



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB

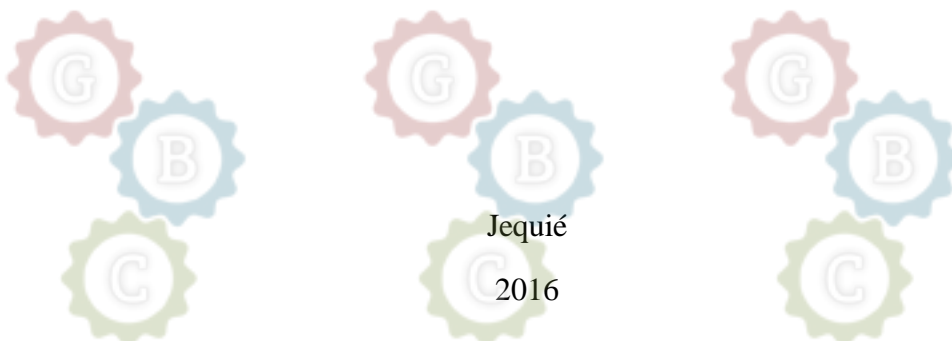
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,

BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DE INDIVÍDUOS COM TRAÇO FALCIFORME:  
ASPECTOS GENÉTICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

LUDMILA XAVIER SOUZA



Jequié

2016

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

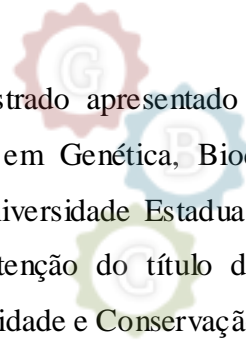
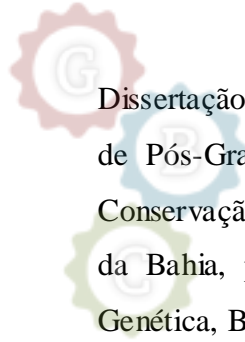


**LUDMILA XAVIER SOUZA**



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**CARACTERIZAÇÃO DE INDIVÍDUOS COM TRAÇO FALCIFORME: ASPECTOS GENÉTICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS**



Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Orientador: Prof. Dr. Juvenal Cordeiro Silva Junior

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Angélica Leal Barbosa



Jequié

2016

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

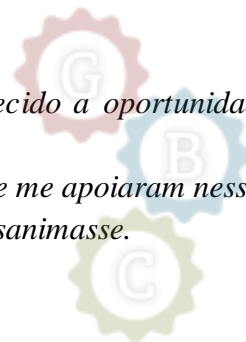
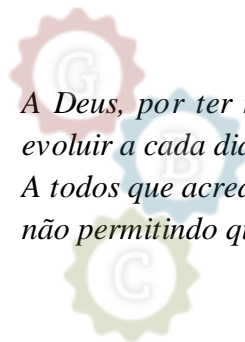


Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

### **Dedicatória**



*A Deus, por ter me oferecido a oportunidade de viver e evoluir a cada dia.*

*A todos que acreditaram e me apoiaram nessa caminhada, não permitindo que eu desanimasse.*

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



## AGRADECIMENTOS

Essa dissertação é o término de uma caminhada longa e de muita luta que me fez crescer através de grande aprendizado. Quero agradecer a todos aqueles que de uma forma ou de outra me auxiliaram a chegar aqui, aliviando as dores desta caminhada.

Agradeço a Deus pela minha existência e por iluminar todos os meus passos. Por ter permitido a realização de mais um sonho e nunca ter me abandonado, mesmo nos momentos mais difíceis, que não foram poucos.

Aos meus queridos pais, Nelson e Ana, meus exemplos de vida, sempre presentes, me dando forças e apoiando minhas escolhas. Obrigado pela preciosa educação, convívio, formação, confiança, apoio diário e por todo amor e ajuda que me dão.

Aos meus irmãos, Aline, Junior e Rafael, pela amizade, carinho, companheirismo e cumplicidade em cada momento de nossas vidas.

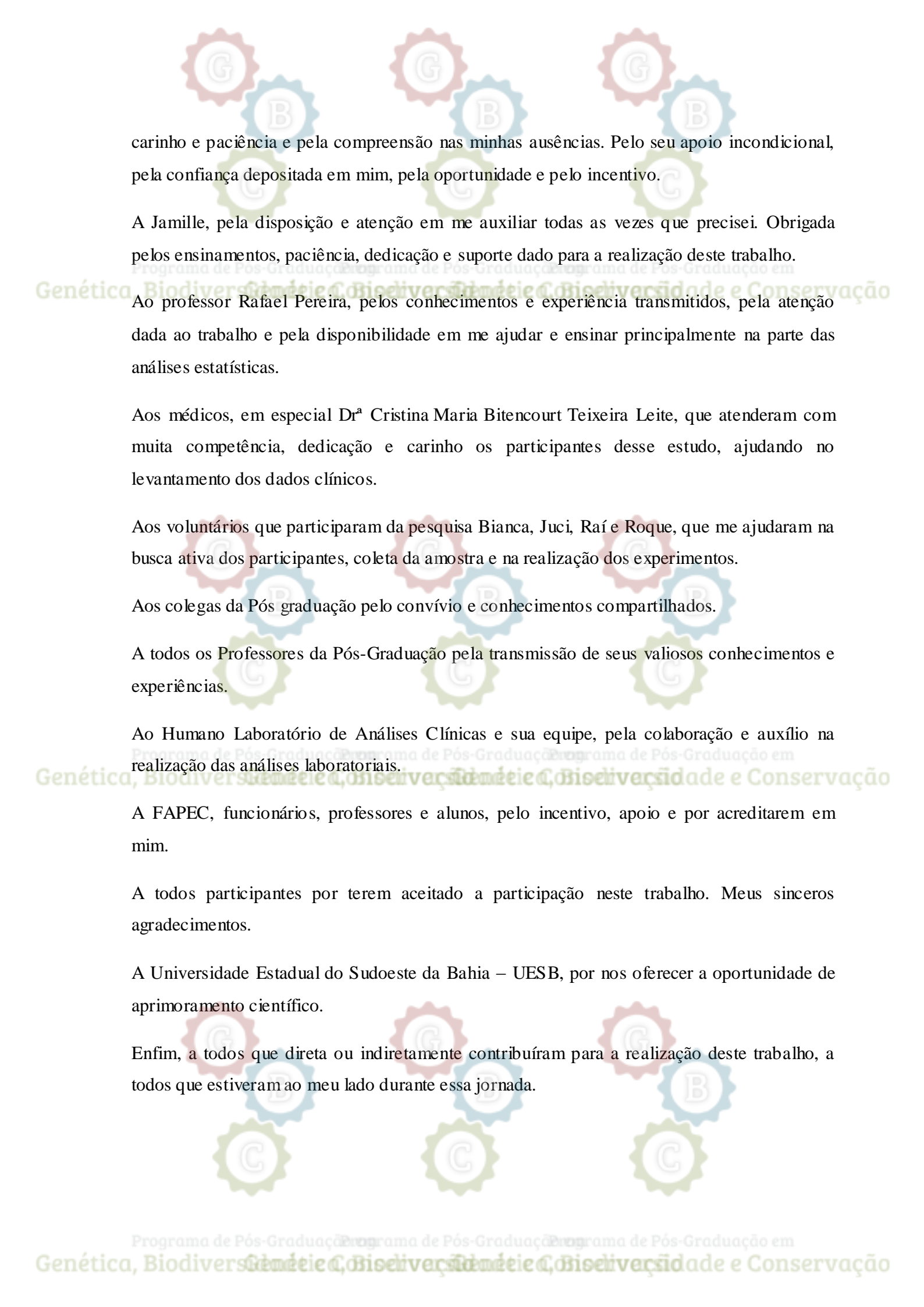
Aos meus filhos, João Lucas e Leonardo, por compreenderem a minha ausência. Vocês são minha maior fonte de inspiração e vontade de crescimento profissional e, principalmente pessoal.

Ao meu marido, Jonatan, por toda compreensão, força e amor que tem me proporcionado, enriquecendo minha vida ainda mais de felicidades e sucessos.

Aos meus amigos e familiares que me alimentaram com seu apoio, paciência, amor nos momentos de dificuldade e, principalmente por acreditarem em mim.

Ao meu orientador, Juvenal Cordeiro Silva Junior, pela confiança, pela oportunidade de realizar esse sonho, pela participação no desenvolvimento desse trabalho e sempre disposto a ajudar, com extrema competência e profissionalismo. Meu muito obrigado!

A minha co-orientadora, Ana Angélica Leal Barbosa, uma pessoa rica não só em conhecimentos, mas também como ser humano de beleza interior inquestionável e com coração imenso. Acima de tudo, exemplo de amor a tudo o que faz. Muito obrigada não só pela excelente orientação e inúmeros ensinamentos, mas também por me acolher com tanto



carinho e paciência e pela compreensão nas minhas ausências. Pelo seu apoio incondicional, pela confiança depositada em mim, pela oportunidade e pelo incentivo.

A Jamille, pela disposição e atenção em me auxiliar todas as vezes que precisei. Obrigada pelos ensinamentos, paciência, dedicação e suporte dado para a realização deste trabalho.

Ao professor Rafael Pereira, pelos conhecimentos e experiência transmitidos, pela atenção dada ao trabalho e pela disponibilidade em me ajudar e ensinar principalmente na parte das análises estatísticas.

Aos médicos, em especial Dr<sup>a</sup> Cristina Maria Bitencourt Teixeira Leite, que atenderam com muita competência, dedicação e carinho os participantes desse estudo, ajudando no levantamento dos dados clínicos.

Aos voluntários que participaram da pesquisa Bianca, Juci, Raí e Roque, que me ajudaram na busca ativa dos participantes, coleta da amostra e na realização dos experimentos.

Aos colegas da Pós graduação pelo convívio e conhecimentos compartilhados.

A todos os Professores da Pós-Graduação pela transmissão de seus valiosos conhecimentos e experiências.

Ao Humano Laboratório de Análises Clínicas e sua equipe, pela colaboração e auxílio na realização das análises laboratoriais.

A FAPEC, funcionários, professores e alunos, pelo incentivo, apoio e por acreditarem em mim.

A todos participantes por terem aceitado a participação neste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, por nos oferecer a oportunidade de aprimoramento científico.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, a todos que estiveram ao meu lado durante essa jornada.



## BIOGRAFIA

LUDMILA XAVIER SOUZA, filha de Nelson Nunes de Souza e Anazilda Xavier Souza, nasceu em Jequié, Bahia, em 18 de outubro de 1982.

Em 2001, ingressou no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas com Ênfase em Biomedicina, na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, Bahia. Em janeiro de 2005 concluiu o curso.

Em 03 de junho de 2005 ingressou no curso de Especialização em Auditoria de Sistemas de Saúde, no Centro de Pós-Graduação da Universidade Estácio de Sá, Itabuna, Bahia, concluindo-o em agosto de 2006.

Em março de 2014 iniciou o curso de mestrado em Genética, Biodiversidade e Conservação na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Jequié, Bahia, na área de Genética Humana, submetendo-se ao exame final de defesa da dissertação em 30 de março de 2016.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

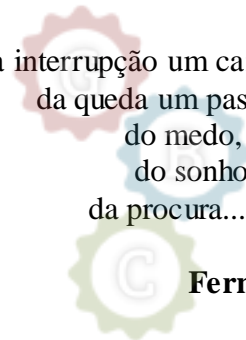
**De tudo, ficaram três coisas:**

a certeza de que estamos sempre começando...  
a certeza de que é preciso continuar...  
a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

fazer da interrupção um caminho novo...  
da queda um passo de dança...  
do medo, uma escada...  
do sonho, uma ponte...  
da procura... um encontro.

**Fernando Sabino**



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



## RESUMO

A anemia falciforme é uma doença hereditária, que se expressa por homozigose do alelo S da hemoglobina, enquanto a heterozigose (AS) constitui uma condição relativamente comum e segundo a literatura clinicamente benigna, raramente apresenta manifestações clínicas ou hematológicas significantes. Embora todo o paciente com anemia falciforme apresente a mesma mutação genética, a diversidade relativa quanto a severidade das manifestações clínicas é notável. O alelo S apresenta haplótipos polimórficos classificados segundo sua distribuição geográfica na África como: Bantu, Benin, Senegal, Camarão e Asiático. Pesquisas demonstraram que existe uma associação entre o tipo de haplótipo e as manifestações clínicas variáveis. Desse modo, essa pesquisa objetivou analisar se as manifestações clínicas e achados laboratoriais nos indivíduos AS podem estar relacionadas com os haplótipos do alelo S. A amostra foi composta de trinta e um indivíduos heterozigotos de ambos os sexos com predominância do sexo feminino e adultos jovens originários principalmente da microrregião de Jequié. Foram realizados exame clínico detalhado e análise demográfica e socioeconômica de todos os participantes, exames bioquímicos e hematológicos e a genotipagem através da técnica PCR-RFLP para identificação dos haplótipos  $\beta^S$ . Os dados foram categorizados e apresentados com frequências absolutas e relativas, e foram analisados utilizando o programa estatístico *Statistical Package for social Sciences* (SPSS 21.0). Com relação à frequência dos haplótipos estudados, observou-se quantidades semelhantes de indivíduos com haplótipo Bantu e Benin (22,6%) e um percentual de 54,8% (17 indivíduos) foi classificado como haplótipo atípico, sendo esses provavelmente originários a partir dos haplótipos típicos Bantu ou Benin. Esses dados reforçam a origem e distribuição geográfica dos negros na Bahia, trazidos principalmente da Baía de Benin e Baía de Biafra. Analisando os resultados hematológicos, obteve-se na amostra estudada cinco indivíduos (16,1%) com Hb e Ht baixos, oito (25,8%) apresentaram VCM baixo e sete (22,6%) HCM baixo, quadro sugestivo de anemia microcítica e hipocrômica, porém não foi identificada co-existência de anemia ferropriva nem de talassemia. Foi possível identificar uma proporção significativamente maior ( $p < 0.05$ ) de parâmetros VCM e HCM alterados entre os indivíduos heterozigotos comparando com a amostra controle. Os demais parâmetros analisados não apresentaram associação significativa. Analisando o quadro clínico e as queixas mais frequentes observou-se que 70% dos participantes relataram dores, principalmente nos membros superiores e inferiores, e nas articulações. Além disso, 29,03% queixaram-se de fadiga e 25,81% relataram um quadro de anemia. Não foi encontrada associação significativa entre os diferentes haplótipos encontrados para as queixas clínicas e parâmetros hematológico nos heterozigotos. Os resultados obtidos demonstram que os indivíduos com traço falciforme quando comparados aos normais apresentaram parâmetros alterados relacionados com o quadro de anemia, além de possuírem maior probabilidade de desenvolver essas alterações quando comparados com grupo controle.

**Palavras-chave:** Anemia falciforme; Heterozigoto AS; Hemoglobinopatias; Haplótipos  $\beta^S$ .






## ABSTRACT

Sickle cell anemia is an inherited disease, which is expressed by homozygous allele S hemoglobin, while heterozygosity (AS) is a relatively common condition and according to clinically benign literature rarely presents clinical or hematologic manifestations significant. Although all patients with sickle cell anemia present the same genetic mutation, diversity as on the severity of the clinical manifestations is remarkable. The S allele has polymorphic haplotypes classified according to their geographical distribution in Africa as Bantu, Benin, Senegal, Cameroon and Asia. Research has shown that there is an association between the type of haplotype and clinical manifestations. Thus, this study aimed to analyze the clinical manifestations and laboratory findings in AS individuals may be related to the haplotype allele S. The sample was composed of thirty-one heterozygous individuals of both sexes with a predominance of females and young adults originating especially the micro-region of Jequié. detailed clinical and demographic and socio-economic analysis were performed in all participants, biochemical and hematological tests and genotyping by PCR-RFLP technique to identify the haplotypes  $\beta^S$ . Data were categorized and presented with absolute and relative frequencies, and were analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS 21.0). Regarding the frequency of haplotypes studied, there was similar amounts of individuals with haplotype Bantu and Benin (22.6%) and a percentage of 54.8% (17 subjects) were classified as atypical haplotype, and these probably originating from the typical Bantu haplotypes or Benin. These data reinforce the origin and geographical distribution of blacks in Bahia, brought mainly from the Bight of Benin and Biafra Bay. Analyzing hematological results, was obtained in the sample studied five subjects (16.1%) with Hb and Ht low, eight (25.8%) had low VCM-seven (22.6%) MCH low, suggestive of anemia microcytic and hypochromic, but was not identified co-existence of iron deficiency anemia or thalassemia. It was possible to identify a significantly greater proportion ( $p < 0.05$ ) and MCV MCH parameters change between heterozygous individuals compared with the control sample. The other analyzed parameters showed no significant association. Analyzing the clinical picture and the most frequent complaints was observed that 70% of participants reported pain mainly in the upper and lower limbs and joints. In addition, 29.03% complained of fatigue and 25.81% reported an anemia. It was not found significant association between different haplotypes found for the clinical signs and hematological parameters in heterozygotes. The results showed that individuals with sickle cell trait when compared to normal had changed parameters related to anemia, in addition to possessing more likely to develop these changes compared to the control group.

**Key words:** sickle cell anemia; Heterozygous AS; Hemoglobinopathies; Haplotypes  $\beta^S$ .



## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

**AA** – Hemoglobina normal

**AF** – Anemia Falciforme

**AC** – Heterozigoto C

**AD** - Heterozigoto D

**AS** – Heterozigoto para hemoglobina S/ Traço falciforme

**AUR** - Ácido Úrico

**BA** – Bahia

**BIL** – Bilirrubinas total e frações

**$\beta$**  - beta

**$\beta^S$**  – Alelo da beta globina com mutação para anemia falciforme

**CAAE** – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

**CAR** – República Centro Africana ou Bantu

**CAM** - Camarões

**CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa

**CRE** – Creatinina

**DF** – Doença Falciforme

**dL** - Decilitro

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**dNTP** – Desoxirribonucleotídeos trifosfato

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetraacético

**et al** - e outros

**FAL** – Fosfatase Alcalina

**FE** - Ferro

**FET** - Ferritina

**g** - Gramas

**GGT** – Gama-glutamyltransferase

**HAF** - Histórico familiar de anemia falciforme

**Hb** – Hemoglobina

**HbA** – Hemoglobina A (normal)

**HbAS** – Heterozigoto para HbS (Traço falciforme)

**HbA1** – Hemoglobina A1

**HbA2** – Hemoglobina A2

**HbC** – Hemoglobina C

**HbD** – Hemoglobina D

**HbF** – Hemoglobina F

**HbS** – Hemoglobina S (falcêmico)

**HbSS** – Homozigoto para HbS (anemia falciforme)

**Hm** – Hemácia

**HCM** - Volume corpuscular médio

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta performance

**Ht** - Hematócrito

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IC** - Intervalos de confiança

**Km** – Quilômetros

**LDH** – Desidrogenase láctica

**ml** – Mililitros

**OD** - odds ratio

**p**- Nível de significância

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*)

**PTF** – Proteínas totais e frações

**RET** - Reticulócitos



**RFLP** – Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorfism*)

**SC** – Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobinas S e C

**SD** – Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobinas S e D

**SPSS** – Statistical Package for social Sciences

**SS** – Portador homozigoto da hemoglobina S

**TGO** - Transaminase glutâmico oxalacética

**TGP** – Transaminase glutâmico pirúvica

**TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TRANS** - Transferrina

**UESB** – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

**URE** - Uréia

**USF** – Unidade de Saúde da Família

**V** - Volts

**VCM** – Volume corpuscular médio

**µl** - Microlitros

**µM** – Micromolar



**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1** – Posicionamento dos sítios polimórficos do cluster beta utilizados na determinação dos haplótipos  $\beta^S$  e seus respectivos pares de primers. As setas indicam os sítios polimórficos identificados pelas endonucleases de restrição utilizadas neste estudo..... 15

**Figura 2** – Padrão de bandas observado para o marcador H23. Gel de agarose 3%, corado com GelRed. Na raia 1 o homozigoto sem o sitio de corte, nas raias 3 e 4 encontram-se os heterozigoto (-/+) e na 2 tem-se o homozigoto com o sítio de corte..... 16





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> <i>Primers</i> utilizados para amplificação de regiões da globina $\beta^S$ .....	13
<b>Tabela 2.</b> Composição e programação das reações de PCR utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da globina $\beta^S$ .....	14
<b>Tabela 3.</b> Condições da Reação de Restrição.....	15
<b>Tabela 4.</b> Padrão dos haplótipos $\beta^S$ .....	16

## CAPÍTULO

<b>Tabela 1.</b> Caracterização dos parâmetros hematológicos categorizados entre indivíduos controle e heterozigotos.....	34
<b>Tabela 2.</b> Caracterização dos parâmetros hematológicos categorizados entre indivíduos com diferentes haplótipos (Bantu vs Benin vs Atípico) da doença falciforme.....	35
<b>Tabela 3.</b> Caracterização dos sinais clínicos e do histórico familiar de anemia falciforme entre indivíduos com diferentes haplótipos $\beta^S$ (Bantu vs Benin vs Atípico).....	36





## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
2.1	HISTÓRICO	4
2.2	MUTAÇÃO E FISIOPATOLOGIA	4
2.3	PADRÃO DE HERANÇA GENÉTICA	5
2.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	6
2.5	FATORES GENÉTICOS MODULADORES	7
2.5.1.	HAPLÓTIPOS DA HEMOGLOBINA S	7
2.6	EPIDEMIOLOGIA	9
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	10
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>11</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO	11
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	11
4.3	ASPECTOS ÉTICOS	12
4.4	COLETA E CONSERVAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO	12
4.5	MARCADORES GENÉTICOS INVESTIGADOS	13
4.6	ANÁLISE CLÍNICA	13
4.7	ANÁLISE LABORATORIAL	14
4.7.1	Extração do DNA Genômico	14
4.7.2	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	14
4.7.3	Reação de Restrição e Análise dos Polimorfismos	15
4.7.4	Análise Bioquímica e Hematológica	17
4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	17
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>19</b>

**6 CAPÍTULO - CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS COM TRAÇO FALCIFORME: ASPECTOS GENÉTICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS ..... 23**

**7 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 47**

**8 APÊNDICES ..... 48**

**9 ANEXOS ..... 54**





## 1 INTRODUÇÃO

A Anemia Falciforme (AF) é uma doença genética frequente nos seres humanos, constituindo assim uma das doenças mais estudadas no mundo. No Brasil, a AF tem importância clínica, hematológica, bioquímica, genética, antropológica e epidemiológica significativa devido à sua prevalência e morbidade-mortalidade sendo identificada como uma questão de saúde pública. AF é uma hemoglobinopatia, onde é produzida alteração estrutural na cadeia da beta globina levando à produção de uma hemoglobina anormal denominada HbS. É uma anemia hemolítica hereditária caracterizada pela presença de hemácias em forma de foice e pela hemólise acelerada, devido à substituição de um único aminoácido da cadeia beta da hemoglobina.

O termo doença falciforme (DF) se aplica a um conjunto de doenças genéticas autossômicas caracterizadas pela presença da hemoglobina S. A maior parte se apresenta sob forma homocigótica SS, que é a anemia falciforme (HbSS), e uma menor parte é representada pela associação da HbS com outras variantes de hemoglobinas, tais como: HbC, HbD e as interações com as talassemias.

Os indivíduos com anemia falciforme (HbSS) apresentam anemia grave e uma diversidade clínica decorrente do processo de hemólise e vaso-oclusão, enquanto os heterocigotos (HbAS) segundo a literatura normalmente não apresentam sintomatologia.

A cada ano, as descobertas sobre esta condição têm se refletido na melhoria da qualidade e aumento da expectativa de vida dos portadores da doença. Porém, pouco se sabe sobre o traço falciforme, considerado como condição benigna, apresentando poucas ou nenhuma manifestação clínica ou laboratorial. Contudo, a literatura apresenta relatos desde pequenos danos à saúde até manifestações clínicas graves, inclusive a morte destes indivíduos.

Diante disso o presente estudo abordará os aspectos genéticos, clínicos, bioquímicos e hematológicos de indivíduos heterocigotos para ampliar os conhecimentos a respeito do quadro clínico desses indivíduos, tendo em vista que estudos anteriores apontam suspeitas de alterações clínicas para esse grupo.

Esses dados vão fornecer informações importantes sobre o traço falciforme confirmando ou não sua relação com as queixas relatadas por alguns desses indivíduos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

A Anemia Falciforme tem grande impacto na vida e na saúde de várias pessoas pelo mundo. Relatos e pesquisas estimam o seu surgimento há aproximadamente 50 mil a 100 mil anos, nos países do centro-oeste africano, países da Índia e do leste da Ásia, nos períodos paleolítico e mesolítico (NAOUM; DOMINGOS, 1997, VOGEL; MOTULSKY, 2000). É a doença hematológica mais comum no mundo e mais prevalente na população brasileira, principalmente em regiões localizadas ao norte e nordeste do nosso país, sendo classificada como uma hemoglobinopatia (transtornos hereditários) que é caracterizada por alteração dos alelos das globinas provocando defeitos hereditários da síntese da hemoglobina o que provoca um quadro de anemia hemolítica (SILVA, 1993; NAOUM, 2000; BRASIL, 2002).

O alelo que causa a doença falciforme, alelo S, tem maior predomínio na África Equatorial, onde atinge até 3% da população. Este alelo encontra-se amplamente distribuído em todos os continentes em função da migração “forçada” que ocorreu no processo de escravidão dos negros africanos, o que resultou em uma grande mistura étnica (ZAGO, 1993; NAOUM; DOMINGOS, 1997). Kan e Dozy (1980) demonstraram em seus estudos moleculares que a mutação que originou o alelo da hemoglobina S não foi um evento único, mas ocorreu em diversos locais e em diferentes épocas, dentro e fora do continente africano.

A introdução da Anemia Falciforme no Brasil ocorreu no período da imigração forçada dos povos africanos, trazidos de diferentes regiões da África para serem usados e comercializados como escravos (BRASIL, 2002).

### 2.2 Mutação e Fisiopatologia

A patologia da Anemia Falciforme é ocasionada pela mutação pontual no alelo da globina beta da hemoglobina. Ocorre substituição do ácido glutâmico por uma valina na posição seis da cadeia beta da hemoglobina, formando uma hemoglobina anormal, conhecida como hemoglobina S (HbS) (STEINBERG, 2006).

A hemoglobina S (HbS) possui propriedades físico-químicas bastante diferentes da hemoglobina normal (HbA), devido à perda de duas cargas elétricas por molécula, solubilidade e estabilidades diferentes, com forte tendência de formar estruturas filamentosas (polímeros de HbS), quando desoxigenada (baixa tensão de oxigênio) (BUNN; FORGET, 1986). A degradação oxidativa da hemoglobina leva a precipitação de corpos de Heinz e geração de radicais livres que causam agressões intra-eritrocitárias atuando contra a estrutura e o desempenho fisiológico da membrana da hemácia. A polimerização da hemoglobina se agrava pelos constantes processos de oxigenação e desoxigenação da HbS, modificando a estrutura do citoesqueleto da hemácia provocando alterações morfológicas em sua estrutura o que pode levar a falcização (hemácias em forma de foice), ou hemólise (rompimento da membrana da hemácia) (NAOUM, 2000; MOUSINHO-RIBEIRO *et al.*, 2008).

Os eritrócitos falcizados na circulação apresentam aspecto rígido e anormal e possuem maior possibilidade de se aderirem ao endotélio vascular o que leva ao surgimento de vários fenômenos que causam danos aos tecidos e órgãos, comprometendo suas funções (NAOUM, 2000).

### 2.3 Padrão de Herança Genética

A Anemia Falciforme é caracterizada como uma doença de caráter hereditário, com padrão de herança autossômico recessivo, podendo apresentar-se na população de duas formas, homozigota ou heterozigota. Os pacientes que apresentam a doença falciforme são homozigotos (SS) para a HbS e apresentam sintomas clínicos característicos da doença. Os pacientes heterozigotos (AS) são chamados de portadores do traço falciforme, sendo, na maioria das vezes, assintomáticos. Nestes pacientes, a concentração de HbS é de aproximadamente 40%, sendo os outros 60 % constituídos de HbA. Essa quantidade HbA impede que a hemácia adquira a forma de foice, salvo em casos de hipóxia acentuada (ZAGO, 1993).

Segundo a literatura, o traço falciforme raramente está associado a manifestações clínicas ou hematológicas significantes, os indivíduos não apresentam anemia e a morfologia e a sobrevivência das hemácias é normal, portanto assume o caráter de condição benigna. Apesar dos indivíduos heterozigotos não apresentarem, normalmente, evidentes manifestações clínicas existem relatos de complicações clínicas e até mesmo de morte súbita em portadores

expostos a condições de baixa tensão de oxigênio, que podem levar à falcização das hemácias (TOMÉ-ALVES *et al.*, 2000; ZAGO *et al.*, 2001).

#### 2.4 Manifestações Clínicas

A baixa tensão de oxigênio distorce a forma das hemácias, causando hemólise, fenômeno responsável pelo quadro de anemia. As hemácias falciformes (HbS) também são menos flexíveis que as hemácias normais (HbA), o que leva a oclusões microvasculares, causando “crises” caracterizadas por episódios de dor intensa e lesão tecidual (LOUREIRO; ROZENFELD, 2005).

Devido os processos decorrentes de hemólise das hemácias falciformes ou os fenômenos secundários aos episódios de vaso-oclusão, as complicações clínicas são diversas podendo atingir todos os órgãos e sistemas, levando o paciente à morbidade, delimitação da sua capacidade de trabalhar e redução da expectativa de vida (BRASIL, 2002).

As complicações podem ser classificadas como agudas ou crônicas e são dependentes, da própria fisiopatologia da doença, bem como da idade dos portadores, da condição socioeconômica, nutrição, diagnóstico e acompanhamento terapêutico precoce, estresse psicossocial (ZAGO, 2007).

Entre as manifestações clínicas mais importantes podemos destacar a anemia, dor e insuficiência de múltiplos órgãos. A anemia é proveniente do processo de hemólise, principalmente pela menor sobrevivência das hemácias falciformes, por isso é considerada uma anemia hemolítica. As constantes crises hemolíticas levam a um quadro de anemia crônica, icterícia, esplenomegalia, hepatomegalia e alterações ósseas (ZAGO, 2007).

A dor é resultado da obstrução da circulação que leva a isquemia tecidual aguda. Esse sintoma é relatado mais frequentemente nos membros inferiores e superiores. Além da dor, os eventos de vaso-oclusão causam danos teciduais devido a obstrução do fluxo sanguíneo, comprometendo diretamente a função de órgãos vitais (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003; STEINBERG, 2005; ZAGO, 2007).

## 2.5 Fatores genéticos moduladores

Embora todo o paciente com anemia falciforme apresente a mesma mutação genética, a diversidade relativa quanto a severidade das manifestações clínicas é notável. Vários fatores modificantes vêm sendo estudados com o intuito de definir o porquê dessa diversidade. Os mais importantes atualmente são: os níveis de Hemoglobina Fetal (HbF), a coexistência de outras hemoglobinopatias hereditárias (ex: talassemias) e finalmente, os diferentes haplótipos para a HbS (POWARS, 1991).

Os níveis de hemoglobina fetal correspondem a menos de um por cento da hemoglobina total em indivíduos maiores de um ano de idade, porém há casos onde eles se encontram bem mais elevados devido a fatores hereditários. Nos indivíduos falciformes, essas taxas elevadas de HbF estão associadas com quadro clínico com menor severidade, e isso se deve ao fato das moléculas de HbF não participarem do processo de polimerização que ocorre entre as moléculas de HbS desoxigenada (BUNN, 1997).

A associação da doença falciforme com outras hemoglobinopatias hereditárias, por exemplo, a talassemia (hemoglobinopatia caracterizada pela redução ou ausência da síntese de uma ou mais cadeias globínicas) é relativamente frequente e leva a uma diversidade de quadros clínicos, que variam desde formas assintomáticas até as mais severas (MUELLER; YONG, 1998).

Os últimos fatores moduladores conhecidos são os haplótipos da HbS, que podem ser descritos como padrão de combinação dos sítios polimórficos de endonucleases de restrição, localizados no interior e ao redor do alelo da cadeia beta mutante (GAY *et al.*, 1997).

### 2.5.1. Haplótipos da Hemoglobina S

As variações em determinadas sequências que levam a alteração do sítio de reconhecimento de uma enzima de restrição produzem um tipo de variabilidade no complexo gênico das globinas alfa ou beta. Estas alterações ocorrem aproximadamente a cada cem bases ao longo do genoma e o padrão de combinação desses sítios polimórficos é chamado de haplótipo (ANTONARAKIS *et al.*, 1985).

O conjunto dessas regiões polimórficas no grupamento beta globina, localizados entre os alelos alfa e beta, bem como nas sequências flangeadoras constitui os haplótipos da globina  $\beta^S$  (NAOUM; NAOUM, 2004).

Foram identificados e descritos cinco haplótipos, sendo eles associados com diferentes grupos étnicos e comumente designados de acordo com a área geográfica onde foram primeiramente identificados: Benin (África Ocidental), Bantu ou Republica Centro Africana - CAR (África Oriental Centro-Sul), Senegal (África Atlântico Ocidental), Asiático (Índia e Península Arábica Oriental) e, um com menos frequência, Camarões - CAM, (restrito a África e ao grupo étnico Eton na Costa Ocidental Africana) (PAGNIER *et al.*, 1984; NAGEL, 1984; SUTTON *et al.*, 1989).

A variabilidade genética a partir da mutação permitiu uma melhor compreensão da heterogeneidade clínica da doença, além de ter importância para o estudo antropológico (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

O estudo dos haplótipos  $\beta^S$  pode ser utilizado com diferentes objetivos, como determinação da origem da mutação, definição do caminho do fluxo do alelo mutante – útil no estudo da origem e evolução, e na evolução clínica dos pacientes com Anemia Falciforme, já que o tipo de haplótipo associado ao alelo S está relacionado a um quadro clínico variado (NAGEL, 1984). Foi observado que o surgimento e intensidade das complicações são diferentes entre os haplótipos, sugerindo melhor prognóstico para os portadores dos haplótipos Senegal e Árabe-indiano, e pior evolução clínica para os portadores dos haplótipos Bantu e Benin (POWARS, 1991).

No Brasil, os haplótipos mais frequentes encontrados foram Bantu (77%), Benin (30%) e Senegal (3%) (PANTE-DE-SOUSA *et al.*, 1998; ZAGO *et al.*, 2000). Além desses cinco haplótipos descritos, existem outros considerados atípicos, que, provavelmente surgiram a partir de alguns mecanismos genéticos que incluem: mutações pontuais nos sítios polimórficos de restrição, conversões gênicas e recombinações entre os haplótipos típicos (ZAGO *et al.*, 2000).

## 2.6 Epidemiologia

Devido aumento no fluxo de migrações é esperado um aumento nas próximas décadas de problemas de saúde relacionados às hemoglobinopatias, incluindo principalmente anemia falciforme, pois o número estimado de migrantes com HbS aumentou mais rapidamente do que o número total de migrantes. Esta tendência também foi acompanhada por um aumento na média global da frequência de HbS nos países de origem. A propagação do gene HbS através de migrações humanas recentes tem importância global como problema de saúde pública, visto que a possibilidade de encontrar um paciente com sintomas associado a distúrbios falcização está aumentando (PIEL *et al.*, 2014).

No Brasil, a anemia falciforme tem significativa importância epidemiológica em virtude da prevalência e da morbimortalidade que apresenta e, por isso, tem sido apontada como uma questão de saúde pública (LOUREIRO; ROZENFELD, 2005).

A anemia falciforme é considerada a doença hereditária monogênica mais comum do Brasil, ocorrendo, predominantemente, entre afro-descendentes. A distribuição do alelo S no Brasil é bastante heterogênea, dependendo de composição étnica da população. A prevalência de heterozigotos para a HbS é maior nas regiões norte e nordeste (6% a 10%), enquanto nas regiões sul e sudeste a prevalência é menor (2% a 3%) (CANÇADO; JESUS, 2007). Isso se deve a maior influência da etnia africana na constituição étnica da população das regiões norte e nordeste.

O traço falciforme é encontrado em frequências que variam de 6,9% a 15,4% dos indivíduos de ascendência africana (GONÇALVES *et al.*, 2003). No Recôncavo Baiano (BA) a prevalência dos portadores do traço falciforme (AS) foi de 10,5%, enquanto da anemia falciforme (SS) foi 1,24% (SILVA *et al.*, 2006). Em Salvador (BA), a prevalência estimada do traço falciforme foi de 9,8%, enquanto da anemia falciforme foi de 0,2% (ADORNO *et al.*, 2005). Pesquisa realizada por Barboza (2013) identificou, no período de 2011 e 2012 no município de Jequié, 223 indivíduos heterozigotos (AS), 101 indivíduos heterozigotos (AC) e dois indivíduos duplos heterozigotos (SC). A frequência média nesse período para o traço falciforme foi de 6,45%.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar os haplótipos da anemia falciforme em amostra de indivíduos heterozigotos para doença, dos municípios de Jequié e Jiquiriçá, e correlacionar com as manifestações clínicas e achados laboratoriais.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Verificar os haplótipos do alelo  $\beta^S$  em indivíduos heterozigotos da anemia falciforme.
- Relacionar os haplótipos do alelo  $\beta^S$  identificados com a manifestação e/ou sintomatologia da doença, no paciente heterozigoto.
- Correlacionar com os parâmetros bioquímicos e achados clínicos do portador do traço falciforme.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização do Local de Estudo

O município de Jequié está localizado no Sudoeste da Bahia, a 365 Km de Salvador, capital do estado. Está a 216 metros acima do nível do mar, nos limites entre a caatinga e a zona da mata. A população do município estimada em 2015, segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), era de 161.528 habitantes.

O município de Jiquiriçá está localizado na mesorregião Sudoeste do Estado, na Microrregião Homogênea 024 – Jequié. Sua população estimada em 2015, segundo dados do IBGE, era de 15.033 habitantes.

Esses dois municípios estão incluídos na microrregião de Jequié, que é uma das microrregiões do estado da Bahia pertencente à mesorregião Centro-Sul Baiano, que possui uma área total de 17.396,126 km<sup>2</sup> e está dividida em 26 municípios.

### 4.2 Caracterização da Amostra

A amostra foi constituída por 31 indivíduos heterozigotos com diagnóstico prévio do traço falciforme (AS), do município de Jequié e de Jiquiriçá, localizados através de uma busca ativa. A idade dos participantes variou entre 1 e 79 anos de idade, consistindo em 21 do gênero feminino e 10 do gênero masculino.

A amostra controle foi obtida no banco de dados do laboratório onde foram realizados os exames hematológicos e bioquímicos dessa pesquisa. Foram selecionados os resultados de pacientes com eletroforese de hemoglobina normal (AA), respeitando a faixa etária dos heterozigotos.

#### 4.3 Aspectos Éticos

A coleta e análise das amostras de sangue seguiram as normas da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e a pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UESB (número de protocolo 090226/2014, CAAE 37152514.4.0000.0055). A coleta de informações socioeconômicas e do material biológico ocorreu seguindo rigorosamente os preceitos de conscientização e autorização dos participantes, aquiescência voluntária e garantia de anonimato. Todos os participantes após esclarecimentos sobre a pesquisa e procedimentos, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ou Termo de Assentimento (Apêndice I e II).

#### 4.4 Coleta e Conservação do Material Biológico

Nesse estudo foram utilizadas amostras de sangue coletadas de 31 indivíduos heterozigotos, sendo 14 moradores de Jequié e 17 moradores de Jiquiriçá.

Para os participantes do município de Jequié, a coleta de material biológico foi realizada em um laboratório de Análises Clínicas do município, onde foram realizados os exames Bioquímicos e Hematológicos. A coleta do material biológico dos participantes localizados no município de Jiquiriçá foi realizada em uma Unidade de Saúde da Família (USF).

De cada participante foi coletado aproximadamente uma amostra de 15 ml de sangue obtido por punção venosa com tubos *Vacu-Tainer*, com e sem EDTA. Para a coleta realizada no município de Jiquiriçá, o material foi mantido em caixa térmica contendo gelo até ser transportado ao Laboratório de Análises Clínicas para realização dos exames laboratoriais. Um tubo com 5 ml de sangue com EDTA de todos participantes foi encaminhado, em caixa térmica contendo gelo, para o laboratório de Genética Humana da UESB para as análises genéticas.

#### 4.5 Marcadores Genéticos Investigados

Para esse trabalho foram utilizados seis *primers* conforme Sutton *et al.* (1989) (Tabela 1). Esses primers flanqueiam e amplificam fragmentos de diferentes tamanhos e localizações.

**Tabela 1** - *Primers* utilizados para amplificação de regiões da globina  $\beta^S$

<i>Primer</i>	Sentido	Sequência do <i>Primer</i>	Região	Tamanho do Fragmento
<b>H0</b>	sense (5'>3')	5' - AAC TGT TGC TTT ATA GGA TTT T - 3'	5' $\gamma$ G	650 pb
<b>H1</b>	anti-sense (3'>5')	5' - AGG AGC TTA TTG ATA ACC TCA GAC - 3'		
<b>H2</b>	sense (5'>3')	5' - AAG TGT GGA GTG TGC ACA TGA - 3'	$\gamma$ G	780pb
<b>H3</b>	anti-sense (3'>5')	5' - TGC TGC TAA TGCTTC ATT ACA A - 3'		
<b>H3</b>	sense (5'>3')	5' - TGC TGC TAA TGCTTC ATT ACA A - 3'	$\gamma$ A	760pb
<b>H4</b>	anti-sense (3'>5')	5' - TAA ATGAGG AGC ATG CAC ACA C - 3'		
<b>H5</b>	sense (5'>3')	5' - GAA CAG AAG TTG AGA TAG A GA - 3'	$\psi\beta$	701pb
<b>H6</b>	anti-sense (3'>5')	5' - ACT CAG TGG TCT TGT GGG CT - 3'		
<b>H7</b>	sense (5'>3')	5' - TCT GCA TTT GAC TCT GTT AGC - 3'	3' $\psi\beta$	590pb
<b>H8</b>	anti-sense (3'>5')	5' - GGA CCC TAA CTG ATA TAA CTA - 3'		

FONTE: Sutton *et al.* (1989).

#### 4.6 Análise Clínica

A Análise clínica foi composta por exame clínico detalhado e análise demográfica e socioeconômica de todos os participantes. Para o exame clínico realizado no município de Jequié contamos com o apoio de um médico que faz parte do grupo de pesquisa, e no município de Jiquiriçá contamos com o apoio dos médicos da USF onde foi realizada a coleta do material biológico. Para o levantamento dos dados demográficos e socioeconômicos utilizamos um questionário (Apêndice III).

## 4.7 Análise Laboratorial

### 4.7.1 Extração do DNA Genômico

O DNA foi extraído a partir do sangue total coletado com EDTA conforme o protocolo do Kit para extração de DNA da Qiagen (QIAamp DNA Mini Kits) conforme instruções do fabricante. A extração foi realizada no Laboratório de Genética Humana da UESB e o DNA extraído armazenado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 4.7.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

O DNA de cada indivíduo foi amplificado utilizando Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Apêndice IV). Foram realizadas seis reações de PCR independentes, cada uma, com um par de *primers* (H0/H1, H2/H3, H3/H4, H5/H6, H7/H8 e H9/H10), conforme condições descritas na tabela 2, amplificando as sequências contendo os sítios polimórficos de interesse no alelo da globina  $\beta^S$  ( $5'\gamma\text{G}$ ,  $\gamma\text{G}$ ,  $\gamma\text{A}$ ,  $3'\psi\beta$ ,  $\psi\beta$ ,  $5'\beta$ ) (SUTTON *et al.*, 1989).

Depois do término da PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% durante 40 minutos com voltagem constante de 150V para visualização do produto amplificado.

**Tabela 2** - Composição e programação das reações de PCR utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da globina  $\beta^S$ . Quantidade em  $\mu\text{L}$  suficiente para uma reação.

Haplótipos	5' $\gamma\text{G}$	$\gamma\text{G}$	$\gamma\text{A}$	$\psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' $\beta$
Marcador	H01	H23	H34	H56	H78	H910
Água	13,25	13,25	13,25	13,25	13,25	13,25
Tampão 10X	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Mg Cl (50mM)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
dNTP (2mM)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Primers (10uM)	2	2	2	2	2	2
Taq (5u)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
DNA	3	3	3	3	3	3
Volume Final (uL)	25	25	25	25	25	25
Programa para amplificação (°C/tempo)	94/5'	94/5'	94/5'	94/5'	94/5'	94/5'
	94/30"	94/30"	94/30"	94/30"	94/30"	94/30"
	59/60"	55/60"	55/60"	55/60"	55/60"	59/60"
	72/60"	72/60"	72/60"	72/60"	72/60"	72/60"
	72/7'	72/7'	72/7'	72/7'	72/7'	72/7'

FONTE: Sutton *et al.* (1989).

### 4.7.3 Reação de Restrição e Análise dos Polimorfismos

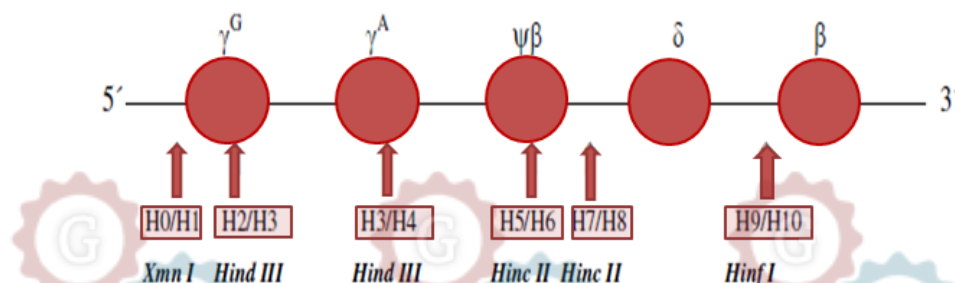
A análise dos polimorfismos e identificação dos haplótipos no presente estudo foi utilizada a técnica de PCR-RFLP, onde o produto da PCR é posteriormente submetido à ação de enzimas endonucleases de restrição. Os *primers* utilizados flanqueiam a região do alelo que contém, ou não, o sítio de restrição específico das enzimas utilizadas na reação de restrição para o locus  $\beta^S$ .

Para a reação de restrição foram utilizadas quatro enzimas endonucleases de restrição BioLabs/Invitrogen (*Xmn I*, *Hin III*, *Hinc II* e *Hinf I*) correlacionadas aos *primers* utilizados na PCR (Figura1), para digestão da amostra de DNA amplificado, conforme protocolo descrito na tabela 3.

**Tabela 3** - Condições da Reação de Restrição. Quantidade em  $\mu$ l suficiente para uma reação.

Reagentes/Primer	H01	H23	H34	H56	H78	H910
Água deionizada autoclavada	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
Tampão da enzima	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
BSA (albumina bovina)	0,15	-	-	-	-	-
Enzima de restrição	0,2 (XmnI)	0,2 (Hind III)	0,2 (Hind III)	0,2 (Hinc II)	0,2 (Hinc II)	0,2 (Hinf I)
Produto da PCR	10	10	10	10	10	10
<b>Volume total</b>						
<b>Temperatura de atividade da enzima</b>	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
<b>Tempo do banho-maria</b>	12h	12h	12h	12h	12h	12h
<b>Fragmentos clivagem</b>	<b>após</b> 450+200	430+340 +10	400+360	360+340 +1	470+120	240+140

FONTE: Sutton *et al.* (1989).

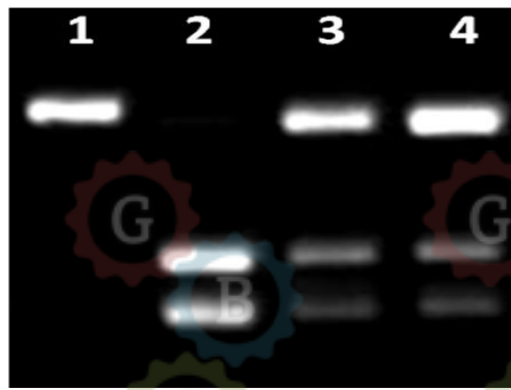


**Figura 1** – Posicionamento dos sítios polimórficos do cluster beta utilizados na determinação dos haplótipos  $\beta^S$  e seus respectivos pares de primers. As setas indicam os sítios polimórficos identificados pelas endonucleases de restrição utilizadas neste estudo.

FONTE: Cabral (2010).

Os produtos oriundos da reação de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% para visualização das bandas e identificação dos padrões de restrição (figura 2).

Para identificação dos haplótipos cada amostra foi identificada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição na análise dos seis sítios polimórficos (tabela 4). Como seqüências padrões foram utilizadas: Bantu [- + - - -], Benin [- - - - +], Senegal [+ + - + +], Camarões [- + + - + +] e Asiático [+ + - + + -]. Estes haplótipos foram considerados como padrão, qualquer combinação diferente da presença e/ou ausência destes sítios foi classificada como haplótipo atípico, seguindo a convenção estabelecida em Zago *et al.* (2000).



**Figura 2** - Padrão de bandas observado para o marcador H23. Gel de agarose 3%, corado com GelRed. Na raia 1 o homocigoto sem o sítio de corte, nas raia 3 e 4 encontram-se os heterocigotos (-/+) e na 2 tem-se o homocigoto com o sítio de corte.

FONTE: O autor (2016).

**Tabela 4** - Padrão dos haplótipos  $\beta^S$ .

Haplótipos	5' $\gamma$ G	$\gamma$ G	$\gamma$ A	$\psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' $\beta$
	Xmml	Hind III	Hind III	Hinc II	Hinc II	Hinf I
<b>Benin</b>	-	-	-	-	+	-
<b>Senegal</b>	-	+	-	+	+	+
<b>Bantu/Car</b>	-	+	-	-	-	-
<b>Camarão</b>	-	+	+	-	+	+
<b>Asiático</b>	+	+	+	-	+	+

FONTE: Zago *et al.* (2000).

#### 4.7.4 Análise Bioquímica e Hematológica

Em 2006, o Ministério de Saúde elaborou um Manual de Condutas Básicas na Doença Falciforme, que traz recomendações a respeito da necessidade de exames complementares.

Seguindo essas diretrizes, os exames foram selecionados a fim de fazer uma avaliação hematológica e bioquímica dos participantes. Por isso foram realizados Hemácia (Hm), Hemoglobina (Hb), Hematócrito (Ht), Volume corpuscular médio (VCM), Hemoglobina corpuscular média (HCM), Reticulócitos (RET), ácido úrico (AUR), uréia (URE), creatinina (CRE), Transaminase glutâmico oxalacética (TGO), Transaminase glutâmico pirúvica (TGP), Gamaglutamiltransferase (GGT), Bilirrubinas total e frações (BIL), Proteínas totais e frações (PTF), Fosfatase alcalina (FAL), Desidrogenase láctica (LDH), Ferritina (FET), Ferro (FE) e Transferrina (TRANS). Também foi realizado eletroforese de hemoglobina pelo método Cromatografia Líquida de Alta Performance – HPLC, para identificação e quantificação dos subtipos de Hemoglobina (HbA1, HbA2, HbF, HbS, HbC e HbD) e confirmação do traço falciforme.

Os parâmetros hematológicos (Hm, Hb, Ht, VCM e HCM) foram categorizados como normal ou alterado, considerando os valores de referência para o sexo e a idade de cada indivíduo. Visando comparar as concentrações dos diferentes subtipos de hemoglobina entre os indivíduos heterozigotos, foi realizada nova categorização, estratificando-os de acordo com a presença ou ausência de alterações indicativas de anemia nos parâmetros hematológicos.

#### 4.8 Análises Estatísticas

Os dados categorizados são apresentados como frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis contínuas como média $\pm$ desvio padrão.

Os testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher foi usado para comparar: 1) as proporções das alterações em diferentes parâmetros hematológicos categorizados entre a amostra controle (indivíduos AA) e heterozigotos, bem como entre indivíduos com diferentes haplótipos  $\beta^S$  (Bantu vs Benin vs Atípico; Bantu vs Benin); 2) as proporções de sintomas clínicos (dor, fadiga, queixas de problemas cardíacos, pulmonares, hepáticos ou renais, Histórico familiar de Anemia Falciforme) entre os indivíduos com diferentes haplótipos  $\beta^S$  (Bantu vs Benin vs

Atípico; Bantu vs Benin). O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparar a concentração dos subtipos de hemoglobina (HbA1, HbA2, HbS, HbF) entre os indivíduos heterozigotos, visando excluir a possibilidade de co-existência de talassemia.

As variáveis que apresentaram associação significativa foram submetidas a análise de regressão logística, no caso de variável dependente (i.e., de resposta ou desfecho estudado, como “controle vs heterozigoto” ou “Bantu vs Benin”) dicotomizada, ou regressão multinomial, no caso de variável dependente com mais de dois níveis (i.e., variável dependente com mais de dois estratos, como “Bantu vs Benin vs Atípico”), visando a obtenção dos odds ratio (OD) com seus respectivos intervalos de confiança 95% (IC95%). As análises de regressão foram ajustadas por variáveis intervenientes quando necessário. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados no programa estatístico *Statistical Package for social Sciences* (SPSS 21.0), sendo o nível de significância adotado de  $p < 0.05$ .



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adorno EV, Couto FD *et al.* (2005). Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Caderno Saúde Pública*, vol. 21, no. 1, p. 292-8.

Antonarakis SE, Kazazian Jr HH, Orkin SH. (1985). DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Human Genetics*, 69: 1-14.

Barboza VP. (2013). Triagem Neonatal de Hemoglobinopatias e associação de marcadores genéticos e culturais. Monografia de graduação em Ciências Biológicas, UESB. p. 54.

Brasil. (2002). Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciforme (Portaria MS nº 822). Brasília, ANVISA, 1. ed. 142p.

Bunn HF, Forget BG. (1986). Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. 1. ed. W.B. Saunders Company, 690p.

Bunn HF. (1997). Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*; 337(11): 762-9.

Cabral CHK, Medeiros TMD. (2010). Determinação de haplótipos do gene beta S em pacientes com anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*; 32(6):491-492

Cançado RD, Jesus JA. (2007). A doença falciforme no Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, vol.29, no. 3, p. 204-6.

Galiza Neto GC, Pitombeira MS. (2003). Aspectos Moleculares da Anemia Falciforme. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 1.

Gay JC, Phillips JAIII, Kazazian HHJr. (1997). Hemoglobinopathies and thalassemias. New York: Churchill Livingstone.

Gonçalves MS, Bonfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A *et al.* (2003). Beta S-Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Journal of Medical and Biological Research*, vol. 36, no. 10, p. 1283-8.

Kan YW, Dozy AM. (1980). Evolution of the the hemoglobin S and C genes in world populations. *Science*, v 209(4454): 388-95.

Loureiro MM, Rozenfeld S. (2005). Epidemiologia de Internações por Doenças Falciformes no Brasil. *Revista Saúde Publica*. Rio de Janeiro, v.39, n.6, p. 943-949.

Mousinho-Ribeiro RC, Cardoso GL, Sousa ÍEL, Martinset PKC. (2008). Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*; 30(2): 136-141.

Mueller RF, Young ID. (1998). Haemoglobin and the haemoglobinopathies. Emery' s elements of medical genetics. 10a ed. Edinburgh, Churchill Livingstone.

Nagel RL. (1984). The origin of the haemoglobin S gene: Clinical, genetic, and anthropological consequences. *The Einstein Journal of Biology and Medicine*; 2:53-62.<sup>11</sup>

Naoum PC, Domingos CRB. (1997). Doença falciforme no Brasil. Origem, genótipos, haplótipos e distribuição geográfica. *Jornal Brasileiro de Patologia*; 33: 145-153.

Naoum PC. (2000). Prevalência e controle da hemoglobina S. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 22 (Suplemento 2), p. 142-8.

Naoum PC, Naoum FA. (2004). *Doenças das Células Falciformes*. São Paulo: Ed Sarvier, p.224.

Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhodja O *et al.* (1984). Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81: 1771-3.

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

Piel FB, Tatem AJ, Huang Z, *et al.* (2014). Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. *Lancet Glob Health*; 2(2): 80-9.

Powars DR. (1991). Sickle cell anemia: Beta s-gene-cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ failure. *Seminars in Hematology*; 28:202-8.

Silva RBP, *et al.* (1993). A anemia falciforme como problema de Saúde Pública no Brasil. *Revista de Saúde Pública*; 27(1): 54-58.

Silva WS, Lastra A *et al.* (2006). Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em população do Recôncavo Baiano, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, vol. 22, no. 12, p. 2561-2566.

Steinberg MH. (2005). Predicting clinical severity in sickle cell anemia. *British Journal of Haematology*; 129:465-81.

Steinberg MH. (2006). Adewoye AH. Modifiers genes and sickle cell anemia. *Current opinion in hematology*; 13:131-6.

Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. (1989). Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of b-like globin gene cluster haplotypes. *American Journal of Hematology*; 32:66-9.

Thein SL. (2005). Genetic modifiers of  $\alpha$ -thalassemia. *Haematologica*, v. 90, n. 5, p. 649-660.

Tomé-Alves R, Marchi-Salvador DP, Orlando GM, Palharini LA, Imperial RE, Naoum PC *et al.* (2000). Hemoglobinas AS/Alfa talassemia – importância diagnóstica. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*; 22: 38 8-94.

Vogel F, Motulsky AG. (2000). *Genética Humana: Problemas e Abordagens*. 3ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Zago MA. (1993). Origem e heterogeneidade da anemia falciforme. *Boletim (SBHH)*, vol. 15, no. 162, p. 3-8.

Zago MA, Silva-Júnior WA, Dalle B, Gualandro S, Hutz MH, Lapoumeroulie C *et al.* (2000). Atypical beta-S haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *American Journal of Hematology*; 63(2):79-84.

Zago MA, Silva WA, Gualandro S *et al.* (2001). Rearrangements of the betaglobin gene cluster in apparently typical beta S haplotypes. *Haematologica*; 86(2): 142-5.

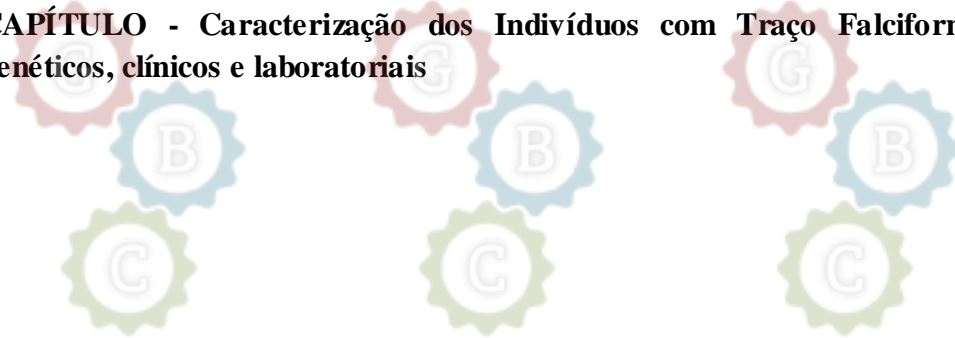
Zago MA, Pinto ACS. (2007). Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 207-214.





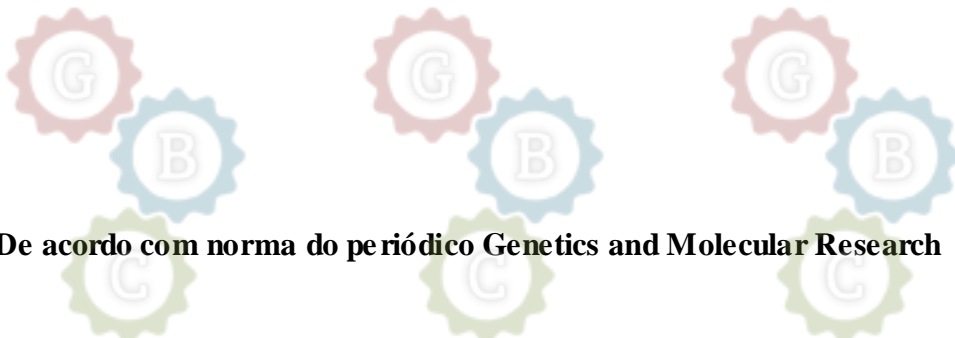
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**6 CAPÍTULO - Caracterização dos Indivíduos com Traço Falciforme: aspectos genéticos, clínicos e laboratoriais**



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**\* De acordo com norma do periódico Genetics and Molecular Research**



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

## Caracterização dos Indivíduos com Traço Falciforme: aspectos genéticos, clínicos e laboratoriais

L. X. Souza<sup>1\*</sup>, J.S. Oliveira<sup>2</sup>, J.C. Silva Junior<sup>2</sup>, A.A.L. Barbosa<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Departamento de Ciências Biológicas - Programa de Pós-Graduação em Genética Biodiversidade e Conservação, Jequié, Bahia, Brasil, CEP 45208-091.

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Departamento de Ciências Biológicas, Jequié, Bahia, Brasil, CEP 45208-091.

**\*Correspondente:** Ludmila Xavier Souza

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação - Rua José Moreira Sobrinho, s/n, Bairro Jequezinho, Jequié, Bahia, Brasil, CEP 45208-091.

Telefone: +5573 3528-9744

E-mail: mxsalmeida@yahoo.com.br

**Título resumido: Traço Falciforme: aspectos genéticos, clínicos e laboratoriais.**

## RESUMO

A anemia falciforme é uma doença hereditária, que se expressa por homozigose do alelo S da hemoglobina, enquanto a heterozigose (AS) constitui uma condição relativamente comum e segundo a literatura clinicamente benigna, raramente apresenta manifestações clínicas ou hematológicas significantes. O alelo S apresenta haplótipos polimórficos classificados segundo sua distribuição geográfica na África como: Bantu, Benin, Senegal, Camarão e Asiático. Pesquisas demonstraram que existe uma associação entre o tipo de haplótipo e as manifestações clínicas variáveis. Desse modo, essa pesquisa objetivou analisar se as manifestações clínicas e achados laboratoriais nos indivíduos AS podem estar relacionadas com os haplótipos do alelo S. A amostra foi composta de trinta e um indivíduos heterozigotos de ambos os sexos com predominância do sexo feminino e adultos jovens originários principalmente da microrregião de Jequié. Os haplótipos típicos encontrados nesses estudos foram Bantu e Benin em proporções semelhantes que reforça a distribuição geográfica dos negros na Bahia. Foi encontrado também haplótipos atípicos na amostra, sendo a maioria provavelmente, originários do haplótipo Bantu ou Benin. Entre os diferentes haplótipos encontrados para as queixas clínicas e parâmetros hematológico nos heterozigotos. Obteve-se alterações hematológicas sugerindo quadro de anemia microcítica e hipocrômica, porém não foi identificada co-existência de anemia ferropriva nem de talassemia. Com relação ao exame clínico, os indivíduos heterozigotos apresentaram dores, principalmente nos membros superiores e inferiores, e nas articulações como queixas mais frequentes. Com isso concluiu-se que ao contrário do que é dito na literatura, esses indivíduos heterozigotos quando comparados aos normais apresentaram parâmetros alterados relacionados com o quadro de anemia, além de possuírem maior probabilidade de desenvolver essas alterações quando comparados com grupo controle.

**Palavras-chave:** Anemia falciforme. Heterozigoto AS. Haplótipos  $\beta^S$ .

## ABSTRACT

Sickle cell anemia is an inherited disease, which is expressed by homozygous allele S hemoglobin, while heterozygosity (AS) is a relatively common condition and according to clinically benign literature rarely presents clinical or hematologic manifestations significant. The S allele has polymorphic haplotypes classified according to their geographical distribution in Africa as Bantu, Benin, Senegal, Cameroon and Asia. Research has shown that there is an association between the type of haplotype and clinical manifestations. Thus, this study aimed to analyze the clinical manifestations and laboratory findings in AS individuals may be related to the haplotype allele S. The sample was composed of thirty-one heterozygous individuals of both sexes with a predominance of females and young adults originating especially the micro-region of Jequié. Typical haplotypes found in these studies were Bantu and Benin in similar proportions reinforces the geographical distribution of blacks in Bahia. It was also found atypical haplotype in the sample, most likely originating in haplotype Bantu or Benin. Among the different haplotypes found for the clinical signs and hematological parameters in heterozygotes. Obtained haematological abnormalities suggesting framework of microcytic and hypochromic anemia, but was not identified co-existence of iron deficiency anemia or thalassemia. Regarding the clinical examination, the heterozygous individuals had pain, especially in the upper and lower limbs and joints as the most frequent complaints. It was concluded that contrary to what is said in the literature, these heterozygous individuals compared to normal had changed parameters related to anemia, in addition to possessing more likely to develop these changes compared to the control group.

**Key words:** Sickle cell disease. Heterozygous (AS). Haplotypes  $\beta^S$ .



## INTRODUÇÃO

A Anemia Falciforme tem grande impacto na vida e na saúde de várias pessoas pelo mundo. As pesquisas estimam o surgimento da mutação há aproximadamente 50 mil a 100 mil anos, nos países do centro-oeste africano, da Índia e do leste da Ásia, nos períodos paleolítico e mesolítico (NAOUM; DOMINGO, 1997; VOGEL; MOTULSKY, 2000). É a doença hematológica mais comum no mundo e a mais prevalente na população brasileira, principalmente em regiões do norte e nordeste do país, sendo classificada como uma hemoglobinopatia caracterizada por alteração nos alelos das globinas provocando defeitos da síntese da hemoglobina o que provoca um quadro de anemia hemolítica (BRASIL, 2002; SILVA *et al.*, 1993; NAOUM, 2000).

Segundo a literatura, o traço falciforme raramente está associado a manifestações clínicas ou hematológicas significantes. Apesar dos indivíduos heterozigotos não apresentarem, normalmente, evidentes manifestações clínicas, existem relatos de complicações clínicas e até mesmo de morte súbita em portadores expostos a condições de baixa tensão de oxigênio, que podem levar à falcização das hemácias (ZAGO *et al.*, 2001, TOMÉ-ALVES *et al.*, 2000).

Embora todo o paciente com anemia falciforme apresente mutação no mesmo alelo, existe uma diversidade relativa em relação à severidade das manifestações clínicas. Vários fatores modificantes vêm sendo estudados com o intuito de definir o porquê dessa diversidade. Os mais importantes são: os níveis de Hemoglobina Fetal (HbF), a coexistência de outras hemoglobinopatias hereditárias (ex: talassemias) e finalmente, os diferentes haplótipos para a HbS (POWARS, 1991).

Foram identificados e descritos cinco haplótipos, sendo eles associados com diferentes grupos étnicos e comumente designados de acordo com a área geográfica onde foram primeiramente identificados: Benin (África Ocidental), Bantu ou Republica Centro Africana - CAR (África Oriental Centro-Sul), Senegal (África Atlântico Ocidental), Asiático (Índia e Península Arábica Oriental) e, um com menos frequência, Camarões - CAM, (restrito a África e ao grupo étnico Eton na Costa Ocidental Africana) (PAGNIER *et al.*, 1984; NAGEL, 1984; SUTTON *et al.*, 1989). No Brasil, os haplótipos mais frequentes encontrados foram Bantu (77%), Benin (30%) e Senegal (3%) (PANTE-DE-SOUSA *et al.*, 1998; ZAGO *et al.*, 2000).

O estudo dos haplótipos  $\beta^S$  pode ser utilizado com diferentes objetivos, para determinar da origem da mutação, para definir o caminho do fluxo do alelo mutante – útil no estudo da

origem e evolução. Importante também na evolução clínica dos pacientes com Anemia Falciforme, já que o tipo de haplótipo associado ao alelo S está relacionado a um quadro clínico e níveis de HbF (Hemoglobina Fetal) variados (NAGEL, 1984). Foi observado que o surgimento e intensidade das complicações são diferentes entre os haplótipos, sugerindo melhor prognóstico para os portadores dos haplótipos Senegal e Árabe-indiano, e pior evolução clínica para os portadores dos haplótipos Bantu e Benin (POWARS, 1991).

A distribuição do alelo  $\beta^S$  no Brasil é bastante heterogênea, dependendo de composição étnica da população. A prevalência de heterozigotos para a HbS é maior nas regiões norte e nordeste (6% a 10%), enquanto nas regiões sul e sudeste a prevalência é menor (2% a 3%) (CANÇADO; JESUS, 2007). Isso se deve a maior influência da etnia negra na constituição de sua população na região norte e nordeste.

O traço falciforme é encontrado em frequências que variam de 6,9% a 15,4% dos indivíduos de ascendência africana (GONÇALVES *et al.*, 2003). No estado da Bahia, em populações do Recôncavo Baiano, os heterozigotos apresentam prevalência de 10,5%, enquanto os homozigotos representam 1,24% (SILVA *et al.*, 2006). Já na cidade de Salvador, a prevalência estimada do traço falciforme foi de 9,8%, enquanto da anemia falciforme foi de 0,2% (ADORNO *et al.*, 2005). Segundo Barboza (2013), foram identificados, no período de 2011 e 2012 no município de Jequié, 223 indivíduos heterozigotos (AS), 101 indivíduos heterozigotos (AC) e dois indivíduos duplos heterozigotos (SC). A frequência média nesse período para o traço falciforme foi de 6,45%.

O fato da HbA estar presente em uma maior porcentagem justifica os portadores do traço falciforme serem geralmente assintomáticos, não apresentarem nenhuma anormalidade física e sua expectativa de vida ser semelhante ao da população geral. Por outro lado, há na literatura relatos de condições anormais ou situações de risco, associadas ao traço falciforme, apesar de nem sempre ser evidente uma relação de causa e efeito. Diante disso surge um questionamento, os indivíduos heterozigotos podem apresentar os sinais clínicos da doença?

Com isso, o presente trabalho se propôs a caracterizar os haplótipos da anemia falciforme em amostra de indivíduos heterozigotos da doença, dos municípios de Jequié e de Jiquiriçá, e correlacionar com as manifestações clínicas e achados laboratoriais.

## MATERIAL E METODOS

### Caracterização do Local de Estudo

O município de Jequié está localizado no Sudoeste da Bahia, a 365 Km de Salvador, capital do estado. Está a 216 metros acima do nível do mar, nos limites entre a caatinga e a zona da mata. A população do município estimada em 2015, segundo dados do IBGE, era de 161.528 habitantes.

O município de Jiquiriçá está localizado na mesorregião Sudoeste do Estado, na Microrregião Homogênea 024 – Jequié. Sua população estimada em 2015, segundo dados do IBGE, era de 15.033 habitantes.

Esses dois municípios estão inclusos na microrregião de Jequié, que é uma das microrregiões do estado da Bahia pertencente à mesorregião Centro-Sul Baiano, possui uma área total de 17.396,126 km<sup>2</sup> e está dividida em 26 municípios.

### Caracterização da Amostra

A amostra foi constituída por 31 indivíduos heterozigotos com diagnóstico prévio do traço falciforme (AS), do município de Jequié e de Jiquiriçá, localizados através de uma busca ativa. A idade dos participantes variou entre 1 e 79 anos de idade, consistindo em 21 do gênero feminino e 10 do gênero masculino.

A amostra controle foi obtida no banco de dados do laboratório onde foram realizados os exames hematológicos e bioquímicos dessa pesquisa. Foram selecionados os resultados de pacientes com eletroforese de hemoglobina normal (AA), respeitando a faixa etária dos heterozigotos.

### Aspectos Éticos

A coleta e análise das amostras de sangue seguiram as normas da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e a pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UESB (número de protocolo 090226/2014, CAAE 37152514.4.0000.0055). A coleta de informações socioeconômicas e do material biológico ocorreu seguindo rigorosamente os preceitos de conscientização e autorização dos

participantes, aquiescência voluntária e garantia de anonimato. Todos os participantes após esclarecimentos sobre a pesquisa e procedimentos, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ou Termo de Assentimento.

### **Análise Clínica**

A Análise clínica foi composta por exame clínico detalhado e análise demográfica e socioeconômica de todos os participantes. Para o exame clínico realizado no município de Jequié contamos com o apoio de um médico que faz parte do grupo de pesquisa, e no município de Jiquiriçá contamos com o apoio dos médicos da USF onde foi realizada a coleta do material biológico. Para o levantamento dos dados demográficos e socioeconômicos utilizamos um questionário.

### **Análise Laboratorial**

#### **- Extração do DNA**

O DNA foi extraído a partir do sangue total coletado com EDTA conforme o protocolo do Kit para extração de DNA da Qiagen (QIAamp DNA Mini Kits). A extração foi realizada no Laboratório de Genética Humana da UESB e o DNA extraído armazenado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **-Determinação dos Haplótipos da Globina $\beta^S$**

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, seguida de análise de restrição (RFLP).

O DNA de cada indivíduo foi amplificado em seis reações de PCR independentes, cada uma, com um par de *primers* (H0/H1, H2/H3, H3/H4, H5/H6, H7/H8 e H9/H10), amplificando as sequências contendo os sítios polimórficos de interesse no alelo da globina  $\beta^S$  ( $5'\gamma\text{G}$ ,  $\gamma\text{G}$ ,  $\gamma\text{A}$ ,  $3'\psi\beta$ ,  $\psi\beta$ ,  $5'\beta$ ) (SUTTON *et al.*, 1989).

A composição das reações e as condições de amplificação variaram, dependendo da região a ser amplificada segundo Sutton *et al.* (1989).

Para identificação haplotípica, as amostras foram submetidas a PCR/RFLP utilizando quatro endonucleases de restrição BioLabs/Invitrogen (*XmnI*, *Hind III*, *HincII*, *Hinf I*). Os

produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 1% para confirmação da amplificação. Os produtos oriundos das reações de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3% de concentração para identificação dos padrões de restrição.

Para identificação dos haplótipos cada amostra foi identificada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição na análise dos seis sítios polimórficos. Como sequências padrões foram utilizadas: Bantu ou CAR [- + - - -], Benin [- - - - +], Senegal [+ + - + +], Camarões [- + + - +] e Asiático [+ + - + +]. Estes haplótipos foram considerados como padrão, qualquer combinação diferente da presença e/ou ausência destes sítios foi classificada como haplótipo atípico, seguindo a convenção estabelecida em ZAGO *et al.* (2000). Os haplótipos atípicos observados no presente estudo foram agrupados em seis diferentes padrões. A análise da origem desses haplótipos foi realizada pelo ganho ou a perda de um sítio de restrição único, como resultado de mutações pontuais, sendo comparado o padrão de genotipagem dos haplótipo atípicos com os típicos, observando qual padrão mais se aproxima, ou seja, com diferença em apenas um sítio de restrição.

### **Análises Bioquímicas e Hematológicas**

Os exames laboratoriais foram terceirizados para um laboratório de Análises Clínicas do município onde foram realizados os seguintes exames: Hemácia (Hm), Hemoglobina (Hb), Hematócrito (Ht), Volume corpuscular médio (VCM), Hemoglobina corpuscular média (HCM), Reticulócitos (RET), ácido úrico (AUR), uréia (URE), creatinina (CRE), Transaminase glutâmico oxalacética (TGO), Transaminase glutâmico pirúvica (TGP), Gamaglutamiltransferase (GGT), Bilirrubinas total e frações (BIL), proteínas totais e frações (PTF), fosfatase alcalina (FAL), desidrogenase láctica (LDH), ferritina (FET), ferro (FE), transferrina (TRANS) e eletroforese de hemoglobina.

Os parâmetros hematológicos (Hm, Hb, Ht, VCM e HCM) foram categorizados como normal ou alterado, considerando os valores de referência para o sexo e a idade de cada indivíduo. Visando comparar as concentrações dos diferentes subtipos de hemoglobina entre os indivíduos com Doença Falciforme, foi realizada nova categorização, estratificando-os de acordo com a presença ou ausência de alterações indicativas de anemia nos parâmetros hematológicos.

## Análises Estatísticas

Os dados categorizados são apresentados como frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis contínuas como média±desvio padrão.

Os testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher foi usado para comparar: 1) as proporções das alterações em diferentes parâmetros hematológicos categorizados entre a amostra controle (indivíduos AA) e heterozigotos, bem como entre indivíduos com diferentes haplótipos  $\beta^S$  (Bantu vs Benin vs Atípico; Bantu vs Benin); 2) as proporções de sintomas clínicos (dor, fadiga, queixas de problemas cardíacos, pulmonares, hepáticos ou renais, Histórico familiar de Anemia Falciforme) entre os indivíduos com diferentes haplótipos  $\beta^S$  (Bantu vs Benin vs Atípico; Bantu vs Benin). O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparar a concentração dos subtipos de hemoglobina (HbA1, HbA2, HbS, HbF) entre os indivíduos heterozigotos, visando excluir a possibilidade de co-existência de talassemia.

As variáveis que apresentaram associação significativa foram submetidas a análise de regressão logística, no caso de variável dependente (i.e., de resposta ou desfecho estudado, como “controle vs heterozigoto” ou “Bantu vs Benin”) dicotomizada, ou regressão multinomial, no caso de variável dependente com mais de dois níveis (i.e., variável dependente com mais de dois estratos, como “Bantu vs Benin vs Atípico”), visando a obtenção dos odds ratio (OD) com seus respectivos intervalos de confiança 95% (IC95%). As análises de regressão foram ajustadas por variáveis intervenientes quando necessário. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados no programa estatístico *Statistical Package for social Sciences* (SPSS 21.0), sendo o nível de significância adotado de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

Os resultados sociodemográficos dos indivíduos heterozigotos estão apresentados em anexo. Observou-se que a faixa etária situou-se entre 1 e 79 anos, sendo a idade média de  $32,54 \pm 19,12$  anos, e 67,74% dos participantes são do sexo feminino e 32,26% masculino. A classificação da faixa etária mostrou que 21 (67,74%) dos indivíduos tinham idades de 25 a 55 anos, oito indivíduos apresentaram idade inferior a 15 anos (25,80%) e dois indivíduos apresentaram idade superior a 70 anos (6,45%).

A cor da pele autodeclarada pelos adultos foi 56,52% negra e 43,48% parda, sugerindo que a maioria dos participantes adultos possuem ancestralidade africana. Os dados sobre a escolaridade apontam que 32,25% de indivíduos adultos não concluíram o ensino médio, destes três não são nem alfabetizados, sendo esses últimos os que têm idade mais avançada. A informação sobre o local de nascimento mostra que 77,41% nasceram na microrregião de Jequié e 100% são do estado Bahia.

Com relação à frequência dos haplótipos estudados, observou-se quantidades semelhantes de indivíduos com haplótipo Bantu e Benin (22,6%) e um percentual de 54,8% (17 indivíduos) foi classificado como haplótipo atípico, sendo identificados cinco tipos diferentes desses variantes. Analisando a possível origem dos haplótipos atípicos, observou-se que todos estão relacionados ao haplótipo típico Bantu ou Benin.

Analisando os resultados hematológicos, obteve-se na amostra estudada cinco indivíduos (16,1%) com Hb abaixo do valor de referência e Ht baixo, oito (25,8%) apresentaram VCM baixo e sete (22,6%) HCM baixo, quadro sugestivo de anemia microcítica e hipocrômica. A partir dos dados do hemograma, realizamos uma análise comparativa entre o grupo controle (AA) e os indivíduos heterozigotos (tabela 1).

Quanto aos parâmetros hematológicos categorizados foi possível identificar uma proporção significativamente maior ( $p < 0,05$ ) de parâmetros VCM e HCM alterados entre os indivíduos heterozigotos. Os demais parâmetros analisados não apresentaram associação significativa.

Por não haver ocorrência de alteração no parâmetro VCM entre os indivíduos controle, o que inviabiliza a obtenção da OD, foi aplicada a regressão logística com os dados contínuos do referido parâmetro, bem como do HCM, e ajustes pela idade e sexo. A análise da regressão logística ajustada por sexo e idade indicou que um incremento em uma unidade do parâmetro VCM reduz em 25% da probabilidade de um indivíduo ter doença falciforme ( $OD = 0,75$ ;

IC95% = 0,65 – 0,87;  $p < 0,05$ ). Quanto ao parâmetro HCM que um incremento em uma unidade deste parâmetro reduz em 57% da probabilidade de um indivíduo ter doença falciforme (OD = 0,75; IC95% = 0,29 – 0,65;  $p < 0,05$ ).

**Tabela 1** - Caracterização dos parâmetros hematológicos categorizados entre indivíduos controle e heterozigotos.

Parâmetros Hematológicos		Controle (n = 42)	Heterozigotos (n = 31)
<b>Hemácias</b>	NORMAL	42 (100%)	31 (100%)
	ALTERADO	0 (0%)	0(0%)
<b>Hemoglobina</b>	NORMAL	38 (90,5%)	26 (83,9%)
	ALTERADO	4 (9,5%)	5 (16,1%)
<b>Hematócrito</b>	NORMAL	40 (95,2%)	26 (83,9%)
	ALTERADO	2 (4,8%)	5 (16,1%)
<b>VCM*</b>	NORMAL	39 (92,9%)	23 (74,2%)
	ALTERADO	3 (7,1%)	8 (25,8%)
<b>HCM*</b>	NORMAL	42 (100%)	24 (77,4%)
	ALTERADO	0(0%)	7 (22,6%)

VCM = volume corpuscular médio; HCM Hemoglobina corpuscular média; (\*) Diferença significativa na proporção entre os grupos estudados ( $p < 0,05$ ).

A partir dos resultados das dosagens bioquímicas, não observamos nenhum dado significativo relacionado com as alterações da anemia falciforme.

A tabela 2 apresenta a distribuição dos parâmetros hematológicos categorizados entre indivíduos com diferentes haplótipos  $\beta^S$  (Bantu vs Benin vs Atípico). Não foi observada associação significativa entre os diferentes haplótipos, tanto nas comparações “Bantu vs Benin vs Atípico”, quanto “Bantu vs Benin”, para os parâmetros hematológicos.



**Tabela 2** - Caracterização dos parâmetros hematológicos categorizados entre indivíduos com diferentes haplótipos (Bantu vs Benin vs Atípico) da doença falciforme.

<b>Parâmetros Hematológicos</b>	<b>Bantu (n = 7)</b>	<b>Benin (n = 7)</b>	<b>Atípico (n = 17)</b>	
<b>Hemácias</b>	NORMAL	7 (100%)	7(100%)	17(100%)
	ALTERADO	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Hemoglobina</b>	NORMAL	6(85,7%)	7(100%)	13(76,5%)
	ALTERADO	1(14,3%)	0 (0%)	4(23,5%)
<b>Hematócrito</b>	NORMAL	6(85,7%)	6(85,7%)	14(82,3%)
	ALTERADO	1(14,3%)	1(14,3%)	3(17,7%)
<b>VCM</b>	NORMAL	5(71,4%)	4(57,1%)	14(82,3%)
	ALTERADO	2(28,6%)	3(42,9%)	3(17,7%)
<b>HCM</b>	NORMAL	5(71,4%)	5(71,4%)	14(82,3%)
	ALTERADO	2(28,6%)	2(28,6%)	3(17,7%)

VCM = volume corpuscular médio; HCM Hemoglobina corpuscular média.

Analisando o quadro clínico e as queixas mais frequentes observou-se que 70% dos participantes relataram dores, principalmente nos membros superiores e inferiores, e nas articulações. Além disso, 29,03% queixaram-se de fadiga e 25,81% relataram um quadro de anemia. Mais da metade (54,84%) têm histórico familiar de anemia falciforme (pais, irmãos ou filhos).

A distribuição dos sinais clínicos e do histórico familiar de anemia falciforme entre indivíduos com diferentes haplótipos  $\beta^S$  (Bantu vs Benin vs Atípico) é apresentada na tabela 3, não sendo observada associação significativa entre os diferentes haplótipos, tanto nas comparações “Bantu vs Benin vs Atípico”, quanto “Bantu vs Benin”.



**Tabela 3.** Caracterização dos sinais clínicos e do histórico familiar de anemia falciforme entre indivíduos com diferentes haplótipos  $\beta^S$  (Bantu vs Benin vs Atípico).

Sinais clínicos/HAF		Bantu (n = 7)	Benin (n = 7)	Atípico (n = 17)
<b>Dor</b>	NÃO	3 (42,9%)	3 (42,9%)	3 (17,6%)
	SIM	4 (57,1%)	4 (57,1%)	14 (82,4%)
<b>Fadiga</b>	NÃO	6(85,7%)	5(71,4%)	11(64,7%)
	SIM	1(14,3%)	2(28,6%)	6(35,3%)
<b>Problema Neurológico</b>	NÃO	6(85,7%)	7(100%)	13(76,5%)
	SIM	1(14,3%)	0(0%)	4(23,5%)
<b>Problema Cardíaco</b>	NÃO	6(85,7%)	7(100%)	16(94,1%)
	SIM	1(14,3%)	0(0%)	1(5,9%)
<b>Problema Pulmonar</b>	NÃO	5(71,4%)	7(100%)	16(94,1%)
	SIM	2(28,6%)	0(0%)	1(94,1%)
<b>Problema Hepático</b>	NÃO	6(85,7%)	7(100%)	17(100%)
	SIM	1(14,3%)	0(0%)	0(0%)
<b>Problema Renal</b>	NÃO	7(100%)	7(100%)	17(100%)
	SIM	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Anemia</b>	NÃO	4(57,1%)	7(100%)	12(70,6%)
	SIM	3(42,9%)	0(0%)	5(29,4%)
<b>HAF</b>	NÃO	3(42,9%)	3(42,9%)	8(47,1%)
	SIM	4(57,1%)	4(57,1%)	9(52,9%)

HAF = Histórico familiar de anemia falciforme

## DISCUSSÃO

Os achados obtidos neste trabalho que analisou os haplótipos da anemia falciforme em indivíduos heterozigotos representam a primeira análise da anemia falciforme em indivíduos heterozigotos nos municípios de Jequié e Jiquiriçá. A população estudada foi composta por indivíduos de ambos os sexos com predominância do sexo feminino e adultos jovens originários principalmente da microrregião de Jequié. Com relação à etnia, todos os participantes adultos desse estudo apresentam ancestralidade negra, dado que corrobora os achados da literatura e dos dados históricos da Bahia.

Os haplótipos típicos encontrados nesses estudos foram Bantu e Benin, ambos com proporções iguais (22,6%). A análise dos haplótipos no estado da Bahia em outros estudos tem relatado prevalências conflitantes entre o haplótipo Bantu (COSTA *et al.*, 1984) e o haplótipo Benin (QUEIROZ, 1996; ADORNO *et al.*, 2004; SILVA; GIOVELLI, 2010), embora outros estudos tenham mostrado prevalência no haplótipo Bantu (GONÇALVES *et al.*, 2003; ADORNO *et al.*, 2008). Entretanto, as frequências para os haplótipos Bantu e Benin são muito similares na maioria desses estudos, semelhante ao da presente pesquisa, o que se justifica pelos dados referentes à imigração de negros da Baía de Benin e Baía de Biafra (VERGER, 1968).

Além disso, foi constatado que 54,8% da amostra apresentaram haplótipos atípicos, dos quais 88,2% provavelmente são originários do haplótipo Bantu ou Benin, e apenas dois (6,45%) tiveram como provável origem o haplótipo Camarão ou o Bantu, o que reforça a distribuição geográfica dos negros na Bahia (VERGER, 1968). De acordo com Nascimento (2014) que investigou os haplótipos  $\beta^S$  em indivíduos homozigotos (SS) na mesma região de Jequié e obteve resultado semelhante (54,8%) para os haplótipos atípicos. Segundo Zago *et al.* (2000) esses atípicos são produzidos por diversos mecanismos genéticos, sendo a recombinação entre dois haplótipos  $\beta^S$  típicos o mais comum. O aparecimento de haplótipos atípicos por recombinação entre os típicos provavelmente ocorre devido alto grau de miscigenação (BORTOLINI; SALZANO, 1999).

Um exemplo marcador da heterogeneidade fenotípica da anemia falciforme é a influência dos haplótipos da  $\beta^S$  globina no quadro clínico (POWARS; HITTI, 1993; SILVA; GONÇALVES, 2009).

Alguns trabalhos realizados com homocigotos (SS) no Brasil encontraram correlação entre as manifestações clínicas da Anemia Falciforme, Hemoglobina Fetal (HbF) e o haplótipo do alelo da globina beta-S, incluindo mais crises vaso-oclusivas e mais infecções no haplótipo Bantu (FIGUEIREDO *et al.*, 1996; ADORNO *et al.*, 2004; LYRA *et al.*, 2005; SILVA FILHO *et al.*, 2012).

Outros estudos com indivíduos SS também destacam a associação do haplótipo Bantu com maior incidência de complicações clínicas do que o haplótipo Benin (NAGEL, 1984; POWARS, 1991; STEINBERG, 2001; GONÇALVES *et al.*, 2003; ADORNO *et al.*, 2008), porém nessa pesquisa não foi encontrada associação significativa entre os diferentes haplótipos encontrados para as queixas clínicas e parâmetros hematológicos.

Com relação aos resultados hematológicos dos heterocigotos, obteve-se alterações nos valores de VCM e HCM com proporção significativamente maior em relação ao grupo controle, sugerindo quadro de anemia microcítica e hipocrômica. Dado que corrobora com o relato de oito (25,81%) participantes quanto a presença de quadro anêmico.

Alguns autores relatam que tanto a morfologia eritrocitária quanto os índices eritrocitários no traço falciforme são normais (CORRONS, 1994; MCKENZIE, 1996; RODAK, 1995), porém, outros ressaltam que pode haver, em alguns casos, a redução do VCM e do HCM, por este motivo, o diagnóstico diferencial do traço falciforme deve considerar outras causas de microcitose, tais como anemia ferropriva e talassemia (BAIN, 1997).

Dentre as duas mais frequentes causas congênitas ou adquiridas de anemias microcíticas (VCM baixo), estão a anemia ferropriva e a talassemia (GREEN; KING, 1989). A anemia ferropriva, anemia por deficiência de ferro, além de Hb, Ht, VCM e HCM baixos, apresenta dosagens de ferro sérico e ferritina sempre baixos (LORENZI, 2011). Na amostra estudada nessa pesquisa não foram observados resultados baixos de ferro e ferritina nos indivíduos com sugestivo quadro de anemia, afastando assim a anemia ferropriva como provável causa da microcitose e hipocromia encontrados.

Segundo Lorenzi (2011), os pacientes com HbAS que tem microcitose e que não tem deficiência de ferro, muito provavelmente têm também estigma talassêmico. Talassemia é uma hemoglobinopatia caracterizada por uma redução ou ausência na produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas que formam o tetrâmero de hemoglobina (THEIN, 2005). O hemograma na talassemia, além de microcitose e hipocromia, apresenta anisocitose e poiquilocitose (formas e tamanhos variados das hemácias). Essas alterações não foram

encontradas nos hemogramas analisados dos heterozigotos. Na eletroforese de hemoglobina com co-existência de talassemia é encontrada uma diminuição da HbA1 e aumento variável de HbA2 e HbF (LORENZI, 2011). O diagnóstico de talassemia associada a hemoglobina S é sugerido por uma elevada HbA2 e um VCM baixo (FRENETTE; ATWEH, 2007).

A comparação das concentrações dos subtipos de hemoglobina entre os indivíduos heterozigotos com (n = 8) e sem (n=23) alterações hematológicas características de anemia indicou concentrações significativamente maiores de HbA1 ( $61.2 \pm 4.4\%$  vs  $58.7 \pm 1.9\%$ ;  $p < 0.05$ ) e menores de HbA2 ( $3.8 \pm 0.3\%$  vs  $3.3 \pm 0.4\%$ ;  $p < 0.05$ ) nos indivíduos com diagnóstico laboratorial de anemia. Não foi observada diferença significativa para concentração de HbF ( $0.45 \pm 0.16\%$  vs  $0.56 \pm 0.43\%$ ; anêmicos vs não anêmicos;  $p > 0.05$ ) e de HbS ( $34.5 \pm 4.2\%$  vs  $32.5 \pm 13.0\%$ ; anêmicos vs não anêmicos;  $p > 0.05$ ). De acordo com esses resultados, é possível afastar a co-existência da talassemia nos indivíduos heterozigotos com quadro laboratorial de anemia microcítica e hipocrômica.

Um estudo realizado com indivíduos AS, com objetivo de verificar a presença de talassemia alfa nos heterozigotos, apresentou resultados alterados (microcitose e hipocromia) consideráveis, não esperados para os heterozigotos. Porém os autores não consideraram relevantes esses resultados (TOMÉ-ALVES *et al.*, 2000).

Através da análise de regressão logística com os índices hematemétricos (VCM e HCM), foi possível observar que existe uma relação inversa desses índices e a probabilidade de ter doença falciforme, identificando assim a razão de chance de ter essa patologia, ou seja, quanto menor o valor do VCM e HCM, maior a chance de ter a doença falciforme.

Com relação ao exame clínico, foi observado que os indivíduos heterozigotos apresentaram dores, principalmente nos membros superiores e inferiores, e nas articulações como queixas mais frequentes. Os exames físicos e clínicos não identificaram outras patologias. Conforme a literatura, a anemia e as crises dolorosas recorrentes devido processo de vaso-oclusão são as principais manifestações clínicas na anemia falciforme (MOORE *et al.*, 1996).

Segundo Pimentel *et al.* (2013), portadores de traço falciforme, em geral, não tem doença, mas produzem parte da hemoglobina sob a forma HbS. Segundo Lorenzi (2011), nos casos de forma heterozigótica da anemia falciforme, o sangue pode ser normal ou pouco alterado.

Uma das hipóteses para justificar as alterações encontradas nos heterozigotos está relacionada ao equilíbrio entre a produção e a destruição dos eritrócitos que mantém os

valores normais da hemoglobina, em indivíduos com HbS. Este equilíbrio pode ser rompido em várias situações, como por hemólises e falcização dos eritrócitos (MOTA, 2009; ÂNGULO, 2003).

Estudos desenvolvidos observaram que a presença do alelo HbS no genótipo é suficiente para produzir a metahemoglobina através do processo de desoxigenação, levando a alterações na membrana plasmática e estruturais podendo causar hemólise e anemia (SOUZA, 1999; NAOUM, 2000).

Outra hipótese que pode explicar essas alterações nos heterozigotos é a heterogeneidade genética que contribui de forma significativa para o fenótipo e explica parcialmente as diferenças interindividuais marcantes na gravidade da doença (NAGEL, 2005).

Dessa forma, podemos observar que na literatura atual, ainda não ficou evidenciado a associação de manifestações clínicas nos indivíduos heterozigotos para anemia falciforme, contudo os resultados encontrados nesse estudo apontam o contrário, o que nos leva a indicar a continuidade das investigações com os indivíduos heterozigotos para anemia falciforme para aumentarmos os conhecimentos a respeito de quais os sintomas e em que condições esses se manifestam nos indivíduos heterozigotos.



## CONCLUSÃO

Este estudo caracterizou os haplótipos  $\beta^S$  em indivíduos heterozigotos, relacionando-os com as manifestações clínicas e achados laboratoriais. Verificamos que o haplótipos Bantu e Benin possuem frequências similares na amostra estudada, os haplótipos atípicos foram identificados em mais da metade da amostra, sendo esses, em sua maioria, originários provavelmente dos haplótipos Bantu ou Benin. No que se refere a correlação dos achados bioquímicos não encontramos diferenças significativas quando comparamos com a amostra controle e pacientes. Contudo encontramos resultados hematológicos significativos para o quadro de anemia nos indivíduos heterozigotos, na análise de regressão logística observamos que esses possuem maior probabilidade de desenvolver essas alterações.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

## REFERÊNCIAS

Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Souza CC, Santos LF, Menezes JF, *et al.* (2004). The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. *Hemoglobin*. 28(3):267-71.

Adorno EV, Couto, FD. *et al.* (2005). Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Caderno Saúde Pública*, vol. 21, no. 1, p. 292-8.

Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Seixas MO, Reis MG, Gonçalves MS.(2008). Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 31:621-5.

Ângulo I DE L.(2003). Crises falciformes. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 36, p. 427-430.

Bain BJ. (1997). *Células sanguíneas: Um guia prático*. 2º ed. Porto Alegre, Artes Médicas. 334 p.

Barboza VP. (2013). *Triagem Neonatal de Hemoglobinopatias e associação de marcadores genéticos e culturais*. Monografia de graduação em Ciências Biológicas, UESB. p. 54.

Bortolini MC, Salzano FM. (1999). Beta S haplotype diversity in Afro-americans, Africans and Euro-Asiatics – An attempt at a synthesis. *Ciência e Cultura*. 51:175-180.

Brasil. (2002) Ministério da Saúde. *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciforme* (Portaria MS nº 822). Brasília, ANVISA, 1. ed. 142p.

Cançado RD, Jesus JA. (2007). A doença falciforme no Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, vol.29, no. 3, p. 204-6.

Corrons JLV. (1994). *Introducción al estudio de la patología retroatario*. Bases bioquímicas y fisiológicas. In: J. Sans – *Sabrafen/Hematología Clínica*, 3º ed., Madrid, España: Mosby – Doyma S.A, p.119.



Costa FF, Arruda VR, Gonçalves MS, Miranda SRP, Carvalho MH, Sonati MF *et al.* (1984).  $\beta^S$  - gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from two regions of Brazil. *American Journal of Hematology*. v 46, p 96-97.

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

Frenette PS, Atweh GF. (2007). Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *Journal of Clinical Investigation*, 117: 850–858.

Gonçalves MS, Bonfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I *et al.*(2003). Beta S-Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Journal of Medical and Biological Research*, vol. 36, no. 10, p. 1283-8.

Green R, King R. (1989). A new red cell discriminant incorporating volume dispersion for differentiating iron deficiency anemia from thalassemia minor. *Blood Cells*, v.15, p.481-495.

Lorenzi TF. (2011). *Manual de Hematologia - Propedêutica e Clínica*. Editora Guanabara Koogan, 4ed, p. 50-300.

Lyra IM, Gonçalves MS, Pellegrinei JA, Gesteira M, Carvalho MH, Olalla ST *et al.* (2005). Clinical, haematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Caderno de Saúde Pública*; 21:1287-90.

Mckenzie SB. (1996). *Textbook of hematology*. 2º ed. Baltimore, Williams & Wilkins.733 p.

Moore CM, Ehlayel M, Leiva LE *et al.* (1996). New concepts in the immunology of sickle cell disease. *Ann Allergy Asthma Immunol*; 76(5):385-400.

Motta VT. (2009). *Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações*. Editora Medbook, 5ed, v. 9, p. 90-120.

Nagel RL. (1984). The origin of the haemoglobin S gene: Clinical, genetic, and anthropological consequences. *Einsten Q J Med*; 2:53-62.

Nagel RL. (2005). "Epistasis and the genetics of human diseases." *Comptes Rendus Biologies*; 328(7): 606-15.

Naoum PC. (1997). *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: Editora Sarvier.

Naoum PC. (2000). Prevalência e controle da hemoglobina S. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 22 (Suplemento 2), p. 142-8.

Nascimento AF. (2014). Caracterização da Ancestralidade Genômica, investigação do CCR5 e identificação dos Haplótipos em pacientes com Doença Falciforme. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, UESB Jequié-BA. pg. 66.

Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhdja O *et al.* (1984). Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81: 1771-3.

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

Pimentel MMG; Gallo CVM, Santos-Rebouças CB. (2013). *Genética Essencial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1 ed.

Powars DR. (1991). Sickle cell anemia: Beta s-gene-cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ failure. *Seminars in Hematology*; 28:202-8.

Powars D, Hitti A. (1993). Sick cell anemia Beta S gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *American Journal of Diseases of Children*, 147: 1197-1202.

Queiroz IMLP. (1996). Características clínicas, hematológicas e genéticas em pacientes homocigotos para a hemoglobinopatia S da Bahia e de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Hematologia) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

Rodak BF. (1995). *Diagnostic hematology*. Philadelphia, Saunders, 720 p.

Silva LB, Gonçalves RP. (2009). Caracterização fenotípica dos pacientes com Anemia Falciforme do gene da  $\beta^S$  globina em Fortaleza, Ceará. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. São Paulo.

Silva RBP *et al.* (1993). A anemia falciforme como problema de Saúde Pública no Brasil. *Revista de Saúde Pública*; 27(1): 54-58.

Silva WS, Lastra A *et al.* (2006). Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em população do Recôncavo Baiano, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, vol. 22, no. 12, p. 2561-2566.

Silva JEP, Giovelli LL. (2010). Traço Falciforme: Uma visão para os centros de Hemoterapia. *Revista Saúde (Santa Maria)*, vol. 36, no. 1, p.23- 28.

Silva Filho IL, Ribeiro GS, Moura PG, Vechi ML, Cavalcante AC, de Andrada-Serpa MJ. (2012). Sick cell disease: acute clinical manifestations in early childhood and molecular characteristics in a group of children in Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*; 34(3): 196-201.

Souza PC. (1999). Avaliação dos produtos de degradação oxidativa da Hb S em eritrócitos de doentes falcêmicos de acordo com o genótipo e sob concentrações diferenciadas de hemoglobinas S. Dissertação apresentada para obter o título de Mestre em Biologia. IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto – SP.

Steinberg MH. (2001). Modulation of fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Hemoglobin*; 25(2):195-211.

Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. (1989). Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of b-like globin gene cluster haplotypes. *American Journal of Hematology*; 32:66-9.

Tomé-Alves R, Marchi-Salvador DP, Orlando GM, Palharini LA, Imperial RE, Naoum PC *et al.* (2000). Hemoglobinas AS/Alfa talassemia – importância diagnóstica. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*; 22: 388-94.

Verger P. (1968). Flux ET Reflux de La Traités des Nègres entre Le Golfe de Benin et Baía de Todos os Santos. Mouton Press, Paris, 720 pp.

Vogel F, Motulsky AG. (2000). *Genética Humana: Problemas e Abordagens*. 3<sup>a</sup> edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Zago MA, Silva-Júnior WA, Dalle B, Gualandro S, Hutz MH, Lapoumeroulie C *et al.* (2000). Atypical beta-S haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *American Journal of Hematology*; 63(2):79-84.

Zago MA, Silva WA, Gualandro S *et al.*(2001). Rearrangements of the betaglobin gene cluster in apparently typical beta S haplotypes. *Haematologica*; 86(2):142-5.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos dos haplótipos realizados neste grupo de indivíduos constituem fonte pioneira de dados referentes ao diagnóstico molecular do alelo da globina  $\beta^S$  em heterozigotos no estado da Bahia. Contribui-se dessa forma com mais informações sobre a doença e a expressão do seu polimorfismo genético, para serem analisadas em conjunto com os demais dados provenientes de outras localidades e regiões do Brasil.

Além disso, nesse trabalho indica-se aparente predominância do grupo Bantu e Benin em nosso meio, o que reafirma as informações obtidas através dos documentos históricos sobre nossa origem étnica. Os dados hematológicos e bioquímicos avaliados junto ao contexto molecular da anemia falciforme serão referência para o aprofundamento do conhecimento clínico em indivíduos heterozigotos.

Com base nos resultados encontrados, considerando a sua relevância, indicamos a necessidade de aprofundar o conhecimento das questões relacionadas às queixas clínicas dos heterozigotos para anemia falciforme, contribuindo para melhor assistência médica desse grupo.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



# APÊNDICES

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

## APÊNDICE I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado (a) Senhor (a)

Eu sou Ludmila Xavier Souza, mestranda do Programa de pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) estou convidando o (a) senhor (a) para participar voluntariamente da pesquisa que vai caracterizar os indivíduos que são portadores do traço falciforme buscando analisar os aspectos genéticos, clínicos e laboratoriais. Esse estudo pode contribuir para um acompanhamento mais adequado das pessoas com traço falciforme, além de fornecer mais esclarecimentos importantes sobre essa condição sendo esse um dos benefícios dessa pesquisa. Caso o (a) senhor (a) aceite participar desta pesquisa, será necessário que forneça uma amostra de sangue para as análises laboratoriais. Para essa coleta, o único incômodo que o (a) senhor (a) poderá ter é a dor pela picada na hora da coleta de sangue, bem como pequenas manchas roxas no local da picada que possam vir a ocorrer e que não lhe causarão dano e desaparecerão após alguns dias. Sua participação nesta pesquisa é voluntária e não obrigatória, ou seja, o (a) senhor (a) tem o direito de não participar ou até de desistir de participar da pesquisa se quiser. Além disso, o (a) senhor (a) terá todas as informações que queira, antes, durante e depois da pesquisa. Garantimos também que seus dados pessoais não serão divulgados e que os resultados desta pesquisa serão publicados em revistas especializadas de forma que nenhum participante da pesquisa será identificado, permanecendo em anonimato. Os dados obtidos serão utilizados na construção de um banco de dados e arquivados por cinco anos no Laboratório de Biologia e Genética Humana da UESB. Sua participação na pesquisa não lhe trará nenhum custo e o (a) senhor (a) também não receberá nenhum valor em dinheiro por participar dela. O material coletado do (a) senhor (a) ficará armazenado no Laboratório de Genética Biologia e Genética Humana da UESB e poderá ser utilizado em pesquisas futuras (sem necessidade de coleta de nova amostra de sangue) para as quais também será garantido o anonimato e a confidencialidade dos dados pessoais. Se o (a) senhor (a) quiser ou precisar de maiores informações sobre esta pesquisa, entre em contato comigo Ludmila Xavier Souza no endereço Laboratório de Genética de Biologia e Humana, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Av. José Moreira Sobrinho, S/N, Jequié, Bahia ou pelo telefone 88311085 ou através do e-mail mxsalmeida@yahoo.com.br.

Se o senhor (a) aceita voluntariamente participar desta pesquisa, por favor, assine comigo este termo em duas vias.

Jequié-BA, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Assinatura do voluntário

Polegar Direito

Ludmila Xavier Souza

## APÊNDICE II: Termo de Assentimento

Eu sou Ludmila Xavier Souza, mestranda do Programa de pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) estou convidando você para participar voluntariamente da pesquisa que vai estudar as pessoas que são portadores do traço falciforme buscando analisar os aspectos genéticos, clínicos e laboratoriais. Esse estudo pode contribuir para um acompanhamento mais adequado das pessoas com traço falciforme, além de fornecer mais esclarecimentos importantes sobre essa condição sendo esse um dos benefícios dessa pesquisa. Caso você aceite participar desta pesquisa, será necessário que forneça uma amostra de sangue para os exames laboratoriais. Para essa coleta, o único incômodo que você poderá ter é a dor pela picada na hora da coleta de sangue, bem como pequenas manchas roxas no local da picada que possam vir a ocorrer e que não lhe causarão dano e desaparecerão após alguns dias. Para participar deste estudo, o responsável por você precisa autorizar, assinando esse termo. Você não vai precisar pagar nada para participar e também não receberá nada pela sua participação nesta pesquisa. Você pode fazer qualquer pergunta, se tiver alguma dúvida sobre sua participação, a qualquer hora, que será respondida. O responsável por você pode retirar a autorização ou não querer mais sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária, ou seja, você participa se quiser. Seu nome será mantido em segredo, ou seja, só os pesquisadores saberão e não irão contar para mais ninguém. Você não será identificado em nenhuma publicação. Sua participação nesta pesquisa não apresenta risco nenhum para você. Suas informações utilizadas na pesquisa ficarão guardadas comigo por cinco anos. Se você quiser ou precisar de maiores informações sobre esta pesquisa, entre em contato comigo, Ludmila Xavier Souza, no endereço Laboratório de Genética de Biologia e Humana, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Av. José Moreira Sobrinho, S/N, Jequié, Bahia ou pelo telefone 88311085 ou através do e-mail mxsalmeida@yahoo.com.br.

Este termo tem duas cópias, sendo que uma cópia será guardada comigo, responsável pela pesquisa, e a outra ficará com você.

### ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu ( \_\_\_\_\_ ), após ter recebido todos os esclarecimentos e assinado o TCLE, confirmo que o (a) menor ( \_\_\_\_\_ ), recebeu todos os esclarecimentos necessários, e concorda em participar desta pesquisa. Desta forma, assino este termo, juntamente com o pesquisador, em duas vias de igual teor, ficando uma via sob meu poder e outra em poder do pesquisador.

Jequié-BA, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

\_\_\_\_\_  
Polegar Direito



APÊNDICE III: Questionário

QUESTIONÁRIO

**Dados do Entrevistado**

Nome completo: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Etnia: \_\_\_\_\_ Estado civil: \_\_\_\_\_

Grau de Escolaridade: \_\_\_\_\_ Ocupação \_\_\_\_\_

Residência:  Zona rural  Zona urbana

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Responsável: \_\_\_\_\_

**Dados Socioeconômicos e Culturais:**

Hábitos de vida:

*Etilismo:*  Sim  Não

Ex-etilistas:  Sim  Não

O que bebe \_\_\_\_\_ O que bebia \_\_\_\_\_

Quantidade (Doses/dia) \_\_\_\_\_ Quantidade (Doses/dia) \_\_\_\_\_

Há quanto tempo \_\_\_\_\_ Por quanto tempo \_\_\_\_\_

*Tabagismo:*  Sim  Não

Ex-tabagistas:  Sim  Não

Quantidade /Dia \_\_\_\_\_ Quantidade/Dia \_\_\_\_\_

Há quanto tempo \_\_\_\_\_ Por quanto tempo \_\_\_\_\_

**Hábitos Alimentares:**

1- Diariamente

3- Semanalmente

5- Raramente

2- 3 vezes por semana

4- Mensalmente

6- Não se aplica

Churrasco

Frituras

Carne Cozida

Embutidos e Defumados

Legumes e vegetais (*tipos mais consumidos*): \_\_\_\_\_

Frutas (*tipos mais consumidos*): \_\_\_\_\_

**Saúde**

Vai sempre ao médico?

( ) 2 vezes/ano ( ) 1 vez/ano ( ) Não vai com regularidade ( ) Nunca foi

Faz algum tratamento médico?

( ) Não ( ) Sim Qual? \_\_\_\_\_

Usa algum tipo de medicamento?

( ) Não ( ) Sim Para quê? \_\_\_\_\_ Qual? \_\_\_\_\_

## Histórico patológico:

- Dores  Sim  Não Local \_\_\_\_\_
- Fadiga  Sim  Não  Não sabe informar
- Feridas nas pernas  Sim  Não  Não sabe informar
- Infecção  Sim  Não Qual \_\_\_\_\_
- Anemia  Sim  Não  Não sabe informar
- Problema neurológico  Sim  Não  Não sabe informar
- Problema cardiovascular  Sim  Não  Não sabe informar
- Problema pulmonar  Sim  Não  Não sabe informar
- Problema renal  Sim  Não  Não sabe informar
- Problema hepático  Sim  Não  Não sabe informar
- Outra \_\_\_\_\_
- Há quanto tempo: \_\_\_\_\_

## Histórico de doenças na família:

- Dores  Sim  Não Local \_\_\_\_\_  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_
- Fadiga  Sim  Não  Não sabe informar  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_
- Feridas nas pernas  Sim  Não  Não sabe informar  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_
- Infecção  Sim  Não Qual \_\_\_\_\_  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_
- Anemia  Sim  Não  Não sabe informar  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_
- Problema neurológico  Sim  Não  Não sabe informar  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_
- Problema cardiovascular  Sim  Não  Não sabe informar  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_
- Problema pulmonar  Sim  Não  Não sabe informar  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_
- Problema renal  Sim  Não  Não sabe informar  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_
- Problema hepático  Sim  Não  Não sabe informar  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_
- Outra \_\_\_\_\_  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_

## Observações:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

#### APÊNDICE IV: Reagentes e Soluções

- **DNA polimerase (Taq):** 1 U/ $\mu$ l de tampão de estocagem (*Fermentas*).
- **dNTP solução estoque:** quatro soluções separadas de 100 mM de cada base (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), pH 8,3 (*Ludwig Biotechnologia Ltda*).
- **dNTP solução trabalho (5 mM):** obtida com a diluição em água estéril da solução estoque (100mM) de cada dNTP para obtenção de uma solução única de concentração 5mM (160  $\mu$ l de água Mili-Q autoclavada mais 10  $\mu$ l de solução estoque de cada dNTP).
- **Iniciadores (*Primers*) específicos – solução estoque (50 $\mu$ M):** os *primers* liofilizados (*euofins mwgloperon*) F e R específicos para cada *locus* foram diluídos em água Milli-Q autoclavada com base no número de moles específico para cada *primer*, e estocados separadamente.
- **Iniciadores (*Primers*) – solução trabalho (2,5  $\mu$ M):** 10  $\mu$ l do *primer* F (solução estoque, 50 $\mu$ M), 10  $\mu$ l do *primer* R (solução estoque, 50 $\mu$ M) e 190  $\mu$ l de água Milli-Q (para cada *primer*) autoclavada, estocados separadamente.
- **Tampão PCR livre de MgCl<sub>2</sub>:** (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM. (*Fermentas*).
- **MgCl<sub>2</sub>:** Concentração de 25mM (*Fermentas*).



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

# ANEXOS



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**ANEXO I: COMPOSIÇÃO E PROGRAMAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES POLIMÓRFICAS DA GLOBINA  $\beta^S$**

Haplótipos	5' $\gamma$ G	$\gamma$ G	$\gamma$ A	$\psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' $\beta$
Marcador	H01	H23	H34	H56	H78	H910
Água	13,25	13,25	13,25	13,25	13,25	13,25
Tampão 10X	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl (50mM)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
dNTP (2mM)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Primers (10uM)	2	2	2	2	2	2
Taq (5u)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
DNA	3	3	3	3	3	3
Volume						
Final (uL)	25	25	25	25	25	25
	94/5'	94/5'	94/5'	94/5'	94/5'	94/5'
Programa para amplificação	94/30"	94/30"	94/30"	94/30"	94/30"	94/30"
(°C/tempo)	59/60"	55/60"	55/60"	55/60"	55/60"	59/60"
	72/60"	72/60"	72/60"	72/60"	72/60"	72/60"
	72/7'	72/7'	72/7'	72/7'	72/7'	72/7'

FONTE: Sutton *et al.* (1989).

**ANEXO II: CONDIÇÕES DAS REAÇÕES DE PCR/RFLP UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES POLIMÓRFICAS DO GLOBINA  $\beta^S$**

Reagentes	H01	H23	H34	H56	H78	H910
Água deionizada autoclavada	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
Tampão da enzima	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
BSA (albumina bovina)	0,15	-	-	-	-	-
Enzima de restrição	0,2 (XmmI)	0,2 (Hind III)	0,2 (Hind III)	0,2 (Hinc II)	0,2 (Hinc II)	0,2 (Hinf I)
Produto da PCR	10	10	10	10	10	10
Volume total						
Temperatura de atividade da enzima	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
Tempo do banho-maria	12h	12h	12h	12h	12h	12h
Fragmentos após clivagem	450+200	430+340+10	400+360	360+340+1	470+120	240+140

FONTE: Sutton *et al.* (1989).