



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Maza Alves Jacob

Polimorfismo nos Genes *Metilenotetrahidrofolato Redutase* e *Cistationina-Beta-Sintase* e a sua relação com eventos Vaso-oclusivos na Doença Falciforme

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos

Co-orientador: Prof. Dr. Celso da Cunha Bastos

Jacob, Maza Alves.

Poliformismo nos genes *Metilenotetrahidrofolato redutase e cistationina-beta-sintase* e a sua relação com eventos vaso-oclusivos na doença falciforme / Maza Alves Jacob. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

143 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

Co-orientador: Celso da Cunha Bastos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Hemoglobinopatia. 2. Polimorfismo (Genética) 3. Vaso-oclusão
4. Trombose. 5. Doença falciforme. 6. Homocisteína. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Bastos, Celso da Cunha. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 616.155

MAZA ALVES JACOB

Polimorfismo nos Genes *Metilenotetrahidrofolato Redutase* e *Cistationina-Beta-Sintase* e a sua relação com eventos Vaso-oclusivos na Doença Falciforme

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de Genética Humana junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Claudia Regina Bonini- Domingos
Professora Doutora
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Flávio Augusto Naoum
Professor Doutor
Academia de Ciência e Tecnologia – São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Sônia Maria Oliani
Professora Adjunto Doutora
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 26 de fevereiro de 2009.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro do CNPq e Capes.

Dedicatória

Dedico esta monografia a todas as pessoas que contribuíram para a reflexão e realização deste trabalho resultando nesta conquista tão esperada.

**"Talvez eu venha a envelhecer rápido demais,
Mas lutarei para que cada dia tenha valido a pena.
Talvez eu não tenha forças para realizar todos os meus
ideais,
Mas jamais irei me considerar uma derrotada.
Talvez um dia o sol deixe de brilhar,
Mas então irei me banhar na chuva.
Talvez um dia eu sofra alguma injustiça,
Mas jamais irei assumir o papel de vítima.
Talvez eu tenha que enfrentar alguns inimigos,
Mas terei humildade para aceitar as mãos que se estenderão
em minha direção.
Talvez com o tempo eu perceba que cometi grandes erros,
Mas não desistirei de continuar trilhando.
Talvez algumas pessoas queiram o meu mal,
Mas irei continuar plantando a semente da fraternidade por
onde passar.
Talvez a vontade de abandonar tudo se torne a minha
companheira,
Mas ao invés de fugir, irei correr atrás do que almejo.
Talvez eu não seja exatamente quem gostaria de ser,
Mas passarei a admirar quem sou.
Porque no final saberei que, mesmo com incontáveis
dúvidas, eu sou capaz de construir uma vida melhor..."**

Autor desconhecido

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por todas as oportunidades oferecidas e sempre estar ao meu lado.

Aos meus pais, João Jacob e Izilda Borges que foram fãis incondicionais e verdadeiros amigos e exemplos, em todo o meu percurso de vida.

Aos meus irmãos, Diego e Frederico Jacob, avó Enira de Carvalho e Geralda de Carvalho, que me deram muito apoio emocional e profissional para enfrentar os desafios que me têm surgido ao longo da minha vida, não só como profissional, mas também como cidadã.

A todos os professores que contribuíram decisivamente para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Gostaria, ainda, de aproveitar esta página para prestar um agradecimento especial à Prof^a. Dr^a Claudia Bonini-Domingos e Prof. Dr. Celso Cunha, pelo apoio e estímulo que me permitiram levar até ao fim este trabalho importante para melhorar o entendimento, tratamento e qualidade de vida dos pacientes com doença falciforme.

Não queria deixar também de mencionar o espírito colaborativo de muitos colegas, com quem tive todo o prazer em trocar experiências e saberes díspares; expressar opiniões diversas sobre os assuntos em causa e atualizar conhecimentos no campo da pesquisa.

Agradeço aos meus grandes amigos, Hederson Souza, Marya Júlia, Mariella Abrahão, Laryssa Cançado, Irene Cristal, Alessandro Liporoni, Mariane Zaqueo, Cátia Maringolo, Márcia Maria, Leliane Commar e Mariana Gomes pelo incentivo, força, amizade, carinho que partilhamos durante “nosso caminhar”, nas viagens, nos pôsteres, nas viradas, nas "reuniões", no celular, no messenger, pelo incentivo que me deram durante todo o trabalho, tanto nesta pesquisa quanto no nosso cotidiano, pela força que me dão, por estarmos sempre juntos nos momentos mais importantes e por "contar" sempre com vocês!

Agradeço também, e de forma especial, aos profissionais de saúde e aos pacientes que participaram deste estudo, pela confiança, respeito e carinho que dividimos durante os dias que trabalhamos juntos.

Por fim, meu agradecimento ao CNPq e Capes pelo auxílio financeiro que possibilitou à realização deste trabalho, à UNESP/IBILCE pelo auxílio e incentivo recebidos.

Sumário

I. Introdução.....	13
1. Doença Falciforme.....	14
2. Vaso-oclusão.....	16
3. Processos Tromboembólicos.....	20
4. <i>Metilenotetrahidrofolato redutase</i>	23
5. <i>Cistationina-beta-sintase</i>	24
II. Objetivos.....	26
III. Material e Método.....	28
1. Casuística.....	29
2. Considerações Éticas.....	30
3. Método.....	30
3.1. Metodologias clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias.....	30
3.2. Metodologias moleculares para análise dos polimorfismos.....	36
3.3. Caracterização da Vaso-oclusão nos Doentes Falciformes.....	48
3.4. Análise estatística.....	48
IV. Resultados.....	49
1. Caracterização e estratificação da amostra.....	50
2. Genotipagem das doenças falciformes.....	52
3. Avaliação dos polimorfismos.....	53
A. <i>Metilenotetrahidrofolato redutase</i>	53
B. <i>Cistationina-beta-sintase</i>	56
4. Correlação entre o quadro clínico e polimorfismos avaliados.....	60
V. Discussão.....	65
VI. Conclusão.....	73
VII. Referências.....	75
VIII. Apêndice.....	88
Apêndice A – Artigos	89
Apêndice B – 1. TCLE.....	116
Apêndice B – 2. Questionário.....	117
Apêndice C – Tabelas.....	118
IX. Resumo.....	141
X. Abstract.....	142

Lista de Figuras

Figura 1. Alteração da membrana celular por polímeros de HbS.....	18
Figura 2. Processo de Vaso-oclusão das células falciformes.....	19
Figura 3. Representação esquemática do metabolismo de homocisteína.....	22
Figura 4. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene da globina beta humana na caracterização molecular da hemoglobina S.....	40
Figura 5. Representação esquemática do produto esperado após amplificação por PCR Alelo Específico da hemoglobina S.....	41
Figura 6. Representação fotográfica do gel de agarose do PCR-AE para HbS....	41
Figura 7. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene da globina beta humana na caracterização molecular da hemoglobina S.....	42
Figura 8. Representação esquemática do produto esperado após digestão por <i>DdeI</i> do amplificado por PCR-RFLP da hemoglobina S.....	42
Figura 9. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene da globina beta humana na caracterização molecular da beta Talassemia CD39.....	43
Figura 10. Representação esquemática do produto esperado da amplificação por PCR-Alelo Específica da hemoglobina Beta CD39.....	44
Figura 11. Representação fotográfica de gel de agarose do PCR-AE para CD39.....	44
Figura 12. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene do <i>MTHFR</i> e sua caracterização molecular.....	45
Figura 13. Representação esquemática do produto esperado após digestão por <i>HinfI</i> Fast do amplificado por PCR-RFLP do gene do <i>MTHFR</i>	46
Figura 14. Representação fotográfica do gel de agarose do PCR-RFLP para <i>MTHFR</i>	46
Figura 15. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene da <i>cistationina-beta-sintase</i> e sua caracterização molecular.....	47
Figura 16. Representação esquemática do produto esperado após amplificação por PCR do gene da <i>cistationina-beta-sintase</i>	47

Lista de Figuras

Figura 17. Representação fotográfica do gel de agarose do PCR para <i>cistatonina-beta-sintase</i>	48
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características Demográficas dos pacientes estudados.....	50
Tabela 2. Caracterização dos relatos de interferentes ambientais e patologia.....	51
Tabela 3. Número de pacientes em relação a medicamentos.....	52
Tabela 4. Perfil das hemoglobinas nos pacientes em estudo, segundo seu genótipo e localidade.....	53
Tabela 5. Frequência Genotípica da mutação no gene da <i>metilenotetrahidrofolato redutase</i> nos pacientes estudados.....	53
Tabela 6. Frequência Alélica da mutação do gene da <i>metilenotetrahidrofolato redutase</i> nos pacientes estudados.....	54
Tabela 7. Frequência Genotípica da mutação no gene da <i>metilenotetrahidrofolato redutase</i> nas cinco localidades avaliadas.....	55
Tabela 8. Valores de p nos perfis WT/C677T e C677T/C677T comparando as frequências genotípicas das cidades comparando duas a duas.....	55
Tabela 9. Frequências da mutação no gene da <i>metilenotetrahidrofolato redutase</i> quanto ao gênero.....	56
Tabela 10. Frequência Genotípica da mutação no gene da <i>cistationina-beta-sintase</i> nos pacientes estudados.....	57
Tabela 11. Frequência Alélica da mutação no gene da <i>cistationina-beta-sintase</i> nos pacientes estudados.....	57
Tabela 12. Frequência Genotípica da mutação no gene da <i>cistationina-beta-sintase</i> nas cinco localidades avaliadas.....	58
Tabela 13. Valores de p nos perfis WT/844isn68 e 844isn68/844ins68 comparando as frequências genotípicas das cidades comparando duas a duas.....	59
Tabela 14. Frequências da mutação no gene da <i>cistationina-beta-sintase</i> quanto ao gênero.....	59
Tabela 15. Característica demográficas e clínica dos pacientes estudados no HC/UFG correlacionados com os polimorfismos <i>MTHFR</i> e <i>CBS</i>	61

Lista de Tabelas

Tabela 16. Frequência alélica para a mutação da <i>MTHFR</i> e da <i>CBS</i> em relação à presença ou ausência das complicações vaso-oclusivas nos pacientes estudados.....	62
Tabela 17. Análise do fator de risco devido à presença da interação dos polimorfismos e complicações vaso-oclusivas nos pacientes estudados.....	63
Tabela 18. Relação da interação dos genótipos de hemoglobina com a presença ou ausência de complicações vaso-oclusivas.....	63
Tabela 19. Relação entre o número de transfusões, administração ou não de hidroxuréia e genótipos de hemoglobina S.....	64
Tabela 20. Resultados gerais encontrados para o grupo avaliado em São Paulo.....	118
Tabela 21. Resultados gerais encontrados para o grupo avaliado em Brasília.....	120
Tabela 22. Resultados gerais encontrados para o grupo avaliado em Goiânia.....	122
Tabela 23. Resultados gerais encontrados para o grupo avaliado no Rio de Janeiro.....	126
Tabela 24. Resultados gerais encontrados para o grupo avaliado em Rio Preto.....	131
Tabela 25. Resultados clínicos encontrados para o grupo avaliado em Goiânia.....	133

Lista de Abreviaturas

A	Adenina
AE	Alelo Específico
ATP	Trifosfato de Adenosina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
C	Citosina
<i>CBS</i>	<i>Cistationina-beta-sintase</i>
CD	Cluster de Diferenciação
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DAC	Doença Arterial Coronariana
Desoxi-HbS	Hemoglobina S desoxigenada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfato
Kb	Kilobases
g	Gramma
β^S	Globina beta S
G	Guanina
Hb	Hemoglobina
HbC	Hemoglobina C
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HbSS	Anemia Falciforme
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
Hcy	Homocisteína
∞	Infinito
IBILCE	Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas
LCR	Região Controladora de Locus

Lista de Abreviaturas

LHGDH	Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas
M	Molar
mL	Mililitro
μL	Microlitro
5-MTHF	5-Metiltetrahidrofolato
<i>MTHFR</i>	<i>Metilenotetrahidrofolato Redutase</i>
ng	Nanograma
Nox	Óxido Nítrico Total
Oxi-HbS	Hemoglobina S oxigenada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Pares de base
pH	Potencial Hidrofílico
PS	Fosfatidilserina
q.s.p	Quantidade suficiente para
RFLP	Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição
Rpm	Rotação por minuto
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
T	Timina
TV	Trombose Venosa
TEV	Tromboembolismo venoso
UNESP	Universidade Estadual Paulistana“Júlio de Mesquita Filho”
UV	Ultra Violeta
V	Volt
VCAM	Molécula de Adesão Vascular Celular
VOC	Vaso-oclusão
WT	Tipo Selvagem

Introdução

I. Introdução

1. Doença Falciforme:

As hemoglobinopatias, também conhecidas como alterações hereditárias da hemoglobina (Hb) humana são doenças geneticamente determinadas e apresentam morbidade significativa em todo o mundo (THOMPSON et al., 2008). Milhões de pessoas trazem em seu patrimônio genético hemoglobinas anormais em várias combinações, com conseqüências que variam das quase imperceptíveis às letais. Dessa forma, as anemias hereditárias compreendem um grupo de condições de considerável complexidade, e a distribuição das hemoglobinas anormais, provenientes de formas variantes e talassemias estão relacionadas com as etnias que compõem a população. O Brasil é caracterizado por significativa mistura étnica, onde o processo de colonização teve grande influência na dispersão dos genes anormais e as hemoglobinas variantes mais freqüentes são as hemoglobinas S (HbS) e C (HbC), ambas de origem africana, evidenciando a intensa participação dessa etnia na composição populacional brasileira (NAOUM, 1984; ORLANDO et al., 2000; PENA, 2005).

Do ponto de vista do conhecimento biomédico contemporâneo, a anemia falciforme é uma doença hereditária caracterizada pela substituição do ácido glutâmico por uma valina: $\text{GAG} \rightarrow \text{GTG}$, no códon que determina o sexto aminoácido da beta globina (WEATHERALL; CLEGG, 2001). Essa mutação em nível molecular promove o desenvolvimento do processo da falcização, que se dá a partir do momento em que a oxi-HbS perde o oxigênio e se torna desoxi-HbS. A desoxi-HbS favorece a formação de ligações de hidrogênio entre os aminoácidos. A formação dessas ligações de hidrogênio modifica a estrutura espacial da molécula de HbS, promovendo contatos inter-moleculares com outros aminoácidos da globina beta S que participam da formação do tetrâmero. Como conseqüência, formam-se agregados desses filamentos que se polimerizam e alteram a estrutura globular das moléculas de HbS, modificando também a

morfologia discóide do eritrócito para a forma de foice (NAOUM, P.; NAOUM, F., 2004; ZAGO; SILVA PINTO, 2007).

Devido à observação de hemácias alongadas e em forma de foice no esfregaço sanguíneo de um jovem negro, originário de Granada, Índias Ocidentais, estudante do Chicago College of Dental Surgery, admitido no Prebysterian Hospital com anemia, J.B Herrick, em 1910, descreveu na literatura médica o primeiro caso clínico de anemia falciforme (NETO; PITOMBEIRA, 2003; FRENETTE; ATWEH, 2007).

A Anemia Falciforme (HbSS) é uma doença com variação fenotípica, pois a falcização das hemácias ocasiona encurtamento da vida média dos eritrócitos, podendo levar a fenômenos de oclusão vascular, episódios de dor e lesão de órgãos. Assim, alguns indivíduos com HbSS têm complicações vaso-oclusivas frequentes e morrem ainda jovens; entretanto outros parecem ser pouco afetados e têm uma vida normal. Portanto, a clínica da Doença Falciforme é muito variável, pois depende de fatores genéticos, sociais, culturais e ambientais, sendo necessário serem avaliados para um melhor diagnóstico e tratamento (COVAS et al., 2004; DINIZ et al., 2005).

Dentre os fatores genéticos que determinam a variabilidade fenotípica dos doentes, destaca-se a herança em homozigose do gene β^S , as interações de HbS com talassemias e a associação com outras variantes de hemoglobina. As principais características clínicas da Doença Falciforme são os episódios de vaso-oclusão (VOC), seqüestro esplênico, síndrome torácica e complicações neurológicas, tais como os acidentes vasculares isquêmicos e hemorrágicos. Estas características clínicas predominarão de forma e intensidade variáveis de acordo com a faixa etária, o nível de hemoglobina F (HbF), leucometria, hemoglobinas basais e haplótipos, influenciando diretamente a qualidade de vida dos pacientes e familiares (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1997; ZAGO, 2001; FRENETTE; ATWEH, 2007).

A Doença Falciforme possui distribuição ampla, abrangendo todos os continentes, notadamente na África, América do Norte, América Latina e parte da Ásia, com prevalência em heterozigose de 1 em cada 500 recém-

nascidos. No Brasil, a Doença Falciforme tem significativa importância epidemiológica em virtude da prevalência, da morbidade e da mortalidade e, por isso, tem sido apontada como uma questão de saúde pública (BANDEIRA et al., 2007). Segundo dados do Ministério da Saúde em 2008 pode-se estimar a existência de mais de dois milhões de pessoas portadoras do traço falciforme e mais de oito mil afetados com a forma homozigótica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal, nascem 3.500 crianças por ano com a Doença Falciforme e cerca de 200.000 com o traço falcêmico (BANDEIRA et al., 2007).

A maior incidência de homozigose e heterozigose está nos Estados em que houve grande presença de escravos durante a colonização, como o Rio de Janeiro e a Bahia, com prevalência de 1 em cada 1.200 recém-nascidos e em 1 em cada 650 recém-nascidos, respectivamente. Nos Estados de São Paulo e Goiás, relatam-se a incidência de um novo caso da doença para cada 4.000 e 1.800 nascimentos, respectivamente (RAMALHO et al., 2002; RAMALHO et al., 2003; LOBO et al., 2003).

2. Vaso-oclusão (VOC):

Pacientes com Doença Falciforme mostram ativação da coagulação sanguínea e sistema fibrinolítico, bem como o aumento da atividade plaquetária e consumo de inibidores (Proteína C, Proteína S e Anti-trombina III), especialmente durante crises vaso-oclusivas, mas também observado durante o estado estável da doença (BAYAZIT; KILINC, 2001). Quase todos os aspectos de homeostase tendem a hipercoagulabilidade (ATAGA; ORRINGER, 2003). Entretanto, não é conhecido se a hipercoagulabilidade é a causa ou consequência da VOC (ALAIN; MARENGO-ROWE, 2006).

A consequência da elevada adesividade do eritrócito falcêmico ao endotélio vascular dos capilares, provoca a estase venosa que desencadeia a hipóxia tecidual, fato que leva mais moléculas de HbS ao estado de desoxi-HbS, numa situação circulatória já desfavorável, lesando os tecidos perfundidos por

esses capilares. Eventualmente pode ocorrer oclusão total dos capilares como a trombose. Esses tecidos sofrem infartos com necrose e formação de fibrose, principalmente no baço, medula óssea e placenta. (STEINBERG, 1998; NAOUM, P.; NAOUM, F., 2004).

A ocorrência de VOC, principalmente em pequenos vasos, representa o evento fisiopatológico determinante na origem da grande maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes com Doença Falciforme, tais como crises álgicas, crises hemolíticas, úlceras de membros inferiores, síndrome torácica aguda, sequestro esplênico, priapismo, necrose asséptica da cabeça do fêmur, retinopatia, insuficiência renal crônica, auto-esplenectomia, acidente vascular cerebral, entre outros (BALLAS; MOHANDAS, 1996).

As complicações isquêmicas são a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com Doença Falciforme. A patogenia dessa complicação não está completamente elucidada. Eventos isquêmicos em pacientes têm sido atribuídos ao efeito da polimerização da hemoglobina, resultando em deformidade e forma de eritrócitos anormais e secundariamente oclusão microvascular. Observações sugerem que outros fatores inflamatórios e da coagulação podem também representar a padrão de patogenia. Se a isquemia resulta exclusivamente de oclusão de vasos por eritrócitos falciformes, então o dano tecidual pode ser uma consequência de oclusão microvascular. Entretanto, episódios mais freqüentes em pacientes ocorrem como resultado de oclusão em artérias de médio a grande calibre (MERKEL, et al., 1978; PLATT et al., 1994).

A fisiopatologia da doença é resultado da interação das células falcizadas com as endoteliais. A estrutura da membrana eritrocitária fica comprometida durante a falcização, caracterizada por desarranjos das proteínas espectrina-actina, diminuição das glicoproteínas, geração de radicais livres oxidantes e orientação anormal dos fosfolipídios, apresentando deformações sob forma de escavações (Figura 1) (STEINBERG, 1998; NAOUM, P.; NAOUM, F., 2004; FRENETTE; ATWEH, 2007). A perda do seu poder deformatório

impossibilita o eritrócito falcizado a transpor o menor diâmetro dos capilares da microcirculação (FABRY; KAUL, 1991).

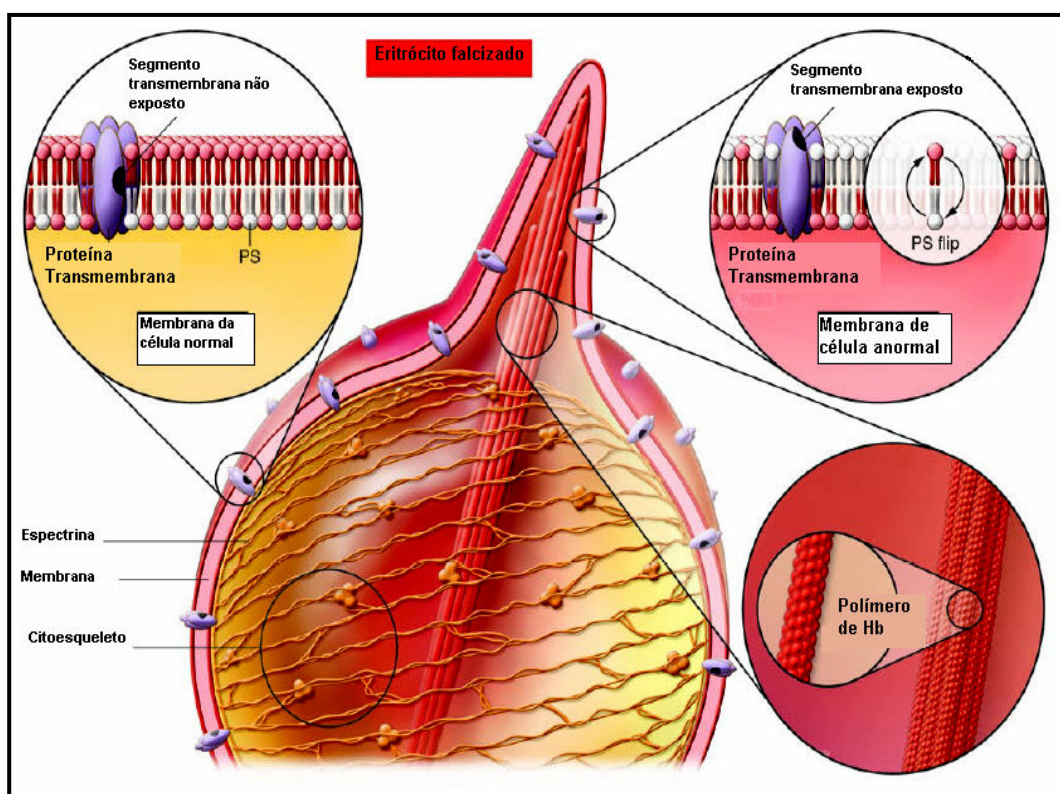


Figura 1 – Alteração da membrana celular por polímeros de HbS. Os polímeros rompem o citoesqueleto e formam uma saliência resultando em um desarranjo da bicamada de fosfolípidos causando a inversão da fosfatidilserina (PS) e exposição da proteína transmembrânica (modificado de FRENETTE; ATWEH, 2007).

Em nível circulatório, a alteração da plasticidade normal dos eritrócitos, desencadeada pelos efeitos polimerizantes da HbS, tornam-os mais adesivos ao endotélio vascular; processo que decorre das interações entre as células endoteliais e os eritrócitos falcêmicos, com a participação de antígenos de superfície celular (CD36 e CD44) e o complexo de integrina ($\alpha 4 \beta 1$), juntamente com fibronectina e selectina que se ligam às células falcêmicas. As proteínas plasmáticas também participam da ligação dos eritrócitos falcêmicos com as células endoteliais, com destaque para o fator de von Willebrand, fibrinogênio e trombospondina, favorecendo a formação de trombos na micro e na

macrocirculação (FABRY; KAUL, 1991; STEINBERG, 1998; NAOUM, P.; NAOUM, F., 2004).

Essas alterações juntamente com a expressão das moléculas de adesão do eritrócito falcizado, provavelmente explicam o aumento da aderência do eritrócito falcizado no endotélio vascular provocando um trânsito lento dessas células em vasos pequenos e assim, ocorrendo crises de VOC (HEBBEL, 2008).

A aderência das células vermelhas falcizadas nas células endoteliais é um processo complexo que requer interações entre as múltiplas moléculas de adesão e os receptores dessas células, como os componentes da matriz subendotelial, proteínas plasmáticas formadoras de pontes entre as células vermelhas com as endoteliais e com os leucócitos, que possuem função importante no processo de obstrução vascular (Figura 2) (FRENETTE; ATWEH, 2007; HEBBEL et al., 2004; TELEN, 2005).

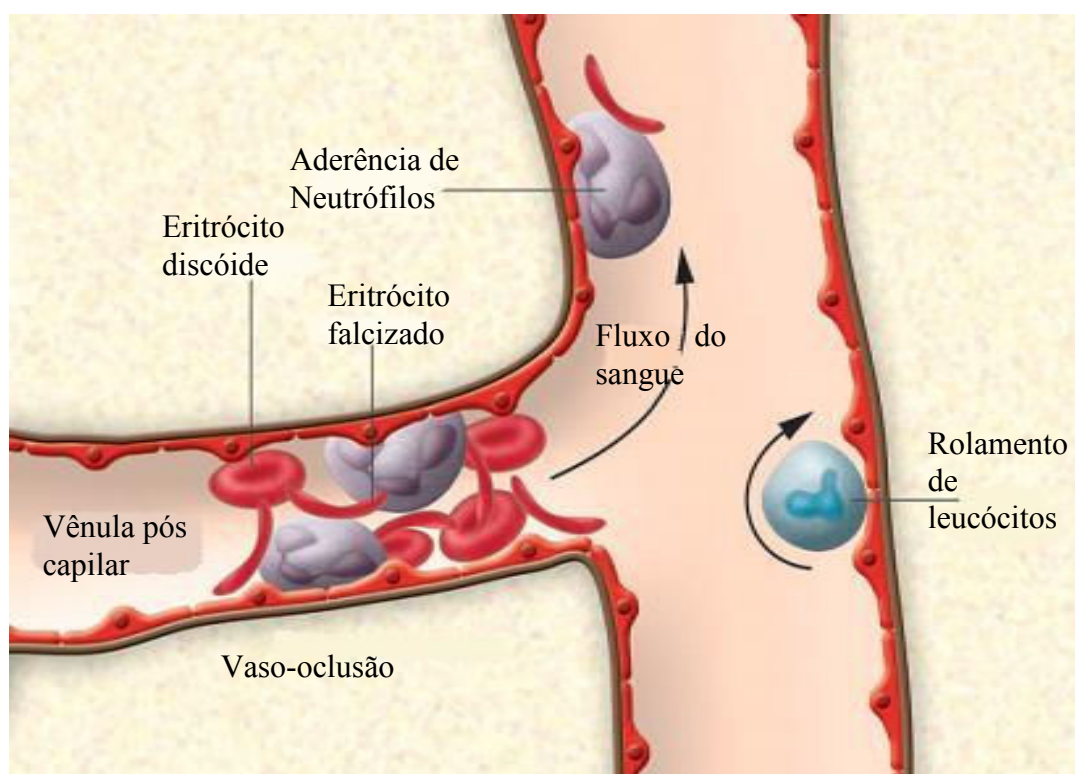


Figura 2. Processo de Vaso-oclusão das células falciformes. Célula falciforme induz a expressão de mediadores inflamatórios e da coagulação. O estímulo das células endoteliais é devido ao recrutamento, rolamento e aderência de leucócitos em vênulas por expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão celular, como as selectinas (E-selectina) e imunoglobulinas (IL-1, IL-8, TNF α). Os neutrófilos aderidos capturam os eritrócitos discóides e falciformes, uma fase de transição da VOC iniciada em pequenas vênulas pós-capilares. A interação entre os

eritrócitos e leucócitos tende a ocorrer nas junções dos vasos, onde o recrutamento dos leucócitos é mais ativado (modificado de FRENETTE; ATWEH, 2007).

3. Processos tromboembólicos:

Trombose venosa (TV) é uma doença comum com importante causa de morbidade, mortalidade e apresenta incidência anual de 1 a 3 casos em 1.000 indivíduos, podendo ser uma combinação de fatores de risco ambientais e genéticos (NAESS et al., 2007). Entre os fatores de risco genéticos, destacam-se os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) em genes codificadores de fatores da coagulação que induzem a síntese de uma proteína defeituosa ou o aumento na produção de proteínas procoagulantes (BERTINA et al., 1994). A co-herança de múltiplos defeitos genéticos foi associada com o aumento do risco de trombose (ALAMAWI et al., 2004). Assim, a ocorrência simultânea de trombofilias hereditárias e/ou polimorfismos protrombóticos mostrou risco substancial de tromboembolismo venoso (TEV) (KEIJZER et al., 2002).

Estudos investigaram o efeito de fatores ambientais, como o efeito do cigarro no sistema de coagulação e encontraram altos níveis de fator VII, protrombina, fator XI e fator X ativados (MILLER et al., 1998). Além dos fatores de coagulação, os fatores inflamatórios podem estar envolvidos, como a IL-6, elevada em fumantes e associada com o risco de recorrência de TV (MENDALL et al., 1997; VAN AKEN et al., 2000).

A incidência de trombose, em indivíduos que possuem defeitos genéticos, é altamente variável e alguns indivíduos nunca desenvolvem trombose; entretanto, outros desenvolvem eventos trombóticos recorrentes e graves, ainda quando jovens. Isso depende particularmente do genótipo, da coexistência de outros defeitos genéticos e da influência de fatores de risco ambientais, tais como, idade, imobilizações, cirurgias, gravidez, contraceptivos orais, reposição hormonal e condições inflamatórias (VANDENBROUCKE et al., 1994; DAHLBÄCK, 2008). É de interesse a coexistência de diferentes alelos mutantes e a análise de suas interações e influências na ocorrência de trombose, pois Houston

et al. (1997) mostraram uma clara influência da hiper-homocisteinemia (excesso de homocisteína sérica) no risco de trombose em doentes falciformes.

A homocisteína (Hcy) tem sido considerada um dos fatores de risco para doença cardiovascular, incluindo a doença arterial coronariana, acidente cerebral vascular e TV (McLLROY et al., 2002; NAKAMURA; YOSHIZAWA, 2002; WOLFGANG et al., 2003; DEN HEIJER et al., 2005). Os mecanismos de indução de aterotrombose pela Hcy ocorrem provavelmente por meio de múltiplos caminhos, incluindo a adesão de leucócitos, estímulo à expressão da molécula de adesão vascular celular (VCAM), disfunção endotelial e estresse oxidativo. Ao promover danos oxidativos e disfunção no endotélio, esses inibem a síntese de óxido nítrico endotelial e, subseqüentemente, reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico, resultando em um vasodilatador ineficiente (WANG et al., 2002; BILSBOROUGH, et al. 2003; LENTZ, 2005).

Alguns estudos relatam que a Hcy promove a trombose por distúrbios no equilíbrio procoagulante-anticoagulante, aumentando ou diminuindo muitos fatores da coagulação (ELDIBANY; CAPRINI, 2007). Outros estudos sugerem que a Hcy induz à proliferação das células musculares conduzindo a um estreitamento do lúmen do vaso (CHEN et al., 2000). Recentemente, foi observado que a Hcy pode induzir danos no ácido desoxirribonucléico (DNA) e que a sua concentração aumentada está associada com o número de vasos afetados e o índice de micronúcleos, fatores indicativos da gravidade de Doença Coronária Arterial (DAC) e de instabilidade genética (ANDREASSI et al., 2003; BOTTO et al., 2003).

A Hcy é um aminoácido formado durante o metabolismo da metionina e essencialmente suprido pelas proteínas da dieta. A metabolização segue uma de duas vias: remetilação ou trans-sulfuração (Figura 3). No ciclo da remetilação, a metionina sintetase promove a metilação da Hcy a metionina, tendo o 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) como doador de grupamento metil e a metilcobalamina (Vitamina B₁₂) como co-fator. Após a metilação da Hcy, a metionina formada é condensada com o trifosfato de adenosina (ATP), resultando na S-adenosilmetionina (SAM). Em seguida, por uma reação de desmetilação,

forma-se a S-adenosil-homocisteína (SAH) com posterior hidrólise para liberar adenosina e Hcy, completando o ciclo (ELDIBANY; CAPRINI, 2007).

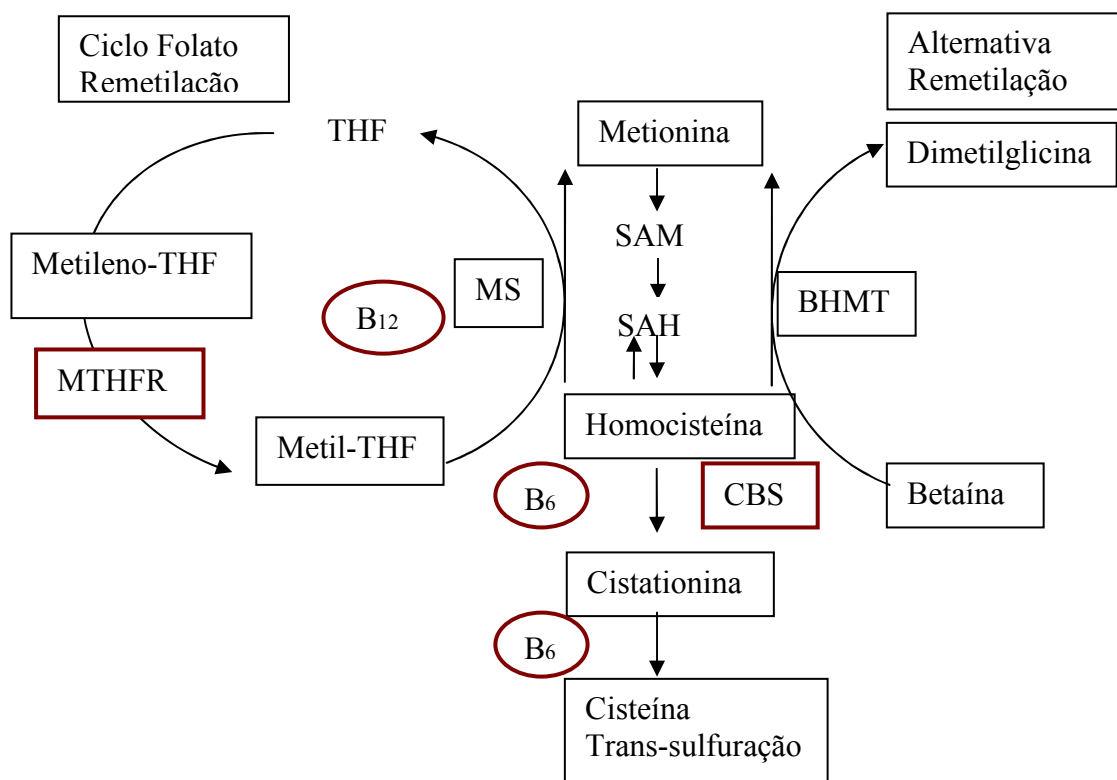


Figura 3. Representação esquemática do metabolismo de homocisteína, tetrahydrofolato (THF); metilenotetrahydrofolato redutase (*MTHFR*); metionina sintase (*MS*); S-adenosilmetionina (SAM); S-adenosilhomocisteína (SAH); betaina homocisteína metiltransferase (*BHMT*); *cistationina-beta-sintase* (*CBS*); vitamina B₁₂ (B₁₂) e vitamina B₆ (B₆) (ELDIBANY; CAPRINI, 2007, com modificações).

Quando há deficiência de vitamina B₁₂, a reação de remetilação da Hcy fica prejudicada e a via de trans-sulfuração representa a alternativa metabólica para a Hcy nos casos em que os níveis de metionina, por quaisquer motivos, estejam elevados. No ciclo da trans-sulfuração, a homocisteína condensa-se com a serina para formar cistationina, numa reação catalizada pela piridoxina (Vitamina B₆). A cistationina é subsequentemente hidrolizada a cisteína, que pode ser excretada na urina como sulfato (ELDIBANY; CAPRINI, 2007).

Deficiências de Folato, Vitamina B₆ ou B₁₂ podem levar a descompensação do metabolismo da Hcy e a hiper-homocisteinemia.

Adicionalmente, uma mutação no código genético para a enzima *metilenotetrahidrofolato redutase* (*MTHFR*) e *cistationina-beta-sintase* (*CBS*) têm um potencial aumento no nível plasmático de Hcy (ANDREASSI et al., 2003).

4. Metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*):

O *MTHFR* é uma enzima regulatória do metabolismo da Hcy, reduzindo seus níveis no sangue, e é uma enzima chave no metabolismo do folato, no qual é essencial para síntese de DNA. Mutações no gene da *MTHFR* têm sido associadas com a forma enzimática termolábil, de baixa atividade biológica (FROSST et al., 1995).

Cinco mutações, resultantes da mudança na seqüência do gene *MTHFR*, foram descritas e, o SNP causando a substituição C (citosina) → T (timina) no nucleotídeo 677 do gene *MTHFR* na região 1p36.3 no cromossomo, tem sido associado com a baixa atividade enzimática. O homozigoto mutante (C677T) para esse SNP é associada com a redução de 50% da atividade da enzima *MTHFR* resultando em aumento no nível de Hcy sérica (SHMELEVA et al., 2003), sendo esse o polimorfismo mais prevalente e mais amplamente estudado (KANG et al., 1988; FROSST et al., 1995).

A *MTHFR* possui outro efeito adicional no aumento de riscos para doença vascular. A sua atividade enzimática reduzida interrompe a síntese de metionina no ciclo da Hcy e assim, reduz a produção de SAM. A diminuição do maior doador do grupo metil provoca uma hipometilação do DNA e expressão do gene anormal, o qual pode ser encontrado em indivíduos com genótipo homozigoto mutante (FRISO et al., 2002). O alelo mutado T também exerce um efeito adicional no aumento da VCAM e diminuição da concentração do Óxido Nítrico total (Nox), podendo contribuir para disfunção endotelial (JUO et al., 2008).

Aproximadamente 40% da população em geral é heterozigota para o polimorfismo C677T, enquanto 8-10% é homozigota para a mutação

(ULRICH, 2002). A frequência tem sido menos comum entre africanos (1.6)%, e no sul da Itália (26%) (WILCKEN et al., 2003; GUEANT-RODRIGUES, et al., 2006). Arruda et al. (1995) relataram a prevalência de 10% de indivíduos homozigotos para esse polimorfismo no gene *MTHFR* no Brasil.

5. Cistationina-beta-sintase (CBS):

O gene para *CBS* está localizado no cromossomo 21q22.3, sendo essa uma enzima envolvida na transulfuração da Hcy e possui relatos de mais de 100 mutações em pacientes com homocisteinúria (MUNKE et al., 1988; KRAUS, 1998). Entre essas mutações, as I278T e G307S que ocorrem no éxon 8, mostram ser as mais frequentes (KRAUS, 1998). Sebastio et al. (1995) descreveram a inserção de 68 pares de base (pb) no éxon 8 (844ins68) em um alelo de um paciente deficiente para *CBS* que continha a mutação I278T, sendo essa a mais comum variação no gene da *CBS*. A mutação 844ins68 no gene da *CBS*, na condição homozigota e heterozigota, é considerada um fator de risco independente para arteriosclerose (TSAI et al., 1996).

O polimorfismo 844ins68 possui frequência variável e o estado heterozigoto parece ser relativamente comum em algumas áreas, como aproximadamente 12-14% em caucasóides da América do Norte, 8% na Europa, 38% na etnia negra e raramente em asiáticos. A homozigose para a mutação, encontrada na população em geral, tem frequência de 5% a 10% (SPERANDEO et al., 1996; TSAI et al., 1996; KLUIJTMANS et al., 1997; FRANCO et al., 1998a).

No Brasil, a análise sobre a variação regional e étnica nos genótipos da *cistationina-beta-sintase*, seus fenótipos bioquímicos associados ou a sua prevalência em pessoas com homocisteinúria devido à deficiência da enzima é de grande interesse. Apesar do alto nível de miscigenação, pacientes brasileiros com homocisteinúria não apresentam uma alta prevalência das mutações mais comuns descritas na literatura (PORTO et al., 2005).

Muitas mutações raras têm sido identificadas nos genes da *MTHFR* e da *CBS*, todos com conseqüente hiper-homocisteinemia grave no estado homozigoto (KLUITJMANS et al., 1995). Khajuria e Houston (2000) mostraram *in vivo* a evidência de um mecanismo direto pelo qual a homocisteína, em concentrações relevantes, pode induzir a trombose.

A importância das complicações vasculares na fisiopatologia da Doença Falciforme, como a maior causa de morbidade e mortalidade, ainda não está completamente elucidada. Múltiplas interações entre fatores ambientais e genéticos contribuem para o desenvolvimento do tromboembolismo, conforme anteriormente relatado.

Objetivo

II. Objetivos:

II.1 - Objetivos gerais

Avaliar a frequência dos polimorfismos genéticos associados com vaso-oclusão como potenciais modificadores genéticos para o risco de desenvolver doenças vasculares em Doentes Falciformes.

II.2 - Objetivos específicos

Em pacientes com Doença Falciforme de diferentes etnias e localidades analisamos:

1. a frequência dos polimorfismos C677T no gene da *metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR)* e 844ins68 inserção no gene da *cistationina-beta-sintase (CBS)*.
2. a presença desses polimorfismos em relação aos fatores de risco capazes de desenvolver eventos vaso-oclusivos.

Material e Método

III. Material e Método:

1. Casuística:

A definição da amostragem foi determinada pela presença de Hemoglobina S (HbS) e de manifestações clínicas de processo vascular, sendo esse o critério de inclusão. Não houve distinção quanto à idade, gênero, etnia ou condição social.

Foram realizadas coletas de sangue periférico (5ml em EDTA) de trezentos (300) indivíduos com Doença Falciforme provenientes do Instituto de Hematologia de Fernandópolis - São Paulo (n=3), Hemocentro da Santa Casa - São Paulo (n=39), Hemocentro de São José do Rio Preto - São Paulo (n=35), Hemocentro do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro (n=96), Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás – Goiás (n=94) e Hospital de Apoio de Brasília – Distrito Federal (n=33).

As amostras, ao chegarem ao laboratório, foram codificadas e as informações referentes ao sujeito da pesquisa ficaram sob a guarda e conhecimento apenas da responsável pela pesquisa.

Os resultados, avaliados em grupo para publicação em revista científica e apresentações em congressos, preservaram a identidade dos envolvidos. Além disso, as informações individuais foram repassadas aos clínicos, responsáveis pelos pacientes, para inclusão nos prontuários e para outras informações necessárias.

Os dados e registros dos pacientes, assim como as suas amostras biológicas, ficaram arquivados em banco de dados e de amostras, sob a guarda do LHGDH/IBILCE/UNESP.

Os resultados pretendidos com a pesquisa visaram avaliar a predisposição a processos tromboembólicos pela presença de mutantes específicos, o que poderá trazer benefícios para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes, quando identificados precocemente.

2. Considerações éticas:

Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Apêndice B.1) em cumprimento à Resolução CNS 196/96, os participantes da pesquisa responderam a um questionário (Apêndice B.2), para avaliar possíveis fatores que pudessem interferir no processo tromboembólico. Esses dados foram organizados em planilhas para melhor visualização e destacados no Apêndice C.

Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto – São Paulo (UNESP/IBILCE) e desenvolvido obedecendo aos princípios éticos estabelecidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), sob protocolo número 0008.0.229.000-07.

O risco, para os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa foi considerado mínimo, e com a possibilidade apenas de equimose no local da punção venosa na coleta da amostra de sangue.

3. Método:

3.1 Metodologias clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias:

Foram realizadas as metodologias de triagem de hemoglobinopatias para caracterização das Hb variantes, listadas a seguir:

3.1.1- Preparação de hemolisados (NAOUM, 1990):

Para que as amostras fossem submetidas a procedimentos eletroforéticos e testes bioquímicos, as células foram lisadas para a obtenção da solução de Hb utilizando duas metodologias:

Hemolisado Rápido: com saponina

Reativo hemolisante:

Saponina P.A.....1g
 Água destilada.....100mL

Procedimento:

- Em placa de Kline colocou-se 1 volume de sangue com 1 volume de reativo hemolisante, com posterior homogeneização até a hemólise completa da mistura;
- O hemolisado pode ser utilizado após 5 minutos e, no máximo, até 4 horas depois da sua preparação.

Solução de Hb: com Clorofórmio

Procedimento:

- Para lavar os eritrócitos, centrifugou-se 1mL de sangue colhido com anticoagulante com solução salina a 0,85%, a 1.500rpm, durante 5 minutos, desprezando o sobrenadante. O processo foi realizado três vezes, no mínimo.
- Ao volume de eritrócitos lavados, adicionou-se outro de água destilada, homogeneizando a solução. A seguir, adicionou-se um volume de clorofórmio idêntico ao do hemolisado formado. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 2.000rpm, por 20 minutos.
- A solução de Hb sobrenadante ou hemolisado foi retirada por meio de pipeta Pasteur e transferida para um tubo limpo com identificação da amostra. A concentração do hemolisado, preparado conforme a metodologia apresentada, variou de 10 a 15g/dl.

3.1.2- Resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36% (SILVESTRONI; BIANCO, 1975):

Princípio:

Técnica utilizada para detectar talassemias do tipo beta, principalmente na forma heterozigota, pois nesses casos os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise nesta solução. A resistência globular não é específica para talassemia beta heterozigota, já que resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e em outras hemoglobinopatias, como nos heterozigotos para HbC.

Reagentes:

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

- NaCl.....9,0g
- Na₂HPO₄.....1,36g
- NaH₂PO₄.H₂O.....0,28g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Solução trabalho

- NaCl 10%.....36mL
- Água destilada q.s.p.....1000mL

Procedimento:

Em tubo de hemólise colocou-se 2,0mL de solução de NaCl a 0,36% e 10μL de sangue total, agitando por inversão, suavemente. A leitura foi feita após 10 minutos.

Interpretação:

O tubo de hemólise com a amostra na solução de NaCl a 0,36% foi colocado a 2,0cm de uma folha branca com linhas negras. O teste foi interpretado como positivo quando não se visualizou as linhas negras, pois a resistência aumentada à hemólise do eritrócito, torna a amostra opaca. Em amostras com resistência normal à hemólise, visualizou-se facilmente as linhas por meio da solução.

3.1.3- Análise, a fresco, da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006):

Os esfregaços sanguíneos, a fresco, foram analisados ao microscópio óptico, quanto ao tamanho, forma e quantidade de Hb nos eritrócitos. Os resultados foram divulgados da seguinte maneira, segundo padronização para cada um dos parâmetros avaliados.

- Alterações discretas: (+)
- Alterações moderadas: (++)
- Alterações acentuadas: (+++)
- Células normais: (N)

3.1.4- Eletroforese em pH alcalino (MARENGO-ROWE, 1965):

Princípio:

Técnica utilizada para qualificação e quantificação de Hb normais e grande parte das Hb anormais com mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais.

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB), pH 8,6

- Tris hidroximetil aminometano.....10,2g
- Ácido etilenodiaminotetracético.....0,6g
- Ácido Bórico.....3,2g
- Água destilada q.s.p.....1000mL

Deve ser conservado em geladeira

Corante:

Ponceau

- Ponceau S.....0,5g
- Ácido tricloroacético.....5,0g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Solução descorante:

- Ácido acético glacial.....100mL
- Metanol.....50mL

- Água destilada q.s.p.....1000mL

Procedimento:

- As fitas de acetato de celulose foram embebidas em tampão TEB por 15 minutos, no mínimo, e seis horas, no máximo.
- Após serem secas em folhas de papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão utilizado para embeber as fitas, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos por meio de tecido absorvente (pano multi-uso).
- A solução de Hb foi aplicada a 1,0cm da extremidade da fita em contato com o pólo negativo.
- Passaram-se 300 volts por 30 minutos.
- As frações foram analisadas, primeiramente, sem coloração e coradas com Ponceau. Para corá-las, as fitas foram colocadas no corante por cinco minutos e, posteriormente, em solução descorante por 30 minutos, com agitação da vasilha. A interpretação se fez por meio de comparação com mapas de migração

3.1.5- Eletroforese em pH ácido (VELLA, 1968):

Princípio:

Técnica utilizada para diferenciar alguns tipos de Hb que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino e caracterização semi-quantitativa de Hb Fetal.

Reagentes:

Tampão Fosfato pH 6,2 - Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel:

- Na_2HPO_42,02g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$7,66g
- Água destilada q.s.p.....1000mL

Conservar em geladeira

Gel de Ágar-Fosfato

- Ágar-agar.....500mg
- Tampão fosfato pH 6,2.....25mL

Procedimento:

- Os componentes do gel de ágar-fosfato foram adicionados a um erlenmeyer de 250mL e levados ao forno microondas até completa dissolução, tomando cuidado para a mistura não ferver.
- Foram pipetados 5,0mL do gel em lâminas de microscópio que gelificaram à temperatura ambiente. As amostras foram aplicadas na porção média da lâmina, inserindo o aplicador com cuidado para não partir totalmente o gel.
- Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos foi utilizado tecido absorvente (pano multi-uso).
- Passaram-se 100 volts por 30 minutos.
- As frações foram analisadas sem corar e coradas com Ponceau.

3.1.6- Cromatografia líquida de alta performance (INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, 1999):*Princípio:*

O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD Laboratories) com Kit de análise para Beta Talassemia Heterozigota. A HPLC neste equipamento consiste da cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados passam pela coluna, detectando as alterações de absorbância a 415nm. O filtro secundário de 690nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes (EASTMAN et al., 1996). As mudanças na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorbância *versus* tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da Hb. Cada Hb tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

Procedimento:

Para o Kit Beta Thalassemia Heterozigota:

Em um tubo de 1,5mL, fornecido pelo fabricante, foram misturados 5µL de sangue total com 1,0mL de solução hemolisante fornecida no kit de análise.

Após a hemólise total, as amostras foram acondicionadas nos recipientes adequados e alojadas no equipamento para realização dos procedimentos de leitura e análise das frações.

Interpretação:

A quantificação das diferentes frações de Hb em uma amostra foi realizada a partir dos valores percentuais e de tempo de retenção fornecidos pela calibração específica, e emitidos em modelo próprio que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico. Aos valores de HbA₀ obtidos pela HPLC, foram incluídas as subfrações de HbA glicosilada e HbA acetilada, denominadas P2 e P3 respectivamente, identificadas separadamente pelo aparelho. Os valores de HbA₂ considerados normais foram de 2,0 a 3,5% e os de HbF até 1,3%, previamente estabelecidos e fornecidos pelo fabricante.

3.2. Metodologias moleculares para análise dos mutantes:

3.2.1- Extração de Sangue Periférico (PENA, 1991):

Princípio:

Técnica utilizada para extrair DNA genômico a partir de sangue total. Os tampões de lise rompem os eritrócitos e glóbulos brancos. O fenol é utilizado para a remoção de proteínas e enzimas contaminantes. O DNA é precipitado com etanol.

Reagentes:

1. Solução de lise 1 para extração de sangue (tampão utilizado na lise de células vermelhas)

➤ Sacarose 0,32M.....10,95g

- Tris HCl 10mM.....1mL
- MgCl₂ 5mM.....0,5mL
- Triton 1% 100x.....1mL
- Água mili-Q autoclavada q.s.p.....100mL

2. Solução de lise 2 para extração de sangue (tampão utilizado na lise de células brancas)

- 0,075M de NaCl.....2,19g
- 0,02M de EDTA.....20mL
- Água mili-Q q.s.p.....500mL

3. Proteinase K (20mg/mL)

- Proteinase K.....20mg
- Água mili-Q q.s.p.....1mL

Conservar em freezer.

4. Fenol

5. Clorofórmio:álcool isoamílico (24:1)

6. Etanol 70% e 100%

7. KCl 2M

Procedimento:

Amostras de sangue periférico, colhidas com EDTA, foram colocadas em microtubos e o volume foi completado para 1,5mL com solução de lise 1. Após 10 minutos de agitação, foi centrifugado por cinco minutos a 6.500rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi acrescentado 1,0mL de solução de lise 1. Esse passo foi repetido por duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 450µL de solução de lise 2, 25µL de SDS à 10% e 5µL de proteinase K 20mg/mL. Após homogeneização, o microtubo foi colocado em banho-maria por três horas a 37°C.

Após esse período de incubação, foram adicionados 500µL de fenol, o material foi homogeneizado e centrifugado por cinco minutos a 7.000rpm. Após centrifugação, a fase superior foi transferida para outro microtubo e

adicionados 500µL da solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1.

O material foi homogeneizado e, novamente, centrifugado por cinco minutos a 7.000rpm. Esse último passo foi repetido por mais uma vez. O sobrenadante foi colocado em tubo com 50µL de solução de KCl 2M gelada e acrescentado 500µL etanol 100% bem gelado. O tubo foi invertido várias vezes até a precipitação do DNA.

O material foi novamente centrifugado por 30 segundos a 13.000rpm e o sobrenadante desprezado. O DNA no fundo do tubo foi lavado com 200µL etanol 70% (gelado), para reiniciar a hidratação, foi desprezado o sobrenadante após centrifugação. Após a evaporação do etanol, o DNA foi solubilizado com 50µL de água ultra pura e conservado em freezer -20°C.

3.2.2- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

A PCR explora a capacidade de duplicação do DNA. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares, sob a ação da enzima DNA polimerase, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo a fita molde.

Reagentes:

- Água ultra pura
- DNA polimerase com tampão e cloreto de magnésio
- DMSO
- dNTP
- Iniciadores (desenhado de acordo com a técnica a ser desenvolvida)

Preparo de Géis

Gel de Agarose

Gel de Agarose 1%

- Agarose ultra pura, 250mg

- TEB 1x
- Aquecimento por 1 minuto no microondas, com potência máxima.

Gel de Agarose 1,5%

- Agarose ultra pura, 375mg
- TEB 1x
- Aquecimento por 1 minuto no microondas, com potência máxima.

Gel de Agarose 2,0%

- Agarose ultra pura, 500mg
- TEB 1x
- Aquecimento por 1 minuto no microondas, com potência máxima.

Gel de Agarose 3,0%

- Agarose ultra pura, 750mg
- TEB 1x
- Aquecimento por 1 minuto no microondas, com potência máxima.

3.2.3- PCR – AE para HbS (CHINELATO-FERNANDES et al., 2003):

Princípio:

Para o polimorfismo de HbS, o DNA foi amplificado a partir de duas misturas, essa metodologia utiliza três iniciadores para cada mistura. Na primeira mistura adiciona-se o par de iniciadores específicos (B5 a e B5 b) para o trecho de interesse e o iniciador específico (BA) para o alelo normal. Na segunda mistura, adicionam-se os iniciadores específicos para o trecho de interesse e o iniciador específico do alelo mutante (BS).

Iniciadores (Figura 4):

B5 a: 5' – GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC A – 3'

B5 b: 5' – AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA A – 3'

BA: 5' – CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCT C – 3'

BS: 5' – CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCA – 3'

A mistura da reação foi preparada com um volume final de 25µL e os microtubos foram transportados para a Sala de Amplificação, onde se realizou a reação de amplificação nas seguintes condições: 1 ciclo de 3 minutos à 94°C; 30 ciclos de 45 segundos minuto à 94°C; anelamento durante 1 minuto 60°C e 30 segundos de extensão; extensão final de 10 minutos à 72°C e ∞ 4°C.

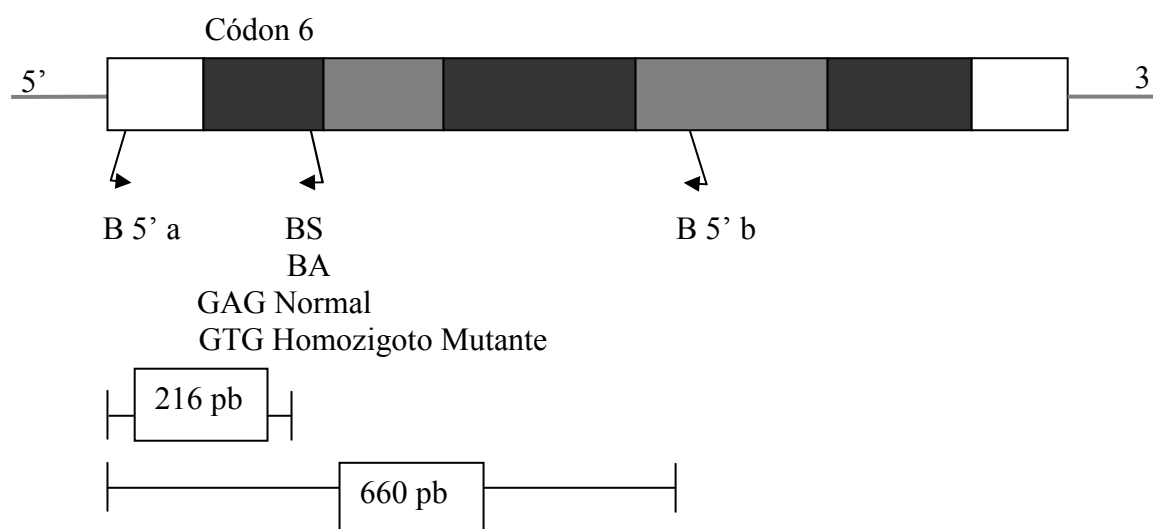


Figura 4. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene da globina beta humana na caracterização molecular da hemoglobina S.

Amplificou-se um fragmento de DNA com uma banda controle de 660pb. Assim, para a confirmação da HbS, as misturas com a presença dos iniciadores específicos (BS e BA) formariam uma banda de 216pb e a não amplificação deste trecho significa que não há o alelo pesquisado, já que a mutação ocorre na substituição de uma adenina por uma timina no códon seis da cadeia beta (GAG → GTG) (Figura 5). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, sob corrente constante de 80V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 6).

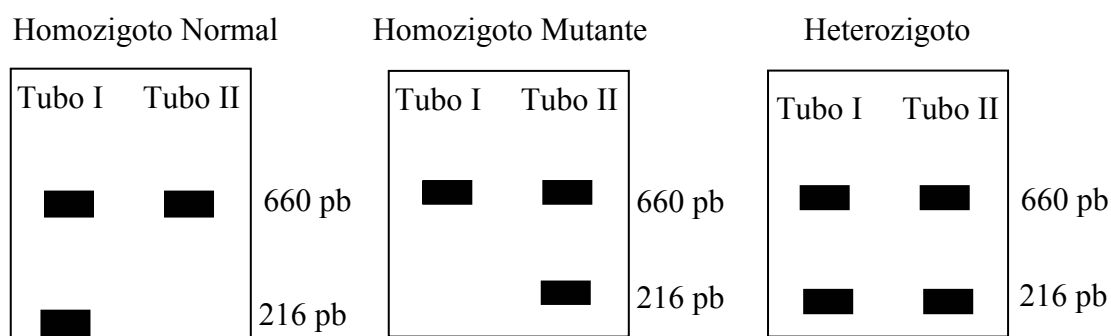


Figura 5. Representação esquemática do produto esperado após amplificação por PCR Alelo Específico da hemoglobina S.

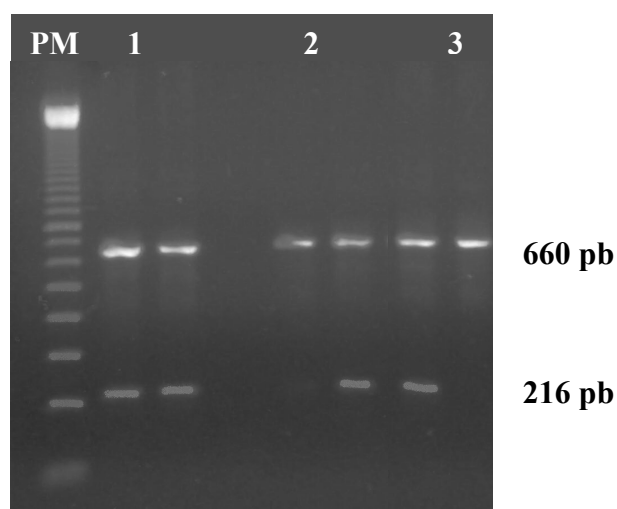


Figura 6: Representação fotográfica do gel de agarose do PCR-AE para HbS. 1- heterozigoto para mutação HbS; 2- homozigoto mutante para a mutação HbS; 3- Ausência da mutação para HbS. Peso Molecular (PM)= 100pb.

3.2.4- PCR-RFLP para HbS (SASAKI et al., 1997):

Princípio:

Para a amplificação do segmento que codifica a HbS foram utilizados os seguintes iniciadores (Figura 7):

Iniciador 1 – P277: 5' – GGCAGAGCCATCTATTGCTTA – 3'

Iniciador 2 – P278: 5' – ACCTTAGGGTTGCCCATAAC – 3'



Figura 7. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene da globina beta humana na caracterização molecular da hemoglobina S.

A mistura da reação foi preparada com um volume final de 25µL e os microtubos foram transportados para o termociclador, onde se realizou a reação de amplificação nas seguintes condições: 30 ciclos de 30 segundos à 94°C; anelamento durante 30 segundos à 55°C; extensão 1 minuto à 72°C, extensão final por 10 minutos à 72°C e ∞ 4°C.

Amplificou-se um fragmento de DNA de 288pb, que foi digerido com a enzima *DdeI* (15U). Como a mutação no códon 6 (GAG → GTG) elimina um sítio de restrição para enzima *DdeI*(C ↓ TNA \overline{G}), após a digestão, o alelo normal gera dois fragmentos de 201pb e 88pb e, o alelo mutante gera um de 288pb (Figura 8). Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, sob corrente constante de 80V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

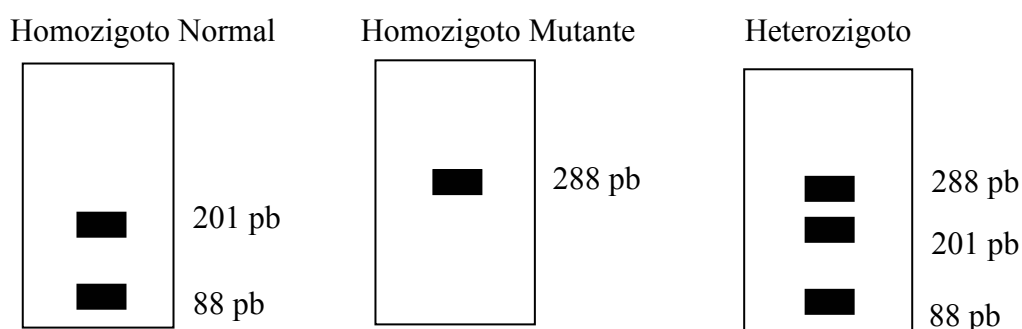


Figura 8. Representação esquemática do produto esperado após digestão por *DdeI* do amplificado por PCR-RFLP da hemoglobina S.

3.2.5- PCR-AE para TALASSEMIA BETA (CD39) (BERTHOLO; MOREIRA, 2006):

Princípio:

Para o polimorfismo de CD39, o DNA foi amplificada a partir de duas misturas, essa metodologia utiliza três iniciadores para cada mistura. Para o controle interno da reação adiciona-se o par de iniciadores específicos (B5 a e B5 b) nas duas misturas, o iniciador específico para o alelo normal (PS39W) na primeira mistura, e na segunda mistura, adiciona-se o iniciador específico (PS39M) onde ocorre à mutação.

Iniciadores (Figura 9):

B5 a: 5' – GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC A – 3'

B5 b: 5' – AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA A – 3'

PS39W: 5' – GAC TCA AAG AAC CTC TG – 3'

PS39M: 5' – GAC TCA AAG AAC CTC TA – 3'

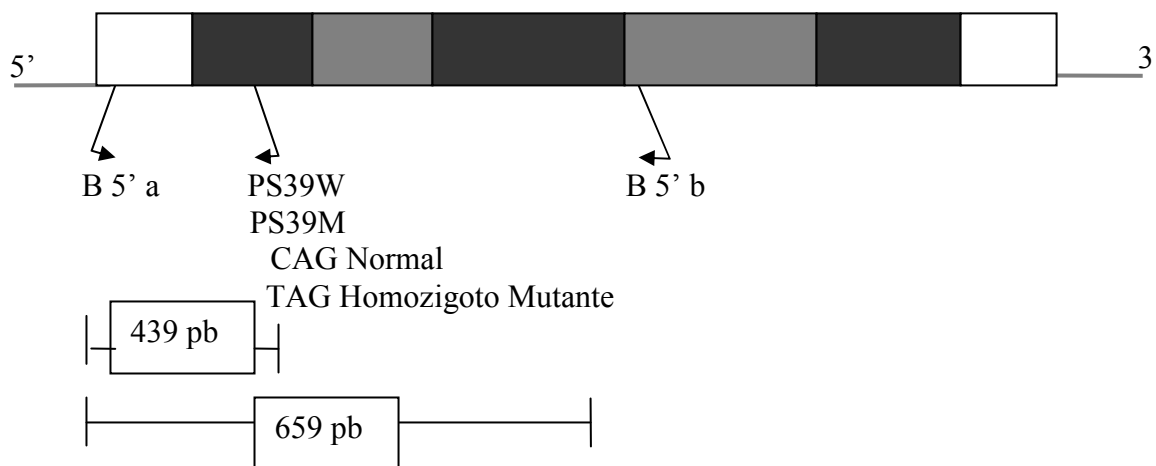


Figura 9. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene da globina beta humana na caracterização molecular da Beta Talassemia CD39.

A mistura da reação foi preparada com um volume final de 25µL e os microtubos foram transportados para a Sala de Amplificação, onde se realizou a reação de amplificação nas seguintes condições: 1 ciclo de 7 minutos à 95°C; 32 ciclos de 50 segundos minuto à 94°C; anelamento durante 50 segundos

54°C e 50 segundos de extensão a 72 °C; extensão final de 7 minutos à 72°C e ∞ 4 °C.

Amplificou-se um fragmento de DNA com uma banda controle de 659pb, sendo assim, para a confirmação de Beta CD39 heterozigoto, as misturas com a presença destes iniciadores específicos formariam uma banda de 659pb e os iniciadores específicos formariam uma banda de 439pb (Figura 10). Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0%, sob corrente constante de 80V por 40 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 11).

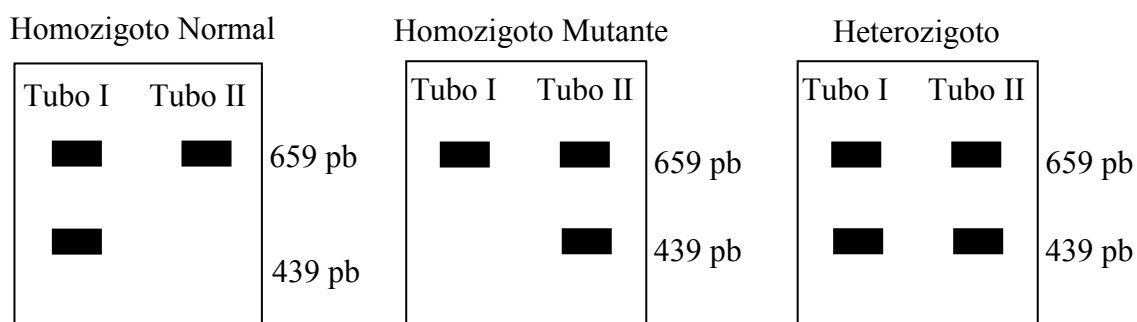


Figura 10. Representação esquemática do produto esperado da amplificação por PCR-Alelo Específica da hemoglobina Beta CD39.

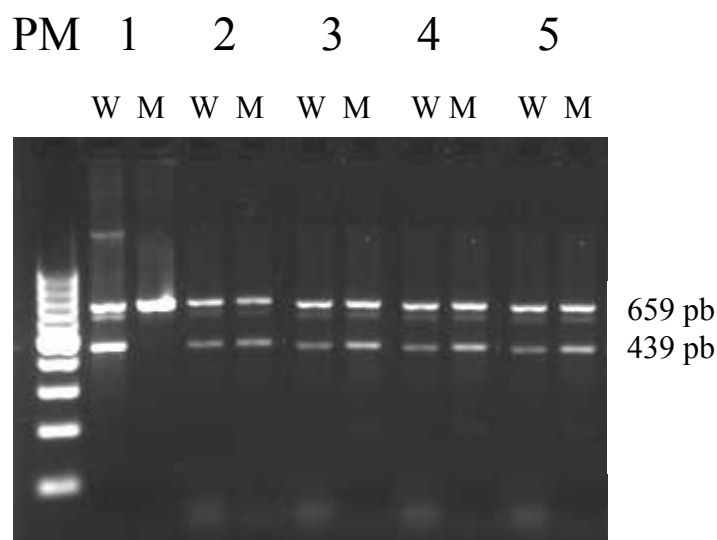


Figura 11. Representação fotográfica de gel de agarose do PCR-AE para CD39. Linha 1 - normal; linhas 2, 3, 4 e 5 – heterozigotos para a mutação. PM= 100pb, W= alelo selvagem, M= alelo mutante.

3.2.6- PCR/RFLP para *MTHFR* (FROSST et al., 1995):

Princípio:

Para a amplificação do segmento que codifica a *MTHFR* foram utilizados os seguintes iniciadores (Figura 12):

Iniciador 1- MHTFR1: 5' – TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGG – 3'

Iniciador 2 - MTHFR2: 5' – AGGACGGTGCGGTGAGAGTG – 3'

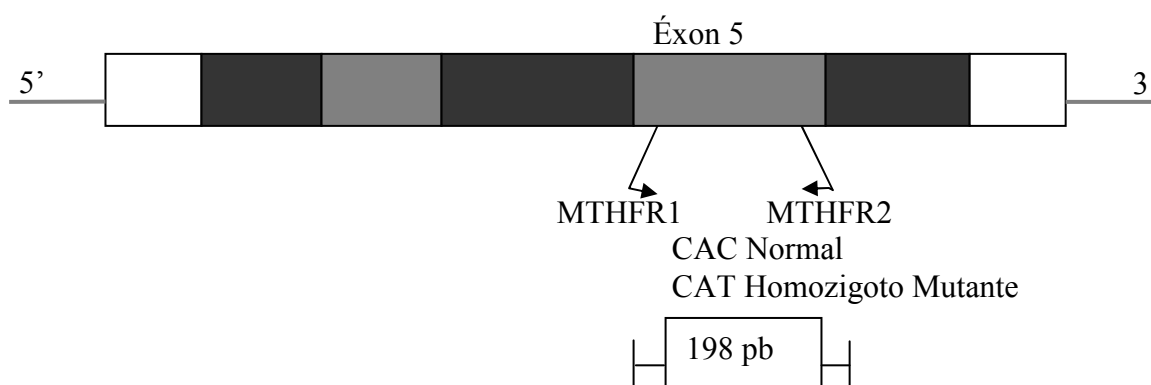


Figura 12. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene do *MTHFR* e sua caracterização molecular.

A mistura da reação foi preparada com um volume final de 34.4µL e os microtubos foram transportados para o termociclador, onde se realizou a reação de amplificação nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C, 35 ciclos de 1 minuto à 94°C; anelamento durante 1 minuto à 66°C; extensão 1 minuto à 72°C, extensão final por 7 minutos à 94°C e ∞ 4 °C.

Amplificou-se um fragmento de DNA de 198pb, que foi digerido com a enzima *HinfI* Fast (Fastdigest Fermentas) a 37°C durante 5 minutos. Como a mutação C→ T gera um sítio de restrição para enzima *HinfI* (G↓ANTC), após a digestão, o alelo normal gera um fragmentos de 198pb e o alelo mutante gera dois fragmentos de 175pb e 23pb (Figura 13). Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3,0%, sob corrente constante de 100V por 40 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 14).

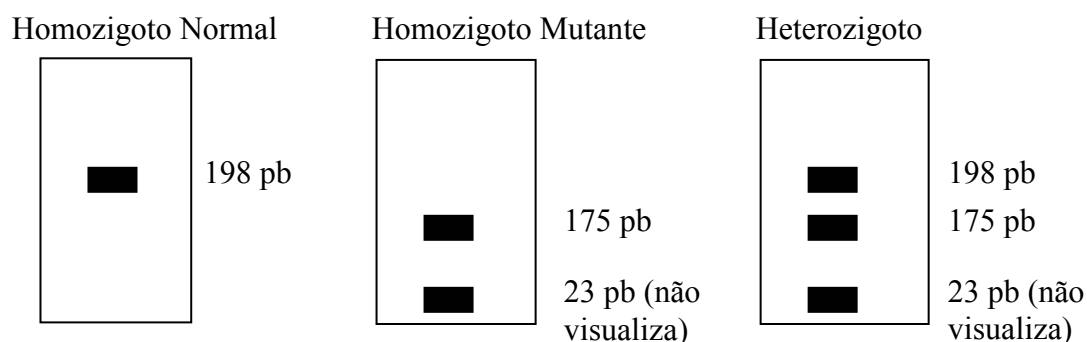


Figura 13. Representação esquemática do produto esperado após digestão por *HinfI* Fast do amplificado por PCR-RFLP do gene do *MTHFR*.

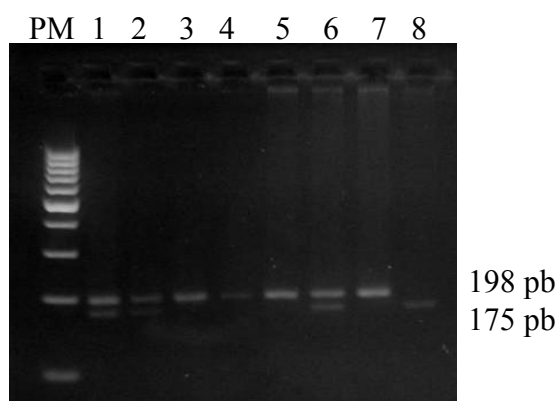


Figura 14. Representação fotográfica do gel de agarose do PCR-RFLP para *MTHFR*. Linhas 1, 2 e 6 - indivíduos heterozigotos; linhas 3, 4, 5 e 7 indivíduos normais; linha 8 - indivíduos homozigoto mutante. PM= 100 pb.

3.2.7- PCR para *CISTATIONINA BETA SINTASE* (TSAI et al., 1996):

Princípio:

Para o polimorfismo da *Cistationina-beta-sintase*, o DNA foi amplificado utilizando os seguintes iniciadores (Figura 15):

Iniciador 1 - Cys A: 5'-CTGGCCTTGAGCCCTGAA-3'

Iniciador 2 - Cys B: 5'-GGCCGGGCTCTGGACTC-3'

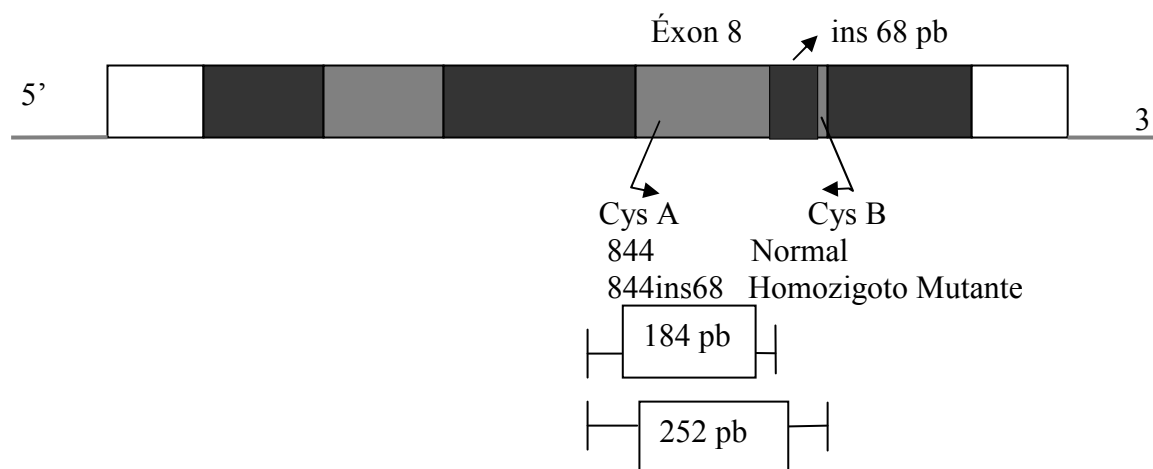


Figura 15. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene da *cistationina-beta-sintase* e sua caracterização molecular.

A mistura da reação foi preparada com um volume final de 24 μ L e os microtubos foram transportados para o termociclador, onde se realizou a reação de amplificação nas seguintes condições: 1 ciclo de 5 minutos à 94°C; 30 ciclos de 1 minuto à 94°C, anelamento durante 1 minuto à 60°C; extensão 1 minuto à 72°C, extensão final por 7 minutos à 72°C e ∞ 4°C.

Amplificou-se um fragmento de DNA com uma banda controle de 184pb, sendo assim, como a mutação é uma inserção de 68pb, o homozigoto mutante forma uma banda de 252pb e o homozigoto normal uma banda de 184pb (Figura 16). Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0%, sob corrente constante de 80V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 17).

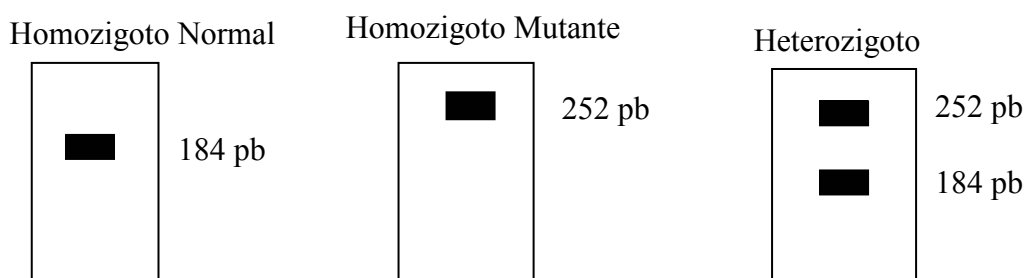


Figura 16. Representação esquemática do produto esperado após amplificação por PCR do gene da *cistationina-beta-sintase*.

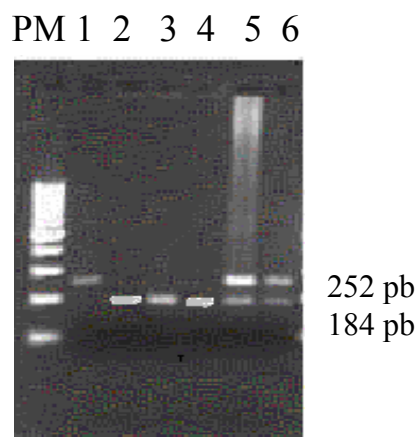


Figura 17. Representação fotográfica do gel de agarose do PCR para cistatonina-beta-sintase. Linha 1 - indivíduo mutante; linhas 5 e 6 - indivíduos heterozigotos; linhas 2, 3 e 4 - indivíduos normais. PM= 100 pb.

3.3. Caracterização da Vaso-oclusão nos Doentes Falciformes:

As complicações vaso-oclusivas, tais como, acidente vascular encefálico isquêmico; necrose avascular do fêmur; priapismo; úlceras maleolares; osteomielite; complicações na gravidez; retinopatia; hemorragia alveolar e infarto esplênico, foram confirmadas pelo clínico hematologista que acompanhava os pacientes na época do evento e a revisão dos prontuários foi realizada sob supervisão do médico pesquisador participante desse estudo.

3.4. Análise estatística:

Aplicou-se o teste de Qui-Quadrado (χ^2), com nível de significância de 95% ($p=0.05$) e a correção de Yates em $n<5$ para comparação das frequências dos polimorfismos nas regiões estudadas e a frequência dos polimorfismos em relação ao gênero. Para comparar as frequências alélicas de cada cidade aplicou-se a fórmula de Hardy-Weinberg, e posteriormente, χ^2 para verificação do possível equilíbrio. Realizaram-se os cálculos para o Risco Relativo (RR) e Intervalo de Confiança (IC) e posteriormente χ^2 para verificação da significância, sendo o banco de dados processado e os cálculos realizados no programa Statistica 7.0.

Resultados

IV. Resultados:

1 – Caracterização e estratificação da amostragem:

Dos trezentos pacientes avaliados, 169 (56,33%) foram do gênero feminino e 131 (43,66%) do gênero masculino, com idade variando de seis meses a cinquenta e oito anos, sendo a maioria com faixa etária de 10-29 anos (48,84%). Quanto à etnia, 92,30% apresentavam características de afro-descendentes e 7,69% de caucasóides (Tabela 1). Em 40 pacientes não foi possível realizar a coleta de dados das características demográficas, interferentes ambientais e fisiopatológicos.

Tabela 1. Características Demográficas dos pacientes estudados.

Parâmetros			Pacientes	
			(n)	(%)
Gênero (n=300)	Homens		131	43,66%
	Mulheres		169	56,33%
Faixa etária (n=260)	Infanto-jovem	0 -> 19 anos	111	42,68%
	Adulto	20 ->39 anos	106	40,76%
	Adulto-envelhecete	40 ->59 anos	43	16,53%
Etnia (n=260)	Afro-descedente		240	92,30%
	Caucasóide		20	7,69%
Total			100%	

Os dados sobre uso de medicamentos, de bebidas alcoólicas e cigarros, assim como de presença de manifestações clínicas de origem vascular

foram obtidos nas declarações dos próprios pacientes no momento da obtenção dos termos de consentimento.

Quanto ao uso de cigarros e bebida alcoólica, 15 pacientes fumam e sete pararam a mais de um ano; 37 fazem uso de bebida alcoólica e um parou a mais de um ano (Tabela 2).

Problemas de saúde como hipertensão, hepatite C, sopro, rinite alérgica, doença de Chagas, osteoporose, pneumonia, desgaste do fêmur, tuberculose, priapismo, osteomelite, miocardiopatia, catarata, embolia pulmonar, artrite reumatóide, úlceras, esplenectomia e AVC foram relatados por 39 pacientes e não foram observações de prontuários. Dezenove pacientes possuem ou possuíram familiares que têm ou tiveram trombose (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização dos relatos de interferentes ambientais e patologia (n=260).

Parâmetros		Pacientes	
		(n)	(%)
Cigarros	Nunca	238	91,53%
	Fez uso	7	2,69%
	Em uso	15	5,76%
Álcool	Nunca	222	85,38%
	Fez uso	1	0,38%
	Em uso	37	14,23%
Patologias (*)	Total	39	15%
	Familiares com trombose	19	6,53%
	AVC	18	6,92%
	Úlceras	5	1,92%
	Necrose da cabeça do fêmur/quadril	7	2,68%
	Cardiopatias	6	2,30%
	Trombose na perna	2	0,76%
	Trombose na órbita	1	0,38%

(*) O n foi de 39 pacientes que relataram ter alguma patologia.

O uso dos medicamentos, ácido fólico e hidroxiuréia foi relatado em 230 e 104 pacientes, respectivamente. Para o parâmetro de uso de contraceptivo oral, 46 pacientes não foram avaliados, devido à não coleta desse dado. Dessas pacientes, 20 mulheres fazem uso e 12 relataram ter interrompido o uso há mais de um ano (Tabela 3).

Tabela 3. Número de pacientes em relação a medicamentos.

Medicamentos		Pacientes
Ácido Fólico		230
Hidroxiuréia		104
Contraceptivo Oral	Em uso	20
	Fez uso	12

2 – Genotipagem das doenças falciformes:

Para a confirmação da HbS foi realizada PCR-AE ou PCR-RFLP, com o objetivo de avaliar os estados homozigoto e heterozigoto para a mutação, dos quais 155 (51,66%) foram homozigotos e 145 (48,33%) apresentaram perfil heterozigoto para de HbS. Desses 145 pacientes com perfil molecular $\beta S/\beta A$, 45 (15,00%) foram HbSC e 100 (33,33%) apresentaram perfil de HbS/Beta talassemia (Tabela 4).

Tabela 4. Perfil das hemoglobinas nos pacientes em estudo, segundo seu genótipo e localidade (n=300).

Diagnóstico	São Paulo (n=39)	Brasília (n=33)	Goiânia (n=94)	Rio de Janeiro (n=96)	S. J. Rio Preto (n=38)	TOTAL (n=300)
SS	25	17	48	52	13	155
SC	0	10	19	14	2	45
S/Beta	14	6	27	30	23	100

3 - Avaliação dos polimorfismos:

A. Metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*):

Para a deficiência no gene da enzima *MTHFR*, 194 (64,66%) pacientes com Doença Falciforme foram normais (WT/WT), 93 (31,00%) heterozigotos (WT/C677T) e 13 (4,33%) homozigotos mutantes (C677T/C677T) (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência Genotípica da mutação no gene da metilenotetrahidrofolato redutase nos pacientes estudados.

<i>MTHFR</i>	n	Frequência Genotípica
WT/WT	194	64,66%
WT/C677T	93	31,00%
C677T/C677T	13	4,33%
Total	300	100%

Avaliando a relação genótipo de HbS e *MTHFR* com o gênero, pode-se observar diferença significativa com maior frequência do genótipo WT/WT nos pacientes falciformes (54,12%) e no gênero feminino (59,04%). Essa relação também foi observada no genótipo WT/C677T, 43 pacientes SS (46,23%)

sendo 23 do gênero feminino (55,81%), no genótipo C677T/C677T, 6 pacientes SS (46,23%), sendo 4 do gênero feminino (75,00%). Entre os genótipos de HbS, não houve diferença significativa entre os gêneros em relação aos genótipos de *MTHFR* no perfil WT/WT ($p=0,064$), WT/C677T ($p=0,446$) e C677T/C677T ($p=0,157$).

Analisando a presença da mutação nas faixas etárias citadas anteriormente, houve diferença significativa no perfil WT/C677T ($p=0,016$) e no perfil C677T/C677T não foi significativa ($p=0,221$).

Avaliando a frequência alélica da *MTHFR*, pode-se observar que, em todas as cidades de proveniência dos pacientes com Doença Falciforme, os alelos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e que as suas frequências não possuem diferença significativa ($\chi^2=1,981$, GL=4, $p=0,739$; Tabela 6).

Tabela 6. Frequência Alélica da mutação do gene do *metilenotetrahidrofolato redutase* nos pacientes estudados de cada região com respectivo equilíbrio de Hardy-Weinberg (n=300).

<i>MTHFR</i>	n	Alelos mudados	Frequência Alélica	Valor p	Hardy-Weinberg
São Paulo	78	22	28,20%	0,063	Sim
Brasília	66	16	24,24%	0,509	Sim
Goiânia	188	36	19,14%	0,462	Sim
Rio de Janeiro	192	30	15,62%	0,993	Sim
S. J. Rio Preto	76	15	19,73%	0,865	Sim
Total	600	120	20,00%		

Teste de Qui Quadrado ($\chi^2=1,981$, GL=4, $p=0,739$).

Para as comparações das frequências genotípicas da mutação por localidade, aplicou-se o Teste de Qui Quadrado comparando as cidades duas a duas, e para as análises com $n < 5$ foi utilizada a correção de Yates. Para o perfil WT/C677T, em Brasília, encontrou-se diferença significativa com as outras cidades, menos com Goiânia ($p=0,162$). Assim, foram as duas regiões com maiores frequências genotípicas (Tabela 7). Para o perfil C677T/C677T, em São

Paulo observou-se diferença significativa com todas as localidades (valor p próximo de zero) (Tabela 8), corroborando com sua maior frequência genotípica.

Tabela 7. Frequência genotípica da mutação no gene da *metilenotetrahidrofolato redutase* nas cinco localidades avaliadas (n=300).

<i>MTHFR</i>	WT /WT n (%)	WT/C677T n (%)	C677T/C677T n (%)
São Paulo	23 (58,97%)	10 (25,64%)	6 (15,38%)
Brasília	18 (54,54%)	14 (42,42%)	1 (3,03%)
Goiânia	60 (63,82%)	32 (33,33%)	2 (2,12%)
Rio de Janeiro	68 (70,83%)	26 (27,08%)	2 (2,08%)
S. J. Rio Preto	25 (65,78%)	11 (28,94%)	2 (5,26%)
Total	194	93	13

Tabela 8. Valores de p nos perfis WT/C677T e C677T/C677T comparando as frequências genotípicas das cidades comparado duas a duas.

WT/C677T	São Paulo	Brasília	Goiânia	Rio de Janeiro	S. J. Rio Preto
São Paulo	x	0,010	NS	NS	NS
Brasília	0,001	x	NS	0,003	0,012
Goiânia	NS	NS	x	NS	NS
Rio de Janeiro	NS	0,018	NS	x	NS
S. J. Rio Preto	NS	0,038	NS	NS	x
C677T/C677T	São Paulo	Brasília	Goiânia	Rio de Janeiro	S. J. Rio Preto
São Paulo	x	nulo	nulo	nulo	nulo
Brasília	nulo	x	NS	NS	NS
Goiânia	nulo	NS	x	NS	NS
Rio de Janeiro	nulo	NS	NS	x	NS
S. J. Rio Preto	nulo	NS	NS	NS	x

Teste Qui Quadrado com grau de liberdade=1, $p \leq 0,05$. NS= não significante; x= sem comparação.

Quando avaliados quanto ao gênero, as frequências da mutação observadas entre os grupos analisados não tiveram diferenças significativas, em heterozigose e homozigose ($\chi^2=1,341$; GL=2; $p=0,512$; Tabela 9). E não houve também diferença significativa avaliando as cidades separadamente, quanto ao gênero em relação à mutação no gene da *MTHFR*.

Tabela 9. Frequências da mutação no gene da *metilenotetrahidrofolato redutase* quanto ao gênero (n=300).

<i>MTHFR</i>	n	Masculino (n=131)	Frequência Relativa	Feminino (n=169)	Frequência Relativa	Valor p
WT/WT	194	80	59,54%	114	68,63%	0,428
WT/C677T	93	45	34,35%	48	28,40%	0,446
C677T/C677T	13	6	6,10%	7	2,95%	0,317
χ^2	300	$\chi^2=1,341$; GL=2; $p=0,512$				

Teste Qui Quadrado, $p \leq 0,05$.

B. *Cistationina-Beta-Sintase (CBS)*:

Para a deficiência da enzima *CBS*, 202 (67,33%) pacientes foram normais (WT/WT), 90 (30,00%) heterozigotos (WT/844ins68) e oito (2,66%) homozigotos mutantes (844ins68/844ins68) para a mutação 844ins68 (Tabela 10).

Tabela 10. Frequência Genotípica da mutação no gene da *cistationina-beta-sintase* nos pacientes estudados (n=300).

<i>Cistationina-beta-sintase</i>	n	Frequência Genotípica
WT/WT	202	67,33%
WT/844ins68	90	30,00%
844ins68/844ins68	8	2,66%
Total	300	100%

Avaliando a relação entre o genótipo de HbS e de *CBS* com relação ao gênero dos pacientes, pode-se observar uma maior frequência do genótipo WT/WT nos pacientes falciformes (51,98%) e no gênero feminino (55,23%). Essa relação também foi observada no genótipo WT/844ins68 (50,00% pacientes HbSS, 73,30% gênero feminino). No genótipo 844ins68/844ins68, 6 (75,00%) foram pacientes HbSS e 6 (83,00%) do gênero masculino. Entre os genótipos de HbS, não houve diferença significativa entre os gêneros em relação aos genótipos de *CBS* no perfil WT/WT ($p=0,283$) e 844ins68/844ins68 ($p=0,102$); e no perfil WT/844ins68 houve diferença ($p=0,002$).

Analisando a presença da mutação nas faixas etárias citada anteriormente, houve diferença significativa no perfil WT/844ins68 ($p=0,033$) e no perfil 844ins68/844ins68 essa diferença não foi significativa ($p=0,598$).

Avaliando a frequência alélica para a inserção 844ins68 no gene da *CBS*, pode-se observar que em todas as localidades os alelos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e as suas frequências alélicas não apresentam diferenças significativas ($\chi^2=2,905$; GL=4; $p=0,574$; Tabela 11).

Tabela 11. Frequência Alélica da mutação no gene da *cistationina-beta-sintase* nos pacientes estudados (n=300).

<i>Cistationina-beta-sintase</i>	n	Alelos mutados	Frequência Alélica	Valor p	Hardy-Weinberg
São Paulo	78	11	14,10%	0,865	Sim
Brasília	66	7	10,60%	0,750	Sim
Goiânia	184	35	19,02%	0,247	Sim
Rio de Janeiro	192	35	18,22%	0,896	Sim
S. J. Rio Preto	76	18	23,68%	0,768	Sim
Total	600	106	17,66%		

Teste de Qui Quadrado ($\chi^2=2,905$; GL=4; $p=0,574$).

A análise da frequência genotípica da mutação, comparando as cidades duas a duas pelo Teste de Qui Quadrado e a correção de Yates para $n < 5$, permitiu uma melhor visualização da presença da mutação nesses grupos. Para o perfil WT/844ins68 não houve um padrão de diferença significativa entre as frequências observadas nas localidades, sendo São Paulo diferente de Goiânia ($p=0,042$, $p=0,012$) e de S. J. Rio Preto ($p=0,023$, $p=0,004$) e a recíproca verdadeira para ambos; Brasília apresentou diferença entre Goiânia ($p=0,019$) e S. J. Rio Preto ($p=0,010$, $p=0,006$), sendo só a última recíproca verdadeira. O perfil 844ins68/844ins68 não foi encontrado em nenhum paciente de Brasília e também não houve um padrão de diferença significativa. Sendo Goiânia diferente do Rio de Janeiro ($p=0,011$) e de S. J. Rio Preto ($p=0,040$, $p=0,006$), para a última, a recíproca foi verdadeira, S. J. Rio Preto diferiu de São Paulo, em termos da frequência do genótipo ($p=0,0005$) (Tabela 12 e 13).

Tabela 12. Frequência genotípica da mutação no gene da *cistationina-beta-sintase* nas cinco localidades avaliadas ($n=300$).

<i>Cistationina-beta-sintase</i>	WT/WT n (%)	WT/844ins68 n (%)	844ins68/844ins68 n (%)
São Paulo	29 (74,35%)	9 (23,07%)	1 (2,56%)
Brasília	26 (78,78%)	7 (21,21%)	0 (0)
Goiânia	60 (63,82%)	33 (35,10%)	1 (1,06%)
Rio de Janeiro	65 (67,70%)	27 (28,12%)	4 (4,16%)
S. J. Rio Preto	22 (57,89%)	14 (36,84%)	2 (5,26%)
Total	202	90	8

Quando avaliados quanto ao gênero, as frequências observadas da mutação, entre os grupos analisados, não tiveram diferença significativa em heterozigose e homozigose ($\chi^2=4,619$; GL=2; $p=0,099$; Tabela 14). Analisando o fator gênero em cada cidade, houve diferença significativa somente na cidade do

Rio de Janeiro, com maior frequência no gênero masculino ($\chi^2=7,372$; GL=2; $p=0,025$).

Tabela 13. Valores de p nos perfis WT/844ins68 e 844ins68/844ins68 comparando as frequências genotípicas das cidades comparando duas a duas.

WT/844ins68	São Paulo	Brasília	Goiânia	Rio de Janeiro	S. J. Rio Preto
São Paulo	x	NS	0,042	NS	0,023
Brasília	NS	x	0,019	NS	0,010
Goiânia	0,012	NS	x	NS	NS
Rio de Janeiro	NS	NS	NS	x	NS
S. J. Rio Preto	0,004	0,006	NS	NS	x

844ins68/844ins68	São Paulo	Brasília	Goiânia	Rio de Janeiro	S. J. Rio Preto
São Paulo	x	#	NS	NS	nulo
Brasília	#	x	#	#	#
Goiânia	NS	#	x	NS	0,040
Rio de Janeiro	NS	#	0,011	x	NS
S. J. Rio Preto	NS	#	0,006	NS	x

Teste Qui Quadrado com grau de liberdade=1, $p \leq 0,05$. NS= não significante; x=sem comparação; # = nenhum paciente encontrado.

Tabela 14. Frequências da mutação no gene da *cistationina-beta-sintase* quanto ao gênero (n=300).

<i>Cistationina-beta-sintase</i>	n	Masculino (131)	Frequência Relativa	Feminino (169)	Frequência Relativa	Valor p
WT/WT	198	91	69,46%	111	65,68%	0,796
WT/844ins68	90	34	25,95%	56	33,13%	0,362
844ins68/844ins68	8	6	4,58%	2	1,18%	0,180
χ^2	300	$\chi^2=4,619$; GL=2; $p=0,099$				

Teste Qui Quadrado, $p \leq 0,05$.

A frequência das heranças em conjunto dos dois polimorfismos (*MTHFR* e *cistationina-beta-sintase*) também foi determinada, sendo presente em

27 dos pacientes (9,00%). Observamos que tanto a frequência do polimorfismo *MTHFR* quanto da *CBS* foram maiores no grupo de homozigoto para HbS do que para aqueles com genótipo S/ β talassemia e SC. A presença de dupla heterozigose ou associação entre homozigose e heterozigose para os polimorfismos avaliados foram presentes em sua grande maioria em indivíduos com HbSS.

4 – Correlação entre o quadro clínico e polimorfismos avaliados:

Dos 94 pacientes do Hospital das Clínicas/FM/UFG, portadores de hemoglobinopatia S, que consentiram em participar dessa pesquisa, houve três exclusões porque seus prontuários não foram encontrados para a revisão final. A Tabela 15 mostra as características demográficas e clínicas desses pacientes e o resultado dos polimorfismos avaliados.

Os resultados mostram que não houve diferença significativa na relação entre os gêneros, os alelos normais e mutantes do polimorfismo para *MTHFR* ($p=0,884$) e na inserção 844ins68 no gene da enzima *CBS* ($p=0,111$). Quando se agrupou os pacientes em três faixas etárias, também constatou-se que não houve diferença significativa ao comparar os alelos normais e mutantes do polimorfismo para *MTHFR* ($p=0,202$) e *CBS* ($p=0,482$). O mesmo resultado foi encontrado quando se avaliou as complicações vaso-oclusivas ($p=0,326$) e os polimorfismos.

Quando se comparou os genótipos encontrados para a doença falciforme (SS, S/Beta e SC) e os polimorfismos pesquisados, verificou-se que também não houve diferença significativa entre os alelos normais e mutantes para *MTHFR* ($\chi^2=0,772$; GL=2; $p=0,680$) e *CBS* ($\chi^2=5,266$; GL=2; $p=0,072$). Entretanto, para os genótipos falciformes, HbSS e HbS/Beta, com os polimorfismos avaliados, verificou-se diferença significativa entre os alelos normais e mutantes para a mutação no gene da enzima *CBS* ($\chi^2=5,219$; GL=1; $p=0,022$), em que se constatou maior frequência desse polimorfismo no genótipo SS (Tabela 15).

Tabela 15. Característica demográficas e clínica dos pacientes estudados no HC/UFG correlacionados com os polimorfismos MTHFR e CBS (n=91).

Características		Pacientes		MTHFR		CBS		
		n	Alelo Normal	Alelo Mutante	p	Alelo Normal	Alelo Mutante	p
		91	147	35		150	32	
Características demográficas								
Sexo	Feminino	51	82	20	0,884	80	22	0,111
	Masculino	40	65	15		70	10	
	P		0,320	0,546		0,563	0,127	
Idade	0-19	45	74	16	0,202	72	18	0,482
	20-39	39	74	14		65	13	
	40-59	7	9	5		13	1	
	P		0,000	0,166		0,000	0,006	
Características da doença falciforme								
Genótipo	SS	48	77	19	0,680	75	21	0,072
	S/Beta	23	39	7		43	3	
	SC	20	31	9		32	8	
	P		0,003	0,191		0,009	0,017	
p (SS x S/Beta)			0,510			0,022		
Episódios de dor	artralgia	70	114	26	0,410	113	27	0,171
	mialgia	35	59	11		52	18	
	síndrome torácica	6	12	0		11	1	
	sem dor		21	5		24	2	
	P		0,000	0,000		0,000	0,000	
p (SS x S/Beta)			0,933			0,045		
Uso de medicamento								
Hidroxiuréia	Sim	49	76	22	0,159	76	22	0,103
	não	42	72	12		73	11	
	P		0,000	0,000		0,000	0,000	
Ácido fólico	sim	84	135	33	0,468	133	32	0,469
	não	7	11	1		11	1	
	P		0,000	0,025		0,000	0,025	
Complicações vaso-oclusivas								
AVC	sim	5	7	3	0,407	7	3	0,389
	não	86	140	32		143	29	
Necrose avascular	sim	11	17	5	0,657	20	2	0,375
	não	80	130	30		130	30	
Priapismo	sim	5	9	1	0,449	8	2	0,443
	não	35	56	14		62	8	
Úlceras	sim	4	7	1	1,000	5	3	0,142
	não	87	140	34		145	29	
Osteomelite	sim	6	11	1	0,466	10	2	1,000
	não	85	136	34		140	30	
Complicações na gravidez	sim	6	10	2	1,000	9	3	0,503
	não	45	72	18		71	19	
Retinopatia	sim	16	23	9	0,160	25	7	0,482
	não	75	124	26		125	25	
Hemorragia alveolar	sim	2	3	1	0,577	2	2	0,1430
	não	89	144	34		148	30	
Infarto esplênico	sim	4	5	3	0,182	5	3	0,148
	não	87	142	32		145	29	

Teste de Qui Quadrado (χ^2), Grau de Liberdade= 1, $p \leq 0,05$.

Quando se comparou as complicações vaso-oclusivas presentes nos pacientes com as frequências alélicas normais e mutantes dos polimorfismos avaliados detectou-se uma diferença significativa para a mutação no gene da enzima *CBS* ($\chi^2=6,502$; GL=1; $p=0,011$), com frequência aproximadamente três vezes maior do que aquela encontrada para os pacientes com ausência de manifestações trombóticas (Tabela 16).

Tabela 16. Frequência alélica para as mutações no gene das enzimas *MTHFR* e da *CBS* em relação à presença ou ausência das complicações vaso-oclusivas nos pacientes estudados (n=91).

	Presença de complicações vaso-oclusivas (n= 59)				Ausência de complicações vaso-oclusivas (n= 32)						
	Número de alelos		Frequência Alélica		Número de alelos		Frequência Alélica				
	W	M	W	M	W	M	W	M	X2	GL	p
<i>MTHFR</i>	92	26	0,78	0,22	55	9	0,86	0,14	1,698	1	0,193
<i>CBS</i>	91	27	0,77	0,23	59	5	0,92	0,08	6,502	1	0,011

Teste de Qui Quadrado (χ^2), GL (grau de liberdade), $p \leq 0,05$.

A interação entre os dois polimorfismos esteve presente em 11 pacientes falciformes estudados (12,08%). Desses, 91% (n=10) apresentaram manifestações vaso-oclusivas, sendo, portanto uma associação significativa para o aumento do risco de manifestações vaso-oclusiva nos pacientes falciformes ($\chi^2=8,158$; GL=1; $p=0,004$). A heterozigose na inserção de 68pb no gene da *CBS* quando combinada com a mutação no gene *MTHFR*, aumenta em duas vezes o risco de doença vaso-oclusiva, arterial e/ou venosa (RR:2,16; 95% IC: 0,31-1,68; Tabela 17).

A correlação dos genótipos da hemoglobina com a presença de manifestações vaso-oclusivas foi significativa ($\chi^2=9,969$; GL=2; $p=0,007$), com maior incidência no genótipo SS. A comparação de pacientes com presença e ausência de complicações vaso-oclusivas foi significativa ($\chi^2=8,380$; GL=2; $p=0,015$), tendo maior frequência de pacientes com presença de complicações

vaso-oclusivas e esses, com predominância do genótipo SS (Tabela 18). Porém, quando avaliados em conjunto, genótipos de hemoglobina e os polimorfismos estudados, não houve diferença significativa, tanto para a presença de alteração na *CBS* ($\chi^2=3,441$; GL=1; $p=0,064$) quanto para o polimorfismo na *MTHFR*, ($\chi^2=0,799$; GL=1; $p=0,371$).

Tabela 17. Análise do fator de risco devido à presença da interação dos polimorfismos e complicações vaso-oclusivas nos pacientes estudados (n=49).

Interação <i>MTHFR/CBS</i>	Manifestação Vaso-oclusivas		Total
	Sim	Não	
Presente	10	1	11
Ausente	16	22	38
Total	26	23	49
χ^2	$\chi^2=8,158$, GL=1; $p=0,004$		

Teste de Qui Quadrado (χ^2), GL (grau de liberdade), $p \leq 0,05$.

Tabela 18. Relação da interação dos genótipos de hemoglobina com a presença ou ausência de complicações vaso-oclusivas (n=91).

Genótipo	Presença de complicações vaso-oclusivas (n=59)	Ausência de complicações vaso-oclusivas (n=32)	n=91
SS	34	14	48
S/Beta	8	15	23
SC	12	8	20
χ^2	$\chi^2=9,969$; GL=2; $p=0,007$		
χ^2	$\chi^2=8,380$; GL=2; $p=0,015$		

Teste de Qui Quadrado (χ^2); GL (grau de liberdade); $p \leq 0,05$.

A presença de complicações vaso-oclusivas nos pacientes que faziam uso de hidroxiuréia, não mostrou diferença significativa entre os polimorfismos no gene das enzimas *MHTFR* ($\chi^2=0,149$; GL=1; $p=0,700$) e *CBS* ($\chi^2=2,702$; GL=1; $p=0,151$). Em relação à administração de hidroxiuréia e transfusões de sangue, os pacientes foram agrupados em três categorias de

resposta clínica às transfusões de sangue: boa resposta quando não necessitavam de transfusão; resposta moderada quando necessitavam de transfusão, mas com intervalos maiores àqueles que recebiam, quando não faziam uso de hidroxiuréia; e os não responsáveis aqueles que depois de um ano de tratamento com hidroxiuréia, permaneceram no mesmo nível de dependência transfusional. A Tabela 19 mostra que houve diferença significativa ($\chi^2=7,405$; GL=2; $p=0,025$) quando se comparou a necessidade transfusional entre os pacientes que recebiam hidroxiuréia e aqueles que não faziam uso desse medicamento.

Tabela 19. Relação entre o número de transfusões, administração ou não de hidroxiuréia e genótipos de hemoglobina S (n=48).

Transfusão (n=49)									
	Boa resposta			Resposta moderada			Não responsáveis		
Genótipo	SS	SC	S/Beta	SS	SC	S/Beta	SS	SC	S/Beta
Hidroxiuréia	16	5	3	10	2	3	5	1	2
%	49%			30,60%			16,30%		
Necessidade Transfusional (n=13)									
	Raramente			Ocasionalmente			Freqüentemente		
Genótipo	SS	SC	S/Beta	SS	SC	S/Beta	SS	SC	S/Beta
Sem uso de Hidroxiuréia	1	2	1	2	0	0	3	0	4
%	31%			15%			54%		
χ^2	$\chi^2=7,405$; GL=2; p=0,025								

Teste de Qui Quadrado (χ^2), GL=grau de liberdade; $p \leq 0,05$. Raramente= menos que 3 transfusões anuais; Ocasionalmente= menos que 6 transfusões anuais, Frequentemente= mais que 6 transfusões anuais.

Por outro lado, a revisão dos prontuários evidenciou, por meio das observações clínicas anotadas pelos médicos assistentes e exames laboratoriais anexados, que 33,33% dos pacientes que faziam uso de hidroxiuréia, tiveram aumento de Hemoglobina Fetal, em percentual maior do que 15%, em relação à dosagem inicial, principalmente no genótipo SS (60% dos pacientes).

Ressalta-se que dos 91 pacientes estudados, houve dois óbitos em 2008, com diagnóstico de Síndrome Torácica Aguda.

Discussão

V. Discussão:

Os brasileiros formam uma das mais heterogêneas populações no mundo, resultado de séculos de trocas gênicas entre etnias diferentes vindas para o Brasil no período colonial: colonizadores europeus, representados por portugueses, escravos africanos, e os indígenas autóctones (PARRA et al., 2003). Como era de se esperar, a mutação que origina a Hemoglobina S, de origem africana, referenda a característica do grupo de pacientes aqui estudados com a maior porcentagem dos pacientes que se auto declararam afro-descendentes. Dos pacientes que se declararam brancos, a S/Beta talassemia foi a hemoglobinopatia mais freqüentemente diagnosticada.

A introdução do exame para diagnóstico de Doenças Falciformes na triagem neonatal desde 2001, permitiu a análise precoce da afecção e, adicionado aos avanços no tratamento e procedimentos profiláticos, tem contribuído para a sobrevivência de pacientes. Esses dados contribuem para a melhoria das condições de saúde e o aumento da expectativa de vida. Assim, justifica-se a faixa etária dos pacientes estudados, entre 0 a 19 anos (42,68%). Pensamos que a prevalência de mulheres (56,33%) justifica-se pelo fato de que no Brasil as pessoas do sexo feminino têm mais preocupação com a saúde, e também porque são as mães que levam e acompanham os filhos nas consultas médicas. Sendo assim, mais acessíveis às informações sobre assuntos relacionados com a saúde e, por isso, são mais cordatas para realizar exames investigatórios que possam auxiliar no diagnóstico ou no conhecimento da doença dos filhos.

Por outro lado, as características das amostras de Doentes Falciformes estudados, com mais mulheres e idade acima dos 20 anos, enquadra-se na faixa de maior risco de Trombose Venosa (FRIEDMAN et al., 2001; REFSUM et al., 2004), e estudos de meta-análise têm confirmado a associação da hiper-homocisteínemia com eventos tromboembólicos, enfatizando que essa alteração é fator de risco trombogênico (EICHNGER et al., 1998; HAINAUT et al., 2002).

Em nossa pesquisa 5,00% dos pacientes referiram uso de cigarros e 2,30% afirmaram que havia parado de fumar há mais de um ano e constatou-se que 0,66% dos pacientes referiram uso de contraceptivos e cigarro. Por isso, não foi possível estabelecer parâmetros de comparação entre o cigarro e contraceptivo oral como fatores desencadeantes ou de agravamento das manifestações clínicas referidas pelos pesquisados, no questionário.

É importante ressaltar que os riscos para trombose venosa em indivíduo normal é de uma vez, e que o uso de contraceptivo oral eleva esse risco para quatro vezes (VANDENBROUCKE et al., 1994). Pomp et al. (2008) investigaram o efeito de cigarros associado com contraceptivos orais em mulheres com faixa etária entre 18-39 anos e para aquelas que não fazem uso de contraceptivos orais, o cigarro foi associado com o aumento de duas vezes no risco para desenvolver trombose. Mulheres que fazem uso de contraceptivos e não fumam tiveram risco de 3.9 vezes maior. Nas que fumam e usam contraceptivos orais o risco para desenvolver trombose é de 8,8 vezes a mais, quando comparadas com as não fumantes e que não usam contraceptivo oral.

A Doença Falciforme utiliza vias e mecanismos semelhantes aos descritos para a trombose venosa, assim contribui para a mesma. Já que, Virchow discutiu três categorias amplas de fatores que contribuem para trombose venosa: alterações no fluxo sanguíneo, mudanças na constituição do sangue e alterações na parede do vaso (DAHLBACK, 2008). A doença falciforme tem sido reconhecida com uma condição inflamatória e acredita-se que a progressão desse estado contribui para as complicações clínicas dos falcêmicos, dentre as complicações, cita-se a hipercoagulabilidade e as crises dolorosas. Os mediadores inflamatórios (IL-1, IL-8) ativam as células endoteliais e assim, aumentam a adesão das células vermelhas falcizadas, um potencial início para os episódios vaso-oclusivos (WALTER et al., 2006; WOOD et al., 2008). A vaso-oclusão na doença falciforme, que pode envolver micro e macrovascularização, é o evento mais importante dessa doença e explica as manifestações clínicas que os pacientes apresentam (SERJEANT, 2001).

O grupo de pacientes estudados apresentou 51,66% de homozigose para hemoglobina S, assim permitiu-nos uma melhor caracterização dos processos tromboembólicos nesses Doentes Falciformes com associação dos polimorfismos avaliados (*MTHFR* e *CBS*). As complicações relatadas da Doença Falciforme causadas pela oclusão microvascular e necrose isquêmica em tecidos, seguidos de adesão de eritrócitos falcêmicos são fatores pré-trombóticos e estão mais acentuados no estado de homozigose da doença, HbSS (SERJANT, 2001).

A mutação no gene da enzima *MTHFR* foi detectada em 31,00% dos pacientes estudados, em heterozigose e 4,33%, em homozigose. A frequência observada em heterozigose dos Doentes Falciformes foi compatível com a mencionada na literatura mundial, de 40% (ULRICH, 2002), e não teve influência significativa quando analisadas estatisticamente em conjunto. A homozigose, dessa mesma mutação, no grupo estudado foi diferente da prevalência da população brasileira de 10% dos indivíduos homozigotos, mencionado por Arruda et al. (1995). Todavia por ser a mutação menos comum em africanos, (1,6%), consideramos essa variável como o principal motivo da menor prevalência no grupo de Doentes Falciformes, o que está concordante com Gueant-Rodrigues e colaboradores (2006). Pesquisas realizadas no Brasil por Couto et al (2004), em Doentes Falciformes, também encontraram frequências semelhantes à nossa: 36,2% para heterozigose e 5,3% para homozigose.

Acreditamos que os nossos resultados sem distinção entre os gêneros, pode ser uma realidade encontrada na população brasileira. Pois, o polimorfismo *MTHFR* C677T mostra ter um efeito gênero específico na população em geral, sendo mais frequentes em homens (CHANGO et al., 2000). Entretanto no Brasil, Rios et al. (2007), analisando a presença da mutação C677T em afro-descendentes brasileiros com doença arterial coronariana não encontraram diferença entre os gêneros.

Considerando que 50% dos homozigotos para a mutação na *MTHFR* apresentam baixa atividade enzimática, e que esse fato leva ao risco adicional de manifestações clínicas de Doença Vascular, podemos inferir que com a hipometilação do DNA no metabolismo do ciclo do ácido tetraidrofólico e

vitamina B₁₂, com envolvimento de VCAM e Nox (FRISO, et al., 2002; JUO et al., 2008), há exacerbação de sintomas e predisposição para Doença Vascular nos pacientes falciformes.

O resultado obtido em nosso estudo para a frequência de heterozigotos 844ins68 nos Doentes Falciformes foi de 30,00%, o que mostra diferença quando comparados com grupos controles analisados na mesma região (BONINI-DOMINGOS et al., 2005). Todavia o estado heterozigoto parece ser relativamente comum em algumas regiões, como o relatado em caucasóides da América do Norte e Europa com aproximadamente 12-14%, e de 38% em etnia negra, corroborando nossos resultados (KLUIJTMANS et al., 1997; FRANCO et al., 1998a). A heterozigosidade para a inserção no gene da enzima *cistationina-beta-sintase* é uma condição comum caracterizada por hiper-homocisteinemia leve e uma tendência discreta à aterosclerose e trombose (BOERS et al., 1985). A homozigose de 2,66% para a mutação no gene da *cistationina-beta-sintase* detectada em nossos pacientes é relevante, já que essa mutação é mencionada em 5% na população em geral (KLUIJTMANS et al., 1997).

No presente estudo a frequência da mutação no gene da enzima *cistationina-beta-sintase* não apresentou diferença significativa entre os gêneros quando se comparou o grupo em geral; mas avaliando os resultados separadamente, de acordo com a origem das amostras de sangue testadas, houve diferença significativa para o Rio de Janeiro, com maior frequência entre os homens. A literatura menciona que a enzima *cistationina-beta-sintase* humana possui uma regulação dependente de testosterona, e há relatos de que o polimorfismo 844ins68 possui um efeito gênero específico, sendo mais frequentes nos homens (VITVITSKY et al., 2007).

A dupla heterozigose para os dois polimorfismos (*MTHFR* e *CBS*) aumenta o risco de evento vaso-oclusivo, ainda mais com a associação à Doença Falciforme (De FRANCHIS et al., 2000; COUTO et al., 2004). Como a fisiopatologia da Doença Falciforme incluem fatores genéticos e ambientais, encontramos 13 indivíduos com HbSS e mutação para os genes *MTHFR* e *CBS* com influência do gênero, sendo nove mulheres e quatro homens. A maioria

desses pacientes foram heterozigotos para ambas as mutações, com todos fazendo uso de ácido fólico e dez de hidroxiuréia. Desses treze pacientes, quatro relataram eventos vaso-oclusivos, sendo todos do sexo feminino. A paciente que relatou Acidente Vascular Cerebral foi diagnosticada como homozigoto para *MTHFR*; e na paciente com trombose nos membros inferiores foi detectada homozigose para *CBS*.

A análise pontual dos 91 Doentes Falciformes provenientes do Hospital das Clínicas (FM/UFG) de Goiânia foi mister para avaliarmos a correlação dos genótipos de Hemoglobina, dos polimorfismos estudados e as manifestações vaso-oclusivas confirmadas pelos prontuários. Assim, não observamos diferença significativa entre as faixas etárias avaliadas e o aumento no risco de tromboembolismo ($p=0,326$), resultado discordante com a literatura que relata o aumento desse risco com o aumento da idade e na presença de fatores ambientais (GOLDHABER; TAPSON, 2004). A presença de sete pacientes na faixa etária de 40-59 anos pode ser o motivo da não significância. Essa baixa incidência nessa faixa etária pode ser explicada pela maior frequência de óbito nos pacientes com mais de 40 anos.

Os nossos resultados relacionados com as manifestações clínicas da Doença Falciforme sendo mais severa e freqüente nos indivíduos com HbSS, em relação aos genótipos de HbS/Beta talassemia e HbSC estão de acordo com a literatura. Houve uma diferença significativa ($\chi^2=9,969$; GL=2; $p=0,007$, Tabela 18) na presença das complicações vaso-oclusivas nos pacientes com HbSS em relação aos outros genótipos e conseqüentemente, maior incidência dos episódios de dor nos pacientes homozigotos. O aumento da concentração de hemoglobina A₂ e redução da hemólise parece ter proteção contra AVC (ELDOR; RACHMILEWITZ, 2002).

Na clínica foi observado melhora da maioria dos pacientes com administração de hidroxiuréia, em relação aos episódios de dor, e redução significativa do número de transfusões desses pacientes ($\chi^2=7,405$; GL=2; $p=0,025$), sendo que 49% apresentando boa resposta e 30,60% resposta moderada em relação à redução do número de transfusões. No grupo em estudo apenas

16,30% não foram responsíveis a administração de hidroxiuréia (Tabela 19). A melhora na clínica dos Doentes Falciformes em uso de hidroxiuréia resulta da redução da expressão das integrinas $\alpha 1\beta 2$ em leucócitos (principalmente dos neutrófilos). Isso ocorre dentro de um mês de terapia, antes de qualquer aumento significativo de hemoglobina Fetal. A hidroxiuréia também reduz a expressão de CD36 e da integrina $\alpha 4\beta 1$ nas células vermelhas. Entretanto, nem todos que recebem a terapia com hidroxiuréia, são biologicamente responsíveis ao agente (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2007).

Quanto ao aumento de hemoglobina fetal após o uso de hidroxiuréia, 60% dos pacientes SS analisados tiveram aumento maior de 15% em relação à hemoglobina Fetal inicial. Efeito esse explicado por elementos genéticos que estão ligados ou não ao agrupamento do gene beta que modulam a expressão de HbF. Sabe-se que o gene que codifica a HbS é influenciado por um dos 5 haplótipos do agrupamento do gene beta globina, no qual são associados com expressão diferenciada dos genes para HbF (STEINBERG et al., 1997). Em nosso estudo os pacientes S/Beta e SC que foram analisados quanto ao aumento de hemoglobina fetal após o uso de hidroxiuréia, apresentaram aumento menor que 15% em relação à hemoglobina Fetal inicial.

As análises estatísticas mostram que a população em estudo está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para os dois polimorfismos, *MTHFR* e *CBS*, como descritos na Tabela 6 e Tabela 11, respectivamente. Portanto, este grupo de pacientes pode ser considerado representante de uma população geral.

No grupo avaliado, a mutação no gene *MTHFR* não aumenta o risco de evento vaso-oclusivo ($\chi^2=1,698$; GL=1; $p=0,193$; Tabela 16). Esse resultado concorda com estudo feito na população brasileira por Morielli e colaboradores (2002), todavia, contradiz os dados mencionados na literatura da população mundial (SHMELEVA et al., 2003; JUO et al., 2008). Portanto, vale ressaltar que muitos estudos sugerem que alguns polimorfismos que influenciam o metabolismo do folato e são fatores de risco para doenças vaso-oclusiva, os seus efeitos variam entre as diferentes populações, com evidente interação gene-gene e gene-nutriente (DEVLIN et al., 2008).

Uma ingestão diária moderada de suplementação de ácido fólico (150 µg/d) mostra conter o efeito do heterozigoto e homozigoto na mutação no gene da enzima *MTHFR*, na concentração de homocisteína total no soro, e isso para a maioria dos grupos étnicos. Estudos indicam que a ingestão de ácido fólico de 200 ou 400µg/d é associada com aproximadamente 60% ou 90%, respectivamente, da redução máxima da concentração de homocisteína que pode ser utilizado como terapia de ácido fólico (HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION, 2005). Em nosso estudo oitenta e quatro pacientes falciformes estudados faziam uso de 5 mg de ácido fólico diariamente, o que pode justificar os resultados encontrados, onde se constatou que não houve diferença significativa para o polimorfismo *MTHFR* em relação à presença de complicações vaso-oclusivas (Tabela 16). Portanto, o ácido fólico pode ser um fator protetor nos pacientes falciformes que possuem o polimorfismo no gene *MTHFR*, diminuindo assim, a incidência de complicações vaso-oclusivas.

A relação da inserção de 68pb no gene da *CBS* e as manifestações vaso-oclusivas foi significativa nos pacientes falciformes estudados ($\chi^2=6,502$; GL=1; $p=0,011$; Tabela 16), confirmando os dados da literatura que a reconhece como fator de risco para o tromboembolismo venoso e doença arterosclerótica vascular precoce (TSAI et al., 1996).

Nos detectamos que 91% dos pacientes com a interação dos polimorfismos *CBS* e *MTHFR* tiveram complicações vaso-oclusivas ($\chi^2=8,158$; GL=1; $p=0,004$; Tabela 17), permitindo concluir que, nesses pacientes, o aumento do fator de risco é de duas vezes (RR=2,16 95% IC:0,31-1,68). Esses achados concordam com a proposta de De Franchis e colaboradores (2000) que mencionaram a interação dos polimorfismos como fator de risco para precocidade da oclusão venosa e arterial na população em geral.

Conclusão

VI. Conclusão:

Os Doentes Falciformes apresentaram Frequências de Heterozigose e Homozigose semelhantes aos já descritos na literatura da população mundial e brasileira para os dois polimorfismos.

A presença da mutação 844ins68 no gene da *CBS* mostrou ser um fator de risco para evento vaso-oclusivo nos pacientes falciformes.

Considerando a escassez de estudos no Brasil envolvendo afro-descendentes, a frequência e interação dos polimorfismos genéticos observados, os nossos resultados poderão contribuir para melhorar o entendimento das manifestações clínicas nos pacientes e sugerir condutas profiláticas e de tratamento para abrandar o sofrimento e melhorar a qualidade de vida desses pacientes.

Referências

ALAIN, J.; MARENGO-ROWE, M. D. Structure-function relations of human hemoglobins. **Baylor University Medical Center Proceedings** v.19, p.239-245, 2006.

ALAMAWI, W. Y.; AMEEN, G.; TAMIM, H.; FIINAN, R. R.; IRANI-HAKIME, N. Factor v, prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase [*MTHFR*] C677T gene polymorphism in angiographically documented coronary artery disease. **Journal Thrombosis Thrombolysis** v.17, p.199-205, 2004.

ANDREASSI, M. G.; BOTTO, N.; COCCI, F.; BATTAGLIA, D.; ANTONIOLI, E.; MASETTI, S. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease. **Human Genetics** v.112, p.171-7, 2003.

ARRUDA, V. R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M.; COSTA, F. F.; REITSMA, P. H. Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian Population. **American Journal Hematologic** v.49, p.242-3, 1995.

ATAGA, K. I.; ORRINGER, E. P. Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. **American Journal Medicine** v.115, n.9, p.721-728, 2003.

BALLAS, S. K., MOHANDAS, N. Pathophysiology of vaso-occlusion. **Hematology/ Oncology Clinics of North America** v.10, n.6, 1996.

BANDEIRA, F. M. G. C et al. Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina S. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** v.29, n.2, p.171-176, 2007.

BAYAZIT, A. K.; KILINC, Y. Natural coagulation inhibitors (protein C, protein S, antithrombin) in patients with sickle cell anemia in a steady state. **Pediatrics International** v.43, p.592-596, 2001.

BERTINA, R. M.; KOELEMANN, B. P. C.; KOSTER, T.; ROSENDAAL, F. R.; DIRVEN, R. J.; DE RONDE, H.; VAN DER VELDEN, P. A.; REITSMA, P. A. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature** v.369, p.64-67, 1994.

BERTHOLO, L. C.; MOREIRA, H. W. Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre elas e talassemias beta. **Jornal Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial** v.42, n.4, p. 245-251, 2006.

BILSBOROUGH, W.; GREEN, D. J.; MAMOTTE, C. D. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism, homocysteine, cholesterol and vascular endothelial function. **Atherosclerosis** v.169, p.131–138, 2003.

BOERS, G. H. J.; SMALS, A. G. H.; TRIJBELS, F. L. M.; et al. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. **New England Journal of Medicine** v.313, p.709-715, 1985.

BONINI-DOMINGOS, C. R.; ZAMARO, P. J. A.; MENDIBURU, C. F. Frequency of the 844ins68 mutation on the cystathionine beta-synthetase gene in deep venous thrombosis patients. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** v.27, n.1, p.12-15, 2005.

BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias**, São José do Rio Preto: HN, 2006.

BOTTO, N.; ANDREASSI, M. G.; MANFREDI, S.; MASETTI, S.; COCCI, F.; COLOMBO, M.G. Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. **European Journal Human Genetics** v.11, p.671-8, 2003.

CHANGO, A.; DE COURCY, G. P.; BOISSON, F.; GUILLAND, J. C.; BARBE, F.; PERRIN, M. O.; CHRISTIDES, J. P.; RABHI, K.; PFISTER, M.; GALAN, P.; HERCBERG, S.; NICOLAS, J. P. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase common mutations, folate status and plasma homocysteine in healthy French adults of the Supplementation en Vitamines et Mineraux Antioxydants (SU.VI.MAX) cohort. **British Journal of Nutrition** v.84, p.891–896, 2000.

CHEN, C.; HALKOS, M. E.; SUROWIEC, S. M. Effects of homocysteine on smooth muscle cell proliferation in both cell culture and artery perfusion culture models. **Journal Surgery Rex** v.88, n.1, p.26–33, 2000.

CHINELATO-FERNANDES, A. R. Diferenciação molecular de mutantes de hemoglobinas humanas na população brasileira. São José do Rio Preto, 227f. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista 2003.

COUTO, F. D.; ADORNO, E. V.; MENEZES, J. F.; MOURA NETO, J. P.; RÊGO, M. A.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. C677T polymorphism of the *MTHFR* gene and variant hemoglobins: a study in newborns from Salvador, Bahia, Brazil. **Caderno de Saúde Pública** v.20, n.2, p.529-33, 2004.

COVAS, D. T.; de LUCENA ANGULO I.; VIANNA BONINI, P. P.; ZAGO, M. A. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica** v.89, n.3, p.273-80, 2004.

DAHLBÄCK, B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. **Blood** v.112, p.19-27, 2008.

DE FRANCHIS, R.; FERMO, I.; MAZZOLA, G.; SEBASTIO, G.; DI MINNO, G.; COPPOLA, A. Contribution of the cystathionine h-synthase gene (844ins68) polymorphism to the risk of early-onset venous and arterial occlusive disease and of fasting hyperhomocysteinemia. **Thrombosis and Haemostasis** v.84, p.576–82, 2000.

DEN HEIJER, M.; LEWINGTON, S.; CLARKE, R. Homocysteine, *MTHFR* and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** v.3, p.292–299, 2005.

DEVLIN, A. M.; CLARKE, R.; BIRKS, J.; EVANS, J. G.; HALSTED, C. H. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. **American Journal Clinical Nutrition** v.83, p.708 –13, 2006.

DINIZ, D.; GUEDES, C.; TRIVELINO, A. Educação para a genética em saúde pública: um estudo de caso sobre a anemia falciforme. **Ciência & Saúde Coletiva** v.10, n.2, p.365-372, 2005.

EICHINGER, S.; STUMPFLN, A.; HIRSCHL, M. Hyperhomocysteinemia is a risk factor of recurrent venous thromboembolism. **Thrombosis and Haemostasis** v.80, n.4, p.566-9, 1998.

ELDIBANY, M. M.; CAPRINI, J. A. Hyperhomocysteinemia and thrombosis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine** v.131, p.872-884, 2007.

ELDOR, A.; RACHMILEWITZ, E. A. The hypercoagulable state in thalassaemia. **Blood** v.99, p.36-43, 2002.

FABRY, M. E.; KAUL, D. K. Sick cell vaso-occlusion. In: Nagel, R.L. (eds.). **Hematology/Oncology Clinics of North America Hemoglobinopathies** v.5, n.3, p. 375-98, 1991.

FRANCO, R. F.; ELION, J.; LAVINHA, J.; KRISHNAMOORTHY, R.; TAVELLA, M. H.; ZAGO, M. A. Heterogeneous ethnic distribution of the 844ins68 in the cystathionine beta-synthase gene. **Human Heredity** v.48, p.338-342, 1998a.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sick cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of Clinical Investigation** v.117, n.4, p. 850-858, 2007.

FRIEDMAN, A. N.; BOSTOM, A. G.; SELHUB, J.; LEVEY, A. S.; ROSENBERG, I. H. The kidney and homocysteine metabolism. **Journal of the American Society of Nephrology** v.12, p.2181-2189, 2001.

FRISO, S.; CHOI, S. W.; GIRELLI, D.; MASON, J. B.; DOLNIKOWSKI, G. G.; BAGLEY, P. J. A common mutation in the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** v.99, n.8, p.5606-11, 2002.

FROSST, P.; BLOM, H. J.; MILOS, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics** v.10, p.111-3, 1995.

GOLDHABER, S. Z.; TAPSON, V. F.; DVT FREE STEERING COMMITTEE. A prospective registry of 5,451 patients with ultrasound-confirmed deep vein thrombosis. **American Journal of Cardiology** v.93, n.2, p.259-62, 2004.

GUEANT-RODRIGUEZ, R. M.; GUEANT, J. L.; DEBARD, R.; THIRON, S., HONG, L. X.; BRONOWICKI, J. P.; NAMOUR, F.; CHABI, N.W.; SANNI, A.; ANELLO, G. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677t and 1298c alleles and folate status: A comparative study in Mexican, West African, and European populations. **American Journal of Clinical Nutrition** v.83, p.701-707, 2006.

HAINAUT, P.; JAUMOTTE, C.; VERHELST, D. Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolism: a risk factor more prevalent in the elderly and in idiopathic cases. **Thrombosis Research** v.106, n.2, p.121-5, 2002.

HEBBEL, R. P.; OSAROGIAGBON, R.; KAUL, D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. **Clinical Hemorheology and Microcirculation** v.11, p.129-51, 2004.

HEBBEL, R. P. Adhesion of sickle red cells to endothelium: Myths and future directions. **Transfusion Clinique Biologique** v.15, n.1-2, p.14-8, 2008.

HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a metaanalysis of the randomized trials. **American Journal Clinical Nutrition** v.82, p.806-12, 2005.

HOUSTON, P. E.; RANA, S.; SEKHSARIA, S., PERLIN, E., KIM, K. S.; CASTRO, O. L. Homocysteine in sickle cell disease: relationship to stroke. **American Journal of Medicine** v.103, p.192-196, 1997.

INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, Variante β -Thalassemia Short Program Instruction Manual. **Bio-Rad Laboratories**, 1999.

JUO, S. H. H.; LIAO, Y. C.; KUO, C. L.; WANG, Y.; HUANG, C. S.; CHIANG, H. C.; LIU, C. S. The *MTHFR* 677 C/T polymorphism influences plasma levels of adhesion molecules and nitric oxide. **Thrombosis Research** v.121, p.549-554, 2008.

KANG, S. S.; ZHOU, J.; WONG, P. W.; KOWALISYN, J.; STROKOSCH, G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. **American Journal Human Genetics** v.43, p.414-21, 1988.

KEIJZER, M.B.; DEN HEIJER, M.; BLOM, H. J. Interaction between hyperhomocysteinemia, mutated methylenetetrahydrofolate-reductase (*MTHFR*) and inherited thrombophilic factors in recurrent venous thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** v.88, n.5, p.723-8, 2002.

KHAJURIA, A.; HOUSTON, D. S. Induction of monocyte tissue factor by homocysteine: a possible mechanism for thrombosis. **Blood** v.96, p.966-72, 2000.

KLUITJMANS, L. A. J.; BLOM, H.J.; BOERS, G. H. J.; VAN OOST B. A.; TRIJBELS, F. J. M.; VAN DEN HEUVEL, L. P. W. J. Two novel missense mutations in the cystathionine b-synthase gene in homocystinuric patients. **Human Genetic** v.96, p.250, 1995.

KLUIJTMANS, L. A. J.; BOERS, G. H. J.; KRAUS, J. P.; VAND DEN HEUVEL, L. P. W. J.; CRUYSBURG, J. R. M.; TRIJBELS, F. J. M.; BLOM, H. J. A common 844ins68 insertion variant in the cystathionine β -synthase gene. **Biochemical and Molecular Medicine** v.62, p.23-25, 1997.

KRAUS, J. P. Biochemistry and Molecular genetics of cystathionine β -synthase deficiency. **European Journal of Pediatric** v.157, p.S50-S53, 1998.

LENTZ, S. R. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** v.3, n.8, p.1646-54, 2005.

LOBO, C. et al. Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Panamamericana de Salud Publica** v.13, n.2/3, p.154-159, 2003.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **Journal of Clinical Pathology** v.18, p.790-792, 1965.

McLLROY, S. P.; DYNAN, K. B.; LAWSON, J. T. Moderately elevated plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotype, and risk for stroke, vascular dementia, and Alzheimer disease in Northern Ireland. **Stroke** v.33, n.10, p.2351-6, 2002.

MENDALL, M. A.; PATEL, P.; ASANTE, M. Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. **Heart** v.78, p.273-277, 1997.

MERKEL, K. H. H.; GINSBERG, P. L.; PARKER, J. R. J. C.; POST, M. J. D. Cerebrovascular disease in sickle cell anemia: a clinical, pathological and radiological correlation. **Stroke** v.9, p.45-52, 1978.

MILLER, G. J.; BAUER, K. A.; COOPER, J. Á.; ROSENBERG, R. D. Activation of the coagulant pathway in cigarette smokers. **Thrombosis and Haemostasis** v.79, p.549-553, 1998.

MORELLI, V. M.; LOURENCO, D. M.; D'ALMEIDA, V.; FRANCO, R. F.; MIRANDA, F.; ZAGO, M. A.; NOGUTI, M. A. E.; CRUZ, E.; KERBAUY, J. Hyperhomocysteinemia increases the risk of venous thrombosis independent of the C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in selected Brazilian patients. **Blood Coagulation & Fibrinolysis** v.13, n.3, p.271-275, 2002.

MUNKE, M.; KRAUS, J. P.; OHURA, T.; FRANCKE, U. The gene for cystathionine β -synthase (*CBS*) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17. **American Journal of Human Genetic** v.42, p.550-559, 1988.

NAKAMURA, Y.; YOSHIZAWA, H. Homocysteine as a risk factor for ischemic heart disease. **Rinsho Byori** v.50, n.8, p.807-14, 2002.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM—Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction U. S. D. o. H. a. H. S. White Paper on Hydroxyurea Risk:Benefit Oct 2007. In: NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of hydroxyurea, 2007.

NAOUM, P. C. Anemias imigrantes: a origem das anemias hereditárias no Brasil. **Ciência Hoje** v.3, n.14, p. 59-64, 1984.

NAOUM, P.C. **Eletroforese: técnicas e diagnósticos**. São Paulo: Livraria Santos, 174p, 1990.

NAOUM, P. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Doença falciforme no Brasil. Origem, genótipos, haplótipos e distribuição geográfica. **Jornal Brasileiro de Patologia** v.33, p.145-153, 1997.

NAOUM, P. C; NAOUM, F. A. **Doença das Células Falciformes**. São José do Rio Preto: **Sarvier**, 2004.

NAESS, I. A.; CHRISTIANSEN, S. C.; ROMUNDSTAD, P.; CANNEGIER, S. C.; ROSENDAAL, F. R.; HAMMERTROM, J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** v.5, p.692–699, 2007.

NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** v.39, n.1, p.51-56, 2003.

ORLANDO, G. M.; NAOUM, P. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, SP, v.22, n.2, p.111-121, 2000.

PLATT, O. S.; BRAMBILLA, D. J.; ROSSE, W. F.; MILNER, P. F.; CASTRO, O.; STEINBERG, M. H.; KLUG, P. P. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **New England Journal of Medicine** v.330, p.1639–1644, 1994.

PARRA, F. C.; AMADO, R. C.; LAMBERTUCCI, J. R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C. M.; PENA, S. D. J. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.7, n.100(1), p.177–182, 2003.

PENA, S. D. J. DNA Bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. **Electrophoresis** v.12, n.2-3, p.146-152, 1991.

PENA, S. D. J. Reasons for banishing the concept of race from Brazilian medicine. **História, Ciência, Saúde-Manguinhos** v.12, n.2, p.321-46, 2005.

POMP, E. R.; ROSENDAAL, F. R.; DOGGEN, C. J. M. Smoking increases the risk of venous thrombosis and acts synergistically with oral contraceptive use. **American Journal of Hematology** v.83, p.97-102, 2008.

PORTO, M. P.; GALDIERI, L.C.; PEREIRA, V.G.; VERGANI, N.; DA ROCHA, J. C.; MICHELETTI, C.; MARTINS, A. M.; PEREZ, A. B.; ALMEIDA, V. D. Molecular analysis of homocystinuria in Brazilian patients. **Clinical Chimica Acta** v.362, n.1-2, p.71-8, 2005.

RAMALHO, A.; PAIVA E SILVA, R. Aconselhamento genético. In: GUERRA, A.; JUNIOR, G. Menino ou menina: os distúrbios da diferenciação do sexo. São Paulo: **Manole** p.208-217, 2002.

RAMALHO, A.; MAGNA, L.; PAIVA E SILVA, R. A portaria nº 822-01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** v.19, n.4, p.1195-1199, 2003.

REFSUM, H.; SMITH, A. D.; UELAND, P. M.; NEXO, E.; CLARKE, R. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. **Clinical Chemistry** v.50, p.3-32, 2004.

RIOS, D. L.; D'ONOFRIO, L. O.; CARVALHO, H. G.; SANTOS-FILHO, A.; GALVÃO-CASTRO, B. Sex-specific effect of the thermolabile C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene on angiographically assessed coronary artery disease in Brazilians. **Human Biology** v.79, n.4, p.453-61, 2007.

SASAKI, Y.; UENO, I.; NAKAKOSHI, R.; ISHIKAWA, S.; HIDAKA, E.; FURUWATARI, C.; FURIHATA, K.; KATSUYAMA, T.; OKUMURA, N. Differentiation of selected abnormal hemoglobin by PCR-RFLP method. **Rinsho Byori** v.45, n.12, p.1163-6, 1997.

SEBASTIO, G., SPERANDEO, M. P.; PANICO, M.; DE FRANCHIS, R.; KRAUS, J. P.; ANDRIA, G. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. **American Journal Human Genetic** v.56, p.1324-1333, 1995.

SERJEANT GR. The emerging understanding of sickle cell disease. **Brasilian Journal of Haematology** v.112,n.1, p.3-18, 2001.

SHMELEVA, V. M.; KAPUSTIN, S. I.; PAPAYAN, L. P.; SOBCZYNSKA-MALEFORA, A.; HARRINGTON, D. J.; SAVIDGE, G. F. Prevalence of hyperhomocysteinemia and the *MTHFR*C677T polymorphism in patients with arterial and venous thrombosis from North Western Russia. **Thrombosis Research** v.111, p.351-58, 2003.

SILVESTRONI, E.; BIANCO, I.; Screening for microcytemia in Italy: analyses of data collected in the past 30 years. **American Journal of Human Genetics** v.27, n.2, p.198-212, 1975.

SPERANDEO, M. P.; DE FRANCHIS, R.; ANDRIA, G.; SEBASTIO, G. A 68-bp insertion found in a homocystinuric patient is a common variant and is skipped by alternative splicing of the cystathionine beta-synthase mRNA. **American Journal of Human Genetics** v.59, n.6, p.1391-3, 1996.

STEINBERG, M.H.; LU, Z. H.; BARTON, F. B.; TERRIN, M. L.; CHARACHE S.; DOVER, G. J. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Determinants of response to hydroxyurea. **Blood** v.89, p.1078–1088, 1997.

STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. In: Sickle cell disease and thalassaemia. Editor: G. P. Rodgers, London, **Balliere Tindall** Ed. 168, 1998.

TELEN, M. J. Erythrocyte adhesion receptors: blood group antigens and related molecules. **Transfer Medical Version** v.19, p.32-44, 2005.

THOMPSON, M.W.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Genética Médica**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Trad. da 7a. Edição Americana, 2008.

TSAI, M. Y.; BIGNELL, M.; SCHWICHTENBERG, K.; HANSON, N. Q. High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. **American Journal of Human Genetics** v.59, n.6, p.1262-7, 1996.

ULRICH, C. M.; ROBIEN, K.; SPARKS, R. Pharmacogenetics and folate metabolism- a promising direction. **Pharmacogenomics** v.3, p.299-313, 2002.

VAN AKEN, B. E.; DEN HEIJER, M.; BOS, G. M. J. Recurrent venous thrombosis and markers of inflammations. **Thrombosis and Haemostasis** v.83, p.536-539, 2000.

VANDENBROUCKE, J. P.; KOSTER, T.; BRIET, E.; REITSMA, P. H.; BERTINA, R. M.; ROSEBDAAL, F. R. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. **Lancet** v.344, p.1453-1457, 1994.

VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis oh human hemoglobins. **American Journal of Clinical Pathology** v.49, n.3, p.440-442, 1968.

VITVITSKY, V.; PRUDOVA, A.; STABLER, S.; DAYAL, S.; LENTZ, S. R.; BANERJEE, R. Testosterone regulation of renal cystathionine beta-synthase: implications for sex-dependent differences in plasma homocysteine levels. **American Journal of Physiology Renal Physiology** v.293, n.2, p.594-600, 2007.

WALTER, P.B.; FUNG, E.B.; KILLILEA, D.W.; JIANG, Q.; HUDES, M.; MADDEN, J.; PORTER, J.; EVANS, P.; VICHINSKY, E.; HARMATZ, P. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with betathalassaemia or sickle cell disease. **British Journal Haematology** v.135, p.254-263, 2006.

WANG, G.; WOO, C. W.; SUNG, F. L.; SIOW, Y. L. Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia:role of chemokine and adhesion molecules. **Arterioscler, Thrombosis and Vascular Biology** v.22, n.11, p.1777-83, 2002.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B.; Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization** v.8, n.79, p.704-712, 2001.

WILCKEN, B.; BAMFORTH, F.; LI, S. Geographical and ethnic variation of the C677T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reducte (*MTHFR*): findings from over 7000 new-borns from 16 areas world wide. **Journal of Medical Genetics** v.40, p.619-625, 2003.

WOLFGANG, H.; OBEID, R.; JOUMA, M. Hyperhomocysteinemia and vitamin B-12 deficiency are more striking in Syrians than in Germans - causes and implications. **Atherosclerosis** v.166, p.143-50, 2003.

WOOD, K. C.; HSU, L. L.; GLADWIN, M. T. Sick cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. **Free Radical Biology & Medicine** v.44, n.8, p.1506-28, 2008.

ZAGO, M. A. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. In. **Considerações Gerais**, Brasília: ANVISA, 2001.

ZAGO, M. A.; SILVA-PINTO, A. C. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética a insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** v.29, p.207-214, 2007.

Apêndice

Apêndice A – Artigos

Título: Frequência dos polimorfismos de base única para as enzimas *metilenotetrahidrofolato redutase* e *cistationina-beta-sintase* em doentes falciformes.

Autores: Jacob, Maza Alves¹; Bastos, Celso da Cunha²; Bonini-Domingos, Claudia Regina¹; Viana-Baracioli, Lígia Márcia da Silveira³; Ricci Junior, Octávio³; Magalhães, Isis Maria Quezado Soares⁴; Cançado, Rodolfo Delfini⁵; Chiattonne, Carlos⁵; Lobo, Clarisse Lopes de Castro⁶.

Instituições: 1. UNESP – IBILCE, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – São José do Rio Preto, SP. 2. Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas – Goiânia, GO. 3. Hemocentro – São José do Rio Preto, SP. 4. Hospital de Apoio – Brasília, DF. 5. Hemocentro da Santa Casa de São Paulo – São Paulo, SP. 6. Hemorio – Rio de Janeiro, RJ.

Resumo

A Doença Falciforme é caracterizada por anemia hemolítica e eventos vaso-oclusivos que resultam em crises de dor aguda, com danos crônicos e progressivos nos tecidos e órgãos. Pacientes com Doença Falciforme mostram ativação da coagulação sanguínea e sistema fibrinolítico, bem como aumento da atividade plaquetária e consumo de inibidores da coagulação, especialmente durante as crises vaso-oclusivas. A hiper-homocisteinemia, resultante de mutações no gene da *metilenotetrahidrofolato redutase* (*MTHFR*) e no gene da *cistationina-beta-sintase* (*CBS*), constituem fatores de risco isolados para doenças vasculares. Diante da importância em se identificar fatores de risco para doenças tromboembólicas, a complexidade da fisiopatologia vascular na Doença Falciforme e a associação de polimorfismo como potenciais modificadores genéticos, objetivamos avaliar a frequência de polimorfismos nos genes *CBS* e *MTHFR* em Doentes Falciformes. Foram pesquisados 300 pacientes de várias localidades do país, com hemoglobinopatia S (Hb SS, Hb SC, Hb S/Beta talassemia) para a presença da mutação C677T no gene da *MTHFR* e 844ins68, no gene da *CBS*. Foram coletados 5 mL de sangue venoso em EDTA, após consentimento informado. As metodologias clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias foram realizadas para a confirmação do fenótipo de cada portador. O DNA foi extraído dos leucócitos pelo método fenol/clorofórmio. As detecções das mutações referentes aos genótipos de Hemoglobina e dos polimorfismos pesquisados foram realizadas por amplificação de um segmento gênico, com iniciadores que flanqueiam a região de inserção e análise por RFLP e AE. Posteriormente foi feita a revelação em gel de agarose, corado com brometo

de etídio, sob luz UV. Os resultados mostraram que, para a mutação no gene da *MTHFR*, 93 pacientes (31,00%) eram heterozigotos e 13 (4,33%) homozigotos mutantes. A diferença foi significativa para essa frequência entre as cidades quando avaliadas duas a duas, e não entre os gêneros. Para a mutação no gene da *CBS*, foram observados 90 heterozigotos (30,00%) e 8 homozigotos mutante (2,66%) com diferença significativa entre as cidades avaliadas duas a duas e quanto ao gênero. Observamos maior frequência dessa mutação no gênero masculino e no grupo da cidade do Rio de Janeiro. As frequências alélicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg para as duas mutações e não diferem significativamente. A interação entre os polimorfismos foi detectada em 27 pacientes (9,00%), sendo mais freqüente nos pacientes com Hb SS. As frequências dos polimorfismos de base única para as enzimas *metilenotetrahidrofolato redutase* e *cistationina-beta-sintase* estão de acordo com o esperado para a população brasileira. Podemos inferir que os Doentes Falciformes com esses polimorfismos estão mais predispostos a manifestarem Doença Vascular.

Palavras-chaves: Doença Falciforme, Polimorfismos genéticos, *Cistationina-beta-sintase*, *Metilenotetrahidrofolato redutase*.

Introdução

A Doença Falciforme é uma patologia inflamatória que se manifesta clinicamente por fenômenos vaso-oclusivos, estados de hipercoaguabilidade e crises dolorosas. O processo envolve interação entre o endotélio vascular, múltiplas moléculas de adesão e receptores, componentes da matriz subendotelial, proteínas plasmáticas, leucócitos e plaquetas, dando origem aos fenômenos de oclusão vascular, episódios de dor e lesão de órgãos [1-4]. Alguns portadores de hemoglobinopatia S homozigótica (HbSS) apresentam complicações vaso-oclusivas freqüentes e, dependendo da gravidade, vão a óbito em idade precoce. Outros parecem ser pouco afetados e têm uma sobrevida próxima do normal. Assim, a clínica da Doença Falciforme é variável e depende de fatores genéticos e ambientais, devendo por isso, serem corretamente avaliada para permitir um diagnóstico preciso, prevenção de complicações, melhor acompanhamento dos pacientes e tratamento adequado [5,6].

A Homocisteína (Hcy) é um aminoácido formado durante o metabolismo da metionina e suprido essencialmente pelas proteínas da dieta. Quando em excesso no organismo é considerado fator de risco para doenças cardiovasculares, incluindo a doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral e trombose venosa [7-10]. O mecanismo de indução de aterotrombose por alteração no metabolismo da Hcy desenvolve-se por múltiplos caminhos e segue ou a via de remetilação ou a de trans-sulfuração. No ciclo da remetilação, a Hcy ganha um grupo metil proveniente da reação catabolizada pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) tendo a metilcobalamina (vitamina B₁₂) como co-fator, para originar metionina [11-14]. Na deficiência de vitamina B₁₂, a reação é inibida a via de trans-sulfuração representa a alternativa metabólica para formação desse aminoácido. No ciclo da trans-sulfuração, a Hcy une-se a serina para formar cistationina, numa reação catalizada pela enzima cistationina-beta-sintase (CBS) tendo a piridoxina (Vitamina B₆) como co-fator. A cistationina é então, hidrolizada a cisteína, que pode ser excretada na urina como sulfato [13]. Mutação nos genes responsáveis pela síntese das enzimas MTHFR e CBS predispõe para um aumento no nível plasmático de Hcy [15].

O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) que determinam a substituição C (citosina) por T (timina) no nucleotídeo 677 do gene para *MTHFR*, na região 1p36.3, tem sido associado com baixa atividade enzimática. O homozigoto mutante (C677T) para esse SNP tem redução de 50% na atividade da enzima, resultando em aumento no nível de Hcy sérica, sendo esse o polimorfismo mais prevalente e mais amplamente estudado para esse gene [16-18].

Sebastio et al., (1995) descreveram uma inserção de 68 pares de base (pb) no éxon 8 (844ins68) de um alelo para o gene *CBS* de um paciente com deficiência da enzima [19]. Essa aletração, nas condições homozigotas e heterozigotas, é considerada como fator de risco independente para o desenvolvimento de arteriosclerose [20].

As complicações vasculares na fisiopatologia da Doença Falciforme são as maiores causas de morbidade e mortalidade, entretanto, seus mecanismos não

estão completamente elucidados. Interações entre fatores ambientais e genéticos contribuem para o desenvolvimento das manifestações vaso-oclusivas observadas. Esse estudo teve por objetivo avaliar a frequência dos polimorfismos nos genes da MTHFR e da CBS.

Materiais e Métodos

Foram avaliados amostras de sangue de 300 portadores de hemoglobina S provenientes de várias cidades do País: São Paulo/SP (n=39), São José do Rio Preto/SP (n=38), Rio de Janeiro/RJ (n=96), Brasília/DF (n=33) e Goiânia/GO (n=94). Coletou-se 5 mL de sangue venoso em EDTA (5%), após consentimento informado.

As metodologias clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias foram realizadas para a confirmação do fenótipo de cada portador [21]. O DNA foi extraído dos leucócitos pelo método fenol/clorofórmio modificado [22], e as detecções das mutações para a definição dos genótipos da hemoglobina foram realizadas por amplificação de um segmento gênico, com iniciadores que flanqueiam a região de inserção e análise por Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP) [23] e Alelo Específico (AE) [24]. Os polimorfismos pesquisados foram determinados por PCR usando iniciadores descritos na literatura para os genes *CBS* [20] e *MTHFR* [17]. Para o gene *MTHFR* o fragmento amplificado foi digerido pela enzima de restrição *HinfI* *Fast*[®] (Fermentas). Posteriormente, realizou-se a revelação em gel de agarose, corado com brometo de etídio, sob luz UV.

Aplicou-se o teste de Qui-Quadrado (χ^2) com nível de significância de 95% ($p=0.05$) e a correção de Yates para $n<5$, na comparação das frequências dos polimorfismos entre as localidades estudadas e para a análise da frequência dos polimorfismos em relação ao gênero. Para comparar as frequências alélicas em cada localidade, aplicou-se a Lei do equilíbrio de Hardy-Weinberg e posteriormente o teste de χ^2 . Os dados processados e os cálculos realizados no *software Statistica 7.0*.

Resultados

Das 300 amostras avaliadas, 169 eram do gênero feminino (56,33%) e 131 do gênero masculino (43,66%), com idade variando de seis meses a cinquenta e oito anos, e a maioria na faixa etária entre 10-29 anos (48,84%). Quanto à etnia, 92,30% apresentavam características de afro-descendentes e 7,69% de caucasóides.

Os resultados das análises clássicas e moleculares para hemoglobinas mostraram que 155 pacientes (51,67%) eram homozigotos (Hb SS), 45 eram portadores de Hb SC (15,00%) e 100 apresentaram genótipo de Hb S/Beta talassemia (33,33%).

Para a avaliação do polimorfismo no gene da enzima *MTHFR*, a pesquisa revelou que 194 (64,66%) amostras apresentaram ausência da mutação (WT/WT), 93 (31,00%) eram heterozigotos (WT/C677T) e 13 (4,33%) homozigotos mutantes (C677T/C677T). A análise da frequência genotípica dessa mutação entre as localidades mostrou para o perfil WT/C677T, diferença significativa em Brasília com relação às outras cidades, menos com Goiânia e essas foram as duas localidades com maiores frequências genotípicas. Deve-se ressaltar que essas duas localidades estão situadas na mesma região geográfica do Brasil (Tabela 1). Para o perfil C677T/C677T, observou-se diferença significativa em São Paulo, quando comparado com as outras localidades, e frequência genotípica de 15,38% (Tabela 2). Não se observou diferença significativa em heterozigotos e homozigotos ($\chi^2=1,341$; GL=2; $p=0,512$) nos grupos e nas localidades, quando se correlacionou o gênero com a mutação no gene *MTHFR*. A frequência alélica estava em equilíbrio e não apresentou diferença significativa ($\chi^2=1,981$, GL=4, $p=0,739$) em todas as localidades avaliadas.

A pesquisa para inserção no gene da enzima *CBS* mostrou que 202 amostras (67,33%) apresentaram ausência desse polimorfismo (WT/WT), 90 (30,00%) apresentaram perfil heterozigotos (WT/844ins68) e oito (2,66%) homozigotos mutantes (844ins68/844ins68). A frequência alélica da inserção 844ins68 no gene *CBS* em todas as localidades, mostrou equilíbrio de acordo com

a lei de Hardy-Weinberg, e não apresentou diferença significativa ($\chi^2=2,905$; GL=4; $p=0,574$) conforme mostra a Tabela 4. A frequência genotípica do perfil WT/844ins68 mostrou diferença significativa entre as localidades, sendo São Paulo diferente de Goiânia ($p=0,042$, $p=0,012$) e de S. J. Rio Preto ($p=0,023$, $p=0,004$); Brasília mostrou ser estaticamente diferente de Goiânia ($p=0,019$) e S. J. Rio Preto ($p=0,010$, $p=0,006$), como mostrado na Tabela 5 e 6. O perfil 844ins68/844ins68 não foi encontrado em Brasília e Goiânia e foi estatisticamente diferente do observado para o Rio de Janeiro ($p=0,011$) e de S. J. Rio Preto ($p=0,040$, $p=0,006$) e S. J. Rio Preto diferiu de São Paulo em termos da frequência desse genótipo (p próximo de zero). Não se observou diferença significativa para a frequência da mutação entre os gêneros ($\chi^2=4,619$; GL=2; $p=0,099$), mas na avaliação das localidades constatou-se diferença significativa para a cidade do Rio de Janeiro, com maior frequência entre os homens ($\chi^2=7,372$; GL=2; $p=0,025$).

A herança de dupla heterozigose para os dois polimorfismos avaliados (*MTHFR* e *CBS*) foi detectada, em 27 amostras (9,00%). A dupla heterozigose ou associação entre homozigose e heterozigose para os polimorfismos foi detectada em sua grande maioria, nos indivíduos com HbSS (48,14%).

A frequência dos polimorfismos avaliados foi maior no grupo de amostras com HbSS. Devido ao pequeno número de informações sobre interferentes ambientais como fatores de risco para desenvolvimento de trombose, esse parâmetro não foi avaliado. Por outro lado, 230 pacientes faziam uso de ácido fólico e 104, recebiam hidroxauréia em seus tratamentos.

Discussão

Segundo Key et al. (1998), em 1856 Virchow descreveu três amplas categorias de fatores que contribuem para trombose venosa: alterações no fluxo sanguíneo, mudanças na constituição do sangue e mudanças na parede do vaso sanguíneo. Sabe-se que a Doença Falciforme está associada com aumento de mediadores inflamatórios na circulação, ativação de fatores pró-coagulantes teciduais e plasmáticos, além de ativação de plaquetas e sistema fibrinolítico [25].

Portanto, na fisiopatologia da Doença Falciforme observa-se o envolvimento das mesmas vias e mecanismos descritos por Virchow para o desenvolvimento de trombose venosa.

A incidência de trombose em indivíduos que apresentam defeitos genéticos é variável e depende de muitos fatores associados. Para Vandenbroucke et al. [26] e Dahlback [27], são dependentes do genótipo, da coexistência de outros defeitos genéticos, e da influência de fatores de risco ambientais como a idade, imobilizações, cirurgias, gravidez, contraceptivos orais, reposição hormonal e condições inflamatórias. O uso de medicação específica em Doentes Falciformes, como o ácido fólico e hidroxuriúria são considerados como profiláticos para impedir o desenvolvimento de eventos vaso-oclusivos [28,29].

A heterozigose para a mutação no gene *MTHFR* (WT/C677T) em 31,00% dos pesquisados está de acordo com os 40% descritos na literatura [30]. No entanto, para a homozigose (C677T/C677T) encontramos a frequência de 4,33%, discordante da prevalência de 10% relatada no Brasil [31]. Todavia, por ser essa uma mutação menos comum em africanos (1,60%) [32], se considerou essa a principal explicação para a menor prevalência detectada em nesse estudo, sendo a Hb S de origem africana. Esse fato está de acordo com os resultados de Couto e colaboradores [33] que mencionaram frequências de 36,20% para WT/C677T e 5,30% para C677T/C677T, na Bahia, com alta taxa de afro-descendentes.

Não se observou diferença significativa entre os gêneros para o polimorfismo no gene *MTHFR*, fato que discorda dos achados de Chango et al. [34], que mencionaram ser essa alteração mais freqüente em homens. Acredita-se ser uma realidade da população brasileira, pois Rios et al. [35] analisando a presença dessa mutação em afro-descendentes brasileiros com doença arterial coronariana também não observaram diferença entre os gêneros.

Considerando que 50% dos homozigotos para a mutação pesquisada no gene da *MTHFR* apresentam baixa atividade enzimática [18] e que essa baixa atividade leva a um risco adicional de Doença Vascular, com envolvimento de moléculas de adesão e óxido nítrico e também, provavelmente, por hipometilação

do DNA [36], podemos inferir que os doentes falciformes com esse polimorfismo estão mais predispostos a manifestarem Doença Vascular.

A heterozigosidade para o polimorfismo no gene *CBS* determina hiperhomocisteinemia leve com tendência discreta à aterosclerose e trombose [37]. Parece ser relativamente comum em algumas populações, como entre caucasóides na América do Norte e Europa, cuja frequência aproximada varia entre 12 e 14%, e na etnia negra com frequência de 38% [39,40]. Os resultados obtidos mostram frequência de 30,00% de heterozigotos em doentes falciformes, o que difere dos valores encontrados em grupos controles e indivíduos com Trombose Venosa Profunda da literatura para o Brasil [38]. A homozigose para a mutação em 2,66% dos pacientes avaliados é significativamente menor quando comparada aos 5% relatados para a população em geral [39].

Não observamos diferença significativa entre os gêneros, nos pacientes estudados. Porém, quando avaliamos separadamente as localidades de origem, houve diferença significativa para a cidade o Rio de Janeiro, com maior frequência entre os homens, o que é concordante com os estudos de Vitvitsky et al. [41] os quais mencionaram que o polimorfismo possui efeito gênero específico, sendo mais freqüente nos homens, justificado pela regulação da enzima dependente de testosterona.

Ressaltamos que a frequência dos polimorfismos nos genes *MTHFR* e *CBS* em pacientes falciformes é semelhante às relatadas na literatura. Entretanto, é necessário que se esclareça a relação entre eventos vaso-oclusivos e a co-herança de outros defeitos genéticos nos doentes falciformes, tendo em vista que essa co-herança pode influenciar os níveis de Homocisteína predispondo os Doentes Falciformes a agravos nos eventos vaso-oclusivos.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu suporte financeiro do CNPq, Capes. Os autores agradecem aos pacientes, aos profissionais da área de saúde e às Instituições que

permitiram a realização dessa pesquisa. Agradecemos ao Fabrício Barreto Teresa e Hederson Vinícius de Souza pelo auxílio nas análises estatísticas.

Referência Bibliográfica

- [1] P.B. Walter, E.B. Fung, D.W. Killilea, Q. Jiang, M. Hudes, et al. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with betathalassaemia or sickle cell disease. *British Journal Haematology* 135 (2006) 254–263.
- [2] P. Frenette, Sickle cell vaso-occlusion multistep and multicellular paradigm. *Current Opinion of Hematology* 9 (2002) 101-6.
- [3] R.P. Hebbel, R. Osarogiagbon, D. Kaul, The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 11 (2004) 129-51.
- [4] M.J. Telen, Erythrocyte adhesion receptors: blood group antigens and related molecules. *Transfer Medical Version* 19 (2005) 32-44.
- [5] D.T. Covas, I. de Lucena Angulo, P.P. Vianna-Bonini, M.A. Zago, Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica* 89(3) (2004) 273-80.
- [6] D. Diniz, C. Guedes, A. Trivelino, “Education for genetics in public health: a case study on sickle cell anemia”. *Science & Public Health* 10(2) (2005) 365-372.
- [7] S.P. McIlroy, K.B. Dynan, J.T. Lawson, Moderately elevated plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotype, and risk for stroke, vascular dementia, and Alzheimer disease in Northern Ireland. *Stroke* 33(10) (2002) 2351-6.
- [8] Y. Nakamura, H. Yoshizawa, Homocysteine as a risk factor for ischemic heart disease. *Rinsho Byori* 50(8) (2002) 807-14.
- [9] H. Wolfgang, R. Obeid, M. Jouma, Hyperhomocysteinemia and vitamin B-12 deficiency are more striking in Syrians than in Germans - causes and implications. *Atherosclerosis* 166 (2003) 143-50.
- [10] M. Den Heijer, S. Lewington, R. Clarke, Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3 (2005) 292–299.

- [11] H. Wang, X. Jiang, F. Yang, et al. Hyperhomocysteinemia accelerates atherosclerosis in cystathionine β -synthetase and apolipoprotein E double knockout mice with and without dietary perturbation. *Blood* 101(10) (2002) 3901-7.
- [12] W. Bilsborough, D.J. Green, C.D. Mamotte, Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism, homocysteine, cholesterol and vascular endothelial function. *Atherosclerosis* 169 (2003) 131–138.
- [13] M.M. Eldibany, J.A. Caprini, Hyperhomocysteinemia and thrombosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 131 (2007) 872-884.
- [14] S.R. Lentz, Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3 (2005) 8:1646-54.
- [15] M.G. Andreassi, N. Botto, F. Cocci, D. Battaglia, E. Antonioli, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease. *Human Genetics* 112 (2003) 171-7.
- [16] S.S. Kang, J. Zhou, J. Wong, J. Kowalisyn, G. Strokosch, Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *American Journal Human Genetics* 43 (1988) 414-21.
- [17] P. Frosst, H.J. Blom, R. Milos, A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 10 (1995) 111-3.
- [18] V.M. Shmeleva, S.I. Kapustin, L.P. Papayan, A. Sobczynska-Malefora, D.J. Harrington, et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism in patients with arterial and venous thrombosis from North Western Russia. *Thrombosis Research* 111 (2003) 351-58.
- [19] G. Sebastio, M.P. Dperandeo, M. Panico, R. de Franchis, J.P. Kraus, G. Andria, The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. *American Journal Human Genetic* 56 (1995) 1324-1333.
- [20] M.Y. Tsai, M. Bignell, K. Schwichtenberg, N.Q. Hanson, High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. *American Journal of Human Genetics* 59(6) (1996) 1262-7.
- [21] C.R. Bonini-Domingos, Laboratory methods for diagnosis of Thalassemia and Hemoglobinopathies, (2006) São José do Rio Preto: HN.

- [22] S.D.J. Pena, DNA Bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis* 12(2-3) (1991) 146-152.
- [23] Y. Sasaki, I. Ueno, R. Nakakoshi, S. Ishikawa, E. Hidaka, et al. Differentiation of selected abnormal hemoglobin by PCR-RFLP method. *Rinsho Byori* 45(12) (1997) 1163-6.
- [24] A.R. Chinelato-Fernandes, Molecular differentiation of mutants of human hemoglobin in the brazilian population. Sao Jose do Rio Preto, 227f. Thesis (Ph.D. in Genetics)-Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences, University Estadual Paulista 2003.
- [25] N.S. Key, A. Slungaard, L. Dandeleit, S.C. Nelson, C. Moertel, et al. Whole blood tissue factor procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell disease. *Blood* 91(11) (1998) 4216-23.
- [26] J.P. Vandenbroucke, T. Koster, E. Briet, P. H. Reitsma, R. M. Bertina, et al. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 344 (1994) 1453-1457.
- [27] B. Dahlbäck, Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders *Blood* 112 (2008) 19-27.
- [28] H. Refsum, A.D. Smith, P.M. Ueland, E. Nexø, R. Clarke, Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clinical Chemistry* 50 (2004) 3-32.
- [29] O.R. Platt, Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *New England Journal of Medicine* 358 (2008) 1362-9.
- [30] C.M. Ulrich, K. Robien, R. Sparks, Pharmacogenetics and folate metabolism-a promising direction. *Pharmacogenomics* 3 (2002) 299-313.
- [31] V.R. Arruda, J.M. Annichino-Bizzacchi, F.F. Costa, P.H. Reitsma, Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian Population. *American Journal Hematologic* 49 (1995) 242-3.
- [32] R.M. Gueant-Rodriguez, J.L. Gueant, R. Debar, S. Thiron, L.X. Hong, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677t and 1298c alleles and folate status: A comparative study in Mexican, West African, and European populations. *American Journal of Clinical Nutrition* 83 (2006) 701-707.
- [33] F.D. Couto, E.V. Adorno, J.F. Menezes, J.P. Moura Neto, M.A. Rêgo, et al. C677T polymorphism of the MTHFR gene and variant hemoglobins: a study in newborns from Salvador, Bahia, Brazil. *Caderno de Saúde Pública*. 20(2) (2004) 529-33.

- [34] A. Chango, G.P. De Courcy, F. Boisson, J.C. Guillard, F. Barbe, et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase common mutations, folate status and plasma homocysteine in healthy French adults of the Supplementation en Vitamines et Minéraux Antioxydants (SU.VI.MAX) cohort. *British Journal of Nutrition* 84 (2000) 891–896.
- [35] D.L. Rios, L.O. D'onofrio, H.G. carvalho, A. Santos-Filho, B. Galvão-Castro, Sex-specific effect of the thermolabile C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene on angiographically assessed coronary artery disease in Brazilians. *Human Biology* 79(4) (2007) 453-61.
- [36] S.H.H. Juo, Y.C. Liao, C.L. Kuo, Y. Wang, C.S. Huang, et al. The MTHFR 677 C/T polymorphism influences plasma levels of adhesion molecules and nitric oxide. *Thrombosis Research* 121 (2008) 549-554.
- [37] G.H.J. Boers, A.G.H. Smals, F.L.M. Trijbels, et al., Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *New England Journal of Medicine* 313 (1985) 709-715.
- [38] C.R. Bonini-Domingos; P.J.A. Zamaro; C.F. Mendiburu, Frequency of the 844ins68 mutation on the cystathionine beta-synthetase gene in deep venous thrombosis patients. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 27(1) (2005) 12-15.
- [39] L.A.J. Kluijtmans, G.H.J. Boers, J.P. Kraus, L.P.W.J. Vand den Heuvel, J.R.M. Cruysberg, et al. A common 844ins68 insertion variant in the cystathionine β -synthase gene. *Biochemical and Molecular Medicine* 62 (1997) 23-25.
- [40] R.F. Franco, J. Elion, J. Lavinha, R. Krishnamoorthy, M.H. Tavella, et al. Heterogeneous ethnic distribution of the 844ins68 in the cystathionine beta-synthase gene. *Human Heredity* 48 (1998a) 338–342.
- [41] V. Vitvitsky, A. Prudova, S. Stabler, S. Dayal, S.R. Lentz, et al. Testosterone regulation of renal cystathionine beta-synthase: implications for sex-dependent differences in plasma homocysteine levels. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 293(2) (2007) 594-600.

Tabelas

Tabela 1. Frequência genotípica da mutação no gene da *metilenotetrahidrofolato redutase* nas cinco localidades avaliadas (n=300).

MTHFR	WT /WT	WT/C677T	C677T/C677T
	n (%)	n (%)	n (%)
São Paulo	23 (58,97%)	10 (25,64%)	6 (15,38%)
Brasília	18 (54,54%)	14 (42,42%)	1 (3,03%)
Goiânia	60 (63,82%)	32 (33,33%)	2 (2,12%)
Rio de Janeiro	68 (70,83%)	26 (27,08%)	2 (2,08%)
S. J. Rio Preto	25 (65,78%)	11 (28,94%)	2 (5,26%)
Total	194	93	13

Tabela 2. Frequência do polimorfismo no gene da enzima *MTHFR* comparado entre as localidades, com valores de significância.

				Rio de	S. J. Rio
WT/C677T	São Paulo	Brasília	Goiânia	Janeiro	Preto
São Paulo	x	0,010	NS	NS	NS
Brasília	0.001	x	NS	0.003	0.012
Goiânia	NS	NS	x	NS	NS
Rio de Janeiro	NS	0.018	NS	x	NS
S. J. Rio Preto	NS	0.038	NS	NS	x

				Rio de	S. J. Rio
C677T/C677T	São Paulo	Brasília	Goiânia	Janeiro	Preto
São Paulo	x	nulo	nulo	nulo	nulo
Brasília	nulo	x	NS	NS	NS
Goiânia	nulo	NS	x	NS	NS
Rio de Janeiro	nulo	NS	NS	x	NS
S. J. Rio Preto	nulo	NS	NS	NS	x

Teste Qui Quadrado com grau de liberdade=1, $p \leq 0,05$.

NS= não significante;

x= sem comparação.

Tabela 3. Frequência Alélica da mutação do gene da enzima *metilenotetrahidrofolato redutase* nos pacientes estudados de cada região com respectivo equilíbrio de Hardy-Weinberg (n=300).

MTHFR	n	Alelos mutados	Frequência Alélica	Valor p	Hardy- Weinberg
São Paulo	78	22	28,20%	0.063	Sim
Brasília	66	16	24,24%	0.509	Sim
Goiânia	188	36	19,14%	0.462	Sim
Rio de Janeiro	192	30	15,62%	0.993	Sim
S. J. Rio Preto	76	15	19,73%	0.865	Sim
Total	600	120	20,00%		

Teste de Qui Quadrado ($\chi^2= 1,981$, grau de liberdade=4, $p= 0,739$).

Tabela 4. Frequência Alélica da mutação no gene da *cistationina-beta-sintase* nos pacientes estudados (n=300).

Cistationina-beta- sintase	n	Alelos mutados	Frequência Alélica	Valor p	Hardy- Weinberg
São Paulo	78	11	14,10%	0.865	Sim
Brasília	66	7	10,60%	0.750	Sim
Goiânia	184	35	19,02%	0.247	Sim
Rio de Janeiro	192	35	18,22%	0.896	Sim
S. J. Rio Preto	76	18	23,68%	0.768	Sim
Total	600	106	17,66%		

Teste de Qui Quadrado ($\chi^2= 2,905$; GL= 4; $p=0.574$).

Tabela 5. Frequência genotípica da mutação no gene da *cistationina-beta-sintase* nas cinco localidades avaliadas (n=300).

Cistationina-beta-sintase	WT/WT n (%)	WT/844ins68 n (%)	844ins68/844ins68 n (%)
São Paulo	29 (74,35%)	9 (23,07%)	1 (2,56%)
Brasília	26 (78,78%)	7 (21,21%)	0 (0)
Goiânia	60 (63,82%)	33 (35,10%)	1 (1,06%)
Rio de Janeiro	65 (67,70%)	27 (28,12%)	4 (4,16%)
S. J. Rio Preto	22 (57,89%)	14 (36,84%)	2 (5,26%)
Total	202	90	8

Tabela 6. Valores de *p* nos perfis heterozigoto e homozigoto comparando as frequências genotípicas das localidades avaliadas.

				Rio de Janeiro	S. J. Rio Preto
WT/844ins68	São Paulo	Brasília	Goiânia		
São Paulo	x	NS	0,042	NS	0,023
Brasília	NS	x	0,019	NS	0,010
Goiânia	0,012	NS	x	NS	NS
Rio de Janeiro	NS	NS	NS	x	NS
S. J. Rio Preto	0,004	0,006	NS	NS	x

				Rio de Janeiro	S. J. Rio Preto
844ins68/844ins68	São Paulo	Brasília	Goiânia		
São Paulo	x	#	NS	NS	nulo
Brasília	#	x	#	#	#
Goiânia	NS	#	x	NS	0,040
Rio de Janeiro	NS	#	0,011	x	NS
S. J. Rio Preto	NS	#	0,006	NS	x

Teste Qui Quadrado com grau de liberdade=1, $p \leq 0,05$.

NS= não significante;

x= sem comparação;

= nenhum paciente encontrado.

Título: Fator de risco para evento vaso-oclusivo em doentes falciformes

Autores: Jacob, Maza Alves¹; Bastos, Celso da Cunha²; Bonini-Domingos, Claudia Regina³.

1- Biomédica Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia da UNESP- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

2- Médico Especialista em Hematologia Doutor em Medicina Tropical e Professor Adjunto - nível IV da UFG- Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas.

3- Bióloga Doutora em Ciências Biológicas (Genética) da UNESP- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

Instituições:

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. CEP: 15054-000 - Rua: Cristóvão Colombo, 2265 – Jd. Nazareth – São José do Rio Preto – SP – Brasil.

UFG- Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas. CEP: 74605-050 - Rua: 1ª Avenida, s/n - Setor Leste Universitário – Goiânia, GO, Brasil.

Resumo

A doença falciforme (DF) é reconhecida como uma condição inflamatória que cursa com aumento na adesão dos eritrócitos falcizados, sendo este, um potencial início dos episódios vaso-oclusivos, evento ligado às manifestações clínicas, morbidade e mortalidade. A mutação 844ins68 no gene da enzima *cistationina-beta-sintase* (CBS) e o polimorfismo C677T do gene da enzima *metilenotetrahidrofolato redutase* (MTHFR) estão envolvidos no metabolismo da homocisteína. O presente estudo avaliou a frequência dos polimorfismos 844ins68 no gene CBS e C677T no gene da MTHFR, e sua correlação como fator de risco para eventos vaso-oclusivos nos DF. Foram avaliadas 91 amostras de sangue de pacientes com DF, após consentimento informado. As detecções das mutações para os Genótipos de Hemoglobina e dos polimorfismos foram realizadas por PCR/RFLP e PCR/AE. Nossos resultados mostraram que a presença de manifestações clínicas relacionadas aos eventos vaso-oclusivos foi mais incidente no genótipo HbSS ($p=0,007$). Detectou-se significância para a presença da mutação na enzima CBS ($p=0,011$) entre os pacientes com presença de complicações vaso-oclusivas de aproximadamente três vezes. A presença da mutação no gene da MTHFR não apresentou aumento de risco para eventos vaso-

oclusivo ($p=0,193$) nos pacientes avaliados. A presença de interação entre os dois polimorfismos foi de 12,08% nos DF e aumentou em duas vezes o risco de doença vaso-oclusiva (RR:2,16). Concluímos que a mutação 844ins68 no gene da CBS foi um fator de risco para o evento vaso-oclusivo nos DF avaliados.

Palavras-chave: doença falciforme; hiper-homocistemia; cistationina-beta-sintase; metilenotetrahidrofolato redutase; trombose.

Introdução

Níveis elevados de Homocisteína (Hcy) são associados com aumento no risco de doenças cardiovasculares e tromboembolismo venoso (1,2). Entretanto, o mecanismo fisiopatológico que esclarece essa associação ainda não está completamente elucidado. A expressão da Hcy é modulada por muitos fatores, incluindo condições genéticas, fisiológicas e ambientais como estilo de vida, idade, sexo, nutrição, cigarro, atividade física e uso de drogas. Na maioria dos casos o *status* anormal de Hcy não é causado por um simples fator isolado, mas resultante da combinação de vários fatores (3). Portanto, é importante compreender como os fatores genéticos interagem na produção de Hcy plasmática para a prevenção e tratamento de doenças vaso-oclusivas decorrentes de hiper-homocistemia.

Mutações genéticas nas enzimas envolvidas no metabolismo da Hcy, tais como, 844ins68 na enzima *Cistationina-beta-sintase* (CBS) e C677T na enzima *Metilenotetrahidrofolato redutase* (MTHFR) contribuem para elevação nos níveis plasmáticos da Hcy (4,5). A mutação 844ins68 no gene da CBS, em homozigose ou heterozigose, é considerada fator de risco independente para oclusões arteriais (6). Mutações na enzima MTHFR levam a baixa atividade enzimática, resultando em aumento no nível de Homocisteína sérica (7). As alterações no gene da MTHFR determinam efeitos adicionais como o aumento de riscos para doença vascular, hipometilação do DNA e influencia em fatores de adesão celular e óxido nítrico. (8). A co-herança dos genótipos C677T no gene da MTHFR e da variante 844ins68 no gene CBS foi significativamente maior entre pacientes com trombose idiopática (10,7%), sugerindo ser um fator de risco para tromboembolismo (9).

A doença falciforme é reconhecida como uma condição inflamatória, na qual os mediadores inflamatórios ativam as células endoteliais e aumentam a adesão das células vermelhas falcizadas, leucócitos e plaquetas à superfície endotelial, com potencial predisposição para fenômenos vaso-oclusivos (10). A vaso-oclusão, que pode envolver micro e macrovascularização, é o evento mais importante na fisiopatologia da doença e justifica muitas das manifestações clínicas, morbidade e mortalidade nesses pacientes (11). O objetivo de nosso estudo foi avaliar a frequência dos polimorfismos 844ins68 no gene da *CBS* e C677T no gene da *MTHFR* e sua correlação como potenciais fatores de risco para eventos vaso-oclusivos em pacientes falciformes.

Resultados

1 – Correlação entre os genótipos de doença falciforme e presença de polimorfismos nos genes da *CBS* e *MTHFR*:

Foram pesquisados 91 Doentes Falciformes sendo 48 HbSS, 20 HbSC, 23 HbS/Beta talassemia, e verificou-se frequência genotípica de 32,96% heterozigotos e 1,09% homozigotos para a presença do polimorfismo no gene *CBS*. Para o polimorfismo no gene *MTHFR*, a frequência genotípica foi de 34,06% heterozigotos e 2,19% homozigotos. A frequência alélica observada foi de 17,58% e de 19,23% para os mutantes nos genes *CBS* e *MTHFR* respectivamente estando em equilíbrio de Hardy Weinberg.

Verificou-se diferença significativa para a presença do polimorfismo no gene da enzima *CBS* ($\chi^2=5,219$; GL=1; $p=0,022$) em relação aos genótipos falciformes HbSS e HbS/Beta. A correlação entre os genótipos da hemoglobina e a presença de manifestações vaso-oclusivas foi significativa com maior incidência no genótipo SS ($\chi^2=9,969$; GL=2; $p=0,007$), conforme mostra a Tabela I.

Quando se comparou a presença e ausência de complicações vaso-oclusivas nos pacientes estudados, constatou-se significância para maior frequência de complicações em indivíduos com HbSS ($\chi^2=8,380$; GL=2;

$p=0,015$). Porém, quando avaliados em conjunto, genótipos de hemoglobina e os polimorfismos estudados, não houve diferença significativa, tanto para a presença de alteração na CBS ($\chi^2=3,441$; GL=1; $p=0,064$) quanto para o polimorfismo na MTHFR ($\chi^2=0,799$; GL=1; $p=0,371$).

2- Uso de Hidroxiuréia e Hemoglobina Fetal:

Em relação à administração de hidroxiuréia e frequência de transfusões de sangue, os pacientes foram agrupados em três categorias de resposta clínica: boa resposta (não necessitavam de transfusão); resposta moderada (necessitavam de transfusão, em intervalos maiores do que os iniciais e sem administração de hidroxiuréia); e os não responsíveis (após um ano do tratamento com hidroxiuréia, permaneciam no mesmo nível de dependência transfusional).

Quando se comparou a necessidade transfusional entre os pacientes que recebiam hidroxiuréia e aqueles que não faziam uso desse medicamento, observou-se diferença significativa ($\chi^2=7,405$; GL=2; $p=0,025$). Quarenta e nove por cento dos pacientes que faziam uso de hidroxiuréia apresentaram boa resposta, enquanto 54% dos pacientes que não faziam uso de hidroxiuréia continuaram necessitando de transfusões em períodos freqüentes.

Por outro lado, evidenciou-se, por meio das observações clínicas e pelos exames laboratoriais anexados aos prontuários, que 33,33% dos pacientes que faziam uso de hidroxiuréia, tiveram aumento percentual de Hemoglobina Fetal, maior do que 15%, em relação à sua dosagem inicial, principalmente naqueles com genótipo HbSS.

3 - Correlação entre a presença do polimorfismos avaliados e eventos vaso-oclusivos:

Ao considerarmos os eventos vaso-oclusivos apresentados pelos pacientes, em relação às frequências alélicas dos polimorfismos avaliados, detectou-se diferença significativa para a presença da mutação no gene da enzima CBS

($\chi^2=6,502$; GL=1; $p=0,011$), de aproximadamente três vezes acima daquela encontrada para os pacientes que não apresentavam essas complicações. Para a mutação no gene da enzima *MTHFR* não observamos aumento no risco trombótico ($\chi^2=1,698$; GL=1; $p=0,193$). A tabela II mostra os resultados obtidos.

A presença da interação entre os dois polimorfismos estudados (*CBS* e *MTHFR*) foi em 11 (12,08%) pacientes. Desses, 91% (n=10) apresentaram manifestações vaso-oclusivas, sugerindo, portanto, que essa associação é significativa para o aumento no risco de manifestações clínicas nesse grupo de pacientes ($\chi^2=8,158$; GL=1; $p=0,004$). A heterozigose para a inserção de 68pb no gene da *CBS* quando combinada com a mutação no gene *MTHFR*, mostrou aumento de duas vezes no risco relativo (RR:2,16; 95%) de apresentar doença vaso-oclusiva, arterial e/ou venosa com Intervalo de Confiança (IC) de 0,31-1,68, conforme mostra a Tabela III.

Discussão

As manifestações clínicas da doença falciforme são dependentes dos genótipos herdados, sendo mais graves e freqüentes nos indivíduos com HbSS (12). Podem ser influenciadas também, por um dos 5 haplótipos do agrupamento do gene beta globina, os quais são associados com a expressão diferenciada dos genes que determinam a HbF, essa tem efeito inibitório no processo de falcização das células vermelhas e, pacientes com hemoglobina fetal maior que 20% apresentam manifestações clínicas mais brandas (13). Em nosso estudo os pacientes com HbS/Beta talassemia e HbSC, analisados quanto ao aumento de hemoglobina fetal após o uso de hidroxiuréia, apresentaram valores menores que 15% em relação à hemoglobina Fetal inicial. A avaliação dos pacientes quanto ao uso de hidroxiuréia e o número de transfusões, confirma os resultados da literatura que indicam a redução das necessidades de transfusões sanguíneas entre os pacientes quando recebem tratamento com hidroxiuréia (14).

A presença da mutação no gene *MTHFR* não aumentou o risco para o evento vaso-oclusivo nos pacientes avaliados, e está de acordo com estudo

realizado na população brasileira por Morielli e colaboradores (15), mas contradiz a literatura quanto a outras populações (7,8). Portanto, vale ressaltar os estudos que sugerem a presença dos polimorfismos que influenciam o metabolismo do folato, como fatores de risco para doenças vaso-oclusivas, apresentam efeitos variáveis entre as diferentes populações, com evidente interação gene-gene e gene-nutriente (16).

A ingestão de 200 µg de ácido fólico por dia pode reduzir a concentração de Homocisteína em até 60% e a administração diária de 400 µg está associada com a redução de até 90% da concentração de Homocisteína (17). Os pacientes falciformes aqui estudados recebiam 5 mg/dia de ácido fólico como tratamento profilático. O ácido fólico pode ter uma ação terapêutica protetora naqueles pacientes com o polimorfismo no gene MTHFR, diminuindo os níveis de Homocisteína e consequente, a incidência de complicações vaso-oclusivas. A não significância de complicações vaso-oclusivas nesses pacientes pode ser justificada pela ação terapêutica do ácido fólico em uso.

A relação entre a presença da inserção de 68pb no gene da *CBS* e as manifestações vaso-oclusivas foi significativa nos pacientes falciformes estudados, concordando com os dados da literatura que a reconhece como fator de risco para tromboembolismos venoso e doença arterosclerótica vascular precoce (6).

A interação entre os dois polimorfismos avaliados (*CBS* e *MTHFR*) mostrou uma associação significativa com aumento de duas vezes no risco para o desenvolvimento de processos vaso-oclusivos nos pacientes estudados, concordando com os achados de De Franchis e colaboradores (18).

Apesar da maioria dos pacientes falciformes não apresentarem episódios de vaso-oclusão de grande magnitude, a forma silenciosa e a não manifestação clínica exscrebada desse tipo de complicação podem ocorrer e liderar os danos crônicos aos órgãos e tecidos desses pacientes (19). Portanto, a frequência de vaso-oclusão clinicamente detectável não deve ser o único parâmetro para avaliar a gravidade da doença falciforme, e não pode servir como parâmetro confiável de terapia eficaz em todos esses pacientes.

Considerando a escassez de estudos envolvendo os afro-descendentes brasileiros, com relação a frequência e a interação dos polimorfismos genéticos avaliados, os nossos estudos envolvendo essa etnia mostrou que a presença da mutação 844ins68 no gene da *CBS* é um fator de risco trombótico para os pacientes falciformes. A detecção dessa mutação poderão contribuir para o melhor entendimento das manifestações clínicas dos pacientes falciformes, com utilização de condutas profiláticas e terapêuticas específicas, para atenuar o sofrimento desses pacientes e melhorar suas qualidades de vida.

Materiais e Método

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto – São Paulo (IBILCE/UNESP), sob protocolo número 0008.0.229.000-07 e também pelo CEPMHA do Hospital das Clínicas/UFG.

Foram pesquisados 91 Doentes Falciformes provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, sendo 51 mulheres e 40 homens. Desses, 45 estão na faixa etária de 0-19 anos, 39 na faixa de 20-39 anos e 7 com idade de 40-59 anos. Os medicamentos hidroxiuréia e ácido fólico foram administrados respectivamente, em 49 e 84 pacientes.

Para os estudos laboratoriais, coletou-se 5 mL de sangue venoso com o anticoagulante EDTA 5%, após consentimento informado e conforme as diretrizes éticas. As metodologias clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias foram realizadas para a confirmação do fenótipo de cada portador (20). O DNA foi extraído dos leucócitos pelo método fenol/clorofórmio modificado (21), e as detecções das mutações dos genótipos de hemoglobina foram realizadas por amplificação de um segmento gênico, com iniciadores que flanqueiam a região de inserção, com análise por Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP) (22) e Alelo Específico (AE) (23). A presença dos polimorfismos pesquisados foram determinados por PCR usando iniciadores

descritos para CBS (6) e MTHFR (24). O fragmento amplificado para MTHFR foi digerido por enzima de restrição *HinfI Fast* (Fermentas). Posteriormente realizou-se a revelação em gel de agarose, corado com brometo de etídio, sob luz UV.

Pelas anotações dos prontuários foi constatado que cinco pacientes apresentaram acidente vascular encefálico isquêmico; onze tiveram necrose avascular do fêmur; cinco manifestaram priapismo; em quatro foram diagnosticadas úlceras maleolares; osteomielite em seis pacientes; complicações na gravidez estão anotadas no prontuário de seis pacientes; retinopatia em dezesseis; hemorragia alveolar em dois; e infarto esplênico em quatro. As complicações vaso-oclusivas foram confirmadas pelo clínico hematologista que acompanhava os pacientes na época do evento e a revisão dos prontuários foi realizada sob supervisão do médico pesquisador participante desse estudo.

Aplicou-se o teste de Qui-Quadrado (χ^2) com nível de significância de 95% ($p=0,05$) e a correção de Yates em $n < 5$ para comparação das frequências dos polimorfismos. Realizaram-se os cálculos para o Risco Relativo e Intervalo de Confiança e posteriormente Qui-Quadrado para verificação da significância, sendo o banco de dados processado e os cálculos realizados no *software Statistica 7.0*.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu suporte financeiro do CNPq, Capes . Os autores agradecem aos pacientes e profissionais da área de saúde do Hospital das Clínicas da UFG que permitiram a realização dessa pesquisa. Agradecemos ao Heury Sousa Ferreira e Hederson Vinícius de Souza pelo auxílio nas análises estatísticas e aos colegas do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas pela presteza e deferência.

Referências

- 1- Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: Evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002;25:1202.
- 2- Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: A meta-analysis of published epidemiological studies. *Thromb Haemost* 2005;3:292–299.
- 3- Schneede J, Refsum H, Ueland PM. Biological and environmental of plasma homocysteine. *Semin Thromb Hemost* 2000;6:263–279.
- 4- Eldibany MM, Caprini JA. Hyperhomocysteinemia and thrombosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:872-884.
- 5- Andreassi MG, Botto N, Cocci F, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease. *Hum Genet.* 2003;112:171-7.
- 6- Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson NQ. High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. *Am J Hum Genet* 199;59(6):1262-7.
- 7- Shmeleva VM, Kapustin SI, Papayan LP, et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism in patients with arterial and venous thrombosis from North Western Russia. *Thromb Res* 2003;111:351-58.
- 8- Juo SHH, Liao YC, Kuo CL, et al. The MTHFR 677 C/T polymorphism influences plasma levels of adhesion molecules and nitric oxide. *Thromb Res* 2008;121:549-554.
- 9- Gaustadnes M, Rudiger N, Rasmussen K, Ingerslev J. Intermediate and severe hyperhomocysteinemia with thrombosis: A study of genetic determinants. *Thromb Haemost* 2000;83:554–558.
- 10- Walter PB, Fung EB, Killilea DW, et al. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. *Br J Haematol* 2006;135:254–263.
- 11- Serjeant GR. The emerging understanding of sickle cell disease. *Br J Haematol* 2001;112(1):3-18.
- 12- Eldor A, Rachmilewitz EA. The hypercoagulable state in thalassaemia. *Blood.* 2002;99:36–43.

- 13- Steinberg MH, Lu ZH, Barton FB, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Determinants of response to hydroxyurea. *Blood*. 1997;89:1078–1088.
- 14- National Toxicology Program—Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction U. S. D. o. H. a. H. S. White Paper on Hydroxyurea Risk:Benefit Oct 2007. In: NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of hydroxyurea, 2007.
- 15- Morelli VM, Lourenco DM, D'almeida V, et al. Hyperhomocysteinemia increases the risk of venous thrombosis independent of the C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in selected Brazilian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13(3):271-275.
- 16- Devlin AM, Clarke R, Birks J, et al Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. *Am J Clin Nutr* 2006;83:708–13.
- 17- Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a metaanalysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr* 2005;82:806–12.
- 18- De Franchis R, Fermo I, Mazzola G, et al. Contribution of the cystathionine h-synthase gene (844ins68) polymorphism to the risk of early-onset venous and arterial occlusive disease and of fasting hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemost* 2000;84:576–82.
- 19- Schong JJB, Lard LR, Rojer RA, et al. New Concepts in Assessing Sickle Cell Disease Severity. *Am J Hematol* 1998;58:61–66.
- 20- Bonini-Domingos, C.R. Laboratory methods for diagnosis of Thalassemia and Hemoglobinopathies, São José do Rio Preto: HN, 2006 121 p.
- 21- Pena SDJ. DNA Bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinnylated probes. *Electrophoresis*. 1991;12(2-3):146-152.
- 22- Sasaki Y, Ueno I, Nakakoshi R, et al. Differentiation of selected abnormal hemoglobin by PCR-RFLP method. *Rinsho Byori* 1997;45(12):1163-6.
- 23- Chinelato-Fernandes AR. Molecular differentiation of mutants of human hemoglobin in the brazilian population. Sao Jose do Rio Preto, 227f. Thesis (Ph.D. in Genetics) - Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences, University Estadual Paulista 2003 227f.
- 24- Frosst P, Blom Hj, Milos R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.

Tabela I. Relação da interação dos genótipos de hemoglobina com a presença ou ausência de complicações vaso-oclusivas (n=91).

Genótipo	Presença de complicações vaso-oclusivas (n=59)	Ausência de complicações vaso-oclusivas (n=32)	n= 91
SS	34	14	48
S/Beta	8	15	23
SC	12	8	20
χ^2	$\chi^2=9,969$; GL=2; p=0,007		
χ^2	$\chi^2=8,380$; GL=2; p=0,015		

χ^2 - Teste de Qui Quadrado
GL - grau de liberdade; p≤0,05.

Tabela II. Frequência alélica para as mutações nos genes da MTHFR e da CBS em relação à presença ou ausência das complicações vaso-oclusivas nos pacientes estudados (n=91).

	Presença de complicações vaso-oclusivas (n= 59)				Ausência de complicações vaso-oclusivas (n= 32)				χ^2	GL	p
	Número de alelos		Frequência Alélica		Número de alelos		Frequência Alélica				
	W	M	W	M	W	M	W	M			
MTHFR	92	26	0,78	0,22	55	9	0,86	0,14	1,698	1	0,193
CBS	91	27	0,77	0,23	59	5	0,92	0,08	6,502	1	0,011

χ^2 - Teste de Qui Quadrado
GL - grau de liberdade; p≤0,05.

Tabela III. Fator de risco devido à presença da interação entre os polimorfismos avaliados e a presença de complicações vaso-oclusivas nos pacientes estudados (n=49).

Interação entre polimorfismos das CBS e MTHFR	Manifestação vaso-oclusivas		Total
	Sim	Não	
Presente	10	1	11
Ausente	16	22	38
Total	26	23	49

Teste de Qui Quadrado ($\chi^2=8,158$, GL=1; p=0,004; 95% IC:0,31-1,68).

Apêndice B. 1 – TCLE

UNESP – São José do Rio Preto
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa “**Polimorfismo nos genes *MTHFR* e Cistationina beta sintase e sua relação com fatores de risco para tromboembólicos na anemia falciforme**” sob responsabilidade da Pós-Graduanda Maza Alves Jacob. O estudo será realizado com amostras de sangue para avaliar os defeitos genéticos envolvidos nos processos de trombose em pacientes com anemia falciforme, buscando esclarecer os fatores envolvidos no agravamento da anemia, visando esclarecer as diferenças de manifestação entre os indivíduos. O risco é considerado mínimo, caracterizado pela possibilidade de mancha roxa no local da picada da agulha de coleta. Você poderá consultar o pesquisador responsável em qualquer época, pessoalmente ou por telefone para esclarecimento de qualquer dúvida pelos endereços abaixo citados. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo e, estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Você será informado dos resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. O material biológico cedido será armazenado e você poderá ser chamado para dar a sua autorização para novo(s) projeto(s). Caso isso não seja possível, seu material biológico somente será utilizado mediante aprovação pelo CEP ou pela CONEP, em cumprimento à Resolução CNS 347/2005.

Após ler com atenção este documento ser esclarecido (a) sobre as informações, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvidas obre seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: 3269 83 38 – 3269 84 26

Assim, concordo em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome: _____ R.G.: _____

Endereço: _____ Fone: _____

_____, ____ de _____ 2007

Usuário/ responsável legal

Pesquisador responsável

Maza Alves Jacob - Cargo/função: Pós-graduanda/Biomédica
Instituição IBILCE–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/UNESP–Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto – SP. Fone: (17) 3221-2392
Endereço: Rua Cristóvão Colombo, n. 2265, Jardim Nazareth – CEP: 15054-000.

Apêndice B.2 - Questionário

Questionário a ser respondido pelos participantes do projeto sobre anemia falciforme e trombose.

Data: ____/____/____

Nome completo: _____

Gênero: () feminino () masculino

Endereço: _____

Cidade e estado aonde mora: _____

CEP: _____

Telefone residencial: () _____ Telefone comercial: () _____

Idade: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Etnia (indicar o país de origem): _____

Local de nascimento (indicar cidade, estado e país): _____

Profissão atual: _____

Fuma? () não () sim- A quanto tempo? _____

Se fumava, quanto tempo faz que você parou de fumar? _____

Toma bebidas alcoólicas? () não () sim –A quanto tempo? _____

Você tem algum tipo de doença? (hipertensão, diabete, colesterol, triglicérides, reumatismo, outras) () não () sim Quais? _____

Toma medicamentos? () não () sim – Quais? _____

Você faz uso de contraceptivos (mulheres)? () não () sim- Qual? _____

Você teve algum membro imobilizado?() não () sim–Local e a quanto tempo? _____

Você tem trombose ou familiares com processos de trombose? () não () sim -

Local, há quanto tempo, grau de parentesco? _____

Muito obrigada por sua consideração em dispor o seu tempo para preencher este questionário.

Maza Alves Jacob - Cargo/função: Pós-graduanda/Biomédica

**Intituição IBILCE–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/UNESP–
Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto – SP.**

Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth – CEP: 15054-000,

Fone: (17) 3221-2392

Tabela 20: Resultados gerais encontrados para o grupo avaliado em São Paulo (n=39).

Perfil de hemoglobinas																			
				Eletroforese		HPLC		Bio.mol.		Eventos clínicos							Interferentes ambientais		
ID	Etnia	Gênero	Idade	pH 8,6	pH 6,2	Hb A2	Hb F	HbS	MTHFR	CBS	Medicamentos em uso	Trombose	Última Transf.	Doença	Químicos	Fumo	Álcool		
SPHBS-1	Afro-descendente	F	20	AS+F	AS+F	2,3	4,7	Homo SS	Normal	Hetero	Ác. Fólico, AAS, complexo B, Digoxina, exjade	Sim (AVC)	29/10/2007	Não	Não	Não	Não		
SPHBS-2	Afro-descendente	F	44	AS+F	AS+F	2,4	2,5	HbS	Normal	Normal	Ác. Fólico, exjade, hidreia, analgésicos	Não	out/07	Não	Não	Não	Não		
SPHBS-3	Afro-descendente	F	27	SS+F	SS+F	2	5,4	Homo SS	Hetero	Normal	Ác. Fólico, hidrêia, analgésicos	Sim	ago/07	Não	Não	Não	Não		
SPHBS-4	Afro-descendente	F	38	SS+F	SS+F	2,1	5,3	Homo SS	Normal	Normal	Ác. Fólico	Não Sim (braço)	não	Não	Não	Não	Não		
SPHBS-5	Afro-descendente	F	48	SS+F	SS+F	2,7	15,7	Homo SS	Normal	Hetero	Hidrêia		1 ano	Sim	Não	Não	Não		
SPHBS-6	Afro-descendente	M	17	S/A	S/A	2,5	1,3	Homo SS	Normal	Normal	Ác. Fólico, Retmic, exjade, idantal	Sim	18/10/2007	Não	Não	Não	Não		
SPHBS-7	Afro-descendente	F	50	S/A	S/A	3,5	3,1	Homo SS	Normal	Normal	Ác. Fólico, exjade, digoxina	Sim	18/7/2007	Sim	Não	Não	Não		
SPHBS-8	Afro-descendente	F	19	SS+F	SS+F	2,3	14,2	Homo SS	Normal	Normal	Ác. Fólico	Não Sim (derrame 3X)	jan/07	Não	Não	Não	Não		
SPHBS-9	Afro-descendente	F	23	S/A	S/A	2,3	3	Hetero HbS S/Beta CD39	Hetero	Normal	Ác. Fólico, exjade		out/07	Não	Não	Não	Não		
SPHBS-10	Caucasóide	F	21	S/A+F	S/A+F	3	10,5		Hetero	Normal	Ác. Fólico	Sim (mão)	26/11/2007	Não	Sim	Não	Não		
SPHBS-11	Afro-descendente	F	40	SS+F	SS+F	2,3	18,8	Homo SS	Normal	Normal	Ác. Fólico	Não	2 anos	não	não	não	não		
SPHBS-12	Afro-descendente	F	13	AS	AS+F	2,5	1,9	Homo SS	Homo	Normal	Ác. Fólico, exjade, complexo B, AAS	Sim	21/11/2007	não	não	não	não		
SPHBS-13	Afro-descendente	F	24	S/A+F	S/A+F	3,2	7,7	Homo SS	Hetero	Normal	Ác.Fólico, hidreia, exjade	Sim	2 semanas	não	não	não	sim		
SPHBS-14	Afro-descendente	F	25	SS	SS+F	2,7	3,9	Homo SS	Normal	Normal	Ác. Fólico, exjade, hidreia, analgesicos	Não	14/11/2007	não	não	não	não		
SPHBS-15	Afro-descendente	M	18	SS	SS+F	2,8	2,5	Homo SS	Normal	Normal	Ác.Fólico, complexo B	não	2 meses	não	não	não	não		
SPHBS-16	Afro-descendente	F	46	AS	AS+F	2,6	1,6	Homo SS	Normal	Hetero	Ác. Fólico, captopril, AAS, exjade	Não	18/11/2007	sim (hipert)	não	não	não		
SPHBS-17	Afro-descendente	M	14	S/A	S/A+F	2,8	4,4	Hetero HbS	Normal	Normal	Ác. Fólico, complexo B , AAS, exjade	Sim	22/11/2007	não	não	não	não		
SPHBS-18	Afro-descendente	F	9	AS	AS	2,4	3,3	Homo SS	Normal	Hetero	Ác. Fólico, exjade, AAS	Sim	11/11/2007	não	não	não	não		
SPHBS-19	Afro-descendente	M	18	AS	AS+F	2,5	2,6	Hetero HbS	Normal	Normal	Ác. Fólico, AAS, Complexo B, exjade	Não	6/11/2007	não	não	não	não		

ID	Etnia	Gênero	Idade	Eletoforese	HPLC	Bio.mol.		Eventos clínicos	Interferentes ambientais	Medicamentos em uso	Trombose	Última Transf.	Doença	Químicos	Fumo	Álcool	
				pH 8,6	pH 6,2	Hb A2	Hb F	MTHFR	CBS								
SPHBS-20	Afro-descendente	M	18	AS	AS+F	2,5	2,6	HbS Hetero	Normal	Normal	Ac. Fólico, AS, Complexo B, exjade	Não	6/11/2007	Não	Não	Não	não
SPHBS-21	Afro-descendente	F	42	SS+F	SS+F	3,1	8,6	Homo SS	Hetero	Normal	Ac.Fólico, hidreia, exjade	sim	2 meses	não sim (hepat C, arritmia)	não	não	não
SPHBS-22	Afro-descendente	M	29	AS	AS	2,7	1,2	Homo SS	Homo	Normal	Ac. Fólico, exjade, hidreia, analgesicos	Não	5 meses		sim	não	não
SPHBS-23	Afro-descendente	F	13	S/A	S/A	1,6	2	Homo SS S/Beta	Normal	Normal	Ac. Fólico, exjade, complexo B	Sim	13/12/2007	não	não	não	não
SPHBS-24	Afro-descendente	M	31	SC	SC	3,3	3,2	CD39 Hetero	Homo	Normal	Hidreía Ac. Fólico, hidreia, exjade	Não		Não	Não	Não	sim
SPHBS-25	Afro-descendente	F	42	AS	AS	2,8	1,4	HbS	Hetero	Hetero		Não	11/7/2007	Não	Não	Não	Não
SPHBS-26	Afro-descendente	F	24	SS	SS	2,2	6,8	Homo SS	Homo	Normal	Ác. Fólico, exjade	Não	1 ano	Não	Não	Não	Não
SPHBS-27	Afro-descendente	F	28	SS	SF	2,7	10,9	Homo SS	Hetero	Homo	Ác. Fólico, exjade, hidreia, analgesicos	Sim (trombose)	11 meses	sim (hipert)	Não	Não	Não
SPHBS-28	Afro-descendente	F	24	SS	SS	0	16,7	Homo SS	Hetero	Normal	Ác. Fólico, hidreia, exjade	Sim	3 meses	Não sim	Não	Não	Não
SPHBS-29	Afro-descendente	F	30	SS	SF	0	4,5	Homo SS	Normal	Hetero	Ác. Fólico	Não	3 meses	sim (cardíaca)	Não	Não	Não
SPHBS-30	Afro-descendente	M	25	SS	SS	2,9	4,7	Homo SS	Normal	Normal	Ác. Fólico	Não	1995	Não	Não Sim	Não	Não
SPHBS-31	Afro-descendente	F	21	SS	SS	2,9	13,2	Homo SS S/Beta	Normal	Hetero	Ác. Fólico, hidreia, captopril, analgésicos	Não	1/8/2007	sim (reumatismo)	(amoníaco, formol)	Não	Não
SPHBS-32	Afro-descendente	F	45	SS+A	SAF	3,7	3,4	CD39	Normal	Hetero	Ác. Fólico, carbamazepina, exjade	Sim	2 meses	Não	Não	Não	Não
SPHBS-33	Afro-descendente	F	33	SS	SS	2,5	13,7	Homo SS Hetero	Normal	Normal	Ác. Fólico, AAS, Complexo B, exjade	Sim (pai)	1 ano	Não	Não	Não	Não
SPHBS-34	Afro-descendente	F	9	AS	AS	3,3	4,6	HbS	Normal	Normal	Ác. Fólico, AAS, Complexo B, exjade	Sim (AVC)	22/11/2007	Não sim (hepat C)	Não	Não	Não
SPHBS-35	Afro-descendente	F	44	SS+A	SS	0	4,7	Homo SS Hetero	Homo	Hetero	Ác. Fólico, Complexo B, exjade	Não	2 meses		Não	Não	Não
SPHBS-36	Afro-descendente	M	17	AS	AS	4,1	1,1	HbS S/Beta	Homo	Normal	Ác. Fólico, Complexo B, captopril	Não	25/11/2007	sim (hipert)	Não	Não	Não
SPHBS-37	Afro-descendente	F	13	AS	AS	3,8	9,3	CD39	Hetero	Normal	Ác. Fólico, AAS, Idantal, exjade	Não	1 mês	Não	Não	Não	Não
SPHBS-38	Afro-descendente	M	42	AS	AS	3,1	2,2	Heter HbS S/Beta	Hetero	Normal	Ác. Fólico, hidreia, captopril	Não	9/12/2007	Não	Não	Não	Não
SPHBS-39	Afro-descendente	M	18	AS	AS	6	1,5	CD39	Normal	Normal	Ác. Fólico	Não	5/12/2007	Não	Não	Não	Não

Tabela 21: Resultados gerais encontrados para o grupo avaliado em Brasília (n=33).

ID	Idade	Gênero	NaCl	M.E.	Perfil de hemoglobinas						
					Eletrforese		HPLC		Bio.mol.		
					pH 8,6	pH 6,2	Hb A2	Hb F	HbS	MTHFR	CBS
HbSBra-1		F	neg	leve	SC	SC	5.6	4.0	SC	Het	Het
HbSBra-2		M	neg	mod	SS	SS	10.2	5.3	SS	Het	Normal
HbSBra-3		F	neg	leve	SC	SC	6.6	5.9	SC	Normal	Normal
HbSBra-4		M	neg	leve	SC	SC	6.7	0.5	SC	Het	Normal
HbSBra-5		M	neg	mod	SF	SF	8.6	20.1	SS	Het	Normal
HbSBra-6		M	neg	leve	FS	FS	5.6	35.4	SS	Het	Normal
HbSBra-7		F	neg	mod	SS	SS + F	7.3	8.5	SS	Homo	Normal
HbSBra-8		M	neg	leve	SC	SC	6.7	5.8	SC	Normal	Normal
HbSBra-9		M	neg	leve	SC	SC	6.6	1.7	SC	Het	Normal
HbSBra-10		M	neg	leve	SC	SC	5.9	7.8	SC	Normal	Het
HbSBra-11		M	neg	mod	SS	SS	10.9	1.0	SS	Het	Normal
HbSBra-12		F	neg	leve	SC	SC	6.0	3.0	SC	Het	Normal
HbSBra-13		M	neg	INSUF.	SS	SS			SS	Het	Normal
HbSBra-14		F	neg	mod	SS+F	SS	9.3	26.6	SS	Het	Normal
HbSBra-15		M	neg	mod	SS+F	SS	4.4	9.0	SS	Normal	Normal
HbSBra-16	0,6	M	neg	mod	SC	SC	4.7	6.4	SC	Normal	Het
HbSBra-17	10	F	neg	mod	SS	SS	5.0	8.7	SS	Normal	Normal
HbSBra-18	7	F	neg	hemolisado	SS	SS	8.9	3.7	SS	Normal	Het
HbSBra-19		F	neg	hemolisado	SC	SC	6.2	5.1	SC	Normal	Het
HbSBra-20		F	neg	hemolisado	SC	SC	7.0	1.5	SC	Normal	Het
HbSBra-21	9	M	neg	mod	SS	SS	5.0	7.2	SS	Het	Het
HbSBra-22	10	M	neg	mod	SS+F	SS + F	4.0	13.9	SS	Het	Normal
HbSBra-23	12	M	neg	mod	SS	SS	4.5	3.5	SS	Normal	Normal
HbSBra-24		F	neg	mod	AS+F	AS+F	2.6	5.7	HET	Normal	Normal
HbSBra-25		M	neg	mod	SF	SF	2.8	21.4	SS	Normal	Normal
HbSBra-26		M	neg	mod	SS+F	SS+F	2.6	14.8	SS	Normal	Normal
HbSBra-27		M	neg	leve	SC	SC	3.3	2.2	HET	Normal	Normal
HbSBra-28		F	neg	grave	SeA	SeA	2.8	2.5	HET	Het	Normal
HbSBra-29		F	neg	grave	SeA	SeA	2.4	5.5	HET	Normal	Normal
HbSBra-30	8	F	positiva	medio cels falcizadas	SF	SS F	5,7	15,8	HET	Normal	Normal

Continuação Tabela 21.

121

ID	Idade	Gênero	NaCl	M.E.	Eletroforese pH 8,6	HPLC pH 6,2	Bio.mol. Hb A2	Hb F	HbS	MTHFR	CBS
HbSBra-31	3	F	negativa	médio	SF A dim	SF A dim	5,2	26,6	HET	Normal	Normal
HbSBra-32	7	M	negativa	médio	SF	SS F	2,7	23,2	SS	Normal	Normal
HbSBra-33	10	M	positiva	médio	SS F	SS F	3,5	5,4	SS	Het	Normal

Tabela 22: Resultados gerais encontrados para o grupo avaliado em Goiânia (n=94).

ID	Etnia	Gênero	Idade	Perfil de hemoglobinas						MTHFR	CBS	Medicamentos em uso	Eventos clínicos					
				Eletroforese		HPLC		Bio.mol.					Trombose	Última Transf.	Doença	Fumo	Álcool	Pílula
				pH 8,6	pH 6,2	Hb A2	Hb F	HbS										
HCGO001	Afro	F	25	SF	SF			SS	Normal	Het	Hydrea e ácido fólico a um ano	AVC na irmã	1/out	não	não	não	não	
HCGO002	Afro	F	22	SAF	SAF			SS	Normal	Het	Hydrea, ácido fólico a dois anos, AS	AVC	25/1/2008	sim	não	não	parou 4a	
HCGO003	Afro	M	11	SF	SF			SS	Het	Het	Hydrea a três anos, ácido fólico a cinco anos		2003	não	não	não	não	
HCGO004	Afro	M	12	S A	S A			SC	Het	Normal	não		nunca	pneumonia	não	não	não	
HCGO005	Afro	M	7	SF	SF			SS	Normal	Normal	Hydrea a seis meses, ácido fólico a cinco anos		2005	fimose	não	não	não	
HCGO006	Afro	F	12	SF	SF			SS	Normal	Het	Hydrea a um ano, ácido fólico a cinco anos, Hydrea a oito meses, digoxina, ácido fólico a oito meses, captopril		2007	osteomelite, pneumonia	não	não	não	
HCGO007	Afro	M	6	S A	ASF			SS	Normal	Normal	Hydrea há quatro meses, ácido fólico a três anos, benzetacil	Miocardiopata	11/2/2008	miocardiopata	não	não	não	
HCGO008	Caucasóide	F	4	SFA	SF			SS	Het	Normal	Hydrea há seis meses, ácido fólico há dois anos	derrame na avó	2007	não	não	não	não	
HCGO009	Afro	F	36	SF	SF			SS	Het	Normal	Hydrea há quatro meses, ácido fólico há 39 anos, atenolol		há anos	não	não	não	não	
HCGO010	Afro	F	41	SF	SF			SS	Het	Normal			mar/03	não	parou a 10 a	não	não	
HCGO011	Afro	F	5	SC	SC			SC	Normal	Normal	Ácido fólico há um mês		2005	pneumonia	não	não	não	
HCGO012	Afro	F	16	S A	FSA			SS	Normal	Normal	Hydrea , ácidp fólico há três anos, AS, aldol	AVC há 4 anos 3x	22/fev	drenagem	não	não	não	
HCGO013	Afro	F	11	SC	SCF			SC	Normal	Het	Hydrea há dois anos, ácido fólico		2005	não	não	não	não	
HCGO014	Afro	M	2	SF	SF			Het	Het	Normal	Hydrea há sete meses, ácido fólico há dois anos, penicilina	AVC há um ano, bisá'vo materna trombose na perna	set/07	não	não	não	não	
HCGO015	Afro	F	5	SF	SF			SS	Normal	normal	ácido fólico há dois anos	tia materna teve trombose na perna esquerda		não	não	não	não	
HCGO016	Caucasóide	F	10	SF	SS F			SS	Normal	Het	Hydrea há um ano, ácido fólico há nove anos		2007	não	não	não	não	
HCGO017	Caucasóide	F	20	SF	SF		4,7 6,3	SS	Het	Normal	Hydrea há quatro meses, ácido fólico há 19 anos,glipilex, estrogênio, puran	fólico há 4 anos	out/07	não	não	não	não	
HCGO018	Afro	M	44	SC	SCF		4,2 1,1	SC	Het	Normal	Hydrea há quatro anos (provoca diarreia, desidrata e provoca dor), ácido fólico há 26 anos	necrose de cabeça do fêmur nas duas pernas	jan/07	transplante de m., osteomelite, artrose	parou a 10a	parou 15a	não	

ID	Etnia	Gênero	Idade	Eletrforese		HPLC pH 6,2	Bio.mol.		Hb		HbS	Eventos clínicos		Medicamentos em uso	Trombose	Última Transf.	Doença	Fumo	Álcool	Pílula
				pH 8,6	pH 8,6		Hb A2	F				MTHFR	CBS							
HCGO019	Afro	F	16	AS	AS						Het	Normal	Normal	não		nunca	não	sim	não	não
HCGO020	Afro	F	11	S A	S A						SS	Het	Normal	não		nunca	não	não	não	não
HCGO021	Afro	F	32	SC	SC						SC	Normal	het	Hydrea, ácido fólico		1998	não	não	não	não
HCGO022	Afro	M	36	SC	SC						SC	Normal	Normal	Ácido fólico		nunca	não	não	sim	não
HCGO023	Afro	M	9	AS	AS		4,9	15			SS	Normal	Normal	Hydrea há um mês, áido fólico há nove anos e benzetacil há nove anos		18/2/2008	priapismo	não	não	não
HCGO024	Afro	F	34	S A	AS						SS	Normal	Normal	Dipirona		nunca	não	sim	sim	não
HCGO025	Caucasóide	F	26	SF ?	AS ?		0	1,2			Het	Het	Normal	não		nunca	não	não	sim	deprovera há 3 anos
HCGO026	Afro	M	4	SC	SC						SC	Normal	Het	Ácido fólico, benzetacil		nunca	não	não	não	não
HCGO027	Afro	M	4	SF	SF						Het	Normal	Normal	Ácido fólico, benzetacil		2005	não	não	não	não
HCGO028	Afro	F	12	SF	SS F						SS	Normal	Normal	Ácido fólico		2002	não	não	não	não
HCGO029	Afro	F	15	S A	ASF						SS	Homo	Het	Hydrea, ácido fólico, AS, dipirona, tilex	AVC há 1a	7/2/2008	não	não	não	não
HCGO030	Afro	F	29	SS	SF		5,3	10			SS	Normal	Normal	Ácido fólico		2004	não	não	não	não
HCGO031	Afro	M	3	SFA	SAF						Het	Normal	Normal	Ácido fólico, benzetacil		20/1/2008	não	não	não	não
HCGO032	Afro	F	6	SF	SF						SS	Normal	Het	Hydrea, ácido fólico		ago/07	não	não	não	não
HCGO033	Afro	F	43	SFA	SAF						SS	Het	Het	Ácido fólico	Úlcera na perna esquerda	dez/08	catarata	não	não	não
HCGO034	Afro	M	20	SC	SCF						SS	Normal	Normal	Ácido fólico		nunca	não	não	sim	não
HCGO035	Afro	M	48	SC	SC						SC	Normal	Normal	Ácido fólico, rovostril		nunca	não	20-25a parou a la	não	não
HCGO036	Afro	F	15	SF	SF						SS	Normal	Normal	Ácido fólico		nunca	não	sim	sim	1a
HCGO037	Caucasóide	M	3	AS	AS						Het	Het	Het	não			não	não	não	não
HCGO038	Caucasóide	F	25	AA	AA						Het	Normal	Normal	não		nunca	não	não	não	parou a 2 a
HCGO039	Afro	F	2	SF	SF						Het	Normal	Het	Ácido fólico, benzetacil		nunca	não	não	não	não
HCGO040	Caucasóide	M	25	SC	SCF						SC	Het	Normal	Hydrea há seis meses, ácido fólico há dois anos		nunca	não	não	não	não
HCGO041	Afro	F	16	SS	SS						Het	Normal	Normal	Ácido fólico		jan/08	não	não	não	não
HCGO042	Afro	F	8	SF	SF						Het	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico há cinco anos			não	não	não	não
HCGO043	Caucasóide	M	11	SF	SSF						SS	Normal	Het	Hydrea há oito anos, ácido fólico há dez anos		2007	não	não	não	não
HCGO044	Afro	M	32	SC	SC						SC	Het	Het	Ácido fólico		jun/07	não	não	sim	não
HCGO045	Caucasóide	F	29	AS?	AFS		3,1	5,9			SS	Normal	Het	Hydrea há 1ano, ácido fólico		10/2/2008	não	não	não	não

ID	Etnia	Gênero	Idade	Eletroforese		HPLC pH 6,2	Bio.mol.		Hb		HbS	Eventos clínicos		Medicamentos em uso	Trombose avó paterna trombose nas pernas	Última Transf.	Doença	Fumo	Álcool	Pílula
				pH 8,6			Hb A2		F			MTHFR	CBS							
HCGO046	Afro	M	14	SF		SF					SS	Normal	Homo	Hydrea há um ano, ácido fólico há doze anos		2003	não	não	não	não
HCGO047	Afro	M	12	SF		SF					SS	Normal	Het	Hydrea há um ano, ácido fólico há onze anos		ago/07	não	não	não	não
HCGO048	Afro	M	27	SS		SSF					Het	Normal	Normal	Hydrea há quatoze meses, ácido fólico há um ano		19/10/2007	não	não sim	não	não
HCGO049	Afro	M	28	SF		ASF					Het	Normal	Normal	Ácido fólico há um ano		1702/2008	não	8a	sim 8a	não
HCGO050	Afro	M	2	S A		ASF					Het	Normal	Normal	Hydrea há dois anos, ácido fólico, benzetacil		8/2/2007	não	não	não	não
HCGO051	Afro	F	13	S A		S A					Het	Normal	Normal	ácido fólico		2007	não	não	não	não
HCGO052	Afro	M	44	S A		SAF					Het	Het	Normal	Hydrea, ácido fólico, nalapril, captropil, hidrocodiazida		nunca	não	sim ?	não	não
HCGO053	Afro	F	38	SC		SC					Het	Normal	Het	Hydrea, ácido fólico, vasix		nunca	não	não	não	não
HCGO054	Afro	F	5	AS		AS					Het	Het	Normal	Dipirona		nunca	não	não	não	não
HCGO055	Afro	M	4	S A		SAF					Het	Het	Normal	Hydrea, ácido fólico, benzetacil		nunca	não	não	não	não
HCGO056	Afro	M	22	SF		SF					SS	Normal	Normal	Ácido fólico		há um ano	não	não	não	não
HCGO057	Afro	F	16	SF		SF aum					SS	Normal	Normal	Ácido fólico		há três anos	não	não	não	não
HCGO058	Afro	M	24	SS Fdim		SS					SS	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico		há oito anos	não	não	sim	não
HCGO059	Afro	F	35	SF		SF					SS	Het	Het	Hydrea, ácido fólico		há quatro anos	não prótese no fêmur	não	não	não
HCGO060	Afro	M	37	SF		SS					SS	Normal	Normal	Ácido fólico, voltarem		nunca	não	não	sim	não
HCGO061	Afro	M	16	SC		SC					SC	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico, tilex		nunca	não	não	não	não
HCGO062	Afro	F	12	SC		SC					SC	Normal	Het	Hydrea, ácido fólico, tilex		nunca	não	não	não	não
HCGO063	Afro	F	20	SF aum		SF					SS	Normal	Het	Ácido fólico		nunca	não	não	não	sim
HCGO064	Afro	F	35	SS (F)		SS (F)					SS	Normal	Het	Ácido fólico		nunca há quatro anos	não	não	não	não
HCGO065	Afro	M	14	SS F		SF					SS	Het	Normal	Hydrea, ácido fólico		nunca	não	não	não	não
HCGO066	Afro	M	45	AC		AC					SC	Het	Normal	Ácido fólico, tilex		nunca	não	não	não	não
HCGO067	Afro	F	33	SF		SF					SS	Normal	Het	Ácido fólico		há um ano	não	não	não	não
HCGO068	Caucasóide	F	35	SF		SF					SS	Normal	Normal	Ácido fólico		nunca	não	não	não	não
HCGO069	Afro	M	18	SF		SF					SS	Homo	Het	Hydrea, ácido fólico, tilex		nunca	não	não	não	não
HCGO070	Caucasóide	F	35	SF aum A		SAF					SS	Het	Normal	Ácido fólico, paracetamol, tilex, ranitidina	necrose do osso do quadril	há dois meses	não	não	não	não

ID	Etnia	Gênero	Idade	Eletroforese		HPLC pH 6,2	Bio.mol.		Hb		Eventos clínicos		Trombose	Última Transf.	Doença	Fumo	Álcool	Pílula
				pH 8,6	pH 6,2		Hb A2	F	HbS	MTHFR	CBS	Medicamentos em uso						
HCGO071	Afro	M	20	AS	SAF				SS	Het	Normal	Hydrea, ácido fólico, forozemida	trombose no pai	no dia	cardíaco	não	não	não
HCGO072	Afro	M	10	SF	SF				SS	Het	Normal	Ácido fólico		nunca	não	não	não	não
HCGO073	Afro	F	11	SF	SF				Het	Het	Normal	Tilex, amocilina		nunca	não	não	não	não
HCGO074	Afro	M	28	SF	SFA dim				SS	Normal	Normal	Ácido fólico		nunca há doze anos	não prótese no fêmur	não	não	não
HCGO075	Afro	M	47	SC	SC				SC	Normal	Normal	não			não	não	não	não
HCGO076	Afro	M	35	SC	SC				SC	Normal	Normal	Diclofenaco de sódio			não dor nos ossos, sente falta de ar	não	sim	não
HCGO077	Afro	F	29	AS	AS				Het	Normal	Normal	Diclofenaco, amtripilina			não	não	sim, diane 35	
HCGO078	Afro	F	32	SF	SF				SS	Het	Het	Ácido fólico			não	não	sim	não
HCGO079	Afro	M	4	SC	SC				SC	Normal	Het	Ácido fólico, benzetacil Hydrea, ácido fólico, captropil, digoxina, desferroxamina			não	não	não	não
HCGO080	Afro	F	13	SF	SF				Het	Normal	Normal		tia materna teve trombose	quinze dias	cardíaca	não	não	não
HCGO081	Afro	F	30	C? SFA	S aum A dim F (C)				Het	Het	Normal	Ácido fólico			não	não	não	diprovera
HCGO082	Afro	F	13	SS	SS Faum				SS	Het	Het	Hydrea, ácido fólico, tilex, paracetamol, peroxican			não	não	não	não
HCGO083	Afro	F	21	SS	SS Faum				Het	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico			hepatite C	não	não	não
HCGO084	Afro	F	23	SS	SSF				SS	Normal	Normal	Ácido fólico			não	não	não	não
HCGO085	Afro	M	8	SSF	ASF		5.5	8.3	SS	Normal	Het	Hydrea, ácido fólico			não	não	não	não
HCGO086	Afro	F	2	SSF	SSF				Het	Normal	Het	Benzetacil, idofolem			não	não	não	não
HCGO087	Afro	F	15	SC	SC				SC	Het	Het	sim?			não	não	não	não
HCGO088	Afro	M	33	SS	SS		7.8	1.4	SS	Normal	Normal	Ácido fólico			não	não	não	não
HCGO089	Afro	F	34	SSF	SSF				Het	Het	Het	Ácido fólico	teve início de trombose		hepatite	não	não	não
HCGO090	Afro	M	25	SFA	SAF				SS	Het	Normal	não			não	não	não	não
HCGO091	Afro	F	24	SC	SC				SC	Het	Normal	Ácifo fólico			não	não	sim	não
HCGO092	Afro	F	21	SC	SC				SC	Het	Het	Hydrea, ácido fólico			não	não	sim	não
HCGO093	Afro	M	4	SAF	SAF				Het	Normal	Normal	Pen-ve-oral			não	não	não	não
HCGO094	Afro	F	57	AS	AS				Het	Normal	Het	Klimater, tibolons			não	não	não	não

Tabela 23: Resultados gerais encontrados para o grupo avaliado no Rio de Janeiro (n=96).

Perfil de hemoglobinas																		
ID	Etnia	Gênero	Idade	Eletroforese		HPLC		Bio.mol.			Medicamentos em uso	Trombose	Eventos clínicos			Fumo	Álcool	Pílula
				pH 8,6	pH 6,2	Hb A2	Hb F	HbS	MTHFR	CBS			Última Transf.	Doença				
HEMO 01		F		AS	AS	4,1	2	SS	Normal	Het								
HEMO 02		F		AS	AS	2,8	2,6	SS	Normal	Normal								
HEMO 03		F		SS	SS F	2,7	3,2	SS	Normal	Normal								
HEMO 04		F		SS	SS	3	5	SS	Normal	Het								
HEMO 05		M		SS	SS	3,4	3,9	SS	Normal	Normal								
HEMO 06	Afro	F	22	SS	SS	4,8	7,6	Het	Normal	Normal	Ácido fólico, cálcio, medicamento para pressão		dez/07	pressão alta prótese na cabeça do fêmur direito embolia pulmonar sopro	não	não	não	
HEMO 07	Afro	F	43	SS	SS	4,6	2,7	Het	Het	Normal	Ácido fólico, digoxina, merivan, anidorona		jan/08	arritmia	não	não	sim 15a	
HEMO 08		F		SS F	SS F	6,9	8,2	SS	Normal	Normal								
HEMO 09	Afro	F	21	AS+F	ASF			SS	Normal	Normal	Ácido fólico		17/1/2008	não	não	não	não	
HEMO 10	Afro	F	38	SC	SC			SC	Het	Normal	Ácido fólico, fluxetina, ranitindina, propanolol, prednisona		nunca	artrite reumatóide, prolapso TOC	não	não	não	
HEMO 11	Afro	F	14	S	SF			SS	Het	Normal	Ácido fólico		2004	não	não	não	não	
HEMO 12	Afro	M	6	SF	SF			Het	Normal	Normal	Ácido fólico, hydrea		17/10/2007	não	não	não	não	
HEMO 13	Afro	F	21	AS+F	SAF			SS	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico		8/2/2008	não	não	não	não	
HEMO 14	Afro	F	14	AS ?	AS			SS	Normal	Normal	Ácido fólico Hydrea, ácido fólico, cinarizina, ranitidina,, cadeina, lidocaína, varfarina, enalapril, dogoxina		jan/08	não	não	não	não	
HEMO 15	Afro	F	54	SS+F	SSF			SS	HET	HET		Trombose nas duas pernas derrame há 13 anos	nov/07	úlceras, sopro	parou a 5a	sim	não	
HEMO 16	Afro	F	21	A S dim ?	ASF			SS	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico		21/1/2008	derrame priapismo, hipertensão	não	não	não	
HEMO 17	Afro	M	16	SF	SSF			SS	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico, captopril		jul/08	não	não	não	não	
HEMO 18	Afro	M	2	SC	SC			SC	Het	Het	Ácido fólico		jun/05	não	não	não	não	
HEMO 19	Afro	M	39	SS	SS			Het	Normal	Het	Ácido fólico		jun/05	não	não	não	não	
HEMO 20	Afro	F	32	S A	S A			SS	Normal	Normal	Ácido fólico		20/1/2008	não	não	não	não	

ID	Etnia	Gênero	Idade	Eletroforese		HPLC	Bio.mol.	Eventos clínicos			Trombose	Última Transf.	Doença	Fumo	Álcool	Pílula
				pH 8,6	pH 6,2			Hb F	HbS	MTHFR	CBS					
HEMO 21	Afro	F	20	SF	SF				SS	Normal	Normal	Ácido fólico	nunca	não	não	não sim
HEMO 22	Afro	F	47	ASC	ASC		5,4	2,4	SC	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico	10/1/2008	não	não	5a
HEMO 23	Afro	M	25	SS	SS				Het	Het	Het	Ácido, fólico, diclofenaco	jul/07	não	não	não
HEMO 24	Afro	F	18	A (S) F	ASF		4,4	1,4	SS	Normal	Normal	Ácido fólico, AAS, sinalizina	jan/08	derrame 2x	não sim	não
HEMO 25	Afro	M	43	SSF	SSF				SS	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico	Há 15a	não	20 a	não
HEMO 26	Afro	F	41	AS (F)?	ASF				SS	Het	Het	Hydrea, ácido fólic, medicamento para circulação	jan/08	úlceras nas 2 pernas	não sim	parou 10a
HEMO 27	Afro	F	42	SS F	SS				SS	Normal	Normal	Ácido fólico	jun/05	não	30a	sim não
											avó paterna teve derrame					
HEMO 28	Afro	M	4	SS F A	SAF				Het	Normal	Het	Ácido fólico, amoxicilina		não	não	não
HEMO 29	Afro	M	4	SS	SF				SS	Normal	Normal	Ácido fólico, diclofenaco, cadeína, amoxicilina	out/07	não	não	não
HEMO 30	Afro	F	50	SS/SF	AS/SF		5,3	17	SS	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico, eritropoetina, sinalizina, fenotreína, AAS	jun/05	AVC 8a	parou 8a	sim não
HEMO 31	Afro	F	19	SS	SSF				SS	Het	Normal	Hydrea, ácido fólico, flunazelina	jun/05	não	não	não
											mãe trombose na perna esquerda na gravidez					
HEMO 32	Afro	F	14	SF	SF				SS	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico, sinalizina	jul/07	não	não	não
HEMO 33	Afro	F	20	SAF	SAF				SS	Het	Normal	Hydrea, ácido fólico, AAS	jan/08	derrame 4x	não	não
											tia paterna trombose nas pernas e AVC					
HEMO 34	Caucasóide	M	5	SF	SF				Het	Het	Normal	Hydrea, ácido fólico, pv oral	jun/05	não	não	não
HEMO 35	Afro	M	4	SF	SF				SS	Het	Normal	Ácido fólico, benzetacil	jun/05	não	não	não

										Eventos clínicos									
				Eletroforese		HPLC	Bio.mol.												
ID	Etnia	Gênero	Idade	pH 8,6	pH 6,2	Hb A2	Hb F	HbS	MTHFR	CBS	Medicamentos em uso	Trombose	Última Transf.	Doença	Fumo	Álcool	Pílula		
HEMO 36	Afro	M	19	SF	SF			SS	Normal	Het	Hydrea, ácido fólico		mai/07	não	não	não	não		
HEMO 37	Afro	M	6	SF	SF A dim			SS	Het	Normal	Hydrea, ácido fólico, diclofenaco		jun/05	não	não	não	não		
HEMO 38	Afro	F	15	SS	SS			Het	Normal	Het	Hydrea, ácido fólico, morfina, codeína		jun/05	não	não	não	não		
HEMO 39	Afro	M	23	SC	SC			SC	Het	Normal	Ácido fólico, dipirona		jun/05	não	não	não	não		
HEMO 40	Caucasóide	M	7	SF	SF			Het	Normal	Het	Hydrea, ácido fólico, amoxicilina		jun/05	não	não	não	não		
HEMO 41	Afro	M	4	S A	S A			SS	Normal	Het	Ácido fólico, benzetacil		jan/08	não	não	não	não		
HEMO 42	Afro	M	33	SC	SC			SC	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico, dipirona		há 15a	não	não	sim	não		
HEMO 43	Afro	M	4	S A	S A			Het	Het	Normal	Hydrea, ácido fólico		jan/08	bronquite	não	não	não		
												irmã com AVC a dois anos			sim				
HEMO 44	Afro	M	39	SC	SC			SC	Het	Homo	Codeína, dipirona		há 20a	não	10a	sim	não		
HEMO 45	Afro	F	15	SF	SFA			Het	Homo	Normal	Ácido fólico, codeína		jun/05	não	não	não	não		
HEMO 46	Afro	F	50	SC	SC			SC	Normal	Het	Hydrea, ácido fólico	AVC 1x	2006	AVC 2a	não	sim	5a		
HEMO 47	Afro	M	39	SS	AF	8.4	8.8	SS	Normal	Homo	Hydrea ácido fólico		jun/05	não	não	não	não		
												necrose da cabeça do fêmur			atrose, necrose da cabeça dos 2 fêmur		2 meses		
HEMO 48	Afro	F	49	SC	SC			SC	Het	Normal	Ácido fólico, dipirona, codeína	úlceras na perna	há 10a		não	não			
HEMO 49	Afro	M	32	SF	SF			Het	Normal	Het	Hydrea, ácido fólico, captopril, metadona		out/07	úlceras na perna	não	sim	não		
															sim				
HEMO 50	Afro	M	58	SC	SC			SC	Normal	Het	Ácido fólico, hydrea, codeína, atenolol		nunca	hipertensão, tétano	46a	sim	não		
HEMO 51	Afro	F	54	SS	SFA	6.4	8.1	SS	Normal	Normal	Ácido fólico, dipirona		jun/05	não	não	não	30 a		
HEMO 52	Afro	M	10	S A	A S			SS	Normal	Het	Ácido fólico	AVC 1x	jan/08	AVC 1X	não	não	não		
HEMO 53	Afro	F	19	SS	SS			SS	Normal	Normal	Ácido fólico, codeínna, dipirona		jun/06	não	não	não	não		
HEMO 54	Afro	F	4	SF	SF			Het	Het	Normal	Hydrea, ácido fólico		out/07	não	não	não	não		
HEMO 55	Afro	M	35	SF	SFA			Het	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico		jun/05	cardíaco	não	não	não		
												úlceras nas pernas			úlceras nas 2 pernas				
HEMO 56	Afro	F	56	S A	AS			Het	Het	Normal	Ácido fólico		18/1/2008	não	não	não	não		
HEMO 57	Afro	M	36	SF	SF			SS	Normal	Homo	Hydrea, ácido fólico		jun/05	não	não	sim	não		
HEMO 58	Afro	F	39	AS	AS			Het	Normal	Normal	Ácido fólico	AVC 2x	15/1/2008	AVC 2x	não	sim	sim		

ID	Etnia	Gênero	Idade	Eletroforese		HPLC		Bio.mol.		Eventos clínicos				Última Transf.	Doença	Fumo	Álcool	Pílula
				pH 8,6	pH 6,2	Hb A2	Hb F	HbS	MTHFR	CBS	Medicamentos em uso	Trombose						
HEMO 59	Afro	M	12	AS	AS	5.8	5.3	SS	Normal	Normal	Ácido fólico Hydrea, ácido fólico, dipirona		10/1/2008	não	não	não	2a	
HEMO 60	Afro	M	39	SS	SS			SS	Het	Normal			set/07	não	não	não	não	
HEMO 61	Afro	F	9	SF	SF			Het	Normal	Normal			Ácido fólico	nunca	não	não	não	não
HEMO 62	Afro	M	30	SF	SAF			SS	Normal	Normal	Não	úlcera	21/1/2008	úlcera na perna	5a	não	não	
HEMO 63	Afro	F	41	A S	ASF			Het	Normal	Het	Ferro		nunca	hipertensão	não	não	parou 4a	
HEMO 64	Afro	M	10	SC	SC			SC	Normal	Normal	Ácido fólico		nunca	não	não	não	não	
HEMO 65	Afro	M	13	SC	SC			SC	Normal	Normal	Ácido fólico	osteomelite	nunca	osteomelite na perna direita	não	não	não	
HEMO 66	Afro	F	39	S A	SAF			Het	Normal	Normal	Ácido fólico, codeína, dipirona, anitidina		1/2/2008	não	não	sim	Sim 4a	
HEMO 67	Afro	M	20	SF	SS			Het	Normal	Het	Ácido fólico, dipirona		jun/07	não	não	não	não	
HEMO 68	Afro	F	30	SF	SS			Het	Normal	Het	Ácido fólico, hydrea, dipirona		nov/07	não	não	não	não	
HEMO 69	Afro	M	8	SF	SF			Het	Normal	Het	Hydrea, ácido fólico		2007	não	não	não	não	
HEMO 70	Afro	F	37	SF	SF			Het	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico	úlcera	2005	úlcera nas 2 pernas	não	sim	parou 1a	
HEMO 71	Afro	M	46	AS	SAF	3.6	0.7	SS	Normal	Normal	Ácido fólico, captopril, diazepan, fluxoteína, complexo B		jan/08	não	não	não	não	
HEMO 72	Afro	F	40	SF	SF			Het	Normal	Normal	Ácido fólico, dipirona, codeína, cálcio, vasorpil	necrose da cabeça do fêmur	há 7a	não	não	parou 8a		
HEMO 73	Afro	M	9	SS	SAF	6.7	4.8	SS	Normal	Normal	Hydrea, ácido fólico		ago/07	não	não	não	não	
HEMO 74	Afro	F	9	SF	SF			Het	Het	Normal	Ácido fólico		há 4a	não	não	não	não	
HEMO 75	Afro	M	42	SF	SF			SS	Het	Het	Ácido fólico, hydrea		jul/07	não	não	não	parou 2	
HEMO 76	Afro	F	29	AS	AS			Het	Normal	Het	Hydrea, ácido fólico		26/1/2008	hipertensão	não	não	meses	
HEMO 77	Afro	M	48	SF	SAF			SS	Normal	Het	Hydrea, ácido fólico		há 5 a	não	não	não	não	

									Eventos clínicos									
				Eletroforese		HPLC	Bio.mol.											
ID	Etnia	Gênero	Idade	pH 8,6	pH 6,2	Hb A2	Hb F	HbS	MTHFR	CBS	Medicamentos em uso	Trombose	Última Transf.	Doença	Fumo	Álcool	Pílula	
HEMO 78	Afro	M	12	S A	ASF			Het	Het	Het	Ácido fólico, hydreia	AVC 1x	3/1/2008	AVC 1x	não	não	não	
HEMO 79	Afro	F	28	SF	SF			SS	Normal	Normal	Hydea, ácido fólico, captopril		nunca	não	não	não	sim	
HEMO 80	Afro	F	12	AS	AS			SS	Normal	Het	Ácido fólico, dipriona, AAS		28/1/2008	não	não	não	não	
HEMO 81	Afro	F	1	AS	AS ?	5.0	7.7	SS	Het	Normal	Ácido fólico, benzetacil		26/12/2007	não	não	não	não	
HEMO 82	Afro	F	43	SF	SF			SS	Normal	Normal	Ácido fólico, dipirona, diclofenaco		há 10a	não	não	sim	não	
HEMO 83	Afro	M	35	SC	SC			SC	Normal	Normal	Hydreia, ácido fólico PV oral, ácido fólico, dipirona		26/6/1905	não	não	sim	não	
HEMO 84	Caucasóide	F	4	SF	SF			SS	Normal	Normal			16/2006	pneumonia	não	não	não	
HEMO 85	Afro	M	6	SF	SSF			SS	Het	Normal	Ácido fólico		há 3a	não	não	não	não	
HEMO 86	Afro	F	8	SC	SC ?			SC	Het	Normal	Ácido fólico		nunca	não	não	não	não	
HEMO 87	Afro	F	12	SF	SAF			SS	Normal	Het	Ácido fólico, hydreia		21/1/2008	pneumonia	não	não	não	
HEMO 88	Afro	F	11m	SAF	SAF			Het	Normal	Normal	Ácido fólico, benzetacil		23/dez	não	não	não	não	
HEMO 89	Afro	F	8	SAF	SAF			SS	Normal	Normal	Ácido fólico	AVC 2x	18/1/2008	AVC 2x	não	não	não	
HEMO 90	Afro	F	54	SF	SF			SS	Homo	Normal	Ácido fólico, hydreia		há 6a	não	sim	não	3m	
HEMO 91	Afro	F	14	SC	SC	4.8	1.5	SC	Normal	Normal	Ácido fólico, dipirona, diclofenaco		nunca	não	não	não	não	
HEMO 92	Afro	M	7	SF	SC	7.2	23.1	SS	Normal	Normal	Ácido fólico, hydreia		dez/07	pneumonia	não	não	não	
HEMO 93	Afro	M	7M	SF	SC?	5.9	16.0	Het	Normal	Het	Não		set/07	não	não	não	não	
												trombos na órbita esquerda		hipertensão, fibrose pulmonar, trombos na órbita equerda				
HEMO 94	Afro	M	44	SS	ASF	4.2	7.8	Het	Normal	Normal	Ácido fólico,, potássio, atenolol		há 4 a	não	sim	não	não	
HEMO 95	Afro	M	2	SS	SF			SS	Normal	Homo	Hydreia, ácido fólico, dipirona, diclofenaco		set/07	não	não	não	não	
HEMO 96	Afro	F	40	SF	SF			SS	Het	Normal	Ácido fólico, hydreia, potássio		há 2a	não	não	não	não	

Tabela 24: Resultados gerais encontrados para o grupo avaliado em Rio Preto (n=38).

ID	gênero	Idade	Etnia	Eletroforese ALC.	ÁC.	HPLC Hb A2	Hb F	HbS	BIO. MOL HbS	MTHFR	CBS	Fumo	Álcool	Medicamentos	Vitaminas	Pílula	Doença associada	Trombose
SS 1	M	34	C	SS A dim	SS A dim	6,3	3,1	78,9	HET HbS	Het	HET	Não	Sim	não	ácido fólico	Não	Não	não
SS 2	M	27	Afro	SS F	SS F	2,9	14,6	76,2	HOMO HbS	Het	Normal	Não	Não	hidroxiuréia	ácido fólico	Não	Não	não
SS 3	M	24	Afro	SS F	SS	6,4	3,3	87,3	HET HbS	Het	HET	Não	Não	não	ácido fólico	Não	Não	não
SS 4	F	43	Afro	AS	AS	2,6	2,3	37,1	HET HbS	Normal	Normal	Sim	Não	deferiprona, ciclobenzapina, alendronato de sódio, carbonato de cálcio, cimetidina	não	Sim	chagas e osteoporose	trombose nas pernas da avó
SS 5	F	30	Afro	SS F	SS F	3,2	11,1	82	HOMO HbS	Normal	HET	Não	Sim	não	ácido fólico	parou a 4m	rinite	trombose nas pernas da avó
SS 6	F	47	Afro	SS	SS	4	3,7	89	HOMO HbS	Het	Normal	Não	Não	não	não	Não	pneumonia, sopro	não
SS 7	F	33	Afro	AS		2,8	5,7	47,9	HOMO HbS	Normal	HET	Não	Não	deferiprona	ácido fólico	Sim	sopro	não
SS 9	F	15	Afro	SS F	SS F	6,9	6	83,6	S/CD39	Normal	Homo	Não	Não	hidroxiuréia	ácido fólico	Não	Não	não
SS 10	F	25	Afro	AS F	AS F	2,6	2,3	25,8	HOMO HbS	Normal	HET	Não	Não	desferal, hidroxiuréia	ácido fólico	Sim	Não	não
SS 11	F	24	C	AS F	AS F	2,7	4,8	25,6	HOMO HbS	Normal	HET	Não	Não	não	ácido fólico	Não	Não	não
SS 12	M	29	Afro	S aum A dim	SS	3,3	5,2	51	HOMO HbS	Normal	Normal	Não	Não	não	betamina (polivitamí nico sem minerais)	Não	Não	não
SS 13	F	35	Afro	SS	SS	5,1	4,2	78,9	HET HbS	Normal	Normal	Não	Não	não	ácido fólico	Sim	Não	não
SS 14	M	28	Afro	S aum A dim	ASF	5,3	9,4	53,6	S/CD39	Homo	Normal	Não	Não	quelante de ferro	ácido fólico	Não	Não	não
SS 15	F	20	Afro	SS F	SS F	3,7	7	84,8	HOMO HbS	Normal	HET	Não	Sim	hidroxiuréia	ácido fólico	Sim	Não	não
SS 16	F	27	Afro	SS F	SS F	3,6	7,3	85,2	HET HbS	Normal	Normal	Não	Não	pressão	ácido fólico	Sim	hipertensão	não
SS 17	F	27	Afro	SS	SS	1,5	3,4	92,3	HET HbS	Normal	Normal	Sim	Sim	dipirona	ácido fólico	parou Não a	Não	não
SS 18	M	18	Afro	SS F	SS F	4,5	12,7	78,3	HET HbS	Normal	HET	Não	Não	hidroxiuréia, AAS, desferroxamina, deferiprona	ácido fólico	Não	AVC, pneumonia	trombose na perna da tia materna
SS 19	M	23	C	S aum A dim	S A dim	6,3	2,4	79,7	HET HbS	Het	Normal	Não	Não	isoniazida, rifampicina	ácido fólico	Não	Tuberculose	não
SS 20	M	20	Afro	SF	SF	6,6	8,6	81,4	S/CD39	Het	Normal	Não	Não	hidroxiuréia	ácido fólico	Não	Desgaste do femur, pneumonia	varizes na irmã
SS 21	M	17	Afro	SF	SF	5,7	19,1	71,6	S/CD39	Normal	HET	Não	Não	hidroxiuréia, captopril, fenisteína, ASS	ácido fólico	Não	Sopro, priapismo, pancardique reumatica	não
SS 22	M	27	Afro	SS F A dim	SS F	3	12,8	74,5	HOMO HbS	Normal	Normal	Não	Não	hidroxiuréia	ácido fólico	Não	pneumonia, sopro?	não

Continuação da Tabela 24.

ID	gênero	Idade	Etnia	Eletroforese ALC.	ÁC.	HPLC Hb A2	Hb F	HbS	BIO. MOL HbS	MTHFR	CBS	Fumo	Álcool	Medicamentos	Vitaminas	Pílula	Doença associada	Trombose
SS 23	F	36	Afro	SC	SC	3,2	0,2	48,8	SC	Normal	Normal	Não	Não	não	ácido fólico	parou a 1 1/2	Não	não
SS 24	F	16	C	SS F	SS F	6,2	15,8	74,7	S/CD39	Het	Normal	Não	Não	tilex, dorflex	ácido fólico	Não	retirou o baço aos 7 anos	não
SS 25	F	24	Afro	SC	SC	3,4	0,9	49,7	SC	Normal	HET	Não	Não	marivan	ácido fólico	parou a Sim-3 anos	Não	não
SS 26	F	15	Afro	SS F	SS F	4,1	9,9	82,3	S/CD39	Normal	Normal	Não	Não	não	ácido fólico	Não	desgaste ósseo na perna direita	não
SS 27	M	24	Afro	SS	SS	3,6	1,9	91,1	HOMO HbS	Normal	HET	Não	Não	?	?	Não	sopro hepate C	não
SS 28	M	17	Afro	AS	AS	4	0	40	HET HbS	Het	Normal	Sim	Sim	não	ácido fólico	Não	Não	trombose nas pernas da bisavó materna
SS 29	M	34	Afro	A dim S	AS	4,8	1	83,5	HET HbS	Het	HET	Sim	Não	não	ácido fólico	Não	Não	não
SS 30	F	19	Afro	SS F	SS F	3	10,8	83	HET HbS	Normal	HET	Não	Não	sulfadiazina, cálcio, ursacol (ácido ursodesoxicólico)	ácido fólico, vit B	Não	reticulite problema no fígado	não
SS 31	M	18	Afro	A dim S	A dim S	3,5	1,4	62,6	HOMO HbS	Normal	Normal	Não	Sim	não	ácido fólico	Não	Não	não
SS 32	M	56	Afro	AS	AS	3,4	0	31,4	HOMO HbS	Normal	Homo	Sim	Sim	digoxina, hidrocortisona, enalapril, anticoagulante	ácido fólico	Não	derrame, usa marcapasso, pressao alta	no irmão tormbose
SS 33	F	25	Afro	SF	SF	2,9	13,3	79,5	HOMO HbS	Normal	Normal	Não	Não	não	ácido fólico	Não	Não	não
SS 34	M	16	Afro	SF	SS F	2,5	20	75,3	HET HbS	Het	Normal	parou a Não mês	Não	hidroxiuréia, paracetamol	ácido fólico	Não	pneumonia Sim vezes	não
SS 35	F			SF	SF	6	8,2	83,3	S/CD39	Normal	Normal							
SS 36	F			SS F	SS F	6,8	9,5	82,3	S/CD39	Normal	Het							
SS 37	F			SS F	SS F	5	8,2	89,3	S/CD39	Normal	Normal							
SS 38	M		C	SF	SF	3,5	31,5	39,2	S/CD39	Homo	Normal	Não						

Tabela 25: Resultados clínicos encontrados para o grupo avaliado em Goiânia (n=91).

Anemia			Exames clínicos					Polimorfismos		Hidroxiuréia		Ácido fólico	Eventos clínicos	
ID	Genóti po.	Hb F	RX	Fundoscopia	USG Abdomen	TC	Ecodoppler	MTHFR	CBS	Ano de início	Dosagem	Dosagem	P. tromboembólico	Transfusões
HCGO 001	SS		Artrite e disfunção têmporo-mandibular, crise miofacial aguda	Normal	Colelitíase, corpo lúteo hemorrágico a D, ovário E micropolicístico	achados tomográficos sugestivos de zonas de infarto no hemisfério cerebral E notando-se sinais de perfusão de lerxo		Normal	Het	2007	500 mg	5 mg	úlceras maleolares cicatrizadas, osteomelite, crise algica vaso-oclusiva	1999/ 2005/ 2006 (2u)/ 2008 (4u)
HCGO002	SS	13,3% (depois) 0% (antes)		Normal			Normal	Normal	Het	2006	500 mg	5 mg	AVCi	1999/ 2000/ 2003 (3u)/ 2006 (14u)/ 2008 (7u)
HCGO003	SS	18,8% (depois)		Normal	esplenectomia		normal	Het	Het	2002	500 mg	5 mg	Dactilite falciforme, Sequestro esplênico	1999/ 2004
HCGO004	SC							Het	Normal			5 mg		nunca
HCGO005	SS			normal	Colecistopatia crônica calculosa		normal	Normal	Normal	2007	500 mg	5 mg		2005
HCGO006	SS	13,9% (depois)	normal	normal	Esplenectomia	normal (sinusopatia esfeno-etmoidal)	Sobrecarga de VE, miocardiopatia isquêmica secundária a anemia	Normal	Het	2006	500 mg	5 mg	Osteomielite 3 vezes nos braços pé e cotovelo	2006 (2u)
HCGO007	SS		Toráx com aumento da silhueta cardíaca					Normal	Normal	2007	500 mg	5 mg		2007 (7u)/ 2008 (4u)
HCGO008	SS	1% (antes) 24,8% (depois)			Crise de sequestro esplênico		normal	Het	Normal	2007	500 mg	5 mg		4 episódios antes de 2006/ 2007 (2u)
HCGO009	SS	0% (antes) 21% (depois)			Hepatomegalia		Regurgitação mitral severa, insuficiencia mitral grave Prolapso mitral com regurgitação mitral moderada, disfunção diastólica VE, insuficiência mitral de gau discreto	Het	Normal	2006	500 mg	5 mg		2006/ 2007 (2u)
HCGO010	SS	8,6% (antes) 18% (depois)	bacia: necrose asséptica da cabeça do fêmur. Tórax: cardiomegalia, sugestivo de ICC	Normal	Hepatopatia, colelitíase			Het	Normal	2007	500 mg	5 mg		2003 (6u)

Anemia		Exames clínicos						Polimorfismos		Hidroxiuréia		Ácido fólico	Eventos clínicos	
ID	Genóti po.	Hb F	RX	Fundoscopia	USG Abdomen	TC	Ecodoppler	MTHFR	CBS	Ano de início	Dosagem	Dosagem	P. tromboembólico	Transfusões
HCGO011	SC		Crânio: extensas áreas de alteração de sinal de comprometimento do córtex e a substância subcortical fronto-temporais E, a coroa radiada D e a região capsulo nuclear E. O aspecto destas lesões é compatível com gliose, provavelmente secundária a lesão isquêmica aguda.					Normal	Normal	2007	500 mg	5 mg		2006
HCGO012	SS	8% (2005)			normal	área isquêmica em região frontal E em topografia de artéria cerebral anterior	normal	Normal	Normal	2005	500 mg	5 mg	AVCi (4x), osteomelite em fêmur D distal, paralisia facial periférica, hemiparesia a D, síndrome coréica (atrofia cortical difusa principalmente a E)	2004 (2u)/ 2005 (4u)/ 2006 (9u)/ 2007 (13u)/ 2008 (8u)
HCGO013	SC	0% (antes) 12,3% (depois)		Lesão "Black sunburst" em periferia da retina temporal superior do OD sem necessário tratamento	Normal		Normal	Normal	Het	2006	500 mg	5 mg		2004
HCGO014	Het	17,8% (depois)				Crise vaso oclusiva grave com isquemia vaso cerebral grave		Het	Normal	2007	500 mg	5 mg	AVCi sequela occipito parietal E	2007 (4u)/ 2008 (2u)
HCGO015	SS	24%	Tórax: Aumento de índice cardio torácico		Normal			Normal	normal	não		5 mg		
HCGO016	SS	2% (antes) 23% (depois)		Aumento de tortuosidade vascular retiniana (sinal precoce de retinopatia falciforme, sem risco no momento)				Normal	Het	2007	500mg	5 mg		5 episódios, último em 2007
HCGO017	SS	1,2% (antes)	Torax com aumento do calibre dos vasos, opacidade heterogênia do pulmão D (LSD?)	Engurgitamento rede venosa retiniana discreta e atenuação vascular periférica	Hepatomegalia e ecogenicidade renal aumentada		Regurgitação leve da válvula mitral e AO	Het	Normal	2007	500 mg	5 mg		2006 (4u)/ 2007/ 2008
HCGO018	SC	0% (antes) 3,9% (depois)	Osteoartrose coxo-femoral bilateral avançada	Retinopatia falciforme com lesões retinianas OD com "Black sunburst" shunts AV na periferia e OE, Back Sunburst e SEA-FAUS	Esplenomegalia		normal	Het	Normal	2005	500 mg	5 mg	Osteomielite em tíbia direita, artroplastia total de quadril	2005/ 2006 (7u)/ 2008 (3u)

Anemia				Exames clínicos				Polimorfismos		Hidroxiuréia		Ácido fólico	Eventos clínicos	
ID	Genóti po.	Hb F	RX	Fundoscopia	USG Abdomen	TC	Ecodoppler	MTHFR	CBS	Ano de início	Dosagem	Dosagem	P. tromboembólico	Transfusões
HCGO019	Het							Normal	Normal	não		não		nunca
HCGO020	SS							Het	Normal	não		não		nunca
				OD com deslocamento de retina temporal superior/ hemorragia vítreo interior, OE hemorragia pré-retiniana temporal superior (Retinopatia falciforme posterior)	Baço com parênquima heterogêneo com redução de volume		normal	Normal	het	2007	500 mg	5 mg	retinopatia, Sofrimento fetal crônico DHEG + SFA	1998
HCGO021	SC	2%(antes) 2%(depois)	normal					Normal	Normal	não		5 mg		nunca
HCGO022	SC													
		2,5% (antes) 30%(depois)	Cardiomegalia				normal	Normal	Normal	dez/06	500 mg	5 mg	Priaprismo	2007(2u) 2008(1u)
HCGO023	SS				normal			Normal	Normal	não		não		nunca
HCGO024	SS							Normal	Normal	não		5 mg		nunca
HCGO025	Het							Het	Normal	não		5 mg		nunca
HCGO026	SC		Normal Tórax: Presença de infiltrado em borda cardíaca D em base		esplenomegalia			Normal	Het	não		5 mg		nunca
HCGO027	Het	18%						Normal	Normal	não		5 mg		2005
				"Black sunburst" sem necessidade de tratamento			Sopro no coração, pancárdiaco							
HCGO028	SS		Cardiomegalia		normal			Normal	Normal	não		5 mg		2002
					Esplenomegalia homogênia inespecífica	AVCi no lobo frontal							AVC Crise convulsivas focais, parestesia em membro MSE eD	2007 (30u)/ 2008 (16u)
HCGO029	SS	10% (depois)		normal			normal	Homo	Het	2007	500 mg	5 mg	Aborto (Expulsão de feto morto com bolsa íntegra aos 6 meses)	
HCGO030	SS				Colelitíase			Normal	Normal	não		5 mg		2004
HCGO031	Het	1%						Normal	Normal	não		5 mg		20/1/2008
							Sugestivo de SVE, miocardiopatia dilatada isquêmica							
HCGO032	SS	17,4% (antes) 27,6% (depois)		normal OD normal e OE com cicatriz isquêmica periférica	Hepatoespleno leve			Normal	Het	2007	500 mg	5 mg		2007 (5u)
HCGO033	SS	5,8% (antes)	Torax: aumento da trama vascular mais sinais de sobrecarga de VD					Het	Het	2008	500 mg	5 mg	Úlcera crônica em perna E	10 episódios antes de 2007/ 2007 (2u)

Anemia				Exames clínicos				Polimorfismos		Hidroxiuréia		Ácido fólico	Eventos clínicos	
ID	Genóti po.	Hb F	RX	Fundoscopia	USG Abdomen	TC	Ecodoppler	MTHFR	CBS	Ano de início	Dosagem	Dosagem	P. tromboembólico	Transfusões
HCGO034	SS			normal	normal			Normal	Normal	não		5 mg		nunca
			Bacia com flebolitos e escavação pelvicas, imagens calcificadas projetadas na região púbica esquerda	OD com alterações pigmentares e OE com áreas isquemicas	Rim direta discretamente reduzido de volume (Hipoplasia congênita?)									
HCGO035	SC							Normal	Normal	não		5 mg		nunca
HCGO036	SS	20%	normal		normal			Normal	Normal	não		5 mg		nunca
HCGO038	Het							Normal	Normal	não				nunca
HCGO039	Het	22,50% 0% (antes) 7% (depois)						Normal	Het	não		5 mg		nunca
HCGO040	SC		normal	normal	Esplenomegalia acentuada			Het	Normal	2007	500 mg	5 mg		nunca
HCGO041	Het	4% (antes) 2,0% (antes) 13,1% (depois)	Bacia: Defeito de fusão dos elementos posteriores sacrais inferiores e coccigeos		Hepatomegalia e colelitíase		ICC (Sopro sistólico)	Normal	Normal	2008	500 mg	5 mg		2002/ 2007 (4u)
HCGO042	Het			Normal	Hipoesplenia, pequeno derrame pericardio em parede posterior de VE		Normal	Normal	Normal	2007	500 mg	5 mg		2006/ 2007 2001/ 2003 (2u)/ 2004 (2u)/ 2005/ 2006/ 2007
HCGO043	SS		Cardiomegalia, derrame pleural		coletíase		Normal	Normal	Het	fev/08	500 mg	5 mg	(Priaprismo?)	
HCGO044	SC			Normal	normal			Het	Het	não		5 mg	Sepse (hemorragia alveolar-IR grave)	jun/07
		10,9% (antes) 30% (depois)												
HCGO045	SS		Osteonecrose de ulmero proximal esquerdo	Normal	Colecistectomia		Pequeno derrame do pericardio	Normal	Het	2008	500 mg	5 mg	Sepse grave com IRA	2007 (7u)/ 2008 (2u)
HCGO046	SS	28,9% (depois) 0% (antes) 13,9% (depois)	Cardiomegalia	Normal			Normal	Normal	Homo	2007	500 mg	5 mg	Sequela de infarto esplênico, crises algicas vaso-oclusivas	1999/ 2001/ 2002/ 2003
HCGO047	SS		normal	normal			Normal miocardiopatia dilatada grau moderado com disfunção sistólica global de grau moderado	Normal	Het	2006	500 mg	5 mg		4 episódios, último 2006
					hepatomegalia homogênea, Colelitíase									
HCGO048	Het	0% (antes)						Normal	Normal	2008	500 mg	5 mg		2007/ 2008 (3u)
HCGO049	Het							Normal	Normal	não		5 mg		2008(2u)
		16,1% (antes) 21,9% (depois)												
HCGO050	Het							Normal	Normal	jul/07	500 mg	5 mg	Priapismo frequente, Dactilite síndrome mão pé	8/2/2008

Continuação Tabela 25.

Anemia			Exames clínicos					Polimorfismos		Hidroxiuréia		Ácido fólico	Eventos clínicos	
ID	Genóti po.	Hb F	RX	Fundoscopia	USG Abdomen	TC	Ecodoppler	MTHFR	CBS	Ano de início	Dosagem	Dosagem	P. tromboembólico	Transfusões
HCGO051	Het		quadril: área de necrose e de irregularidade na cabeça femoral					Normal	Normal	não		5 mg		2007
HCGO052	SC	0%		Hemorragia retiniana com deslocamento de retina	Calcificação maciça do baço com redução de volume consequente a infartos isquêmicos		Hipertrofia disfuncional do VE , leve dilatação do AE	Het	Normal	jul/07	500 mg	5 mg		dois episódios na infância
HCGO053														
ÓBITO (S. Torácica aguda)	SC		Esplenectomia	Retinopatia OE	Hepatomegalia homogênia acentuada		Normal	Normal	Het	2004	500 mg	5 mg	ICC, AVCi (há 10 anos), hipertensão pulmonar	1996 (3u)/ 1997 (5u)/ 1998/ 1999 (2u) 2006-2006 (60u)
HCGO055	Het	40% (antes)			Esplenomegalia		normal	Het	Normal	jan/08	500 mg	5 mg		2007/ 2008
HCGO056	SS				Hepatomegalia discreta e atrofia esplenica		Normal	Normal	Normal	não		5 mg	Crise álgica vaso oclusiva	há um ano
HCGO057	SS		Sopro sistolico pancardiaco, hipertrofia do baço, litíase biliar e adeno amigdalectomia	Normal				Normal	Normal	não		5 mg		há três anos
HCGO058	SS				Normal			Normal	Normal	dez/06	500 mg	5 mg	Derrame articular e crise álgica vaso oclusiva; Insuficiência renal aguda	2004 (5u)/ 2005/ 2006
HCGO059	SS	16% (depois)	Aumento de fuso de densidade óssea do quadril. Perda de esferecidade com lesões líticas e aparente com desabamento condrial da cabeça do femur bilateral (necrose avascular - grau 4 de Ficat)	normal	Normal			Het	Het	2007	500 mg	5 mg		2008
HCGO060	SS				Hepatomegalia de grau leve, gastrite endoscópica moderada de corpo e antro associada a refluxo biliar, duodeno gástrico		Insuficiencia tricúspede sem repercursão hemodinâmica	Normal	Normal	não		5 mg	Osteossarcoma femoral, endoprótese femural distal D	há quatro anos
HCGO061	SC	0% (antes) 12% (depois)	Sacro ilite bilateral, borramento com perda de fise da cabeça femural direita, esclerose do tipo acetabular bilateral	normal	Hepatoesplenomegalia, colelitíase, gastrite antral erosiva moderada, nodularidade antral (H. pilory) duodenite	Calcificação em núcleo da base a direita, corresponde a forma inativa de neurocisticercose	normal	Normal	Normal	2006	500 mg	5 mg		7 episódios antes de 2008

Anemia				Exames clínicos				Polimorfismos		Hidroxiuréia		Ácido fólico	Eventos clínicos	
ID	Genóti po.	Hb F	RX	Fundoscopia	USG Abdomen	TC	Ecodoppler	MTHFR	CBS	Ano de início	Dosagem	Dosagem	P. tromboembólico	Transfusões
HCGO063	SS	34,50%			Cisto ovariano simples à direita			Normal	Het	não		5 mg		nunca
HCGO064	SS			normal	Hepatomegalia homogênia, Colicistectomia, aumento do lobo esquerdo do fígado		normal	Normal	Het	não		5 mg	Aborto espontâneo, ferimento maleolo lateral esquerdo pós-trauma formando lesão ulcerada de difícil cicatrização	nunca
HCGO065	SS		normal	normal			normal	Het	Normal	2007	500 mg	5 mg		2003
HCGO066	SC		normal		Fígado de textura grosseira		Nomal	Het	Normal	não		5 mg	Queixa de diminuição de acuidade visual (Não realizou fundoscopia)	nunca
HCGO067	SS	12,9% (depois)	normal	normal	Colelitíase		Prolapso mitral com regurgitação mitral leve	Normal	Het	2008	500 mg	5 mg		30 episódios/ 2008
HCGO068	SS		normal	Normal			sinais incipientes de miocardiopatia isquêmica secundária à anemia, dilatação de AE e VE com insuficiência mitral leve, sem disfunção ventricular	Normal	Normal	não		5 mg	Priapismo	nunca
HCGO069	SS	9,8% (antes)	Quadril D com presença de área necrosada da cabeça do fêmur (FICAT II) com esclerose subcondrial, alterações da densidade da forma de todas as vertebrae consequente da anemia	Normal	Colelitíase, hepatomegalia de etiologia a esclarecer			Homo	Het	2007	500 mg	5 mg		1995 (3u)/ 19996 (4u)/ 1998/ 2001 (2u)/ 2008 (2u)
HCGO070	SS	30%		Tortuosidade vascular nos dois olhos secundária a anemia falciforme OD: estreitamento arteriolar, cruzamento arterio-venoso patológico, OE: atrofia importante do N. óptico E, maculopatia cruzamento arterio-venoso, edema periorbitário congestivo	Vesícula escleroatrófica com múltiplos cálculos		normal	Het	Normal	não		5 mg		há dois meses
HCGO071	SS		deformidades ósseas em pé E e quadril E		hepatomegalia, atrofia esplênica, Colelitíase	Quadril: alterações difusa do sinal da medulla óssea da diáfise femoral bilateralmente, compatível com infartos ósseos, derrame articular coxo-femoral bilateral	regurgitação mitral moderada, espessamento valvular aórtico discreto sem repercussão hemodinâmica	Het	Normal	2005	500 mg	5 mg	Necrose asséptica do fêmur E, retinopatia OE,	2004 (2u)/ 2005 (3u)/ 2006 (14u)/ 2007 (23u)/ 2008 (12u)

Anemia				Exames clínicos				Polimorfismos		Hidroxiuréia		Ácido fólico	Eventos clínicos	
ID	Genóti po.	Hb F	RX	Fundoscopia	USG Abdomen	TC	Ecodoppler	MTHFR	CBS	Ano de início	Dosagem	Dosagem	P. tromboembólico	Transfusões
HCGO072	SS	2% antes		Retina com palidez discreta	hepatomegalia inespecífica			Het	Normal	2004	500mg	5mg	Priapismo 2 x	nunca
HCGO073	Het				Condensação em lobo médio D do fígado (Hepatomegalia), Colelitíase		ICC	Het	Normal	não		5 mg	Risco de tromboembolismo aumentado devido a anemia falciforme associada a quadro infeccioso grave (Sepse), crise convulsiva	nunca
HCGO074	SS	17,5% (depois)	Normal	normal	Hepatoesplenomeglia			Normal	Normal	2007	500 mg	5 mg	Úlcera maleolo lateral do tornozelo esquerdo sem necrose com presença de granulações, osteomieleite na região sacro-iliaca	2003 (2u)/ 2005
HCGO075	SC		Bacia: Prótese em fêmur E, Lesão em face lateral da perna esquerda cicatrizada porém pruriginosa	normal	atrofica severa do baço decorrente da anemia hemolítica		normal	Normal	Normal	não		5 mg		há doze anos
HCGO076	SC	0,60%	Quadril: Perda de esferecidade da cabeça femual D, associada a redução da fenda articular ipsilateral, anquilose da articulação sacro-iliaca D		Dreno intracavitário dilação das vias biliares			Normal	Normal	não		5 mg		
HCGO077	Het	0%						Normal	Normal	não		não	Osteomielite em fêmur D	
HCGO078	SS												Gravidez com retenção placentária com curetagem	
HCGO079	SC			normal	normal		normal	Het	Het	não		5 mg	Gravidez interrompida por oligoamnio severa, imaturidade fetal, DHEG leve (cesária por SFC)	
							miocardiopatia isquêmica secundária a anemia, dilatação moderada do AE e VE sem disfunção sistólica	Normal	Het	não		5 mg		
HCGO080	Het	0% (depois)	tórax: cardiomegalia/ bacia: normal	normal	normal	tórax: cardiomegalia e pletora vascular pulmonar		Normal	Normal	2008	500 mg	5 mg		2007 (14u)/ 2008 (4u)
HCGO081	Het		Normal	Normal	Esplenomegalia		Normal	Het	Normal	não		5 mg		
HCGO082	SS	7% (antes)			Esplenomegalia heterogenea secundaria a processos esquemicos anteriores, Colelitíase		Miocardiopatia secundaria (dilatação do VE) função reservada	Het	Het	2007	500 mg	5 mg		1998 (2u)/ 2004/ 2007 (2u)
HCGO083	Het	24% (depois)	Normal	Normal	Hepatite crônica, microesplenía, rim E ectópico		Normal	Normal	Normal	2007	500 mg	5 mg		2005/ 2007

ID	Anemia			Exames clínicos				Polimorfismos		Hidroxiuréia		Ácido fólico	Eventos clínicos	
	Genóti po.	Hb F	RX	Fundoscopia	USG Abdomen	TC	Ecodoppler	MTHFR	CBS	Ano de início	Dosagem	Dosagem	P. tromboembólico	Transfusões
HCGO084	SS	8% antes		Normal	Colilitiase	Abdomen: hepatoesplenomegalia com algumas adenomegalias peri-aorticas. Tórax: cardiomegali amoderada	Normal	Normal	Normal	2008	500 mg	5 mg		2008 (6 u)
HCGO085		12% (depois)		Normal	Hepatomegalia moderada		Sopro funcional secundário a anemia	Normal	Het	2007	500 mg	5 mg		2005 (2u)
HCGO086								Normal	Het	não		5 mg		há um ano
HCGO087			Normal	Normal			Normal	Het	Het	não		5 mg		
HCGO088	SS		Necrose da cabeça do femur E (queda de cavalo com trauma de quadril E - Artrose do quadril E)					Normal	Normal	não		5 mg		
				Alterações fundoscópicas bilateral de nominadas estrias angiíoides, tortuosidade vascular característica da anemia	Infartos focais ou focos de degenerações císticas no baço. Histo arquitetura parcialmente alterada no fígado, alargamento fibroso portal e espaço porta com infiltrado inflamatório linfocítico, edema fibrose		normal	Het	Het	não		5 mg		
HCGO089	Het	12,50%												
HCGO090	SS	36,51% (antes)			Valvulopatia mitral (sopro)			Het	Normal	2008	500 mg	5 mg		2008 (2u)
HCGO091	SC		normal					Het	Normal	não		5 mg	Terceira gestação com deslocamento reto placentário	
				alterações na periferia de AO estando mais avançados em OD e proliferação vitreoretiniana (retinopatia)										
HCGO092	SC	1,3% (antes)	normal				Normal	Het	Het	2006	500 mg	5 mg		
HCGO093	Het							Normal	Normal	não		não		

Resumo

A Doença Falciforme é uma condição inflamatória com fisiopatologia dependente de episódios vaso-oclusivos. Mutações nos genes *metilenotetrahidrofolato redutase* (*MTHFR*) e *cistationina-beta-sintase* (*CBS*), constituem fatores de risco para doenças vasculares. Diante da importância em se identificar fatores de risco para eventos vaso-oclusivos em Doentes Falciformes (DF), objetivamos avaliar a frequência das mutações C677T no gene *MTHFR* e 844ins68 no gene *CBS* nesses pacientes. Foram avaliados 300 DF, HbSS, HbSC, HbS/Beta talassemia, provenientes de Brasília, Goiânia, Rio de Janeiro, São José do Rio Preto e São Paulo. Foram coletados 5mL de sangue venoso em EDTA, após consentimento informado. As metodologias clássicas foram realizadas para a confirmação do fenótipo de hemoglobina. As mutações para os genótipos de Hemoglobina e polimorfismos pesquisados foram avaliadas por Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição e Alelo Específico. Os resultados mostraram que 93 pacientes (31,00%) foram heterozigotos e 13 (4,33%) homozigotos para a mutação C677T e 90 heterozigotos (30,00%) e 8 homozigotos (2,66%) para a mutação 844ins68, ambas com diferença significativa para as frequências genotípicas entre para as localidades. As frequências alélicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg para as duas mutações. Analisando pontualmente os pacientes da localidade de Goiânia observamos que a frequência das mutações foi significativa e a presença de eventos vaso-oclusivos foi mais incidente nos pacientes com HbSS ($p=0,007$). A mutação 844ins68 foi aproximadamente três vezes maior nos pacientes com presença de complicações vaso-oclusivas ($p=0,011$). A mutação C677T não mostrou associação com o risco para manifestações vaso-oclusivas ($p=0,193$) nos pacientes. A interação C677T/844ins68 ocorreu em 12,08% dos DF e mostrou aumento de duas vezes no risco para manifestação vaso-oclusiva (RR:2,16). As frequências das mutações estão de acordo com o esperado para a população brasileira e a presença da mutação 844ins68 no gene da *CBS* mostrou ser um potencial fator de risco para evento vaso-oclusivo nos Doentes Falciformes analisados na Região Centro-Oeste do País..

Palavras-chave: Doença Falciforme, Vaso-oclusão, Polimorfismos, *MTHFR*,

Abstract

Sickle Cell Disease is an inflammatory condition with dependent pathophysiology of vaso-occlusive episodes. Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) and cystathionine beta-synthase (CBS) gene are risk factors for vascular disease. Given the importance of identifying risk factors for vaso-occlusive events in sickle cell patients, aimed to evaluate the frequency of mutations C677T in the MTHFR gene and 844ins68 in the CBS gene in these patients. We evaluated 300 sickle cell patients, HbSS, HBSC, HbS/Beta thalassemia, from Brasília, Goiânia, Rio de Janeiro, São Jose do Rio Preto and São Paulo. Were collected 5mL of venous blood in EDTA after informed consent. The classical methods were performed to confirm the phenotype of hemoglobin. The mutations to the genotypes of hemoglobin and polymorphisms studied were evaluated by Restriction Fragment Length Polymorphism and Allele Specific. The results showed that 93 patients (31.00%) were heterozygous and 13 (4.33%) homozygous for the C677T mutation and 90 were heterozygotes (30.00%) and 8 homozygous (2.66%) for the 844ins68 mutation, both with significant difference for genotypic frequency between the localities. The allelic frequencies are in Hardy-Weinberg equilibrium for both mutations. Analyzing punctually the patients of the city of Goiania The frequency of mutations were significant and the presence of related vaso-occlusive events was more incident in patients with HbSS ($p=0.007$). The 844ins68 mutation was approximately three times higher in patients with the presence of vaso-occlusive complications ($p=0.011$). The C677T mutation didn't show association with the risk for vaso-occlusive manifestations ($p=0.193$) in patients. The C677T/844ins68 interaction occurred in 12.08% of patients and showed an increase of twice the risk of vaso-occlusive manifestations (RR:2.16). The frequencies of mutations are consistent with the expected for the Brazilian population and the presence of 844ins68 mutation in the CBS gene shown to be a potential risk factor for vaso-occlusive event in Sickle Cell patients analyzed in the Midwest region of the country.

Key-words: Sickle Cell Disease, Vaso-occlusion, Polymorphisms, *MTHFR*, *CBS*.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 26/02/2009

Assinatura