEN in 10.71% and CAR/BEN in 35.71%. Based on records of the in Brazil, the results obtained in this study were similar to brazilian data showing a predominance of CAR chromosomes among the patients studied. The determination of β -globin gene haplotypes has great importance not only for monitoring sickle cell disease patients but may be useful as one predictor of disease and can help anthropological studies in clarifying the origin of Africans who have contributed in ethnological, economic, cultural and social development of Brazil.

INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias constituem uma das principais e mais freqüentes doenças genéticas que acometem os seres humanos (Di Nuzzo e Fonseca, 2004); e dentre elas, a anemia falciforme (AF) é provavelmente a doença hematológica hereditária mais prevalente na população brasileira (Bandeira *et al.*, 1999). A crise vaso-oclusiva é a mais comum e dramática manifestação da anemia falciforme (Costa *et al.*, 2006). O encurtamento da vida média dos eritrócitos falcizados, em forma de foice, leva ao quadro de anemia hemolítica (Bandeira *et al.*, 1999).

A hemoglobina presente na AF é a HbS, resultante de uma mutação que substitui uma adenina (A) por uma timina (T), no sexto códon do gene da β -globina (GAG→GTG), ocasionando a substituição do ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia da β -globina (Fleury, 2007). A forma homozigótica de HbS, HbS/HbS, contendo 80 a 99% de HbS, é a responsável por anemia hemolítica crônica. Este tipo de anemia é oriunda do continente africano, mas ocorre também entre os habitantes da Índia e da costa de países mediterrâneos (Lima *et al.*, 2001).

O gene da hemoglobina S é um gene de alta freqüência em toda América, e no Brasil é mais freqüente nas regiões sudeste e nordeste. A anemia falciforme chega a acometer 0,1 a 0,3% da população brasileira, devido ao alto grau de miscigenação em nosso país (Iñiguez *et al.*, 2003; Di Nuzzo e Fonseca, 2004). No Maranhão há 1 falcêmico para 1,4 mil nascidos vivos, o mesmo índice para Minas Gerais e Pernambuco, esse índice aumenta no Rio de Janeiro, sendo 1 para cada 1,2 mil e na Bahia onde há 1 falcêmico para cada 500 nascidos vivos (Brasil, 2007).

O diagnóstico da anemia falciforme baseia-se nos achados do hemograma, testes de solubilidade em tubo da HbS, falcização em lâmina, eletroforese alcalina e ácida, (Dacie e Lewis, 1984; Verrastro, 2001). Outras técnicas alternativas, como a focalização isoelétrica e

a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), também têm sido amplamente utilizadas (Zamaro *et al.*, 2002). Atualmente a análise direta de ácidos nucleicos oferece, em princípio, melhor abordagem para o diagnóstico de malignidade no ser humano e de doenças genéticas, uma vez que todas são causadas diretamente por mutações no genoma. Assim, a análise de ácidos nucleicos permite o diagnóstico baseado na detecção da causa e não em sintomas ou efeitos secundários (Lima *et al.*, 2001).

A variabilidade clínica da anemia falciforme é influenciada por fatores genéticos que modificam a expressão da doença. A utilização de técnicas de biologia molecular permite a identificação de marcadores moleculares distribuídos na região do grupo de genes β , possibilitando a subclassificação dos pacientes. O gene da hemoglobina S está diretamente ligado a cinco principais haplótipos do sítio polimórfico das endonucleases de restrição do grupo dos genes β . Os haplótipos são relatados em diferentes regiões do mundo e são relacionados com países ou áreas do continente africano ou próximo a ele, estando ligados a grupos populacionais específicos, recebendo as denominações de acordo com os locais de sua origem: Arábia Saudita e Índia (ARB); Benin (BEN); República Centro-Africana (CAR); Senegal (SEN) e Camarões (CAM) (Galiza-Neto *et al.*, 2005).

As diferenças hematológicas, originalmente notadas entre populações africanas com variados haplótipos, sugeriram a possibilidade de serem, esses, marcadores para a heterogeneidade fenotípica da anemia falciforme. Os haplótipos associados com níveis mais altos de hemoglobina fetal seriam acompanhados de doença menos grave (Costa *et al.*, 2006). Os haplótipos do tipo Senegal, Camarões e Árabe-Indiano estão comumente associados a níveis mais altos de hemoglobina fetal (acima de 15%) e a um curso clínico mais brando. No haplótipo do tipo Benin, os níveis de hemoglobina fetal são intermediários (de 5 a 15%) e os benefícios quanto ao curso clínico são menos marcantes. O tipo CAR, por sua vez, apresenta

níveis mais baixos de hemoglobina fetal (abaixo de 5%) e o curso clínico mais grave (Fleury, 2007).

As técnicas de biologia molecular permitiram a caracterização e identificação dos haplótipos de pacientes com anemia falciforme. O estudo do polimorfismo no grupo do gene da β -globina possibilita o mapeamento da população de origem africana e a classificação dos haplótipos associados a regiões geográficas específicas. A caracterização dos haplótipos pode servir de parâmetro para prognóstico dos pacientes com anemia falciforme descrevendo características da severidade do caso. Estes resultados são fundamentais para a caracterização dos grupos de pacientes, pois estes haplótipos estão associados à heterogeneidade clínica da doença. Além disso, esta estratificação poderá contribuir para pesquisa e adoção de opções terapêuticas mais específicas e racionais para os mesmos.

Considerando que não existem pesquisas relacionadas à análise de haplótipos de pacientes portadores da anemia falciforme em nosso Estado, este presente estudo apresentou como objetivo determinar os haplótipos de pacientes portadores de anemia falciforme acompanhados em um serviço público ambulatorial no município de São Luís, Maranhão.

MATERIAIS E MÉTODOS

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi composta por 28 pacientes, selecionados por conveniência, de ambos os sexos, com idade variando de 2 a 39 anos, diagnosticados com anemia falciforme, que faziam tratamento e acompanhamento ambulatorial no Hemocentro do Maranhão (HEMOMAR) em São Luís, Maranhão, no período de abril a junho de 2008.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA, conforme parecer N°

111/2008. Todos os pacientes e/ou seus responsáveis assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e somente depois de assinado esse termo foi realizada a coleta.

EXTRAÇÃO DE DNA E PCR-RFLP

Quatro mililitros de sangue venoso foram coletados em tubos Vacuteiner[®] contendo EDTA como anticoagulante. O *buffy-coat* foi usado para a extração de DNA genômico, de acordo com o protocolo estabelecido por Salazar *et al.* (1998).

Os haplótipos Árabe-Indiano (ARB), Benin (BEN), Camarões (CAM), República Central Africana (CAR) e Senegal (SEN) foram determinados pela análise dos sítios polimórficos do cluster gênico da β -globina: *Xmn* I 5'G γ ; *Hind* III G γ ; *Hind* III A γ ; *Hinc* II $\psi\beta$; *Hinc* II 3' $\psi\beta$; e *Hinf* 5' β . Sequências contendo cada um desses sítios foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase e subsequentemente digeridas com a enzima de restrição apropriada (PCR-RFLP). Os *primers*, as concentrações de cada reagente e a termociclagem para a PCR foram obtidos em Sutton *et al.* (1989). Os haplótipos com padrões de fragmentos que não se aplicavam a nenhum dos haplótipos acima citados foram considerados atípicos (ATP).

Os produtos de PCR e digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e visualizado diretamente sob luz UV (Figuras 1, 2 e 3).

RESULTADOS

Os haplótipos identificados nos 28 pacientes estudados estão apresentados na Tabela I. O haplótipo CAR foi o mais freqüente, com 64,28%, seguido do haplótipo BEN com 28,57%. Foram considerados haplótipos ATP 7,15%. Não foram observados os haplótipos SEN, CAM e ARB. Dos pacientes analisados, 46,43% e 10,71% foram

considerados homocigotos para o CAR e BEN, respectivamente, e 35,71% foram heterocigotos para esses haplótipos.

A distribuição da frequência dos haplótipos dos pacientes com AF observada no presente estudo é semelhante àquela encontrada em estudos realizados por outros pesquisadores no Brasil (Tabela II).

DISCUSSÃO

Estes resultados representam a primeira análise de haplótipos da AF em pacientes do Maranhão. A frequência dos haplótipos observada na amostra estudada apresentou 36 (64,28%) cromossomos CAR, 16 (28,57%) cromossomos BEN e 4 (7,15%) cromossomos ATP. Com base na literatura existente sobre os haplótipos do gene da β -globina, os resultados obtidos neste estudo apresentaram-se de forma semelhante aos dados brasileiros que mostram uma predominância dos cromossomos tipo CAR entre os pacientes estudados (Gonçalves *et al.*, 2003; Galiza-Neto *et al.*, 2005; Cardoso e Guerreiro, 2006; Fleury, 2007).

Nas Américas do Norte, Central e em alguns países América do Sul, o haplótipo mais freqüente é o BEN, ao contrário do Brasil, onde o CAR tem maior frequência. O haplótipo SEN registra uma distribuição irregular na América Latina, com maior prevalência em Cuba, México, Venezuela e Nordeste do Brasil (Salzano e Bortolini, 2002). Em relação ao haplótipo CAM, este pode ser encontrado em 50% dos países americanos. Na África, sua distribuição está restrita à região Centro-Oeste, mais especificamente ao grupo étnico Ethom de Camarão (Bortolini e Salzano, 1999).

As frequências encontradas dos haplótipos CAR e BEN (64,28% e 28,57%, respectivamente) no nosso estudo estão em concordância com vários trabalhos recentemente publicados em Estados como o Ceará, Rio de Janeiro, Pará e Rio Grande do Sul. A média obtida entre esses Estados foi de 63,05% e 28,95% para os cromossomos CAR e BEN,

respectivamente (Cardoso e Guerreiro, 2006; Silva, 2006; Fleury, 2007; Silva *et al.*, 2009). Já na Bahia, de acordo com os estudos de Adorno *et al.* (2008), o haplótipo BEN apresenta uma maior frequência quando comparado ao CAR, pois esse Estado recebeu uma elevada influência de escravos oriundos da Nigéria e Ghana, regiões onde prevalecem o haplótipo BEN.

A predominância do haplótipo CAR, seguido do BEN, encontrados no presente estudo, justifica-se pelos registros históricos que relatam que os primeiros escravos que chegaram ao Brasil entraram pelos portos de São Luís e principalmente do Recife (Curtin, 1969). No Maranhão, foi registrada uma intensa influência do tráfico de escravos, principalmente de países africanos tais como Guiné-Bissau, Togo, Benin, Nigéria e Angola, no período de 1655 a 1822 (Meireles, 1994).

O haplótipo SEN é relatado como o terceiro mais presente no Brasil (Pante-de-Souza *et al.*, 1998; Cançado, 2007). Estudos como o de Gonçalves *et al.* (2003), que avaliaram 80 pacientes com anemia falciforme, identificaram somente um indivíduo (0,63%) SEN. Esse haplótipo está irregularmente distribuído no Brasil, consequência do pequeno tráfico de escravos provenientes de Senegal, Gâmbia, Serra Leoa e Guiné. Fato esse que não descarta a possível influência de um fluxo gênico de escravos provenientes da África Ocidental.

Embora o presente estudo não tenha apresentado nenhum registro dos haplótipos SEN, CAM e ARB, alguns trabalhos já relataram a presença desses haplótipos na população brasileira, porém, em uma baixa frequência (Cardoso e Guerreiro, 2006; Adorno *et al.*, 2008).

Inúmeros estudos descrevem as diferenças existentes entre as condições clínicas e/ou laboratoriais dos pacientes entre um e outro haplótipo, e até mesmo dentro de um mesmo haplótipo. O haplótipo CAR é o de pior prognóstico clínico, apresentando maior severidade em manifestações clínicas e frequência de internamentos, devido o maior número de crises

álgicas, de infecções, de transfusões sanguíneas, crises de seqüestração esplênica e até mesmo aumento da mortalidade, principalmente em crianças (Costa *et al.*, 2006).

De acordo com Cançado, 2007, a presença do haplótipo CAR em pelo menos um dos alelos, aumenta o risco relativo de AVC para 2,01 e de complicação renal para 5,0, comparado com indivíduos CAR negativos. Isto pode ser explicado, em parte, pela maior síntese de hemoglobina fetal (HbF), nos haplótipos SEN, CAM e ARB. Entretanto, mesmo entre pacientes com o mesmo haplótipo, existe substancial heterogeneidade quanto a produção de HbF e à expressão clínica. Assim, nem mesmo o haplótipo nem a concentração da HbF são suficientes para explicar a variabilidade clínica observada nos indivíduos com anemia falciforme.

A presença de 7,15% de haplótipos atípicos registrados nesta pesquisa provavelmente reflete os diversos mecanismos genéticos que podem gerar associações com o gene falciforme, ou seja, esses haplótipos são os que diferem da maioria dos cinco haplótipos comuns observados em todo o mundo. Esses dados corroboram a hipótese de que todas estas estruturas diferentes são geradas por recombinações ou substituições pontuais ou transferências não-recíprocas (conversão) em haplótipos comuns pré-existentes em vez de mutações *de novo* no gene da β -globina (Zago *et al.*, 2000).

A determinação dos haplótipos do “cluster” da β -globina é de grande importância não só para o acompanhamento e prognóstico dos pacientes de anemia falciforme, bem como serve de subsídio para estudos antropológicos que podem auxiliar na elucidação sobre a origem dos africanos que tanto contribuíram na formação etnológica, econômica, cultural e social do Brasil (Fleury, 2007). As frequências haplotípicas do “cluster” gênico da β -globina, presente na população maranhense, devem ser confirmadas pelo aumento do número de indivíduos a serem analisados e posteriores estudos de outros possíveis marcadores genéticos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todas as pessoas que contribuíram diretamente para o sucesso deste trabalho, principalmente aos pacientes portadores de anemia falciforme no Estado do Maranhão e seus responsáveis, que se dispuseram a participar dessa pesquisa. Que este trabalho possa ser mais uma forma de divulgar a luta desses pacientes por melhores dias. Este trabalho contou com o apoio financeiro da Financiadora de Estudos e Projetos do Ministério da Ciência e Tecnologia – FINEP.

REFERÊNCIAS

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

Bandeira FMGC, Leal MC, Sousa RR, Furtado VC, Gomes YN, Marques NM (1999) Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina S detectados através de triagem em sangue de cordão umbilical. *J Pediat* 75(3): 167-171.

Bortolini MC e Salzano FM (1999) BetaS haplotype diversity in Afro-americans, Africans and Euro-Asiatics – An attempt at a synthesis. *Ciência e Cultura*, 51:175-80.

Cançado RD (2007) Doenças Falciformes. *Prat Hosp* 50:61-64.

Cardoso GC e Guerreiro JF (2006) African gene flow to North Brazil as revealed by HBB*S gene haplotype analysis. *Am J Hum Biol* 18:93–98

Costa PJMS, Vilela RQB, Cipolotti R e Figueiredo MS (2006) Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo Bantu da anemia falciforme. *R Hematol Hemoter*, 28(1):40-44.

Costa PJMS, Vilela RQB e Figueiredo, MS (2006) Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo Bantu da anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter* 28:40-44.

Curtin, PD (1969) *The Atlantic Slave Trade: A Census*. University of Wisconsin Press, Madison, 383pp.

Dacie J e Lewis SM (1984) *Practical Hematology*. Churchill Livingstone, 6th ed.

Di Nuzzo DVP e Fonseca SF (2004) Anemia falciforme e infecções. *J Pediatr*, 80(5):347-354.

Fleury MK (2007) Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: aspectos clínicos laboratoriais. *Rev bras Anal Clin* 32:89-93.

Galiza-Neto G, Pitombeira MS, Vieira HF, Vieira MLC e Farias DAB (2005). Analysis of β S globin gene haplotypes in Ceará, Brazil. *J Bras Patol Med Lab* 41:315-321.

Gonçalves MS, Bomfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A, Bomfim G, Adorno EV, Albuquerque AL, Pontes A et al. (2003) β S -Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, northeastern Brazil. *Braz J Med Biol Res* 36:1283-88.

Iñíguez ED, López MAC, Cela de Julián ME, García PG (2003) Detección precoz neonatal de anemia falciforme y otras hemoglobinopatías en la comunidad autónoma de Madrid. Estudio Piloto. *An Pediatr* 58:146-55.

Lima AO *et al.* (2001) *Métodos de laboratório aplicados a clinica: técnica e interpretação*. 8th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

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

Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO e Hirata RDC (1998) Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem* 44: 1748-1750.

Salzano MF e Bortolini MC (2002) *The Evolution and Genetics of Latin American population*. Cambridge, 528pp.

Silva WS, Lastra A, Oliveira SF, Klautau-Guimarães N, Grisolia CK (2006). Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 22(12): 2561-2566.

Silva, MAL (2006). Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, 105p

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

Verrastro T (2001) Hematologia e Hematoterapia. Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e Clínica. ATHENEU. São Paulo, 303pp

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

Zamaro PJA, Canalli AA, Silva-Junior WA e Domingos CRB (2002) Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à HbS. J Bras Patol Med Lab 38:261-266.

FONTES DE INTERNET

Brasil, Programa de Anemia Falciforme, www.saude.gov.br (Dezembro 1, 2007)

Tabela I: Distribuição da frequência de haplótipos e cromossomos de pacientes com anemia falciforme em São Luís, Maranhão, em 2008.

Tabela II: Distribuição da frequência (%) dos haplótipos encontrados no Maranhão em comparação com estudos realizados em outros estados do Brasil.

Tabela I

<i>Haplótipos</i>	<i>Nº de indivíduos (%)</i>	<i>Nº de cromossomos</i>		
		CAR	BEN	ATÍPICO
CAR/CAR	13 (46,43%)	26	-	-
CAR/BEN	10 (35,71%)	10	10	-
BEN/BEN	03 (10,71%)	-	06	-
ATÍPICO	02 (7,15%)	-	-	04
TOTAL	28 (100%)	36 (64,28%)	16 (28,57%)	04 (7,15%)

Tabela II

POPULAÇÃO	Nº DE CROMOSSOMOS	% de Haplótipos					
		CAR	BEN	SEN	CAM	ARB	ATP
Maranhão ¹	56	64.28	28.57	0	0	0	7.15
Bahia ²	250	41.60	55.20	0.40	1.20	0.40	1.20
Ceará ³	68	66.20	22.00	0	0	0	11.80
Pará ⁴	260	66.00	21.80	10.90	1.30	0	0
São Paulo ⁵	142	64.80	35.20	0	0	0	0
Rio de Janeiro ⁶	148	54.00	45.00	1.00	0	0	0
Rio Grande do Sul ⁷	150	66.00	27.00	0	0	0	7.00

¹Presente estudo; ²Adorno *et al.*, 2008; ³Silva *et al.*, 2009; ⁴Cardoso e Guerreiro, 2006;

⁵Gonçalves *et al.*, 1994; ⁶Fleury, 2007; ⁷Silva, 2006.

Figura 1: Gel de agarose a 2% apresentando a amplificação dos 6 sítios polimórficos analisados no gene da β -globina.

Figura 2: Gel de agarose 2% a apresentando a digestão de 5 dos 6 sítios polimórficos analisados no gene da β -globina.

Figura 2: Gel de agarose a 2% apresentando a digestão apenas do sítio $G\gamma$, confirmando um haplótipo CAR/CAR.

Figura 1

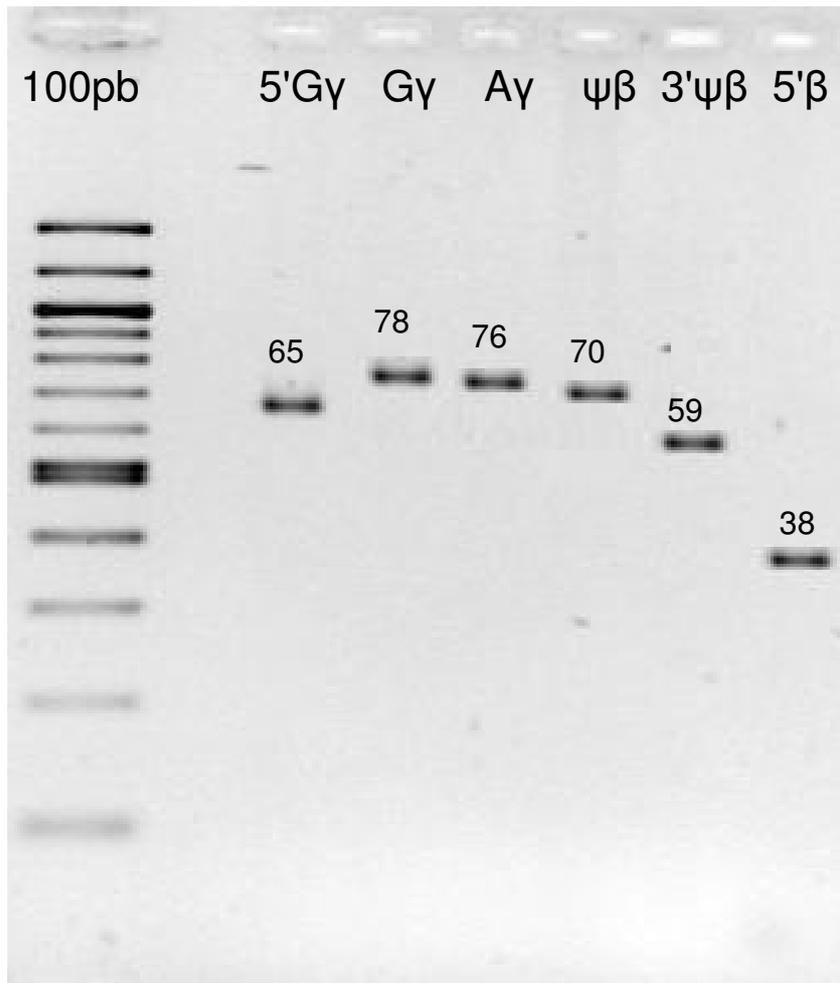


Figura 2

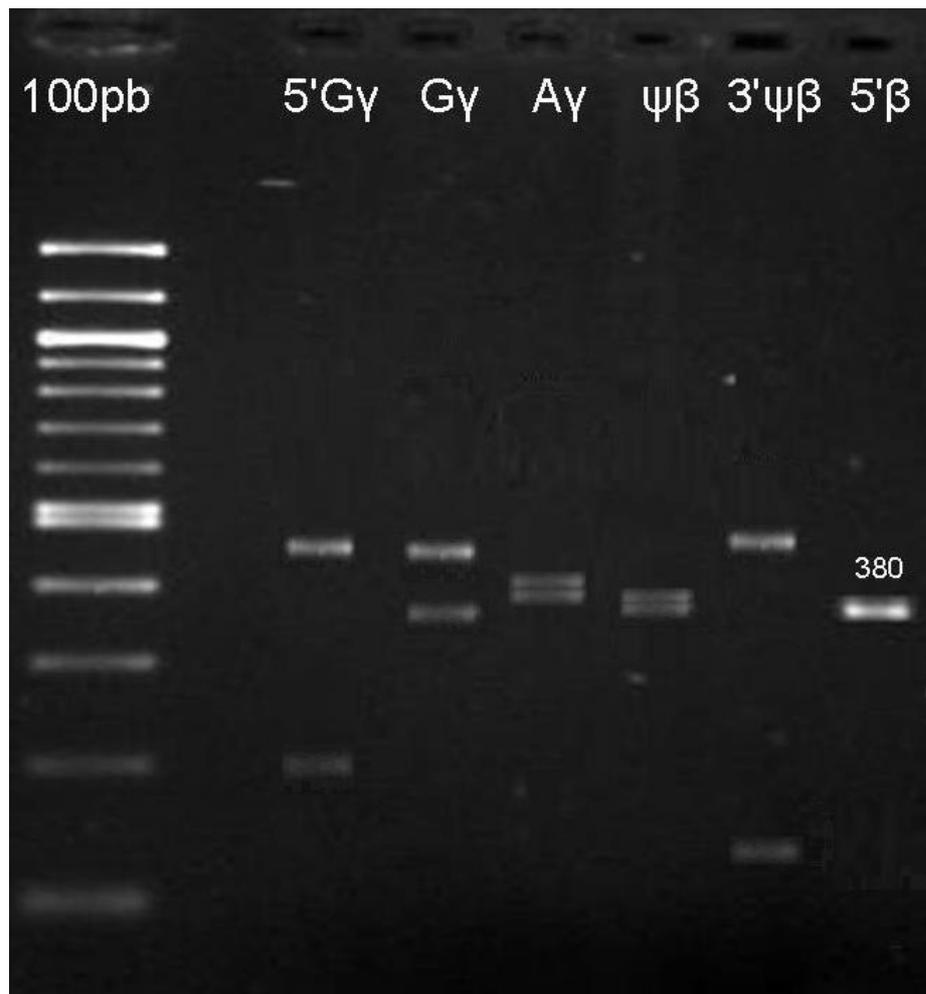
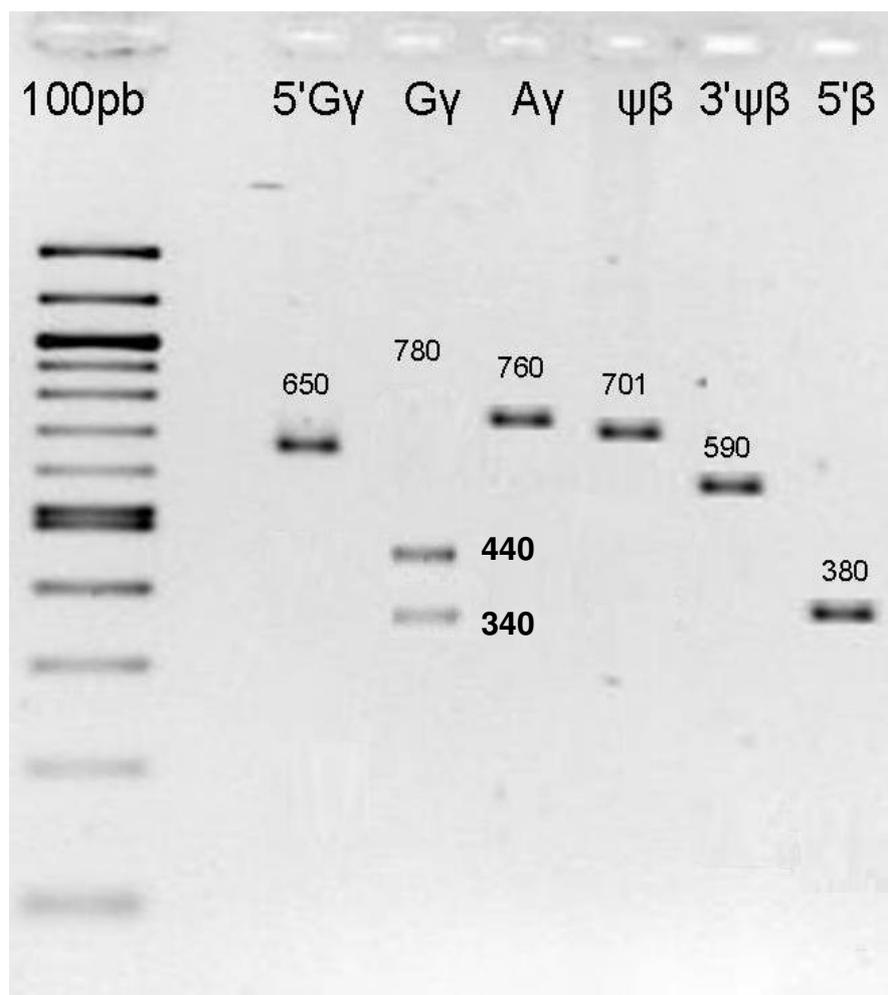


Figura 3



4 CONCLUSÃO

O presente estudo foi o pioneiro em nosso Estado a utilizar a Biologia Molecular para analisar os haplótipos do gene da β -globina em pacientes com anemia falciforme, em um serviço público ambulatorial de São Luis.

De acordo com o mesmo, pode-se concluir que o hapótipo CAR foi o mais freqüente, apresentando 64,28%, seguido do haplótipo BEN com 28,57%. Haplótipos ATP obtiveram uma freqüência de 7,15%. Não foram observados os haplótipos SEN, CAM e ARB na amostra em estudo. Dos pacientes analisados, 46,43% e 10,71% foram considerados homozigotos para o CAR e BEN, respectivamente, e 35,71% foram heterozigotos para esses haplótipos.

A estratificação genética dos falcêmicos baseado nos haplótipos possibilita a avaliação do grau de severidade das possíveis manifestações clínicas da doença e permite a separação dos pacientes em grupos para tratamento diferenciado.

Estes dados estão de acordo com os encontrados em outras regiões do Brasil, porém, para uma melhor caracterização da população maranhense, deve-se aumentar a casuística para que se tenha uma maior representatividade.

A presença dos haplótipos CAR e BEN, em nosso estudo, justifica-se pelos registros históricos que relatam que houve um intenso tráfico de escravos dos países africanos, principalmente das regiões próximas a República Central Africana e do Benin.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As hemoglobinopatias são alterações genéticas com ampla distribuição mundial e constituem um grande problema de saúde pública. Dentre elas, podemos citar a anemia falciforme, que é a doença hereditária de maior prevalência no Brasil.

O objetivo desta pesquisa foi analisar a frequência dos haplótipos do gene da β -globina em pacientes com anemia falciforme. A investigação desses haplótipos serve como “marcadores moleculares”, que de maneira complementar, podem ser utilizados no prognóstico de pacientes falcêmicos. E ainda podem fornecer subsídios para o entendimento de como foi a contribuição genética dos negros na formação de nossa população.

Os haplótipos CAR e BEN encontrados em nosso estudo são relatados como os de pior prognóstico, já que os mesmos estão associados a complicações clínicas mais severas, necessitando assim de um acompanhamento mais rigoroso e de medidas profiláticas seletivas.

Os dados encontrados confirmam os registros históricos que explicam que os principais escravos que aportaram no Maranhão durante o Brasil Colônia eram provenientes das regiões da República Centro-Africana e proximidades, e do Benin e países limítrofes.

Encontra-se aqui o primeiro trabalho em nosso Estado a utilizar a Biologia Molecular para analisar os haplótipos do gene da β -globina em pacientes com anemia falciforme.

REFERÊNCIAS

AIDOO, M.; TERLOUW, D. J.; SKOLCZAK, M. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. **Lancet**, vol 359, p.1311-1312, 2002.

ÂNGULO, I. L. Crises falciformes. *In*: Simpósio Urgências e Emergências Hematológicas, Ribeirão Preto, vol. 36, p. 427-430, 2003.

ASHLEY-KOCH, A.; YANG, Q.; OLNEY, R. S. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease. **Am. J. Gen.**, v.1, n. 151, p. 839-845, 2000.

BACKES, C. E.; MALLMANN, T. D.; BAZZO, M. L.; SANTOS-SILVA, M. C. Triagem neonatal como um problema de saúde pública. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** vol. 27, n. 1, p. 43-47, 2005.

BALLAS, S. K. Sickle cell anaemia: progress in pathogenesis and treatment. **Drugs**, vol. 62, n. 8, p. 143-172, 2002.

BANDEIRA, F. M. G. C. et al. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina S detectados através de triagem em sangue de cordão umbilical. **J Pediat** vol. 75, n. 3, p.167-171, 1999.

BEIGUELMAN, B. **Genética de populações humanas**. Disponível em: <http://lineu.icb.usp.br/bbeiguel/genetica_populacoes/>. Acesso em: 10 maio 2009.

BERTHOLO, L. C.; MOREIRA, H. W. PCR multiplex na caracterização de talassemias do tipo alfa. *In*: 40º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, 2006, Curitiba, PR.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Assistência e Promoção à Saúde. Coordenação de Sangue e Hemoderivados. **Programa de Anemia Falciforme**. Brasília, DF, 2007. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 10 dez. 2007.

BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, n. 11, p. 762-769, 1997.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G.: Sickle cell disease-molecular and cellular pathogenesis; *In* BUNN, H.F.; FORGET, B.G. (eds.). **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia, PA, USA, 1986, p. 453-501.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A. Doença falciforme no Brasil. **R. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 203-206, 2007.

CHIES, J. A. B.; NARDI, N. B. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. **Med. Hyp.**, vol. 57, n. 1, p. 46-50, 2001.

COSTA, P. J. M. S. et al. Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo Bantu da anemia falciforme. **R. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 1, p. 40-44, 2006.

FATHALLAH, H.; ATWEH, G. F. Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. **ASH Education Book**, 2006.

FLEURY, M. K. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos Clínicos e Laboratoriais. **Rev. bras. Anal. Clin.**, v. 32,n.2, p. 89-93, 2007.

GALIZA-NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J. Bras. Patol. Med. Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

GALIZA NETO, G., et al. Analysis of β^S globin gene haplotypes in Ceará, Brazil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, vol. 41, n. 5, p. 315-321, 2005.

GONÇALVES, M. S. et al. β^S -Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, northeastern Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, vol. 36, p. 1283-1288, 2003

INATI, A. et al. β^S -Globin gene cluster haplotypes and Hb F levels are not the only modulators of

sickle cell disease in Lebanon. **Eur. J. Haematol.**, vol. 70, p. 79-83, 2003.

JENKINS, T.L. Sickle cell anemia in the pediatric intensive care unit: novel approaches for managing life-threatening complications. **AACN Clin Issues**, vol. 13, n. 2, p. 154-168, 2002.

KLINGS, E. S. et al. Abnormal pulmonary function in adults with sickle cell anemia. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 173, p. 1264-1269, 2006.

LIMA, O. A. et al. **Métodos de laboratório aplicados a clínica: técnicas e interpretação**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

LOBO, C. et al. Crises dolorosas na doença falciforme. **R. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 247-258, 2007.

LYRA, I.M. et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Cad. Saúde Pub.**, vol. 21, n. 4, p. 1287-1290, 2005.

MACHADO, R. F. P. Hipertensão arterial pulmonar associada à anemia falciforme. **J. Bras. Pneumol.**, v. 33, n. 5, p. 583-591, 2007.

MAGAÑA, M. T. et al. Analysis of β^S and β^A genes in a Mexican population with african roots. **Blood Cells Mol. Dis.**, vol. 28, n. 2, p. 121-26, 2002.

NAOUM, P.C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**, São Paulo: Ed. Sarvier, 1997.

NIGEL, R. L. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. **Einstein Q. J. Biol. Med.**, vol. 2, p. 53-62, 1984.

OLIVEIRA, R. A. G; POLI-NETO, A. **Anemias e leucemias**. São Paulo: Roca, 2004.

OSÓRIO-BORGES, M.R.; ROBINSON, W. **Genética Humana**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, págs. 209-215, 1993.

RAGHUPATHY, R. et al. Th1 and Th2 cytokine profiles in sickle cell disease. **Acta Haematol.**, vol. 103, p. 197-202, 2000.

RAPAPPORT, S.I. **Introdução à Hematologia**. São Paulo: Roca, 1990.

ROSSE, W. F. et al. New views of sickle cell disease pathophysiology and treatment. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 2-17. 2000.

RUIZ, M. A. Anemia falciforme. Objetivos e resultados no tratamento de uma doença de saúde pública no Brasil. **R. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p.203-206, 2007.

SALZANO M. F.; BORTOLINI, M. C. **The Evolution and Genetics of Latin American population**. Cambridge, p. 215-227, 2002.

SERJEANT, G.R. The emerging understanding of sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, vol. 112, n. 1, p. 3, 2001.

SILVA, W. S. et al. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 22, n. 12, p. 2561-2566, 2006.

STEINBERG, M. H.; RODGERS, G.P. Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. **Seminars in Hematology**, vol. 38, n. 4, p. 299-306, 2001.

SILVA, M.A.L. Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, 2006. 105p

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br. J Haematol**, vol. 129, p. 465-81, 2005.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle cell disease. **Lancet**, vol. 364, p. 1343-1360, 2004

THOMPSON, M. W. et al. Thompson & Thompson Genética. Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 301 p... .

VERRASTRO, T. et al. **Hematologia e Hematoterapia. Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e Clínica.** ATHENEU, São Paulo.

VICHINSKI, J. G. T. et al. Variants in the VCAM1 gene and risk for symptomatic stroke in sickle cell disease. **Blood.**, v. 100, p. 4303-4309, 2002.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. HIGGS, D. R.; WOOD, W.G. **The hemoglobinopathies.** In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L. L. SLY, W.S.; VALLE, D., EDS. **The metabolic basis of inherited disease.** N.York: MacGraw-Hill, v2, pp. 2281-2339, 1989

WINTROBE, S. Clinical Hematology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999.

ZAGO, M. A.; SILVA, W. A. JR; FRANCO, R. F. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the Brazilian population. *Ciênc. cult. (São Paulo)*, vol. 51, n. 3-4, p. 226- 234, 1999.

ZAGO, M. A. et al. Rearrangements of the β -globin gene cluster in apparently typical β^S haplotypes. **Haematologica**, vol. 86, n. 2, p. 142-145, 2001.

ZAMARRO, I. A. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes a HbS. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 38, n.4, p. 261-266, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aos pacientes

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Apêndice A

**PROJETO: AVALIAÇÃO DE MARCADORES LABORATORIAIS NO PROGNÓSTICO DE
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidado(a) para participar do presente estudo, que pretende identificar, através de exames laboratoriais, de que forma o hemograma ou a contagem de reticulócitos podem ajudar o médico a identificar o seu estado de saúde na anemia falciforme.

Para a realização dos exames laboratoriais, serão necessárias amostras de 5 ml de seu sangue. Essas amostras serão coletadas por técnicos treinados e especializados, do HEMOMAR e do Hospital Universitário Presidente Dutra, proporcionando segurança e o mínimo de desconforto possível.

Com as suas amostras de sangue, iremos realizar os seguintes exames laboratoriais: Hemograma, contagem de reticulócitos e eletroforese de hemoglobina. Através desse conjunto de exames poderemos identificar, de forma bastante criteriosa, de que forma esses exames podem determinar o seu estado de saúde e comparar com os dados clínicos dos seu prontuário médico.

Após a realização dos exames, as suas amostras de sangue serão desprezadas de forma adequada.

Com a sua participação nesse projeto, poderemos ter conhecimento da relação desses exames com o seu estado de saúde, e assim, o seu médico indicará o tratamento mais adequado, melhorando desta forma a sua qualidade de vida.

Você poderá entrar em contato com a nossa equipe a qualquer momento para tirar dúvidas. Os seus dados pessoais como nome endereço ou telefone não serão de forma alguma publicados nesta pesquisa, sua identidade será preservada.

Após as informações acima fornecidas, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Você terá a garantia de sigilo, direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo da continuidade na forma de tratamento, assistência, cuidado, ou acompanhamento.

Paciente: _____ Data do aceite: ___/___/___

Nomes dos Pesquisadores:

Pesquisador Responsável: Raimundo Antonio Gomes Oliveira

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (98) 8111-2027

Pesquisadores participantes:

Verônica Avena Lisboa da Silva - Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar):

: (98)3221-2098 (98)88511902

Sônia Maria Pereira Cruz - Telefone para contato: (98) 3232-3812.

Comitê de Ética em pesquisa-Hospital Universitário- UFMA

Rua Barão de Itapary, 227, 4º Andar, Centro Telefone: 2109-1250

Coordenador: Prof. Wildoberto Batista Gurgel

APÊNDICE II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aos pais ou responsáveis

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Apêndice B

**PROJETO: AVALIAÇÃO DE MARCADORES LABORATORIAIS NO PROGNÓSTICO DE
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Aos Pais ou Responsáveis)**

Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidado(a) a autorizar a participação do(s) seu(s) filho(s) ou menor sob sua responsabilidade no presente estudo, que pretende identificar, através de exames laboratoriais, de que forma o hemograma a contagem de reticulócitos automatizada podem ajudar o médico a identificar o estado de saúde do seu filho na anemia falciforme.

Para a realização dos exames laboratoriais, serão necessárias amostras de 5ml de sangue do(s) seu(s) filho(s). Essas amostras serão coletadas por técnicos treinados e especializados, do HEMOMAR e do Hospital Universitário Presidente Dutra, proporcionando segurança e o mínimo de desconforto possível.

Com a amostra de 5ml de sangue dos seu(s) filho(s), iremos realizar os seguintes exames laboratoriais: Hemograma, contagem de reticulócitos e eletroforese de hemoglobina. Através desse conjunto de exames poderemos identificar, de forma bastante criteriosa, de que forma esses exames podem determinar o estado de saúde do seu(s) filho(s) e comparar com os dados clínicos dos prontuários médicos.

Após a realização dos exames, as amostras de sangue e DNA serão desprezadas de forma adequada.

Com a participação do(s) seu(s) filho(s) ou menor sob sua responsabilidade nesta pesquisa, poderemos ter conhecimento da relação desses exames com o estado de saúde dele(s), e assim, o seu médico indicará o tratamento mais adequado, melhorando desta forma a qualidade de vida dele(s)

Você poderá entrar em contato com a nossa equipe a qualquer momento para tirar dúvidas. Os dados pessoais como nome endereço ou telefone não serão de foram alguma publicados nesta pesquisa, a identidade do(s) seu(s) filho(s) será preservada

Após as informações acima fornecidas, no caso de aceitar a participação do(s) seu(s) filho(s) ou menor sob sua responsabilidade, no estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Você terá a garantia de sigilo, direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo da continuidade na forma de tratamento, assistência, cuidado, ou acompanhamento, proporcionados a seu(s) filho(s) ou menor sob sua responsabilidade.

Responsável: _____ Data do aceite: ___/___/___

Nomes dos Pesquisadores:

Pesquisador Responsável: Raimundo Antonio Gomes Oliveira

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (98) 8111-2027

Pesquisadores participantes:

Verônica Avena Lisboa da Silva - Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar):

Sônia Maria Pereira Cruz - Telefone para contato: (98) 3232-3812.

Comitê de Ética em pesquisa-Hospital Universitário- UFMA

Rua Barão de Itapary, 227, 4º Andar, Centro Telefone: 2109-1250

Coordenador: Prof. Wildoberto Batista Gurgel.

ANEXOS

ANEXO I – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Unidade Presidente Dutra – HUUFMA

	Universidade Federal do Maranhão Hospital Universitário Diretoria Adjunta de Ensino, Pesquisa e Extensão Comitê de Ética em Pesquisa
<p style="text-align: center;">PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL</p> <p style="text-align: center;">PROJETO – DISSERTAÇÃO DE MESTRADO</p>	<p>Nº. do Parecer: 111/2008</p> <p>Nº do Protocolo: 33104-0628/2008</p> <p>Data de Entrada no CEP: 13/03/2008</p> <p>Data da Assembléia: 18/04/2008</p> <p>Parecer: APROVADO</p>

I - Identificação:

Título do projeto:		
Avaliação de marcadores laboratoriais no prognóstico de pacientes com anemia falciforme.		
Identificação do Pesquisador Responsável:		
Raimundo Antônio Gomes Oliveira		
Identificação da Equipe executora:		
Verônica Avena Lisboa da Silva e Raimundo Antônio Gomes Oliveira		
Instituição onde será realizado:		
HEMOMAR, Hospital Universitário da UFMA, CEPEC-HU, DEFAR		
Área temática:	Multicêntrico:	Cooperação estrangeira:
III	NÃO	NÃO

II – Objetivos:

Estudar a variabilidade clínica através de marcadores laboratoriais em pacientes com anemia falciforme e avaliar a sua utilização como fatores de diagnóstico desta patologia.

III- Sumário do projeto:

Trata-se de um estudo observacional, transversal, com amostragem por conveniência, de 30 pacientes com diagnóstico clínico de anemia falciforme, confirmados pela eletroforese de hemoglobina, oriundos do hemocentro do Maranhão e do Hospital Universitário –HU. Serão coletados 5 ml de sangue para determinação de marcadores laboratoriais.

Como critério de não inclusão os pacientes que não receberam transfusão sanguínea nos últimos 120 dias antes da coleta para os exames da pesquisa.

O delineamento do projeto está claro, incluindo locais de pesquisa, coleta, análise laboratorial e estatística.

IV- Comentários frente à resolução 196/96 CNS e complementares:

Folha de rosto preenchida adequadamente. Do projeto constam os elementos indispensáveis a sua realização, tais como: introdução, objetivos, material e métodos, aspectos éticos, cronograma, orçamento, referências, questionários de dados de pessoais.

Os pesquisadores obedecem a Res. 196/96 e suas complementares.

Falta entretanto no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) incluir a explicitação sobre isenção de riscos e pequeno desconforto no procedimento da coleta.

V - Parecer Consubstanciado do CEP:

Diante do exposto, o protocolo 33104-0629/08, referente o título Avaliação de marcadores laboratoriais no prognóstico de pacientes com anemia falciforme, pleiteado por Raimundo Antônio Gomes Oliveira é considerado: **APROVADO.**

Relatórios parciais (um por ano) devem ser apresentados ao CEP-HUUFMA, sendo o primeiro para 19/05/2009, ou se houver algum evento adverso, emenda ou alteração no protocolo. O relatório final deve ser entregue, acompanhado de cópia do trabalho final gravado em CD ROM.

Obs: Este parecer se refere só à forma como o projeto dessa pesquisa desenhado e foi protocolado junto ao CEP, não dando nenhum respaldo à pesquisa para fins de publicação ou apresentação em congresso, bancas ou outros eventos científicos. Para isto, o pesquisador deve solicitar o Parecer Consubstanciado Aprovando Relatório de Pesquisa ou o Parecer Consubstanciado Aprovando a finalização da Pesquisa.

São Luís, MA, 19 de maio de 2008.


Wladoberto Batista Gurgel
Filósofo
Coordenador do CEP-HUUFMA
Ethica homini habitat est

**INSTRUCTIONS TO AUTHORS**

ISSN 1415-4757 printed version
ISSN 1678-4685 online version

- [Scope and policy](#)
- [Submission of papers](#)

1. Manuscripts should be submitted to:

Angela M. Vianna-Morgante, Editor-in-Chief. Genetics and Molecular Biology

By Postal Address: Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736. CEP: 14025-670 Ribeirão Preto, SP – Brazil

Or by Electronic Address: editor@gmb.org.br

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

a) The manuscript that must be submitted by the Corresponding Author, this being the person who will also check the page proofs, and arranges for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) An accompanying cover letter stating that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. It must also inform the e-mail addresses of all other authors so that they can be contacted by the Editorial Office for confirmation of the submission. Possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must be disclosed.

c) An electronic copy of the text, tables and figures, including supplementary material to be published online only. Formats for text are Word or RTF in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h). Mailed CD-ROMs must be labeled with the first author's last name, platform and software.

d) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; formatted to A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person who submits the manuscript, checks the page proofs, and arranges for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text. URLs for citations of publications in electronic journals should appear in the reference section

The text includes the following elements:

Introduction –Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by *et al.* Use standard abbreviations for journal titles as suggested by ISI Web of Knowledge or PubMed.

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample Electronic Article citation:

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD and Van Dyke T (2004) pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. Plos Biol 2:194-205. <http://www.plosbiology.org> .

f) Internet Resources Section

this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet Resource citation :

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)

LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm (September 4, 2005)

g) Tables: must be inserted at the end of the main text file, each table starting on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

h) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a new page that immediately follows the tables. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustration can be accepted, but authors may be asked to defray the cost.

i) Nomenclature should adhere to current international standards.

j) Sequences may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

k) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

m) Supplementary Material: Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. This material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. For online access, supplementary material should be in PDF, JPEG or GIFF formats.

In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement: *Supplementary material - the following online material is available for this article: - Table S1 – < short title >*

- Figure S1 – < short title >

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)