

ANA ISABEL MALVA SILVA

**IMPORTÂNCIA DOS HAPLÓTIPOS
DO GENE DA GLOBINA BETA-S
NA HEMOGLOBINOPATIA SC**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina para
obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**São Paulo
2008**

ANA ISABEL MALVA SILVA

**IMPORTÂNCIA DOS HAPLÓTIPOS
DO GENE DA GLOBINA BETA-S
NA HEMOGLOBINOPATIA SC**

**Tese apresentada à
Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de
Medicina para obtenção do
título de Mestre em Ciências**

**Orientadora:
Profa Dra Maria Stella Figueiredo
Coordenadora da Pós-Graduação:
Profa Dra Dayse Maria Lourenço
Realização:
Disciplina de Hematologia e Hemoterapia**

**São Paulo
2008**

Malva Silva, Ana Isabel

Importância dos haplótipos do gene da globina beta-S na hemoglobinopatia SC. / Ana Isabel Malva Silva. São Paulo, 2008.

vii, 57 p.

Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

Título em inglês:

Importance of beta-S haplotypes on SC hemoglobinopathy

Descritores: 1. Síndromes Falciformes. 2. Haplótipos do gene beta 3. Hemoglobinopatia SC 4. Triagem neonatal de hemoglobinopatias

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria e Moacyr e à memória
de minha irmã, Liliane

Este projeto foi desenvolvido com suporte financeiro do CNPq
(bolsa de mestrado)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade e por permitir que todo o processo se tornasse possível.

Aos meus pais pelo amor, apoio e compreensão.

À memória de minha irmã, Liliane, que não pode ver o término deste trabalho mas me apoiou até onde foi possível.

À Doutora Maria Stella Figueiredo por ter acreditado na minha capacidade e perseverança.

À Maria Helena, Denise, Thiago, Dna. Eliene e Dores.

Aos Técnicos da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia.

Às amigas Ana Carolina Cabañas Pedro, Roberta Spetic Félix e Perla Vicari por me ouvirem nos momentos mais complicados e pelas experiências na Biologia Molecular.

À Ana Maria, Bianca, Fernanda, Cidinha, Aline, Alessandra, Rodrigo e tantos outros que infelizmente esqueci.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	7
REVISÃO DE LITERATURA	8
CASUÍSTICA E MÉTODOS	21
CASUÍSTICA	22
MÉTODOS	23
RESULTADOS	32
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	51
ANEXOS	58

RESUMO

Introdução: Estudos anteriores em população brasileira de pacientes com anemia falciforme detectaram maior frequência do haplótipo Bantu (70%) em pacientes com anemia falciforme na região Sudeste e de haplótipo Benin (51%) na Bahia. Entretanto, indivíduos com hemoglobinopatia SC (HbSC) da região Sudeste, apresentaram alta frequência do haplótipo Benin (57%). Esta discrepância na frequência dos haplótipos β^S sugere que diferentes mecanismos podem estar envolvidos nesta distribuição, desde uma provável miscigenação devido à migração interna, como uma diminuição do número de indivíduos Bantu, devido a uma maior gravidade da doença. **Objetivo:** Para uma melhor elucidação dos mecanismos envolvidos na diferença de haplótipos observada entre portadores de HbSS e HbSC, tivemos como objetivo analisar o haplótipo do gene da globina beta em crianças portadoras de HbSC e compará-lo aos obtidos em indivíduos adultos com a mesma hemoglobinopatia. **Casuística:** 60 crianças e adolescentes com HbSC provenientes do ambulatório de Hemato-Pediatria do Hospital São Paulo e/ou da triagem neonatal para diagnóstico de hemoglobinopatias. Dados laboratoriais de 28 adultos com HbSC analisados anteriormente neste Serviço. **Métodos:** A identificação dos haplótipos foi feita por PCR seguida de digestão com enzimas específicas, segundo proposto por Sutton et al. (1989). **Resultados:** Dos sessenta cromossomos estudados para o haplótipo β^S , observou-se a presença do haplótipo Bantu (56,7%) em 34 pacientes, Benin em 25 pacientes (41,7%) e Senegal em 1 paciente (1,6%). Quanto ao haplótipo β^C , o haplótipo I foi observado em 54 pacientes (90%), o haplótipo II e o haplótipo III (5%) em 3 pacientes cada. Como resultado da análise do genótipo, pôde-se observar 55% (33/60) de Bantu/I, 35% (21/60) de Benin/I, 5% (3/60) de Benin/II e 1,6% (1/60) dos respectivos genótipos: Bantu/III, Benin/III e Senegal/III. A análise comparativa dos genótipos entre crianças/adolescentes e adultos mostrou maior frequência do genótipo Bantu/I no primeiro grupo ($p=0,04$). **Discussão e Conclusão:** As informações obtidas neste estudo são relevantes já que apontam para uma maior prevalência, na infância, do haplótipo Bantu, diferentemente dos indivíduos adultos que apresentaram haplótipo Benin. Com isso, pode-se sugerir que indivíduos com HbSC e haplótipo β^S Bantu possuam um quadro clínico mais grave do que os com haplótipo Benin.

ABSTRACT

Introduction: Previous studies in Brazilian population have shown higher frequency of Bantu haplotype (70%) in patients with sickle cell anemia (SCA) in Southeast region whereas in Bahia (Northeast) the SCA patients had more Benin haplotype (51%). However, studies in patients with SC hemoglobinopathy (HbSC) from Southeast region showed a higher frequency of Benin haplotype (57%). The different frequency of haplotypes observed in the same region (Southeast) suggest that some mechanisms may be involved on the haplotype distribution in our population, as miscegenation, secondary to internal migration, or lower Bantu patients due to higher severity of this manifestation.

Objective: Our aim was to identify the frequency of beta globin haplotypes in children and teenagers with SC disease comparing to previous analysis of adults with HbSC to understand the mechanisms involved in the haplotype difference observed in these population.

Methods: We studied 60 children and teenagers with SC disease from the outclinic patients and/or from the neonatal screening Service of Hospital São Paulo. Laboratorial data from 28 adults with HbSC, previously studied, were also analyzed. The haplotype identification was realized by PCR and digestion following the protocol of Sutton et al. (1989).

Results: The analyses of the β^S haplotype showed: Bantu in 34 (56.7%) patients, Benin in 25 (41.7%) and Senegal in 1 patient (1.6%). Regarding the β^C haplotype, the I haplotype was observed in 54 patients (90%), the II and III haplotypes were seen in 3 patients each (5%). The genotypes observed were 55% (33/60) of Bantu/I, 35% (21/60) of Benin/I, 5% (3/60) of Benin/II e 1,6% (1/60) of the following genotypes: Bantu/III, Benin/III and Senegal/III. The comparative analyses between children/teenagers and adults showed higher frequency of Bantu/I genotype in the first group ($p=0.04$).

Discussion and Conclusion: The results obtained in this study are relevant because they showed a higher prevalence of Bantu haplotype in children than in adults. This can suggest that HbSC patients with Bantu haplotype may have worse clinical manifestation than patients with Benin haplotype.

INTRODUÇÃO

A hemoglobina é uma molécula globular, formada por quatro cadeias de globinas (2 alfa-símiles e 2 beta-símiles), quatro grupos heme, que se localizam em cada cadeia globínica e que contém ferro. Dois complexos gênicos (*clusters*) controlam a síntese da hemoglobina, um no cromossomo 16 onde estão os genes das cadeias alfa-símiles e outro no cromossomo 11 onde estão os beta símiles (ZAGO, 2004A).

Os genes das globinas podem ser sede de alterações moleculares simples ou muito complexas. As conseqüências funcionais resultantes destas alterações dependem não apenas do tipo de alteração molecular como também do local onde esta ocorre. Assim, a mais simples e comum alteração molecular, ou seja, a troca de uma base do DNA pode provocar:

- Supressão da síntese da cadeia globínica específica,
- Redução do ritmo de sua síntese ou
- Produção de cadeias com alterações estruturais variadas, desde a simples troca de um aminoácido até a produção de cadeias alongadas (ZAGO, 2004B).

A anemia falciforme caracteriza-se pela presença de mutação no gene da globina beta com troca de uma base nitrogenada, no sexto códon, CAG para GTG. Esta mutação leva à alteração estrutural na molécula, resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6. Esta hemoglobina

anômala resultante, hemoglobina S (HbS), é uma das hemoglobinas variantes mais comuns. Na África, o gene está amplamente distribuído e atinge uma prevalência de até 40% (DACIE, 1988).

Milhões de pessoas no mundo todo são afetados pela anemia falciforme (GONÇALVES ET AL, 2003). Na África, nascem cerca de 120.000 recém-nascidos com anemia falciforme por ano, enquanto que nos Estados Unidos e no Brasil nascem de 1.000 e 3.000 indivíduos respectivamente (STEINBERG, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006*).

O termo "síndrome falciforme" identifica as condições em que o eritrócito sofre falcização após redução na tensão do oxigênio, enquanto a designação "doença falciforme" é reservada às situações em que a falcização conduz a manifestações clínicas evidentes. Assim encontramos o estado homocigoto para a hemoglobina S ou anemia falciforme (SS), e suas interações, como a hemoglobinopatia S- β talassemia (S/ β tal), hemoglobinopatia SC (SC), hemoglobinopatia SD (SD) e hemoglobina S-persistência hereditária de hemoglobina fetal (S/PHHF). Já o traço para hemoglobina S, traço falciforme (AS), é classificado como síndrome falciforme e não como doença (ANVISA, 2002; COSTA, 2004)

* Jesus JA, 2006. Comunicação pessoal

Os eritrócitos com HbS sofrem processo de falcização, fisiologicamente provocado pela baixa tensão de oxigênio, acidose e desidratação. As células passam então a apresentar a forma de foice ou de lua crescente, com conseqüências variáveis em seu portador, dependentes da quantidade de HbS por eritrócito. A presença de hemoglobina fetal (HbF) no eritrócito com HbS oferece proteção à esta célula contra o processo de falcização, pois não interage com HbS quando esta se precipita. Outras hemoglobinas além da HbF, também interferem na falcização, dentre elas a hemoglobina A (HbA) e a hemoglobina C (HbC) (TOMÉ-ALVES ET AL, 2000).

A HbC é uma das três hemoglobinas anômalas mais freqüentes no homem e pode induzir o eritrócito à uma maior desidratação com formação de cristais intracelulares (NAGEL, FABRY & STEINBERG, 2003). A HbC tem distribuição mais restrita, limitada ao norte de Gana e Burkina-Faso onde alcança a prevalência de 20%. A hemoglobinopatia C (HbCC), por sua vez, caracteriza-se por anemia hemolítica crônica, sem as manifestações de vaso-occlusão (SERJEANT, 1992).

Na hemoglobinopatia SC (HbSC), as HbS e HbC coexistem no indivíduo. Esta associação apresenta quase todas as complicações da anemia falciforme, tais como: maior suscetibilidade a infecções e fenômenos vaso-oclusivos. Devido

aos episódios de oclusão vascular, estes indivíduos podem apresentar dores crônicas ou agudas (INATI ET AL, 2003). A hipofunção esplênica se desenvolve mais vagarosamente enquanto a esplenomegalia é mais persistente na HbSC do que na HbSS. As complicações oftalmológicas também são mais freqüentes em portadores de HbSC (COSTA, 2004).

Haplótipos são determinantes genéticos localizados em um mesmo cromossomo, caracterizados pelo padrão de combinação de diferentes sítios polimórficos (polimorfismos) (LIMA DA SILVA, 2006). Na década de 90, foi observado que a gravidade das manifestações clínicas da HbSS estava relacionada ao tipo de haplótipo do gene da globina beta (Powars & Hiti, 1993).

Trabalhos realizados na população brasileira mostraram maior prevalência do haplótipo Bantu, diferentemente de estudos em população americana e jamaicana, onde ocorre predomínio do haplótipo Benin (ÖNER ET AL, 1992). Embora vários trabalhos tenham sido realizados sobre este aspecto, ainda hoje as razões para tal fato não estão totalmente elucidadas.

O papel dos haplótipos do gene da globina beta na hemoglobinopatia SC também é desconhecido. Trabalho anteriormente realizado em população de São Paulo, que analisou 28 pacientes adultos portadores de HbSC, mostrou predomínio do haplótipo β^S Benin (57%), diferindo de trabalhos em HbSS na

mesma população que mostraram maior frequência do haplótipo Bantu (70%) (Gil, 1998). Estes dados sugeriram que diferentes mecanismos poderiam estar envolvidos nesta conflitante distribuição, desde uma provável miscigenação devido à migração interna, como a diminuição do número de indivíduos Bantu, devido a uma possível maior gravidade da doença.

A partir da introdução do diagnóstico neonatal de síndromes falciformes no estado de São Paulo, vem sendo identificado maior número de portadores de HbSC do que observado anteriormente nesta população (DAUDT ET AL, 2002; RAMALHO, MAGNA & PAIVA E SILVA, 2002). Relacionando estes dados, fica clara a necessidade de maior investigação da influência do haplótipo Bantu na gravidade e menor sobrevida dos indivíduos com HbSC.

OBJETIVOS

A discrepância na frequência da HbSC em crianças e adultos sugere a possibilidade de haver casos de maior gravidade e que não sobrevivem até a idade adulta.

Com o intuito de determinar se o haplótipo do gene da globina beta poderia ser fator determinante nesta discrepância da frequência da HbSC em crianças e adultos da cidade de São Paulo, nos propusemos a determinar o haplótipo de crianças com hemoglobinopatia SC e compará-lo com dados de trabalho em população adulta com hemoglobinopatia SC, realizado anteriormente em nosso Serviço.

REVISÃO DA LITERATURA

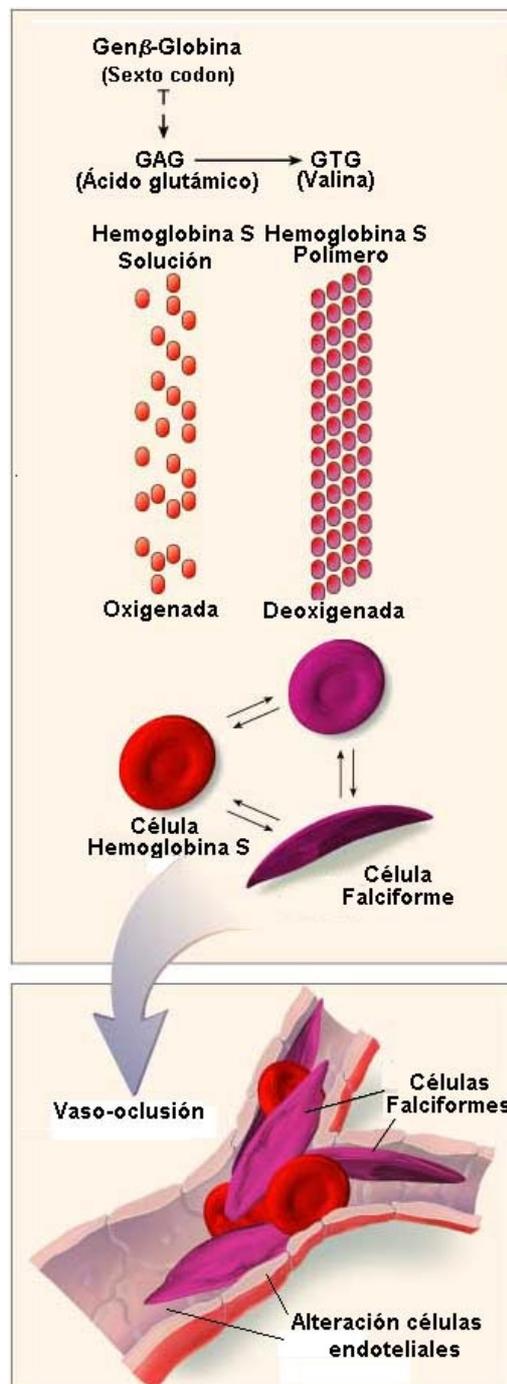
1. Hemoglobina S

A troca de bases no códon 6 do gene da globina beta (adenina por timina) resulta na substituição do resíduo glutamil na posição beta 6 por um resíduo valil, gerando a hemoglobina S (HbS) (TOMÉ-ALVES ET AL, 2000; COSTA, 2004).

A polimerização da HbS é fundamental na patogenia da anemia falciforme, resultando na alteração da forma do eritrócito (foice) e na acentuada redução de sua deformabilidade, pois os géis de polímero possuem componentes substancialmente sólidos. A polimerização da HbS ocorre durante a desoxigenação e é dependente de numerosas variáveis como concentração de oxigênio, pH, concentração de HbS, temperatura, pressão, força iônica e presença de hemoglobinas normais (COSTA, 2004).

Estes polímeros de desoxi HbS na célula estão presentes em grande número de formas, desde fibras individuais até agregados de fibras ordenadas, preenchendo a célula e levando-a ao seu formato clássico em foice (EMBURY & STEINBERG, 1994). Após oxigenação, eles se dissolvem e o eritrócito volta a sua forma normal (EMBURY & STEINBERG, 1994). (Figura 1)

Figura 1: Esquema representativo do processo de polimerização da hemoglobina S.



(STEINBERG,

1999)

A repetição de episódios de desoxigenação e conseqüente polimerização provocam lesões de membrana irreversíveis, fazendo com que a forma de foice da hemácia

persista. Além disso, este processo contribui para a perda excessiva de potássio acelerando a desidratação destas células (COSTA, 2004).

O processo de polimerização é modulado pela presença de outras hemoglobinas, como a hemoglobina fetal (HbF), hemoglobina A (HbA) e hemoglobina C (HbC) (POWARS & HITI, 1993).

1.1. HbF

A HbF tem importância fisiológica no feto devido à grande afinidade desta pelo oxigênio. Na vida adulta, a HbF é encontrada em níveis baixos (< 1%). Sua concentração aumenta nos casos de anemia hemolítica e na persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF) (STEINBERG, 1984).

A presença de HbF modifica a cinética da polimerização da HbS, já que ela não participa do heterotetrâmero ($\alpha^2\beta^s$) do polímero (NOGUCHI ET AL, 1985; FABRY, 2001).

Pacientes árabes apresentam manifestações clínicas menos graves do que os africanos, provavelmente devido ao nível elevado de HbF observado (INATI ET AL, 2003).

Os níveis elevados de HbF, segundo INATI ET AL (2003), podem ser causados pela presença de um polimorfismo na região promotora do gene γ que regula a expressão da hemoglobina fetal. Outros fatores moduladores da expressão de HbF têm sido descritos (WYSZYNSKI ET AL, 2004).

1.2. HbA

HbA é a hemoglobina padrão do indivíduo adulto à qual as outras hemoglobinas são comparadas. Nos indivíduos heterozigotos para HbS, onde estão presentes as hemoglobinas A e S, a HbS apresenta concentração variando entre 25% e 45% do total de hemoglobina. Esta é uma condição benigna, sem anemia e com aspecto normal dos eritrócitos (HILLMAN, AULT & RINDER, 2005).

Os efeitos inibitórios da HbA na polimerização da HbS vêm de diferentes mecanismos, entre eles, a queda da concentração dos tetrâmeros HbS pela presença das moléculas de HbA, já que a probabilidade de o tetrâmero híbrido $[(\alpha\beta^S)(\alpha\beta^A)]$ entrar na fase de polimerização é apenas metade daquela do tetrâmero HbS. (STEINBERG, 2001).

2. Hemoglobina C

A HbC (β^6 glu-lis), assim como a HbS e HbE é uma das três hemoglobinas anormais mais prevalentes em humanos (NAGEL & STEINBERG, 2001).

A HbC compartilha com a HbS o local da seqüência de mutação mas as conseqüências fisiopatológicas diferem (HIRSH, LIN & NAGEL, 1987). Enquanto a HbS se polimeriza quando desoxigenada, a HbC cristaliza quando oxigenada (NAGEL & STEINBERG, 2001).

A HbC tem a capacidade de induzir o eritrócito à desidratação e à formação de cristais intracelulares. Esta formação ocorre, em sua maioria, em hemácias onde não se detectou HbF, sugerindo que esta poderia ter uma ação inibitória na formação de cristais (NAGEL ET AL, 2003; HIRSH ET AL, 1987).

A homozigose para a HbC, ou hemoglobinopatia CC (HbCC) é caracterizada por leve anemia, resultado da menor sobrevivência do eritrócito, esplenomegalia e presença de células-alvo (HILLMAN ET AL, 2005).

2.1. Hemoglobinopatia SC (HbSC)

A hemoglobinopatia SC (HbSC) é uma doença hereditária caracterizada por uma anemia hemolítica crônica e crises de dor, devido aos episódios intermitentes de vaso-oclusão (KODURI, AGBEMADZO & NATHAN, 2001; INATI ET AL, 2003).

Na HbSC, onde a HbS e a HbC coexistem em porcentagens praticamente iguais, a HbC acentua as propriedades deletérias da HbS em comparação à combinação entre HbA e HbS no traço falciforme. Esta conjunção de hemoglobinas variantes culmina em manifestações vasooclusivas e hemolíticas, fazendo da HbSC uma doença clinicamente significativa. A proporção de HbS no complexo heterozigoto SC e o aumento da densidade celular (CHCM), devido à presença de HbC, são os fatores que, em conjunto, diminuem a solubilidade da desoxi HbS nas hemácias SC em comparação aos eritrócitos AS (Schechter & Noguchi, 1994).

De maneira similar à HbSS, as características clínicas e hematológicas da HbSC são heterogêneas, mas todas as complicações que fazem a HbSS notória também podem estar presentes na HbSC (NAGEL & STEINBERG, 2001).

Os níveis de HbF na HbSC são menores do que os da HbSS, provavelmente pela menor hemólise e menor expansão da medula. É possível também que fatores genéticos, ainda não esclarecidos, possam estar envolvidos na determinação do nível de HbF na HbSC (STEINBERG ET AL, 1996).

3. Fatores que interferem na gravidade das Síndromes Falciformes

3.1. Alfa-talassemia

A α -talassemia (α -tal), conhecido modulador da gravidade da anemia falciforme, leva a alterações que interferem no mecanismo da polimerização da HbS, não só melhorando a anemia dos pacientes, como também diminuindo a incidência de algumas de suas manifestações clínicas. Analogamente à anemia falciforme, quando a α -tal coexiste com a HbSC, poucas células densas estão presentes (STEINBERG ET AL, 1983). Os dados da associação entre α -tal e HbSC entretanto, são escassos.

LEE ET AL, EM 1998A, mostraram que a presença de α -tal não apresentou efeito nos níveis de hemoglobina, mas reduziu a hemólise nos pacientes com HbSC quando comparados aos pacientes HbSS.

3.2. Haplótipos

As combinações específicas de variações polimórficas ao longo da seqüência de DNA são denominadas de haplótipos e estão relacionados à origem geográfica dessas mesmas variações. Como estes polimorfismos são transmitidos em bloco de geração a geração, os haplótipos permanecem inalterados e servem como marcadores de linhagens evolutivas (FERNANDES, 2001).

O estudo dos haplótipos pode ser utilizado com diferentes objetivos, seja para determinação da origem

unicêntrica ou multicêntrica de uma mutação, para discriminar eventos epistáticos ou para definir o caminho de fluxo de um gene mutante (GALIZA NETO ET AL, 2005).

3.2.1. Haplótipos do gene da globina β^S

Na anemia falciforme, são três os haplótipos mais freqüentes: Benin, Bantu e Senegal. Outros haplótipos descritos, Cameroon e Indo-Saudi são mais raramente encontrados (STEINBERG ET AL, 1996). Estes haplótipos têm diferentes origens étnicas e geográficas. No meio-oeste africano encontra-se o haplótipo Benin, o Bantu é encontrado na região central, leste e sul africanos. No oeste africano encontramos o haplótipo Senegal, enquanto que o Indo-Saudi está presente na Índia e no leste da península arábica. (GONÇALVES ET AL, 2003) (Figura 2)

Figura 2: Distribuição geográfica dos Haplótipos do gene β^S nos Continentes Africano (imagem a) e Asiático (imagem b).

a) Continente Africano



b) Continente Asiático



No Brasil, a distribuição dos haplótipos varia de acordo com a migração forçada ocorrida. Em São Paulo, estudos anteriores em pacientes HbSS, mostraram maior prevalência do haplótipo Bantu (FIGUEIREDO ET AL, 1996). No estado da Bahia, onde ocorreu maior afluxo de indivíduos provenientes do oeste africano, observa-se grande número de indivíduos com haplótipo Benin (GONÇALVES ET AL, 2003) (Figura 3).

Figura 3: Fluxo de imigração forçada entre o Continente Africano e o Brasil



PANTE-DE-SOUSA ET AL (1999) analisando descendentes de escravos em três cidades na região norte brasileira (Curiaú, Pacoval e Trombetas), consideradas como comunidades semi-isoladas, observaram a maior porcentagem de alelos Senegal do Brasil.

3.2.2. Haplótipos do gene da globina β^c

Foi identificada a presença de três haplótipos ligados aos alelos do gene β^c , denominados haplótipos I, II e III (TRAVI ET AL, 1992). A heterogeneidade dos haplótipos associados com o

gene β^c resulta de trocas na posição 5' do cluster do gene da globina beta (NAGEL & STEINBERG, 2001). São raros os estudos de haplótipo na HbCC, sugerindo que ele não tenha importância neste tipo de hemoglobinopatia.

3.2.3. Haplótipos e HbSC

São poucos os estudos de haplótipos em HbSC no mundo. Estudo de STEINBERG ET AL, de 1996, analisando 73 adultos com HbSC mostrou a seguinte frequência de haplótipos β^S : 56% de Benin, 25% do Bantu, 6% de Senegal e 12% de atípicos. Quanto ao haplótipo do gene β^c 71% eram do tipo I, 18% do II e 11% de outros haplótipos. Este estudo também analisou aspectos clínicos e não observou diferença relacionada aos haplótipos, propondo que o fato de, na HbSC, a HbF não ser modulada pelos haplótipos poderia ser responsável pela ausência de efeitos clinicamente significantes.

Dois estudos brasileiros com pacientes HbSC adultos encontraram alta frequência do haplótipo β^S Benin (57,0 e 47,6%) na mesma região geográfica onde observa-se predomínio do haplótipo Bantu nos indivíduos com HbSS, região Sudeste (BELTRÃO, 1996; ALBERTO ET AL, 1998; GIL, 1998). Quanto ao haplótipo do gene β^c , os resultados foram semelhantes ao da

literatura com 67,85% do tipo I, 17,85% do II, 10,71% do III e 3,57 de haplótipo atípico (GIL, 1996).

Esta prevalência de haplótipo Benin em indivíduos HbSC na mesma região onde indivíduos HbSS apresentam predomínio do haplótipo Bantu chamou a atenção e na tentativa de uma melhor elucidação dos mecanismos envolvidos, tivemos como objetivo analisar o haplótipo do gene da globina beta em crianças portadoras de HbSC e compará-lo aos resultados obtidos em indivíduos adultos com a mesma hemoglobinopatia.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Pacientes portadores de HbSC convidados a participar deste estudo foram selecionados entre os acompanhados no ambulatório de Especialidades Pediátricas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM), durante o período de março de 2005 a dezembro de 2007.

Os responsáveis pelos pacientes foram informados sobre os objetivos do projeto e consultados sobre a vontade de participar da pesquisa. Sendo favoráveis, os responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo).

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/EPM (Anexo).

Os critérios de inclusão resumiram-se à presença de HbSC em acompanhamento ambulatorial regular e não houve critérios de exclusão.

Foram incluídos 60 pacientes crianças e adolescentes portadores de HbSC e as amostras de sangue periférico foram obtidas durante as consultas no ambulatório.

MÉTODOS

O DNA (ácido desoxirribonucléico) genômico foi isolado a partir de leucócitos provenientes de amostras de sangue periférico de pacientes segundo a técnica de LEE ET AL, 1998B.

O sangue foi centrifugado para a remoção do plasma, seguido da lise de hemácias com saponina e lavagem com solução de KCl 100mM, Tris 10mM, MgCl₂ 2,5mM, Tween 1%, Triton X100 a 1% e Proteinase K. Após incubação a 60°C por uma hora, foi realizada a purificação do DNA com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico. As amostras de DNA de cada indivíduo foram identificadas e armazenadas em freezer a -20°C.

Para a determinação dos polimorfismos do gene (SUTTON, BOUHASSIRA & NAGEL, 1989) da beta globina foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase, (PCR = *polymerase chain reaction*) com modificações, seguida de digestão. O mapa dos haplótipos do complexo do gene β^S e β^C encontra-se na figura 4.

Em todas as reações, a PCR foi realizada para um volume final de 50 μ L e continha concentração de 10pmol dos primers. A PCR foi realizada no termociclador Perkin Elmer Cetus[®].

Para os primers H2/H3 (Tabela 1), H3/H4 (Tabela 2), H7/H8 (Tabela 3) as condições da reação foram a seguinte: temperatura de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 90 segundos, anelamento a 55°C por 90 segundos, extensão a 72°C por 120 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para os primers H5/H6 (Tabela 4) e H9/H10 (Tabela 5), as condições foram: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 60 segundos, anelamento a 55°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2%, banhado em brometo de etídio e exposto à luz ultravioleta (Alpha Imager™ 2.200, São Leandro, Califórnia, USA).

Cada produto da PCR foi submetido à digestão com enzima específica por 4 horas a 37°C:

- fragmento H2/H3, produto de 782pb, digerido pela enzima HindIII;
- fragmento H3/H4, produto de 762pb, digerido pela enzima HindIII;
- fragmentos H5/H6, de 701pb, e H7/H8, de 614pb, foram digeridos pela enzima HincII e

- fragmento H9/H10, 386pb, digerido pela enzima HinfI.

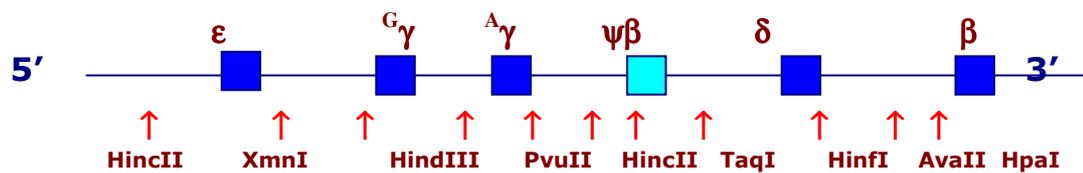
Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose a 1,5%, banhado em brometo de etídio e exposto à luz ultravioleta (Alpha Imager™ 2.200, São Leandro, Califórnia, USA).

A seguinte estratégia foi utilizada para identificação dos haplótipos: iniciou-se com os primers H2/H3 e H7/H8. Nos casos inconclusivos, procedeu-se à reação H5/H6 e, de acordo com os resultados obtidos foram realizadas as reações seguintes H3/H4 ou H9/H10 segundo o organograma disposto na Tabela 6. A reação denominada H11/H12 referida no organograma não foi realizada neste grupo de pacientes.

Análise Estatística

Foi utilizado o teste **t** para comparar as médias das variáveis numéricas. Para verificar a existência de relação entre duas variáveis categóricas, foi utilizado o Teste Qui-quadrado de Pearson (X^2).

Para todos os testes estatísticos foi utilizado o nível de significância de 5% ($\alpha=5\%$), sendo estatisticamente significantes os testes com nível descritivo (p) menor que 0,05.

Figura 4: Haplótipos do complexo do gene da globina β **Haplótipos do gene β^S**

SENEGAL	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
BENIN	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
BANTU	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
SAUDI	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
CAMER	-	-	+	+	-	+			+	+	+

Haplótipos do gene β^C

I	-		+	-	-	+			+	+	-
II	-		-	-	-	+			+	+	-
III	-		-	-	-	-			+	+	-

Ref.: modificado de TALACKI ET AL, 1990 e POWARS, 1991

Tabela 1: Seqüência dos primers utilizados para estudo do polimorfismo H2/H3, tamanho do produto da PCR e dos fragmentos após digestão com enzima HindIII.

Primers			Produto da PCR	Produto digestão
H3	Sense	TGCTGCTAATGCTTCATTAC	782pb	436pb
H2	Antisense	AAGTGTGGAGTGTGCACATG		346pb

Tabela 2: Seqüência dos primers utilizados para estudo do polimorfismo H3/H4, tamanho do produto da PCR e dos fragmentos após digestão com enzima HindIII.

Primers			Produto da PCR	Produto digestão
H3	Sense	TGCTGCTAATGCTTCATTAC	762pb	360pb
H4	Antisense	TAAATGAGGAGCATGCACAC A		400pb

Tabela 3: Seqüência dos primers utilizados para estudo do polimorfismo H7/H8, tamanho do produto da PCR e dos fragmentos após digestão com enzima HincII.

Primers			Produto da PCR	Produto digestão
H7	Sense	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	614pb	495pb
H8	Antisense	GGACCCTAACTGATATAACTA		120pb

Tabela 4: Seqüência dos primers utilizados para estudo do polimorfismo H5/H6, tamanho do produto da PCR e dos fragmentos após digestão com enzima HincII.

Primers			Produto da PCR	Produto digestão
H5	Sense	GAACAGAAGTTGAGATAGAG	701pb	364pb
H6	Antisense	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT		337pb

Tabela 5: Seqüência dos primers utilizados para estudo do polimorfismo H9/H10, tamanho do produto da PCR e dos fragmentos após digestão com enzima HinfI.

Primers			Produto da PCR	Produto digestão
H9	Sense	CTACGCTGACCTCATAAATG	386pb	239pb
H10	Antisense	CTAATCTGCAAGAGTGTCT		147pb

Tabela 6: Organograma para identificação dos haplótipos

H2/H3	H7/H8		H5/H6	
+/+	+/-	BAN/I		
-/-	+/+	BEN/II		
+/-	+/+	BEN/I SEN/II CAM/II SAU/II	-/- BEN/I ou CAM/II	H3/H4 -/- BEN/I +/- CAM/II
			+/- SEN/II SAU/II	H9/H10 +/+ SEN/II - /+ CAM ou SAU/II
+/-	+/-	BEN/III SEN/III BAN/II SAU/III CAM/III	+/- SEN/III ou SAU/III	H9/H10 +/+ SEN/III - /+ CAM ou SAU/III
			-/- BEN/III BAN/II CAM/III	H3/H4 +/- CAM/III -/- BEN/III ou BAN/II
				H11/H12 -/- BEN/III +/- BAN/II

LEGENDA:

BEN = Benin

SEN = Senegal

CAM = Cameroon

BAN = Bantu

SAU = Saudi

RESULTADOS

Do total de 60 pacientes analisados, 25 (41,66%) eram do sexo masculino e 35 (58,33%) do sexo feminino, com média de idade de 3,72 anos e desvio padrão de 3,854. A mediana foi de 2,0 anos e as idades variaram de 1 a 17 anos.

Dos sessenta cromossomos estudados para o haplótipo β^S , observou-se a presença do haplótipo Bantu (56,7%) em 34 pacientes, Benin em 25 pacientes (41,7%) e Senegal em 1 paciente (1,6%), como observado na Tabela 7.

Tabela 7: Distribuição dos haplótipos β^S nos 60 cromossomos estudados

Haplótipos β^S	cromossomos	%
Bantu	34	56,7
Benin	25	41,7
Senegal	1	1,6
TOTAL	60	100,0

Na Tabela 8, observa-se a distribuição do haplótipo β^c nos 60 cromossomos analisados. O tipo I foi observado em 54 pacientes (90%), o II e o III (5%) em 3 pacientes.

Tabela 8: Distribuição dos haplótipos β^c nos 60 cromossomos estudados

Haplótipos β^c	cromossomos	%
I	54	90
II	3	5
III	3	5
TOTAL	60	100,0

Como resultado da análise do genótipo, pôde-se observar 55% (33/60) de Bantu/I, 21% (21/60) de Benin/I, 5% (3/60) de Benin/II e cada um dos genótipos restantes, Bantu/III, Benin/III e Senegal/ III, correspondeu a 1,6% (1/60) (Tabela 9).

Tabela 9: Distribuição dos genótipos relativos ao haplótipo β^S/β^C no grupo total de pacientes estudados

Genótipo β^S/β^C	pacientes	%
Bantu/ I	33	55,0
Benin/ I	21	35,0
Benin/ II	3	5,0
Bantu/ III	1	1,66
Benin/ III	1	1,66
Senegal/ III	1	1,66
TOTAL	60	100,0

Análise comparativa dos resultados

Com o objetivo de verificar se existe ou não diferença na frequência dos haplótipos em diferentes faixas etárias, realizamos o estudo comparativo dos dados deste estudo com trabalho anteriormente realizado em população de indivíduos adultos com HbSC do nosso Serviço (GIL, 1998).

Na tabela 10 mostramos quadro comparativo dos diferentes genótipos encontrados nos dois trabalhos.

A análise do genótipo SC nestas duas populações mostrou que os genótipos Bantu/I e Benin/I foram os mais freqüentes nos dois grupos, entretanto, enquanto nas crianças observa-se maior número de genótipo Bantu/I, nos adultos ocorre o inverso.

Com o objetivo de realizarmos análise estatística destes dados, os grupos com menos indivíduos foram reunidos ou suprimidos, conforme mostrado na Tabela 11. A análise estatística foi significativa ($p=0,0398$).

Tabela 10: Distribuição dos genótipos SC (β^S/β^C) nos dois estudos: atual (crianças) e anterior (adultos).

Genótipo β^S/β^C	Crianças (%)	Adultos (%)
Bantu/ I	33 (55,0)	8 (28,5)
Benin/ I	21 (35,0)	10 (37,5)
Bantu/ II	0	1 (3,6)
Benin/ II	3 (5,0)	4 (14,2)
Bantu/ III	1 (1,66)	1 (3,6)
Benin/ III	1 (1,66)	1 (3,6)
Benin/atípico	0	1 (3,6)
Cameroon/ I	0	1 (3,6)
Senegal/ III	1 (1,66)	0
Atípico/ III	0	1 (3,6)
TOTAL	60	28

Tabela 11: Distribuição dos genótipos SC nos dois grupos de pacientes, reunindo os grupos com menor número de pacientes. Nesta tabela, os haplótipos β^S Cameroon, Senegal e atípico não foram contabilizados.

Genótipos	Crianças (%)	Adultos (%)
Bantu/I	33 (55,9)	08 (30,8)
Bantu/II ou Bantu/III	01 (1,7)	02 (7,7)
Benin/I	21 (35,6)	10 (38,5)
Benin/II ou Benin/III	04 (6,8)	06 (23,0)
Total	59 (100,0)	26 (100,0)

$X^2 = 8,323$ $p = 0,0398$
Graus de liberdade = 3

Quando comparamos apenas os genótipos que apresentaram maior frequência nas duas populações, apesar da diferença entre elas, não foi observado diferença estatística ($p = 0,2752$). (Tabela 12)

Tabela 12: Comparação dos genótipos SC mais freqüentes nos dois grupos analisados.

Genótipos	Crianças (%)	Adultos (%)	Total (%)
Bantu/I	33 (46,0)	08 (11,0)	41 (57,0)
Benin/I	21 (29,0)	10 (14,0)	31 (43,0)
Total	54 (75,0)	18 (25,0)	72 (100,0)

Fisher, $p = 0,2752$

Na Tabela 13, comparamos os dados do haplótipo β^s nos dois grupos analisados e não foi visto diferença estatística ($p = 0,1144$).

Tabela 13: Comparação do haplótipo β^s nos dois grupos analisados

Haplótipos	Crianças (%)	Adultos (%)
Bantu	34 (56,7)	10 (35,7)
Benin	25 (41,7)	16 (57,2)
Outros	01 (1,6)	02 (7,1)
Total	60 (100,0)	28 (100,0)

$X^2 = 4,337$ $p = 0,1144$
 graus de liberdade = 2

Quando comparamos apenas os haplótipos Bantu e Benin, tabela 14, não observamos diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,1570$).

Tabela 14: Comparação da frequência dos haplótipo Bantu e Benin nos dois grupos analisados.

Haplótipos	Crianças (%)	Adultos (%)	Total (%)
Bantu	34 (40,0)	10 (12,0)	44 (52,0)
Benin	25 (29,0)	16 (19,0)	41(48,0)
Total	59 (69,0)	26 (31,0)	85 (100,0)

Fisher, $p = 0,1570$

Quando comparamos a frequência do haplótipo Bantu em relação a qualquer outro haplótipo β^S , tabela 15, não observamos diferença significativa ($p = 0,1083$).

Tabela 15: Comparação entre Bantu e outros genótipos encontrados

Haplótipos	Crianças (%)	Adultos (%)	Total (%)
Bantu	34 (39,0)	10 (11,0)	44 (50,0)
Outros	26 (30,0)	18 (20,0)	44 (50,0)
Total	60 (68,0)	28 (32,0)	88 (100,0)

Fisher, $p = 0,1083$

Quando analisamos a frequência dos haplótipos β^S dividindo as amostras segundo faixa etária (≤ 3 anos, 3 a 18 anos e ≥ 18 anos), não observamos diferença estatística, tanto na análise global dos haplótipos (Tabela 16, $p = 0,3232$), quanto na análise apenas dos haplótipos Bantu e Benin (Tabela 17, $p = 0,1871$).

Tabela 16: Comparação dos haplótipos β^S segundo faixa etária.

Haplótipos	≤ 3 anos N (%)	3 – 18 anos N (%)	≥ 18 anos N (%)
Bantu	21 (56,8)	13 (56,5)	10 (35,7)
Benin	15 (40,5)	10 (43,5)	16 (57,2)
Outros	01 (2,7)	00 (0)	02 (7,1)
Total	37 (100,0)	23 (100,0)	28 (100,0)

$X^2 = 4,667$ $p = 0,3232$
 graus de liberdade = 4

Tabela 17: Comparação do haplótipo Bantu com qualquer outro haplótipo, de acordo com a faixa etária.

Haplótipos	≤ 3 anos N (%)	3 – 18 anos N (%)	≥ 18 anos N (%)
Bantu	21 (56,8)	13 (56,5)	10 (35,7)
Outros	16 (43,2)	10 (43,5)	18 (64,3)
Total	37 (100,0)	23 (100,0)	28 (100,0)

$X^2 = 3,353$ $p = 0,1871$
 graus de liberdade = 2

DISCUSSÃO

A hemoglobina S (HbS) é a mais importante e freqüente das variantes estruturais da hemoglobina A (HbA) em populações de diferentes regiões geográficas (SERJEANT, 1992; COSTA, 2004). Apesar de ser mais comum em pessoas de etnia negra, estudos populacionais têm demonstrado a presença de HbS em pessoas descendentes de populações do Mediterrâneo, Arábia e Índia (KAN & DOZY, 1980).

Apresenta extrema diversidade de manifestações clínicas nos diferentes indivíduos, que podem variar desde quadro clínico extremamente grave até outros praticamente assintomáticos. Embora a falcização eritrocitária seja o passo fisiopatológico fundamental da doença, as manifestações clínicas e hematológicas são influenciadas por vários outros genes (COSTA, 2004).

A hemoglobinopatia SC inclui-se dentre as Síndromes Falciformes, onde podemos destacar, além da anemia falciforme propriamente dita, a HbS associada às β talassemias, em suas várias formas, e a HbS associada à HbD Punjab; HbO Arab e Hb Lepore (WEATHERALL & CLEGG, 1981; DACIE 1988).

Dentre as alterações clínicas das síndromes falciformes, destaca-se o aumento da suscetibilidade a infecções, secundário predominantemente à hipofunção esplênica, razão importante de óbito na primeira infância (ROGERS ET AL, 1978;

DRISCOLL ET AL, 1987). Assim, com o intuito de minimizar esta alta frequência de óbitos, além de medidas terapêuticas específicas (penicilinoterapia profilática, vacinação adequada e acompanhamento médico), foi instituído o diagnóstico neonatal de hemoglobinopatias pela Portaria do Ministério da Saúde nº 822, de 06 de junho de 2001 (RAMALHO ET AL, 2002).

Como o Brasil apresenta uma população com diferentes origens raciais e diversificados graus de miscigenação, a implantação do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias inclui todos os recém-nascidos independentemente do grupo étnico (DAUDT ET AL, 2002; RAMALHO ET AL, 2002; BACKES ET AL, 2005).

A partir da implantação da triagem neonatal, dados iniciais do estado de Minas Gerais mostraram 3,6% de indivíduos com variantes estruturais da hemoglobina e um caso de HbSC para cada 3.450 recém-nascidos (PAIXÃO ET AL, 2001). Estes dados chamaram a atenção por mostrar uma frequência de HbSC até então desconhecida.

Embora seja a segunda hemoglobinopatia mais freqüente no Brasil, a HbSC tem sido relativamente pouco estudada em nosso meio. Sua fisiopatologia é semelhante à da anemia falciforme, consistindo, basicamente, de complicações decorrentes da falcização, da hemólise e das crises vaso-oclusivas

(BELTRÃO, 1996; STEINBERG ET AL, 1996; ALBERTO ET AL, 1998; GIL ,1998; NAGEL & STEINBERG, 2001).

Três estudos brasileiros em HbSC procuraram analisar os haplótipos β^S na população com HbSC e, dado constante nestes estudos, foi a maior freqüência do haplótipo Benin (BELTRÃO, 1996; ALBERTO ET AL, 1998; GIL ,1998). Este resultado comparado a estudos em população HbSS na mesma região (estado de São Paulo), mostrou diferença evidente, já que o haplótipo β^S mais encontrado foi o Bantu (ZAGO, FIGUEIREDO & OGO, 1992; GONÇALVES ET AL, 1994; FIGUEIREDO ET AL, 1996).

A discrepância de dados de freqüência do haplótipo β^S poderia estar relacionada a movimentos migratórios, por exemplo uma maior freqüência de indivíduos oriundos da Bahia, onde predomina o haplótipo Benin (GONÇALVES ET AL, 2003). Porém, outra explicação possível seria uma ação moduladora do haplótipo Benin, associado a manifestações clínicas menos graves em indivíduos HbSS, que levaria à maior sobrevivência destes indivíduos na vida adulta (NAGEL ET AL, 1985; FIGUEIREDO ET AL, 1993).

Para tentar responder a esta questão, analisamos 30 crianças encaminhadas pela triagem neonatal da cidade de São Paulo com diagnóstico recente e, portanto, com acompanhamento adequado desde o nascimento. Além disso, foram também estudadas 30 crianças com HbSC já em seguimento no

Ambulatório de Pediatria da UNIFESP/EPM ou seja, não oriundas da triagem neonatal. Finalmente, estes dados foram comparados aos de 28 indivíduos adultos com a mesma hemoglobinopatia e estudados anteriormente (BELTRÃO, 1996; GIL, 1998).

Como esperado, a distribuição do haplótipo β^C neste grupo de pacientes não mostrou diferença em relação a estudos anteriores (SCHROEDER ET AL, 1989; BELTRÃO, 1996; STEINBERG ET AL, 1996; ALBERTO ET AL, 1998; GIL, 1998; NAGEL & STEINBERG, 2001).

Ao compararmos o haplótipo β^S das crianças estudadas com o obtido nos indivíduos adultos, notamos uma inversão de haplótipos, ou seja, maior frequência de Bantu em crianças e de Benin em adultos, independente de dividirmos o grupo de crianças quanto à realização de triagem neonatal. Entretanto, esta diferença não foi significativa, provavelmente devido ao pequeno tamanho da amostra.

Realizamos diferentes comparações no sentido de identificar se estas populações, crianças e adultos, apresentariam diferença estatística. Apenas a análise de genótipos mostrou diferença significativa (tabela 11), provavelmente devido ao predomínio evidente do genótipo Bantu/I em crianças (55,9%).

A gravidade clínica da HbSC é heterogênea e assim como na HbSS e, fatores genéticos co-herdados com a mutação

falciforme necessitam ser elucidados quanto aos seus possíveis efeitos moduladores. (LEE ET AL, 1998A)

A partir dos dados obtidos, não podemos afastar a possibilidade do haplótipo Bantu estar associado a pior manifestação clínica, interferindo na sobrevida dos pacientes com HbSC. Estudos com maior número de indivíduos e, preferentemente, multicêntricos são necessários para melhor elucidação do papel dos haplótipos do gene beta nas manifestações clínico-laboratoriais das Síndromes Falciformes.

CONCLUSÕES

A maior prevalência encontrada do haplótipo β^C I (90%) confirma achados anteriores na população do estado de São Paulo e é semelhante aos encontrados em outras populações, como Estados Unidos e Jamaica.

O haplótipo β^S mais observado nas crianças analisadas foi o do tipo Bantu (56,7%), seguido pelo Benin (41,7%) e Senegal (1,6%).

Foi observado diferença na frequência dos haplótipos β^S entre crianças e adultos, porém esta não se mostrou significativa.

Estudos com maior número de indivíduos e, preferentemente, multicêntricos são necessários para melhor elucidação do papel dos haplótipos do gene da globina beta nas manifestações clínico-laboratoriais das Síndromes Falciformes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberto FL, Bordin S, Beltrão ACS, Aranalde MP, Figueiredo MS, Saad STO, Costa FF. beta-Globin gene haplotypes among Brazilian patients with hemoglobin SC disease. *British Journal of Hematology* 1998; 102(1-I): 48-49.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Falciformes. Brasília, Ministério da Saúde, 2002.

Backes CE, Mallmann FG, Dassi T, Bazzo ML, Santos-Silva M. Triagem neonatal como um problema de saúde pública. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2005; 27(1):43-47.

Beltrão ACS. Caracterização dos Haplótipos do Complexo do Gene da Globina Beta em uma População de Portadores de Hemoglobinopatia C e SC. 1996. Dissertação (Medicina (Hematologia)) - Universidade Federal de São Paulo

Costa FF, Anemia Falciforme, pg 289. *In: Hematologia: Fundamentos e Prática*. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R, editores. 1º edição. Editora Atheneu, São Paulo, 2004.

Dacie J. The Hemolytic anemias. Volume 2: The hereditary haemolytic anemias. Part 2. 3ª edição. Churchill Livingstone. Edinburgh, 1988, 588pp.

Daudt LE, Zechmaister D, Portal L, Neto EC, Silla LMR, Giugliani R. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 2002; 18: 833-841.

Driscoll MC, Lerner N, Anyane-Yeboa K, Maidman J, Warburton D, Schaefer-Rego K, Hsu R, Ince C, Malin J, Pallai M, Mears JG, Bank A. Prenatal diagnosis of sickle cell hemoglobinopathies: The experience of the Columbia University comprehensive center for sickle cell disease. *American Journal of Human Genetics* 1987; 40: 548-558.

Embury SH, Steinberg MH. Genetic Modulators of Disease. 279-298. *In: Embury SH, Hebbel RP, Mohandas N, Steinberg MH, editores. Sickle cell disease. Basic principles and clinical practice*. Raven Press, New York, Primeira Edição, 1994.

- Fabry ME. Laboratory Diagnosis of Hemoglobin Disorders, and Animal Models for Their Study. 910-940. *In: Steinberg MH, Forget B,G, Higgs DR, Nagel RL. Disorders of Hemoglobin – Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Cambridge University Press, 2001.*
- Fernandes T. Especiais – genética e arqueologia de mãos dadas. *Ciência Hoje on-line*, 2001. <http://cienciahoje.uol.com.br/3939> acessado em 01/05/08.
- Figueiredo MS, Kerbauy J, Gonçalves MS, Arruda VR, Saad ST, Sonati MF, Stoming T, Costa FF. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *American Journal of Hematology* 1996; 53: 72-76.
- Galiza Neto GC, Pitombeira MS, Vieira HF, Vieira M, Farias DAB. Análise dos haplótipos do gene da β^S -globina no Ceará. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2005; 41: 315-321.
- Gil ICP. Influência dos Haplótipos do Gene da Globina Beta em Manifestações Clínicas Seleccionadas de Pacientes Portadores de Hemoglobinopatia SC e C Homozigota. 1998. Dissertação (Medicina (Hematologia)) - Universidade Federal de São Paulo
- Gonçalves MS, Bonfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A, Bomfim G, Adorno EV, Albuquerque AL, Pontes A, Dupuit MF, Fernandes GB, dos Reis MG. β^S -Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003; 36: 1283-1288.
- Gonçalves MS, Nechtman JF, Figueiredo MS, Kerbauy J, Arruda VR, Sonati MF, Saad SOT, Costa FF, Stoming TA. Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the β^S haplotypes. *Hum Hered* 1994; 44: 322-327.
- Hillman RS, Ault KA, Rinder HM. *Hematology in clinical practice*. 4a edição, 2005. McGraw-Hill, New York.
- Hirsh RE, Lin MJ, Nagel RL. The inhibition of hemoglobin C crystalization by hemoglobin F. *The Journal of Biological Chemistry* 1987; 263: 5936-5939.

- Inati A, Taher A, Bou Alawi W, Koussa S, Kaspar H, Shbaklo H, Zalloua PA. β globin gene cluster haplotypes and HbF levels are not the only modulators of sickle cell disease in Lebanon. *European Journal of Hematology* 2003; 70: 79-83.
- Kan YW, Dozy AM. Evolution of the hemoglobin S and C genes in world populations. *Science* 1980, 209: 388-390.
- Koduri PR, Agbemadzo B, Nathan S. Hemoglobin S-C disease revisited: Clinical study of 106 adults. *American Journal of Hematology* 2001; 68: 298-300.
- Lee K, Préhu C, Mérault G, Kéclard L, Roudot-Thoravai F, Bachir D, Wajcman H, Denis L, Galactéros F. Genetic and hematological studies in a group of 114 adult patients with SC sickle cell disease. *American Journal of Hematology* 1998A; 59: 15-21.
- LEE TH, SAKAHARA NS, FIEBIG EW, HIRSCHKORN DK, JOHNSON MP. Quantification of white cell subpopulation by polymerase chain reaction using frozen whole blood sample. *Transfusion* 1998B; 38: 262-270.
- Lima da Silva MA. Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme. 2006. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, Zohoun I, Wajcman H, Baudin V, Labie D. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell in Africa – The Senegal type and the Benin type. *The New England Journal of Medicine* 1985; 312: 880-884.
- Nagel RL, Fabry ME, Steinberg MH, The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Reviews* 2003; 17: 167-178.
- Nagel RL, Steinberg MH. Hemoglobin SC Disease and HbC Disorders. 756-783. *In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. Disorders of Hemoglobin – Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Cambridge University Press, 2001.*

- Noguchi CT, Dover GJ, Rodgers GP, Serjeant GR, Antonarakis SE, Anagnou NP, Higgs DR, Weatherall DJ, Schechter AN. Alpha thalassemia changes erythrocyte heterogeneity in sickle cell disease. *The Journal of Clinical Investigation* 1985; 75: 1632-1637.
- Öner C, Dimovski AJ, Olivieri NF, Schiliró G, Codrington JF, Fattoum S, Adekile AD, Öner R, Yüregir GT, Altay Ç, Gurgey A, Gupta RB, Jogessar VB, Kitundu MN, Loukopoulos D, Tamagnini GP, Ribeiro MLS, Kutlar F, Gu LH, Lanclos KD, Huisman THJ. β^S haplotypes in various world populations. *Human Genetics* 1992; 89: 99-104.
- Paixão MC, Cunha Ferraz MH, Januário JN, Viana MB, Lima JM. Reliability of isoelectrofocusing for the detection of HbS, HbC, and HbD in a pioneering population-based program of newborn screening in Brazil. *Hemoglobin* 2001; 25:297-303.
- Pante-de-Sousa G, Mousinho-Ribeiro RC, Santos EJM, Guerreiro JF. β -globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West África. *Annals of Human Biology* 1999; 26: 365-373.
- Powars D, Hiti A. Sickle Cell Anemia - β^S Gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *American Journal of Diseases of Children* 1993; 147: 1197-1202.
- Powars DR. β^S -Gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1991; 5(3): 475-493.
- Ramalho AS, Magna LA, Paiva e Silva RB. A Portaria MS nº 822/01 e a triagem neonatal das hemoglobinopatias. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2002; 24: 244-250.
- Rogers DW, Clarke JM, Cupidore L, Ramlal AM, Sparke BR, Serjeant GR. Early deaths in Jamaican children with sickle cell disease. *British Medical Journal* 1978, 1: 1515-1516.
- Schechter AN, Noguchi CT. Sickle hemoglobin polymer: structure – function correlates. *In*: Embury SH, Hebbel RP, Mohandas N, Steinberg MH, editores. *Sickle cell disease. Basic principles and clinical practice*. Raven Press, New York, Primeira Edição, 1994.

- Schroeder WA, Powars DR, Kay LM, Chan LS, Huynh V, Shelton JB, Shelton JR. β cluster haplotypes, α gene status, and hematological data from SS, SC and S- β -Thalassemia patients in Southern California. *Hemoglobin* 1989; 13(4): 325-353.
- Serjeant GR. Sickle cell disease. Oxford University Press, Segunda Edição, 1992, 631 pp.
- Steinberg MH, Coleman MB, Adams JG, Platica O, Gillette P, Rieder RF. The effects of alpha-thalassaemia in HbSC disease. *British Journal of Haematology* 1983; 55: 487-492.
- Steinberg MH, Nagel RL, Lawrence C, Swaminathan V, Lu ZH, Plonczynski M, Harrell A. β -globin gene haplotype in HbSC disease. *American Journal of Hematology* 1996; 52: 189-191.
- Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *New England Journal of Medicine* 1999; 340:1021-1030.
- Steinberg MH. The sickle hemoglobinopathies – Genetic analyses of common phenocopies and new molecular approaches to treatment. *American Journal of Medical Sciences* 1984; 288: 169-174.
- Steinberg, MH, Sickle Cell Trait. 811-830 *In*: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. Disorders of Hemoglobin – Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Cambridge University Press, 2001.
- Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin cluster haplotypes. *American Journal of Hematology* 1989; 32: 66-69.
- Talacki CA, Rappaport E, Schwartz E, Surrey S, Ballas SK. β globin gene cluster haplotypes in HB C heterozygotes. *Hemoglobin* 1990; 14(3): 229-240.
- Tomé-Alves R, Marchi-Salvador DP, Orlando GM, Palharini LA, Imperial RE, Naoum PC, Bonini-Domingos CR. Hemoglobinas AS/Alfa talassemia – importância diagnóstica. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2000; 22: 388-394.
- Travi M, Cremonesi L, Primignani P, Di Benedetto S, Testa R, Schiliró G, Ferrari M. Molecular characterization of hemoglobin C in Sicily. *American Journal of Hematology* 1992; 39: 5-8.

WEATHERALL DJ, CLEGG JB. The thalassaemia syndromes. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Terceira edição, 1981, 875 pp.

Wyszynski DF, Baldwin CT, Cleves MA, Amirault Y, Nolan VG, Farrell JJ, Bisbee A, Kutlar A, Farrer LA, Steinberg MH. Polymorphisms near a chromosome 6q QTL area are associated with modulation of fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia. Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand) 2004; 50: 23-33.

Zago MA, Estrutura, Síntese e Genética das Hemoglobinas, pg 269. *In: Hematologia: Fundamentos e Prática*. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R, editores. 1º edição. Editora Atheneu, São Paulo, 2004A.

Zago MA, Defeitos Hereditários das Hemoglobinas, pg 279. *In: Hematologia: Fundamentos e Prática*. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R, editores. 1º edição. Editora Atheneu, São Paulo, 2004B.

Zago MA, Figueiredo MS, Ogo SH. Bantu β^S cluster haplotype predominates among brazilian blacks. Am J Phys. Anthropol 1992, 88: 295-298.

ANEXOS



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 12 de agosto de 2005.
CEP 0612/05

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) ANA ISABEL MALVA SILVA

Co-Investigadores: Maria Stella Figueiredo (orientador), Josefina Aparecida Pellegrini Braga, Faustino Moreira Neto
Disciplina/Departamento: Hematologia e Hemoterapia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Haplótipos do gene da globina beta em pacientes com hemoglobinopatia sc em uma população brasileira”**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Intervenção diagnóstica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco mínimo, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue.

OBJETIVOS: Comparar as frequências dos alelos Bs e Bc em populações com HbSC em diferentes faixas etárias..

RESUMO: Serão estudados 60 portadores de HbSC, acompanhados ambulatorialmente no Ambulatório de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo. Serão incluídos todos os pacientes com hemoglobinopatia SC de 0 a 13 anos, divididos em 2 grupos: I: de recém nascido à crianças com idade menor ou igual a 3 anos e II: crianças de 3 até 3 anos. Será realizada eletroforese para confirmação da HbC, teste de solubilidade das hemoblobinas para confirmação da HbS. Será realizado hemograma em contador eletrônico, e análise de DNA por técnica de PCR..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo fundamentado, analisando o gene da globina Beta em pacientes com hemoglobinopatia SC..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos, sendo utilizadas técnicas de domínio do laboratório..

TCLE: .

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo - R\$ 13000,00.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 7/8/2006 e 2/8/2007.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

HAPLÓTIPOS DO GENE DA GLOBINA BETA EM PACIENTES COM HEMOGLOBINOPATIA SC EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Para ter maior conhecimento clínico e científico sobre Hemoglobinopatia SC, médicos e pesquisadores deste hospital desenvolvem pesquisas clínicas. Através desta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos desta doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca de fatores que contribuam para o entendimento da gravidade desta doença.

Para fazer este estudo é necessário comparar os resultados obtidos em pacientes que tenham Hemoglobinopatia SC, como seu filho(a), em diferentes faixas etárias. Por isso, você está sendo convidado a colaborar com este estudo, autorizando a coleta de 5 mL de sangue de seu filho(a) para pesquisa científica, através de uma punção venosa. Este sangue será utilizado para avaliação de fatores genéticos ligados à gravidade da anemia falciforme, chamados de haplótipos.

Em caso de dano pessoal causado por este procedimento, seu filho(a) terá direito a tratamento médico nesta instituição, bem como às indenizações legalmente previstas. Todo o material colhido e usado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, a privacidade e identidade de seu filho(a) serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do voluntário. Além disso, todo material colhido será utilizado somente para esta pesquisa, ou seja, não haverá utilização futura.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo, de acordo com o processo nº 612/05, e todo estudo que vier a utilizar este material será previamente apresentado à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do hospital.

Concordando com a participação, do modo descrito, é necessário esclarecer que seu filho(a) não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar que seu filho(a) participe deste estudo, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, sobre o atendimento dele e de parentes ou conhecidos seus ou sobre um futuro atendimento seu neste hospital. Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Ana Isabel, que pode ser encontrada na disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Rua Botucatu, 740 – 3º andar do prédio dos ambulatórios, fone 557-1550. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 1º andar cjto 14, fone 5571-1062, tel/FAX: 5539-7162.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim. Eu discuti com a Dra. Ana Isabel sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente que meu filho(a) participe deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Representante Legal: _____ Data: __/__/__
Testemunha: _____ Data: __/__/__

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Responsável pelo projeto:

_____ Data: __/__/__