



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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

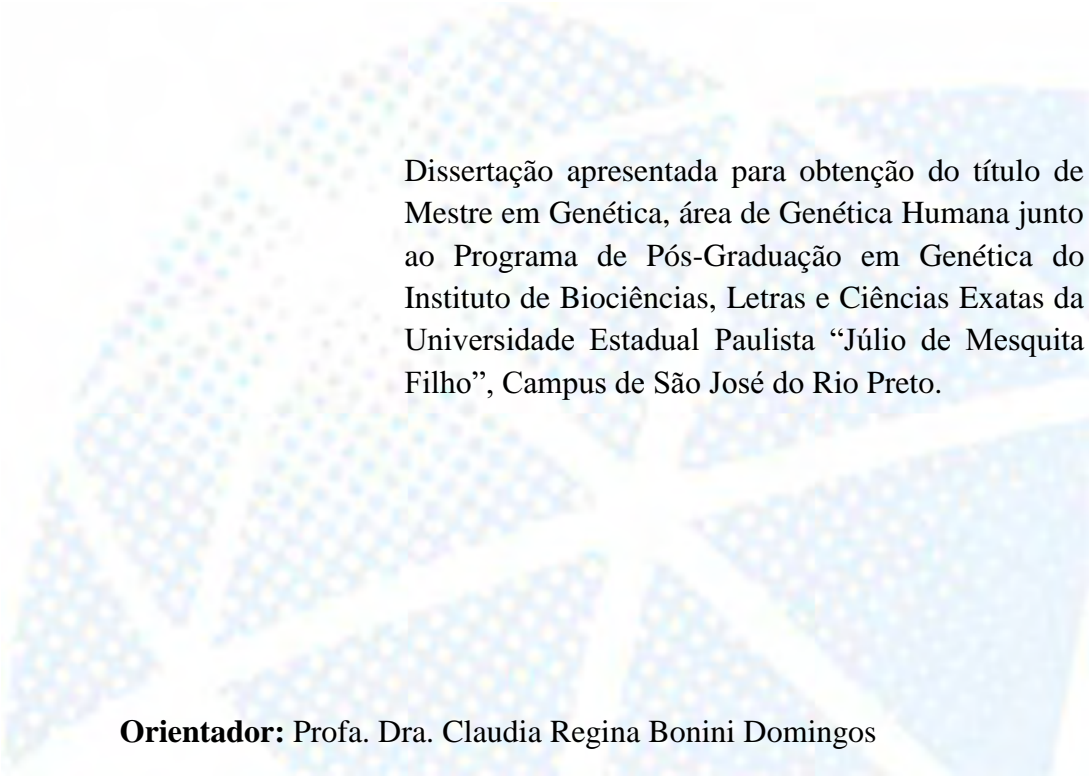
Jéssika Viviani Okumura

**Modulação pelo haplótipo Bantu da resposta ao uso de Hidroxiureia em Anemia
Falciforme**

São José Do Rio Preto - SP
2013

Jéssika Viviani Okumura

Modulação pelo haplótipo Bantu da resposta ao uso de Hidroxiureia em Anemia 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.

Orientador: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto - SP
2013

Okumura, Jéssika Viviani.

Modulação pelo haplótipo Bantu da resposta ao uso de hidroxiureia em anemia falciforme /Jéssika Viviani Okumuta - São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.
100 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1.Hemoglobinopatias. 2. Hemoglobina S – Fenótipo. 3. Haplótipo beta-S.
4. Hidroxiureia. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616.155.194

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Jéssika Viviani Okumura

Modulação pelo haplótipo Bantu da resposta ao uso de Hidroxiureia em Anemia 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

Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos
Professora Assistente do Departamento de Biologia
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-IBILCE

Profa. Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto
Doutora Pesquisadora do Centro de hematologia e Hemoterapia
Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo
Professora Assistente do Departamento de Oncologia Clínica e Experimental
Universidade Federal de São Paulo - EPM

São José do Rio Preto, 28 de fevereiro de 2013

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 (IBILCE/UNESP) de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro do Ministério da Saúde, HEMORIO, MS, CAPES e FAPESP.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ailton e Jovilhana, por terem me apoiado em todas as decisões me orientando à escolha do melhor caminho. Ao meu namorado Matheus, pela parceria, companheirismo e por fazer dos nossos momentos uma grande alegria. À minha irmã Gisella, por sempre me dar forças nos momentos mais difíceis, e à minha irmãzinha Karina, por ser simplesmente especial.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado meus passos durante minha caminhada e por ter possibilitado encontrar pessoas maravilhosas.

*Aos meus avós maternos, **João e Aparecida Galbeiro** e aos meus avós paternos, **Yukio e Mioko Okumura**, pelo imenso carinho que tem por mim, o qual retribuo com muita admiração.*

*A todos da família **Okamoto**, que me receberam de braços abertos e sempre dispostos a me ajudarem, principalmente minha tia avó, **Mitiko**, que me acolheu como uma filha. A minha bisavó, **Aiko**, que aos 93 anos me ensina que ser feliz não importa a idade. Sempre serei grata.*

*A família que construí em Três Lagoas-MS, **Regiane, Bianca e Andréia**, pelo companheirismo, alegria, parceria, respeito, lealdade, amizade, pelos quatro anos de pura experiência, que jamais serão esquecidos.*

*A Turma **Alelos Múltiplos**, principalmente ao **Guilherme, Glaucia, Maíra, Isabela** pela grande amizade, aventuras, risos, grupos de estudos e muita conversa.*

*Aos professores da UFMS de Três Lagoas pelo aprendizado e incentivo, principalmente a professora **Glória Maria Gelle de Oliveira**, por ter me orientado mesmo em momentos difíceis.*

*Aos amigos do LHGDH pelo aprendizado, trabalho em equipe, descontração, principalmente ao **Danilo (meu coorientador de coração)** e ao **Belini** que me ajudam desde a graduação e me deram incentivo para adentrar na pós-graduação. Aos amigos do CEQ, que mesmo não trabalhando na mesma área, sempre estavam dispostos a ajudar.*

*Agradeço a Deus todos os dias por ter me dado o privilégio de conhecer pessoas maravilhosas, inteligentes, amigáveis, dedicadas e companheiras: **Larissa, Belini, Danilo, Gisele, Tiago, Bel, Lidiane, Isabela, Willian, Renan, Nathalia, Tayrone, Jéssica, Vinicius, Barbara, Vanessa Urbis, Vanessa Leiko, Marina, Giovana, Mariana e Paula.***

*A **Gabriela (Gabi)** que disponibilizou tempo para me ensinar **ELISA** e sua orientadora **Profa. Dra. Débora Ap. Pires de Campos Zuccari** que cedeu o laboratório para a realização do teste bioquímico.*

*A minha orientadora, **Claudia Regina Bonini Domingos** pelos maravilhosos ensinamentos, apoio, dedicação, confiança. Sempre serei grata.*

*A **FAPESP** pelo auxílio financeiro.*

*“Nunca tenha certeza de nada, porque a sabedoria começa com a
dúvida”*

Sigmund Freud

RESUMO

A anemia falciforme (AF) apresenta processos fisiopatológicos complexos que dificultam o tratamento e culminam no desenvolvimento de manifestações clínicas diversificadas, as quais são moduladas por marcadores genéticos, como os haplótipos da globina beta S (β^S), e bioquímicos como glicoproteínas plasmáticas detoxificadoras: haptoglobina (Hp) e a hemopexina (Hpx) que formam complexos com a Hb e grupo heme livres, respectivamente, garantindo efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, e a eritropoetina (Epo) que repõe os eritrócitos em resposta à hemólise, por exemplo. Desta forma, o objetivo do trabalho foi verificar, em portadores da AF, a influência do haplótipo Bantu sobre o tratamento com hidroxiuréia (HU) por meio da análise de marcadores de estresse oxidativo e eritrogênico, correlacionando-os com parâmetros hematimétricos e níveis de hemoglobina fetal (Hb F). Para isso, o grupo amostral (67 portadores da AF), foi dividido em três subgrupos: 25 (37,3%) homocigotos para o haplótipo Bantu (Bantu/Bantu), 26 (38,8%) heterocigotos para o haplótipo Bantu (Bantu/_) e 16 (23,0%) sem o haplótipo Bantu (_/_). Todos sob uso de HU há pelo menos 300 dias, sem transfusão sanguínea há 120 dias e adultos independentes do gênero. A confirmação da homocigose para Hb S e dos haplótipos β^S , foi realizada por PCR-RFLP; os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) foram avaliados por método espectrofotométrico e as glicoproteínas plasmáticas (Epo, Hp e Hpx) por ensaio imunoenzimático. Os parâmetros hematológicos foram fornecidos pelo HEMORIO. A média de Hb F no grupo amostral foi de 12,1% e não diferiu entre os subgrupos ($p=0,55$), porém o Bantu/_ apresentou acréscimo na média sendo o Benin o segundo haplótipo mais frequente. Os valores médios de Epo, Hp e Hpx não diferiram entre os subgrupos, indicando que os haplótipos não exercem influência nos níveis dos mesmos ($p>0,05$). Em relação aos valores de referência, quase todos os parâmetros hematológicos apresentaram-se alterados, exceto VCM, HCM e CHCM, certamente devido ao uso de HU. No subgrupo Bantu/_ , houve correlação negativa de 43% entre Hpx e reticulócitos absoluto ($p=0,02$). No subgrupo _/_ houve correlação negativa de 63% entre Epo e GV ($p=0,01$). Quanto a peroxidação lipídica, o grupo amostral apresentou níveis elevados de TBARS (2449,01 ng/mL) em relação aos valores de referência. A comparação entre os subgrupos amostrais não diferiu significativamente ($p=0,09$), porém o subgrupo Bantu/Bantu apresentou diminuição nos níveis deste marcador em relação aos outros subgrupos. Com os resultados obtidos sugerimos que o haplótipo Bantu em homocigose parece influenciar a diminuição da hemólise e peroxidação lipídica em pacientes com AF na resposta à terapia com HU sob as condições utilizadas.

Palavras-chave: Hemoglobina S, haplótipo β^S , estresse oxidativo, hidroxiureia

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) presents complex pathophysiological processes that complicate the treatment and culminate in development of diverse clinical manifestations, which are modulated by genetic markers, such as beta-S globin haplotype (β^S), and biochemical, such as plasmatic glycoproteins with action to detoxify: haptoglobin (Hp) and hemopexin (Hpx), which form complexes with free Hb and heme, respectively, providing antioxidant and anti-inflammatory effects, and erythropoietin (Epo), that restores the erythrocytes in response to hemolysis, for example. Thus, the aim of this study was to determine, in patients with SCA, the influence of Bantu haplotype in treatment with hydroxyurea (HU), by analysis of oxidative stress and erythrogenic markers, correlating them with hematological parameters and levels of fetal hemoglobin (Hb F). For this, the sample group (67 SCA patients), was divided into three subgroups: 25 (37.3%) were homozygous for the Bantu haplotypes (Bantu/Bantu), 26 (38.8%) heterozygous for the Bantu haplotype (Bantu/_) and 16 (23.0%) without the Bantu haplotype (_/_). The sample group was under use of HU for at least 300 days, without blood transfusion for 120 days and were all adults independent of the genus. The confirmation of homozygous Hb S and β^S haplotypes was performed by PCR-RFLP; levels of lipid peroxidation (TBARS) were measured by the spectrophotometric method and plasmatic glycoproteins (Epo, Hp and Hpx) by enzyme immunoassay. Hematological parameters were provided by HEMORIO. The average of Hb F in the sample group was 12.1% and did not differ between the groups ($p = 0.55$), but the Bantu/_ showed an increase in the average, being Benin the second most frequent haplotype. The average values of Epo, Hp and Hpx did not differ between the subgroups, indicating that the haplotypes did not influence the levels of the same ($p > 0.05$). Regarding to reference values, most hematological parameters showed up have changed except MCV, MCH and MCHC, certainly due to the use of HU. In the subgroup Bantu /_ , there was a negative correlation of 43% between Hpx and absolute reticulocyte ($p = 0.02$). In the subgroup _/_ , there was a negative correlation of 63% between Epo and red blood cells (RBC) ($p=0,01$). As lipid peroxidation, the sample group showed high levels of TBARS (2449.01 ng/mL) compared to reference values. The comparison between subgroups sample did not differ significantly ($p = 0.09$), but the subgroup Bantu/Bantu showed decreased levels of this marker in relation to other subgroups. To the results obtained, we suggest that the Bantu haplotype homozygosity seems to influence the reduction of hemolysis and lipid peroxidation in patients with AF in response to HU therapy under the conditions used.

Key-words: Hemoglobin S, β^S haplotypes, oxidative stress, hydroxyurea

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da hematopoese humana	21
Figura 2. Família dos genes alfa e beta-globina e ontogenia das cadeias globínicas	24
Figura 3. Alteração na membrana do eritrócito por polímeros de Hb S	26
Figura 4. Representação esquemática dos processos fisiopatológicos na anemia falciforme	28
Figura 5. Reações de Fenton e Haber-Weiss	29
Figura 6. Representação dos principais eventos decorrentes da fisiologia na AF	30
Figura 7. Via da resposta adaptativa e patológica da hemólise intravascular	32
Figura 8. Caracterização dos alelos atípicos dos haplótipos β^S	39
Figura 9. Ilustração dos possíveis resultados para a resistência globular osmótica a NaCl a 0,36%	46
Figura 10. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para HbS	53
Figura 11. Representação esquemática dos sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S	54
Figura 12. Representação esquemática do princípio do teste de ELISA para detecção de Epo	59
Figura 13. Representação esquemática do princípio do teste de ELISA para detecção de Hpx	61
Figura 14. Representação esquemática do princípio do teste de ELISA para detecção de Hp	62
Figura 15. Associação entre glicoproteínas plasmáticas e parâmetros hematimétricos nos subgrupos amostrais	73
Figura 16. Relação entre a peroxidação lipídica e os subgrupos amostrais	74

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros hematimétricos e eritrogênicos de referência em indivíduos adultos	22
Tabela 2. Frequência genotípica dos haplótipos β^S/β^S	40
Tabela 3. Frequência alélica dos haplótipos β^S	40
Tabela 4. Influência da idade nos parâmetros avaliados no subgrupo sem haplótipo Bantu	41
Tabela 5. Influência do tempo de uso de hidroxiureia nos parâmetros avaliados	43
Tabela 6. Quantidade de hemoglobinas presente no grupo amostral	44
Tabela 7. Características do grupo amostral	44
Tabela 8. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de regiões da família β	54
Tabela 9. Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família da globina β	55
Tabela 10. Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família da globina β	55
Tabela 11. Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição	56
Tabela 12. Representação esquemática dos tubos a serem pipetados para dosagem de TBARS	57
Tabela 13. Comparação entre níveis de Hb F nos subgrupos amostrais com uso de HU..	66
Tabela 14. Distribuição da concentração de Hb F nos subgrupos amostrais	67
Tabela 15. Haplótipos do subgrupo Bantu/_ e os níveis de Hb F	67
Tabela 16. Valores médios de Epo, Hp e Hpx do grupo amostral em relação aos valores de referência	68
Tabela 17. Concentrações de glicoproteínas plasmáticas entre mulheres e homens dos subgrupos amostrais	69
Tabela 18. Comparação das concentrações das glicoproteínas plasmáticas entre os subgrupos amostrais	69
Tabela 19. Parâmetros hematimétricos e eritrogênicos no grupo amostral	71

Tabela 20. Associação entre os níveis hematológicos e glicoproteínas plasmáticas 72

Tabela 21. Associação entre glicoproteínas plasmáticas e parâmetros hematológicos dos subgrupos amostrais 72

Tabela 22. Correlação entre marcador de peroxidação lipídica, e glicoproteínas plasmáticas e Hb F 74

LISTA DE ABREVIATURAS

–	qualquer haplótipo beta-S exceto o Bantu
/	subgrupo sem haplótipo Bantu
AF	Anemia Falciforme
AHSP	proteínas estabilizadoras de alfa-hemoglobina
AVE	acidente vascular encefálico
Bantu/_	subgrupo heterozigoto para o haplótipo Bantu
Bantu/Bantu	subgrupo homozigoto para o haplótipo Bantu
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	catalase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular media
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CTH	células tronco hematopoéticas
D.O.	densidade optica
DF	doença falciforme
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etinoadaminotetracético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
Epo	eritropoetina
ERO	espécies reativas de oxigênio
et al.	e outros
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAG	ácido glutâmico
GMPc	guanosina monofosfato cíclica
GPx	glutationa peroxidase

GSH	glutaciona
GSSG	glutaciona dissulfeto
GST	glutaciona S transferase
GTG	valina
GV	glóbulos vermelhos
Haplótipos β^S	Haplótipos da globina beta-S
Hb A	hemoglobina A (normal)
Hb F	hemoglobina fetal
Hb S	hemoglobina S (falcêmica)
Hb S/beta	interação Hb S e beta talassemia
Hb SC	duplo heterozigoto para a Hb S e Hb C
Hb SS	homozigoto para a Hb S (anemia falciforme)
Hb	hemoglobina
HCM	hemoglobina corpuscular média
Hp	haptoglobina
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
Hpx	hemopexina
Ht	hematócrito
HU	hidroxiureia
LHGDH	Laboratório de Hemoglobinas e genética das Doenças Hematológicas
MDA	malondialdeído
MS	Ministério da Saúde
pb	pares de base
PCR-RFLP	Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
PHHF	persistência hereditária da hemoglobina fetal
q.s.p	quantidade suficiente para
rpm	rotação por minuto
Saudi	Índia-Arábia Saudita
STA	síndrome torácica aguda
SUS	Sistema Único de Saúde
TBA	ácido tiobarbitúrico

TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEB	Tris-EDTA-Borato
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
VCM	volume corpuscular médio

LISTA DE UNIDADES

μL	microlitro
fL	fentolitros
g/dl	grama por decilitros
K/ μl	mil por microlitros
$10^9/\text{L}$	um bilhão por litro
mM	mili molar
ng/mL	nanograma por mililitro
pg	picogramas
μM	micro molar

LISTAS DE FÓRMULAS QUÍMICAS

CO	monóxido de carbono
CO ₂	dióxido de carbono
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
KCl	cloreto de potássio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio dibásico anidro
NaCl	cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	fosfato de sódio monobásico monohidratado
NO	óxido nítrico
O ₂	oxigênio

LISTA DE SÍMBOLOS

ζ	gene zeta
α	gene alfa
ε	gene épsilon
γ^G	gene gama glicina
γ^A	gene gama alanina
δ	gene delta
β	gene beta
%	porcentagem

Sumário

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Hematopoese e Eritropoese	20
1.2	Parâmetros hematimétricos e eritrogênicos	21
1.3	Hemoglobina Humana.....	22
1.4	Hemoglobinopatias Hereditárias	24
1.5	Hemoglobina S e Doença Falciforme	25
1.6	Haplótipos da globina beta S.....	26
1.7	Fisiopatologia da Anemia Falciforme	27
1.8	Estresse Oxidativo e Capacidade Antioxidante.....	30
1.9	Tratamento.....	32
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	Objetivo Geral	36
2.2	Objetivos Específicos:.....	36
3	MATERIAL E MÉTODO.....	38
3.1	Casuística.....	38
3.2	Método:.....	45
3.2.1	Caracterização do perfil hemoglobínico dos pacientes	45
3.2.2	Genotipagem.....	50
3.2.3	Avaliação do estresse oxidativo	56
3.2.4	Quantificação dos níveis séricos de Hp, Hpx e Epo.....	58
3.3	Análises estatísticas.....	63
4	RESULTADOS.....	66
4.1	Influência do haplótipo Bantu sobre os níveis de Hb F.....	66
4.2	Valores séricos de glicoproteínas plasmáticas e comparação entre os subgrupos	68
4.3	Parâmetros Hematológicos e associação com os níveis de Epo, Hp e Hpx.....	70
4.4	Níveis de peroxidação lipídica e associação com Hp, Hpx, Epo e Hb F	73
5	DISCUSSÃO.....	76
6	CONCLUSÕES	82
7	REFERÊNCIAS	84
8	APÊNDICES.....	94

1.Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hematopoese e Eritropoese

As células tronco hematopoéticas (CTH) se localizam na medula óssea vermelha e possuem a função de restabelecer constantemente o sistema sanguíneo, controlando a hierarquia celular da linhagem sanguínea. Por processos de proliferação, diferenciação e maturação celular, as CTH dão origem às células progenitoras que formam células hematopoéticas maduras, as quais compõem cerca de 99% da medula óssea vermelha (TESTA; DEXTER, 1989). A diferenciação em células sanguíneas maduras é orquestrada por glicoproteínas como a eritropoetina (Epo), a qual age na eritropoese de modo complexo produzindo eritrócitos a partir da proliferação e diferenciação das células precursoras de eritróides (Unidades Formadoras de Colônias Eritróides, UFC-E). Sem esta glicoproteína plasmática estas células vão a apoptose (ELLIOTT et al, 2008; ELLIOTT, 2008). A ação na eritropoese resume em: estimulação na proliferação de células medulares indiferenciadas (UFC-E), induzindo ao maior número de mitoses; da estimulação para o amadurecimento das UFC-E, originando os proeritroblastos e os eritroblastos basófilos; da estimulação da síntese da hemoglobina (Hb) e do aumento na taxa de reticulócitos no sangue. A figura 1 ilustra este processo (LORENZI, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A Epo é sintetizada de acordo com a demanda ou em baixa tensão de oxigênio (hipóxia) no sangue. A produção na fase fetal ocorre no fígado (hepatócitos), e na fase adulta nos rins (fibroblastos peritubulares no córtex renal). A Epo é essencial para a produção de glóbulos vermelhos, e acelera a produção destes após hemorragia, por exemplo (SILVERTHORN, 2010; JELKMANN, 2011).

Os eritrócitos dos mamíferos são células pequenas e anucleadas com grande quantidade de Hb. O eritrócito humano, em um meio oxigenado e hidratado possui a forma de disco bicôncavo e proporciona maior superfície em relação ao volume facilitando as trocas gasosas, e flexibilidade ao passar por capilares mais finos, onde sofrem deformações temporárias e não se rompem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A anucleação ocorre durante a maturação do eritroblasto em eritrócito na medula óssea, na qual a cromatina sofre condensação gradualmente e é expelida da célula ao mesmo tempo em que a concentração de Hb aumenta (JI et al., 2011) (Figura 1B). Por esta razão, os eritrócitos são incapazes de renovar suas moléculas apresentando meia-vida de aproximadamente 120

dias. Neste período, as enzimas, que controlam as atividades metabólicas da célula, encontram-se em nível crítico comprometendo o ciclo metabólico celular, e a célula é, então, retirada da circulação por macrófagos, principalmente no baço (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

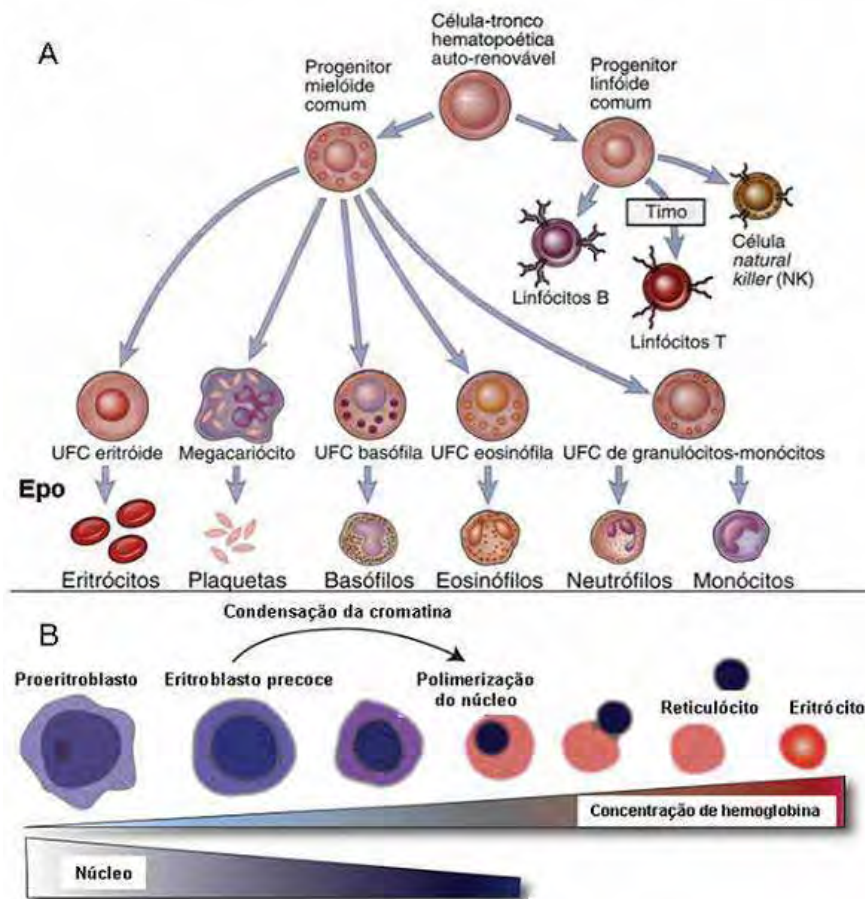


Figura 1: Representação esquemática da hematopoese humana. A. Árvore hematopoética. Por meio de processos de proliferação, diferenciação e maturação da célula tronco hematopoética, e ação de algumas citocinas, são formados progenitores que dão origem às células sanguíneas maduras, por exemplo a eritropoetina (Epo) (modificado de ABBAS et al., 2008) B. Para a formação do eritrócito, o progenitor (eritroblasto) sofre anucleação, processo em que o núcleo se condensa até ser expelido da célula, enquanto a concentração de Hb aumenta (modificado de JI et al., 2011).

1.2 Parâmetros hematimétricos e eritrogênicos

Índices hematimétricos e eritrogênicos são avaliados para determinar a condição de um indivíduo podendo indicar alterações com significado clínico. Os principais parâmetros avaliados são: contagem de glóbulos vermelhos em bilhões por litro (GV $10^9/L$), e quando em baixa concentração indicam eritrocitopenia e, em alta concentração, eritrocitose; quantidade de Hb nos eritrócitos em grama por decilitros (Hb g/dL), baixa quantidade

indica anemia; a quantidade de eritrócitos expressa em porcentagem é denominada de hematócrito (Ht %) e avalia a porcentagem de eritrócitos em relação ao sangue total; volume corpuscular médio mede o volume dos eritrócitos em fentolitros (VCM fL) e, quando baixo indica microcitose e, quando alto indica macrocitose; hemoglobina corpuscular média em picogramas (HCM pg) que indica a quantidade de Hb em cada eritrócito; concentração de hemoglobina corpuscular média em gramas por decilitros (CHCM g/dL) avalia a concentração de Hb em relação aos eritrócitos presentes; a porcentagem de reticulócitos em relação a quantidade de hemácias circulantes e a quantidade absoluto de reticulócitos em mil por microlitros (K/ μ L) (FAILACE, 2003).

Alguns índices hematimétricos e eritrogênicos variam quanto à idade e gênero. A tabela 1 ilustra os parâmetros de normalidade para indivíduos acima de dez anos segundo Failace (2003).

Tabela 1. Parâmetros hematimétricos e eritrogênicos de referência em indivíduos adultos

Parâmetros hematimétricos e eritrogênicos	Unidade de medida	Valores de referência	
		Mulheres	Homens
GV	($10^9/L$)	4 - 5,2	4,5 - 5,9
Hb	(g/dL)	12,0 - 16,0	13,5 - 17,5
Ht	(%)	36,0 - 46,0	41,0 - 53,0
VCM	(fL)	80,0 - 100,0	
HCM	(pg)	26,0 - 34,0	
CHCM	(%)	31,0 - 37,0	
Reticulócitos	(%)	1,06 - 2,63	0,87 - 2,6
Reticulócitos	(K/ μ L)	< 150,0	

(GV) glóbulos vermelhos; (Ht) hematócrito; (VCM) volume corpuscular médio; (HCM) hemoglobina corpuscular média; (CHCM) concentração de hemoglobina corpuscular média; ($10^9/L$) um bilhão por litro; (g/dL) grama por decilitros; (%) porcentagem; (fL) fentolitros; (pg) picogramas; (K/ μ L) mil por microlitros.

1.3 Hemoglobina Humana

A Hb é uma proteína globular tetramérica, com peso molecular de 64.458 Daltons, formada por quatro subunidades, cada uma composta por duas porções: a globina, fração proteica geneticamente determinada; e o grupo heme, um grupo prostético que contém o átomo de ferro. A principal função da Hb nos mamíferos é o transporte de gases como o oxigênio (O_2), dióxido de carbono (CO_2), o monóxido de carbono (CO) e o óxido nítrico (NO). Especificamente, o ferro se liga ao O_2 e transporta este gás dos pulmões para os

tecidos e também interage com o CO e o NO. Já o transporte de CO₂ dos tecidos para os pulmões, ocorre por interações com resíduos aminoterminais da molécula de Hb formando um complexo carbamino fraco (HONIG; ADAMS, 1986; SCHECHTER, 2008).

A fração proteica da Hb é formada por duas globinas do tipo alfa e duas globinas do tipo beta, as quais são codificadas por genes organizados em duas famílias: os genes da família tipo alfa - um zeta (ζ) e dois alfas (α_1 e α_2) - que se localizam no braço curto do cromossomo 16 (16p 13.3); e os genes da família tipo beta - épsilon (ϵ), gama glicina (γ^G), gama alanina (γ^A), delta (δ) e beta (β) - que se localizam no braço curto do cromossomo 11 (11p 15.4). Estes genes estão presentes em ambos os cromossomos, na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento (FRENETTE; ATWEH, 2007). Portanto, durante o desenvolvimento do organismo, diferentes Hb são sintetizadas. Na fase embrionária são formadas a Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$), Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) e Hb Portland II ($\zeta_2\beta_2$), que são posteriormente substituídas pela Hb Fetal (Hb F - $\alpha_2\gamma_2$), prevalente até o nascimento. Após o nascimento, a Hb F é gradativamente substituída, antes do primeiro ano de vida, pelas Hb A ($\alpha_2\beta_2$), que constitui de 96% - 98% da Hb total do eritrócito, e Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$), que constitui de 2,5% - 3,5%. A substituição da Hb F pode ser total ou parcial, restando até 1% na fase adulta (RANDHAWA et al., 1983; WEATHERALL; CLEGG, 2001a; FRENETTE; ATWEH, 2007). A figura 2 ilustra a ontogenia das cadeias globínicas. Pacientes que possuem doenças causadas por alterações em algum gene das globinas do tipo beta apresentam sinais e sintomas clínicos após o primeiro ano de vida, período em que ocorre a substituição da Hb F pela Hb alterada (FRENETTE; ATWEH, 2007).

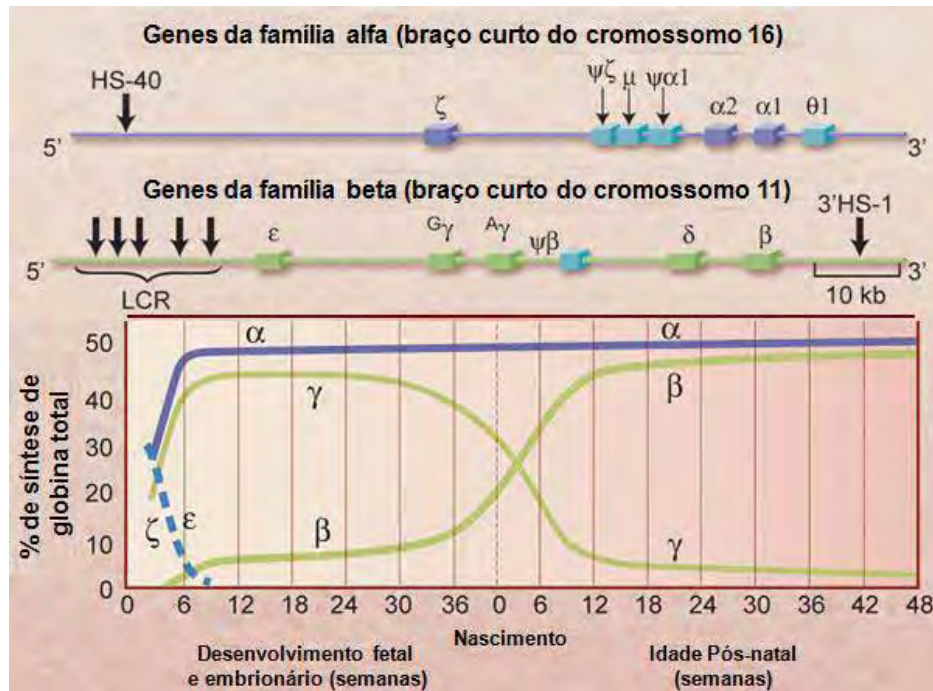


Figura 2. Família dos genes alfa e beta-globina e ontogenia das cadeias globínicas. Os genes da família alfa estão localizados no braço curto do cromossomo 16 e os genes da família beta estão localizados no braço curto do cromossomo 11. Todos os genes estão localizados na mesma ordem que são expressos durante o desenvolvimento (modificado de SCHECHTER, 2008).

1.4 Hemoglobinopatias Hereditárias

As hemoglobinopatias, ou anemias hereditárias, são as doenças monogênicas mais comuns no mundo (WEATHERALL; CLEGG, 2001a). Possuem alta frequência nas regiões tropicais da África, Ásia e em parte do Mediterrâneo. Nas Américas, as hemoglobinopatias são encontradas em quase todos os países como resultado, dentre outros fatores, do tráfico de escravos e fluxo migratório (LUZ et al., 2006).

As anemias hereditárias são divididas em dois grandes grupos: as Hb variantes e as talassemias. As últimas resultam do desequilíbrio do conteúdo quantitativo das cadeias globínicas, pela ausência parcial ou total da síntese de uma ou mais cadeias, e são classificadas de acordo com a cadeia globínica afetada como α , β , $\delta\beta$ e $\gamma\delta\beta$ talassemias. Apesar da grande variedade, as α e β -talassemias são as formas com maior frequência nas populações. As α -talassemias são encontradas na África, Ásia e parte do Mediterrâneo, enquanto que as β -talassemias são oriundas principalmente da Ásia e Mediterrâneo (WEATHERALL; CLEGG, 2001b, LUZ et al., 2006). Como consequência da diminuição na produção de uma das cadeias, a globina complementar se precipita e se acumula interferindo na eritropoese e na hemólise (MUNCIE; CAMPBELL, 2009). Na alfa-

talassemia, na vida fetal, as cadeias gamas formam tetrâmeros (γ_4) dando origem à Hb Bart's e, na vida adulta as cadeias beta formam tetrâmeros (β_4) formando a Hb H (HARTEVELD; HIGG, 2010). Essas Hb são instáveis e se precipitam formando corpúsculos que diminuem o tempo de vida útil da célula. Na beta-talassemia o excesso de cadeias alfa precipitam nas células precursoras eritróides prejudicando a eritropoese; nas células maduras leva a danos na membrana com consequente hemólise (HIGGS et al., 2012).

As Hb variantes são causadas por mutações, geralmente pontuais, nos genes das globinas, que resultam em Hb com estrutura alterada, e com características bioquímicas diferentes. As variantes mais frequentes são a Hb S e a Hb C (WEATHERALL; CLEGG, 2001a).

1.5 Hemoglobina S e Doença Falciforme

A Hb S é resultado de uma mutação com troca do vigésimo nucleotídeo, adenina por uma timina ($GAG \rightarrow GTG$), no gene da beta-globina (HBB) e resulta na substituição do sexto aminoácido, o ácido glutâmico (com características hidrofílicas) por uma valina (com características hidrofóbicas) (HBB, GLU6VAL) (TAYLOR et al., 2008). Durante a passagem na microcirculação, no eritrócito desoxigenado a molécula de Hb S sofre mudança conformacional. O aminoácido valina ao tentar se estabilizar em meio hidrofílico, forma interações com resíduos hidrofóbicos de outra Hb S-desoxigenada dando origem a cristais e, com a agregação destes, aos polímeros. Os polímeros causam danos à membrana dos eritrócitos, os quais rompem o citoesqueleto e originam a célula em formato de foice. Este processo afeta o citoesqueleto e ocorre a exposição de epítomos protéicos e lipídios como a fosfatidilserina e CD36 (ZAGO; PINTO, 2007; FRENETTE; ATWEH, 2007, BRITTENHAM et al., 1985 apud REES, 2010; LABIE; ELTON, 1999 apud ODIÈVRE et al., 2011) (Figura 3).

Para efetivar a polimerização, é necessário um tempo do eritrócito em condições adversas (desoxigenação, acidose, desidratação e temperatura corporal elevada) e, quanto maior a concentração de Hb S dentro da célula, menor é o tempo para as Hb se polimerizarem (ODIÈVRE et al., 2011). A polimerização é reversível, ou seja, em condições adequadas as Hb S desfazem a ligação entre os polímeros e voltam a eluir no eritrócito (FRENETTE; ATWEH, 2007). Alguns fatores genéticos influenciam na

polimerização como a concentração de Hb F e os efeitos protetores da co-herança com a α -talassemia ou com a Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF) (REES, 2010).

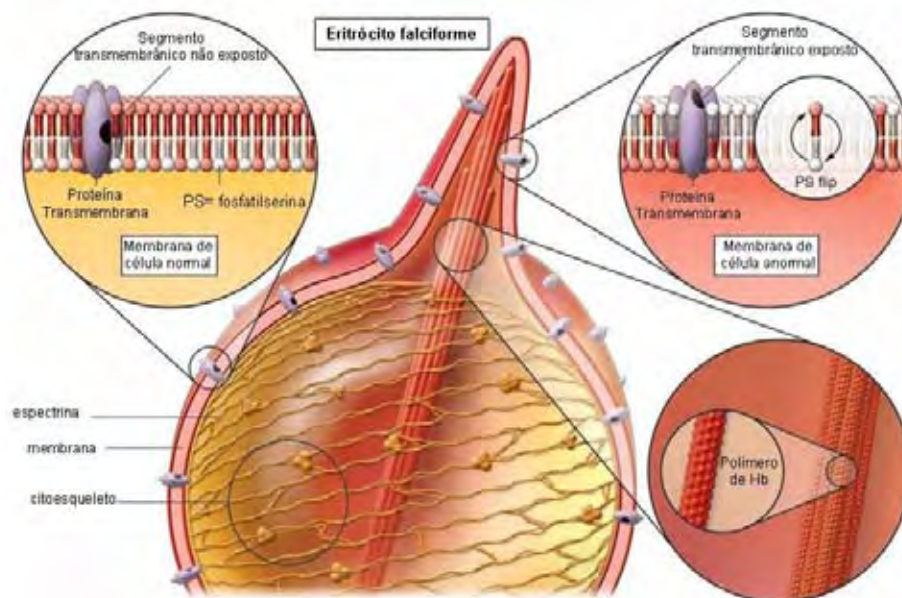


Figura 3. Alteração na membrana do eritrócito por polímeros de Hb S. A mutação pontual no gene da beta globina gera um resíduo de valina hidrofóbico que tende a se agrupar formando polímeros rígidos que causam danos a membrana eritrocitária expondo proteínas transmembrana (FRENETTE; ATWEH, 2007).

Doença falciforme (DF) é um termo genérico usado para determinar o grupo de alterações genéticas caracterizadas pelo predomínio da Hb S, seja em homozigose (Hb SS), denominada de anemia falciforme (AF), ou associada a outras alterações de hemoglobinas, formando heterozigotos compostos como a interação entre a variante e talassemias - Hb S/ β^0 talassemia, Hb S/ β^+ talassemia, Hb SC, Hb S/ α talassemia, dentre outros (MACUS et al., 1997; NAGEL, 2000). A AF é a forma clínica mais grave da DF (FRENETTE; ATWEH, 2007) e a mais comum em determinadas regiões do Brasil, sendo que a cada ano nascem aproximadamente 3.500 crianças com Hb SS (CANÇADO; JESUS, 2007). Além disso, e por sua diversidade clínica, é considerada um problema de saúde pública em muitos locais. Desde 2005, o Ministério da Saúde (MS), instituiu no Sistema Único de Saúde (SUS) cuidados diferenciados a pessoas com DF e outras hemoglobinopatias (Portaria nº 1.391, 16 agosto de 2005; CANÇADO; JESUS, 2007).

1.6 Haplótipos da globina beta S

Haplótipos são combinações específicas de sítios polimórficos em uma única

cromátide. Os haplótipos da globina beta S (haplótipos β^S) são fundamentados na análise de um conjunto de polimorfismos, localizados na família gênica da beta globina, no cromossomo 11, reconhecidos por endonucleases específicas (ORKIN et al., 1982).

A descoberta dos haplótipos β^S foi importante para a detecção de riscos clínicos em pacientes com AF. Cinco haplótipos têm sido associados a diferentes grupos étnicos, de acordo com a região de origem e predomínio geográfico: o haplótipo Benin associado à África Ocidental; o Bantu à África Oriental Centro-Sul; o Senegal à África Atlântico Ocidental, o Índia-Arábia Saudita (Saudi) à Índia e Península Arábica Oriental e, o Camarões, que é restrito à África, mais especificamente, ao grupo étnico Eton na Costa Ocidental Africana (NAGEL, 1984). A análise dos haplótipos β^S e a correlação com achados clínicos revelaram que os pacientes com haplótipo Senegal apresentam curso clínico mais brando, os que apresentam Benin têm clínica intermediária, e os com Bantu, curso clínico mais grave (POWARS, 1991; POWARS; HITI, 1993). Segundo Nagel (1984) essa variação pode ser explicada pela evidência de que indivíduos com o haplótipo Bantu e sem tratamento possuem níveis menores de Hb F (< 5%) em relação aos pacientes, nas mesmas condições e com os outros haplótipos β^S . Os três haplótipos β^S mais comuns entre os brasileiros, com DF, são o Bantu, Benin e Senegal. Essa herança reforça a etnia da maioria dos Africanos que vieram para o Brasil, originários da África Oriental e Centro-Sul (ZAGO et al., 1992; SILVA et al., 2009).

Alguns pacientes, no entanto, apresentam haplótipos β^S incomuns, com padrões de digestão diferentes dos sítios que caracterizam os anteriormente descritos, e são denominados de atípicos. Os padrões diferenciados de haplótipos são gerados por diversos mecanismos genéticos envolvendo os cromossomos β^S como: mutação pontual dos haplótipos típicos; recombinação dupla ou simples entre os cromossomos com um haplótipo β^S comum; e conversão gênica (ZAGO et al., 2000).

1.7 Fisiopatologia da Anemia Falciforme

Dois processos fisiopatológicos decorrentes da polimerização estão presentes na AF, sendo eles: a vaso-oclusão, com isquemia e reperfusão, e a anemia hemolítica (STEINBERG, 2008; REES, 2010). Porém, a polimerização sozinha não é suficiente para explicar tais processos complexos (CHIANG; FRENETTE, 2005).

A vaso-oclusão é a obstrução da microcirculação, desencadeada por um processo

complexo que envolve a interação e adesão de células e moléculas ao endotélio vascular, como os eritrócitos falcizados, os leucócitos, algumas células endoteliais, plaquetas, fatores de coagulação e proteínas plasmáticas. Resulta na interação dinâmica entre eritrócitos e o endotélio vascular com episódios de oclusão e isquemia, seguidos de restauração do fluxo sanguíneo, o que aumenta a lesão tecidual mediada por danos inflamatórios com consequente estresse oxidativo (REES et al., 2010). Com a microcirculação obstruída, a polimerização tende a aumentar causando danos à membrana do eritrócito com consequente hemólise (CHIANG; FRENETTE, 2005) (Figura 4). Estes dois eventos estão envolvidos na AF formando um ciclo: a vaso-occlusão aumenta a taxa de hemólise, a qual está envolvida na diminuição do tônus vascular com aumento na obstrução da microcirculação.

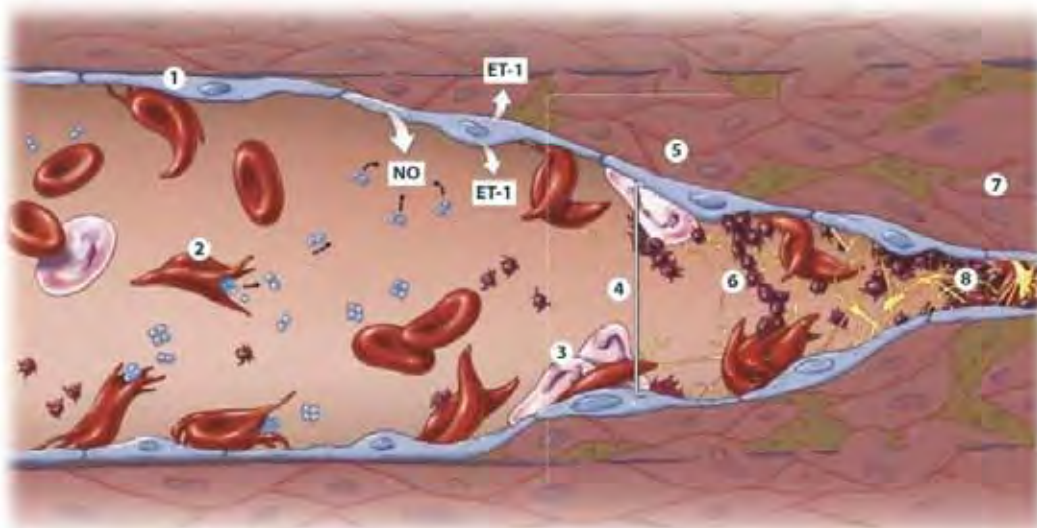


Figura 4. Representação esquemática dos processos fisiopatológicos na anemia falciforme. (1) Adesão de hemácias ao endotélio. (2) Hemólise. (3) Adesão leucocitária. (4) Diminuição do calibre vascular. (5) Proliferação neointimal. (6) Agregação plaquetária. (7) Vasculopatia. (8) Vaso-occlusão. ET-1: endotelina 1; NO: óxido nítrico. (modificado de BARABINO et al., 2010).

A hemólise é caracterizada pela destruição do eritrócito. A maior parte ocorre no espaço extravascular (hemólise extravascular) em que as células do retículo endotelial, principalmente do baço, destroem as células velhas e danificadas. Já a hemólise intravascular é menos frequente e ocorre por alterações nos eritrócitos os quais se rompem no espaço vascular. A hemólise intravascular libera a Hb, molécula depletora de NO, e reduz a biodisponibilidade deste que é um importante vasodilatador, facilitando assim, a vaso-constricção e a ativação de moléculas de adesão. Além disso, a hemólise libera arginase, uma enzima que degrada a L-arginina, substrato enzimático para a produção de NO, ocorrendo então a redução na síntese pela destruição do seu precursor (ODIÈVRE et

al., 2011) (Figura 4 e 6). Este mecanismo também contribui com o estresse oxidativo, pois a Hb livre se degrada e libera o grupo heme e o ferro, uma das substâncias tóxicas ao organismo (ROTHER, et al. 2005) e que participa de vias de formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), como nas reações de Fenton e Haber-Weiss (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KRUSZEWSKI, 2003), representadas na figura 5.

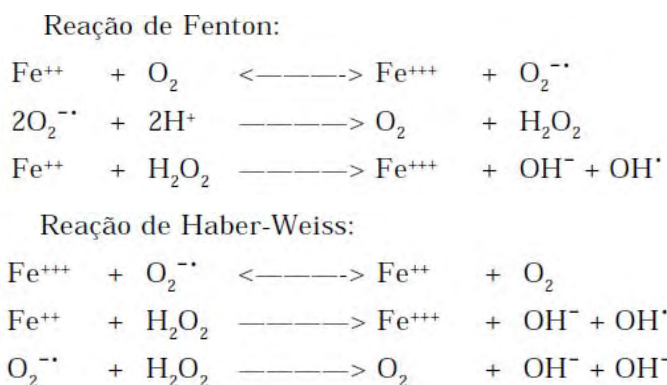


Figura 5. Reações de Fenton e Haber-Weiss. Estas reações exemplificam a participação do ferro na produção de espécies reativas de oxigênio (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A fisiopatologia na AF desencadeia processos inflamatórios e, conseqüentemente, subfenótipos clínicos. Os episódios de dor aguda são os eventos clínicos de maior ocorrência nestes pacientes e a principal razão para a admissão hospitalar, seguida pela Síndrome Torácica Aguda (STA). Certas complicações são predominantes em diferentes estágios da vida. Por exemplo, nos dez primeiros anos, os mais comuns são: episódios de dores, iniciados com a síndrome mão-pé, em consequência da inflamação da região do metacarpo e metatarso; STA e Acidente Vascular Encefálico (AVE). No entanto, não estão restritas a esta faixa etária, podendo ocorrer por toda a vida do indivíduo com AF (STEINBERG, 2008; REES et al., 2010).

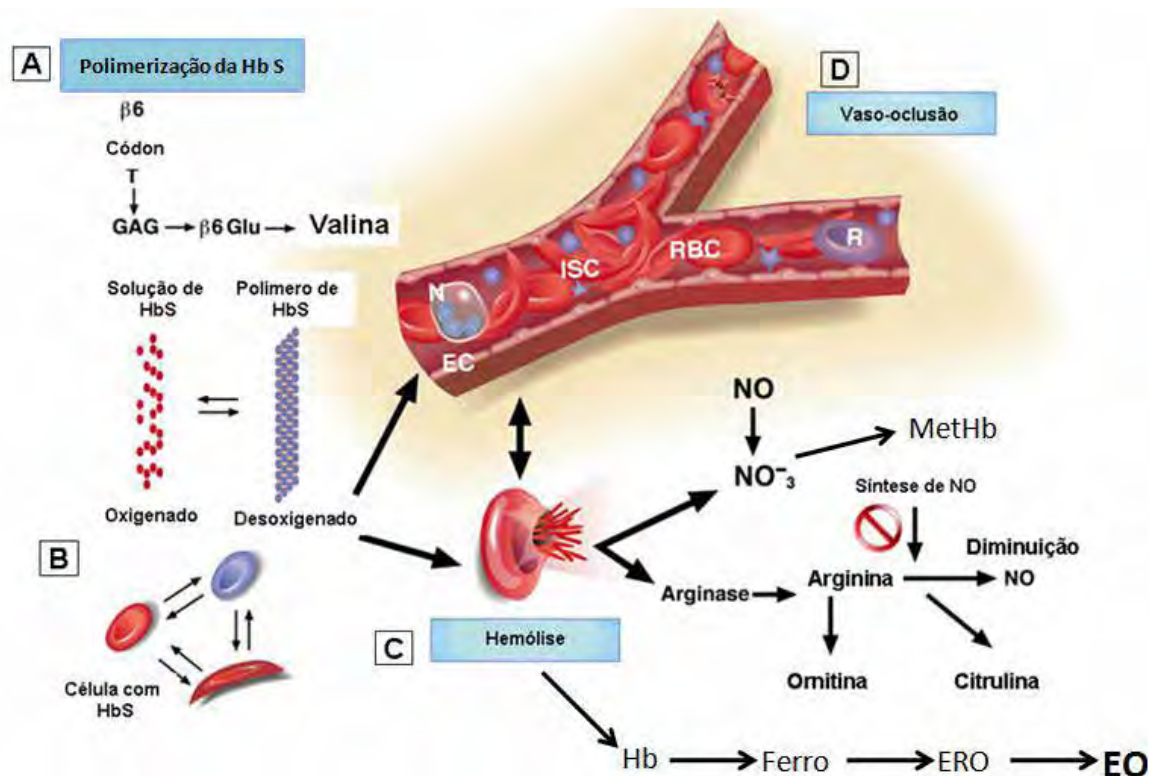


Figura 6. Representação dos principais eventos decorrentes da fisiopatologia na AF. **A.** A troca do sexto aminoácido da cadeia beta-globina leva a produção de Hb S, que, quando desoxigenada polimeriza. **B.** O eritrócito falcizado pode voltar à conformação bicôncava quando em condições de normóxia. **C.** A polimerização, em estado de hipóxia, causa danos ao eritrócito e sua membrana levando a hemólise com consumo de NO, pela liberação de Hb, a qual é dissociada, liberando o ferro, que contribui para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) com aumento no estresse oxidativo (EO). **D.** A interação dos eritrócitos falcizados com os leucócitos e o endotélio vascular resulta na vaso-oclusão. N (neutrófilo); EC (células endoteliais); ISC (isquemia); RBC (eritrócito); R (reperfusão); MetHb (metahemoglobinemia) (modificado de STEINBERG, 2008).

1.8 Estresse Oxidativo e Capacidade Antioxidante

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de ERO e os sistemas de defesa antioxidante. O estresse oxidativo na AF se deve ao aumento nos níveis de peroxidação lipídica, alterações nos níveis de glutathiona (GSH) e nas atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (VARMA et al, 1983; LÓPEZ et al, 1999; DIOP et al, 2005). A peroxidação lipídica é resultado da ação de ERO aos ácidos graxos poli-insaturado da membrana celular resultando na alteração da estrutura e permeabilidade destas membranas. Esta reação de peroxidação é dividida em três fases: 1. a fase de *iniciação* mediada por um radical hidroxila (OH^\cdot) ou por íons de ferro que sequestra o hidrogênio (H) do ácido graxo poli-insaturado da membrana celular

resultando no radical peroxila (LOO^-); 2. a fase de *propagação* com sequestro de outro H do ácido graxo poli-insaturado formando um radical lipídico (L^-); 3. no *término* temos a propagação destes radicais (LOO^- e L^-) até a produção de substâncias genotóxicas como o malondialdeído (MDA) (BURCHAM, 1998). A peroxidação lipídica pode ser avaliada, em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento) por meio do teste de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no qual, o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um cromógeno com alta absorvidade molar no espectro visível (MIHARA; UCHIYAMA, 1978; JANERO, 1990; BENZIE, 1996; CIOBICA et al., 2011).

O controle oxidativo da Hb, ou de suas subunidades, é essencial para se estabelecer a estrutura tetramérica da Hb, durante a eritropoese, e depois da destruição eritrocitária e acúmulo de Hb extracelulares (SCHAER; ALAYASH, 2010). Por essa razão, há vias protéicas que detoxificam as células, como por exemplo, as proteínas estabilizadoras de α -hemoglobinas (AHSP) as quais são responsáveis por se ligarem às cadeias α -globinas funcionando como chaperonas moleculares, facilitando o rearranjo destas globinas, e como proteínas de controle de qualidade, prevenindo a instabilidade das cadeias α diminuindo a precipitação destas e, conseqüentemente, o estresse oxidativo (MOLLAN et al. 2010 e 2012). Para eventos pós hemólise, glicoproteínas plasmáticas como a haptoglobina (Hp) e a hemopexina (Hpx) fazem parte do controle oxidativo.

A Hp foi descoberta em 1938 por Polonovski e Jayle como um “substrato ligante de proteína plasmática” (POLONOVSKI, 1938 apud SHAHABI et al., 2012). É composta por dímeros ou uma montagem estrutural multimérica ($\alpha_2 \beta_2 \dots \alpha_x \beta_x$) na qual a subunidade β se liga a um dímero de Hb formando complexo protéico irreversível (Hb/Hp). Além de ser reconhecida como ‘depletora’ de Hb livre, também tem potencial para atenuar alguns dos principais efeitos adversos da mesma, como a vasoatividade, os danos oxidativos nos tecidos e a autodestruição peroxidativa do grupo heme (BORETTI et al., 2009; BUEHLER et al., 2009).

A Hpx também possui função depletora. Liga-se ao grupo heme livre formando um complexo Heme/Hpx e oferece efeito antioxidante adicional. Os complexos Hb/Hp e Heme/Hpx são recuperados pelos respectivos receptores CD163 e CD91/LRP, que se encontram nos macrófagos reticuloendoteliais, antes de serem degradados por proteases lisossomais (KATO, 2009; SCHAER; ALAYASH, 2010) (Figura 7). A Hpx, além do papel depletora do grupo heme, atua em processos como a homeostase do ferro e defesa

bacteriostática, entre outros. A determinação dos níveis plasmáticos de Hp e Hpx é utilizada para avaliar os danos que algumas doenças causam aos eritrócitos, e conseqüentemente auxiliam no diagnóstico de anemias hemolíticas (DELANGHE; LANGLOIS, 2001; KÖRMÖCZI et al, 2006, HEILMANN et al., 2009, GUPTA et al., 2011).

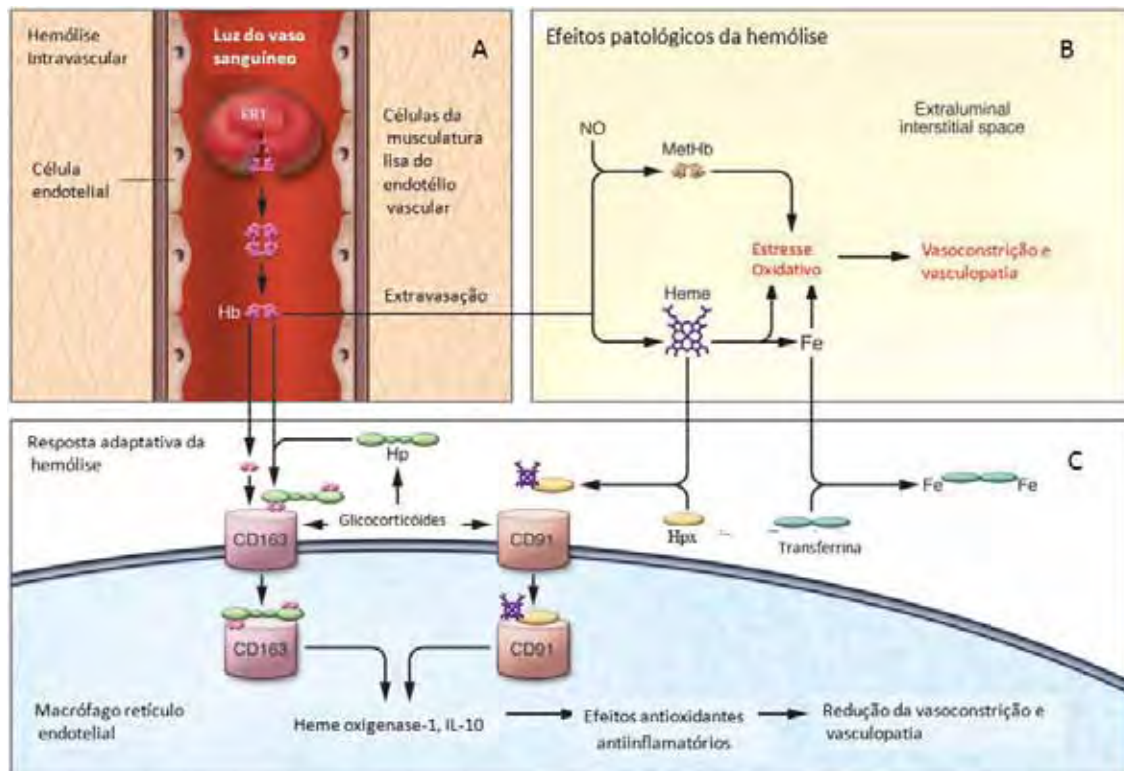


Figura 7. Via da resposta adaptativa e patológica da hemólise intravascular. **A.** A hemólise intravascular libera Hb. **B.** A Hb intravascular livre desencadeia um conjunto de efeitos patológicos: é oxidada em metahemoglobina (MetHb) quando sequestra o óxido nítrico (NO), esgotando este vasodilatador endógeno e libera o grupo heme e o ferro (Fe), culminando em estresse oxidativo, vasoconstrição e vasculopatia. **C.** Glicoproteínas de detoxificação, como a Hp, que se liga a Hb, e a Hpx, a qual se liga a grupo heme extracelular, suprimem as conseqüências oxidativas da hemólise. Os complexos formados (Hb/Hp e heme/Hpx) são depletados nos macrófagos reticuloendoteliais, CD163 e CD91 respectivamente, proporcionando efeitos antioxidantes e antiinflamatórios. A transferrina transporta o Fe livre no plasma, impedindo sua oxidação (modificado de KATO, 2009).

1.9 Tratamento

A AF é caracterizada por fisiopatologia complexa e diversificada e há interesse constante de pesquisa para melhorar a clínica e sobrevida dos pacientes. São três as intervenções que diminuem a morbidade e mortalidade na AF: transfusão sanguínea, uso de hidroxiureia (HU) e a cura com o transplante de medula óssea (STYLES; VICHINSKY, 1997). Pacientes com DF podem necessitar de várias transfusões sanguíneas ao longo de

sua vida acarretando em sobrecarga de ferro (FERTRIN; COSTA, 2010). Intervenção farmacológica, com o uso de hidroxiureia (HU) ameniza a manifestação fenotípica da doença. O transplante de células tronco cura o indivíduo e é procedimento indicado para pacientes que apresentam o fenótipo mais grave da DF (STYLES; VICHINSKY, 1997; FRENETTE; ATWEH, 2007). No Brasil até 2010, somente oito casos de transplante de células tronco hematopoéticas (CTH) em pacientes com DF foram realizados, com um caso de rejeição com recidiva da doença. Daqueles com sucesso no transplante, não foi registrado nenhum óbito e os pacientes tiveram sobrevida livre de eventos clínicos (SIMÕES et al., 2010).

A HU é uma pequena molécula que reduz a síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA) por inibir a ribonucleotídeo redutase, e manter as células na fase S do ciclo celular. Esta interrupção do ciclo celular, provavelmente é responsável pelo aumento da Hb F (REES, 2011) e, há evidências de que a HU tem ação como doadora de NO, o que aumenta os níveis de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que acelera a tradução dos genes da gama-globina (COKIC et al., 2003; ALMEIDA et al., 2012). Seus efeitos hematológicos na DF acarretam na diminuição da polimerização, principalmente pelos níveis aumentados de Hb F; diminuição na produção de neutrófilos (ação mielossupressora) e, conseqüentemente, na aderência vascular e vaso-oclusão; a formação de carbamil nitroso, pela oxidação da HU, e conseqüente geração de nitroxil e NO, auxiliando na vasodilatação. Estes efeitos permitem melhoria no fluxo sanguíneo (DAVIES; GILMORE, 2003; WARE; AYGUN, 2009; ALMEIDA et al., 2012).

A HU é um agente químico com boa biodisponibilidade oral e tem sido utilizada por muitos anos no tratamento de doenças mieloproliferativas, como alguns tipos de câncer (FRENETTE; ATWEH, 2007). Em 1998, foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de adultos com AF que apresentavam frequentes episódios clínicos graves da doença (STROUSE; HEENEY, 2012). A medicação previne danos a órgãos cruciais como fígado, rins e cérebro e melhora a sobrevida nos adultos com DF. Porém, nem todos os pacientes respondem adequadamente ao tratamento elevando os níveis de Hb F na mesma proporção. Por isso, é necessário encontrar outros agentes que, isolados ou em combinação com a HU, tenham efeitos mais robustos nos níveis de Hb F (SCHECHTER, 2008).

Embora a HU apresente efeitos benéficos em curto prazo, pode apresentar potencial risco genotóxico (NZOUAKOU et al., 2011). Como todo fármaco, a HU apresenta

toxicidade, porém seus efeitos benéficos superam os efeitos colaterais, no caso da DF. Com dose, frequência de uso apropriado, e monitoramento da mielossupressão, sua administração pode ser considerada segura (KOVACIC, 2011).

A AF possui importância epidemiológica no Brasil, sendo considerada um problema de saúde pública. Seus processos fisiopatológicos, complexos e diversificados, desencadeiam manifestações clínicas variadas que podem ser moduladas por polimorfismos genéticos e pelos haplótipos da globina beta-S. O haplótipo Bantu confere a clínica mais grave e é o mais frequente em algumas regiões do Brasil. Em 2011, um trabalho realizado pelo nosso grupo (SILVA, 2011), relatou resposta diferencial ao tratamento com HU nos pacientes com AF, e com presença de pelo menos um alelo Bantu. Assim, este trabalho buscou entender a resposta ao tratamento com HU em pacientes com AF que possuem haplótipo Bantu em homozigose, heterozigose e sem este haplótipo, por meio de marcadores de hemólise e de requisição medular, de estresse oxidativo e capacidade antioxidante e níveis de Hb F. Com essas análises pretendemos entender os aspectos genéticos e bioquímicos que conduzem à resposta individual ao tratamento com HU em pacientes brasileiros.

2.Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar, em portadores da AF, a influência do haplótipo Bantu sobre marcadores de estresse oxidativo e eritrogênico, em resposta ao tratamento com HU, correlacionando-os com parâmetros hematimétricos e níveis de Hb F.

2.2 Objetivos Específicos:

- avaliar a concentração de Hb F nos subgrupos amostrais;
- quantificar e comparar os valores séricos de marcadores de hemólise (Hp e Hpx) e eritrogênicos (Epo) nos diferentes subgrupos;
- avaliar parâmetros hematológicos (GV, Hb, Ht, VCM, HCM, CHCM, e reticulócitos) em cada subgrupo e relacionar com os níveis séricos de Hp, Hpx e Epo;
- comparar os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) entre os subgrupos amostrais e correlacionar com os valores de Epo, Hp, Hpx e Hb F.

3. Material e Método

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Casuística

No ano de 2011 foram avaliadas 772 amostras de sangue periférico de indivíduos com DF em acompanhamento clínico no Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcante - HEMORIO, Rio de Janeiro-RJ. Estes pacientes fazem parte de um amplo estudo em parceria com o HEMORIO e as amostras de sangue, plasma e DNA são armazenadas no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH). Todas as amostras de sangue (8 mL) foram coletadas por punção venosa, por equipes do HEMORIO, com material descartável, em dois tubos de 4 mL, contendo EDTA a 5%, para testes de triagem de hemoglobinas, biologia molecular e bioquímicos, após o consentimento livre e esclarecido, conforme normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) 196/96 e complementares. Para obedecer aos princípios estabelecidos por esta Resolução, o presente projeto foi registrado sob o nº 006/11 e Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 0030.0.229.000-10 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HEMORIO. Todos os pacientes foram selecionados por meio de entrevista e aplicação de questionário (Apêndice I) sobre informações clínicas e uso de outros medicamentos.

A presença da homozigose para Hb SS, para confirmação da AF, foi feita por meio de testes de triagem básica e investigação molecular em todos os pacientes. Posteriormente, os indivíduos foram genotipados quanto aos haplótipos da globina β^S e aqueles que não apresentaram o perfil genético de inclusão nesse estudo foram excluídos desse grupo amostral.

Portanto, a seleção do grupo amostral partiu da genotipagem dos 772 pacientes quanto à presença da Hb S. Destes, 623 possuem AF e 531 (100%) foram genotipados quanto os haplótipos β^S . Além dos haplótipos com combinações típicas dos sítios polimórficos analisados, alguns haplótipos apresentaram diferentes combinações dos sítios de restrição e estes foram denominados de Atípicos e classificados por números (Figura 8).

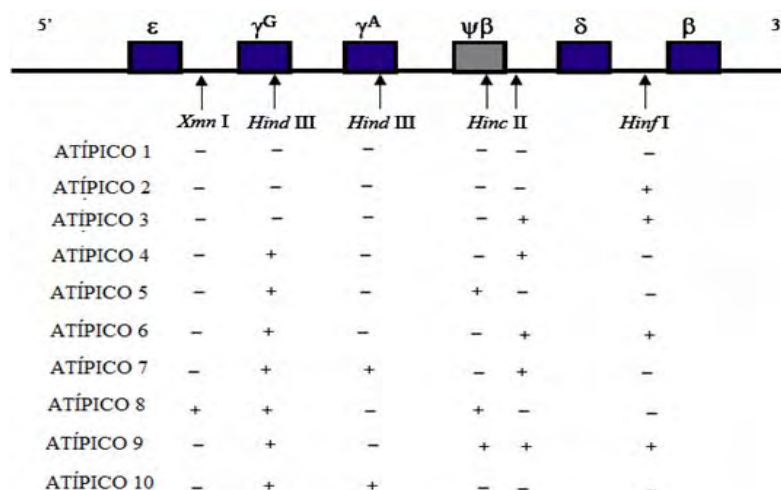


Figura 8. Caracterização dos alelos atípicos dos haplótipos β^S . Dez alelos apresentaram padrões de digestão diferenciados os quais foram denominados de Atípicos e classificados por número. (+) presença do sítio de restrição; (-) ausência do sítio de restrição.

Foram encontrados 294 (55,36%) Bantu/Bantu, 130 (24,5%) Bantu/Benin, dois (0,37%) Bantu/Senegal, dois (0,37%) Bantu/Saudi, três (0,57%) Bantu/Camarões, 46 (8,66%) Bantu/Atípicos, 36 (6,78%) Benin/Benin, um (0,19%) Benin/Saudi, três (0,57%) Benin/Camarões, dez (1,88%) Benin/Atípico e quatro (0,77%) Atípico/Atípico (Tabela 2).

Dos 1062 (100%) cromossomos analisados, foram identificados 771 (72,60%) Bantu, 216 (20,35%) Benin, dois (0,18%) Senegal, três (0,29%) Saudi, seis (0,56%) Camarões e 64 (6,02%) Atípicos (Tabela 3). A caracterização do grupo amostral possibilitou a redação de um artigo no formato de Carta ao Editor que foi aceito e será publicado na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Apêndice II).

Tabela 2. Frequência genotípica dos haplótipos β^S/β^S

Haplótipos β^S/β^S	Frequência Genotípica	TOTAL
	n (%)	n (%)
Bantu/Bantu	294 (55,36)	294 (55,36)
Bantu/Benin	130 (24,50)	130 (24,50)
Bantu/Senegal	2 (0,37)	2 (0,37)
Bantu/Saudi	2 (0,37)	2 (0,37)
Bantu/Camarões	3 (0,57)	3 (0,57)
Bantu/Atípico 1	20 (3,76)	
Bantu/Atípico 2	3 (0,57)	
Bantu/Atípico 3	7 (1,31)	
Bantu/Atípico 4	1 (0,19)	
Bantu/Atípico 5	3 (0,57)	
Bantu/Atípico 6	5 (0,94)	46 (8,66)
Bantu/Atípico 7	2 (0,37)	
Bantu/Atípico 8	1 (0,19)	
Bantu/Atípico 9	3 (0,57)	
Bantu/Atípico 10	1 (0,19)	
Benin/Benin	36 (6,78)	36 (6,78)
Benin/Saudi	1 (0,19)	1 (0,19)
Benin/Camarões	3 (0,57)	3 (0,57)
Benin/Atípico 1	6 (1,13)	
Benin/Atípico 3	1 (0,19)	
Benin/Atípico 4	1 (0,19)	10 (1,88)
Benin/Atípico 7	2 (0,37)	
Atípico 1/Atípico 1	2 (0,37)	
Atípico 4/Atípico 4	1 (0,19)	4 (0,75)
Atípico 6/Atípico 6	1 (0,19)	
TOTAL	531 (100)	531 (100)

Tabela 3. Frequência alélica dos haplótipos β^S

Haplótipos β^S	Frequência Alélica	TOTAL
	n (%)	n (%)
Bantu	771 (72,60)	771 (72,60)
Benin	216 (20,35)	216 (20,35)
Senegal	2 (0,18)	2 (0,18)
Saudi	3 (0,29)	3 (0,29)
Camarões	6 (0,56)	6 (0,56)
Atípico 1	30 (2,82)	
Atípico 2	3 (0,29)	
Atípico 3	8 (0,75)	
Atípico 4	4 (0,37)	
Atípico 5	3 (0,29)	64 (6,02)
Atípico 6	7 (0,66)	
Atípico 7	4 (0,37)	
Atípico 8	1 (0,09)	
Atípico 9	3 (0,29)	
Atípico 10	1 (0,09)	
TOTAL	1062 (100)	1062 (100)

Após a genotipagem, as amostras foram separadas segundo os critérios de inclusão para compor os grupos amostrais. Como o objetivo do estudo foi avaliar a influência do haplótipo Bantu frente ao uso de HU, primeiramente, foram excluídos pacientes que não tomaram HU há pelo menos 300 dias antecedentes a data da coleta. Este tempo de exposição ao medicamento foi estabelecido para a certeza do uso da HU e da aderência do paciente a este tratamento. Posteriormente, foram excluídos aqueles que receberam transfusão sanguínea há pelo menos 120 dias antes da coleta da amostra e aqueles com idade inferior a dez anos. Porém, foram incluídas seis amostras de pacientes com idade entre seis e nove anos no grupo sem haplótipo Bantu para aumentar a casuística, pois a ocorrência de pacientes com esse perfil foi pequena. Para isso, antes das comparações e correlações entre os subgrupos amostrais, o subgrupo em questão foi dividido em indivíduos com idade inferior a dez anos (seis pacientes com média de $8 \pm 1,17$ anos), e indivíduos com idade acima de dez anos (dez pacientes com média de $38,5 \pm 13,6$ anos). A análise estatística foi realizada para verificar se este viés de pacientes com idade inferior poderia influenciar os resultados quanto aos parâmetros elencados para o projeto. Os dados mostraram que os indivíduos com idade inferior não influenciam os resultados como está representado na tabela 4.

Tabela 4. Influência da idade nos parâmetros avaliados no subgrupo sem haplótipo Bantu

	Idade inferior a 10 anos	Idade superior a 10 anos	Valor de p
	Média \pm DP (n=6)	Média \pm DP (n=10)	
Hb F (%)	10,16 \pm 8,27	13,74 \pm 10,05	0,47*
TBARS (ng/mL)	2244,33 \pm 1542,0	3131,5 \pm 2221,0	0,40*
GV ($10^9/L$)	2,68 \pm 0,51	2,31 \pm 0,47	0,16*
Epo (mU/mL)	605,9 \pm 230,5	872,7 \pm 125,1	0,12 [#]
Hp (ng/mL)	681,7 \pm 23,0	685,6 \pm 20,3	0,74*
Hpx (ng/mL)	1626,6 \pm 88,2	1814,6 \pm 127,7	0,46 [#]
Hb (g/dL)	8,63 \pm 1,81	8,14 \pm 1,16	0,51*
Ht (%)	24,2 \pm 5,24	23,09 \pm 3,53	0,61*
VCM (fl)	89,8 \pm 5,14	101,9 \pm 15,47	0,08*
HCM (pg)	32,1 \pm 2,24	36,11 \pm 6,2	0,15*
CHCM (%)	35,58 \pm 1,2	35,31 \pm 1,05	0,64*
Reticulócitos (%)	8,82 \pm 3,03	8,95 \pm 3,46	0,94*
Reticulócitos (K/ μL)	230,46 \pm 66,0	206,2 \pm 109,0	0,63*

*Comparação por teste t. [#] Comparação por Mann-Whitney. DP: desvio padrão. (ng/mL) nanogramas por mililitro; ($10^9/L$) um bilhão por litro; (mU/mL) mili unidades por mililitros; (g/dL) gramas por decilitros; (%) porcentagem; (fl) femtolitros; (pg) picogramas; (K/ μ L) mil por microlitros.

Além da exclusão dos itens que poderiam influenciar os resultados citados acima, foi pensado que o tempo de exposição ao tratamento com hidroxureia (HU) também poderia mascarar os resultados. Como o objetivo geral foi avaliar a influência do haplótipo

Bantu na resposta ao tratamento com HU sobre alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos, o medicamento não poderia interferir nos resultados. Para isso, foram realizados testes estatísticos a fim de verificar a influência ou não do medicamento. Os pacientes foram divididos em: uso de HU a menos de 1000 dias e uso de HU igual ou maior que 1000 dias (< 1000 dias e ≥ 1000 dias). A separação dos pacientes em dois tempos de exposição extremos foi escolhida por dois motivos: para saber se uma exposição crônica (acima de 1000 dias) mudaria os parâmetros avaliados e, a fragmentação dos subgrupos em vários tempos de exposição diminuiria o número de pacientes impossibilitando a realização de testes estatísticos. Os resultados mostraram que o tempo de exposição ao medicamento não está relacionado com nenhum dos parâmetros avaliados neste trabalho como mostra a tabela 5.

Tabela 5. Influência do tempo de uso de hidroxíureia nos parâmetros avaliados.

Parâmetros avaliados	Bantu/Bantu		Bantu/		/	
	< 1000 dias N=10 Média (Mín-Máx)	≥ 1000 dias N=15 Média (Mín-Máx)	< 1000 dias N=20 Média (Mín-Máx)	≥ 1000 dias N=6 Média (Mín-Máx)	< 1000 dias N=8 Média (Mín-Máx)	≥ 1000 dias N=8 Média (Mín-Máx)
Hb F (%)	9,1 (0,7-15,2)	12,66 (3,3-22,9)	13,52 (3,0-27,4)	11,51 (3,5-20,3)	9,4 (1,6-28,4)	14,4 (2,1-26,8)
TBARS (ng/ml)	1459,0 (382,0-7185,0)	1681,0 (509,0-3668,0)	2285,0 (314,0-8338,0)	2370,0 (102,0-11155,0)	2721,12 (717,0-6291,0)	2876,5 (904,0-5170,0)
Epo (mU/mL)	720,0 (0,0- 1331,0)	1150,09 (374,5-4490,9)	725,4 (408,1-3003,6)	874,5 (133,6-1659,0)	804,0 (280,9-1870,9)	983,0 (479,0-1688,0)
Hp (ng/mL)	660,9 (590,7-739,6)	675,9 (607,2-810,7)	684,3 (646,4-720,9)	682,8 (625,4-724,1)	688,5 (654,5-716,6)	679,0 (658,4-699,0)
Hpx (ng/mL)	1863,1 (1356,6-2362,6)	1856,6 (1484,0-2530,0)	1952,0 (1526,0-2792,6)	1665,0 (1317,0-2087,0)	1766,6 (1622,6-2859,3)	1836,0 (1520,0-1927,3)
GV (10 ⁹ /L)	2,5 (1,23,6)	2,17 (1,52-3,05)	2,42 (1,59-3,21)	2,66 (1,9-4,2)	2,44 (1,74-2,9)	2,45 (1,53-3,6)
Hb (g/dL)	8,09 (4,98-9,8)	8,04 (5,67-10,5)	8,79 (6,4-11,9)	8,43 (7,3-10,2)	8,05 (6,51-10,2)	8,6 (7,1-12,0)
Ht (%)	23,32 (13,3-28,9)	22,42 (15,0-28,5)	24,69 (17,5-32,70)	24,05 (20,20-31,0)	22,92 (18,0-29,0)	22,15 (19,1-34,0)
VCM (fl)	101,0 (37,3-126,0)	97,11 (70,0-119,0)	102,95 (75,4-123,0)	93,23 (75,0-104,0)	94,18 (78,6-110,0)	100,65 (81,0-125,0)
HCM (pg)	34,93 (23,0-42,0)	35,86 (30,0-45,7)	36,87 (25,3-45,0)	32,93 (24,0-38,6)	33,10 (27,5-38,6)	36,11 (28,0-46,2)
CHCM (%)	34,93 (33,8-37,5)	35,86 (33,0-37,8)	36,0 (33,5-36,8)	35,08 (32,0-37,0)	35,18 (33,8-37,0)	35,63 (34,0-37,0)
Reticulócitos (%)	7,95 (4,9-22,3)	7,2 (3,7-18,2)	9,05 (2,98-16,5)	7,26 (4,91-9,2)	10,55 (1,57-13,77)	7,85 (6,1-13,0)
Reticulócitos (K/ μL)	205,53 (102,0-330,0)	183,0 (66,4-364,8)	211,8 (80,5-381,0)	190,93 (108,6-352,0)	220,0 (41,45-360,0)	215,08 (114,0-339,0)

*ANOVA um critério. # Teste Mann-Whitney. (Mín-Máx): mínimo e máximo; _ : qualquer haplótipo beta-S exceto o Bantu; (mU/mL) mili unidades por mililitros; (ng/mL) nanogramas por mililitros; (10⁹/L) um bilhão por litro; (g/dL) gramas por decilitros; (%) porcentagem; (fl) femtolitros; (pg) picogramas; (K/ μL) mil por microlitros.

Assim, após a normatização, fizeram parte do grupo amostral 67 amostras de pacientes com AF, sendo 37 mulheres e 30 homens, com média de idade entre $29,65 \pm 16,13$ anos e sob o uso de HU há $1036,56 \pm 886$ dias. A tabela 6 ilustra o valor percentual das frações de Hb presentes e confirma a não ocorrência de transfusão sanguínea pelos baixos níveis de Hb A e altos níveis de Hb S.

Tabela 6. Quantidade de hemoglobinas presente no grupo amostral
Quantidade de Hb [Média (%) \pm DP (Mín-Máx)]

Hemoglobinas	Grupo amostral (AF)	Quantidade de Hb normais em adultos
Hb A	$3,12 \pm 3,43$ (0,9 - 25,9)	96,0 – 98,0
Hb S	$80,0 \pm 7,74$ (53,4 – 92,1)	0,0
Hb A₂	$4,37 \pm 1,18$ (2,1 – 10,6)	2,5 – 3,5
Hb F	$12,10 \pm 7,3$ (0,7 – 28,4)	0,0 – 1,0

Hb A: maior quantidade nos adultos normais; Hb S: hemoglobina presente nas DF; Hb F: hemoglobina fetal. DP: desvio padrão. Mínimo – Máximo.

Após o estabelecimento dos critérios de exclusão, o grupo amostral foi dividido em três subgrupos: 25 (37,3%) amostras de indivíduos homocigotos para o haplótipo Bantu (Bantu/Bantu); 26 (38,8%) de heterocigotos para o haplótipo Bantu (Bantu/_) e 16 (23,9%) sem o haplótipo Bantu (_/_) (Tabela 7). Após a eliminação de todos os possíveis vieses, a comparação entre os subgrupos amostrais pode ser iniciada e está apresentada, segundo os objetivos específicos propostos.

Tabela 7. Características do grupo amostral.

Subgrupo Genotípico	Haplótipos β^S/β^S	Frequência genotípica n (%)	Idade (anos) Média \pm DP	Uso de HU (dias) Média \pm DP
Bantu/Bantu (n = 25)	Bantu/Bantu	25 (37,30)	$31,4 \pm 15,6$	$1283,5 \pm 1152$ (360,0 – 5.760,0)
Bantu/_ (n = 26)	Bantu/Benin	20 (29,84)	$29,62 \pm 15,43$	$754,23 \pm 431,14$ (300,0 – 2.039,0)
	Bantu/Atípico 1	3 (4,46)		
	Bantu/Atípico 4	1 (1,50)		
	Bantu/Atípico 5	1 (1,50)		
/ (n = 16)	Bantu/Atípico 6	1 (1,50)	$28,0 \pm 18,8$	$1109 \pm 881,3$ (300,0 – 3.156,0)
	Benin/Benin	13 (19,40)		
	Benin/Atípico 1	1 (1,50)		
	Atípico 2/Atípico 2	1 (1,50)		
	Atípico 4/Atípico 4	1 (1,50)		
TOTAL		67 (100%)	$29,65 \pm 16,13$	$1036,0 \pm 886,25$

DP: desvio padrão (mínimo – máximo). _: qualquer haplótipo β^S exceto o Bantu.

3.2 Método:

As análises laboratoriais específicas foram desenvolvidas no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), do Departamento de Biologia sediado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE) campus de São José do Rio Preto, SP. Os testes para hematimetria e eritrogênese (GV, Hb, Ht, VCM, HCM, CHCM e reticulócitos) foram realizados no HEMORIO em equipamentos automatizados.

A seguir, o detalhamento técnico realizado na UNESP:

3.2.1 Caracterização do perfil hemoglobínico dos pacientes

As amostras coletadas passaram por testes clássicos da investigação de anemias hereditárias a fim de confirmar a presença da Hb S e quantificar as Hb presentes no adulto (Hb A, Hb A₂, Hb F e possível Hb S), pelos métodos a seguir:

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

Princípio:

Teste seletivo utilizado para identificar possível talassemias do tipo beta, principalmente na forma heterozigota, pois em 97% desses casos, os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise, nesta concentração. A resistência globular não é específica para talassemia beta heterozigota, e resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e em outras hemoglobinopatias, como na Hb C.

Reagentes:

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

- NaCl	9,0 g
- Na ₂ HPO ₄	1,36 g
- NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,28 g
- Água destilada q.s.p	100 mL

Solução trabalho

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

Procedimento:

Em tubo de ensaio colocou-se 2 mL de solução de NaCl a 0,36% e 10 μ L 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 2,0 cm de uma folha branca com linhas negras (Figura 9). O teste foi interpretado como positivo quando não se visualizava as linhas, pois o eritrócito não se rompendo tornava a amostra opaca. Em amostras com resistência normal à hemólise visualizavam-se facilmente as linhas através da solução translúcida.



Figura 9: Ilustração dos possíveis resultados para a resistência globular osmótica a NaCl a 0,36%. O número 1 ilustra uma amostra positiva em que, devido à resistência dos eritrócitos a esta solução, não é possível a visualização das linhas negras. Já o número 2 ilustra uma amostra negativa em que os eritrócitos se rompem nesta solução possibilitando a visualização das linhas.

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

Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados na forma de “esfregaço italiano” padronizado no LHGDH, no qual os eritrócitos são mais facilmente visualizados. Estes foram analisados ao microscópio óptico, quanto ao tamanho (microcitose, macrocitose e anisocitose), forma (poiquilicitose) e quantidade de Hb (hipocromia e hipercromia). Os resultados foram expressos da seguinte maneira, segundo padronização do LHGDH para cada um dos parâmetros avaliados.

- | | |
|--------------------------------|------------------------------|
| - alterações discretas: (+) | - alterações moderadas: (++) |
| - alterações acentuadas: (+++) | - células normais: (N) |

- *Preparação de hemolisados:*

Princípio

Por meio de uma reação de lise da membrana dos eritrócitos, liberou-se as Hb presentes, as quais foram submetidas a procedimentos eletroforéticos. Os reagentes utilizados foram:

Reagentes

Hemolisado Rápido - com saponina (NAOUM, 1990).

Reativo hemolisante:

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

Procedimento:

- Em placa de Kline foi colocado 50 μ L de sangue com 100 μ L de reativo hemolisante ($\frac{1}{2}$ volume de amostra para 1 volume de reagente), com posterior homogeneização até a hemólise completa;

- O hemolisado pode ser utilizado após 5 minutos e, no máximo, até 4 horas após sua preparação, em temperatura ambiente (25° C).

- *Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino (MARENGO; ROWE, 1965)*

Princípio:

Técnica qualitativa utilizada para detecção de Hb normais e anormais, principalmente as variantes. A leitura se baseia nas diferentes cargas elétricas das Hb, que acarretam em mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais.

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB), pH 8,6

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

Conservado em 4° C.

Procedimento:

- As fitas de acetato de celulose foram embebidas em tampão TEB por 15 minutos, no mínimo, e seis horas, no máximo, antes da aplicação do hemolisado;

- 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 tecido absorvente (pano multi-uso);

- A solução de Hb foi aplicada a 1,0 cm da extremidade da fita em contato com o pólo negativo.

- Passaram-se 300 volts por aproximadamente 30 minutos do pólo negativo para positivo;

- As frações de Hb foram analisadas de acordo com o posicionamento na fita, e seguindo mapa de migração com padrão conhecido. No sentido da mais eletronegativa para a mais eletropositiva temos: Hb A₂ mais eletronegativa, seguida das Hb S, Hb F e a Hb A como a mais eletropositiva.

- *Eletroforese de hemoglobinas em pH ácido (VELLA, 1968)*

Princípio:

Na eletroforese de pH alcalino, a Hb C migra na mesma posição que a Hb A₂, e a Hb D na mesma posição que a Hb S.. Esta técnica é utilizada para diferenciar alguns desses tipos de Hb que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino .

Reagentes:

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

- Na ₂ HPO ₄	2,02 g
- NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	7,66 g
- Água destilada q.s.p	1000 mL

Conservar em 4° C.

Gel de Ágar-Fosfato

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

Procedimento:

- Os componentes do gel de ágar-fosfato foram adicionados a um erlenmeyer de 250 mL e levados ao forno micro-ondas por um minuto ou até completa dissolução, sendo o tempo interrompido de 10 em 10 segundos para evitar fervura e evaporação;

- Foram pipetados 5,0 mL do gel, em lâminas de microscopia, para gelificarem em 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 45 minutos no sentido do pólo positivo para o negativo;

As frações de Hb foram analisadas de acordo com o posicionamento no gel segundo mapa de migração e padrão conhecido. No sentido da mais eletropositiva para a mais eletronegativa temos: Hb C, Hb S, Hb A e Hb F mais eletronegativa.

- *Perfil hemoglobínico e Quantificação das frações por Cromatografia líquida de alta performance (BIO-RAD Kit de Beta-Talassemia Heterozigota)*

Princípio:

Com base na carga elétrica de cada uma das frações é possível identificar o perfil de Hb e os valores percentuais de cada uma das frações. O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD) com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota, que consiste na 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 415 nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes. 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 relacionado à sua carga elétrica. No final da análise de cada amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

Procedimento:

Em um tubo de 1,5 mL, foram misturados 5 µL de sangue total com 1,0 mL 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 do tempo de retenção, fornecidos pela calibração específica, e emitidos em modelo próprio, que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico. Aos valores de Hb A₀ obtidos pela HPLC foram incluídas as subfrações de Hb A glicosilada e Hb A acetilada, denominadas “P2” e “P3” pelo equipamento respectivamente. Os valores de Hb A₂ considerados normais foram de 2,5 a 3,5% e os de Hb F até 1,3%, previamente estabelecidos e fornecidos pelo fabricante.

3.2.2 Genotipagem

- *Extração do DNA (SAMBROOK et al., 1989 – modificado por PENA et al., 1991)*

Princípio:

Técnica utilizada para extrair DNA genômico a partir de sangue total. Os tampões de lise rompem os eritrócito 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 0,32 M	10,95 g
- Tris HCl 10 mM	1 mL
- MgCl ₂ 5 mM	0,5 mL

- | | |
|--|--------|
| - Triton 1% 100x | 1 mL |
| - Água mili-Q autoclavada q.s.p. | 100 mL |
| 2. Solução de lise 2 para extração de sangue (tampão utilizado na lise de células brancas) | |
| - 0,075 M de NaCl | 2,19 g |
| - 0,02 M de EDTA | 20 mL |
| - Água mili-Q q. s. p. | 500 mL |
| 3. Proteinase K (20 mg/mL) | |
| - Proteinase K | 20 mg |
| - Água mili-Q q.s.p. | 1 mL |
| Conservado em freezer. | |
| 4. Fenol | |
| 5. Clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) | |
| 6. Etanol 70% | |
| 7. KCl 2M | |

Procedimento:

Amostras de sangue periférico (800 μ L), colhidas com EDTA, foram colocadas em microtubos e o volume completado para 1,5 mL com solução de lise 1. Após 10 minutos de agitação, foi centrifugado por cinco minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foram acrescentados 1,0 mL de solução de lise 1, esse passo foi repetido por duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 450 μ L de solução de lise 2; 25 μ L de SDS à 10% e 5 μ L de proteinase K 20 mg/mL para lise de proteínas restantes. Após homogeneização, o microtubo foi colocado em banho-maria por três horas a 42°C.

Posteriormente, foram adicionados 500 μ L de fenol. O material foi homogeneizado e centrifugado por cinco minutos a 7000 rpm. Após centrifugação, a fase superior foi transferida para outro microtubo, e adicionados 500 μ L da solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1 para a purificação da solução. O material foi homogeneizado e, novamente, centrifugado por cinco minutos a 7000 rpm. Esse último passo foi repetido por mais uma vez.

O sobrenadante foi colocado em tubo cotendo 50 μ L de solução de KCl 2M gelada e acrescentado 500 μ L etanol 100% bem gelado para facilitar a precipitação do DNA. O tubo foi invertido várias vezes até a precipitação do DNA.

O material foi novamente centrifugado por 30 segundos a 13000 rpm e o sobrenadante desprezado. O DNA no fundo do tubo foi lavado com 200 µL etanol 70% (gelado), para iniciar a hidratação, o sobrenadante, após centrifugação, foi desprezado. Após a evaporação do etanol, o DNA foi solubilizado com 50 µL de água ultra pura e conservado em freezer -20°C.

- *Análise molecular para Hb S por PCR-RFLP (SAIKI et al., 1985 modificado)*

A detecção da mutação foi realizada por reação em cadeia da polimerase seguida de análise de restrição (PCR-RFLP). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação que envolve o códon 6 foram: o oligonucleotídeo iniciador P 277 (*sense*): 5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA 3' e o oligonucleotídeo iniciador P 278 (*antisense*): 5' ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC 3'.

Mistura de reação de amplificação

H ₂ O	13,3 µL
Tampão sem MgCl ₂ (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	3,0 µL
dNTP (1,25 mM cada)	1,0 µL
Primer P277 (10,0 µM)	1,5 µL
Primer P278 (10,0 µM)	1,5 µL
<i>Taq</i> Polimerase (5U)	0,2 µL
DNA (150 ng/µL)	2,0 µL
Volume Final da reação	25 µL

A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: um ciclo com 35 repetições de 30 segundos a 94°C para desnaturação inicial, anelamento dos primers durante 30 segundos a 55°C e extensão da fita por adição dos dNTPs de 1 minuto a 72°C; e um outro ciclo com uma repetição de 10 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 36 ciclos de repetições.

Após a amplificação, o fragmento de 382 pb foi digerido a 37 °C por 3 horas. A enzima utilizada foi a *Dde* I (C↓TNAG).

Mistura de reação de digestão

H ₂ O	13,1 µL
<i>Dde</i> I	2,1 µL
PCR	5,0 µL

A mutação no códon 6 (GAG → GTG) elimina um sítio de restrição para a enzima *Dde* I; assim após a digestão o alelo normal gerou 3 fragmentos de 201 pb, 88 pb e 87 pb e o alelo mutante gerou dois, um de 288 pb e outro de 88 pb. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio. (Figura 10).

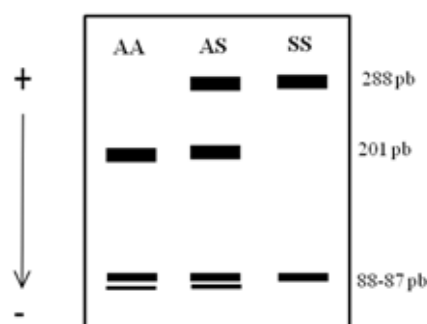


Figura 10. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para HbS. AA: homocigoto selvagem; AS: heterocigoto para Hb S; SS: homocigoto para Hb S; pb = pares de bases.

- *Análise dos Haplótipos β^S* (SUTTON *et al.*, 1989)

A determinação dos haplótipos foi realizada por PCR-RFLP, por meio da análise de seis sítios polimórficos, e a classificação segundo Sutton e colaboradores (1989) (Figura 11).

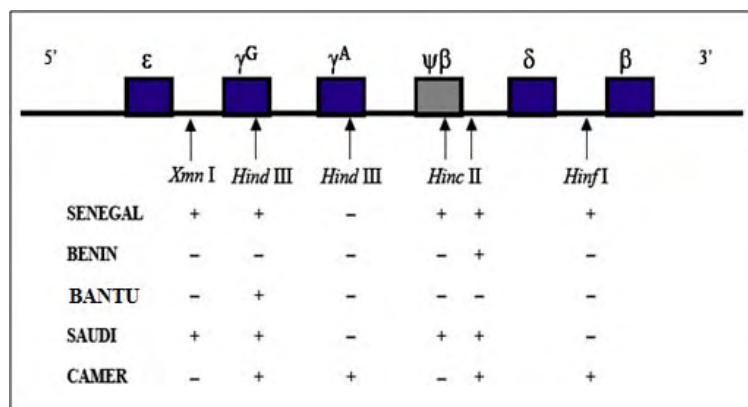


Figura 11. Representação esquemática dos sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S . (+) indica presença do sítio polimórfico; (-) indica ausência do sítio polimórfico.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para análise dos polimorfismos da família β estão listadas na Tabela 8.

Tabela 8. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de regiões da família β .

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência do oligonucleotídeo iniciador (5' – 3')	Direção	Região
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	→	5' γ^G
H1	AGGAGCTTATTGATAACTCAGAC	←	5' γ^G
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	←	γ^G
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	γ^G
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	γ^A
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	←	γ^A
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	→	$\Psi\beta$
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	←	$\Psi\beta$
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	→	3' $\Psi\beta$
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	←	3' $\Psi\beta$
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	→	5' β
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	←	5' β

→: sense ; ← anti-sense

Os reagentes, a concentração utilizada para a montagem da solução de reação e as condições de amplificação estão representadas nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9. Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família da globina β .

Componentes	Volumes (μL)			
	<i>XmnI</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Hinc</i> II	<i>Hinf</i> I
	5' γ^G	γ^G e γ^A	$\Psi\beta$ e 3' $\psi\beta$	5' β
H ₂ O	17,125	18,55	17,55	16,6
Tampão (10X)	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂ (50 mM)	1,25	1,0	1,0	1,25
dNTP's (2 mM)	2,5	-	-	2,5
dNTP's (10 mM)	-	0,75	0,75	-
Oligonucleotídeo iniciador 5' (10 μM)	-	0,5	0,5	0,5
Oligonucleotídeo iniciador 3' (10 μM)	-	0,5	0,5	0,5
Oligonucleotídeo iniciador 5' (25 μM)	0,25	-	-	-
Oligonucleotídeo iniciador 3' (25 μM)	0,25	-	-	-
Taq Polimerase (5U/ μL)	0,125	0,20	0,20	0,20
DNA (100 ng/ μL)	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume Final (μL)	25,0	25,0	25,0	25,0

Tabela 10. Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas da família da globina β .

Região	Desnaturação Inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão Final	
	35 ciclos									
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
5' γ^G	94	5'	94	45''	60	45''	72	1'30''	72	7'
γ^G	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
γ^A	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
$\Psi\beta$	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
3' $\psi\beta$	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
5' β	94	5'	94	45''	57	45''	72	1'30''	72	7'

O produto da PCR foi digerido, a 37°C durante 3 horas, para a região 5' γ^G e para as demais foi digerido por 5 minutos a 37°C com endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico. O tamanho dos produtos de amplificação e após clivagem, podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11. Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.

Oligonucleotídeo iniciador	Enzima	Região	Tamanho do fragmento amplificado	Tamanho dos fragmentos após a clivagem
H0 e H1	<i>Xmn</i> I	5'γ ^G	657 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>Hind</i> III	γ ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>Hind</i> III	γ ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>Hinc</i> II	Ψβ	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>Hinc</i> II	3'ψβ	590 p b	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>Hinf</i> I	5' β	380 pb	240 pb + 140 pb

A identificação dos padrões de restrição que determinam os haplótipos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição. De acordo com perfil de restrição para as seis regiões polimórficas da família da β-globina, foi possível definir os haplótipos β^S.

3.2.3 Avaliação do estresse oxidativo

O sangue total foi centrifugado por aproximadamente 15 minutos e o plasma foi separado em duas alíquotas: uma para avaliar a peroxidação lipídica (TBARS) e outra para os testes de imunoenensaio enzimático para a quantificação dos níveis de Epo, Hp e Hpx.

- *Dosagem de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)*
(MIHARA; UCHIYAMA, 1978).

A dosagem plasmática das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada para avaliar a peroxidação lipídica ocorrida nos eritrócitos. O método é baseado na reação do malondialdeído (MDA) e outros aldeídos, com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo MDA-TBA de cor rosa com absorção máxima em 535 nm. Valores até 440 ng/mL são considerados normais.

*Reagentes:**Tampão fosfato 75 mM (pH 2,5)*

Fosfato monobásico de potássio (KH ₂ PO ₄)	10 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL

Foi adicionado 500 mL de H₂O para dissolver e posteriormente acidificado com ácido acético glacial. Depois a solução foi completada para 1000 mL.

Ácido tiobarbitúrico (TBA) 10 nM

TBA	0,036 g
Tampão fosfato 75 mM (pH 2,5)	25 mL

Foi utilizado 1 mL desta solução para cada amostra a ser dosada.

*Solução padrão MDA (1,1,3,3, tetraetoxipropano) 20 µM**Solução com 400 µM*

1,1,3,3, tetraetoxipropano	99 µL
H ₂ O d	1000 mL

Solução com 20 µM

Solução com 400 µM	5 mL
H ₂ O d q.s.p.	100 mL

Procedimento

Em tubos de ensaio, pipetar os reagentes na ordem e quantidade que estão dispostos na tabela 12.

Tabela 12. Representação esquemática dos tubos a serem pipetados para dosagem de TBARS

Tubos	Conteúdo	Descrição
1	500 µL de H ₂ O d + 1 mL de TBA	Branco
2	500 µL de H ₂ O d + 1 mL de TBA	Branco
3	500 µL de padrão + 1 mL de TBA	Padrão
4	500 µL de padrão + 1 mL de TBA	Padrão
5	500 µL de amostra + 1 mL de TBA	Amostra

H₂O d: água destilada; branco: nome dado à solução que não apresenta nem o padrão de MDA, nem amostras de plasma. Sendo assim, não deve apresentar luminescência na espectrometria.

Após pipetar as amostras, os tubos foram incubados por 1 hora a 94°C e acrescentado 4 mL de álcool n-butílico após descanso de 15 minutos das amostras em temperatura ambiente. A solução foi homogeneizada e centrifugada a 2.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante contendo o complexo MDA-TBA foi lido no espectrofotômetro.

Cálculo do valor de TBARS da amostra

O valor final de TBARS da amostra, em ng/mL (ou nmol/mL) é obtido pelo emprego da seguinte fórmula:

TBARS = A média x F, no qual:

$$A \text{ média} = (A1+A2)/2$$

(lembrar que amostras com diferenças entre A1 e A2 superiores a 10% devem ser desconsideradas).

$F = ([\text{padrão TBARS}] \times 440,61) / A \text{ padrão TBARS}$, como a solução padrão MDA utilizada tem concentração de 10nM temos:

$$F = 10 \times 440,61 / A \text{ padrão TBARS},$$

$$F = 4406,1 / A \text{ padrão TBARS}$$

(lembrando que A padrão TBARS é a média, ou seja $(A1+A2)/2$ referente às amostras 2).

3.2.4 Quantificação dos níveis séricos de Hp, Hpx e Epo

Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O teste ELISA é baseado no método sanduíche, com duplo anticorpo. Neste ensaio o antígeno a ser detectado (glicoproteínas plasmáticas - Hp, Hpx e Epo), presente na amostra, reage com o anticorpo anti-enzimático que está aderido à superfície da microplaca de poliestireno, formando um complexo. As proteínas que não se ligarem são removidas por lavagem. É adicionada então, uma peroxidase conjugada com outro anticorpo anti-enzimático. Um segundo passo de lavagem é requerido. Um substrato cromógeno é adicionado e, por reação enzimática de oxidação, ocorrerá a emissão de fluorescência. Por fim, se adiciona uma solução ácida para interromper a reação do cromógeno possibilitando a leitura das amostras.

A intensidade de cor gerada é diretamente proporcional à quantidade de conjugado ligado ao complexo anticorpo, e conseqüentemente, diretamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra, ou seja, a quantidade das glicoproteínas de interesse.

Os resultados do ensaio são quantificados espectrofotometricamente a 450 nanômetros, usando um leitor de microplaca (Multiskan FC). Os resultados da absorbância de cada amostra é gerado por um Software, neste caso o SkanIt Software 2.5.1 RE. Ele apresenta a absorbância de cada amostra e gera a curva padrão dos calibradores e até a concentração de glicoproteína na amostra.

- *Protocolo de ELISA para detectar ERITROPOETINA HUMANA (R&D Systems)*

Princípio

Imunoensaio para a determinação quantitativa de concentrações de Epo em plasma humano. A figura 12 ilustra o princípio.

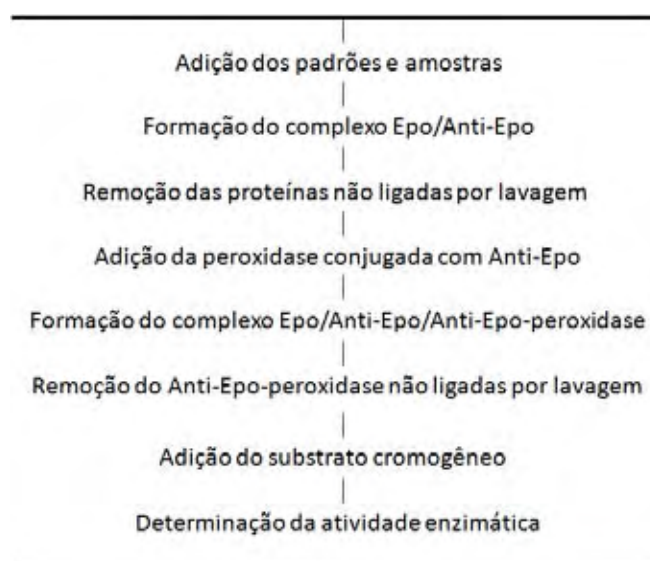


Figura 12: Representação esquemática do princípio do teste de ELISA para detecção de Epo.

Procedimento

1. Manter os reagentes em temperatura ambiente antes do uso.
2. Pipetar 100 µL de Diluente de Ensaio Epo para cada poço.
3. Adicionar 100 µL de padrões, controles e amostra por poço correspondente. Mexer levemente a microplaca durante cerca de 1 minuto para misturar o conteúdo dos poços.

Cobrir a microplaca com a película fornecida e incubar durante 2 horas \pm 5 à temperatura ambiente.

4. Aspirar o conteúdo de cada poço. Secar invertendo a microplaca sobre toalhas de papel. Não lavar.
5. Adicionar 200 μ L de Conjugado Epo a cada poço. Cobrir a placa com uma nova película adesiva e incubar durante 2 horas \pm 5 à temperatura ambiente.
6. Aspirar cada poço e lavar, repetindo o processo três vezes, num total de 4 lavagens. A lavagem efetua-se enchendo cada poço com Tampão de Lavagem (400 μ L), usando pipetador automático. A remoção completa do líquido, em cada passo, é essencial para um bom desempenho. Após a última lavagem, remover qualquer vestígio de Tampão de Lavagem por aspiração, ou invertendo a placa de encontro a uma toalha de papel.
7. Adicionar 200 μ L de Solução Substrato a cada poço (Nota: a Solução Substrato deve ser utilizada no prazo de 15 minutos após preparação). Incubar durante 20-25 minutos à temperatura ambiente (20-25° C) na bancada.
8. Adicionar 100 μ L de Solução de Parada a cada poço. Se a mudança da cor não parecer uniforme, agitar a placa com cuidado para assegurar uma boa mistura.
9. Determinar a densidade óptica (D.O.) de cada poço no prazo de 15 minutos, utilizando um espectrofotômetro regulado a 450 nm. Se a correção do comprimento de onda estiver disponível, regular a 600 nm. Se a correção do comprimento de onda não estiver disponível, subtrair as leituras a 600 nm das leituras a 450 nm. Esta subtração corrigirá as imperfeições ópticas da microplaca de poliestireno. As leituras efetuadas diretamente a 450 nm sem correção poderão ser mais elevadas e menos precisas.

Os níveis normais de Epo fornecidos pelo kit (*R&D Systems*) é de 3,1-14,9 mU/mL.

- *Protocolo de ELISA para detectar HEMOPEXINA HUMANA (Gen Way)*

Princípio

O kit para detecção de Hemopexina (Hpx) é um Ensaio Imunoenzimático (ELISA) altamente sensível para medir Hpx no plasma humano. A figura 13 ilustra o princípio.

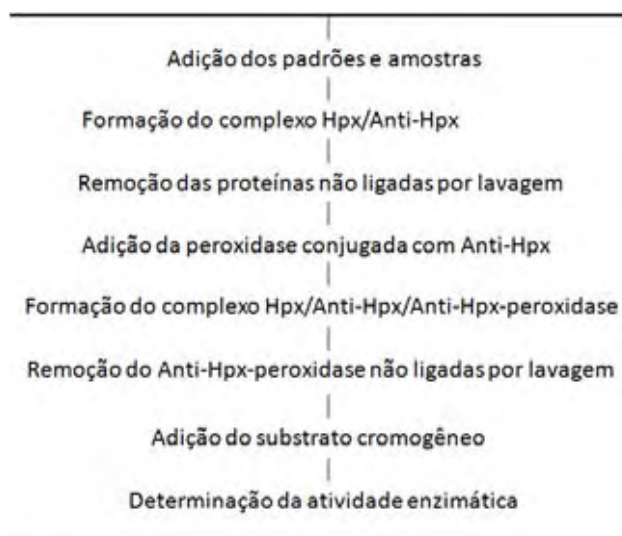


Figura 13. Representação esquemática do princípio do teste de ELISA para detecção de Hpx.

Procedimento

1. Manter os reagentes em temperatura ambiente antes do uso.
2. Pipetar 100 μL de:
 - Padrão 0 (0,0 ng/mL) em duplicata
 - Padrão 1 (6,25 ng/mL) em duplicata
 - Padrão 2 (12,5 ng/mL) em duplicata
 - Padrão 3 (25 ng/mL) em duplicata
 - Padrão 4 (50 ng/mL) em duplicata
 - Padrão 5 (100 ng/mL) em duplicata
 - Padrão 6 (200 ng/mL) em duplicata
3. Pipetar 100 μL de amostra em cada poço pré-destinado.
4. Incubar a microplaca em temperatura ambiente (22°C) por trinta minutos (30 ± 2). Manter a placa coberta e em nível durante a incubação.
5. Após a incubação, aspirar o conteúdo dos poços.
6. Completar cada poço com solução de lavagem e aspirar. Repetir três vezes, com um total de quatro lavagens.
7. Pipetar 100 μL de conjugado de enzima-anticorpo, diluída, em cada poço. Incubar em temperatura ambiente por trinta minutos. Manter a placa coberta e em nível durante a incubação em local escuro.
8. Repetir as etapas 5 e 6.

9. Pipetar 100 μL de solução substrato cromogênico de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço.
10. Incubar, em local escuro e temperatura ambiente, por dez minutos precisos.
11. Depois, adicionar 100 μL de solução de parada em cada poço.
12. Determinar a absorbância (450 nm) em até 2 horas após a adição da solução de parada. Mas é recomendado medir logo após o termino da reação.

O kit utilizado não forneceu os valores de Hpx para indivíduos normais. Por este motivo, o nível normal utilizado, de 800-1000 ng/mL, foi retirado do kit fornecido pela *New Scientific Company*.

- *Protocolo de ELISA para detectar HAPTOGLOBINA HUMANA (Gen Way)*

Princípio

O kit para detecção de Haptoglobina (Hp) é um Ensaio Imunoenzimático (ELISA) altamente sensível para medir Hp no plasma humano. A figura 14 ilustra o princípio.

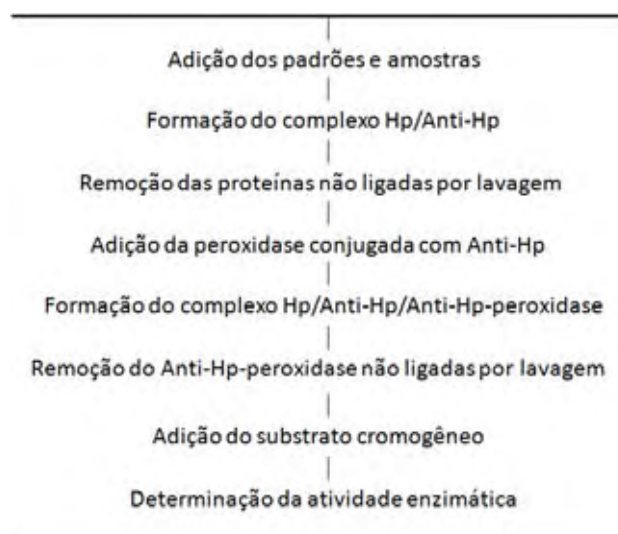


Figura 14. Representação esquemática do princípio do teste de ELISA para detecção de Hp.

Procedimento

1. Manter os reagentes em temperatura ambiente antes do uso.
2. Pipetar 100 μL de:
Padrão 0 (0,0 ng/mL) em duplicata

- Padrão 1 (3,125 ng/mL) em duplicata
Padrão 2 (6,25 ng/mL) em duplicata
Padrão 3 (12,5 ng/mL) em duplicata
Padrão 4 (25 ng/mL) em duplicata
Padrão 5 (50 ng/mL) em duplicata
Padrão 6 (100 ng/mL) em duplicata
Padrão 7 (200 ng/mL) em duplicata
3. Pipetar 100 μ L de amostra em cada poço pré-destinado.
 4. Incubar a microplaca em temperatura ambiente (22°C) por quinze minutos (15 ± 2). Manter a placa coberta e em nível durante a incubação.
 5. Após a incubação, aspirar o conteúdo dos poços.
 6. Completar cada poço com solução de lavagem e aspirar. Repetir três vezes, com um total de quatro lavagens.
 7. Pipetar 100 μ L de conjugado de enzima-anticorpo, diluída, em cada poço. Incubar em temperatura ambiente por quinze minutos. Manter a placa coberta e em nível durante a incubação em local escuro.
 8. Repetir as etapas 5 e 6.
 9. Pipetar 100 μ L de solução substrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço.
 10. Incubar, em local escuro e temperatura ambiente, por cinco minutos precisos.
 11. Depois, adicionar 100 μ L de solução de parada em cada poço.
 12. Determinar a absorbância (450 nm) em até 2 horas após a adição da solução de parada. Mas é recomendado medir logo após o término a reação.

O kit utilizado não forneceu os valores de Hp para indivíduos normais. Por este motivo, o nível normal utilizado, de 360-1950 ng/mL, foi retirado do trabalho de Gupta e colaboradores, 2011.

3.3 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* Statistica 9.0 (Statsoft Inc.). Os dados foram testados quanto distribuição normal utilizando o teste Shapiro Wilk e, também quanto a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. As médias entre os grupos foram comparadas pelo teste t ou ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey para dados paramétricos. Para dados não paramétricos, as medianas foram

comparadas por meio do teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn. Para avaliar o grau de associação entre as variáveis estudadas, utilizamos a correlação de Pearson. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4.Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Influência do haplótipo Bantu sobre os níveis de Hb F

A média de Hb F no grupo amostral foi de 12,1% com desvio padrão de 7,27%. Para verificarmos os valores de Hb F entre os indivíduos sem e com haplótipo Bantu, comparamos os níveis desta Hb entre os subgrupos amostrais. A análise estatística revelou que não houve diferença significativa ($p=0,55$) como ilustra a tabela 13.

Tabela 13. Comparação entre níveis de Hb F nos subgrupos amostrais com uso de HU

Subgrupos amostrais	Hb F (%) Média ± DP (Mín – Máx)	Média total Hb F (%) Média ± DP
Bantu/Bantu n = 25	10,93 ± 6,32 (0,7 – 22,9)	
Bantu/_ n = 26	13,05 ± 6,85 (3,0 – 27,4)	12,1 ± 7,27
/ n = 16	12,4 ± 9,31 (1,6 – 28,4)	
Valor de p	0,55	

A comparação foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis. DP: desvio padrão; _: qualquer haplótipo beta-S exceto o Bantu.

Estratificamos os níveis de Hb F e agrupamos os indivíduos em cada nível segundo o haplótipo para verificar em que subfenótipos os maiores valores eram encontrados (Tabela 14).

O valor abaixo de 1% de Hb F foi observado em um paciente com haplótipo Bantu/Bantu. Valores de Hb F acima de 10% foram observados em 58,21% dos pacientes e os valores abaixo ou iguais a 10% foram observados em 41,8% dos pacientes. Os níveis acima de 20,1% de Hb F foram representados por 16,43% dos pacientes, sendo mais frequente nos heterozigotos para Bantu (seis indivíduos).

Tabela 14. Distribuição da concentração de Hb F nos subgrupos amostrais.

Subgrupos amostrais						
Quantidade de Hb F (%)	Média de Hb F (%) (Mín-Máx)	Bantu/Bantu (n=25)	Bantu/_ (n=26)	_/_ (n=16)	Média Hb F (%)±DP (valor de p)	TOTAL (n=67)
0 - 1,0	0,7	1	0	0		1 (1,49%)
1,1 - 5,0	3,32 (1,6 - 5,0)	5	4	5	5,19 ± 2,64 (p=0,21)*	14 (20,9%)
5,1 - 10,0	7,55 (5,7 - 10,0)	4	6	3		13 (19,4%)
10,1 - 15,0	12,52 (10,1 - 14,8)	9	7	2		18 (26,88%)
15,1 - 20,0	17,96 (15,1 - 19,8)	5	3	2	17,06 ± 5,14 (p=0,14)*	10 (14,9%)
≥ 20,1	23,7 (20,2 - 28,4)	1	6	4		11 (16,43%)
TOTAL	11,8 (0,7 - 28,4)	25	26	16		67

*Comparação ANOVA um critério (Min-Máx): mínimo e máximo; Hb F: hemoglobina fetal; DP: desvio padrão; _: qualquer haplótipo beta-S exceto o Bantu; n= número amostral.

Mesmo sem associação significativa entre a presença do haplótipo Bantu e os níveis de Hb F, os indivíduos do subgrupo heterozigoto (Bantu/_) se destacaram por apresentar valores de Hb F acima de 20,1%. Como este subgrupo é composto por haplótipos distintos, buscamos saber qual seria o haplótipo desconhecido mais frequente e se este poderia influenciar na concentração de Hb F. O haplótipo mais frequente neste subgrupo foi o Benin presente em 20 (76,9%) pacientes, e o restante, seis pacientes (23,1%) apresentaram haplótipos atípicos. Nos seis pacientes com Hb F acima de 20,1%, o Benin estava presente em cinco pacientes e o Atípico 1 em um paciente, como ilustra a tabela 15.

Tabela 15. Haplótipos do subgrupo Bantu/_ e níveis de Hb F

Haplótipos β^S/β^S	Subgrupo Amostral	Pacientes com Hb F ≥ 20,1%
	Média Hb F (%) ± DP (Mín-Máx) n=()	Média Hb F (%)±DP (Mín-Máx) n=()
Bantu/Benin	13,65 ± 7,27 (3,0-27,4) n= 20	22,78 ± 2,78 (20,2-27,4) n=5
Bantu/Atípico 1	12,76 ± 6,6 (8,0-20,30) n=3	20,3 n=1
Bantu/Atípico 4	11,0 n=1	
Bantu/Atípico 5	4,7 n=1	
Bantu/Atípico 6	12,5 n=1	
Valor de p	0,43 [#]	

DP: desvio padrão; Min-Máx: mínimo e máximo; n: número amostral. [#]Mann-Whitney comparando Bantu/Benin e Bantu/Atípicos.

Foi realizada análise estatística para verificar qual dessas combinações de haplótipos, Bantu/Benin ou Bantu/Atípicos, apresentariam maiores níveis de Hb F. A média de Hb F e o desvio padrão para Bantu/Benin foi de $13,65 \pm 7,27$ % e para o grupo Bantu/Atípico foi de $11,08 \pm 5,26$ %. (Mann-Whitney: $p=0,43$).

4.2 Valores séricos de glicoproteínas plasmáticas e comparação entre os subgrupos

Para verificar a hemólise e a requisição para a formação de eritrócitos, algumas glicoproteínas plasmáticas foram avaliadas: Hp, Hpx e Epo. Os valores séricos encontrados para todos os pacientes foram confrontados com valores de referência. Para a Epo o valor de referência (3,1-14,9 mU/mL) foi fornecido pelo kit de ELISA (*R&D Systems*); o valor referenciado (360,0-1950,0 ng/mL) para Hp foi obtido no trabalho de Gupta e colaboradores (2011) e o valor para Hpx (800,0-1000,0 ng/mL) foi fornecido pelo kit de ELISA (*New Scientific*). Não foi informado, para nenhum dos valores de referência, o tipo de população em que estes marcadores foram avaliados.

Quando comparados com os valores médios de referência, a avaliação de Epo sérica mostrou cerca de 110 vezes a mais que os valores de normalidade. Os níveis de Hp do grupo amostral estão de acordo com os valores normais, com média de 680,0 ng/mL e os níveis de Hpx foram aproximadamente duas vezes maiores que a média da normalidade com 1878,7 ng/mL. A tabela 16 detalha os resultados obtidos nos ensaios bioquímicos com os pacientes avaliados.

Tabela 16. Valores médios de Epo, Hp e Hpx do grupo amostral em relação aos valores de referência

Glicoproteínas Plasmáticas	Média ± DP (mínimo-máximo)	Valores de referência (valores médios)
Epo (mU/mL)	1000,7 ± 676,0 (0,0-4490,0)	3,1-14,9 (9,0)
Hp (ng/mL)	680,0 ± 33,7 (590,7-810,7)	360,0-1950,0 (1155,0)
Hpx (ng/mL)	1878,7 ± 324,0 (1317,3-2859,3)	800,0-1000,0 (900,0)

DP: desvio padrão. (mU/mL) mili unidades por mililitros; (ng/mL) nanogramas por mililitros. Epo: eritropoetina; Hp: haptoglobina; Hpx: hemopexina.

Antes das comparações entre os subgrupos amostrais, fizemos a separação por gênero, pois os níveis de Epo podem variar entre estes indivíduos (JELKMANN, 2011) e a análise estatística não mostrou diferença significativa (Tabela 17).

Na avaliação por subgrupos não houve diferença entre as glicoproteínas plasmáticas (Tabela 18).

Tabela 17. Concentrações de glicoproteínas plasmáticas entre mulheres e homens dos subgrupos amostrais

Bantu/Bantu			
	Feminino	Masculino	Valor de p
	Média ± DP (Mín-Máx)	Média ± DP (Mín-Máx)	
Epo (mU/mL)	822,2 ± 508,8 (0,0-1846,0)	1657,72 ± 1412,6 (578,1-4490,9)	0,1 [#]
Hp (ng/mL)	666,27 ± 47,29 (590,7-810,7)	690,0 ± 44,3 (630,9-739,6)	0,19 [#]
Hpx (ng/mL)	1810,0 ± 279,0 (1356,6-2362,0)	2085,55 ± 373,25 (1831,3-2830,0)	0,16 [#]
Bantu/_			
	Feminino	Masculino	Valor de p
	Média ± DP (Mín-Máx)	Média ± DP (Mín-Máx)	
Epo (mU/mL)	906,01 ± 452,82 (408,1-1996,3)	1036,28 ± 761,86 (133,6-3003,6)	0,82 [#]
Hp (ng/mL)	676,28 ± 23,69 (625,4-708,6)	692,35 ± 25,06 (651,0-724,0)	0,09 [#]
Hpx (ng/mL)	1951,69 ± 375,9 (1458,6-2792,0)	1822,0 ± 281,9 (1317,3-2285,3)	0,62 [#]
/			
	Feminino	Masculino	Valor de p
	Média ± DP (Mín-Máx)	Média ± DP (Mín-Máx)	
Epo (mU/mL)	839,54 ± 482,84 (280,9-1688,1)	959,09 ± 458,39 (573,6-1870,9)	0,81 [#]
Hp (ng/mL)	679,5 ± 16,7 (654,5-699,0)	687,7 ± 23,4 (658,4-716,6)	0,48 [*]
Hpx (ng/mL)	1781,0 ± 184,3 (1565,3-2006,6)	1900,5 ± 412,82 (1520,0-2859,0)	0,89 [#]

*Teste t. [#] Teste Mann-Whitney. DP: desvio padrão. (Mín-Máx): mínimo e máximo. (mU/mL) mili unidades por mililitros; (ng/mL) nanogramas por mililitros. _: qualquer haplótipo beta-S exceto o Bantu. Epo: eritropoetina; Hp: haptoglobina; Hpx: hemopexina.

Tabela 18. Comparação das concentrações das glicoproteínas plasmáticas entre os subgrupos amostrais

Glicoproteínas	Subgrupos amostrais			Valor de p
	Bantu/Bantu	Bantu/_	_/_	
	Média ± DP (Mín-Máx)	Média ± DP (Mín-Máx)	Média ± DP (Mín-Máx)	
Epo (mU/mL)	1101,94 ± 885,01 (0,0-4490,9)	968,54 ± 610,71 (133,6-3003,6)	911,27 ± 454,98 (280,9-1870,9)	0,40 [#]
Hp (ng/mL)	672,76 ± 46,73 (590,7-810,7)	684,0 ± 25,2 (625,4-724,1)	684,2 ± 20,5 (654,5-716,6)	0,15 [#]
Hpx (ng/mL)	1885,3 ± 323,5 (1356,6-2830,0)	1889,52 ± 333,88 (1317,0-2792,6)	1849,28 ± 329,54 (1520,0-2859,3)	0,47 [#]

[#]Teste Kruskal-Wallis. DP: desvio padrão. (Mín-Máx): mínimo e máximo. (mU/mL) mili unidades por mililitros; (ng/mL) nanogramas por mililitros. _: qualquer haplótipo beta-S exceto o Bantu. Epo: eritropoetina; Hp: haptoglobina; Hpx: hemopexina.

4.3 Parâmetros Hematológicos e associação com os níveis de Epo, Hp e Hpx

A associação de índices hematimétricos, eritrogênicos e marcadores de hemólise foi avaliada para inferir a requisição medular para a produção de eritrócitos. Para a comparação dos índices hematológicos, os subgrupos foram divididos por gênero, pois é sabido que alguns destes índices diferem entre mulheres (♀) e homens (♂).

Em relação aos valores de referência, o grupo amostral apresentou quase todos os parâmetros alterados, por se tratarem de portadores da AF que apresentam anemia hemolítica grave. Os únicos parâmetros que não diferiram dos valores normais foram o VCM, a HCM e a CHCM (Tabela 19).

Para entender melhor a hemólise, comparamos alguns parâmetros hematológicos, que possuem relação com o processo hemolítico e a requisição medular (GV, Hb, Ht e reticulócitos absoluto), por correlação com os níveis de Epo, Hp e Hpx. As análises de associação no grupo amostral não apresentaram diferença significativa (Tabela 20).

Posteriormente, fizemos a correlação das glicoproteínas plasmáticas com os parâmetros hematológicos em cada subgrupo amostral, a fim de verificar se a presença do haplótipo Bantu interferiria na associação dos marcadores avaliados. No subgrupo Bantu/Bantu, não houve correlação significativa. No subgrupo Bantu/_ apresentou correlação negativa significativa entre Hpx e reticulócitos absoluto ($r = -0,43$; $p = 0,02$) e o subgrupo _/_ apresentou correlação negativa significativa entre Epo e GV ($r = -0,63$; $p = 0,011$) (Tabela 21 e Figura 15).

Tabela 19. Parâmetros hematimétricos e eritrogênicos no grupo amostral

Parâmetros hematimétricos e eritrogênicos	Subgrupos Amostrais				Média Total (n = 67)	Valor de p	Valores de Referência
	Bantu/Bantu (n = 25)	Bantu/_ (n = 26)	_/_ (n = 16)	Média ± DP			
GV (10⁹/L)	♀	2,22 ± 0,56	2,42 ± 0,43	2,54 ± 0,64	2,35 ± 0,53	0,35*	4 – 5,2
	♂	2,48 ± 0,07	2,24 ± 0,35	2,38 ± 0,40	2,37 ± 0,5	0,65*	4,5 – 5,9
Hb (g/dL)	♀	7,63 ± 1,2	8,55 ± 1,54	8,74 ± 1,9	8,1 ± 1,51	0,13*	12 – 16,0
	♂	8,98 ± 1,25	8,57 ± 1,14	8,00 ± 0,85	8,5 ± 1,12	0,19*	13,5 – 17,5
Ht (%)	♀	21,61 ± 3,66	24,02 ± 4,4	24,5 ± 5,54	23,03 ± 4,4	0,19*	36,0 – 46,0
	♂	25,26 ± 3,84	23,96 ± 3,3	22,73 ± 2,7	23,93 ± 3,31	0,30*	41,0 – 53,0
VCM (fl)	♀-♂	99,46 ± 19,76	100,7 ± 13,3	97,4 ± 13,7	99,45 ± 15,93	0,81*	80,0 – 100,0
HCM (pg)	♀-♂	36,4 ± 6,0	35,96 ± 5,36	34,6 ± 5,4	35,8 ± 5,6	0,60*	26,0 – 34,0
CHCM (%)	♀-♂	35,5 ± 1,34	35,55 ± 1,14	35,4 ± 1,08	35,5 ± 1,2	0,93*	31,0 – 37,0
Reticulócitos (%)	♀	8,87 ± 4,45	9,04 ± 3,80	7,18 ± 3,6	9,0 ± 4,43	0,61 [#]	1,06 – 2,63
	♂	7,31 ± 1,62	8,08 ± 2,69	10,16 ± 2,65	8,50 ± 2,58	0,07*	0,87 – 2,6
Reticulócitos (K/ μL)	♀-♂	195,2 ± 73,24	206,99 ± 79,49	215,30 ± 93,77	204,57 ± 80,03	0,72*	< 150,0

[#] Kruskal-Wallis. *ANOVA um critério. DP: desvio padrão. _: qualquer haplótipo β^S exceto o Bantu; ♀: Mulher, ♂: Homem; (10⁹/L) um bilhão por litro; (g/dL) gramas por decilitros; (%) porcentagem; (fl) femtolitros; (pg) picogramas; (K/ μL) mil por microlitros.

Tabela 20. Associação entre os níveis hematológicos e glicoproteínas plasmáticas

Parâmetros hematológicos	Glicoproteínas plasmáticas		
	Epo (mU/mL) [r (p)]	Hp (ng/mL) [r (p)]	Hpx (ng/mL) [r (p)]
GV (10⁹/L)	- 0,38 (0,76)	- 0,06 (0,60)	- 0,02 (0,82)
Hb (g/dL)	- 0,014 (0,91)	0,003 (0,97)	- 0,10 (0,40)
Ht (%)	- 0,02 (0,83)	- 0,02 (0,85)	- 0,11 (0,36)
Reticulócitos absoluto (K/μL)	- 0,002 (0,98)	-0,012 (0,92)	0,21 (0,09)

(mU/mL) mili unidades por mililitros; (ng/mL) nanogramas por mililitros; (10⁹/L) um bilhão por litro; (g/dL) gramas por decilitros; (%) porcentagem; (K/ μL) mil por microlitros. r: Coeficiente de Correlação de Pearson. Epo: eritropoetina; Hp: haptoglobina; Hpx: hemopexina.

Tabela 21. Associação entre glicoproteínas plasmáticas e parâmetros hematológicos dos subgrupos amostrais

Bantu/Bantu			
Parâmetros hematológicos	Glicoproteínas plasmáticas		
	Epo (mU/mL) [r (p)]	Hp (ng/mL) [r (p)]	Hpx (ng/mL) [r (p)]
GV (10⁹/L)	0,16 (0,46)	- 0,18 (0,41)	- 0,15 (0,49)
Hb (g/dL)	0,15 (0,50)	- 0,13 (0,55)	- 0,29 (0,18)
Ht (%)	0,11 (0,62)	- 0,16 (0,45)	- 0,27 (0,22)
Reticulócitos absoluto (K/μL)	- 0,05 (0,80)	- 0,11 (0,61)	0,17 (0,44)
Bantu/_			
Parâmetros hematológicos	Glicoproteínas plasmáticas		
	Epo (mU/mL) [r (p)]	Hp (ng/mL) [r (p)]	Hpx (ng/mL) [r (p)]
GV (10⁹/L)	- 0,13 (0,52)	- 0,14 (0,49)	- 0,34 (0,09)
Hb (g/dL)	- 0,02 (0,88)	- 0,13 (0,52)	0,04 (0,82)
Ht (%)	- 0,05 (0,80)	- 0,13 (0,51)	- 0,04 (0,84)
Reticulócitos absoluto (K/μL)	- 0,27 (0,17)	- 0,39 (0,051)	- 0,43 (0,02) *
/			
Parâmetros hematológicos	Glicoproteínas plasmáticas		
	Epo (mU/mL) [r (p)]	Hp (ng/mL) [r (p)]	Hpx (ng/mL) [r (p)]
GV (10⁹/L)	- 0,63 (0,01) *	- 0,05 (0,86)	0,08 (0,76)
Hb (g/dL)	- 0,32 (0,23)	- 0,20 (0,48)	0,39 (0,15)
Ht (%)	- 0,39 (0,14)	- 0,24 (0,40)	0,39 (0,17)
Reticulócitos absoluto (K/μL)	- 0,28 (0,30)	0,24 (0,40)	0,005 (0,74)

(mU/mL) mili unidades por mililitros; (ng/mL) nanogramas por mililitros; (10⁹/L) um bilhão por litro; (g/dL) gramas por decilitros; (%) porcentagem; (K/ μL) mil por microlitros. _: qualquer haplótipo beta-S exceto o Bantu. *Associação entre os marcadores. r: Coeficiente de Correlação de Pearson. Epo: eritropoetina; Hp: haptoglobina; Hpx: hemopexina.

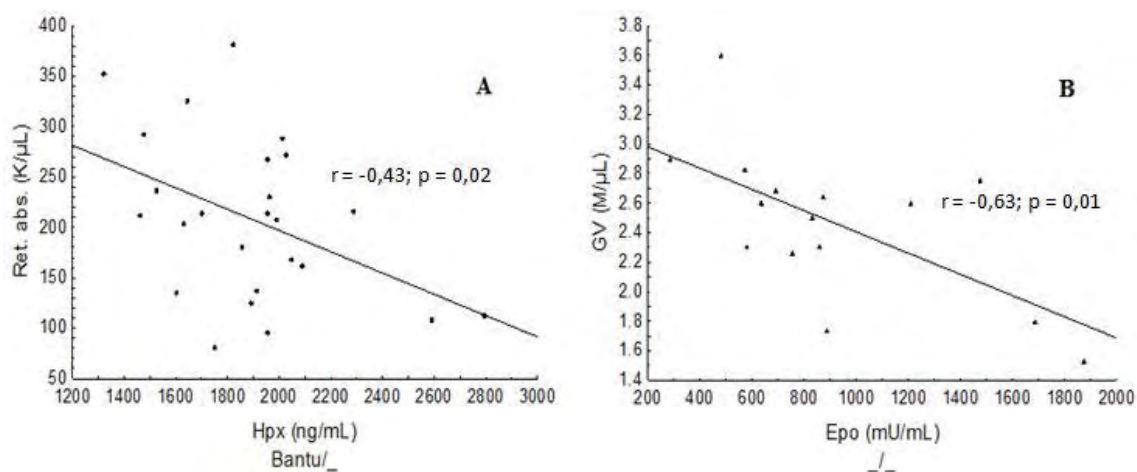


Figura 15. Associação entre glicoproteínas plasmáticas e parâmetros hematimétricos nos subgrupos amostrais. **A.** Correlação linear negativa de 43% entre níveis de Hpx e quantidade de reticulócitos absoluto no subgrupo heterozigoto para o haplótipo Bantu. **B.** Correlação linear negativa de 63% entre níveis de Epo e quantidade de glóbulos vermelhos no subgrupo sem haplótipo Bantu. (ng/mL) nanogramas por mililitros; (mU/mL) mili unidades por mililitros. _: qualquer haplótipo beta-S exceto o Bantu. Correlação por Pearson.

4.4 Níveis de peroxidação lipídica e associação com Hp, Hpx, Epo e Hb F

Os níveis de peroxidação lipídica do grupo amostral foram cerca de seis vezes maiores quando confrontados com valores encontrados em indivíduos sem hemoglobinopatias (0 a 400 ng/mL aproximadamente) (SHIMAUTI et al., 2010; SILVA et al., 2011; TORRES, et al. 2012).

A fim de verificar se o haplótipo Bantu influenciaria os níveis de TBARS, foi realizada uma comparação entre os subgrupos amostrais. O resultado não mostrou diferença estatística ($p=0,09$) (Figura 16).

Os níveis de Epo, Hp, Hpx e Hb F foram relacionados com os níveis de TBARS no grupo amostral como um todo e em cada subgrupo amostral. Os resultados mostraram que não houve correlação significativa (Tabela 22).

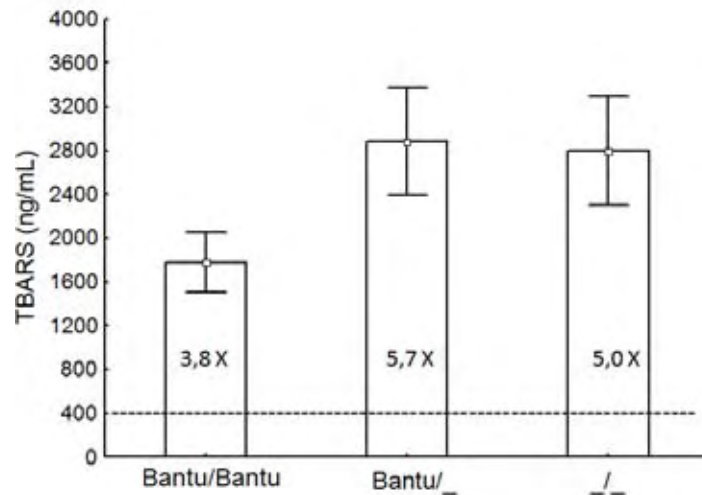


Figura 16. Relação entre a peroxidação lipídica e os subgrupos amostrais. Os níveis de peroxidação lipídica não diferiu estatisticamente entre os subgrupos amostrais ($p=0,09$; teste de Kruskal-Wallis). Linha pontilhada indica valores de referência (0-400 ng/mL). O subgrupo Bantu/Bantu apresentou níveis 3,8 vezes a mais que o valor de referência, Bantu/_ apresentou 5,7 vezes a mais e _/_ apresentou 5 vezes a mais.

Tabela 22. Correlação entre marcador de peroxidação lipídica, e glicoproteínas plasmáticas e Hb F

		Glicoproteínas Plasmáticas			
Grupo Amostral		Epo [r(p)]	Hp [r(p)]	Hpx [r(p)]	Hb F [r(p)]
TBARS (ng/mL)	Total	-0,17 (0,17)	0,03 (0,77)	0,05 (0,67)	-0,06 (0,62)
	Bantu/Bantu	-0,13 (0,56)	-0,12 (0,58)	-0,14 (0,53)	-0,22 (0,28)
	Bantu/_	-0,24 (0,22)	-0,04 (0,83)	-0,13 (0,52)	-0,24 (0,23)
	/	-0,03 (0,89)	0,13 (0,64)	0,13 (0,64)	0,20 (0,45)

_: qualquer haplótipo beta-S exceto o Bantu. (ng/mL) nanogramas por mililitros. r: Coeficiente de Correlação de Pearson. Epo: eritropoetina; Hp: haptoglobina; Hpx: hemopexina.

5. Discussão

5 DISCUSSÃO

Muitos subfenótipos clínicos da AF são modulados por polimorfismos genéticos e fatores ambientais. Os polimorfismos genéticos são úteis como prognóstico podendo orientar a terapia individual a estes pacientes e prever riscos (STEINBERG; SEBASTIANI, 2012). Altos níveis de Hb F amenizam manifestações clínicas advindas da AF por interferir na formação de polímeros de Hb S, e consequentemente, na vaso-oclusão e hemólise (AKINSHEYE et al., 2011). Uma das ações da HU é aumentar a produção de Hb F, por isso, este medicamento é recomendado para indivíduos com AF e esse parâmetro é um dos indicativos de resposta positiva ao uso da medicação (WARE; AYGUN, 2009).

Desde muitos anos é sabido que os haplótipos da globina β^S modulam a concentração de Hb F nos pacientes com AF (NAGEL, 1984), sendo que os pacientes com haplótipo Bantu apresentam os menores níveis de Hb F (5%) quando sem tratamento, o Benin com níveis intermediários entre 5-10% e Senegal e Saudi acima de 10% de Hb F. Isto se deve aos dois últimos haplótipos apresentarem o polimorfismo *XmnI*, substituição de uma C→T na posição - 158 no gene γ^G (HBG2) que reconhecidamente influencia a produção de Hb F (GARNER et al., 2000). No Brasil indivíduos com AF do Ceará possuem níveis de Hb F semelhantes aos citados, sendo Bantu com média de 6,2%, Benin com 8,6% e Senegal com 13,4% (NETO et al., 2005). Altos níveis de Hb F (12,1%) em nosso grupo de estudo, como esperado, confirmam o efeito farmacológico do medicamento, pois todos os pacientes estavam sob uso de HU por mais de 300 dias. Porém foi verificado que 41,8% dos pacientes apresentaram média de Hb F abaixo de 10%.

Apesar de ser o haplótipo que apresenta maior gravidade clínica, esperava-se que os indivíduos com Bantu responderiam com valores elevados de Hb F quando em tratamento com HU (VICARI et al., 2005; SILVA, 2011). No entanto o subgrupo Bantu/Bantu foi o que apresentou um decréscimo na média de Hb F. Considerando que os pacientes que apresentaram valores médios de Hb F mais altos foram os portadores do haplótipo Bantu/_, e que o outro haplótipo associado em maior frequência foi o Benin, inferimos que a associação de outros haplótipos beta-S com Bantu parece exercer influência sobre os valores de Hb F. Gonçalves e colaboradores (2003) encontraram valores médios de Hb F menores que os obtidos nesse estudo, em indivíduos com os mesmos haplótipos (Bantu/Benin: 8,14% de Hb F e Bantu/Atípicos: 4,18% de Hb F), porém sem uso de HU e oriundos da Bahia. Uma explicação possível para essas variações reside em alterações

genéticas nas regiões promotoras do gene da gama glicina e alanina (HBG2 e HBG1), responsáveis pela produção da Hb F. Estas alterações podem ser polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) ou mutação deletional com perda de alguns pares de bases. Além disso, alguns destes polimorfismos são específicos para o haplótipo Bantu e outros para o Benin (BARBOSA et al., 2010). Assim, podemos inferir que a interação do haplótipo Benin com o Bantu parece modular positivamente a produção de Hb F nos pacientes avaliados.

Com relação aos haplótipos atípicos, a literatura é divergente quanto a sua classificação. O agrupamento de sítios de restrição enzimáticos, aqui utilizados, classificaram os atípicos em dez padrões diferentes, sendo o Atípico 1 o mais frequente. Essa divergência de haplótipos atípicos pode ser considerada uma característica da população brasileira e merece ser melhor estudada. Os pacientes que respondem melhor ao uso de HU só poderão ser avaliados quanto à influência desses haplótipos em estudos longitudinais.

Além do tratamento, que melhora a fisiopatologia da doença, o organismo responde sintetizando glicoproteínas plasmáticas as quais amenizam o desequilíbrio gerado pela hemólise, estabelecendo um controle oxidativo gerado pela Hb livre (SCHAER; ALAYASH, 2010; LEVY et al., 2010). A Hp e Hpx são depletoras de Hb e grupo heme livres, respectivamente, e são utilizadas como marcadores de hemólise intravascular para doenças hemolíticas (DELANGHE; LANGLOIS, 2001; KÖRMÖCZI et al., 2006; HEILMANN et al.; 2009; GUPTA et al., 2011). A Hb livre no plasma é dissociada em dímeros ($\alpha\beta$) e cada dímero forma complexo com um monômero de Hp o qual é recuperado pelo receptor CD163 nos macrófagos reticuloendoteliais (NAGEL; GIBSON, 1971; KATO, 2009; SCHAER; ALAYASH, 2010). A meia-vida da Hp no plasma é de aproximadamente cinco dias, e do complexo Hb/Hp de menos de dez minutos (DELANGHE; LANGLOIS, 2001; FREEMAN, 1964 apud LEVY et al., 2010). Portanto, após hemólise, os níveis desta glicoproteína estarão diminuídos. Quando a ação da Hp é excedida pela Hb livre, a Hpx forma um complexo com o grupo heme. A meia-vida da Hpx no plasma é de sete dias e do complexo Heme/Hpx é de aproximadamente sete horas. O complexo formado é recuperado por receptores CD91 nos macrófagos reticuloendoteliais (DELANGHE; LANGLOIS, 2001; KATO, 2009; SCHAER; ALAYASH, 2010).

Nos pacientes com AF, que tem como característica a hemólise crônica, os níveis de Hp são reduzidos em relação aos indivíduos normais (BOURANTAS et al., 1998). Brown e colaboradores (2011) avaliaram os níveis de Hp em pacientes com AF que faziam ou não uso de HU, comparados com um grupo controle. Observaram que os indivíduos com AF, em geral, apresentaram concentração de Hp extremamente baixas (2,31 mg/mL) quando comparadas com o grupo controle (45,58 mg/mL) ($p=0,01$). Porém os níveis de Hp entre os pacientes com AF em uso e não de HU foram semelhantes. Resultado parecido foi encontrado por Moller e colaboradores (2011) em um grupo de crianças com DF. No presente trabalho, os níveis de Hp mostraram-se na faixa de normalidade de acordo com os valores de referência. Uma explicação para esse fato reside no consumo da Hp, sendo sua produção equilibrada, pois é uma proteína de fase aguda, com síntese rápida e em resposta à Hb livre (IMRIE et al., 2006). Os níveis de Hpx apresentaram-se elevados em relação ao valor de referência, o que segundo Delanghe e Langlois (2001) é raro, pois diferente da Hp, a Hpx não é verdadeiramente uma proteína de fase aguda, o que permite aumentar moderadamente sua concentração. Uma possível explicação para os níveis aumentados seria o retorno da Hpx para o plasma após sua ação efetiva (DOBRYSYCKA, 1997). Como os pacientes com AF recebem transfusão sanguínea ao longo da vida, levando a uma sobrecarga de ferro com consequente liberação de grupos heme, a Hpx pode ser requisitada para manter esses níveis equilibrados.

Para avaliar a requisição medular na síntese de eritrócitos em resposta a hemólise, os níveis de Epo foram quantificados. Por se tratarem de pacientes com anemia hemolítica crônica, já era esperado que os níveis desta glicoproteína estivessem aumentados, porém, observamos aumento de mais de 110 vezes o valor de referência. Se o uso de HU auxilia na diminuição da requisição medular por controlar a hemólise, esses valores não deveriam, teoricamente, estar tão aumentados. Quanto aos pacientes com haplótipo Bantu/Bantu, mais graves, observamos também o aumento da Epo. Esse aumento, observado em pacientes em uso de HU, pode sugerir a influência de outros fatores sob a ação da Epo e da resposta ao uso desse medicamento. A produção de Epo pode ser aumentada pela ação da angiotensina II (Ang II), uma molécula que atua no sistema renina-angiotensina aldosterona (VLAHAKOS, 2010), que tem a síntese aumentada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (SAYED-TABATABAEI et al., 2006). O polimorfismo de inserção (I) ou deleção (D) de 287 pb no intron 16 do gene da ECA (17q23.3) modulam a quantidade desta proteína, produzindo consequentemente a Ang II, sendo a presença do

alelo D o responsável pelo aumento de ECA (ABCHEE et al., 2010). Os dados na literatura são escassos com relação a esses parâmetros e AF, e nosso estudo mostrou que os marcadores de hemólise e requisição medular responderam igualmente nos pacientes, independentes dos haplótipos.

Outro parâmetro utilizado para avaliar a saúde e a resposta ao tratamento foi a análise dos índices hematológicos. O eritrograma dos pacientes avaliados se apresentou alterado devido à doença, como esperado em uma anemia hemolítica crônica. O VCM refletiu o uso de HU, pois os resultados apresentaram-se no limite superior indicando normocitose e normocromia. Pela baixa quantidade de eritrócitos circulantes, os níveis de HCM e CHCM apresentaram-se normais ou um pouco superiores. A quantidade de reticulócitos aumentada indica a necessidade de reposição celular devido à hemólise e retirada de eritrócitos pelo baço e certamente refletiu os níveis elevados de Epo. Em 2003, Gonçalves e colaboradores verificaram em pacientes com AF, sem uso de HU, separados por grupos de haplótipos, os índices hematimétricos e os dados não diferiram dos encontrados neste trabalho, somente o VCM apresentou-se diminuído (88,48 fl).

Para entender a hemólise, correlacionamos as glicoproteínas plasmáticas avaliadas com alguns parâmetros hematológicos, no grupo amostral como um todo, e não obtivemos associação significativa. Provavelmente, este resultado refletiu a homogeneidade do grupo amostral: todos adultos, com a presença da Hb SS, sob uso de HU há pelo menos 300 dias e sem transfusão sanguínea há 120 dias. Um dos fatores que poderia modular a resposta individualizada residiria nos haplótipos. Assim, correlacionamos os mesmos parâmetros entre os diferentes subgrupos amostrais. No grupo homozigoto para o haplótipo Bantu, não houve correlação entre os parâmetros. Obtivemos correlação negativa significativa entre Hpx e reticulócitos absoluto no subgrupo Bantu/_. O aumento de reticulócitos refletiu a hemólise grave que culmina na supressão da Hpx, evitando toxicidade dos grupos heme. O grupo sem o haplótipo Bantu apresentou correlação também negativa significativa entre Epo e GV. A explicação para esse fato pode ser a baixa concentração de GV. Como a produção é necessária, o organismo responde aumentando os níveis de Epo. Estes resultados sugerem que os subgrupos Bantu/_ e _/_ possuem hemólise mais grave que o subgrupo Bantu/Bantu.

Após a avaliação da Hb F, dos marcadores de hemólise e eritrogênico e dos parâmetros hematológicos de acordo com os haplótipos, o próximo passo foi avaliar a peroxidação lipídica, ocasionada pelo estresse oxidativo da membrana celular, por meio da

dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. Nos eritrócitos falcêmicos, o estresse oxidativo é decorrente da alta taxa de meta Hb S, menos estáveis do que a meta Hb A, resultando na formação de hemicromos e hemólise com a liberação do heme e do ferro (RE et al., 1999; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). Conseqüentemente há altos níveis de peroxidação lipídica resultando em um aumento de estresse oxidativo. Quando em uso de HU, os níveis deste marcador podem diminuir em até 35,2% conferindo ação antioxidante (SILVA et al, 2011; BELINI-JÚNIOR et al, 2012). Mesmo sob o uso deste medicamento, o grupo amostral avaliado apresentou níveis elevados de TBARS (2449,07 ng/mL) em comparação com o valor de referência. Valores elevados de TBARS nos grupos heterozigoto para o haplótipo Bantu e sem Bantu podem estar associados a hemólise mais pronunciada. Quando a peroxidação lipídica foi associada com os marcadores de capacidade antioxidante, não foi observada correlação significativa.

Os pacientes com haplótipo Bantu/_ apresentaram 5,7 vezes mais TBARS que os valores de normalidade. Como é um grupo que também apresentou correlação negativa entre Hpx e reticulócitos e com maiores valores de Hb F, sugerimos que a maior geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) induz a lesão de membrana e peroxidação lipídica com conseqüente hemólise. A Hpx parece ser atuante nesses casos, mas não o suficiente para neutralizar as ERO geradas. Para analisar a efetividade do uso de HU nessas situações, a aderência ao tratamento e avaliações em longo prazo são necessárias.

Com os resultados obtidos sugerimos que o haplótipo Bantu não parece exercer influência sobre os valores de Hb F e parâmetros hematológicos nesses pacientes. Um melhor entendimento dos aspectos moleculares da AF são necessários para avaliar a modulação de fenótipos nesse grupo de indivíduos.

6. Conclusões

6 CONCLUSÕES

- Mesmo sem associação significativa o subgrupo heterozigoto para o haplótipo Bantu apresentou níveis elevados de Hb F, permitindo a inferência de que a interação de outros haplótipos da globina beta-S com o Bantu pode modular a quantidade desta Hb em resposta a HU;

- Os marcadores de hemólise (Hp e Hpx) e requisição medular (Epo) respondem igualmente na AF independentes dos haplótipos avaliados;

- Os parâmetros hematológicos não diferiram no grupo amostral, por se tratar de um grupo homogêneo com os pacientes sob as mesmas condições, mas diferiram quando avaliadas entre os subgrupos amostrais podendo inferir hemólise pronunciada no subgrupo heterozigoto e sem o haplótipo Bantu;

- Mesmo sem diferença significativa o subgrupo homozigoto para o haplótipo Bantu apresentou níveis médios diminuídos de peroxidação lipídica, provavelmente por apresentarem menos hemólise em relação aos outros subgrupos amostrais.

7.Referências

7 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; ANDREW, H.L.; SHIV, P. *Imunologia Celular e Molecular* – 6.ed. – Rio de Janeiro: Elsevier, p.57, 2008.
- ABCHEE, A.; EL-SIBAI, M.; YOUHANNA, S. et al. The I allele of the angiotensin converting enzyme I/D polymorphism confer protection against coronary artery disease. **Coronary Artery Disease**, v.21, p 151-156, 2010.
- AKINSHEYE, I.; SOLOVIEFF, N.; NGO, D.; et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Molecular characterization of the unusually high fetal hemoglobin phenotype in African Americans. **American Journal of Hematology**. v.87, p. 217-219, 2011.
- ALMEIDA, C.B.; SCHEIERMANN, C.; JANG, J.E.; PROPHETE, C.; COSTA, F.F.; CONRAN, N.; FRENETTE, P.S Hydroxyurea and a cGMP- amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. **Blood**. v.120, n.14,p. 2879-2888, 2012.
- BARABINO, G. A.; PLATT, M. O.; KAUL, D. K. Sickle Cell Biomechanics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 12, p. 345-367, 2010.
- BARBOSA, C.G.; GONÇALVES-SANTOS, N.J.; SOUZA-RIBEIRO, S.B.; et al. Promoter region sequence differences in the A and G *gamma globin* genes of Brazilian sickle cell anemia patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, n.8, p. 706-711, 2010.
- BELINI-JUNIOR, E.; SILVA, D.G.H.; TORRES, L.S.; ALMEIDA, E.A.; CANÇADO, R.D.; CHIATTONE, C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Oxidative stress and antioxidant capacity in sickle cell anaemia patients receiving different treatments and medications for different periods of time. **Annals of Hematology**. v.91, n.4, p.479-89, 2012.
- BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Science and Nutritions**, v.47, p.233-261, 1996.
- BIO-RAD. Variant β thalassemia short program Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories, 1999.
- BONINI-DOMINGOS, C. R. Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias. São José do Rio Preto, SP: HN Editora, 2006.
- BORETTI, F.S.; BUEHLER, P.W.; D'AGNILLO, F.; et al. Sequestration of extracellular hemoglobin within a haptoglobin complex decreases its hypertensive and oxidative effects in dogs and guinea pigs. **The Journal of Clinical Investigation**. v.119, p. 2271-2280, 2009.
- BOURANTAS, K.L.; DALEKOS, G.N.; HAKIS, A.; CHAIDOS, A.; TSIARA, S.; HAVRIDIS, A. Acute phase proteins and interleukins in steady state sickle cell disease. **European Journal of Haematology**. v.61, p. 49-54, 1998.

BROWN, H.C.; KUTLAR, F.; CLAIR, B.; KUTLAR, A. Exploratory study of haptoglobin levels by genotype in adult sickle cell patients. Oral and poster abstract. **53rd American Society of Hematology-ASH-Annual Meeting and Exposition**, 2011.

BUEHLER, P.W.; ABRAHAM, B.; VALLELIAN, F.; et al. Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. **Blood**. v. 113, p. 2578-2586, 2009.

BURCHAM, P.C. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. **Mutagenesis**. v.13, n.3, p.287-305, 1998.

CANÇADO, R.D.; JESUS, J.A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, n. 3, p. 203-206, 2007.

CHIANG, E.Y.; FRENETTE, P.S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematology/ Oncology Clinics of North American**. v. 19, n. 5, p. 771-784, 2005.

CIOBICA, A.; PADURARIU, M.; DOBRIN, I.; STEFANESCU, C.; DOBRIN, R. Oxidative stress in schizophrenia - focusing on the main markers. **Psychiatria Danubina**. v.23, n.3, p.237-345, 2011.

COKIC, V.P.; SMITH, R.D.; BELESLIN-COKIC, B.B.; et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent action of soluble guanylyl cyclase. **The Journal of Clinical Investigation**. v.111, n.2,p.231-239, 2003.

DAVIES, S.C.; GILMORE, A. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. **Blood Reviews**. v.17, n.2, p.99-109, 2003.

DELANGHE, J.R.; LANGLOIS, M.R. Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. **Clinica Chimica Acta**. v.312, n.1-2, p.13-23, 2001

DIOP, S.; et al. Prevalence and morbidity of G6PD deficiency in sickle cell disease in the homozygote. **Dakar Medical Journal**. v. 50, n. 2, p. 56-60, 2005.

DOBRYSYCKA, W. Biological functions of haptoglobin – New pieces to an old puzzle. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.35, n.9, p. 647-654, 1997.

ELLIOTT, S. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, p. 529-541, 2008.

ELLIOTT, S.; PHAM, E.; MACDOUGALL, I.C. Erythropoietins: A common mechanism of action. **Experimental Hematology**, v.36, p. 1573-1584, 2008.

FAILACE, R. Hemograma: manual de interpretação. – 4.ed. – Porto Alegre: **Artmed**, p. 39-70, 2003.

- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica do Brasil**, v.43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FERTRIN, K.Y.; COSTA, F.F. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Review of Hematology**, v. 3, n.4, p. 443–458, 2010.
- FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 7, p. 609-619, 2008.
- FRENETTE, P. S.; ATWEH G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts and future promise. **Journal of Clinical Investigation**, v.117, n. 4, p.850-858, 2007.
- GARNER,C.; TATU,T.; GAME, L.; CARDON, L.R.; SPECTOR, T.D.; FARRALL, M.; THEIN, S.L. A candidate gene study of Fcell levels in sibling pairs using a joint linkage and association analysis. **GeneScreen**, v.1, p.9-14, 2000.
- GenWay. Immunoperoxidase Assay for Determination of Haptoglobin in Human Samples. Version3, L18.0-16. www.genwaybio.com
- GenWay. Immunoperoxidase Assay for Determination of HEMOPEXIN in Human Samples. Version2, L14.0-7. www.genwaybio.com
- GONÇALVES, M.S.; BOMFIM, G.C.; MACIEL, E.; et al. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n.10, p.1283-1288, 2003.
- GUPTA, S.; AHERN, K.; NAKHL, F.; FORTE, F. Clinical usefulness of haptoglobin levels to evaluate hemolysis in recently transfused patients. **Advances in Hematology**, p.1-4, 2011.
- HARTEVELD, C.L.; HIGGS, D.R. α -Thalassaemia. **Orphanet Journal of Rare Disease**, v.5, n.13, p. 1-21, 2010.
- HEILMANN, C.; GEISEN, U.; BENK, C.; et al. Haemolysis in patients with ventricular assist devices: major differences between systems. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v.36, n.3, p.580-584, 2009.
- HIGGS, D.R.; ENGEL, J.D.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Thalassaemia. **Lancet**, v. 379. p. 373-383, 2012.
- HONIG, G. R.; ADAMS, J.G. Human Hemoglobin Genetics. **Springer-Verlag Wien**: New York, p. 236, 1986.
- IMRIE, H.; FOWKES, F.J.I.; MICHON, P.; et al. Haptoglobin levels are associated with haptoglobin genotype and alpha+-thalassemia in a malaria-endemic area. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.76, n.6, p. 965-971, 2006.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biological & Medicine**, v.9, p.515-540, 1990.

JELKMANN, W. Regulation of erythropoietin production. **The Journal of Physiology**, v. 15, n.589, p.1251-1258, 2011.

JI, P.; MURATA-HORI, M.; LODISH, H.F. Formation of mammalian erythrocytes: Chromatin condensation and enucleation. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n.7, p. 409-415, 2011

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. – 11.ed. – Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 238-231, 2008.

KATO, G.J. Haptoglobin halts hemoglobin's havoc. **The Journal of Clinical Investigation**, v.119, n.8, p. 2140-2142, 2009.

KÖRMÖCZI, G.F.; SÄEMANN, M.D.; BUCHTA, C.; et al. Influence of clinical factors on the haemolysis marker haptoglobin. **European Journal of Clinical Investigation**. v.36, n.3, p.202-209, 2006.

KOVACIC, P. Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. **Medical Hypothesis**, v.76, n.1, p.24-31, 2011.

KRUSZEWSKI, M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. **Mutation Research**, v.531, n. 1-2, p.81-92, 2003.

LEVY, A.P.; ASLEH, R.; BLUM, S.; LEVY, N.S.; et al. Haptoglobin: Basic and clinical aspects. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.12, n.2, p.293-304, 2010.

LÓPEZ, N., GONZÁLEZ, O. L., HIDALGO, P. C. Erythrocyte glutathione reductase in pregnant women with hemoglobin AA and AS. **Sangre**, v. 44, n. 3, p. 195-198, 1999.

LORENZI, T. F. Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica. 3. ed. Rio de Janeiro: **MEDSI**, 2003

LUZ, J.A.; SANS, M.; KIMURA, E.M.; ALBUQUERQUE, D.M.; SONATI, M.F.; COSTA, F.F. α -thalassemia, Hb S, and β -globin gene cluster haplotypes in two Afro-Uruguayan sub-populations from northern and southern Uruguayan. **Genetic and Molecular Biology**, v.29, n.4, 595-600, 2006.

MARCUS, S. J. et al. Quantitative analysis of erythrocytes containing fetal hemoglobin (F cells) in children with sickle cell disease. **American of Journal Hematology**, v. 54, n. 1, p. 40-6, 1997.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetato. **Journal of Clinical Pathology**, v. 18, n. 6, p. 790-792, 1965.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursors in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v.86, n.1, p.271-278, 1978.

MOLLAN, T.L.; YU, X.; WEISS, M.J.; OLSON, J.S. The role of alpha- hemoglobin stabilizing protein in redox chemistry, desaturation, and hemoglobin assembly. **Antioxid Redox Signaling**, v.12, n.2, p.219-231, 2010.

MOLLAN, T.L.; KHANDROS, E.; WEISS, M.J.; OLSON, J.S. Kinetics of α -Globin Binding to α -Hemoglobin Stabilizing Protein (AHSP) Indicate Preferential Stabilization of Hemichrome Folding Intermediate. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 287, n. 14, p. 11338–11350, 2012.

MOLLER, H.J.; NIELSEN, M.J.; BARTRAM, J.; DICK, M.C.; HEIGHT, S.E.; MOESTRUP, S.K.; RESS, D.C. Soluble CD 163 levels in children with sickle cell disease. **British Journal Haematology**. v.153, p. 105-110, 2011.

MUNCIE, H.L.J.; CAMPBELL, J. Alpha and beta thalassemia. **American Family Physician**, v. 80, n. 4, p. 339-344, 2009.

NAGEL, R. L. Haemoglobinopathies due to structural mutations. In: PROVAN, D.; GRIBBEN, J. Molecular haematology. **Oxford: Blackwell Science Ltd**, p. 121-33, 2000.

NAGEL, R. L. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. **Einstein Quarterly Journal of Biology and Medicine**, v. 2, p.53-62, 1984.

NAGEL, R.L.; GIBSON, Q.H. The binding of hemoglobin to haptoglobin and its relation to subunit dissociation of hemoglobin. **The Journal of Biological Chemistry**. v.246, n.1, p. 69-73, 1971.

NAOUM, P. C. Eletroforese, técnicas e diagnósticos. São Paulo: Santos, 1990.

NETO, G.C.G.; PITOMBEIRA, M.S.; VIEIRA, H.F.; VIEIRA, M.L.C.; FARIAS, D.A.B. Análise dos haplótipos do gene da β^S -globina no Ceará. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.41, n.5, p.315-321, 2005.

NewScientific. Immunoenzymatic assay for determination of hemopexin in human. www.newscientific.com

NZOUAKOU, R.; BACHIR, D.; LAVAUD, A.; et al. Clinical follow-up of hydroxyurea-treated adults with sickle cell disease. **Acta Haematologica**. v.125, n.3, p.145-152, 2011.

ODIÈVRE, M.H.; VERGER, E.; SILVA-PINTO, A.C.; ELION, J. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **The Indian Journal of Medical Research**. v. 134, p. 532-537, 2011.

ORKIN, S.H.; KAZAZIAN-JUNIOR, H.H.; ANTONARAKIS, S.E.; et al. Linkage of β -thalassaemia mutation and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster. **Nature**. v.296, p.627-631, 1982.

- PENA, S. D. J. et al. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinnylated probes. **Electrophoresis**, v. 12, n. 2-3, p. 146-152, 1991
- Portaria no 1.391/GM de 16 de Agosto de 2005. Art. 1º Instituir, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS, como diretrizes para a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias. <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/gab05/gabago05.htm> > Acesso em: 15/10/2012
- POWARS, D. R.; HITI, A. Sickle cell anemia: beta S gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. **American Journal of Diseases of Children**, v. 147, p. 1197–1202, 1993.
- POWARS, D.R. β S gene cluster haplotypes in sickle cell anemia: clinical and hematologic features. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 5, p. 475-493, 1991.
- RANDHAWA, Z.I.; JONES, R.T.; LIE-INJO, L. Human hemoglobin Portland II ($\zeta_2\beta_2$): isolation and characterization of Portland hemoglobin components and their constituent globin chains. **The Journal of Biological Chemistry**. v.259, n.11, p.7325-7330, 1983.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radicals Biology Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.
- REES, D.C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**. v. 376, n. 9757, p. 2018-2031, 2010.
- REES, D.C. The rationale for using hydroxycarbamide in the treatment os sickle cell disease. **Haematologica**. v.96, n.4, p.488-491, 2011.
- R&D Systems*. Quantikine IVD ELISA-Human Erythropoietin. www.RnDSystems.com
- ROTHER, R.P.; BELL,L.;GLADWIN, M.T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **JAMA**. v.293, n.13, p.1653-1662, 2005.
- SAIKI, R.K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**. v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.
- SAMBROOK, J.; FRITCSH, E.F.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, ed.2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SAYED-TABATABAEI, F.A. ; OOSTRA, B.A. ; ISAACS, A. ; van DUIJIN, C.M. ; WITTEMAN, J.C.M. ACE polymorphisms. **Circulation Research**. v.98, p.1123-1133, 2006.
- SCHAER, D.J.; ALAYASH, A.I. Clearance and Control Mechanisms of Hemoglobin from Cradle to Grave. **Antioxidants & Redox Sinaling**. v.12,n.2,p.181-184, 2010.

- SCHECHTER, A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**. v. 112, n. 10, p. 3927-3938, 2008.
- SHAHABI, P.; SIEST, G.; HERBETH, B.; NDIAYE, N.C.; VISVIKIS-SIEST, S. Clinical necessity of partitioning of human plasma haptoglobin reference intervals by recently-discovered rs2000999. **Clinica Chimica Acta**. v.413, n.19-20, p.1618-1624, 2012.
- SHIMAUTI, E. L. T., SILVA, D. G. H., ALMEIDA, E. A.; et al. Serum melatonin levels and oxidative stress in sickle cell anemia. **Blood Cells Molecules and Diseases**, v. 45, n. 4, p. 297-301, 2010.
- SILVA, D.G.; BELINI-JUNIOR, E.; TORRES, L.S.; RICCI-JÚNIOR, O.; LOBO, C. C.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; ALMEIDA, E.A. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. **Blood Cells Molecules Diseases**. v.47, n.1, p.23-28, 2011.
- SILVA, D.G.H. Expressão fenotípica da homozigose para hemoglobina S em relação aos haplótipos da beta globina, polimorfismos da glutathione S-transferase e enzimas de detoxificação. **Dissertação de mestrado**. UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, 2011.
- SILVA, L.B.; GONÇALVES, R.P.; RABENHORS, S.H.B. Análise dos haplótipos da anemia falciforme em Fortaleza revela as origens étnicas da população cearense. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.45, n.2, p 115-118, 2009.
- SILVERTHORN, D.U. Fisiologia Humana: uma abordagem integrada. – 5.ed. – Porto Alegre: **Artmed**, p. 547-557, 2010
- 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.
- SIMÕES, B.P.; PIERONI, F. ; BARROS, G.M.N.; MACHADO, C.L.; CANÇADO, R.D.; SALVINO, M.A.; ÂNGULO, I.; VOLTARELLI, J.C. Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: Comitê de Hemoglobinopatias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.32, p.43-56, 2010.
- STEINBERG, M.H. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. **The Scientific World JOURNAL** . v. 8, p. 1295–1324, 2008.
- STEINBERG, M.H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**. v.87, n.8, p.795-803, 2012.
- STROUSE, J.J.; HEENEY, M.M. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell disease: efficacy, barriers, toxicity, and management in children. **Pediatric Blood & Cancer**. v.59, n.2, p.365-371, 2012.

- STYLES, L.A.; VICHINSKY, E.P. New therapies and approaches to transfusion in sickle cell disease in children. **Current Opinion in Pediatrics**. v.9, n. 1, p. 41-51, 1997.
- SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R.L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene *cluster* haplotypes. **American Journal of Hematology**, v. 32, p. 66-69, 1989.
- TAYLOR, J.G.; ACKAH, D.; COBB, C.; et al. Mutations and polymorphisms in hemoglobin genes and the risk of pulmonary hypertension and death in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**. v.83, n.1, p.6-14, 2008.
- TESTA, N.G.; DEXTER, T.M. Long-term hematopoietic damage: concepts, approaches, and results relevant to the study of environmental toxins. **Environmental Health Perspectives**, n. 82, p.51-56, 1989.
- TORRES, L.S.; SILVA, D.G.H.; BELINI-JUNIOR, E.; ALMEIDA, E.A.; LOBO, C.L.C.; CANÇADO, R.D.; RUIZ, M.A.; BONINI-DOMINGOS, C.R. The influence os hydroxyurea on oxidative stress in sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.34, n.6, p.421-425, 2012.
- VARMA, R. N. et al. Depressed erythrocyte glutathione reductase activity in sickle cell disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 38, p. 884-887, 1983
- VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis oh human hemoglobins. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 49, n. 3, p. 440-442, 1968.
- VICARI, P.; MELLO, A.B.; FIGUEIREDO, M.S. Effects of hydroxyurea in a population of Brazilian patients with sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v.78, p.243-244, 2005.
- VLAHAKOS, D.V.; MARATHIAS, K.P.; MADIAS, N.E. The role of the renin-angiotensin systems in the regulation oh erythropoiesis. **American Journal of Kidney Diseases**. v.56, n3, p. 558-565, 2010.
- WARE, R.E.; AYGUN, B. Advances in the use of hydroxyurea. **Hematol/ the Education Program of the American Society of Hematology**, p.62-9. 2009.
- WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**. v.78, n. 8, p. 704-712, 2001. (a)
- WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. The thalassaemia syndromes. Oxford, Blackwell Science, 2001. (b)
- ZAGO, M.A.; FIGUEIREDO, M.S.; OGO, S.H. Bantu beta S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. **American Journal of Physical Anthropology**, v.88, n.3, p.295-98, 1992.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

ZAGO, M.A.; SILVA-JUNIOR, W.A.; DALLE, B.; et al. Atypical β^S haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. **American Journal of Hematology**, v.63, p.79-84, 2000.

8. Apêndices

8 APÊNDICES

APÊNDICE I - Questionário

Questionário do projeto de Pesquisa “Modulação da resposta terapêutica pelo haplótipo Bantu”.

Data: ____/____/____

Informações Pessoais

Nome completo: _____

Sexo: () feminino () masculino

Endereço: _____

Cidade e estado onde mora: _____

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

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

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

Histórico Transfusional

- Em regime regular de transfusão de hemácias?

Não Sim

Intervalo: _____ Data da última transfusão: ____/____/____

- Nº de unidades de concentrado de hemácias transfundidas até o início do estudo?

< 10 10 a 20 21 a 30 31 a 40 > 40

Histórico Clínico

Nº de crises de dor nos últimos 3 anos: 0 a 2 3 a 5 ≥ a 6

Data da última crise: ____/____/____

Nº de infecções nos últimos 3 anos: 0 a 2 3 a 5 \geq a 6

Data da último evento infeccioso: ___/___/___

Nº de internações nos últimos 3 anos: 0 a 2 3 a 5 \geq a 6

Motivo: _____ Data da última internação:
___/___/___

Pulmonar:

Síndrome Torácica Aguda Não Sim Data: ___/___/___

Cardíaca:

- Cardiomegalia Não Sim Data: ___/___/___

Hepatobiliar:

- Cálculo Biliar Não Sim Data: ___/___/___

- Colectomia Não Sim Data: ___/___/___

Neurológica:

- AVC Não Sim Data: ___/___/___

Osteoarticular:

- Osteonecrose Não Sim Data: ___/___/___ Local: _____

Cutânea:

- Úlcera isquêmica Não Sim Data: ___/___/___ Local: _____

Urológica:

- Priapismo Não Sim Data: ___/___/___

Outra:

- Esplenectomia Não Sim Data: ___/___/___

Medicamentos em uso

- Hidroxiuréia: Não Sim Início: ___/___/___ Dose: _____

- Desferroxamina (Desferal): Não Sim Início: ___/___/___ Dose: _____

- Deferiprona (Ferriprox): Não Sim Início: ___/___/___ Dose: _____

- Deferasirox (Exjade) Não Sim Início: ___/___/___ Dose: _____

- Ácido fólico: Não Sim Início: ___/___/___ Dose: _____

- Vitaminas: Não Sim Data última ingestão: ___/___/___

Quais? _____

- Analgésicos: Não Sim Data última ingestão: ___/___/___

Quais? _____

- Outros: Não Sim Data última ingestão: ___/___/___

Quais? _____

Tem contato com produtos químicos? (Exemplos: solvente, cola, tinta, pesticida, herbicida, fertilizante, óleos de motor, gasolina, fumaça, material radioativo, outras substâncias)

() não () sim – Quais? _____

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

Toma bebidas alcoólicas?

() não () sim - Quando foi a última vez que você ingeriu bebida alcoólica? _____

APÊNDICE II: Carta ao Editor –Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**Haplótipos da globina beta-S em pacientes com Anemia Falciforme: uma abordagem para a compreensão da diversidade no Brasil**

¹ Jéssika Viviani Okumura

² Clarisse Lopes de Castro Lobo

¹ Claudia Regina Bonini Domingos

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE)

² Instituto Estadual de Hematologia Athur de Siqueira Cavalcante (HEMORIO)

e-mail: claudiabonini@sjrp.unesp.br

A anemia falciforme (AF) é uma doença monogênica caracterizada pela homozigose da hemoglobina S (Hb S), que em condições adversas como desoxigenação, acidose ou desidratação, formam polímeros deformando os eritrócitos, levando à fisiopatologia complexa e variada ^{1,2}. Os haplótipos da globina beta S (haplótipos β^S) são importantes para a compreensão da diversidade clínica em pacientes com AF. Cinco haplótipos, fundamentados em sítios de restrição específicos, têm sido associados a diferentes grupos étnicos, de acordo com a região de origem e prevalência sendo: Bantu, Benin, Senegal, Índia-Arábia Saudita (Saudi) e Camarões ³. Com o objetivo de avaliar a frequência dos haplótipos β^S nos pacientes com AF do estado do Rio de Janeiro, analisamos amostras de 790 pacientes com Doença Falciforme. Os haplótipos foram classificados por análise de seis sítios polimórficos segundo Sutton et al (1989). Aqueles que não apresentaram padrão de digestão, conforme descrito, foram nomeados de atípicos. A presença ou ausência dos sítios polimórficos foram avaliadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida pela análise do polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) ^{4,5}. Dos 790 pacientes avaliados, 527 são portadores da anemia falciforme (Hb SS). Destes, foram identificados, de acordo com a frequência genotípica do haplótipos β^S , 295 (56%) Bantu/Bantu, 128 (24,3%) Bantu/Benin, 44 (8,3%) Bantu/Atípico, 36 (6,84%) Benin/Benin, 10 (1,9%) Benin/Atípico, três (0,57%) Bantu/Camarões, três (0,57%)

Benin/Camarões, três (0,57%) Atípico/Atípico, dois (0,38%) Bantu/Saudi, dois (0,38%) Bantu/Senegal e um (0,19%) Benin/Saudi. Para a avaliação da frequência alélica, do total de 1054 cromossomos analisados, foram identificados 769 (72,96%) alelos Bantu, 214 (20,3%) Benin, 60 (5,7%) Atípicos, seis (0,57%) Camarões, três (0,28%) Saudi e dois (0,19%) Senegal. Os dados de frequência genotípica e alélica estão disposta na Tabela 1. A alta frequência, tanto genotípica quanto alélica, do haplótipo Bantu, seguido do Benin, reforça a influencia e contribuição dos povos vindos da África Oriental e Centro-Sul na formação da população brasileira⁶. Os haplótipos Atípicos, identificados por meios de diferentes padrões de digestão, são originados devido a mecanismos genéticos como conversão gênica, e reforçam a miscigenação entre as etnias que povoam o Rio de Janeiro e o Brasil. Ressaltamos a necessidade de identificação e caracterização dessa variação genética para melhor compreensão dos aspectos clínicos e diversidade fenotípica encontrada nas pessoas com Doença Falciforme no Brasil.

Tabela 1- Frequência genotípica e alélica dos haplótipos da globina beta-S

Haplótipo β^S/β^S	Frequência	Haplótipo β^S	Frequência
	Genotípica n (%)		Alélica n (%)
Bantu/Bantu	295 (56%)	Bantu	769 (72,96%)
Bantu/Benin	128 (24,3%)	Benin	214 (20,3%)
Bantu/Atípico	44 (8,3%)	Atípicos	60 (5,7%)
Benin/Benin	36 (6,84%)	Camarões	6 (0,57%)
Benin/Atípico	10 (1,9%)	Saudi	3 (0,28%)
Bantu/Camarões	3 (0,57%)	Senegal	2 (0,19%)
Benin/Camarões	3 (0,57%)		
Atípico/Atípico	3 (0,57%)		
Bantu/Saudi	2 (0,38%)		
Bantu/Senegal	2 (0,38%)		
Benin/Saudi	1 (0,19%)		
Total	527 (100%)		1054 (100%)

β^S : globina beta-S

Frequência Genotípica n (%): número de indivíduos com o respectivo haplótipo

Frequência Alélica n (%): número de cromossomos com o respectivo haplótipo

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

1295-1324. [cited 2012 Sep 12]. Available from:

<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2008/798678/abs/>

2. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest*. 2007; 117 (4): 850-858. [cited 2012 Sep 12]. Available from:

<http://www.jci.org/articles/view/30920>

3. Nagel RL. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. *Einstein Quarterly Journal of Biology and Medicine*. 1984; 2: 53-62.

4. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol*. 1989; 32 (1): 66-69.

5. Bonini-Domingos CR. Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias. São José do Rio Preto, SP: HN Editora, 2006. 121 p.

6. Filho ILS, Ribeiro GS, Moura PG, Vecchi ML, Cavalcante AC, Andrada-Serpa MJ. Manifestações clínicas agudas na primeira e segunda infâncias e características moleculares da doença falciforme em um grupo de crianças do Rio de Janeiro. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012. 34 (3): 196-201. [cited 2012 Sep 12]. Available from:

http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v34n3/pt_v34n3a10.pdf

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 12/03/2013

Jéssika Viviani Okumura