

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DEBORA REGINA DAGA

**Variabilidade genética do exon 1 do gene da beta globina
humana em indivíduos normais e portadores da
hemoglobina S**

**CURITIBA
2009**

DEBORA REGINA DAGA

Variabilidade genética do exon 1 do gene da beta globina humana em indivíduos normais e portadores da hemoglobina S

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. Geraldo Picheth

Co-orientadores:

Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento

Prof^a. Dr^a. Maria Suely Soares Leonart

**CURITIBA
2009**

TERMO DE APROVAÇÃO

DEBORA REGINA DAGA

Título: "Variabilidade genética do exon I do gene da beta globina humana em indivíduos normais e portadores da hemoglobina S"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, área de concentração Análises clínicas.



Prof. Dr. Geraldo Picheth
Orientador



Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Universidade Federal do Paraná



Profa. Dra. Ana Claudia Bonatto
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 19 de março de 2009.

Dedicado à

Osmar

Amélia

Tatiana

Guilherme

Henrique

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor Geraldo Picheth pela confiança, paciência, dedicação, disponibilidade, compreensão, pelos ensinamentos e conselhos dados. Este trabalho não seria possível sem sua ajuda.

Aos meus co-orientadores Professora Doutora Maria Suely Soares Leonart e Professor Doutor Aguinaldo José do Nascimento, pela compreensão e por toda ajuda prestada durante o trabalho.

Ao Professor Doutor Emanuel Maltempo de Souza por toda ajuda e disponibilidade.

A Farmacêutica-Bioquímica Cinthia Pelissari pela colaboração na obtenção das amostras.

A todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para esta pesquisa, em especial Michelle da Cunha Torres, Roseli Wassem, Valter Baura, Roseli Prado, Cyntia Fadel-Picheth, Noemi Farah, Maria da Graça de Toledo, Ligia Maria Claro, Julio.

A amiga Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos por toda sua ajuda e pela sua amizade.

Ao Doutor Luso Mario Silveira, por todo o apoio e incentivo.

Aos meus irmãos, Tatiana, Guilherme e Henrique, pelo apoio, pelo amor e por toda a força que sempre me deram, compreendendo a ausência e tornando meus dias mais felizes.

E às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, Osmar e Amélia, pelo amor sem limites, onde encontro conforto e colo para os dias difíceis, onde encontro alegria, compreensão e amor sempre. Obrigada por acreditarem na minha capacidade, por todo o apoio, incentivo, por estarem do meu lado em todos os momentos da minha vida. Nenhum gesto seria grande o suficiente para agradecer-los.

“Há um tempo em que é preciso abandonar
as roupas usadas que já têm a forma
do nosso corpo, e esquecer os nossos
caminhos que nos levam sempre aos
mesmos lugares. É o tempo da
travessia; e se não ousarmos fazê-la,
teremos ficado para sempre, à margem
de nós mesmos”.
(Fernando Pessoa)

RESUMO

A anemia falciforme é resultante da mutação de um nucleotídeo no gene da beta globina humana, que promove a substituição de um resíduo de ácido glutâmico no sexto códon por uma valina. Esta alteração promove a formação de polímeros de hemoglobina S desoxigenada, que alteram a forma do eritrócito e são responsáveis pelos efeitos clínicos, como a vaso-oclusão, associados a esta patologia. A prevalência do alelo S na população brasileira é de aproximadamente 2,3%, predominando em afro-brasileiros, e cerca de 1000 novos casos são reportados por ano. Neste trabalho, comparou-se a eficiência dos métodos de triagem para a hemoglobina S realizados em bancos de sangue (teste de solubilidade, teste de falcização e eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino) com a detecção da mutação S (GAG → GTG; rs344) pelo ensaio de PCR-RFLP utilizando a enzima *HpyF3* I. Novas variações genéticas no gene da beta globina foram triadas na região que flanqueia a mutação S utilizando a técnica de PCR-SSCP. As concentrações séricas de parâmetros bioquímicos foram associadas com os grupos em estudos. A amostra foi composta por 498 indivíduos coletados no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), classificados por ensaios de triagem para a presença da HbS em Grupo AA (n=224, grupo controle normal), Grupo AS (n=231, pacientes com traço falcêmico) e Grupo SS (n=45, pacientes com anemia falciforme). A comparação entre os ensaios de triagem convencionais com a detecção da mutação por PCR-RFLP apresentou uma concordância de aproximadamente 98%. O único paciente que apresentou divergência nas análises mostrou-se como SS nos ensaios de triagem e AS no ensaio de PCR-RFLP, resultado confirmado por seqüenciamento de DNA. A hipótese prevalente é que este indivíduo apresente uma dupla heterozigose com o alelo S, sendo a HbD-Los Angeles a outra variante possivelmente envolvida, pela sua maior freqüência em nossa população. O ensaio de PCR-SSCP permitiu identificar duas variações no mesmo sítio polimórfico na população em estudo. As variações HBB:c.9C>T e HBB:c.9C>G, a última observada em apenas um indivíduo (0,2% da amostra). A variação HBB:c.9C>T apresentou uma freqüência do alelo T de 14% na amostra em estudo e a freqüência deste alelo foi significativamente menor nos grupos que contemplam o alelo S. A concentração sérica de colesterol total reduziu significativamente nos grupos que apresentam o alelo S, mostrando uma redução de cerca de 20% no grupo com anemia falciforme quando comparado ao grupo AA, sendo o parâmetro bioquímico que isoladamente melhor discriminou os grupos em estudo. Concentrações de colesterol total menores que 150 mg/dL associadas a concentrações de proteína total superiores a 7,0 g/dL permitiram identificar 70% dos indivíduos do grupo SS, sendo estes parâmetros laboratoriais sugeridos como biomarcadores para a patologia em estudo. Foi demonstrado que as concentrações de produtos de glicação avançada fluorescentes, marcadores de processos inflamatórios, não estão associadas com a anemia falciforme na amostra em estudo.

Palavras chave: anemia falciforme, mutação S, gene da beta globina, PCR-RFLP, PCR-SSCP, variação genética, parâmetros bioquímicos.

ABSTRACT

Sickle cell disease results of a point mutation in the human beta globin gene. The substitution of a glutamic acid for valine on codon 6 promotes the variant hemoglobin (HbS) to polymerize when deoxygenated. This process changes the erythrocyte shape and it is responsible for the pathogenic effects such as vaso-occlusion, associated with this pathology. The prevalence of S allele in Brazilian population is approximately 2.3%. Sickle cell anemia is more predominant in Afro-Brazilian descendants, and about 1,000 of new cases are reported each year. In this work, we compared the efficiency of the S hemoglobin detection methodologies performed in Blood Banks (sulfation test, solubilization test and alkaline Hb electrophoresis) with the DNA mutation detection (GAG → GTG; rs344) by PCR-RFLP with *HpyF3I* as the restriction enzyme. Also, new genetic variations were searched with PCR-SSCP methodology in the S mutation flanking region. Finally, serum levels of biochemical parameters were compared among the studied groups. The blood samples of 498 subjects were collected in the Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) and classified by the screening assays in Group AA (n=224, control group), Group AS (n=231, patients with sickle cell trait) and Group SS (n=45, patients with sickle cell anemia). The comparison among blood bank screening for HbS detection with PCR-RFLP showed an agreement of about 98%. The only one patient which showed different results was reported as SS in the screening assays and as AS and the PCR-RFLP methodology. The last result was confirmed by DNA sequence analysis. The first hypothesis was that the subject involved showed double heterozygosity with the S allele and the other hemoglobin such as HbD-Los Angeles which has the higher frequency in our population. The PCR-SSCP methodology were able to identify two genetic variations on the same polymorphic site in the studied population. The variations HBB:c.9C>T and HBB:c.9C>G with the last one observed in only one subject (0.2% of the sample). The T-allele of HBB:c.9C>T variation showed a 14% frequency in the studied sample. The frequency of this allele was significantly lower in the groups with the S allele. The total cholesterol serum level was significantly lower in the groups with the S allele. The SS group showed a reduction about 20% in the serum cholesterol level when compared with AA group. Total cholesterol was the best discriminated laboratory parameter among the study groups. The combined cholesterol levels below 150 mg/dL with the total protein concentration above 7.0 g/dL allowed the identification of 70% of the subjects in the SS group. These both parameters were suggested as laboratory biomarkers for the study pathology. Finally, the fluorescent advanced glycation end products serum concentration, an inflammatory marker, was not shown associated with sickle cell anemia in the studied sample.

Key words: sickle cell anemia, S mutation, beta globin gene, PCR-RFLP, PCR-SSCP, genetic variation, biochemical parameters.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura da molécula de hemoglobina A.	19
FIGURA 2	Mapa genômico dos genes da alfa e beta globinas.	21
FIGURA 3	Incidência de haplótipos do gene da beta globina.	25
FIGURA 4	Principais haplótipos do gene beta, definidos pela ação de treze enzimas de restrição.	30
FIGURA 5	Representação esquemática da formação do polímero de HbS.	31
FIGURA 6	Morfologias do eritrócito normal e falcizado.	32
FIGURA 7	Alterações na membrana de eritrócitos devido à presença da HbS.	35
FIGURA 8	Fisiopatologia da vaso-occlusão.	37
FIGURA 9	Fluxograma para caracterização dos grupos em estudo.	53
FIGURA 10	Perfil eletroforético típico de produtos de PCR da amplificação do gene da beta globina humana.	56
FIGURA 11	Mapa de restrição com a enzima <i>HpyF3 I</i> do amplicon do exon 1 do gene da beta globina humana.	57
FIGURA 12	Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP do exon 1 do gene da beta globina clivados com a enzima <i>HpyF3 I</i> .	58
FIGURA 13	Perfil eletroforético típico da reação de PCR-SSCP para o exon 1 do gene da beta globina.	60
FIGURA 14	Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP do exon 1 do gene da beta globina clivados com a enzima <i>HpyF3 I</i> .	65
FIGURA 15	Eletroforese típica da reação de PCR-SSCP, em gel de poliacrilamida 8% (29:1) contendo TBE 0,5X e 0,5% de glicerol.	66
FIGURA 16	Alinhamento e cromatogramas típicos observados para as variações AA, AS e SS do gene da beta globina humana.	68
FIGURA 17	Padrão de variabilidade genética encontrada na PCR-SSCP, seguido do seqüenciamento do fragmento de DNA em estudo.	69

FIGURA 18	Média e desvio padrão das concentrações séricas de colesterol total para a amostra total analisada e genótipos da hemoglobina obtidos por PCR-RFLP.	73
FIGURA 19	Média e desvio padrão das concentrações séricas de AGEs fluorescentes para a amostra total analisada e genótipos da hemoglobina obtidos por PCR-RFLP.	74
FIGURA 20	Distribuição dos valores de colesterol total e proteína total na amostra em estudo.	75
FIGURA 21	Comparações entre as concentrações séricas do colesterol total observadas nos genótipos AA, AS e SS com as observadas nos genótipos das variações HBB:c.9C>C e HBB:c.9C>T.	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	VARIAÇÕES GENÉTICAS QUE FLANQUEIAM A MUTAÇÃO S NO EXON 1 DO GENE DA BETA GLOBINA HUMANA	27
TABELA 2	CONDIÇÕES PARA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO EXON 1 DO GENE DA BETA GLOBINA HUMANA	55
TABELA 3	PROTOCOLO DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA A DETECÇÃO DA MUTAÇÃO S DO GENE DA BETA GLOBINA HUMANA POR PCR-RFLP	57
TABELA 4	PREPARO DO GEL DE POLIACRILAMIDA E CONDIÇÕES PARA O ENSAIO DE PCR-SSCP	59
TABELA 5	PROTOCOLO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP	59
TABELA 6	PROTOCOLO DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO	61
TABELA 7	PRINCÍPIOS METODOLÓGICOS E REAGENTES PARA DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	62
TABELA 8	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO A SEXO E IDADE NOS GRUPOS EM ESTUDO PARA AS ANÁLISES MOLECULARES	64
TABELA 9	COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS OBTIDOS POR ENSAIOS CONVENCIONAIS COMPARADOS COM A PCR-RFLP	65
TABELA 10	PADRÕES ELETROFORÉTICOS OBSERVADOS NA PCR-SSCP E SUAS FREQUÊNCIAS	67
TABELA 11	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E EQUÍLÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (H-W) PARA A VARIAÇÃO HBB:c.9C>T NOS GRUPOS EM ESTUDO E DISTRIBUIÇÃO DA VARIAÇÃO HBB:c.9C>G NOS GRUPOS EM ESTUDO	70
TABELA 12	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO A SEXO E IDADE NOS GRUPOS EM ESTUDO PARA AS ANÁLISES BIOQUÍMICAS	71
TABELA 13	VALORES DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E GENÓTIPOS EM ESTUDO	72
TABELA 14	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E VARIAÇÕES 1 E 2 (HBB:c.9CC E HBB:c.9CT)	76

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR	107
ANEXO 2	Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde Pública do Paraná	108
ANEXO 3	Método de extração do DNA genômico por <i>salting out</i> .	109
ANEXO 4	Seqüência do gene da beta globina humana (GenBank U01317)	110

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs	Produtos de glicação avançada, <i>advanced glycation end products</i>
Água ultra-pura tipo 1	Água obtida em sistema de purificação Milli-Q (Millipore) apresentando >18MΩ-cm de resistividade
F-AGEs	Produtos de glicação avançada fluorescentes em baixa massa molecular; <i>low molecular weight fluorescent advanced glycation end products</i>
HbA	Hemoglobina A, hemoglobina normal do adulto
HBB	Gene da beta globina
HbC	Hemoglobina C, HBB:c.19G>A, rs33930165
HbF	Hemoglobina F, hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S, HBB:c.20A>T; rs334
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IL	Interleucina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismos de comprimentos dos fragmentos de restrição; <i>restriction fragment length polymorphism</i>
PCR-SSCP	Polimorfismo conformacional de fita simples; <i>single-stranded conformation polymorphism</i>
PS	Fosfatidilserina
rs	Reference SNP, identificação dos polimorfismos de único nucleotídeo
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo, <i>single nucleotide polymorphism</i>
VCAM	Molécula de adesão celular vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA	19
3.2 OS GENES ENVOLVIDOS NA HEMOGLOBINA	20
3.3 A HEMOGLOBINA S	22
3.4 HISTÓRICO DA ANEMIA FALCIFORME	22
3.5 PREVALÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DA HbS	24
3.6 VARIAÇÕES GENÉTICAS NO GENE DA BETA GLOBINA	26
3.7 FISIOPATOLOGIA DA HbS	30
3.7.1 Estrutura do polímero de HbS e o processo de polimerização	30
3.7.2 Cinética da falcização	32
3.7.3 Patologia celular	33
3.7.4 Adesão ao endotélio e fenômeno de vaso-oclusão	35
3.7.5 Fenômenos inflamatórios	38
3.7.6 Hemólise	38
3.8 FATORES QUE MODULAM A GRAVIDADE DA ANEMIA FALCIFORME	39
3.9 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME	39
3.9.1 Crises vaso-oclusivas	41
3.9.2 Crises hematológicas	41
3.9.3 Crises aplásicas	41
3.9.4 Crises infecciosas	42
3.9.5 Seqüestro esplênico	42
3.10 INVESTIGAÇÃO DO PACIENTE PORTADOR DE HbS	43
3.10.1 Teste de solubilidade	43
3.10.2 Teste de falcização	44
3.10.3 Vantagens e desvantagens dos testes de solubilidade e de falcização	44
3.10.4 Eletroforese de hemoglobinas	45
3.10.5 Focalização isoeletrica	46
3.10.6 HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão	46
3.11 MÉTODOS MOLECULARES PARA A DETECÇÃO DA HbS	47
3.11.1 PCR-RFLP – Polimorfismos de Comprimentos dos Fragmentos de Restrição	48
3.11.2 PCR-SSCP – Polimorfismo conformacional de fita simples	49
3.11.3 DGGE – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante	50
3.11.4 ARMS-PCR	50
3.11.5 ASO – Oligonucleotídeo alelo-específico	51
3.11.6 Seqüenciamento de DNA	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 ANÁLISES MOLECULARES	52
4.1.1 Amostra para estudos moleculares	52
4.1.2 Extração do DNA genômico	53
4.1.3 Quantificação do DNA genômico	53
4.1.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	54
4.1.5 Detecção molecular da mutação S por PCR-RFLP	56
4.1.6 Detecção de outros sítios polimórficos por PCR-SSCP	58

4.1.7 Identificação das variações genéticas por reações de seqüenciamento de DNA	60
4.1.8 Análise das seqüências de DNA	61
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	62
4.2.1 Amostra para análises bioquímicas	62
4.2.2 Quantificação dos parâmetros bioquímicos	62
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
5 RESULTADOS	64
5.1 ANÁLISES MOLECULARES	64
5.1.1 Caracterização da amostra para ensaios moleculares	64
5.1.2 Detecção da mutação S por PCR-RFLP	65
5.1.3 Detecção de outros sítios polimórficos por PCR-SSCP	66
5.1.4 Identificação dos polimorfismos através da reação de seqüenciamento de DNA	68
5.1.4.1 Confirmação dos ensaios de PCR-RFLP para a detecção da mutação S	68
5.1.4.2 Identificação das variações genéticas observadas na PCR-SSCP	68
5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	71
5.2.1 Caracterização da amostra para ensaios bioquímicos	71
5.2.2 Quantificação dos parâmetros bioquímicos e dos produtos de glicação avançada fluorescentes	71
6 DISCUSSÃO	78
6.1 ENSAIOS MOLECULARES	79
6.1.1 Amostra	79
6.1.2 Detecção da mutação S por PCR-RFLP	80
6.1.3 Detecção de outros sítios polimórficos por PCR-SSCP	83
6.1.4 Identificação dos polimorfismos por seqüenciamento de DNA	85
6.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	88
6.2.1 Amostra	88
6.2.2 Quantificação dos parâmetros bioquímicos e F-AGEs	88
6.2.2.1 Perfil lipídico	88
6.2.2.2 Proteína total e albumina	90
6.2.2.3 Creatinina	91
6.2.2.4 Produtos de glicação avançada fluorescentes	91
6.2.3 Comparação do colesterol total com a proteína total	92
6.2.4 Quantificação dos parâmetros bioquímicos com as variações HBB:c.9CC e HBB:c.9C>T do gene da beta globina humana	93
6.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
7 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	96
ANEXOS	107

1 INTRODUÇÃO

Os genes que codificam as globinas da molécula de hemoglobina podem sofrer mutações que alteram a funcionalidade desta proteína. A hemoglobina S (HbS) é resultado de uma mutação de ponto no gene da beta globina (HBB:c.20A>T), produzindo uma alteração estrutural na molécula. A alteração molecular é caracterizada pela substituição de um nucleotídeo no sexto códon do gene da beta globina, onde uma adenina é substituída por uma timina (INGRAM, 1956). Esta mutação (GAG→GTG) resulta na substituição de aminoácidos, onde o resíduo glutamílica é substituído por um resíduo valil ($\beta 6$ Glu→Val). Como consequência desta variação genética em único nucleotídeo e de alterações na estrutura terciária da molécula, a HbS sofre polimerização quando desoxigenada (SERJEANT, 1999).

A HbS, assim denominada devido ao formato de foice (do inglês, *sickle*) que confere as hemácias desoxigenadas, é responsável por um amplo espectro de distúrbios que variam em relação ao grau de anemia, frequência de crises vaso-oclusivas e extensão da lesão vascular (LEE *et al.*, 1998). As manifestações clínicas da doença falciforme são variáveis e dependentes do fenômeno de falcização o qual leva à oclusão vascular e em menor grau, do grau de anemia associada.

A maior prevalência da anemia falciforme é no continente africano e em países que participaram no tráfico de escravos. No Brasil, a anemia falciforme distribuiu-se heterogeneamente, sendo mais freqüente onde a proporção de antepassados afro-descendentes da população é maior. Com base em estudos de prevalência, estima-se a existência de mais de 2 milhões de portadores do gene da HbS no Brasil, representando mais de 8 mil indivíduos afetados com a forma homocigótica (ANVISA, 2002).

Vários métodos para a detecção de hemoglobinas anormais estão disponíveis, entre estes os testes de solubilidade e de falcização, a eletroforese de hemoglobinas, a focalização isoelétrica, a cromatografia líquida de alta pressão e a espectrometria de massa. Os métodos moleculares com base na pesquisa de alterações no DNA fazem parte do arsenal diagnóstico moderno (LOREY *et al.*, 1994; PAPADEA; CATE, 1996).

Métodos que detectam alterações no DNA, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida da digestão com enzima de restrição apropriada ou do

seqüenciamento de DNA, apresentam elevada especificidade, porém são pouco utilizados, devido ao custo elevado e à necessidade de equipamentos especiais. No entanto, é crescente a popularização das metodologias moleculares na detecção da HbS e de outras variantes genéticas da hemoglobina.

O estudo das alterações moleculares associadas à hemoglobinopatia S possibilita uma melhor compreensão dos sítios iniciais do aparecimento da mutação do gene β^S no planeta, bem como de alterações estruturais e funcionais no eritrócito delas decorrentes. Este estudo pode ainda possibilitar um entendimento mais amplo dos aspectos clínicos envolvidos no curso da evolução da doença, tornando mais compreensível o entendimento da existência de diferentes intensidades de sinais e sintomas que se apresentam nos pacientes acometidos pela mutação gênica da anemia falciforme (GALIZA; PITOMBEIRA, 2003).

A variabilidade genética do gene da beta globina humana é grande, sendo descritos mais de 750 polimorfismos. O exon 1 do gene da beta globina humana codifica para uma região da proteína importante para a manutenção de sua conformação (*hot spot*). É neste sítio que se encontra a mutação S e a mutação C (HBB:c.19G>A). São poucos os estudos de outras variantes genéticas do gene da beta globina, além da mutação S, na população brasileira e em particular na população paranaense.

Neste estudo, a presença da HbS foi detectada através de técnicas moleculares, utilizando-se a reação de polimorfismos de comprimentos dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) e confrontando os resultados moleculares com a metodologia tradicional de detecção empregada em hemocentros. Também foram identificadas outras possíveis variações genéticas no exon 1 do gene da beta globina humana e suas freqüências na população paranaense através da técnica de polimorfismo conformacional de fita simples (PCR-SSCP). A identificação das características moleculares do exon 1 da beta-globina poderá estabelecer o padrão genético da população paranaense de doadores de sangue e de pacientes portadores de HbS e, em estudos futuros, associar os eventuais polimorfismos detectados com a etnia, características fenotípicas da doença e mesmo seu padrão de resposta terapêutica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a presença e a frequência de outras variações genéticas na região que flanqueia a mutação S no exon 1 do gene da beta globina humana em uma população do estado do Paraná, Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a amplificação da região do exon 1 do gene da beta globina envolvida na hemoglobinopatia S através da reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Caracterizar a mutação da hemoglobina S através da reação de PCR-RFLP;
- Otimizar a reação de PCR-SSCP para a região do exon 1 do gene da beta globina para a detecção de novas variações genéticas;
- Avaliar a utilidade da técnica de PCR-SSCP para estudos em larga escala e aplicação na rotina em pacientes com anemia falciforme;
- Caracterizar as variações genéticas diferentes da mutação S através da reação de seqüenciamento de DNA do exon 1 em estudo;
- Correlacionar os genótipos associados a hemoglobina S com as concentrações séricas de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicérides, creatinina, proteína total, albumina e produtos de glicação avançada fluorescentes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A síndrome das células falciformes é a mais comum das alterações hematológicas hereditárias conhecidas no homem. Sua distribuição é ampla, abrangendo todos os continentes, notadamente a África, a América do Norte e a América Latina. No Brasil, ela se distribuiu heterogeneamente, sendo mais freqüente nas regiões onde a população de origem africana é maior.

3.1 ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA

A hemoglobina é uma proteína composta por quatro cadeias globínicas, associadas uma a uma a grupos heme. O grupo heme é um complexo que contém um átomo de ferro central em uma estrutura protoporfirínica (BUNN; FORGET, 1986). Em adultos normais, a hemoglobina A (HbA), cerca de 98% da hemoglobina total, é formada por duas cadeias alfa e duas cadeias beta (Figura 1). A hemoglobina A₂ (HbA₂), com concentração de até 3,5% da hemoglobina total, é formada por duas cadeias alfa e duas cadeias delta; e a hemoglobina fetal (HbF), que representa até 1% da hemoglobina total, é formada por duas cadeias alfa e duas cadeias gama. Durante o desenvolvimento fetal, predomina a síntese de cadeias gama associadas às cadeias alfa, uma vez que ainda não há formação de cadeias beta, originando grandes proporções de hemoglobina fetal (SCHMIDT, 1973).

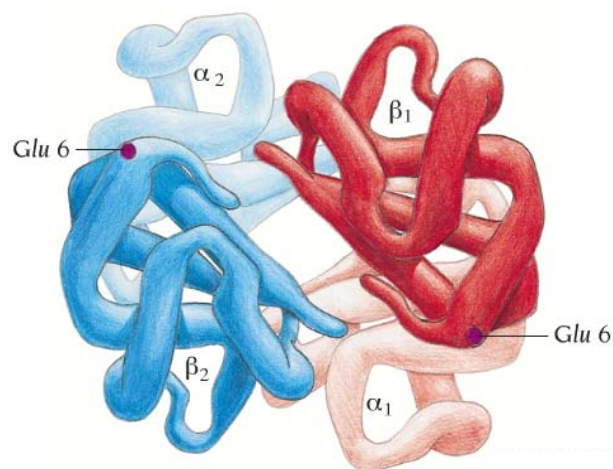


FIGURA 1 – Estrutura da molécula de hemoglobina A.

Estrutura das cadeias globínicas com destaque para a posição do ácido glutâmico, na cadeia beta, sítio da mutação S.

FONTE: GARLAND, 1999.

3.2 OS GENES ENVOLVIDOS NA HEMOGLOBINA

A síntese das cadeias globínicas é regulada por agrupamentos (*clusters*) de genes nos cromossomos 11 e 16, na ordem cronológica em que são expressos (sentido 5' → 3'), nos períodos embrionário, fetal e adulto, quando diferentes grupos de genes são ativados ou suprimidos e diferentes cadeias globínicas são sintetizadas independentemente. Nas diferentes combinações das cadeias globínicas que possibilitam o surgimento de distintas hemoglobinas, para que o tetrâmero funcional seja formado, é necessário um perfeito equilíbrio na velocidade de síntese destas cadeias (HOFFBRAND; PETTIT, 1993).

No braço curto do cromossomo 16, em um segmento de DNA de 35 kb, localizam-se os genes zeta, que codificam a cadeia zeta globínica, dois pseudogenes e os genes alfa 1 e alfa 2, provavelmente originados de duplicação gênica (HIGGS *et al*, 1989).

No cromossomo 11, em uma região de aproximadamente 60 kb, localiza-se o complexo dos genes beta, onde se observa no sentido 5' → 3', os genes épsilon, gama glicina, gama adenina, um pseudogene e os genes delta e beta, como indicados na Figura 2 (HOFFBRAND; PETTIT, 1993).

Cada um dos genes do *cluster* da globina tem sido seqüenciado e sua estrutura estabelecida, além de um número de importantes seqüências regulatórias bem definidas (HONIG; ADAMS, 1986). Os elementos promotores agem em *cis* e estão localizados no final 5' de cada um dos genes da globina. Vários elementos acentuadores têm sido caracterizados. São seqüências distais, que aumentam os níveis de transcrição do gene. Há duas seqüências regulatórias: o LCR (região controladora do gene) no cluster do gene beta, marcado por sítios hipersensíveis à DNase; e o HS (sítio hipersensível) no *cluster* alfa, similar ao LCR. Estas seqüências e muitas regiões através do complexo do gene da globina contêm sítios de ligação para fatores de transcrição específicos para a linhagem eritróide e para uma variedade de proteínas de ligação ao DNA ubiquitinado. O modelo de controle da síntese de globinas mais favorecido sugere que a transcrição dos genes envolve a posição do LCR para cada gene individual que, junto com uma variedade de fatores de transcrição de ação *trans* e com a RNA polimerase II, atua para formar um complexo transcricional na região promotora (WEATHERALL; CLEGG, 1999).

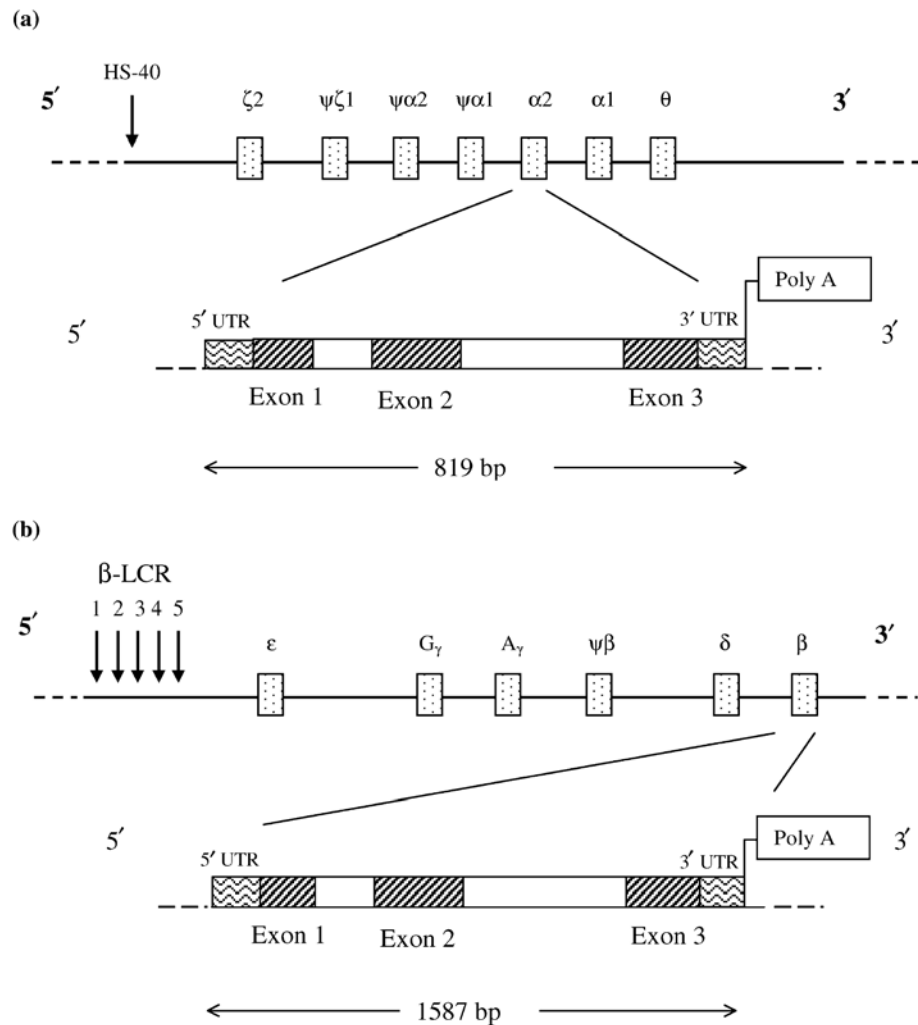


FIGURA 2 – Mapa genômico dos genes da alfa e beta globinas.

Cada gene de globina contendo três exons e dois introns.

(a) O gene da α globina, localizado no cromossomo 16 (16p13.3). Dos sete genes mostrados apenas três são expressos em níveis fisiológicos significativos, o gene $\zeta 2$, $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Os demais genes são pseudogenes ou genes que não são expressos significativamente. A estrutura do gene $\alpha 2$ é mostrada na figura, indicando os três exons, os dois introns e regiões 5' UTR e 3' UTR.

(b) O locus β do cromossomo 11 (11p15.4) com os genes ϵ , G-gama, A-gama, delta e β . O gene da β globina, mostrado em destaque para evidenciar a sua estrutura. Assim como o gene $\alpha 2$, o gene β também possui três exons, dois introns, e regiões comuns a todos os genes de globinas.

FONTE: CLARK; THEIN, 2004.

Os genes que codificam as globinas podem sofrer mutações e entre estas algumas alteram a funcionalidade das proteínas. Assim, a mais simples e comum lesão molecular, a troca de uma base do DNA genômico, pode provocar a supressão da síntese da cadeia de globina, uma redução na velocidade de síntese ou ainda a produção de cadeias com alterações estruturais variadas, desde a troca de um aminoácido até a produção de cadeias alongadas (ZAGO; FALCÃO; PINTO, 2004).

3.3 A HEMOGLOBINA S

A maior frequência das alterações na molécula de hemoglobina ocorre por substituição de uma única base nitrogenada no DNA, designado de polimorfismo de único nucleotídeo ou *single nucleotide polymorphism* (SNP). Na mutação S ocorre a substituição de uma adenina por timina na composição do sexto códon do gene da beta globina humana (GAG→GTG), promovendo a introdução de um resíduo de valina em substituição ao resíduo de ácido glutâmico. Esta substituição tem como consequência propiciar a polimerização das moléculas de hemoglobina S quando desoxigenadas (INGRAM, 1956; LEE *et al.*, 1998).

A anemia falciforme é caracterizada pelo estado de homozigose quanto a presença do alelo S (HbSS). Os heterozigotos (HbAS), caracterizam o traço falcêmico e não manifestam as formas clínicas da doença, exceto em situações especiais quando o afetado é submetido à baixa tensão de oxigênio (ATLAS, 1974).

3.4 HISTÓRICO DA ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme é conhecida há séculos por povos de diferentes regiões da África. Exames radiológicos de ossos de pessoas que viveram naquele continente há mais de sete mil anos mostraram lesões características dessa condição mórbida. É interessante destacar que os doentes eram identificados por tatuagens para facilitar o diagnóstico e proibir o casamento com membros sadios do grupo (NAOUM, 1997).

Estudos científicos da doença das células falciformes datam de um século e meio atrás. Segundo Naoum (1997), os trabalhos de Cruz Jobim, no Rio de Janeiro, em 1835; de Leiby, em 1846; de Hodenpyl, em 1896; e de Accioli, na Bahia, em 1908; podem ser considerados como pioneiros a respeito dessa doença. Entretanto, foi Herrick em 1910, quem registrou a presença de “corpúsculos vermelhos alongados em formato de foice” no sangue periférico de um estudante negro procedente da Jamaica, portador de quadro anêmico grave, acompanhado de icterícia, complicações pulmonares e úlceras de membros inferiores.

O termo doença falciforme – *sickle cell disease* – foi empregado pela primeira vez, em 1922, por Mason. Este autor relacionou, inclusive, algumas características comuns entre os portadores dessa doença: todos eram negróides,

apresentavam icterícia, fraqueza, úlceras de membros inferiores, anemia intensa, reticulocitose e eritrócitos falcizados no sangue periférico. Em 1927, os estudos de Hahn e Gillespie delinearam as condições que afetam a formação de células falciformes *in vitro*, incluindo pH, temperatura, fixadores, tonicidade entre outras. A mais importante entre as observações revelava que a exclusão de oxigênio era um pré-requisito para a falcização e o fenômeno poderia ser revertido pela reexposição ao gás; atribuindo-se o defeito à hemoglobina, e não somente ao eritrócito. Três anos depois, esses resultados foram confirmados *in vivo*, quando se observou a formação de células falcizadas, especialmente quando a tensão de oxigênio caía abaixo de 40 a 45 mmHg.

Em 1940, Sherman demonstrou que as células falciformes, ao serem desoxigenadas, exibiam birrefringência óptica. Esse fato consistiu na primeira evidência de que a hemoglobina S, na ausência de oxigênio, apresentava uma estrutura ordenada no interior dos eritrócitos, e sugeriu a Linus Pauling que a hemoglobina S era diferente da hemoglobina normal. Pauling concebeu a possibilidade de que a interação entre as moléculas de hemoglobina anormal poderia explicar esse fenômeno. Em 1949, Pauling e seus colaboradores demonstraram por meio da mobilidade eletroforética, uma hemoglobina eletroforeticamente anormal em sangue de pacientes portadores de anemia falciforme, originando assim o conceito de doença molecular, e atribuíram esse fenômeno à mudança de carga da globina.

Em 1956, Ingram, utilizando a técnica de *fingerprint* - eletroforese bidimensional, associada com cromatografia, demonstrou que a anormalidade química da HbS era devida à substituição do ácido glutâmico pela valina na posição número 6 da cadeia beta ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$) levando à perda de duas cargas negativas por molécula de hemoglobina.

Watson, Stahman e Billelo (1948), perceberam que os sintomas da anemia falciforme apareciam na infância somente após a diminuição da concentração da hemoglobina fetal (HbF), e estabeleceram a noção do efeito benéfico da presença de HbF nas manifestações da doença.

A partir de 1978, com as observações iniciais de Kan e Dozy, novo impulso foi dado ao estudo da HbS, pela introdução de técnicas de biologia molecular. Por meio de enzimas de restrição, foi possível mostrar que o gene da HbS teve múltiplas origens. Esses estudos foram realizados em populações da etnia negra da África,

Jamaica e em afro-americanos. Pela análise do agrupamento de genes do tipo beta do cromossomo 11, os autores concluíram que há, pelo menos, cinco tipos de HbS: SS-Benin, SS-Bantu, SS-Senegal, SS-Camarões, SS-Árabe-indiano. Todas elas apresentam como resultado final a troca de ácido glutâmico por valina, na posição seis da globina beta, porém se originam de diferentes extensões de lesões moleculares ocorridas ao longo do agrupamento dos genes beta, delta, gama-alanina, gama-glicina, pseudogene beta e épsilon. Essas descobertas esclareceram a diversidade clínica que se observa em diferentes doentes com anemia falciforme, alguns com evolução clínica benigna e outros apresentando constantes complicações (KAN; DOZY, 1978).

A descoberta dos haplótipos do gene β^S apresentou-se como importante elemento de análise antropológica para estudo das composições populacionais, bem como elementos de estudo clínico, os quais podem fornecer dados preditivos sobre a evolução da doença e seu nível de gravidade (POWARS, 1991).

3.5 PREVALÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DA HbS

A HbS é a mais comum das hemoglobinas anormais. Sua freqüência varia consideravelmente com a localização geográfica e grupo racial. A maior prevalência de HbS é na África e entre negros em países que participaram no tráfico de escravos, porém ocorre com menor freqüência na bacia mediterrânea, Arábia Saudita e regiões da Índia. Os resultados de estudos de polimorfismos de DNA ligados ao gene β^S sugerem que a HbS surgiu de cinco mutações independentes na África. (LEE *et al.*, 1998). O cromossomo β^S mais comum é encontrado em Benin e na África ocidental central (Figura 3).

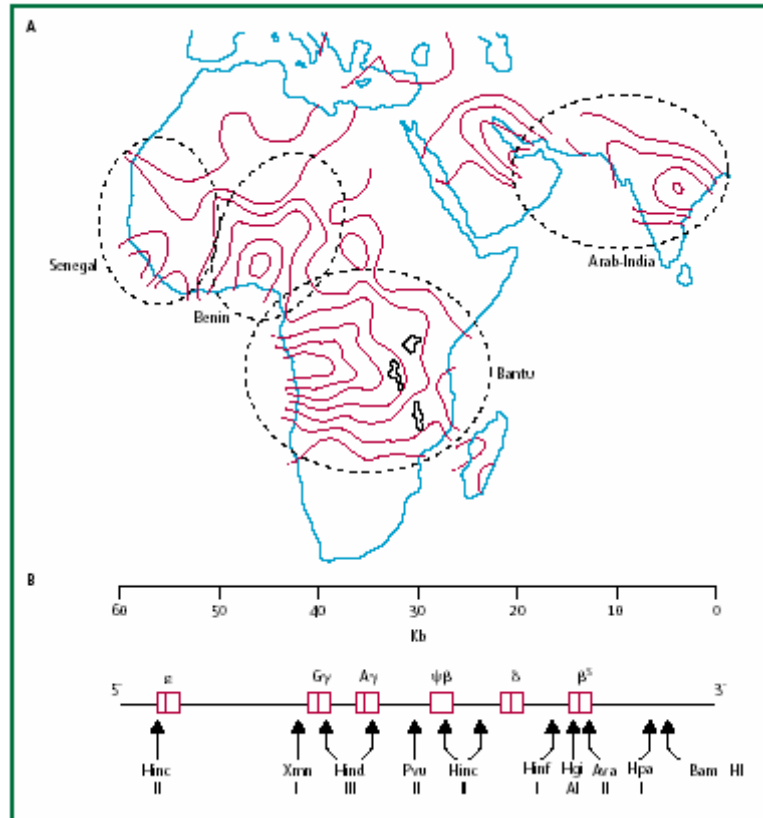


FIGURA 3 – Incidência de haplótipos do gene da beta globina.

(A) Identificação de três regiões da África e uma região da Arábia Saudita e da Índia onde o gene β^S está presente. O número de indivíduos com a anemia falciforme (linhas vermelhas) em Senegal, Benin e Bantu é maior em regiões próximas à costa. (B) O *cluster* de haplótipos da β -globina é determinado por sítios polimórficos no DNA, os quais podem ser identificados por endonucleases.

FONTE: STUART; NAGEL, 2004.

A distribuição geográfica do gene da HbS no continente africano é expressivamente semelhante à do *Plasmodium falciparum*. Indivíduos com HbS em heterozigose, quando infectados por *Plasmodium falciparum*, apresentam vantagem seletiva em relação a indivíduos que não carregam este gene anômalo. A vantagem seletiva das células AS sobre as células AA foi demonstrada *in vitro*, embora seu mecanismo exato ainda não tenha sido completamente elucidado. O *Plasmodium falciparum* se fixa as glicoforinas, proteínas transmembrana eritrocitárias, para penetrarem no eritrócito. Desta forma indivíduos que possuem alterações ou carências desta proteína são resistentes às infecções pelo plasmódio da malária, como é o caso dos portadores da HbS, onde estas proteínas estão alteradas. Deste modo, a vantagem seletiva do heterozigoto teve como consequência o aumento da frequência do gene da HbS em áreas do mundo em que a malária foi endêmica (NAGEL *et al.*, 2001; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

A HbS foi trazida às Américas pela imigração forçada dos escravos. No Brasil, a anemia falciforme se distribuiu heterogeneamente, sendo mais freqüente onde a proporção de antepassados negros da população é maior, como no nordeste do país, em especial no estado da Bahia. No sudeste, a prevalência média de heterozigotos é de 2%, atingindo 6-10% entre afro-brasileiros. Com base em estudos de prevalência, estima-se a existência de mais de 2 milhões de portadores do gene da HbS no Brasil, representando mais de 8 mil indivíduos afetados com a forma homozigótica (HbSS). Também se estima um incremento de 700 a 1000 novos casos anuais da doença falciforme no país (ANVISA, 2002). De fato, a anemia falciforme tem uma incidência entre recém-nascidos brasileiros cerca de dez a trinta vezes maior que a da fenilcetonúria (RAMALHO; MAGNA; SILVA, 2002). No estado do Paraná a prevalência da anemia falciforme e de heterozigotos é menor que em outros estados do centro-oeste, norte e nordeste do Brasil, sendo mais prevalente na região norte do estado (WATANABE *et al.*, 2008).

A detecção de indivíduos portadores das formas heterozigóticas de hemoglobinopatias é importante para o sistema de saúde pública, pois além de representar fonte de novos heterozigotos, podem, através de casamentos entre portadores, originar indivíduos homozigotos e duplos heterozigotos como, por exemplo, os portadores de HbSC, que manifestam formas clínicas graves (ORLANDO *et al.*, 2000). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a implantação de programas para prevenção e controle de hemoglobinopatias na América Latina, especialmente no Brasil (PENCHSZADEH, 1993).

3.6 VARIAÇÕES GENÉTICAS NO GENE DA BETA GLOBINA

A molécula de DNA pode sofrer alterações conhecidas como variações genéticas ou polimorfismos, os quais compreendem inserções, deleções e trocas de bases nitrogenadas. Como é grande a variação no número e no tipo de variações genéticas é possível identificar um indivíduo com base em seu padrão de variabilidade genética.

Estão descritos para o gene beta globina mais de 750 variações genéticas (Tabela 1). Para reconhecer essas variabilidades genéticas, múltiplos ensaios, entre os quais o uso de enzimas de restrição que clivam o DNA em pontos específicos, identificando o sítio da variação, são amplamente empregados.

TABELA 1 – VARIAÇÕES GENÉTICAS QUE FLANQUEIAM A MUTAÇÃO S NO EXON 1 DO GENE DA BETA GLOBINA HUMANA

nt	Denominação	Mutação	Nomenclatura
1	<u>Initiation codon ATG->GTG beta0</u>	Códon de iniciação beta Met>Val	HBB:c.1A>G
2	<u>Initiation codon T>A</u>	Códon de iniciação beta Met>Lys	HBB:c.2T>A
2	<u>Initiation codon ATG->AGG beta0</u>	Códon de iniciação beta Met>Arg	HBB:c.2T>G
2	<u>Initiation codon ATG->ACG beta0</u>	Códon de iniciação beta Met>Thr	HBB:c.2T>C
3	<u>Initiation codon ATG->ATC beta0</u>	Códon de iniciação beta Met>Ile	HBB:c.3G>C
3	<u>Initiation codon ATG->ATT beta0</u>	Códon de iniciação beta Met>Ile	HBB:c.3G>T
3	<u>Initiation codon ATG->ATA beta0</u>	Códon de iniciação beta Met>Ile	HBB:c.3G>A
4	<u>Hb South Florida</u>	beta 1(NA1) Val>Met	HBB:c.4G>A
4	<u>Hb Niigata</u>	beta 1(NA1) Val>Leu	HBB:c.4G>T
5	<u>Hb Raleigh</u>	beta 1(NA1) Val>Ala	HBB:c.5T>C
5	<u>Hb Doha</u>	beta 1(NA1) Val>Glu	HBB:c.5T>A
5	<u>Hb Watford</u>	beta 1(NA1) Val>Gly	HBB:c.5T>G
7	<u>Hb Fukuoka</u>	beta 2(NA2) His>Tyr	HBB:c.7C>T
8	<u>Hb Graz</u>	beta 2(NA2) His>Leu	HBB:c.8A>T
8	<u>Hb Agrigente</u>	beta 2(NA2) His>Pro	HBB:c.8A>C
8	<u>Hb Marseille</u>	beta 2(NA2) His>Pro	HBB:c.8A>C
8	<u>Hb Deer Lodge</u>	beta 2(NA2) His>Arg	HBB:c.8A>G
9	<u>Hb Okayama</u>	beta 2(NA2) His>Gln	HBB:c.[9C>A ou 9C>G]
10	<u>Hb Kamakura</u>	beta 3(NA3) Leu>Val	HBB:c.10C>G
11	<u>Hb Santo Domingo</u>	beta 3(NA3) Leu>Gln	HBB:c.11T>A
14	<u>Hb Wurzburg</u>	beta 4(A1) Thr>Asn	HBB:c.14C>A
16	<u>Hb Tyne</u>	beta 5(A2) Pro>Ser	HBB:c.16C>T
16	<u>Hb Gorwihl</u>	beta 5(A2) Pro>Ala	HBB:c.16C>G
17	<u>Hb Warwickshire</u>	beta 5(A2) Pro>Arg	HBB:c.17C>G
19	<u>Hb Arlington Park</u>	beta 6(A3) Glu>Lys e beta 95(FG2) Lys>Glu	HBB:c.[19G>A;286A>G]
19	<u>Hb C-New Cross</u>	beta 6(A3) Glu>Lys e beta 83(EF7) Gly>Asp	HBB:c.[19G>A;251G>A]
19	<u>Hb C</u>	beta 6(A3) Glu>Lys	HBB:c.19G>A
19	<u>Hb Machida</u>	beta 6(A3) Glu>Gln	HBB:c.19G>C
19	<u>Hb C-Rothschild</u>	beta 6(A3) Glu>Lys e beta 37(C3) Trp>Arg	HBB:c.[19G>A;112T>A or 112T>C]

TABELA 1 – VARIAÇÕES GENÉTICAS QUE FLANQUEIAM A MUTAÇÃO S NO EXON 1 DO GENE DA BETA GLOBINA HUMANA

nt	Denominação	Mutação	Nomenclatura
20	<u>Hb Jamaica Plain</u>	beta 6(A3) Glu>Val e beta 68(E12) Leu>Phe	HBB:c.[20A>T;205C>T]
20	<u>Hb S-Cameroon</u>	beta 6(A3) Glu>Val e beta 90(F6) Glu>Lys	HBB:c.[20A>T;271G>A]
20	<u>Hb G-Makassar</u>	beta 6(A3) Glu>Ala	HBB:c.20A>C
20	<u>Hb S-South End</u>	beta 6(A3) Glu>Val e beta 132(H10) Lys>Asn	HBB:c.[20A>T;399A>C]
20	<u>Hb S-Oman</u>	beta 6(A3) Glu>Val e beta 121(GH4) Glu>Lys	HBB:c.[20A>T;364G>A]
20	<u>Hb S-Travis</u>	beta 6(A3) Glu>Val e beta 142(H20) Ala>Val	HBB:c.[20A>T;428C>T]
20	<u>Hb C-Ndjamena</u>	beta 6(A3) Glu>Val e beta 37(C3) Trp>Gly	HBB:c.[20A>T;112T>G]
20	<u>Hb S-Providence</u>	beta 6(A3) Glu>Val e beta 82(EF6) Lys>Asn	HBB:c.[20A>T;249G>T or 249G>C]
20	<u>Hb C-Harlem</u>	beta 6(A3) Glu>Val e beta 73(E17) Asp>Asn	HBB:c.[20A>T;220G>A]
20	<u>Hb C-Ziguinchor</u>	beta 6(A3) Glu>Val e beta 58(E2) Pro>Arg	HBB:c.[20A>T;176C>G]
20	<u>Hb Lavagna</u>	beta 6(A3) Glu>Gly	HBB:c.20A>G
20	<u>Hb S-Antilles</u>	beta 6(A3) Glu>Val AND beta 23(B5) Val>Ile	HBB:c.[20A>T;70G>A]
20	Hb S	beta 6(A3) Glu>Val	HBB:c.20A>T
22	<u>Hb G-Siriraj</u>	beta 7(A4) Glu>Lys	HBB:c.22G>A
23	<u>Hb G-San José</u>	beta 7(A4) Glu>Gly	HBB:c.23A>G
25	<u>Hb N-Timone</u>	beta 8(A5) Lys>Glu	HBB:c.25A>G
25	<u>Hb J-Luhe</u>	beta 8(A5) Lys>Gln	HBB:c.25A>C
26	<u>Hb Rio Grande</u>	beta 8(A5) Lys>Thr	HBB:c.26A>C
26	<u>Hb Lucknow</u>	beta 8(A5) Lys>Arg	HBB:c.26A>G
26	<u>Hb Nakano</u>	beta 8(A5) Lys>Met	HBB:c.26A>T
27	<u>Hb Limassol</u>	beta 8(A5) Lys>Asn	HBB:c.27G>C
29	<u>Hb Pôrto Alegre</u>	beta 9(A6) Ser>Cys	HBB:c.29C>G

NT: nucleotídeo (considerando 1 o ATG da sequência U01317). Em destaque as mutações C e S.
Adaptado de: http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3.

O tipo de variabilidade mais comum no complexo gênico das globinas alfa ou beta é aquele produzido por variações de seqüências que alteram o sítio de reconhecimento de uma enzima de restrição. O padrão de combinação dos sítios polimórficos para qualquer cromossomo é chamado de haplótipo (ANTONARAKIS; KAZAZIAN; ORKIN, 1985). Os diversos polimorfismos do DNA em *cis* ligados ao complexo do gene da beta globina definem os chamados haplótipos da anemia falciforme. O primeiro polimorfismo associado ao gene β^S foi descrito por Kan e Dozy em 1978, no sítio para a enzima de restrição *Hpa* I localizado na posição 3' do gene, seguindo-se novas descrições de outros sítios de polimorfismos de restrição (MEARS, 1981). Estudos subseqüentes definiram os principais haplótipos para a

anemia falciforme. Através da análise dos haplótipos foi possível observar que a mesma mutação β^S apareceu independentemente em pelo menos cinco diferentes grupos populacionais, com cinco diferentes composições genéticas nas proximidades do gene da globina beta (Figura 4).

A denominação desses haplótipos foi derivada da região geográfica onde cada tipo apresentou sua mais elevada prevalência. Desse modo, os haplótipos mais freqüentes foram denominados Benin, Bantu, Senegal, Camarões e Árabe-Indiano (PAGNIER, 1984). A variabilidade genética em torno da mutação S permitiu uma melhor compreensão da heterogeneidade da doença, além de ter importância para o estudo antropológico. Esses haplótipos podem ser utilizados como marcadores de características genéticas em *cis* herdadas com o gene β^S e que podem influenciar a expressão dos genes gama globina e, conseqüentemente, as concentrações de HbF. Os haplótipos Senegal e Árabe-Indiano estão associados com concentrações elevadas de HbF, ao passo que os haplótipos Benin e Bantu com concentrações menores. No Brasil, existe certa heterogeneidade na freqüência dos diversos haplótipos entre diferentes regiões, mas predominam os haplótipos Bantu e Benin (ZAGO et al, 2004).

O estudo dos haplótipos pode ser utilizado com diferentes objetivos: para a determinação da origem unicêntrica ou multicêntrica de uma mutação; para discriminar eventos epistáticos, quando outros genes interferem na expressão fenotípica do gene mutante; e para definir o caminho de fluxo de um gene específico mutante. Quando os dados e informações estão suficientemente consolidados como no caso do agrupamento (*cluster*) do gene da beta globina mutante, os haplótipos podem ser úteis no estudo da origem e da evolução da raça humana (NAGEL e RANNEY, 1990). A importância dos haplótipos associados a mutação β^S na evolução clínica dos pacientes com anemia falciforme foi determinada através das observações quanto ao surgimento e à intensidade das complicações fisiopatológicas e da curva de sobrevivência dos pacientes, sugerindo melhores prognósticos para os portadores dos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano e pior evolução clínica para os pacientes portadores dos haplótipos República Centro-Africana (CAR ou Bantu) e Benin (POWARS, 1991).

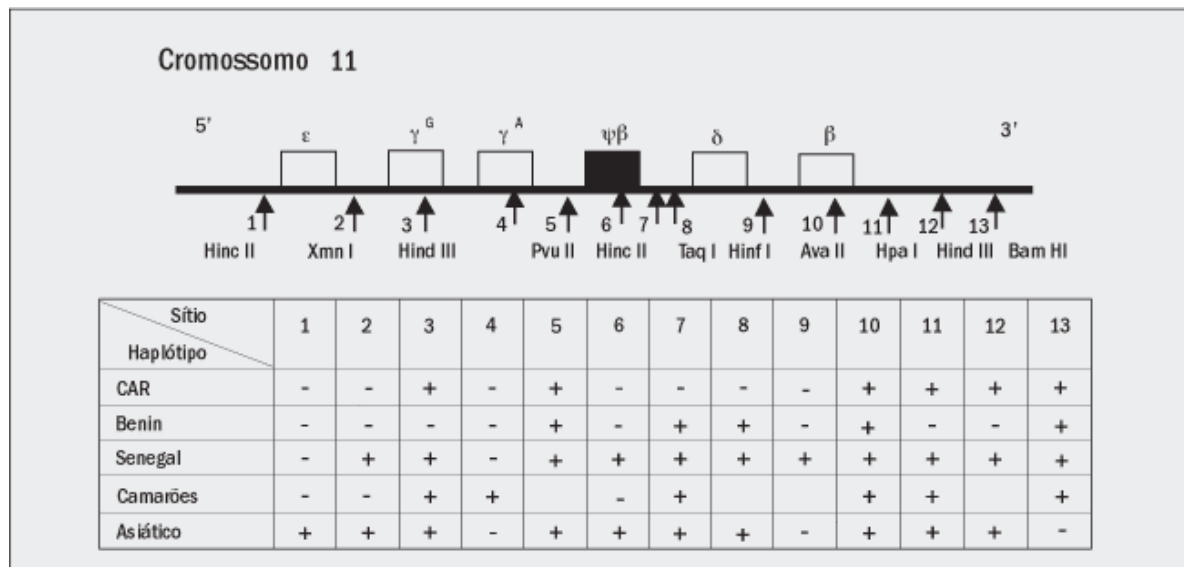


Figura 4 – Principais haplótipos do gene beta, definidos pela ação de treze enzimas de restrição.

FONTE: GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003.

3.7 FISIOPATOLOGIA DA HbS

3.7.1 Estrutura do polímero de HbS e o processo de polimerização

O crescente conhecimento das propriedades estereoquímicas da hemoglobina permitiu um melhor entendimento do mecanismo molecular da falcização. A substituição do ácido glutâmico por valina na posição $\beta 6$ ocorre na superfície da molécula, sem provocar alterações significativas na sua conformação global. Entretanto, dados experimentais indicam que, como consequência da substituição, poderia ocorrer uma perda da estrutura helicoidal desta região (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

A valina é um aminoácido neutro e o ácido glutâmico é carregado negativamente. Esta troca altera o ponto isoelétrico (pI) da HbS, tornando-a menos negativa, fato que resulta em uma mobilidade mais lenta quando comparada com a HbA em eletroforese alcalina. A troca de aminoácidos também altera a estrutura da molécula, pois se na HbA o ácido glutâmico da posição 6 da globina beta auxilia no afastamento das moléculas desoxigenadas de hemoglobinas, a entrada da valina nesta posição favorece a polimerização sob condições de baixo teor de oxigênio. No estado oxigenado, a molécula de HbS está “relaxada” e, nesta conformação estrutural as globinas beta S estão mais separadas. No estado desoxigenado, a

molécula de HbS torna-se esticada ou “tensa” e as globinas beta S ficam mais próximas (MANWANI, GALDASS; BIEKER, 2007).

Esta mudança de conformação favorece o contato entre moléculas de desoxihemoglobina, o que não é possível no estado oxigenado. Por meio da união de vários tetrâmeros de HbS, formam-se longos polímeros, alterando a forma do eritrócito para afoiçada (Figura 5). Nesta etapa, há a mudança no citoplasma do eritrócito, alterando-se a viscosidade e formando cristais tactóides de HbS. Essa alteração do estado solúvel para o insolúvel é a diferença estrutural mais significativa, sob o ponto de vista patológico da presença da HbS (BUNN; FORGET, 1986).

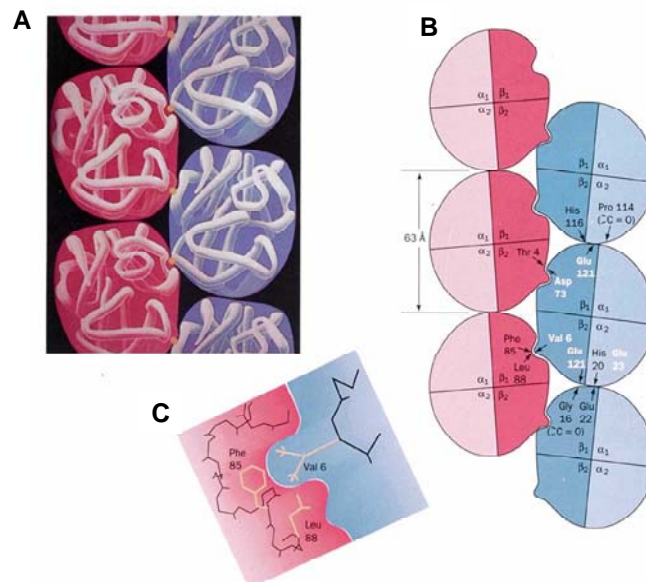


FIGURA 5 – Representação esquemática da formação do polímero de HbS.

(A) União dos tetrâmeros de HbS formando um polímero. (B) Destaque para a mudança na conformação da molécula de HbS, facilitando a ligação entre as mesmas. (C) Ponto da mutação HbS, resultante da troca do ácido glutâmico pela valina, a qual interage com os resíduos fenilalanina e leucina na molécula adjacente.

FONTE: www.dwb.unl.edu/teacher/nsf/c10/c10links/sickle.bwh.harvard.edu

A HbS no estado de baixa tensão de oxigênio sofre uma modificação na sua conformação molecular devido à presença do aminoácido valina, o qual interage com o resíduo fenilalanina ($\beta 85$) e leucina ($\beta 88$) na molécula adjacente da HbS (STEINBERG, 1998). Esta interação de natureza hidrofóbica desencadeia a formação de polímeros, os quais são estruturas tubulares constituídas de 14 filamentos de HbS, que se dispõem ao redor de um eixo central. Nos cristais de HbS

desoxigenada somente uma das valinas $\beta 6$ de cada tetrâmero participa dos contatos intermoleculares (BALLAS; MOHANDAS, 1996).

A polimerização da hemoglobina S é o evento fundamental na patogenia da anemia falciforme, resultando na alteração da forma do eritrócito e na acentuada redução de sua deformabilidade (Figura 6). As células rígidas com formas aberrantes são responsáveis pela oclusão vascular e lesão de tecidos que representam os principais fenômenos dessa doença (DEAN; SCHECHTER, 1978).

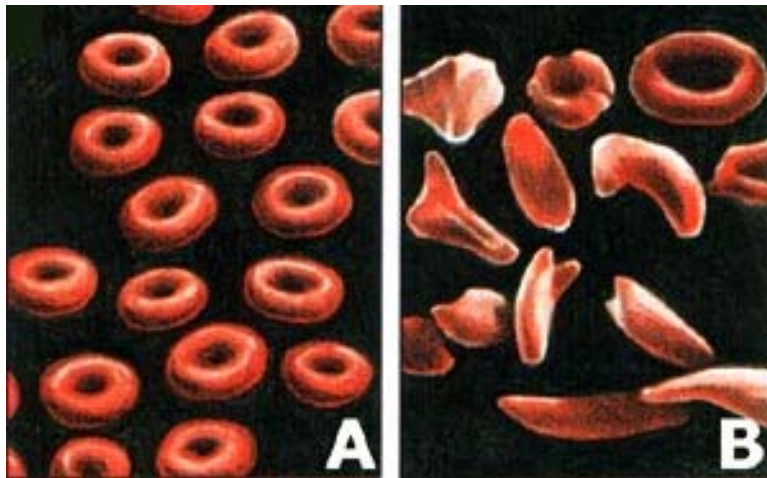


Figura 6 – Morfologias do eritrócito normal e falcizado.

A: eritrócitos normais, com seu formato em disco bicôncavo.

B: eritrócitos falcizados pela presença da HbS.

FONTE: <http://www.visualsunlimited.com/browse/vu229/vu229650>

A polimerização da HbS desoxigenada depende de numerosas variáveis tais como, concentração de oxigênio, pH, concentração de HbS, temperatura, pressão, força iônica e presença de hemoglobinas normais. A hemoglobina fetal inibe a polimerização, fenômeno responsável pela redução de sintomatologia clínica nos pacientes com elevada concentração de HbF. Da mesma forma, a HbA participa pouco do polímero, sendo esta a razão para a ausência de anormalidades clínicas nos heterozigotos para o gene da HbS (BOOKCHIN; LEW, 1996).

3.7.2 Cinética da Falcização

A falcização não é um fenômeno instantâneo. A análise cinética da falcização sugere que a polimerização molecular ocorre em estágios. Se uma solução de HbS desoxigenada mantida a 4°C for aquecida rapidamente, observa-se

um intervalo entre a elevação da temperatura e o início de agregação das moléculas de hemoglobina. Depois desse retardo inicial, a polimerização ocorre rapidamente até que a gelificação se complete e seja atingido um novo equilíbrio. O período de demora é atribuído aos processos de nucleação, nos quais os tetrâmeros de HbS formam pequenos agregados sem modificação da viscosidade interna. Quando estes agregados atingem uma massa crítica, ocorre uma rápida adição de unidades de hemoglobina livre para formar fibras, que depois sofrem alinhamento para formar um cristal tactóide (WERNER; BALCERZAK, 1984). A nucleação, sendo um processo termodinamicamente desfavorável, representa o passo limitante na formação do polímero. A fase de propagação, termodinamicamente favorável, equivale à adição relativamente rápida de moléculas livres de hemoglobina ao núcleo (LEE *et al*, 1998).

Sob condições fisiológicas, a demora entre a desoxigenação completa e a falcização dos eritrócitos é fortemente influenciada pelas alterações na concentração da hemoglobina, pela presença de outras hemoglobinas que não a HbS, pH e 2,3-bisfosfoglicerato. Como a extensão da desoxigenação *in vivo* é uma função do tempo requerido para as células atravessarem o leito capilar, a cinética da falcização sem dúvida tem importante significado clínico (EATON *et al.*, 1976).

3.7.3 Patologia celular

Com a desoxigenação, as hemácias que contém predominantemente a HbS podem adquirir a deformidade em formato de foice devido à polimerização intracelular da HbS desoxigenada, processo normalmente reversível após a reoxigenação. No entanto, a repetição desse fenômeno provoca considerável lesão de membrana em alguns eritrócitos susceptíveis, fazendo com que a rigidez e configuração em forma de foice persistam mesmo após a reoxigenação. Essas células são as chamadas células irreversivelmente falciformes. Tanto a polimerização da HbS como a lesão da membrana contribuem para a fisiopatologia das síndromes falciformes (BUNN, 1999).

Quando falcizadas, as hemácias perdem K^+ e ganham Na^+ , um fenômeno atribuído à falha parcial do bombeamento destes cátions pela Na^+K^+ -ATPase. Como o fluxo líquido de Na^+ e K^+ é aproximadamente igual em células reversivelmente falciformes, não ocorre nenhuma mudança na hidratação intracelular ou

concentração de hemoglobina. A concentração intracelular de Ca^{++} está aumentada durante a falcização devido, em parte, ao prejuízo do bombeamento de Ca^{++} dependente de $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}\text{ATPase}$. Nas células irreversivelmente falciformes a perda de K^+ excede o ganho de Na^+ , resultando na perda de água das células e na concentração aumentada de hemoglobina intracelular (BRUGNARA, 2001).

O componente majoritário do esqueleto da membrana eritrocitária é a espectrina, uma proteína flexível e fibrosa. A espectrina está ligada à superfície interna da membrana por meio de ligações não covalentes a uma outra proteína, a anquirina. Esta por sua vez se liga à proteína banda 3, a qual é a proteína integrante mais volumosa da membrana do eritrócito que serve de canal para a troca passiva de ânions através da membrana. A HbS forma polímeros associados com proteínas da membrana, em especial da banda 3. Uma anormalidade funcional na anquirina é sugerida pela ligação ineficaz de espectrina normal pela anquirina de vesículas internas-externas preparadas de hemácias falciformes como observado na Figura 7 (PALEK, 1977).

Embora a composição dos lipídios das células irreversivelmente falciformes seja comparável à das células normais da mesma idade, a evidência de alteração na organização dos lipídios da membrana é considerável. O folheto externo da bicamada lipídica está enriquecido em fosfatidiletanolamina e contém fosfatidilserina. Estas alterações são compensadas pelo desvio de fosfatidilcolina do folheto externo para o interno. Este rearranjo de amino-fosfolipídios tem possível significado na patogênese da oclusão microvascular, pois a fosfatidilserina fornece uma superfície catalítica para a ligação de fatores de coagulação sanguínea, acelerando, portanto, o tempo de coagulação (HEBBEL, 1991).

A membrana é, assim, o principal local onde se refletem alterações moleculares que ocorrem no interior da célula. Essas modificações têm conseqüências que levam a manifestações clínicas, como as apontadas por Zago e Pinto (2007):

- Aumento da adesão de hemácias ao endotélio, desencadeando fenômenos inflamatórios que influenciam também os granulócitos e plaquetas;
- Enrijecimento da membrana e da hemácia, encurtando sua sobrevida em circulação;
- Lesões microvasculares;

- Depleção de óxido nítrico, que contribui para vasoconstrição e ativação da inflamação;
- Ativação da coagulação.

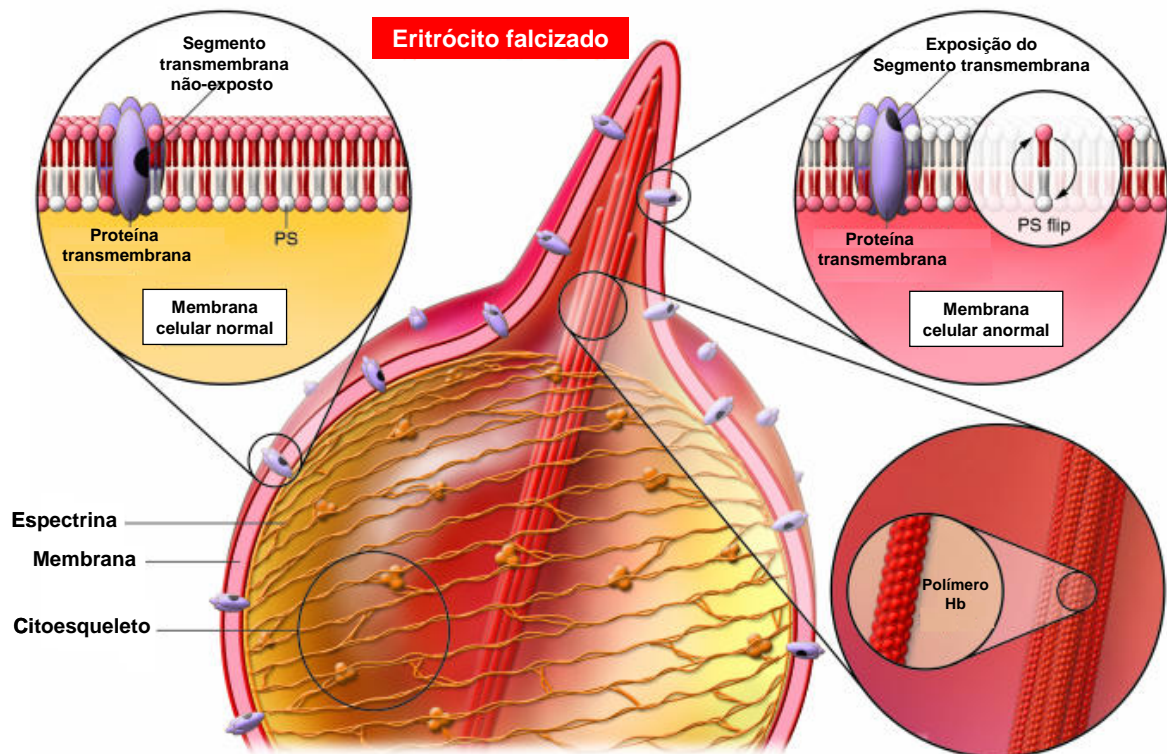


Figura 7 – Alterações na membrana de eritrócitos devido à presença da HbS.

A desoxigenação da HbS induz a uma mudança de conformação nesta molécula devido à troca do ácido glutâmico pela valina, a qual interage com os resíduos fenilalanina e leucina na molécula adjacente da HbS. Esta interação de natureza hidrofóbica desencadeia a formação de polímeros. Os polímeros de hemoglobina rompem o citoesqueleto do eritrócito formando protusões que dão a aparência de foice ao eritrócito. Interrupções de ligações da membrana com as proteínas do citoesqueleto resultam na exposição de epítomos de proteínas transmembrana e lipídios como a fosfatidilserina (PS). A exposição de glicolípídios carregados negativamente contribui para estados pró-inflamatórios e pro-trombóticos.

FONTE: STATIUS, 1999.

3.7.4 Adesão ao endotélio e o fenômeno de vaso-oclusão

As hemácias falciformes têm uma aderência anormal ao endotélio vascular, monócitos, macrófagos e membrana lipídica. Esta propriedade é conferida pelas células falciformes deformáveis e não pelas células irreversivelmente falciformes, talvez porque as células rígidas são incapazes de formar contatos de superfície

múltiplos com as células endoteliais (BOOKCHIN; LEW, 1996). A importância desta observação em relação à fisiopatologia de crises vaso-oclusivas é sugerida pela demonstração de que a deformabilidade das hemácias tem uma forte correlação positiva com a frequência e gravidade das crises dolorosas. Indivíduos que geram um número relativamente maior de células irreversivelmente falciformes têm deformabilidade reduzida das hemácias e doença mais leve comparados com aqueles cujas hemácias são mais deformáveis (MOHANDAS; EVANS, 1984).

As células irreversivelmente falciformes são incapazes de penetrar nos capilares ou são incapazes de se aderir ao endotélio capilar, ao passo que as células falciformes deformáveis penetram nos capilares rapidamente, aderem ao endotélio e comprometem o fluxo sanguíneo. Vários mecanismos foram propostos para o aumento da aderência entre eles: a distribuição desigual e interrompida de cargas negativas sobre a membrana das hemácias falciformes, a desidratação celular e a excessiva auto-oxidação das hemácias falciformes (LEE *et al.*, 1998).

Os eritrócitos falciformes expressam maior número de moléculas de adesão (PS, CD36, CD47, CD49d e BCAM/LU) na superfície externa da membrana celular do que eritrócitos normais (HEBBEL, 1997). Essas moléculas favorecem a interação com o endotélio e com outras células, propagando o processo de vaso-oclusão. Algumas dessas moléculas (CD36 e CD49d) estão expressas somente nos reticulócitos. Como essas células jovens são mais aderentes e estão presentes em maior número nesses pacientes, elas desempenham papel importante no fenômeno vaso-oclusivo (HEBBEL, 1997).

A vaso-oclusão depende de numerosos fatores adicionais, como a adesão dos eritrócitos ao endotélio vascular e a interação entre leucócitos, plaquetas e hemácias. As interações moleculares responsáveis pela adesão das hemácias falcizadas ao endotélio incluem o complexo das integrinas ($\alpha\beta$) presente na membrana dos reticulócitos, que é capaz de ligar-se à fibronectina e à molécula de adesão vascular 1, na superfície das células endoteliais, particularmente após ativação por citocinas inflamatórias (BALLAS; MOHANDAS, 1996).

Além disso, tanto as células endoteliais quanto uma população de reticulócitos possuem CD36, que tem a propriedade de ligar-se a trombospondina secretada pelas plaquetas ativadas. A trombospondina também se liga a glicanas sulfatadas na membrana das hemácias falcizadas. Várias outras proteínas

plasmáticas, incluindo o fator de Von Willebrand, parecem ter papel importante na adesão das hemácias ao endotélio (TELEN, 2000).

Este conjunto de mecanismos perturba a função normal do endotélio, rompendo o equilíbrio entre a vasodilatação e a vasoconstrição, de tal modo que a vasoconstrição é favorecida. Em resposta a essa reação, os níveis de endotelina (vasoconstrição) estão elevados na anemia falciforme, ao passo que a produção de óxido nítrico (vasodilatação) está reduzida (Figura 8).

Existem evidências para uma importante função dos neutrófilos na vaso-occlusão que, estimulados pela ligação entre as hemácias falciformes e o endotélio, liberam citocinas. Os neutrófilos ativados expressam CD64, integrinas ($\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_M\beta_2$), receptor de trombospondina (CD36), moléculas de adesão ao endotélio, recrutam plaquetas e outros neutrófilos para o sítio de inflamação, além de secretarem H_2O_2 que lesa o endotélio vascular (OKPALA, 2004).

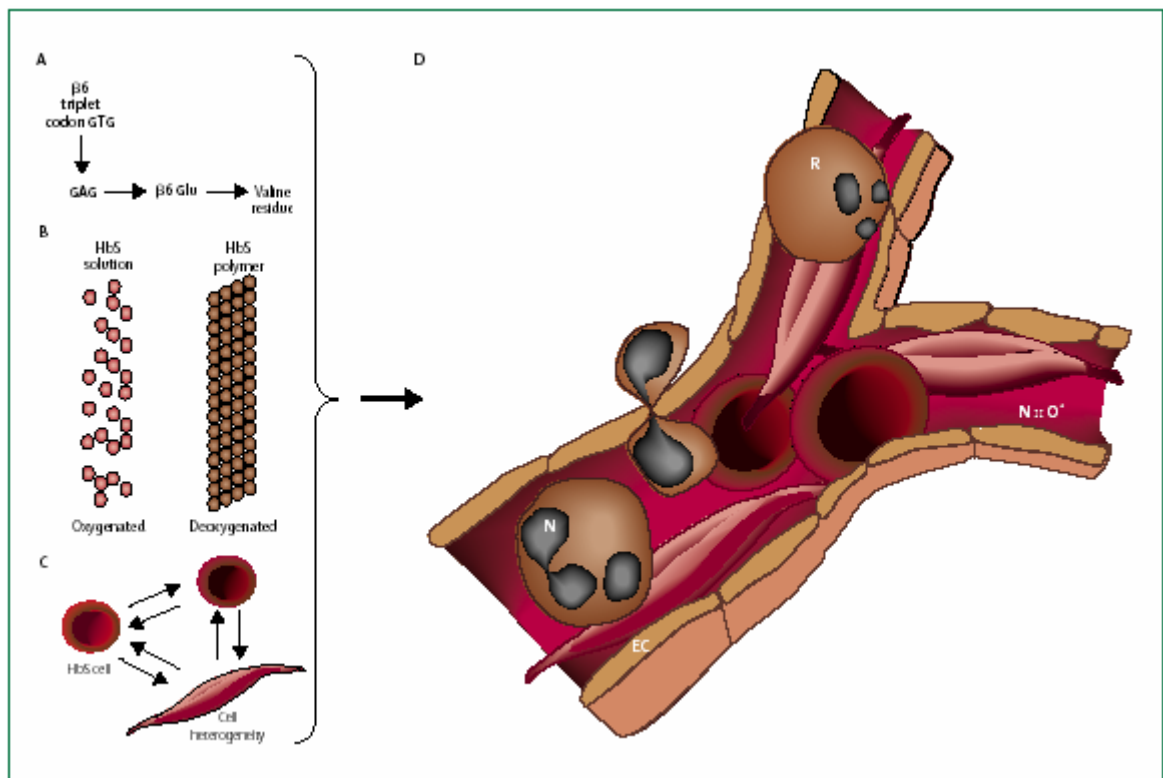


FIGURA 8 – Fisiopatologia da vaso-occlusão.

(A) Substituição de nucleotídeo ($GAG \rightarrow GTG$). (B) Polimerização da HbS desoxigenada. (C) Mudança na forma do eritrócito contendo o polímero de HbS. (D) Fenômeno da vaso-occlusão.

FONTES: STUART; NAGEL, 2004.

3.7.5 Fenômenos inflamatórios

O estado inflamatório crônico que ocorre nos pacientes com doença falciforme é decorrente de diversos fatores que se interligam e se retroalimentam, formando um ciclo inflamatório permanente (FIGUEIREDO, 2007).

As células endoteliais participam na manutenção da hemostasia e produzem óxido nítrico, substância vasodilatadora que regula o tônus vascular. O endotélio lesado expõe um fator tecidual que desencadeia a cascata da coagulação e libera multímeros de Von Willebrand, que participam da hemostasia primária (HEBBEL; OSAROGIAGBON; KAUL, 2004). A hemólise crônica de hemácias falciformes libera hemoglobina livre e arginase, enzima que contribui para a produção de óxido nítrico. A depleção de substrato e o seqüestro de óxido nítrico causam redução local desta substância e vasoconstrição, a qual retarda o fluxo sanguíneo e favorece a falcização das hemácias (ZAGO; PINTO, 2007).

Além de produzir óxido nítrico, as células endoteliais liberam endotelina-1, um peptídeo pró-inflamatório e potente vaso-constritor. Durante quadros inflamatórios agudos, as concentrações plasmáticas de endotelina-1 estão elevadas. Esse peptídeo, além da ação vasoconstritora, aumenta as concentrações de VCAM-1 e ICAM-1 solúveis e também estimula monócitos a secretarem citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , GC-SF) e substâncias que aumentam a produção de superóxidos pelos neutrófilos (WAUTIER; WAUTIER, 2004).

As plaquetas, estimuladas pela presença dessas citocinas inflamatórias, liberam multímeros de Von Willebrand, que favorecem a ligação entre as plaquetas, endotélio e eritrócito falciforme, e liberam também trombospondina e fibronectina, ligantes entre endotélio e células (MCINTYRE; PRESCOTT; ZIMMERMAN, 2003).

3.7.6 Hemólise

Na anemia falciforme, aproximadamente um terço das hemácias lisadas, sofrem hemólise intravascular, e cerca de dois terços destas, são removidas da circulação pelos macrófagos (MCINTYRE; PRESCOTT; ZIMMERMAN, 2003) A hemólise intravascular é considerada o resultado do desprendimento de microfilamentos durante o processo de desfalcização e da lise de células irreversivelmente falcizadas expostas a altas taxas de esforço, tal como ocorre

durante exercício (ROTHER *et al.*, 2005). A base para a remoção extravascular acelerada de hemácias não está completamente elucidada. O formato anormal e a rigidez aumentada são menos importantes do que se a função esplênica fosse preservada (SERJEANT *et al.*, 1994).

3.8 FATORES QUE MODULAM A GRAVIDADE DA ANEMIA FALCIFORME

Algumas características genéticas têm grande importância na gravidade clínica da doença, porque determinam a concentração intracelular de HbS. A elevada concentração de HbS é essencial para que a polimerização da HbS se inicie e se propague rapidamente, provocando a falcização e os fenômenos celulares que desencadeiam as lesões tissulares (STEINBERG, 2005). Assim, genótipos que produzem uma menor concentração de HbS ou uma elevação da HbF, que não interage com as moléculas de HbS, dificultam a polimerização e a falcização, reduzindo a gravidade e a intensidade das manifestações clínicas (FRENETTE; ATWEB, 2007).

Além disso, os haplótipos da região dos genes da beta globina têm uma função importante na determinação da gravidade da doença, em parte, por influenciar na concentração da HbF (STUART; NAGEL, 2004).

Tão importante quanto as variações genéticas, os fatores adquiridos são responsáveis pela variabilidade clínica e prognóstico dos pacientes com anemia falciforme. O nível sócio-econômico e educacional ocupa uma posição central, pois determina variantes que influenciam diretamente na evolução da doença e no seu prognóstico: acesso à atenção médica, diagnóstico precoce, alimentação e nutrição de boa qualidade, acesso a saneamento básico e, portanto, água de boa qualidade e menor exposição a infecções, melhores condições de vida e de trabalho, além do tratamento rápido das complicações (ZAGO; PINTO, 2007).

3.9 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME

As cadeias de alterações que ligam o defeito molecular às manifestações clínicas nos pacientes com doença falciforme devem ser consideradas em três níveis: moléculas e células, tecidos e órgãos e organismo completo (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Uma das características dessa doença é a variabilidade clínica, sendo que, enquanto alguns pacientes têm um quadro de grande gravidade e estão sujeitos a inúmeras complicações e freqüentes hospitalizações, outros apresentam uma evolução mais benigna, e, em alguns casos são quase assintomáticos. Existem numerosos fatores condicionantes que podem intensificar ou diminuir os efeitos, gerando essa impressionante variabilidade. Os principais fatores que podem influenciar o fenótipo da doença falciforme são, segundo Zago e Pinto (2007):

- O genótipo do paciente: homozigose para HbS ou genótipos compostos do tipo HbS/HbC, HbS/ β -talassemia, HbS/HbD;
- Fatores genéticos que podem influenciar no processo de polimerização da HbS, no fenômeno de falcização e na hemólise;
- Outros fatores genéticos que podem alterar a resposta individual à doença, a suas complicações ou ao tratamento;
- Fatores ambientais, como o local onde vive o paciente, a prevalência de doenças infecto-contagiosas, as condições sócio-econômicas e o acesso à assistência médica.

Embora a doença atribuída a HbS tenha sido observada no início da fase de lactação, os indivíduos afetados caracteristicamente não têm sintomas até a segunda metade do primeiro ano de vida (OTENG-NTIM *et al.*, 2006). A falta de expressão clínica do genótipo homozigoto da HbS (HbSS) durante a vida fetal e início da pós-fetal é explicada pela produção de uma quantidade suficiente de HbF para limitar a falcização (STREETLY; DICK, 2005). As condições para a falcização sob condições fisiológicas são alcançadas gradualmente a partir do nascimento (AJAYI, 2005).

As manifestações clínicas nas doenças falciformes são derivadas primariamente da oclusão vascular e, em menor grau, da anemia. Praticamente todos os órgãos podem ser afetados pela oclusão vascular. As obstruções em pequenos vasos causam quadro de dor e comprometem progressivamente as funções de órgãos e tecidos. As alterações das hemácias afetam também o baço, que aumenta muito de tamanho e contribui ainda mais para a anemia (KRUGER, 2008).

Os pacientes com a doença falciforme apresentam períodos sem manifestações clínicas, denominados fase estável da doença. A fase estável pode

ser interrompida por manifestações agudas, denominadas de crises de falcização, que são em geral classificadas em crises vaso-oclusivas ou dolorosas, aplásicas, infecciosas e a chamada síndrome de seqüestro (STEINBER, 2006).

3.9.1 Crises vaso-oclusivas

Os episódios dolorosos agudos representam as manifestações clínicas mais comuns e características da doença falciforme. As manifestações clínicas são repentinas no início e são diretamente atribuídas à obstrução da microcirculação pela falcização intravascular (BALLAS, MOHANDAS, 1996). A freqüência e a gravidade das crises variam consideravelmente de paciente para paciente e em um mesmo paciente, modificando-se bastante em diferentes períodos da vida. Os fatores desencadeantes são variados e incluem infecção, desidratação e tensão emocional de qualquer natureza (FRANCIS, 1991). As crises dolorosas são mais freqüentes na terceira e quarta décadas da vida, e a taxa de mortalidade é mais alta em adultos que apresentam maior freqüência dessas crises (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004). As crises dolorosas podem afetar muitas articulações e órgãos diferentes do corpo; mas as costas, o tórax, as mãos, os pés e o abdome geralmente são mais afetados. Na metade dos casos, estas crises são acompanhadas de febre, inchaço, sensibilidade, náuseas, vômitos, pressão alta e taquicardia (DAVIES, 2007).

3.9.2 Crises hematológicas

As crises hematológicas, caracterizadas por súbita agudização na anemia, não estão patogenética e temporalmente relacionadas às crises vaso-oclusivas. Se não reconhecida ou não tratada, a queda na concentração de hemoglobina pode ser tão precipitada e grave que causa insuficiência cardíaca e morte em horas (LEE *et al.*, 1998).

3.9.3 Crises aplásicas

As crises aplásicas são caracterizadas por queda acentuada nas concentrações de hemoglobina, acompanhada de contagem de reticulócitos

extremamente reduzida, caracterizando uma insuficiência transitória da eritropoiese. No entanto, o processo é autolimitado; dentro de 5 a 10 dias, a produção de hemácias recomeça espontaneamente e grande número de reticulócitos e eritrócitos nucleados aparecem no sangue periférico. Depois disso, a concentração de hemoglobina retorna aos níveis pré-crise (SERJEANT *et al.*, 1981). No entanto, no período agudo de anemia, pode ser necessária a terapêutica com transfusões de concentrado de hemácias. A insuficiência medular também pode resultar da deficiência de ácido fólico, especialmente durante a gravidez (ROSSE; TELEN; WARE, 1998).

3.9.4 Crises infecciosas

A infecção é a principal manifestação presente na anemia falciforme no início da infância, a complicação mais comum que requer hospitalização e a causa mais freqüente de morte em todas as idades (REES *et al.*, 2003). A base fisiológica para aumento da suscetibilidade à infecção relaciona-se, em grande parte, à perda da função esplênica. Inicialmente, uma esplenomegalia conseqüente à congestão da polpa esplênica em virtude da obstrução por grandes quantidades de células falcizadas, acompanhada de hemorragias ao redor dos corpúsculos de Malpighi (GASTON *et al.*, 1986). A oclusão vascular provocaria repetidos microenfartos, tornando o órgão fibrótico e atrófico. Na ausência da função do baço, os antígenos particulados oriundos do sangue não conseguem fazer surgir uma resposta antigênica esperada (ZARKOWSKY *et al.*, 1986).

3.9.5 Seqüestro esplênico

O seqüestro esplênico é caracterizado pelo súbito aprisionamento de sangue no baço. Ocorre em lactentes e crianças jovens onde o baço está cronicamente dilatado. Há uma redução de hemoglobina com resposta medular compensatória e aumento rápido do baço. É a segunda causa mais freqüente de morte por levar ao choque hipovolêmico (KINNEY, 1990).

3.10 INVESTIGAÇÃO DO PACIENTE PORTADOR DE HbS

A HbS pode ser detectada em testes de triagem por métodos que identificam a alteração da solubilidade da hemoglobina S e pela visualização em microscopia ótica do fenômeno de falcização *in vitro*, testes amplamente utilizados na rotina laboratorial (BANDEIRA *et al.*, 2003).

O diagnóstico conclusivo da anemia falciforme depende da detecção da HbS pela eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino, sendo que esta metodologia permite a caracterização genotípica em homocigoto normal (AA), homocigoto ou portador da anemia falciforme (SS), ou heterocigoto (AS), designado portador do traço falcêmico (FRENETTE; ATWEB, 2007).

3.10.1 Teste de solubilidade

A solubilidade reduzida de HbS desoxigenada forma a base para testes nos quais o sangue é adicionado a uma solução tamponada de um agente redutor, tal como ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). A HbS precipita na solução de ditionito, deixando-a turva, ao passo que na presença de outras hemoglobinas a solução permanece límpida. Este é um teste qualitativo, pois a turvação ou a insolubilidade da mistura, não indicam o tipo de associação da HbS.

Este teste foi adaptado para facilitar sua utilização. Por exemplo, o “teste da mancha”, é uma modificação da técnica original onde se usa o tampão fosfato e ditionito de sódio embebido em papel de filtro (BANDEIRA *et al.*, 2003).

Hemoglobinas altamente instáveis que não a HbS, podem também serem precipitadas pelos reagentes do teste de solubilidade. A hiperglobulinemia é a causa mais comum de resultados falsamente positivos (LEE *et al.*, 1998). O teste tem baixa reprodutibilidade, podendo não ocorrer precipitação, mesmo na presença da hemoglobina S.

O teste de solubilidade, assim como outros testes de triagem para a HbS, possuem limitações, podendo fornecer resultados falso-positivos ou falso-negativos em diversas situações. Resultados falso-positivos podem ser observados em patologias, como policitemia, mieloma múltiplo, presença da Hb Bart ou HbC Harlem, insuficiência renal crônica e transfusão recente. Excesso de volume de sangue na

reação também produz resultado falso-positivo. Casos falso-negativos também ocorrem, principalmente quando se tem quantidade inadequada de sangue, deterioração e inatividade dos reagentes, dificuldade na leitura do teste, HbS presente em quantidades pequenas, como ao nascimento e após transfusão sanguínea (PRUDENCIO; COVAS; BONINI-DOMINGOS, 2000).

3.10.2 Teste de falcização

O teste de falcização é uma avaliação qualitativa, que determina a presença ou a ausência da HbS. Baseia-se na indução da falcização dos eritrócitos por meio da desoxigenação da hemoglobina por drogas redutoras num microambiente formado no espaço entre lâmina e lamínula (SCHMIDT, 1973).

O fenômeno de falcização pode ser induzido colocando-se uma gota de sangue sob uma lamínula, para reduzir a tensão de oxigênio, adicionando-se agentes que induzem a desoxigenação química, tal como metabissulfito de sódio a 2% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) ou por deslocamento gasoso de oxigênio através de misturas de nitrogênio e dióxido de carbono (BANDEIRA *et al.*, 2003). O grau e a rapidez do fenômeno de falcização dependem da relativa quantidade de HbS e do grau de desoxigenação. Células contendo outras hemoglobinas variantes, nas quais está presente a substituição $\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$, tal como HbS-Georgetown e HbS-Memphis, exibem também o fenômeno de falcização (LEE *et al.*, 1998).

Resultados falso-negativos no teste de falcização não são infreqüentes. A sensibilidade do teste de falcização depende de fatores como o agente redutor utilizado e sua pureza; tempo, temperatura e umidade na reação, eficiência da anaerobiose no meio reacional, quantidade presente das hemoglobinas S e F. O ensaio indica quando positivo, a presença de HbS nos eritrócitos, sem caracterizar genótipos como AS, SS, SC, S+F ou SD (WAJCMA *et al.*, 2001).

3.10.3 Vantagens e desvantagens dos testes de solubilidade e de falcização

Embora os testes de solubilidade e de falcização sejam usados na rotina dos laboratórios pela sua simplicidade e rapidez, nenhum deles fornece um diagnóstico definitivo. Ambos não conseguem diferenciar anemia falciforme de traço de células falciformes ou detectar variantes de hemoglobina que interagem com HbS para

produzir falcização clinicamente significativa, como a heterozigose HbSC. Além disso, em neonatos esses testes costumam apresentar-se negativos devido à pequena concentração de HbS e elevada concentração de HbF. Podem ser utilizados como testes de triagem para a HbS, sendo necessário testes complementares para o diagnóstico, como por exemplo, a eletroforese alcalina (LEE *et al.*, 1998).

3.10.4 Eletroforese de hemoglobinas

A eletroforese de hemoglobinas é um procedimento laboratorial simples, porém útil para a detecção e identificação de hemoglobinas. Com esta técnica podem-se separar as proteínas de acordo com sua carga elétrica (PRUDENCIO; COVAS; BONINI-DOMINGOS, 2007). Assim, sua principal limitação é a incapacidade de detectar substituições de aminoácidos que não alteram a carga da proteína. Esta metodologia deve ser utilizada como teste de rastreamento para a detecção de hemoglobinas variantes. Metodologias complementares devem ser realizadas para a caracterização de hemoglobinas com migração semelhante (ZAMARO *et al.*, 2002). Os métodos mais simples e mais populares de rotina empregam membranas de acetato de celulose, para as quais muitos tipos de equipamentos de eletroforese estão disponíveis comercialmente.

A HbS é detectada pela eletroforese alcalina de hemoglobinas, assim denominada pelo fato de utilizar tampão com pH entre 8,0 e 9,0. Nesta faixa de pH, a HbS se move de forma mais lenta que a HbA, sendo possível detectar sua presença. Entretanto, deve-se lembrar que existem outras hemoglobinas variantes que possuem o mesmo padrão de migração que a hemoglobina S, sendo, portanto, necessários outros testes para o diagnóstico definitivo. Com eletroforese ácida, pH entre 5,0 e 6,0, consegue-se diferenciar a HbS de outras hemoglobinas variantes. Nesta faixa de pH, a HbS migra em posição diferente da HbA, enquanto as outras hemoglobinas variantes migram na mesma posição. A análise conjunta dos perfis eletroforéticos em meio alcalino e ácido tem importante função no estabelecimento dos diferentes genótipos de hemoglobinas (HOCKING, 1997).

3.10.5 Focalização isoeletrica

A técnica de focalização isoeletrica permite diagnósticos mais seguros, podendo facilmente ser adaptada a triagens populacionais. Neste método, as hemoglobinas são separadas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI) em um gradiente de pH estável estabelecido por meio de uma mistura de anfólitos com valores de pH estreitamente distribuídos sobre uma faixa de variação específica (BEUZARD, *et al.*, 1981). Durante o processo de focalização, as hemoglobinas migram até a posição onde ocorra a identificação de seu pI com o gel, e assim a hemoglobina poderá ser visualizada como uma banda muito nítida. Como cada hemoglobina possui seu pI específico, as identificações de variantes menos comuns, como as hemoglobinas D, E, G e outras, ficam bastante facilitadas. As frações de HbS, ou outras variantes em neonatos, são facilmente visualizadas por este método (ANVISA, 2002).

A focalização isoeletrica apresenta algumas vantagens sobre os procedimentos eletroforéticos e cromatográficos. Este método possui excelente resolução para separar hemoglobinas variantes cujo pI apresentam pouca diferença; a quantidade de amostra a ser analisada é pequena quando comparada com outros métodos, como a cromatografia por exemplo; e permite a análise de 20 a 100 amostras por vez. Devido ao alto custo operacional, seu uso ainda é restrito (WAJCMAN *et al.*, 2001).

3.10.6 HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão

A HPLC é uma das mais sensíveis formas de fracionamento cromatográfico. As colunas, de diferente composição química, são previamente selecionadas, conforme o teste que se deseja realizar. Para o estudo estrutural das hemoglobinas, esta proteína é enzimaticamente clivada e os oligonucleotídeos resultantes são separados por HPLC. Também, este processo pode ser utilizado para a análise quantitativa dos aminoácidos que compõem a molécula de hemoglobina. A HPLC substitui os tradicionais métodos de cromatografia por troca iônica, bem como o mapeamento peptídico pela técnica de *fingerprinting*. Essa técnica é usada no diagnóstico de HbS em sangue de recém-nascidos. Entretanto, seu uso deve ser

monitorado por eletroforeses alcalina e ácida, uma vez que há sobreposição de frações com a HbA₂ (CLARKE; HIGGINS, 2000; BAIN, 2001).

3.11 MÉTODOS MOLECULARES PARA A DETECÇÃO DE HbS

As metodologias para análise do gene da beta globina tornaram possível a identificação de uma grande gama de mutações que causam as hemoglobinopatias, especialmente a anemia falciforme. Os métodos moleculares têm em comum uma etapa de amplificação de uma região específica do gene da beta-globina utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). Essas metodologias têm se mostrado útil na identificação precisa de uma mutação ou um defeito genético (BERTHOLO; MOREIRA, 2006). As técnicas que detectam mutações conhecidas têm sido extensivamente utilizadas, entre as quais destacam-se:

- Sondas de oligonucleotídeos alelo-específicos (ASOs),
- Análise de hibridização ou *dot-blot*,
- Análise de *dot-blot* reverso,
- Amplificação gênica alelo-específica,
- Análise com enzimas de restrição (PCR-RFLP).

Outras técnicas moleculares podem ser empregadas para a identificação e triagem da presença de mutações não conhecidas, tais como:

- Análise de conformação de fita simples (SSCP),
- Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE),
- Análise de heteroduplex,
- Seqüenciamento de DNA.

Cada uma dessas técnicas tem suas próprias limitações. As técnicas a serem escolhidas pelo laboratório de biologia molecular dependem do espectro de mutações encontradas em seu meio e dos conhecimentos técnicos disponíveis para o diagnóstico. É de boa prática que o laboratório realize pelo menos dois métodos para detectar cada mutação (MOLINA; TOBO, 2004).

O gene beta globina humana possui uma das regiões polimórficas mais estudadas por técnicas de biologia molecular, sendo descritas para o mesmo mais de 750 variações genéticas. A combinação destas variações genéticas em haplótipos específicos pode contribuir para a diversidade clínica observada nos pacientes com hemoglobinopatias. As técnicas de biologia molecular permitem a

diferenciação da HbS de outras hemoglobinas variantes que migram eletroforéticamente em posição similar à da HbS (POWARS, 1991).

3.11.1 PCR-RFLP – Polimorfismos de Comprimentos dos Fragmentos de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

A alteração molecular na HbS pode ser facilmente identificada pela reação em cadeia da polimerase seguida de digestão com uma enzima de restrição (endonuclease) apropriada. As endonucleases de restrição são enzimas bacterianas que atuam como “tesouras moleculares”, reconhecendo seqüências de pares de bases específicas em moléculas de DNA e clivando-as nesses pontos (SAIKI *et al.*, 1988). Elas são altamente específicas, cada tipo de enzima reconhece e corta apenas uma determinada seqüência de nucleotídeo, em geral constituída por 4 a 6 pares de bases nitrogenadas (WATERFALL; COBB, 2001).

A mutação S pode ser detectada pela enzima de restrição *Dde I*, ou seu isoesquizômero *HpyF3 I*. Estas enzimas permitem identificar o sítio da mutação S, pois clivam a seqüência 5' C↓ TNAG 3' e 3' GANT↑C 5', onde N pode ser qualquer nucleotídeo. Como na mutação S ocorre a troca da adenina para timina, a enzima não vai clivar a seqüência mutada, gerando assim apenas uma banda para a HbS e duas bandas para a HbA, quando os fragmentos de restrição são analisados em eletroforese. Este método é utilizado no diagnóstico pré-natal das doenças falciformes ou em alguns casos de difícil diagnóstico pela eletroforese de hemoglobinas (KHELIL *et al.*, 2004).

A técnica de PCR-RFLP possui limitações:

- Existem muitas doenças que resultam de vários genes mutantes trabalhando juntos para produzir o fenótipo da doença;
- Existem doenças genéticas para as quais o gene ainda não foi descoberto; até o gene poder ser localizado, clonado e seqüenciado nenhuma sonda pode ser feita para o detectar diretamente;
- Se existir troca de base, deleção ou inserção no sítio da restrição, a enzima não vai reconhecer este sítio e, conseqüentemente, não vai clivar a seqüência, tendo assim um resultado falso.

Uma série de eventos mutacionais pode promover alterações nos tamanhos dos fragmentos, excluindo ou introduzindo um sítio de restrição (ANTONARAKIS et

al, 1985). Por outro lado, a vantagem de se utilizar a técnica de PCR-RFLP encontra-se no fato da mesma apresentar um diagnóstico rápido e preciso para a HbS, permitindo diferenciar indivíduos homocigotos de heterocigotos em uma única técnica.

3.11.2 SSCP – Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (*Single-Stranded Conformation Polymorphism*)

A PCR-SSCP é um método destinado a realizar a triagem de mutações, pois permite a detecção de alterações na mobilidade eletroforética de fita simples dos ácidos nucleicos em condições não desnaturantes. As fitas simples de ácidos nucleicos formam estruturas secundárias em solução que dependem da composição e da seqüência das bases e do comprimento da fita simples (ORITA *et al.*, 1989). As fitas simples adquirem conformações tridimensionais estáveis e migram em diferentes posições. Uma simples mutação de ponto pode alterar esta conformação e, conseqüentemente, o padrão de bandas do fragmento (IWAHANA; YOSHIMOTO; ITAKARA, 1992). Os perfis de PCR-SSCP podem ser detectados pela coloração dos géis de eletroforese pelo método de nitrato de prata ou brometo de etídeo (LEE *et al.*, 1998).

Embora a técnica de PCR-SSCP seja uma técnica relativamente simples, ela exige alguns cuidados e apresenta algumas limitações. Este método precisa ser otimizado para cada gene a ser estudado. Essa padronização é empírica e é necessário ajustar as concentrações de acrilamida, bisacrilamida, pH do gel, tempo de corrida e voltagem, além de se verificar a necessidade da adição de alguns compostos para melhor migração dos fragmentos (LESSA; APPLEBAUM, 1993). Além disso, o fragmento analisado não deve ser muito grande. Sabe-se que bons resultados são obtidos com fragmentos entre 200 e 300 pb, embora tenha se conseguido identificar variações genéticas em fragmentos bem maiores, de mais ou menos 550 pb, os quais exigem um tempo de corrida maior com possível perda da sensibilidade do método (SHEFFIELD *et al.*, 1993). Também é possível utilizar enzimas de restrição para clivar o segmento de DNA amplificado, obtendo assim, fragmentos menores, com melhores resoluções na PCR-SSCP (IWAHANA; YOSHIMOTO; ITAKARA, 1992).

Uma desvantagem do método está no fato da necessidade de posterior seqüenciamento do produto de PCR em estudo para identificar as mutações indicadas pelo ensaio de PCR-SSCP.

A vantagem desta técnica consiste no fato de ser relativamente barata quando comparada a outros procedimentos em biologia molecular, e permitir a observação de mutações desconhecidas, sendo eficiente na descoberta de novos polimorfismos (SUNNUCKS *et al.*, 2000).

3.11.3 DGGE – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

A DGGE é um método de separação eletroforética baseado em diferenças no comportamento da desnaturação de fragmentos de DNA de cadeia dupla. A DGGE, assim como a SSCP é uma técnica utilizada para a triagem de mutações desconhecidas. Essa técnica pode ser usada para detectar diretamente modificações de uma única base e outras variações genéticas em DNA genômico, DNA clonado ou DNA amplificado por PCR. As moléculas do DNA desnaturam em segmentos específicos designados domínios de desnaturação, quando a temperatura ou a concentração do desnaturante se eleva. A seqüência contendo mutação tem a mobilidade alterada em um gel com gradiente do agente desnaturante (MYERS; MANIATIS; LERMAN, 1987).

Esse método é simples e apresenta elevada sensibilidade de detecção. Por outro lado, necessita de equipamentos de alto custo, além de necessitar, assim como a PCR-SSCP, de seqüenciamento posterior do gene analisado para identificar as mutações encontradas (LOSEKOOT *et al.*, 1990).

3.11.4 ARMS-PCR (*amplification refractory mutation system*)

Na técnica ARMS-PCR, os oligonucleotídeos iniciadores são escolhidos de modo a permitir a amplificação de um só alelo. A base mutada encontra-se na posição 3' do iniciador, o qual possui mutação interna desestabilizadora (NEWTON *et al.*, 1989).

3.11.5 ASO – Oligonucleotídeo alelo-específico

A amplificação alelo-específica consiste somente na amplificação dos alelos mutantes e normais, facilitando a análise e diminuindo custos, por não utilizar enzimas de restrição. O método está baseado na hibridização específica de duas sondas de oligonucleotídeos, uma complementar à seqüência mutante e outra complementar a seqüência normal. Os genótipos das amostras são detectados pela presença ou ausência de sinal de hibridização da sonda mutante ou normal (CONNER *et al.*, 1983).

3.11.6 Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento do DNA permite a determinação da ordem das bases nitrogenadas da molécula de DNA. Existem vários métodos disponíveis para o seqüenciamento gênico, cada um apresentando vantagens e desvantagens (DARNELL; LODISH; BALTIMORE, 1990). O método tradicional de seqüenciamento de DNA foi proposto por Frederick Sanger na década de 70, e consiste na adição de nucleotídeos modificados, chamados didesoxiribonucleotídeos, que impedem o crescimento de um fragmento de DNA em replicação pela DNA polimerase após sua adição (SANGER, 1981).

A desvantagem do seqüenciamento do DNA é o custo elevado e o tempo. Em contrapartida, um gene seqüenciado terá todas as suas mutações identificadas.

Portanto, as metodologias para a identificação da presença da HbS são múltiplas e todas com vantagens e desvantagens próprias.

Um elemento central neste estudo é comparar procedimentos de triagem para a detecção da HbS, com base na carga ou propriedade de falcização desta molécula, com um método que detecta a alteração de bases no DNA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob o Registro CEP/SD: 479.016.08.03 e CAAE: 0010.0.091.000-08, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde Pública do Paraná (SESA) sob o Registro 009/2008 (Anexos 1 e 2).

4.1 ANÁLISES MOLECULARES

4.1.1 Amostra para estudos moleculares

Foram obtidas 500 amostras de sangue periférico, coletadas com EDTAK₃ (Vacutainer, BD) de pacientes e de doadores de sangue atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR). Foram incluídas no estudo todas as amostras com informações de idade, sexo e triagem completa para a detecção da hemoglobina S. O sistema do banco de sangue do HEMEPAR não contempla informações para etnia de todos os pacientes, por esse motivo esta informação não foi analisada na pesquisa.

A amostra foi classificada conforme os ensaios de triagem do HEMEPAR para a identificar a presença de hemoglobina S, que inclui teste de solubilidade, teste de falcização e eletroforese de hemoglobina em meio alcalino em três grupos:

- Grupo AA – 224 indivíduos saudáveis com presença de hemoglobina A em homozigose;
- Grupo AS – 231 indivíduos portadores do traço falcêmico com presença de hemoglobinas A e S em heterozigose;
- Grupo SS – 45 indivíduos portadores de anemia falciforme com presença de hemoglobina S em homozigose.

Foram excluídas da pesquisa duas amostras (0,4%) que apresentaram problemas com a quantidade ou qualidade do DNA extraído. Também foram excluídas nove amostras de pacientes, por serem duplamente heterozigotos (HbSC e Hb β S).

A Figura 9 sumariza a classificação da amostra para estudos moleculares.

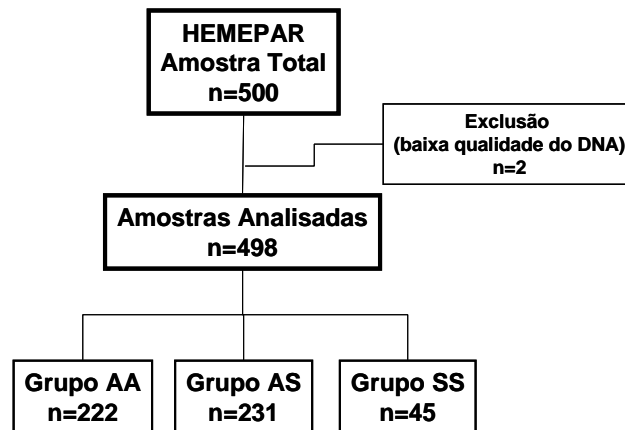


Figura 9 – Fluxograma para caracterização dos grupos em estudo.

As amostras dos nove pacientes duplamente heterozigotos, sendo três portadores da hemoglobinopatia SC (HbSC) e seis portadores de beta talassemia menor associada à hemoglobinopatia S (Hb β^0 S), foram utilizadas para os ensaios preliminares, mas não para os demais estudos deste projeto.

4.1.2 Extração do DNA genômico

O DNA genômico, das amostras de sangue periférico, foi extraído pelo método de *salting out* segundo Lahiri e Nurnberger (1991), com modificações (Anexo 3).

4.1.3 Quantificação do DNA genômico

Após extração, o DNA genômico foi quantificado conforme Wittwer e Kuskawa (2006). As amostras foram diluídas 1:50 com água ultra pura e quantificadas por espectrofotometria em 260 nm (Bio Photometer, Eppendorf). O cálculo da concentração foi realizado pela equação:

$$\text{Concentração em ng/}\mu\text{L de DNA (fita dupla)} = A_{260} \times 50 \times \text{diluição}$$

As amostras com concentração de DNA superiores a 100 ng/ μ L foram consideradas adequadas.

A pureza da amostra do DNA foi estimada pela razão entre as absorvâncias A_{260}/A_{280} . Valores entre 1,6 e 2,0 foram considerados adequados.

Amostras que não apresentaram resultados satisfatórios, com a relação A_{260}/A_{280} , sendo inferior a 1,6 ou superior a 2,0, e concentrações de DNA abaixo de 100 ng/ μ L, foram submetidas a uma nova extração.

Todas as amostras de DNA foram normalizadas para a concentração de 100 ng/ μ L por diluição com água ultra pura estéril e mantidas em freezer a -20°C até o momento da análise.

4.1.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A região da seqüência 62111 a 62487 (GenBank número de acesso U01317) do gene da beta globina humana que flanqueia o sítio da mutação da hemoglobina S foi amplificada através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados utilizando-se o programa (Primer3: www.primer3.com) e produzem um amplicon de 377 pares de base (377 pb). A região amplificada compreende todo o exon 1, intron 1 e parte do exon 2 do gene da beta globina humana. A localização do sítio de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e sítio de mutação S encontra-se no Anexo 4.

A otimização *in silico* dos oligonucleotídeos foi realizada com o programa NetPrimer, disponível na Internet (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) sendo realizadas as análises de temperatura de anelamento (T_m), propriedades termodinâmicas e a formação de grampos e dímeros de *primers*. Os resultados demonstraram que uma temperatura de anelamento de aproximadamente 60°C pode ser utilizada no ensaio de PCR e a possibilidade do aparecimento de grampos e dímeros de *primers* é baixa.

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores foram alinhadas com as seqüências do genoma humano depositadas no banco de genes, utilizando-se o programa Blast N (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). As análises mostraram que os oligonucleotídeos iniciadores propostos alinham com as regiões codificadoras do gene da beta globina humana, sugerindo especificidade para o amplificado. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no presente estudo foram sintetizados pela Bioneer.

A reação de PCR foi conduzida com base no protocolo descrito por Clark e Thein (2004) e otimizada para as condições do laboratório. A Tabela 2 mostra o protocolo para o procedimento de PCR.

TABELA 2 – CONDIÇÕES PARA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO EXON 1 DO GENE DA BETA GLOBINA HUMANA

Reagentes	Região exon 1	
Oligonucleotídeos iniciadores	HBB-F-5'-AGTCAGGGCAGAGCCATCTA-3'	
	HBB-R-5'-GCCCATACAGCATCAGGAG-3'	
	Concentração final	Volumes para 20 µL
Oligonucleotídeos iniciadores (10 pmol/µL cada)	10 pmol	2,0 µL
DNA molde (100 ng/µL)	100 ng/20µL	1,0 µL
Tampão Taq 10X	1 X	2,0 µL
dNTP 5 mM	0,2 mM	0,8 µL
MgCl ₂ 50 mM	1,5 mM	0,6 µL
Água ultra pura estéril	-----	12,8 µL
Taq DNA polimerase (5U/µL)	4 U/20µL	0,8 µL
Ciclo térmico	1 ciclo: 94°C → 2 min 34 ciclos: 94°C → 1 min 60°C → 1 min 72°C → 1 min 1 ciclo: 72°C → 10 min	

Tampão *Taq* 10X concentrado: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em agarose 1,2% em tampão TBE 1X (Tris-hidroximetilaminometano 89 mM/L; ácido bórico 89 mM/L e EDTA 1 mM/L, pH 8,2). Uma alíquota de 2µL do produto de PCR acrescido de 3 µL de solução de aplicação (glicerol 30% v/v, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol) foi aplicada no gel. Os produtos de PCR foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta (302 nm). As imagens foram capturadas com câmara CCD (Sistema Biochemi, UVP). A Figura 10 mostra um perfil eletroforético típico para este ensaio.

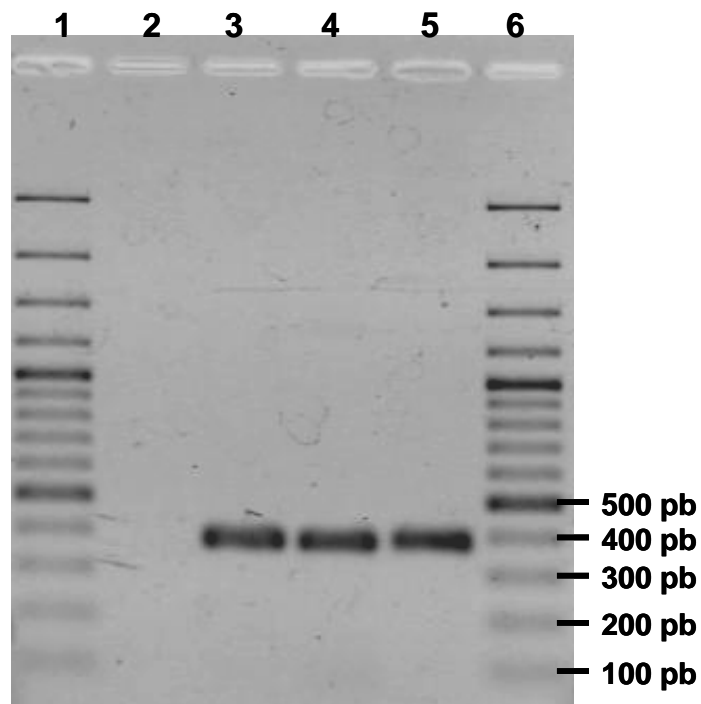


Figura 10 – Perfil eletroforético típico de produtos de PCR da amplificação do gene da beta globina humana.

Eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescidos a 3 μ L da solução de aplicação foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada em temperatura ambiente por 50 min a 50V (25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo. As linhas 1 e 6 mostram o marcador de massa molecular de 100 pb (Fermentas). A linha 2 mostra o controle negativo (branco) da reação. As linhas 3, 4 e 5 mostram os produtos de PCR (377pb).

4.1.5 Detecção molecular da mutação S por PCR-RFLP

A presença da mutação S (HBB:c.20A>T, rs334) no gene da beta globina foi caracterizada através da reação de PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) utilizando a enzima de restrição *HpyF3 I* (Fermentas), com protocolo de ensaio realizado segundo Badens *et al.* (2002) e Kanokwan *et al.* (2004) com modificações. A Tabela 3 mostra o protocolo utilizado para a reação de restrição.

TABELA 3 – PROTOCOLO DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA A DETECÇÃO DA MUTAÇÃO S DO GENE DA BETA GLOBINA HUMANA POR PCR-RFLP

Reagentes	Reação de Restrição	
	Concentração final	Volumes para 5 μ L
Produto de PCR	~20ng/ μ L	1,0 μ L
Tampão Tango 10X concentrado*	1X	0,5 μ L
Água ultra pura estéril	----	3,375 μ L
Enzima de restrição <i>HpyF3</i> I (10U/ μ L)	1,25U/5 μ L	0,125 μ L
Temperatura de incubação	37° C	
Tempo de incubação	~16 h	

Tampão 10 X: 330 mM Tris-Acetato (pH 7,9); 100 mM Acetato de Magnésio, 660 mM Acetato de Potássio, 1 mg/mL BSA.

Foram estudados os tamanhos dos fragmentos de restrição do amplicom do gene da beta globina humana com a enzima de restrição *HpyF3* I, que cliva na seqüência 5'-C↓TNAG-3'. A Figura 11 mostra os mapas de restrição com a enzima *HpyF3* I para o amplicom em estudo.

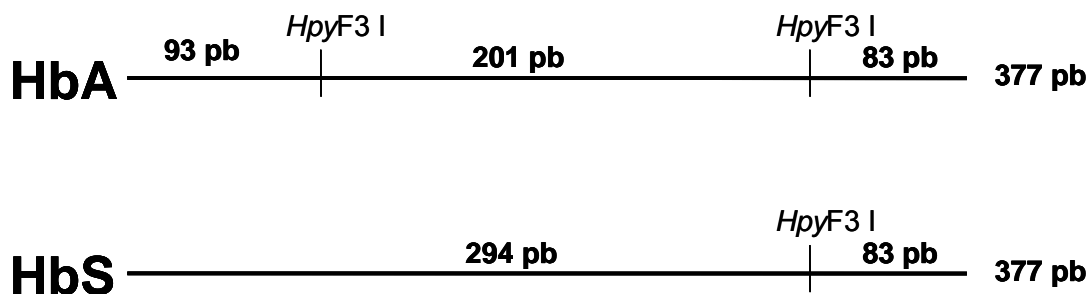


Figura 11 – Mapa de restrição com a enzima *HpyF3* I do amplicom do exon 1 do gene da beta globina humana.

Na HbA normal, dois sítios de restrição são observados resultando em fragmentos de restrição de 83, 93 e 201 pb. A mutação S suprime um sítio de restrição resultando em fragmentos de 83 e 294 pb. O fragmento de 83 pb sendo comum a todas as formas é utilizado como controle da reação de restrição.

Os produtos de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (29:1) em tampão TBE 1X. Foi aplicado no gel 5 μ L da reação de restrição acrescidos de 4 μ L de solução de aplicação (glicerol 30% v/v, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol). O gel de eletroforese foi corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL), visualizado sob luz ultra-violeta (302 nm) e

fotodocumentado com câmara CCD (Biochemi, UVP). A Figura 12 mostra um perfil eletroforético de todos os genótipos em estudo.

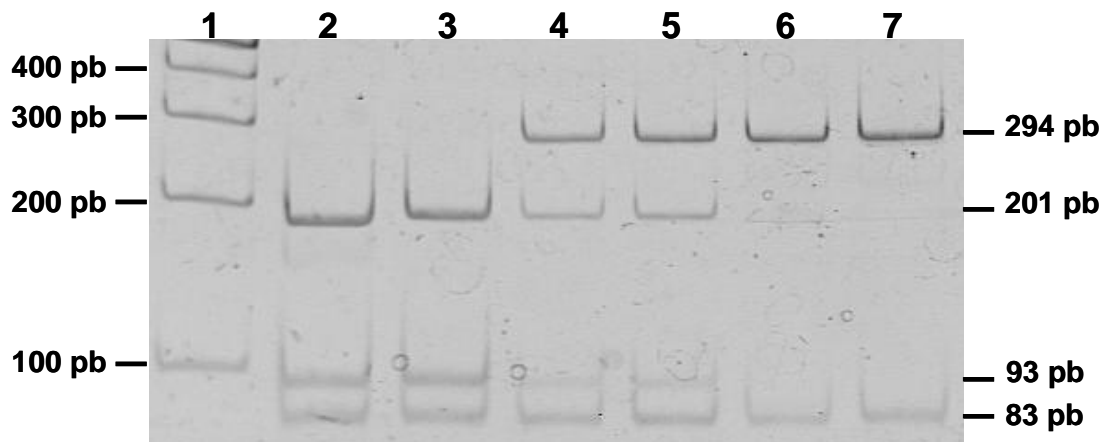


Figura 12 – Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP do exon 1 do gene da beta globina clivados com a enzima *HpyF3* I.

Os fragmentos de restrição com a enzima *HpyF3* I (sítio de restrição: C↓TNAG) foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302 nm) com imagem capturada em sistema Biochemi (UVP).

As linhas 2 e 3 mostram o perfil de restrição para o genótipo AA. As linhas 4 e 5 mostram o perfil de restrição para o genótipo AS. As linhas 6 e 7 mostram o perfil de restrição para o genótipo SS. A linha 1 mostra o marcador de massa molecular de 100 pb (Fermentas) e no lado direito do gel estão assinalados as massas moleculares dos fragmentos de restrição.

4.1.6 Detecção de outros sítios polimórficos por PCR-SSCP

Outros sítios polimórficos no exon 1 do gene da beta globina foram detectados através do ensaio de PCR-SSCP, com procedimento realizado segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Os produtos de PCR (4µL) adicionados de 10 µL de tampão contendo formamida (95% formamida, 2mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol) foram aquecidos a 95°C por 10 minutos para a separação da fita dupla do DNA e imediatamente resfriados em gelo. Em seguida, todo o volume da amostra foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (29:1) em tampão TBE 0,5X e glicerol 0,5%, sendo os fragmentos corados com brometo de etídeo. A corrida eletroforética foi terminada quando o corante azul de bromofenol atingia o limite inferior do gel. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta com imagem capturada em sistema Biochemi, UVP. Foram usados géis com 160x160x0,8 mm (Gibco) e géis com 100x75x0,75 mm (Mini Protean 3, BioRad). As Tabelas 4 e 5 mostram, respectivamente, o preparo do gel

de poliacrilamida e as condições de ensaio para a reação de PCR-SSCP. A Figura 13 mostra um gel típico da reação de PCR-SSCP otimizada.

TABELA 4 – PREPARO DO GEL DE POLIACRILAMIDA E CONDIÇÕES PARA O ENSAIO DE PCR-SSCP

Reagentes	Para 25mL de Gel 8%*	Para 5mL de Gel a 8%**
Solução a 40% Acrilamida/Bisacrilamida 29:1 (GE, HealthCare)	5,0 mL	1,0 mL
TBE 5X	2,5 mL	0,5 mL
Glicerol 50%	0,25 mL	0,05 mL
Água tipo 1 ultra-pura	qsp 25 mL (17,25 mL)	qsp 5 mL (3,5 mL)
Persulfato de amônio 10% p/v	0,20 mL	0,03 mL
TEMED	0,025 mL	0,005 mL
Condições de ensaio	variáveis	variáveis
Pré-corrída	60 mim, 150 V	30 min, 150V
Tampão de corrida	TBE 0,5X	TBE 0,5X
Corrente	200 V (25mA por gel)	200V (15mA por gel)
Temperatura	Geladeira (4 – 8 °C)	Geladeira (4 – 8 °C)
Tempo	~ 18 horas	~4 horas

*Gel para cuba Gibco (160x160X0,8mm)

**Gel para cuba miniProtean 3, BioRad (100x75x0,75mm)

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletetilenodiamina.

TABELA 5 – PROTOCOLO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP

Reagentes	Reação de SSCP
Produto de PCR (~40ng/μL)	4,0 μL
Tampão de formamida	10 μL
Temperatura	98°C
Tempo de incubação	10 min
Resfriar em gelo	Imediatamente após incubação Aplicar no gel todo o volume

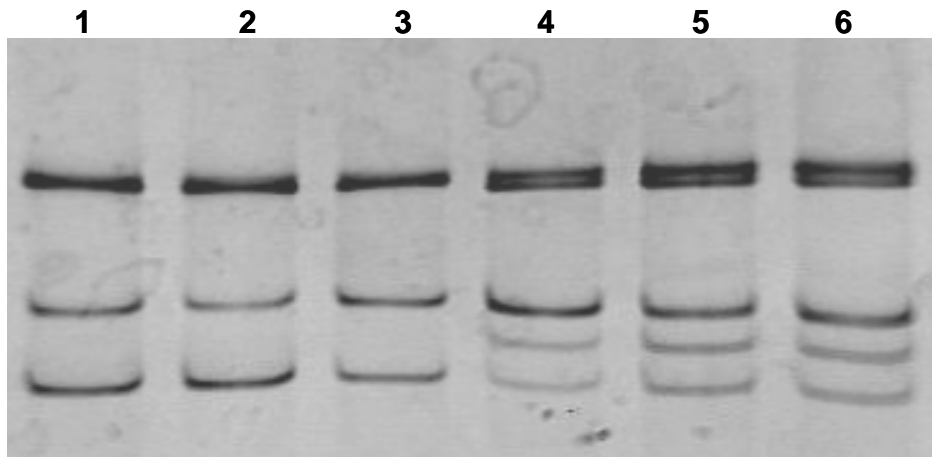


Figura 13 – Perfil eletroforético típico da reação de PCR-SSCP para o exon 1 do gene da beta globina.

Gel de poliacrilamida (29:1) 8% em tampão TBE 0,5X com adição de 0,5% de glicerol. A 4 μ L do produto de PCR foram acrescidos 10 μ L de tampão com formamida seguido de incubação a 98°C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada em a 4-8°C por cerca de 4 horas a 200V (16mA). O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta (302 nm) com imagem capturada em sistema Biochemi (UVP). As linhas 1, 2 e 3 mostram o padrão eletroforético da variação 1 (usual) e as linhas 4, 5 e 6 mostram o padrão eletroforético da variação 2.

4.1.7 Identificação das variações genéticas por reação de seqüenciamento de DNA

A caracterização dos polimorfismos detectados no procedimento de PCR-SSCP foi realizada por reação de seqüenciamento do fragmento de DNA (amplicon) após remoção dos oligonucleotídeos iniciadores e dNTP. A reação de seqüenciamento de DNA foi realizada utilizando-se o sistema ET terminator (GE Healthcare), que utiliza didesoxirribonucleotídeos acoplados a fluoróforos. Foram seqüenciadas 288 diferentes amostras de DNA (57,8% do total da amostra) sendo 144 no sentido direto e 144 no reverso. Do total de amostras seqüenciadas, aproximadamente 50% puderam ser analisadas por apresentarem seqüências boas de DNA. Também, todas as amostras que apresentaram padrões eletroforéticos distintos na PCR-SSCP foram seqüenciadas em ambos os sentidos. Os produtos das reações foram analisados em seqüenciador automático modelo 377 (Applied Biosystems) ou MegaBACE 1000 (GE Healthcare). A Tabela 6 detalha o protocolo para a reação de seqüenciamento.

TABELA 6 – PROTOCOLO DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

Remoção dos oligonucleotídeos iniciadores dos produtos de PCR	
Produto de PCR (10-20 ng/ μ L)	5 μ L
Exonuclease I (EXO I, USB, 10U/ μ L)	0,33 μ L
Fosfatase Alcalina de camarão (SAP, USB, 1U/ μ L)	0,66 μ L
Incubação	45 min a 37°C
Inativação	20 min a 80°C
Reação de sequenciamento	
Produto de PCR livre de oligonucleotídeos (10 - 15 ng)	2 μ L
Oligonucleotídeos iniciadores "F" ou "R" (10 pmol/ μ L)	1 μ L
Água ultra-pura estéril	1,5 μ L
Reagente ET (GE HealthCare)	3 μ L
Ciclos/temperaturas	35 ciclos: 30 s a 94°C e 120 s a 60°C
Purificação dos produtos da reação de sequenciamento	
Reação de sequenciamento	Utilizar o volume total da reação
Água ultra-pura estéril	12 μ L
Acetato de amônio 7,5M	2 μ L
Etanol absoluto	65 μ L
Homogeneizar e Centrifugar	45 min a 2900 x g
Retirar o excesso de etanol	
Etanol 70%	150 μ L
Homogeneizar e Centrifugar	10 min a 2900 x g
Secar	
Reconstituir com água ultra pura estéril ou formamida	10 μ L

4.1.8 Análise das seqüências de DNA

A montagem das seqüências contíguas a partir das seqüências direta (F) e reversa (R) obtidas e a detecção de mutações foram realizadas utilizando o programa CodonCode Aligner 2.0.6 para Windows (<http://www.codoncode.com>). Este programa foi alimentado com arquivo em extensão "scf" gerado pelo programa Phred/Phrap (EWING *et al.*, 1998) e CONSED (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998).

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.2.1 Amostra para análises bioquímicas

Uma sub-amostra da amostra total (item 4.1.1), compreendendo 404 indivíduos, foi utilizada nas análises de parâmetros bioquímicos.

As amostras de sangue com EDTA_{K₃} (Vacutainer, BD) foram centrifugadas por 10 minutos a 3200 x g (centrífuga 1420 Eppendorf). Após centrifugação o plasma foi separado em alíquotas e mantido em freezer a -20°C até a realização das análises. Amostras hemolisadas foram excluídas das dosagens.

Esta sub-amostra foi classificada segundo a presença dos alelos para hemoglobinas A e S determinados por PCR-RFLP (item 4.1.5) em Grupo AA (n=200), Grupo AS (n=162) e Grupo SS (n=42).

4.2.2 Quantificação dos parâmetros bioquímicos

As quantificações plasmáticas dos analitos em estudo foram realizadas em sistemas automatizado Express Plus (Bayer), com calibradores e controles da In Vitro Diagnostica S/A. Os princípios dos métodos e reagentes utilizados estão descritos na Tabela 7.

TABELA 7 – PRINCÍPIOS METODOLÓGICOS E REAGENTES PARA DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Dosagem	Princípio metodológico	Reagente utilizado
Albumina	Reação com verde de bromocresol	Kovalent do Brasil Ltda
Colesterol total	Enzimático colorimétrico com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase (Reação de Trinder)	
Creatinina	Picrato alcalino cinético	
HDL-colesterol	Ensaio homogêneo enzimático colorimétrico	
LDL-colesterol*	Cálculo pela equação de Friedewald	IV Diretrizes Brasileira
Proteínas Totais	Reação do Biureto	Kovalent do Brasil Ltda
Triglicérides	Ensaio enzimático com lípase, glicerol quinase, glicerol-3-fostato oxidase e peroxidase com reação de Trinder.	

*LDL-colesterol = Colesterol total – HDL-colesterol – Triglicérides/5

Os produtos de glicação avançada (AGEs) foram quantificados pela medida da fluorescência como descrito por Wróbel *et al.* (1997) e Zilin *et al.* (2001). Esta metodologia quantifica os AGEs fluorescentes presentes na fração de baixa massa molecular do soro. A 25 μL de amostra de plasma foram adicionados 600 μL de ácido tricloroacético (0,15 mol/L) e 125 μL de clorofórmio. A mistura foi vigorosamente homogeneizada para a precipitação completa das proteínas e para extrair os lípidos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12100 x g por dez minutos. O sobrenadante límpido foi transferido para um frasco do equipamento de HPLC. A análise foi realizada em equipamento HPLC (Varian), no qual foram injetados 20 μL do sobrenadante utilizando-se fluxo de água ultra-pura. Os AGEs foram detectados pela fluorescência Ex370/Em440 (banda de passagem de 17 nm) e as proteínas quantificadas pela absorvância em 280 nm. A concentração de AGEs fluorescentes em fração sérica de massa molecular pequena (F-AGEs) foi obtida pela razão da fluorescência observada (UA) dividida pela absorvância em 280 nm, resultando na unidade UA/A_{280} .

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre variáveis com distribuição normal foram realizadas pelo teste “t” de Student para amostras não-pareadas e pela análise de variância (ANOVA), sendo a variável triglicérides analisada após sua normalização por transformação logarítmica (JEKEL; ELMORE; KATZ, 1999).

As análises envolvendo AGEs, que não apresentaram distribuição normal foram realizadas com teste U de Mann-Whitney.

O programa Statistica 5.5 (StatSoft, Inc. Tulsa, CA) para Windows foi utilizado para as determinações de média, desvio padrão e freqüências dos sexos.

As freqüências genótípicas e sexo foram comparadas utilizando o teste exato de Fisher bidirecional com o programa RxC (Miller, 1997). As freqüências alélicas foram comparadas pelo teste de Chi-quadrado com um grau de liberdade.

Uma probabilidade (p) inferior a 0,05 foi considerada significativa em todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISES MOLECULARES

5.1.1 Caracterização da amostra para ensaios moleculares

A estatística descritiva (média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação) para a idade e sexo dos grupos em estudo encontra-se na Tabela 8.

TABELA 8 – CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO A SEXO E IDADE NOS GRUPOS EM ESTUDO PARA AS ANÁLISES MOLECULARES

Grupos		n(%)	Idade (anos)		
			Média±DP	Mediana	AV
Genótipo AA	H	114 (51,7)	34,0±11,0	33	18-60
	M	108 (48,3)	32,5±9,9	31	18-55
	T	222	33,3±10,5	32	18-60
Genótipo AS	H	136 (58,9)	31,8±10,5	29	18-58
	M	95 (41,1)	33,2±9,9	31	18-56
	T	231	32,3±10,3	30,5	18-58
Genótipo SS	H	17 (37,5)	24,9±12,6 ^{b, c}	20	10-52
	M	28 (62,5)	23,3±9,9 ^{b, c}	23,5	6-45
	T	45 ^b	23,9±18,9 ^{b, c}	23	6-52
Total	H	267 (53,7)	32,4±11,0	31	10-60
	M	231 (46,3)	31,6±10,3	30	6-56
	T	498	32,0±10,7	30	6-60

AV: amplitude de variação; DP: 1-desvio padrão; H: homens, M: mulheres; T: amostra total

^a HbAA vs HbAS, $p < 0,05$ (Teste t para amostras não pareadas)

^b HbAA vs HbSS $p < 0,05$ (Teste t para amostras não pareadas)

^c HbAS vs HbSS $p < 0,05$ (Teste t para amostras não pareadas)

A comparação da frequência de homens e mulheres entre os grupos apresentou similaridade entre os grupos com genótipos AA e AS ($\chi^2=2,59$; $p=0,11$); AA e SS ($\chi^2=2,76$; $p=0,09$). Os grupos AS e SS apresentaram diferença significativa nesta análise ($\chi^2=6,79$; $p=0,009$) com uma frequência maior de mulheres entre os indivíduos com anemia falciforme.

A idade média entre os grupos foi significativamente diferente (ANOVA, $p < 0,001$), sendo que os grupos AA e AS não diferiram entre si ($p=0,41$). O grupo SS apresentou uma idade média cerca de 30% menor que os grupos AA e AS.

5.1.2 Detecção da mutação S por PCR-RFLP

A detecção molecular da HbS foi realizada através da reação de PCR-RFLP. A Figura 14 mostra o perfil eletroforético da reação de PCR-RFLP para o exon 1 do gene da beta globina utilizando a enzima de restrição *HpyF3 I* (*Dde I*). Todas as reações apresentaram um padrão de restrição inequívoco.

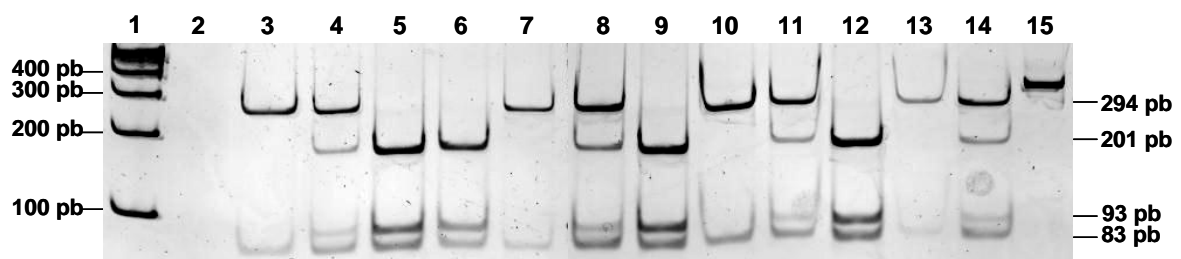


Figura 14 – Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP do exon 1 do gene da beta globina clivados com a enzima *HpyF3 I*.

Os fragmentos de restrição com a enzima *HpyF3 I* (sítio de restrição: C↓TNAG) foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302 nm) com imagem capturada em sistema Biochemi (UVP).

A linha 1 mostra o marcador de massa molecular de 100 pb (Fermentas). A linha 2 mostra o branco da reação. A linha 15 mostra o produto de PCR sem corte (377 pb). As linhas 3, 7, 10 e 13 mostram o perfil de restrição para o genótipo SS. As linhas 4, 8, 11 e 14 mostram o perfil de restrição para o genótipo AS. As linhas 5, 6, 9 e 12 mostram o perfil de restrição para o genótipo AA.

Os resultados obtidos pela PCR-RFLP foram comparados com os resultados dos ensaios convencionais realizados na rotina do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná. A Tabela 9 mostra a classificação dos resultados obtidos nos ensaios convencionais comparados com os resultados obtidos na PCR-RFLP.

TABELA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS OBTIDOS POR ENSAIOS CONVENCIONAIS COMPARADOS COM A PCR-RFLP

Genótipos	Ensaio Convencionais	PCR-RFLP	Concordância (%)
AA	222	222	100
AS	231	231	100
SS	45	44 + 1 AS	97,8%

Ensaio convencionais: teste de falcização, teste de solubilidade e eletroforese de hemoglobinas em meio alcalino.

Apenas uma amostra apresentou discordância entre os resultados, na qual era esperado um genótipo SS e foi observado um genótipo AS confirmado pela reação de sequenciamento do DNA da amostra discordante.

5.1.3 Detecção de outros sítios polimórficos por PCR-SSCP

A técnica de PCR-SSCP, para a detecção de outros sítios polimórficos, foi otimizada para a região do exon 1 do gene da beta globina humana. Por apresentar melhor separação das fitas simples de DNA e identificação de bandas adicionais, utilizou-se um gel de poliacrilamida (29:1) na concentração de 8% em TBE 0,5X com a adição de 0,5% de glicerol, e corrida eletroforética em TBE 0,5X. As condições otimizadas apresentaram reprodutibilidade no ensaio e facilidade na identificação dos padrões eletroforéticos. A Figura 15 mostra uma eletroforese típica de PCR-SSCP.

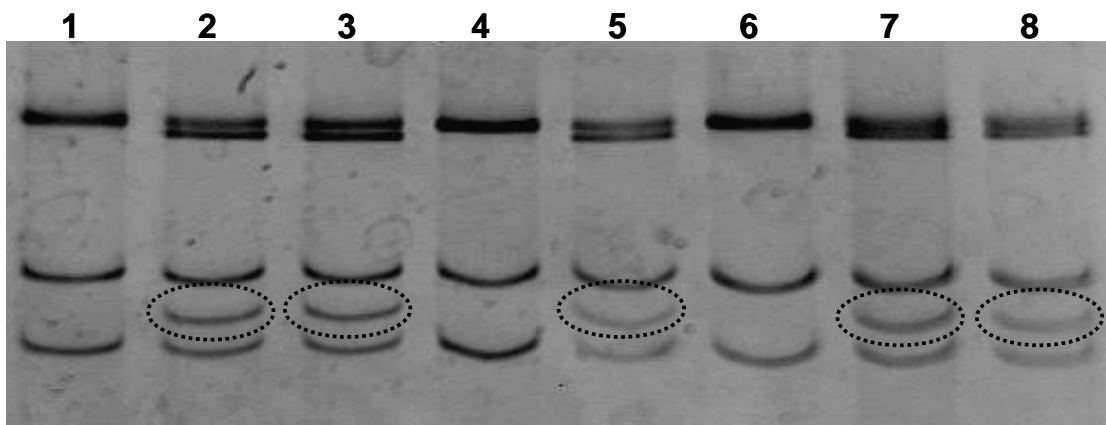
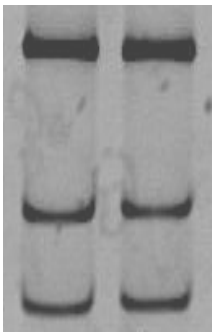
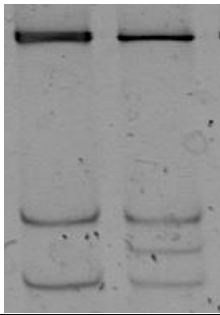
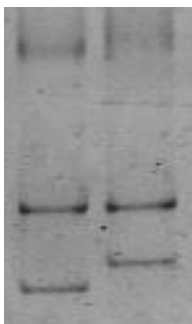
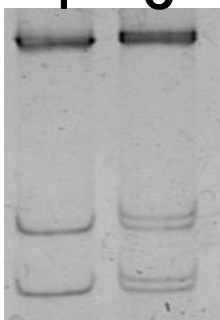


Figura 15 – Eletroforese típica da reação de PCR-SSCP, em gel de poliacrilamida 8% (29:1) contendo TBE 0,5X e 0,5% de glicerol. Corrida eletroforética com TBE 0,5X. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta (302 nm) com imagem capturada em sistema Biochemi (UVP). As linhas 1, 4, 5, e 6 representam o padrão de eletroforese mais freqüente designado usual. As linhas 2, 3, 5, 7 e 8 mostram o perfil eletroforético para a variação 2, em destaque (círculo pontilhado) a banda adicional observada.

Foram observados quatro padrões eletroforéticos diferentes nas análises de PCR-SSCP das amostras estudadas. A Tabela 10 mostra a freqüência dos padrões encontrados na PCR-SSCP.

TABELA 10 – PADRÕES ELETROFORÉTICOS OBSERVADOS NA PCR-SSCP E SUAS FREQUÊNCIAS

Padrões de SSCP		n (%)
Varição 1 (usual)	1	1
		
Varição 2	1	A
		
Varição 3	1	B
		
Varição 4	1	C
		
		360 (72,3)
		135 (27,1)
		2 (0,40)
		1 (0,20)

A linha 1 em todos os géis representa o perfil eletroforético usual. As linhas A, B e C, representam os padrões eletroforéticos diferentes.

5.1.4 Identificação dos polimorfismos através da reação de seqüenciamento de DNA

5.1.4.1 Confirmação dos ensaios de PCR-RFLP para a detecção da mutação S

Os resultados obtidos na PCR-RFLP foram confirmados pela reação de seqüenciamento do amplicon contendo parte do gene da beta globina. A Figura 16 mostra um exemplo da análise de seqüenciamento das amostras.

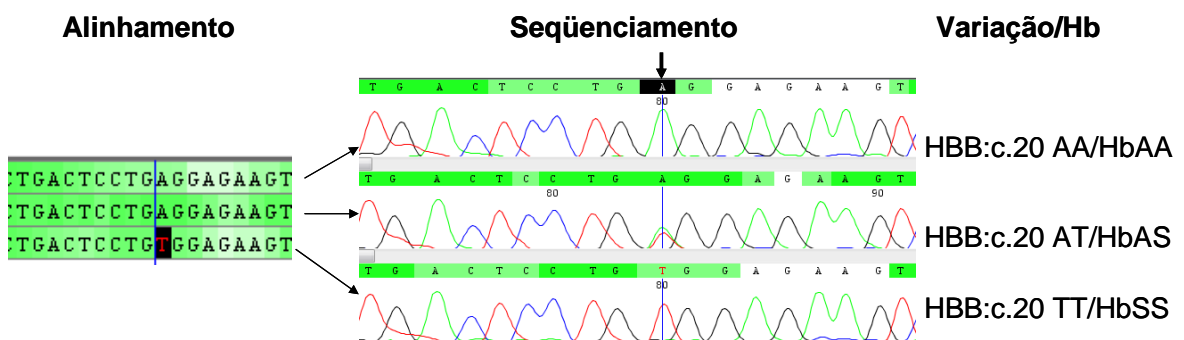


Figura 16 – Alinhamento e cromatogramas típicos observados para as variações AA, AS e SS do gene da beta globina humana.

A seta indica o sítio de mutação. Análises obtidas com o programa CodonCode e seleção de bases de alta qualidade.

5.1.4.2 Identificação das variações genéticas observadas na PCR-SSCP.

A Figura 17 mostra as regiões polimórficas das amostras com padrões de PCR-SSCP diferenciados detectados pelo seqüenciamento do amplicon.

Padrões de SSCP

Seqüenciamento

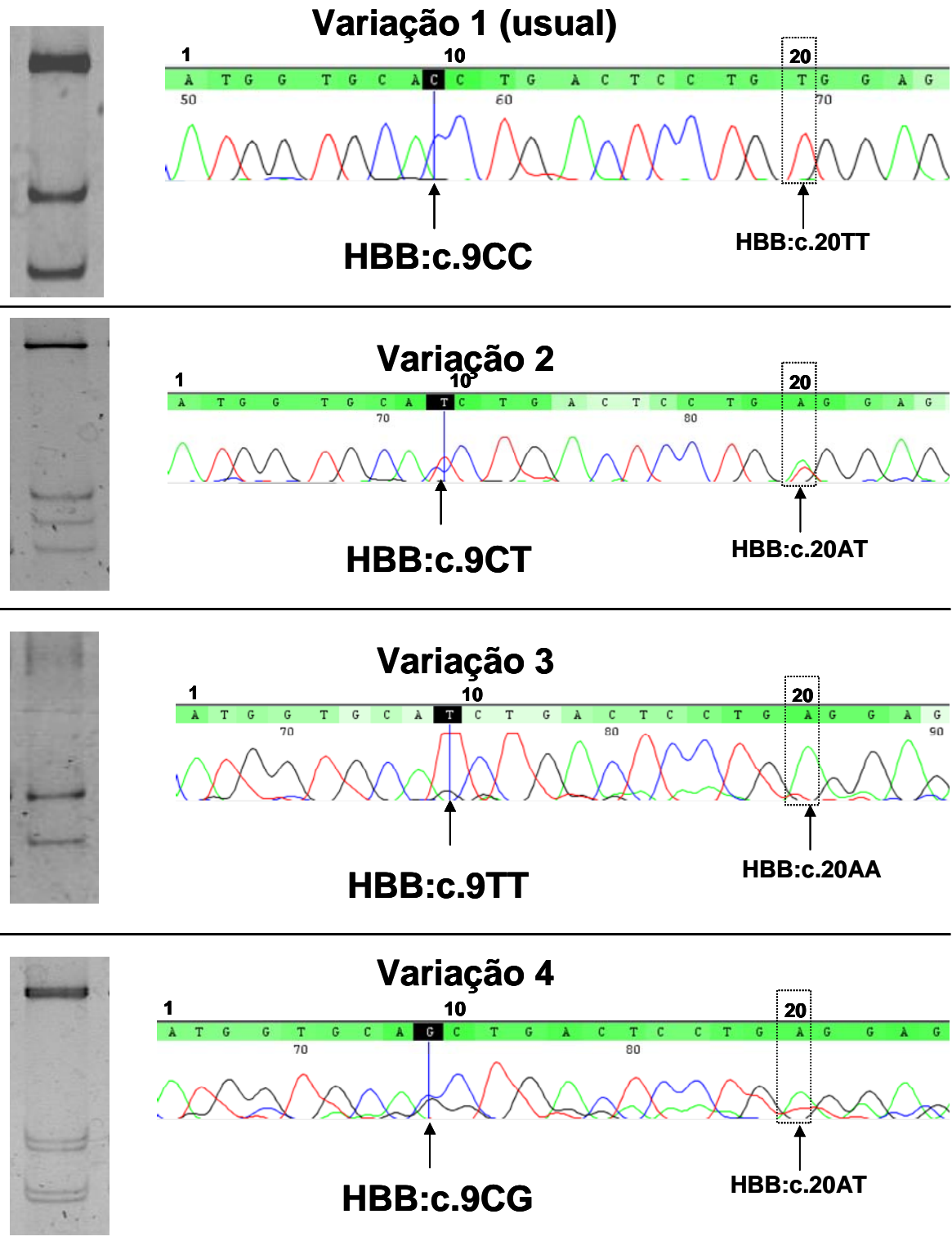


Figura 17 – Padrão de variabilidade genética encontrada na PCR-SSCP, seguido do seqüenciamento do fragmento de DNA em estudo.

A seta indica o sítio da variabilidade genética observada na PCR-SSCP localizada no nucleotídeo 9 do exon 1 do gene da beta globina humana. Em destaque o nucleotídeo 20, no qual está localizado o sítio da mutação S.

A Tabela 11 mostra a freqüência dos padrões encontrados na PCR-SSCP, associados aos grupos em estudo.

TABELA 11 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (H-W) PARA A VARIAÇÃO HBB:c.9C>T NOS GRUPOS EM ESTUDO E DISTRIBUIÇÃO DA VARIAÇÃO HBB:c.9C>G NOS GRUPOS EM ESTUDO

PCR-SSCP (Variação genética)	Total n(%) n=498	Genótipo AA n=222	Genótipo AS n=231	Genótipo SS n=45	p*
HBB c.9C>T					<0,0001^a
CC	360 (72,3)	135 (60,8)	183 (79,2)	42 (93,3)	
CT	135 (27,1)	85 (38,3)	47 (20,3)	3 (6,7)	
TT	2 (0,40)	2 (0,90)	0 (0)	0 (0)	
Alelo T(%) [95%IC]	14,0 [12–16]	20,0 [16–24]	10,2 [7–13]	3,3 [0–7]	
H-W	p=0,0045	p=0,0038	p=0,084	p=0,817	
^a Variação HBB c.9C>T: genótipos AA vs AS, p<0,001 ^a Variação HBB c.9C>T: genótipos AA vs SS, p<0,001 ^a Variação HBB c.9C>T: genótipos AS vs SS, p<0,033					
HBB c.9C>G					----
CG	1 (0,20)	0 (0)	1 (0,43)	0 (0)	

* teste exato de Fisher bidirecional

^aComparação dos genótipos AA, AS e SS com os genótipos da variação HBB c9C>T.

H-W: probabilidade do teste do Chi-quadrado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

95% IC: intervalo de confiança de 95%.

5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

5.2.1 Caracterização da amostra para ensaios bioquímicos

A estatística descritiva (média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação) para a idade e sexo entre os subgrupos em estudo para as análises bioquímicas encontra-se na Tabela 12.

TABELA 12 – CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO A SEXO E IDADE NOS GRUPOS EM ESTUDO PARA AS ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Grupos		n(%)	Idade (anos)		
			Média±DP	Mediana	AV
Genótipo AA	H	110(54,8)	34,5±1,1	33	18-64
	M	90 (45,2)	33,1±0,3	33	19-54
	T	200	33,9±10,7	33	18-64
Genótipo AS	H	103 (63,3)	31,1±0,3	29	18-57
	M	59 (36,7)	32,8±9,9	29	18-56
	T	162	31,7±10,2	39	18-57
Genótipo SS	H	17 (41,0)	27,6±12,6	25	18-52
	M	25 (59,0)	24,0±7,3	24	18-45
	T	42	26,9±8,7	24	18-52
Total	H	229 (56,8)	32,5±10,9	30	18-64
	M	175 (43,2)	32,1±10,0	30	18-56
	T	404	32,3±10,5	30	18-64

AV: amplitude de variação; DP: 1-desvio padrão; H: homens, M: mulheres; T: amostra total.

Comparações pelo Teste exato de Fisher bidirecional da freqüência de homens e mulheres AA vs AS, $p=0,1079$; AA vs SS, $p=0,0923$ e AS vs SS, $p=0,0083$.

Comparação pelo teste "t-Student" entre idades de amostra total AA vs AS, $p=0,048$; AA vs SS, $p=0,0002$ e AS vs SS, $p=0,0083$.

5.2.2 Quantificação dos parâmetros bioquímicos e dos produtos de glicação avançada fluorescentes

Os valores de média (M), desvio padrão (DP) e amplitude de variação (AV) para os analitos em estudo são mostrados na Tabela 13, separados por sexo e grupos estudados.

TABELA 13 – VALORES DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E GENÓTIPOS EM ESTUDO

Analitos	Sexo	Genótipos			p (ANOVA)
		HbAA (n=200)	HbAS (n=162)	HbSS (n=42)	
Colesterol Total (mg/dL)	H	167,1±41,3 [92-296]	155,1±38,0 ^a [85-282]	134,0±36,5 ^{b,c} [84-217]	0,002
	M	170,2±39,9 [91-340]	160,0±38,0 ^a [90-266]	133,7±36,5 ^{b,c} [79-227]	<0,001
	Total	168,5±40,6 [91-340]	157,0±38,0 ^a [85-282]	134,2±36,1 ^{b,c} [79-227]	<0,001
HDL-C (mg/dL)	H	43,0±8,7 [21-70]	42,2±9,5 [24-70]	38,7±10 [26-60]	0,172
	M	48,7±11,2 [26-82]	46±10,5 [25-69]	38,8±10,3 ^{b,c} [23-73]	<0,001
	Total	45,6±10,3 [21-82]	43,7±10,1 [24-70]	38,7±10,1 ^{b,c} [23-73]	<0,001
LDL-C (mg/dL)	H	92,9±24,2 [33-173]	87,9±26,3 [41-196]	76,3±30,7 ^b [29-140]	0,031
	M	99,7±30,4 [39-255]	92,0±27,0 [42-180]	72,1±30,1 ^{b,c} [26-146]	<0,001
	Total	96,0±27,3 [33-255]	89,5±26,6 ^a [41-196]	73,8±30,1 ^{b,c} [26-146]	<0,001
Triglicérides (mg/dL)	H	151,9±98,1 [32-510]	125,1±77,7 [29-395]	99,7±40,6 [40-196]	0,015
	M	109,2±65,1 [30-373]	107,7±64,4 [39-371]	118,6±62,3 [45-347]	0,747
	Total	132,5±87,2 [30-510]	118,4±73,1 [29-395]	110,8±54,7 [40-347]	0,114
Proteína Total (g/dL)	H	6,6±1,1 [4,2-8,7]	6,7±0,8 [5,0-8,5]	7,9±0,8 ^{b,c} [5,5-8,9]	<0,001
	M	6,8±1,1 [4,6-8,5]	6,4±0,9 ^a [4,5-8,4]	8,0±0,7 ^{b,c} [5,6-9,0]	<0,001
	Total	6,7±1,1 [4,2-8,7]	6,6±0,9 [4,5-8,5]	8,0±0,7 ^{b,c} [5,5-9,0]	<0,001
Albumina (g/dL)	H	3,7±0,3 [2,9-4,5]	3,7±0,3 [3,0-4,6]	4,0±0,5 ^{b,c} [2,4-4,7]	<0,001
	M	3,7±0,3 [3,1-4,3]	3,5±0,3 ^a [2,8-4,2]	4,0±0,3 ^{b,c} [3,2-4,6]	<0,001
	Total	3,7±0,3 [2,9-4,5]	3,6±0,3 [2,8-4,6]	4,0±0,4 ^{b,c} [2,4-4,7]	<0,001
Creatinina (mg/dL)	H	1,0±0,2 [0,3-1,7]	0,9±0,2 ^a [0,4-1,5]	0,5±0,2 ^{b,c} [0,2-6,3]	<0,001
	M	0,8±0,2 [0,6-1,5]	0,8±0,2 [0,4-1,4]	0,6±0,5 ^{b,c} [0,3-2,5]	<0,001
	Total	0,9±0,2 [0,3-1,7]	0,9±0,2 ^a [0,4-1,5]	0,6±0,5 ^{b,c} [0,2-6,3]	<0,001
F-AGES (UA/A ₂₈₀)	H	3,9±1,6 [1,6-10,8]	3,6±1,2 ^d [3,0-7,4]	3,1±0,6 [2,4-3,8]	0,094
	M	3,7±1,4 [2,5-11,9]	3,4±1,3 [2,0-8,7]	3,3±0,5 [2,5-4,0]	0,278
	Total	3,8±1,5 [1,6-11,9]	3,5±1,2 ^d [2,0-8,7]	3,2±0,5 [2,4-4,0]	0,119

Os resultados são: Média ±1-DP e Mediana [AV]; H: homens, M: mulheres.

n total= 404, n homens= 229, n mulheres= 175

Teste t para amostras não pareadas: ^aHbAA vs HbAS, p<0,05; ^bHbAA vs HbSS p<0,05; ^cHbAS vs HbSS p<0,05.

Teste U Mann-Whitney: ^dHbAA vs HbAS p<0,05

Dois indivíduos apresentaram valores de creatinina muito diferentes dos demais indivíduos analisados. Um indivíduo com genótipo AA apresentou valor de creatinina igual 1,7mg/dL, e outro indivíduo com genótipo SS, apresentou creatinina de 6,3 mg/dL. Estes indivíduos foram removidos da planilha de resultados e uma nova análise realizada não mostrou alteração significativa nos resultados apresentados na Tabela 14.

As Figuras 18 e 19 destacam as médias e desvios padrões para as determinações de colesterol total e AGEs fluorescentes observados para os genótipos AA, AS e SS determinados por PCR-RFLP.

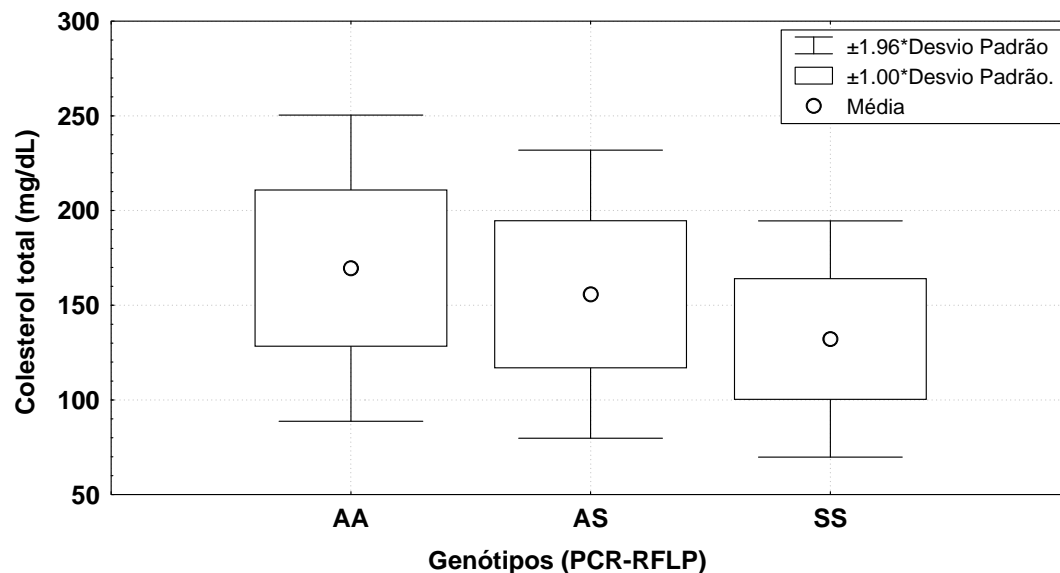


Figura 18 – Média e desvio padrão das concentrações séricas de colesterol total para a amostra total analisada e genótipos da hemoglobina obtidos por PCR-RFLP.

O retângulo superior destaca os elementos da figura. As médias foram significativamente diferentes entre todos os grupos ($p < 0,05$).

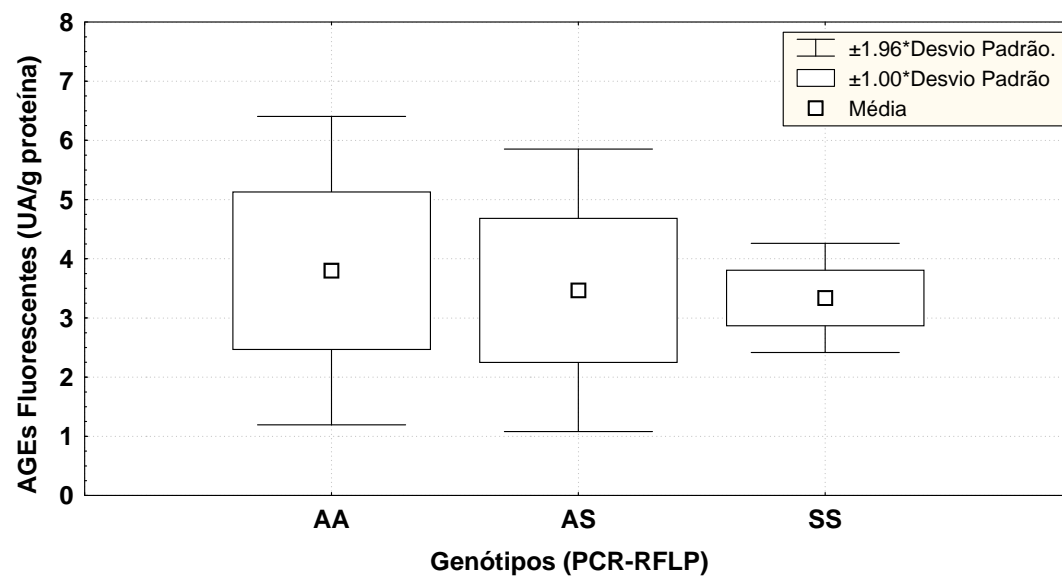


Figura 19 – Média e desvio padrão das concentrações séricas de AGEs fluorescentes para a amostra total analisada e genótipos da hemoglobina obtidos por PCR-RFLP. O retângulo superior destaca os elementos da figura. As médias não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$).

A Figura 20 mostra a distribuição dos valores de colesterol total e proteína total para as amostras em análise. Enquanto os valores para colesterol total reduzem com a presença do alelo S, os valores para proteína total aumentam.

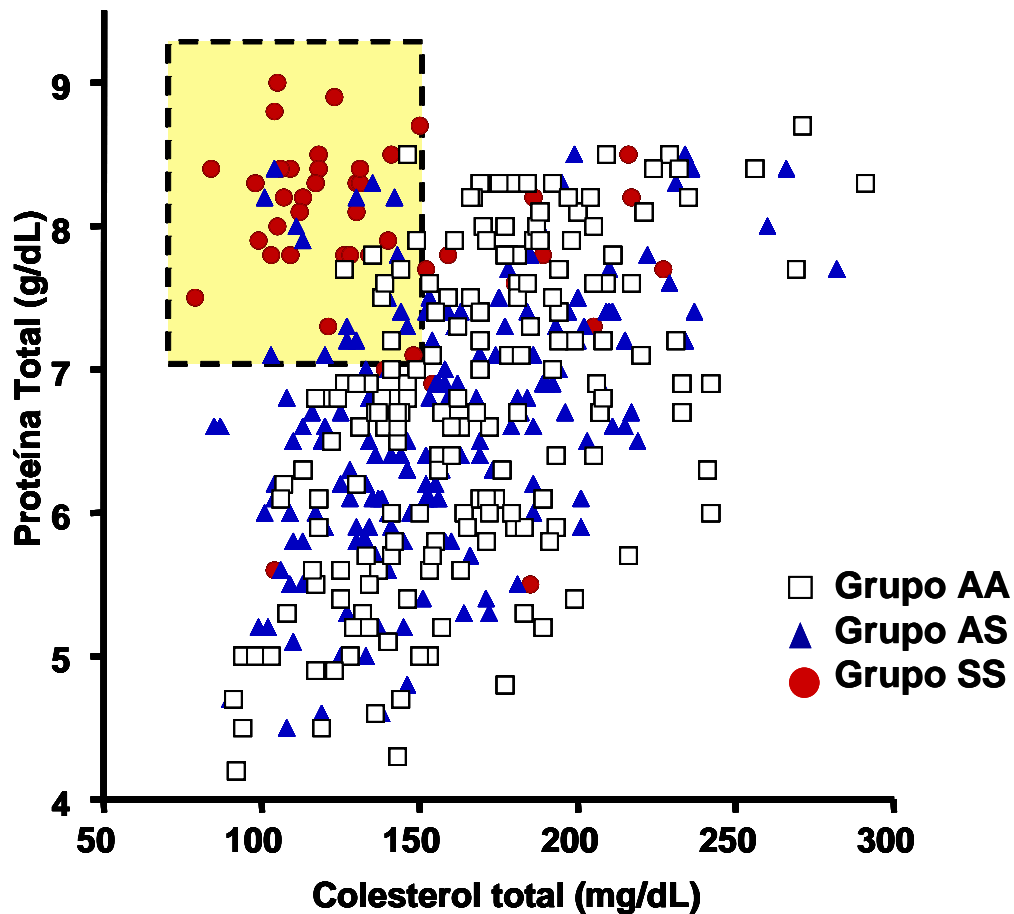


Figura 20 – Distribuição dos valores de colesterol total e proteína total na amostra em estudo.

Os quadrados abertos representam o grupo AA (n=200), os triângulos azuis o grupo AS (n=162) e os círculos vermelhos o grupo SS (n=42).

O retângulo tracejado destaca as amostras que apresentam colesterol total menor que 150 mg/dL associado a proteína total maior que 7,0 g/dL características que representam frequências de indivíduos para os grupos AA, AS e SS, respectivamente, 4,3%, 9,3% e 69,5%.

A Tabela 14 mostra os valores bioquímicos encontrados distribuídos nos grupos em estudo formados pelos genótipos HBB:c.9CC e HBB:c.9CT.

TABELA 14 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E VARIAÇÕES 1 E 2
(HBB:c.9CC E HBB:c.9CT)

Analitos	Sexo	SSCP/sequenciamento		
		HBBc.9CC	HBBc.9CT	p
Colesterol Total (mg/dL)	H	153,9±36,9	166,4±43,8	0,065
	M	155,7±37,3	179,6±45,3	<0,001
	Total	154,7±37,0	173,2±44,8	<0,001
HDL-C (mg/dL)	H	42,2±9,4	43,4±9,3	0,470
	M	45,6±12,2	48,8±8,7	0,100
	Total	43,7±10,9	46,2±9,4	0,057
LDL- C (mg/dL)	H	85,9±23,7	92,3±25,8	0,134
	M	88,6±28,1	104,1±35,4	<0,001
	Total	87,1±25,8	98,4±31,6	<0,001
Triglicérides (mg/dL)	H	127,3±83,7	148,7±96,8	0,184
	M	106,3±55,5	133,2±83,1	0,086
	Total	117,8±72,9	140,7±89,8	0,055
Proteína Total (g/dL)	H	6,7±1,0	6,7±1,1	0,694
	M	6,7±1,1	6,9±1,1	0,809
	Total	6,8±1,0	6,8±1,1	0,980
Albumina (g/dL)	H	3,7±0,3	3,7±0,3	0,432
	M	3,7±0,3	3,6±0,3	0,273
	Total	3,7±0,3	3,7±0,3	0,850
Creatinina (mg/dL)	H	0,99±0,54	0,95±0,21	0,662
	M	0,78±0,31	0,86±0,17	0,129
	Total	0,90±0,46	0,91±0,20	0,900
F-AGES	H	3,7±1,7	3,6±0,89	0,272
	M	3,5±1,1	3,9±1,6	0,166
	Total	3,6±1,5	3,8±1,3	0,077

H: homens, M: mulheres; T: amostra total.

n total= 404, n homens= 229, n mulheres= 175

p= teste t para amostras não pareadas

Teste U Mann-Withey para FAGES

A Figura 21 mostra a comparação entre as concentrações do colesterol total dos genótipos AA, AS e SS com os genótipos da variação HBB:c.9C>T.

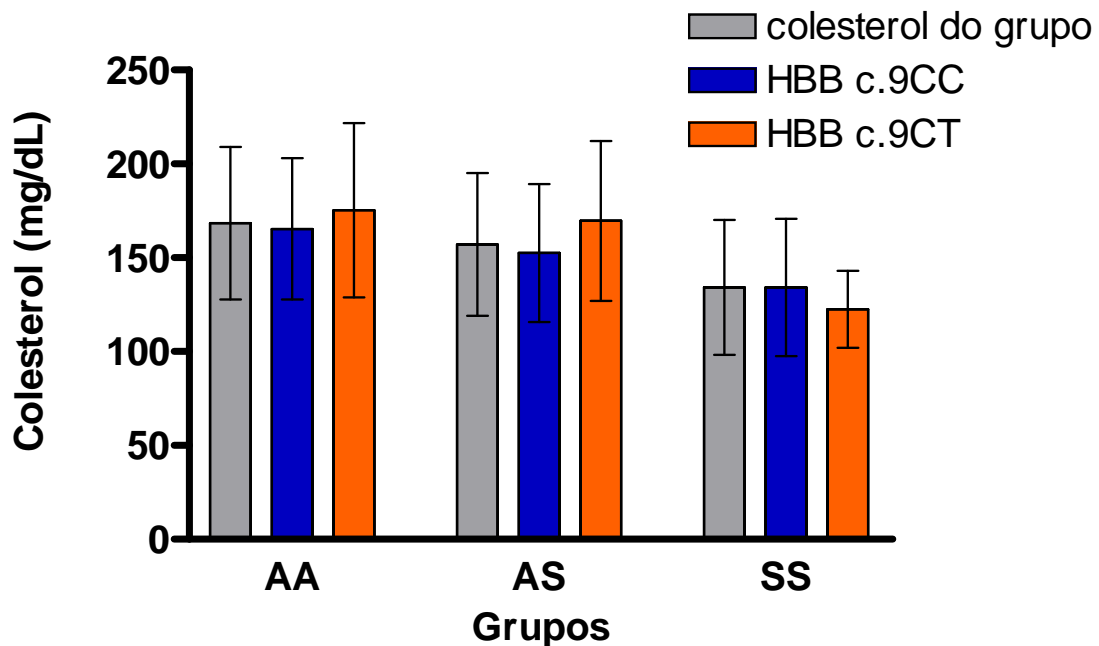


Figura 21 – Comparações entre as concentrações séricas do colesterol total observadas nos genótipos AA, AS e SS com as observadas nos genótipos das variações HBB:c.9C>C e HBB:c.9C>T.

Em cinza os valores de colesterol do respectivo grupo para a amostra total descrito na Tabela 14. Em azul e laranja respectivamente os valores para os genótipos HBB:c.9CC e HBB:c.9CT, descritos na tabela 15.

As colunas representam a média e as barras horizontais internas na coluna indicam um desvio padrão.

Análise de variância (ANOVA) entre os valores em cada grupo não mostrou diferenças significativas ($p > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Esta dissertação está centrada na mutação do gene da beta globina que altera o sexto resíduo de aminoácido de ácido glutâmico para valina (HBB:c.20A>T, rs334), e produz como resultado a hemoglobina S. Esta variação genética decorrente da alteração de uma base no DNA é caracterizada como um polimorfismo de uma única base ou SNP (*single nucleotide polymorphism*). Os SNPs são resultados de erros na replicação ou reparo do DNA que ocorreram na história humana (HINDS *et al.*, 2006).

Cerca de 3,1 milhões de SNPs já estão descritos no genoma humano, sendo 25 a 35% deles, comuns entre diversas populações (The International HapMap Consortium, 2007). A estimativa é que o genoma humano contemple um total de 10 milhões de SNPs, definidos como variações com frequência >1%, o que representa uma densidade de um SNP a cada 290 pb do DNA (YUE; MOULT, 2006).

A mutação que resulta na formação da hemoglobina S leva a alterações na estrutura desta molécula cujos efeitos resultam nos sinais e sintomas da anemia falciforme. O diagnóstico desta patologia deve ser precoce e específico, de modo a minimizar as complicações fisiopatológicas da doença. Centros de triagem neonatal e bancos de sangue são instâncias de detecção e acompanhamento, respectivamente, dos indivíduos afetados pela anemia falciforme. Ao mesmo tempo, os hemocentros detectam indivíduos heterozigotos através da triagem dos doadores de sangue.

A abordagem da detecção da hemoglobina S através de ensaios moleculares envolvendo o DNA genômico é pouco utilizada nos Centros de Triagem, quer por custos elevados, quer pela necessidade de profissionais qualificados na área e, possivelmente, por serem recentes se comparados aos quase centenários testes de solubilidade e falcização da hemoglobina S. Não foram detectados na literatura estudos comparando os ensaios convencionais com métodos moleculares, como a PCR-RFLP, apresentado neste estudo.

6.1 ENSAIOS MOLECULARES

6.1.1 Amostra

A amostra utilizada neste estudo é composta de doadores de sangue e pacientes de anemia falciforme que utilizam o serviço do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná. Do total de 500 amostras coletadas apenas duas (0,4%) foram excluídas por dificuldades na extração do DNA genômico. Este problema foi associado ao tempo prolongado de estocagem destas amostras antes do processo de extração de DNA, ao pouco volume de amostra e ao método de extração utilizado.

O grupo AS, que apresenta o chamado traço falcêmico, não diferiu em idade e proporção entre homens e mulheres do grupo AA ($p > 0,05$). Este fato pode ser justificado por serem estes indivíduos assintomáticos e diagnosticados quanto à presença da HbS somente em situações especiais, como quando se apresentam como doadores de sangue. Ramalho, Magna e Silva (2003) descrevem que o diagnóstico dos heterozigotos AS é um achado casual, pois os mesmos desconhecem a sua condição de portador do traço falcêmico por serem assintomáticos.

A idade média dos doadores de sangue representa o grupo com genótipo AA, $33,3 \pm 10,5$ anos, considerado neste estudo como grupo controle normal e o grupo de doadores com traço falcêmico, $32,3 \pm 10,3$ anos (Tabela 9). O grupo de pacientes com anemia falciforme (grupo SS), diferiu dos grupos AA e AS quanto à idade ($p < 0,05$) apresentando uma idade média cerca de 30% menor que os demais grupos. Esta diferença se deve ao fato de que, os indivíduos dos grupos AA e AS são doadores de sangue, enquanto os do grupo SS são pacientes em tratamento. Devido a programas governamentais, que propuseram a inclusão das hemoglobinopatias na triagem neonatal através da Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde, há no Brasil uma população cada vez mais jovem de pacientes com anemia falciforme em tratamento. O diagnóstico precoce das hemoglobinopatias é fundamental devido a sua frequência no Brasil, e à gravidade de algumas de suas formas. Assim, a triagem neonatal e o diagnóstico precoce, beneficiam tanto a

qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes, quanto os programas preventivos e assistenciais (VIANA-BARACIOLI *et al.*, 2001).

A diferença significativa na idade dos pacientes SS em relação aos outros grupos, também se deve ao fato de que sintomas característicos da doença, se manifestam primariamente aos 5 anos de idade, o que leva a busca de tratamento em idade precoce (LONERGAN; CLINE; ABBONDANZO, 2001).

A proporção de homens e mulheres foi diferente apenas quando comparados os grupos AS e SS ($p=0,009$). A frequência maior de mulheres (62,5%) no grupo SS provavelmente é uma característica casual da amostra em análise. Estudos realizados em outros estados brasileiros como os de Holsbach *et al.* (2008) no Mato Grosso do Sul e de Bandeira *et al.* (1999), em Pernambuco, que avaliaram a prevalência da HbS e sua ocorrência segundo o sexo, não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre pacientes do sexo feminino e masculino. Em contrapartida, PINHEIRO *et al.* (2006), analisando dados de triagem neonatal em Fortaleza demonstraram maior prevalência de HbS no sexo masculino em relação ao feminino (6,3% vs. 2,0%). Em outro estudo epidemiológico da doença falciforme, realizado na Índia, constatou-se menor frequência para o sexo feminino (KAMBLE; CHATRUVEDI, 2000). Estes autores sugerem que características culturais na Índia promovem maior atenção ao sexo masculino, negligenciando os indivíduos do sexo feminino, quanto ao atendimento à saúde.

Devido ao padrão de herança das hemoglobinopatias, é necessário se conhecer a origem étnica dos indivíduos. Porém, nem todos os serviços prestam tal informação, o que dificulta uma análise mais detalhada de cada caso (ORLANDO *et al.*, 2000). As amostras deste estudo não puderam ser avaliadas quanto à etnia dos indivíduos, pois o sistema do banco de sangue do HEMEPAR não inclui esta informação de todos os doadores de sangue e, tampouco, dos pacientes.

6.1.2 Detecção da mutação S por PCR-RFLP

A otimização da reação em cadeia da polimerase proposta neste estudo permitiu a obtenção de produtos de PCR com boa quantidade e ausência de bandas inespecíficas (Figura 10, Material e Métodos). Os estudos, realizados por Wu *et al.* (1989) e por Chamayou *et al.* (2002) propõem a obtenção de um amplicon para identificação da mutação S, de tamanho maior que o utilizado neste estudo, variando

ente 405 e 743 pb o que facilita posteriormente a identificação genotípica por PCR-RFLP em gel de agarose. A opção por um amplicon menor (377 pb) neste estudo, teve como fundamento a dupla utilização deste produto para as técnicas de PCR-RFLP e PCR-SSCP, onde esta última é mais sensível com fragmentos menores.

A reação de restrição foi otimizada para um volume final de 5 µL (Tabela 4, Material e Métodos) o que proporcionou uma redução nos custos do ensaio sem perda da eficiência. A opção do uso do gel de poliacrilamida na separação dos fragmentos de restrição, embora mais trabalhosa quando comparada ao gel de agarose, ofereceu melhor identificação dos fragmentos quando comparada com resultados de géis de agarose observados na literatura (CLARK; THEIN, 2004; CHAMAYOU *et al.*, 2002), sendo por isso recomendada para novos estudos.

A enzima de restrição *Dde* I referendada em múltiplos trabalhos da literatura foi substituída pelo seu isoesquisômero *HpyF3* I pelo seu menor custo. Não foram observadas na literatura vantagens ou desvantagens para qualquer uma das formas. Neste estudo não se observou nenhuma desvantagem associada ao uso da enzima *HpyF3* I.

A Figura 12 (Material e Métodos) mostra o perfil eletroforético dos fragmentos de restrição em gel de poliacrilamida, onde são identificados com facilidade os genótipos associados à mutação S.

Quando os resultados dos genótipos obtidos por PCR-RFLP foram comparados com os ensaios convencionais realizados no HEMEPAR (teste de solubilidade, teste de falcização e eletroforese de hemoglobinas) apenas um indivíduo (0,2%) apresentou resultado conflitante (Tabela 10). A concordância entre as genotipagens por PCR-RFLP com os ensaios convencionais, neste caso, foi cerca de 98%. A única discrepância observada foi de um indivíduo definido como genótipo SS, pelos testes convencionais, mas que foi definido por PCR-RFLP como genótipo AS, confirmado pela reação de seqüenciamento de DNA.

Entre as possibilidades aventadas para explicar esta discrepância, descartando um erro de transcrição no resultado e troca de amostra, a principal é que este indivíduo apresente dupla heterozigose composta pela HbS e outra hemoglobina variante, como a HbD-Los Angeles ou HbG Philadelphia, que possuem perfis eletroforéticos semelhantes aos da HbS. A HbD-Los Angeles ou Punjab (HBB:c.364G>C; beta 121 Glu>Gln) apresenta uma frequência elevada na população brasileira, de um caso para cada cinco mil pessoas analisadas (NAOUM;

DOMINGOS, 2007). A eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino e o teste de falcização não conseguem diferenciar o genótipo SS do SD, que pode ser positivo em ambos os casos. A HbD-Los Angeles interage com a HbS para produzir anemia hemolítica branda e sintomas que simulam os da anemia falciforme leve (LEE *et al.*, 1998).

Estão descritas, além da HbD-Los Angeles, outras hemoglobinas variantes como a HbD Iran (HBB:c.67G>C; beta 22 Glu>Gln) e HbD Ibadan (HBB:c.263C>A; beta 87 Thr>Lys), que apresentam comportamento eletroforético similar ao da hemoglobina S em pH alcalino (NAOUM; DOMINGOS, 2007).

A hemoglobina G Philadelphia (HBA2:c.207C>G ou C>A ou HBA1:c.207C>G; alfa 2 ou alfa 1 68 Asn>Lys) é uma variante da cadeia alfa que possui propriedades bioquímicas e/ou funcionais muito semelhantes às da hemoglobina S. A HbG tem uma migração discretamente catódica em relação a HbS na eletroforese alcalina dificultando a discriminação entre estas formas variantes (PEREA *et al.*, 1999). Outras hemoglobinas variantes, como a Hb Memphis (HBB:c.286A>G; beta 95 Lys>Glu) e a Hb Hasharon (HBA2:c.142G>C; alfa 2 47 Asp>His), possuem perfil eletroforético igual ao da HbS tanto em pH alcalino quanto em pH ácido (CLARKE; HIGGINS, 2000).

Exceto a HbD-Los Angeles, todas as hemoglobinas variantes anteriormente citadas, são raras, não se conhecendo suas frequências na população brasileira.

No presente estudo, não foi possível determinar conclusivamente a causa da discrepância observada entre o resultado do banco de sangue e a PCR-RFLP. A coleta de nova amostra, repetição de todos os ensaios e possivelmente técnicas para a detecção de outras hemoglobinas variantes ou a detecção de outros sítios polimórficos seriam pertinentes neste caso.

A técnica de PCR-RFLP mostrou-se eficaz na detecção da hemoglobina S. Suas vantagens frente aos métodos convencionais residem na especificidade da detecção do sítio da mutação em análise e o fato de que ela consegue diferenciar portadores (heterozigotos) e doentes (homozigotos) em um único ensaio. Em contrapartida, as técnicas convencionais precisam ser realizadas em conjunto para definir o diagnóstico da anemia falciforme e podem apresentar resultados falsos negativos e falsos positivos. Por exemplo, os testes de falcização e de solubilidade podem apresentar resultados falso-negativos em amostras onde a HbS está presente em baixa concentração associada à elevada concentração de HbF, como

ocorrem em recém nascidos (WAJCMAN *et al.*, 2001). Já a eletroforese de hemoglobinas pode resultar em casos falso-positivos, pois outras hemoglobinas variantes apresentam o mesmo perfil eletroforético da hemoglobina S, em pH alcalino.

O procedimento de PCR-RFLP permite identificar os genótipos associados a HbS, em qualquer estágio da vida, contrastando com os métodos convencionais para os quais o diagnóstico confirmatório só é possível após os seis meses de idade quando a HbF atinge suas concentrações fisiológicas (ORLANDO *et al.*, 2000).

Apesar de apresentar vantagens sobre as técnicas convencionais, a PCR-RFLP tem custo elevado, além da necessidade de um laboratório com características específicas, o que a torna, no presente, inviável para a rotina de populações. Resultados incorretos na PCR-RFLP estão associados a variações genéticas ou inserções/deleções que afetem o sítio de restrição da enzima (ANTONARAKIS; KAZAZI; ORKIN, 1985). Como exemplos, a mutação no nucleotídeo 17 (HBB:c.17C>G; Hb Warwickshire) e as deleções no códon 5 (-CT) e códon 6 (-A) e associadas a beta talassemia, removem o sítio de restrição para a enzima *Ddel* (*HpyF3I*) produzindo resultados falso positivos (KAZAZIAN *et al.*, 1983; LOSEKOOT *et al.*, 1990).

Novas tecnologias nas análises moleculares, como os micro-arranjos, que permitam um diagnóstico rápido com elevado custo/benefício, de múltiplos sítios polimórficos poderão em futuro próximo, atender às necessidades de laboratórios e bancos de sangue com vantagens sobre os testes convencionais ora empregados.

6.1.3 Detecção de outros sítios polimórficos por PCR-SSCP

O método de PCR-SSCP é destinado à triagem de variações genéticas e detecta alterações na mobilidade eletroforética de fitas simples do DNA em condições não desnaturantes (ORITA *et al.*, 1989). A alteração de uma base em um amplicon pode ser detectada por esta técnica.

A técnica de PCR-SSCP para a detecção de novos polimorfismos apresenta como vantagens a simplicidade de execução e o baixo custo. No entanto a detecção de padrões de migração eletroforética, decorrentes das conformações assumidas pelas fitas simples de DNA que caracterizam os polimorfismos, é dependente de vários fatores como concentração da acrilamida, pH do gel, temperatura na

eletroforese, presença de aditivos como glicerol, formamida, entre outros (HENNESSY; TEARE; KO, 1998). Portanto, esta técnica deve ser otimizada para cada fragmento de DNA que se quer analisar.

Nesta dissertação a técnica de PCR-SSCP foi otimizada para a região do exon 1 do gene da beta globina humana. Cerca de duas dezenas de condições de ensaio foram analisadas para a otimização da separação dos enantiômeros. Foram testadas diferentes concentrações de géis de poliacrilamida (29:1 e 19:1): 8, 9 e 10%, na presença e ausência de aditivos como uréia, glicerol (10, 5 e 0,5%), sacarose e diferentes tampões (TBE 1X, 0,5X e solução Tris-HCl 40 mM, pH 4,25).

Kukita *et al.* (1997) mostraram em seus estudos que a sensibilidade do método é afetada pelo pH, e encontraram uma melhor resolução no gel de poliacrilamida para a técnica de PCR-SSCP, adicionando glicerol ao gel. A presença do glicerol diminui o pH do gel e pode aumentar a sensibilidade da técnica fazendo com que fragmentos maiores (acima de 300 pb) possam ser analisados. Neste estudo, no qual o amplicon possui 377 pb, pôde-se observar que a adição de glicerol ao gel aumentou a qualidade de separação das fitas de DNA, melhorando sua resolução.

A condição que permitiu identificar melhor a presença de polimorfismos foi aquele que utilizou um gel de poliacrilamida (29:1) a 8% em TBE 0,5X com a adição de 0,5% de glicerol, e corrida eletroforética em TBE 0,5X (item 4.1.6, Material e Métodos). Este ensaio permitiu o melhor padrão de separação das fitas simples de DNA e identificação de bandas adicionais mostrando-se reprodutível, como mostra a Figura 15. Portanto, estas condições de ensaio foram escolhidas para as análises.

O tamanho do gel não foi associado a nenhuma vantagem na identificação de variações genéticas na PCR-SSCP. O emprego de géis com 160x160x0,8 mm (Gibco) ou com 100x75x0,75 mm (Mini Protean 3, BioRad) apresentaram a mesma sensibilidade. A utilização do sistema Mini Protean 3 oferece significativa economia de reagentes e uma redução em cerca de quatro vezes no tempo de corrida eletroforética, sendo por isso recomendado.

O procedimento de PCR-SSCP não permitiu a identificação da mutação S em nenhuma das condições estudadas. Podem ter contribuído para este fato o tamanho do amplicon de 377 pb, quando o ideal seria que tivesse entre 150 e 300 pb (SHEFFIELD *et al.*, 1993). É de conhecimento, que o tamanho do fragmento analisado não deva ser muito grande, pois há uma perda de sensibilidade da técnica

com o aumento do amplicon (IWAHANA; YOSHIMOTO; ITAKARA, 1992) e o número de mutações que pode ser detectado diminui para fragmentos maiores submetidos ao método de análise (SARKAR; YOON; SOMMER, 1992). Outra possibilidade está associada ao princípio da PCR-SSCP, que é a formação de conformações estáveis das fitas simples de DNA na presença de mutações. Propõe-se que o sítio de mutação S não produza conformações estáveis, o que como consequência, não alteraria o padrão de migração de PCR-SSCP nas condições de ensaio estudadas. Como sugerido por Sozen, Whittall e Humphries (2004), a utilização de oligonucleotídeos iniciadores fluorescentes acoplados à eletroforese capilar pode oferecer uma maior sensibilidade para este processo, sendo sugerida para outros estudos. Outra abordagem seria o uso de enzimas de restrição para diminuir o tamanho do fragmento e facilitar a detecção dos polimorfismos através da PCR-SSCP (IWAHANA; YOSHIMOTO; ITAKARA, 1992).

Analisando as corridas eletroforéticas obtidas em géis de poliacrilamida, foi possível distinguir quatro padrões eletroforéticos, designados de variação 1 (72,3%), variação 2 (27,1%), variação 3 (0,40%) e variação 4 (0,20%) no fragmento amplificado do exon 1 do gene da beta globina humana (Tabela 11). Uma amostra representativa de todas as variantes detectadas no procedimento de PCR-SSCP foi seqüenciada, para caracterizar a variação genética.

6.1.4 Identificação dos polimorfismos por seqüenciamento de DNA

Foram seqüenciadas 57,8% do total das amostras deste estudo e destas aproximadamente 50% renderam seqüências de bases de boa qualidade para a análise.

O resultado do seqüenciamento mostrou uma concordância de 100% com os resultados de PCR-RFLP, reforçando a confiabilidade neste ensaio (Figura 16). A amostra que apresentou resultados diferentes nos ensaios convencionais com a técnica de PCR-RFLP foi caracterizada pelo seqüenciamento de forma inequívoca como heterozigoto AS, confirmando o resultado obtido pela PCR-RFLP.

A análise de seqüenciamento permitiu identificar os perfis eletroforéticos da PCR-SSCP (Figura 17). O sítio das variações detectadas está localizado no códon 2, nucleotídeo 9 do exon 1 do gene da beta globina. Na variação 1, a mais freqüente, por isso designada usual, temos o genótipo HBB:c.9CC. As variações 2 e

3 foram caracterizadas, respectivamente, com os genótipos HBB:c.9CT e HBB:c.9TT. Finalmente um único indivíduo apresentou no mesmo nucleotídeo o genótipo HBB:c.9CG.

A variação HBB:c.9C>T produz uma alteração silenciosa ou sinônima na molécula de hemoglobina, onde o segundo códon CAC que codifica para uma histidina (His) é alterado para CAT, que codifica para o mesmo aminoácido.

Quando a frequência da variação HBB:c.9C>T foi comparada nos grupos AA, AS e SS, mostrou-se com uma distribuição diferente ($p < 0,0001$). A frequência do alelo T reduziu significativamente ($p < 0,05$) e progressivamente, ao se comparar os grupos AA, AS e SS (20% vs. 10,2% vs. 3,3%, respectivamente).

A população brasileira tem como característica a miscigenação (PROBST *et al.*, 2000). Sendo os portadores da mutação S prevalentes em afro-descendentes e a população paranaense predominantemente euro-descendente, postula-se que o alelo T da variação HBB:c.9C>T seja predominante nesta última. Caso este achado seja confirmado em estudos subseqüentes, é possível propor que a variação HBB:c.9C>T possa ser um marcador étnico para a população paranaense.

A variação HBB:c.9C>T está descrita na literatura sob número rs713040 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=713040), embora ainda não esteja validada. O pequeno número de estudos que mencionam esta variação pode estar associado ao fato da mesma ser uma mutação silenciosa, não produzindo alteração na seqüência de aminoácido, e, conseqüentemente não chamando a atenção para sua presença.

A variação HBB:c.9C>T na amostra total e no grupo AA não se encontra no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,01$). A escolha não aleatória da amostra pode explicar este achado.

Para este mesmo sítio polimórfico (HBB:c.9), estão descritas as mutações HBB:c.9[C>A ou C>G], as quais resultam na substituição de uma histidina por uma glutamina, caracterizando a Hb Okayama. A variação HBB:c.9C>G foi encontrada em um indivíduo com traço falcêmico, 0,2% na amostra em estudo (Figura 17, variação 4, Tabela 11).

A Hb Okayama tem sido detectada casualmente em indivíduos diabéticos, que realizam a determinação de Hb glicada, utilizando a metodologia de HLPC em coluna de troca iônica. A Hb Okayama tem o mesmo tempo de retenção na coluna de troca iônica, que a hemoglobina glicada (HbA_{1c}), promovendo uma falsa elevação

desta fração. Esta variação afeta o sítio de ligação com o 2,3-bisfosfoglicerato e promove uma maior afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (HARANO *et al.*, 1983).

O presente estudo que utiliza aleatoriamente amostras de banco de sangue evidencia a necessidade de maiores informações sobre os indivíduos da pesquisa. Dados como a etnia, peso, altura e parâmetros laboratoriais são relevantes para as pesquisas genéticas. É inegável o ganho em qualidade e informação que novas pesquisas poderão trazer, se tiverem disponível mais informações sobre a amostra em estudo.

6.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

6.2.1 Amostra

A amostra utilizada para a análise dos parâmetros bioquímicos e dos produtos de glicação compreendeu 404 indivíduos da amostra total. As amostras escolhidas foram as de indivíduos adultos, acima de 18 anos, cujo plasma não apresentava sinais visíveis de hemólise e foram classificadas em grupos AA, AS e SS, de acordo com os resultados da PCR-RFLP. Estes grupos diferiram entre si com relação à idade ($p < 0,05$) e quanto à proporção de homens e mulheres em relação ao grupo SS (Tabela 13). As demais características foram similares às reportadas para as amostras das análises moleculares (item 5.1.1).

6.2.2 Quantificação dos parâmetros bioquímicos e F-AGEs

6.2.2.1 Perfil lipídico

As concentrações séricas dos componentes do perfil lipídico (colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicerídios) são marcadores de risco para doença arterial coronariana (IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2007).

As concentrações do perfil lipídico para os pacientes em estudo mostraram uma significativa redução nos pacientes com anemia falciforme, exceto para os triglicérides, os quais não diferiram do grupo controle AA (Tabela 14). Estes resultados estão em concordância com os descritos para uma população iraniana por Rahimi *et al.* (2006). Estes autores sugerem que a redução no perfil lipídico em pacientes com anemia falciforme possa caracterizar uma redução no risco para doença arterial coronariana.

O grupo controle (AA) não diferiu significativamente do grupo AS para os componentes do perfil lipídico, exceto para os valores de colesterol total, quando estes foram analisados separadamente, em relação ao sexo. A determinação de LDL-colesterol mostrou concentrações séricas menores no grupo SS, porém foi menos sensível na discriminação dos grupos quando comparada à do colesterol total. Como a fração LDL está diretamente associada ao colesterol plasmático, seria

esperada uma melhor associação entre estes parâmetros. A medida indireta do LDL-colesterol pela equação de Friedewald* utilizada neste estudo, pode estar relacionada a uma menor sensibilidade discriminadora para este parâmetro. Para novos estudos, sugere-se a quantificação direta do LDL-colesterol em ensaio homogêneo.

*Equação de Friedewald:

$$\text{LDL-colesterol} = \text{Colesterol total} - (\text{triglicérides}/5 + \text{HDL-colesterol})$$

O colesterol total foi o parâmetro bioquímico que melhor discriminou os três grupos em estudo (Figura 18). Considerando o grupo AA como controle, foi observada uma redução média de 7% no colesterol total para o grupo AS (168,5/157,0) e de 20% para o grupo SS (168,5/134,2). As diferenças observadas para o grupo SS são também similares às descritas por Rahimi *et al.* (2006) que mostraram uma redução de 22% e 39%, respectivamente, para mulheres e homens no colesterol total, em comparação a indivíduos normais.

O relato na redução do colesterol sérico associado à anemia falciforme é antigo. Westerman *et al.* (1964) descreveram uma redução de 39% no colesterol total sérico em pacientes com anemia falciforme. Estes autores não observaram diferença significativa na concentração do colesterol da membrana de eritrócitos falcêmicos, quando comparados a eritrócitos normais. Outros estudos também confirmam a redução do colesterol total sérico em pacientes com anemia falciforme (ERASMUS; OJUAWO, 1990; OFORORUO; ADEDEJI, 1994; EL-HAZMI *et al.*, 1995).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a redução do colesterol total associado à anemia falciforme. O estado de hemólise, acentuado e crônico, em geral presente na anemia falciforme, promove hiperplasia medular decorrente da hiperproliferação dos precursores eritróides. O estado hiperproliferativo pode se refletir na redução do colesterol plasmático, para atender à maior demanda deste elemento para a biossíntese de membranas celulares (NAOUM, 2005).

Postula-se ainda, que a disfunção hepática usualmente presente nos pacientes com anemia falciforme reduz a produção endógena de colesterol e amplifica as alterações no perfil lipídico destes pacientes. Paralelamente, o estresse oxidativo crônico, gerado pelo estado hemolítico, bem como a sobrecarga de ferro, decorrente das múltiplas terapias transfusionais, tornam a partícula LDL, que é a principal carreadora do colesterol no sangue, mais susceptível à oxidação. Nessas

condições, a LDL oxidada é removida do plasma com maior velocidade pelo sistema retículo endotelial contribuindo para a hipocolesterolemia (BELCHER *et al.*, 1999).

A redução do colesterol sérico é um achado comum também em outras condições patológicas, como a leucemia mielóide aguda, o mieloma múltiplo e outras doenças mieloproliferativas, adenocarcinoma endometrial e carcinomas de cérvix, mama, próstata, ovário, vesícula biliar e pulmão. O aumento da proliferação celular é, possivelmente, a principal causa para estas condições estarem associadas à hipocolesterolemia (NAOUM, 2005).

O presente estudo parece ser o primeiro a relatar o comportamento do perfil lipídico em uma população brasileira de indivíduos portadores de hemoglobina S, bem como apresenta uma amostra com número de indivíduos expressivamente superior em relação aos relatados em outros estudos.

6.2.2.2 Proteína Total e Albumina

Os resultados das concentrações séricas de proteína total e albumina foram similares entre os grupos AA e AS, exceto para as mulheres, que apresentaram concentrações discretamente elevadas destes parâmetros no grupo AA. Os pacientes com anemia falciforme apresentaram valores significativamente superiores aos demais grupos para estes analitos (Tabela 14).

O aumento conjunto de proteínas totais e albumina sugere um incremento na síntese global de proteínas. Salman *et al.* (1996) demonstraram que em pacientes jovens com anemia falciforme, mesmo na ausência de crises vaso-oclusivas e doenças intercorrentes, estes pacientes utilizam 19% a mais de energia e 58% a mais de proteínas em relação a indivíduos saudáveis. O aumento na síntese de hemoglobina em resposta à hemólise, associado ao aumento da carga cardíaca, podem contribuir para a utilização excessiva de proteínas e energia. Como resposta ao estado hipermetabólico, há um aumento na síntese protéica.

Outra hipótese que pode ser aventada é um aumento das globulinas, principalmente da fração gama, pelo fato de o paciente falcêmico ser mais suscetível a infecções. Neste estudo, a concentração de globulinas nos pacientes falcêmicos, estimada pela diferença entre a proteína total e a albumina, foi significativamente maior, se comparado os grupos AA, AS e SS (3,0, 3,0 e 4,0g/dL, respectivamente).

Sugere-se para estudos futuros, que a fração gama seja avaliada através de eletroforese de proteínas séricas.

6.2.2.3 Creatinina

A creatinina sérica é um marcador da função renal sensível a alterações da filtração glomerular. A concentração sérica da creatinina depende além da função renal, da massa muscular do indivíduo (LEVEY; PERRONE; MADIAS, 1988).

Neste estudo, os indivíduos dos grupos AA e AS apresentaram concentrações similares de creatinina, exceto para homens do grupo AS, que mostraram uma discreta redução. Pacientes com anemia falciforme apresentaram resultados significativamente menores em relação aos demais grupos (Tabela 14). Apenas um paciente, excluído das análises bioquímicas apresentou comprometimento renal com concentração de creatinina superior a 6,0 mg/dL. Sesso *et al.* (1998) estudaram vários parâmetros laboratoriais associados à função renal em pacientes com anemia falciforme. Os valores de creatinina sérica para pacientes com anemia falciforme observados por estes autores (0,60 mg/dL) foram semelhantes aos encontrados neste estudo (0,54 mg/dL) e também inferiores aos de indivíduos com o traço falcêmico.

A função renal é afetada ao longo da história clínica dos pacientes com anemia falciforme. Na medula renal, a hiperosmolaridade, a hipoxemia e a acidose local facilitam para que a hemoglobina S polimerize, promovendo o fenômeno de vaso-oclusão intra-renal, responsável principal pela lesão renal (STRAUSS; ZILLERUELO; ABITBOL, 1986).

Nos indivíduos em estudo, os valores reduzidos da creatinina sérica para o grupo SS, podem estar associados à menor massa muscular, uma característica relatada para estes pacientes (MAPP *et al.*, 1987). Esta hipótese não pode ser confirmada neste estudo, por não estarem disponíveis as informações de peso e altura dos indivíduos estudados.

6.2.2.4 Produtos de glicação avançada fluorescentes

Os produtos de glicação avançada (AGEs) são formados pela reação não enzimática entre uma molécula de açúcar e uma proteína (MIYATA *et al.*, 1997). A

partir desta reação, outras modificações complexas como desidratações, oxidações e ciclizações ocorrem, resultando em múltiplos compostos, todos designados AGEs. Alguns destes compostos são fluorescentes como a pentosidina e outros não fluorescem como a N^ε-carboxi-metil-lisina (CML) o principal AGE em concentração no soro (SCHLEICHER *et al.*, 2001).

A formação dos AGEs está aumentada em processos patológicos como o *Diabetes mellitus*, insuficiência renal e processos inflamatórios, patologias que promovem aumento do estresse oxidativo (BASTA; SCHMIDT; CATERINA, 2004).

Alguns estudos têm apontado as concentrações séricas de AGEs como marcadores de complicações clínicas em processos que induzem estresse oxidativo. O processo de polimerização da hemoglobina S altera a estrutura da membrana do eritrócito (Figura 7, Introdução) estimulando processos pró-inflamatórios (FRENETTE; ATWEB, 2007).

A concentração de AGEs fluorescentes séricos em fração de baixa massa molecular, quantificados neste estudo, não se mostrou associada à anemia falciforme (Tabela 14). Em estudo prévio, Somjee *et al.* (2004) mostraram um aumento na concentração sérica de N^ε-carboxi-metil-lisina (CML), um AGE não fluorescente, quantificado por imunoenensaio, em pacientes com anemia falciforme.

A Figura 19 realça a progressiva redução na média dos AGEs fluorescentes, na comparação entre grupos AA, AS e SS, sem no entanto apresentar diferenças significativas ($p > 0,05$). A elevada variação na concentração de AGEs fluorescentes, observada pelo desvio padrão e amplitude de variação, pode ter influenciado os resultados desta análise.

A principal hipótese para explicar a discrepância nos resultados está no fato de que a categoria de AGEs fluorescentes presentes no soro não tem sua biossíntese estimulada pelos processos de estresse oxidativo associados à anemia falciforme, ao contrário dos AGEs não fluorescentes como a CML.

6.2.3 Comparação do colesterol total com a proteína total

A constatação de que os pacientes com anemia falciforme apresentavam concentrações séricas de proteínas totais e albumina diferentes em relação aos indivíduos com hemoglobina AA e AS, sugere que a análise de parâmetros

bioquímicos pode revelar marcadores laboratoriais que permitam identificar características nos pacientes com anemia falciforme. A análise conjunta das concentrações séricas de proteína total e colesterol total (Figura 20) permitiu agrupar os indivíduos com anemia falciforme com sensibilidade próxima a 70%, utilizando os valores de corte $>7,0$ g/dL para a proteína total e <150 mg/dL para o colesterol.

Embora a especificidade destes valores de discriminação seja baixa, cerca de 60%, os ensaios laboratoriais utilizados são de baixo custo e facilmente processados em qualquer laboratório. Novos estudos são necessários para avaliar se as concentrações de proteína total e colesterol total têm eficácia para monitorar pacientes com anemia falciforme, quanto a complicações desta condição patológica ou para detectar precocemente a necessidade de transfusão sanguínea, ou ainda, para monitorar o tratamento.

6.2.4 Quantificação dos parâmetros bioquímicos com as variações HBB:c.9CC e HBB:c.9CT do gene da beta globina humana

A partir da identificação da variação HBB:c.9C>T e da constatação de sua frequência elevada na população em estudo, as concentrações dos parâmetros bioquímicos foram comparados entre os genótipos HBB:c.9CC e HBB:c.9CT (Tabela 15). Nos indivíduos do sexo feminino as determinações de colesterol total e LDL-colesterol apresentaram diferenças significativas ($p<0,001$), com elevação de aproximadamente 15% do colesterol total para o genótipo HBB:c.9CT, que contempla o alelo T. Nos indivíduos do sexo masculino, a análise da concentração do colesterol total apresentou significância próxima ao limítrofe ($p=0,065$). Não foram encontrados trabalhos na literatura que descrevessem qualquer tipo de associação deste genótipo com parâmetros bioquímicos.

O valor de colesterol total e LDL-colesterol aumentado em mulheres e nos indivíduos da amostra total, poderia estar refletindo uma relação inversa entre o alelo T da variação HBB:c.9C>T e a presença da mutação S, anteriormente descrita (Tabela 12). Como demonstrado, a mutação S está associada à redução do colesterol e estes indivíduos têm baixa frequência do alelo T da variação HBB:c.9C>T, o que poderia justificar a razão de este alelo se apresentar associado à maior concentração de colesterol na amostra em estudo.

Quando as concentrações séricas de colesterol em indivíduos com genótipos HBB:c.9CC e HBB:c.9CT total foram comparadas com as concentrações deste analito para os grupos AA, AS e SS, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 21). Este resultado permite afirmar que a variação HBB:c.9C>T não está associada às concentrações de colesterol na amostra em estudo.

6.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, neste trabalho, foram comparados ensaios de rotina para identificar a presença da hemoglobina S com um ensaio com base molecular genética. Também foi explorada a identificação de novas variações genéticas para o gene da beta globina humana, na região que flanqueia a mutação da anemia falciforme em uma população do Estado do Paraná. Esta abordagem molecular pode servir como base para novos estudos que proponham a implantação de ensaios diagnósticos com base molecular para as múltiplas variações dos genes envolvidos na síntese da hemoglobina. Em futuro previsível, com as metodologias já existentes, poderá ser possível, com um único procedimento, identificar todas as variações associadas às doenças causadas pelos genes codificadores da hemoglobina, de forma rápida, confiável e econômica. Para tanto, é necessário conhecer as variações genéticas presentes em nossa miscigenada população. Um pequeno passo nesta direção foi dado com este trabalho.

7 CONCLUSÕES

- Na comparação entre os métodos de genotipagem para caracterizar as hemoglobinas em AA, AS e SS por métodos convencionais (teste de falcização, teste de solubilidade e eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino) e por PCR-RFLP, houve correlação de 99,8%;
- O ensaio de PCR-SSCP otimizado não possibilitou a identificação da mutação S nas condições ensaiadas, portanto, ele não é recomendado para a detecção da mutação S nos ensaios de rotina;
- O ensaio de PCR-SSCP otimizado permitiu identificar os genótipos HBB:c.9C>T e HBB:c9.C>G no gene da beta globina;
- A variação HBB:c.9C>T apresentou freqüências de 14% para o alelo raro (T) para a amostra total, e freqüência genotípica CC=72,3%; CT=27,1% e TT=0,40%, este é o primeiro estudo deste SNP para a população brasileira;
- A variação HBB:c.9C>T apresentou uma redução significativa da freqüência do alelo T na presença do alelo S;
- A concentração do colesterol sérico é significativamente menor em indivíduos com alelo que codifica para hemoglobina S;
- A combinação de valores de proteína total >7,0g/dL e de colesterol total <150 mg/dL permitiram discriminar os grupos AA e AS do grupo SS em estudo com sensibilidade de 70%;
- A concentração dos AGEs fluorescentes de baixa massa molecular no soro não foi associada com a presença do alelo S na amostra em estudo.

REFERÊNCIAS

- ABDU, A.; GÓMEZ-MÁRQUEZ, J.; ALDRICH, T.K. The oxygen affinity of sickle hemoglobin. **Resp. Physiol. Neurobiol.**, 2008 (in press)
- ADORNO, E. V. *et al.* Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 292-298, 2005.
- AJAYI, A. A. L. Should the sickle cell trait be reclassified as a disease state? **Europ. J. Internal. Med.**, v. 16, p. 463, 2005.
- ANTONARAKIS, S. E. *et al.* Nonrandom association of polymorphic restriction sites in the beta-globin gene cluster. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 79, p. 137-141, 1982.
- ANTONARAKIS, S. E.; KAZAZIAN, H. H. J.; ORKIN, S. H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene cluster. **Hum. Genet.**, v. 69, p. 1-14, 1985.
- ANVISA; **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**. Brasília, 2002.
- ATLAS, S. A. Sickle cell trait and surgical complications. A matched-pair patient analysis. **JAMA**, v. 229, p. 1078-1080, 1974.
- BADENS, C. *et al.* Molecular basis of haemoglobinopathies and G6PD deficiency in the Comorian population. **J. Hematol.**, v. 1, p. 264-268, 2000.
- BAIN, B. J. **Haemoglobinopathy diagnosis**. Oxford: Blackwell Science, 2001.
- BALLAS, S. K.; MOHANDAS, N. Pathophysiology of vaso-occlusion. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 10, p. 6, 1996.
- BANDEIRA, F. M. G. C. *et al.* Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina S detectados através de triagem em sangue de cordão umbilical. **J. Pediatr.**, v. 75, p.167-171, 1999.
- BANDEIRA, F. M. G. C. *et al.* Diagnóstico da hemoglobina S: análise comparativa do teste de solubilidade com a eletroforese em pH alcalino e ácido no período neonatal. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.**, v. 3, n. 3, p. 1-8, 2003.
- BASTA, G.; SCHMIDT, A. M.; CATERINA, R. D.; Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovasc. Res.**, v. 63, p. 582-92, 2004.
- BELCHER, J. D. *et al.* Low-density lipoprotein susceptibility to oxidation and cytotoxicity to endothelium in sickle cell anemia. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 133, p. 605-612, 1999.

BERTHOLO, L. C.; MOREIRA, H. W. Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre elas e talassemia beta. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 4, p. 245-251, 2006.

BEUZARD, Y. *et al.* Isoelectric focusing of human hemoglobins. **Ad. Hem. Anal.**, v. 60, p. 177-195, 1981.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemoglobinopatias no Brasil: variabilidade genética e metodologia laboratorial. São José do Rio Preto, 1993. *Tese de Doutorado em Ciências Biológicas*. Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. 120p.

BOOKCHIN, R. M.; LEW, V. L. Pathophysiology of sickle cell anemia. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 10, p. 1241-1253, 1996.

BRUGNARA, C. Therapeutic strategies for prevention of sickle cell dehydration. **Blood Cel. Mol. Dis.**, v. 27, p. 71-80, 2001.

BUNN, H. F.; FORGET, B. G. **Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects**. W.B.: Saunders Company, 1986.

BUNN, H. F. Induction of fetal hemoglobin in sickle cell disease. **Blood**, v. 93, p. 1787-1789, 1999.

CHAMAYOU, S. *et al.* Successful application of preimplantation genetic diagnosis for beta-thalassemia and sickle cell anemia in Italy. **Hum. Reprod.**, v. 17, n. 5, p. 1158-1165, 2002.

CLARK, B.E.; THEIN, S.L. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. **Clin. Lab. Haem.**, v. 26, p. 159-176, 2004.

CLARKE, G. M.; HIGGINS, T. N. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. **Clin Chem.** 46(8):1284-1290, 2000.

CONNER, B. J. *et al.* Detection of sickle cell bs-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.80, p. 278-282, 1983.

DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. **Molecular Cell Biology**. New York: Scientific American Books, 1990.

DAVIES, S.C. Haemoglobinopathies. **Ped. Child. Healt.**, v.17, p. 311-316, 2007.

DEAN, J.; SCHECHTER, A. N. Sickle cell anemia: molecular and cellular bases of therapeutic approaches. **Engl. J. Med.**, v. 299, n. 14, p. 752-763, 1978.

EATON, W. A. *et al.* Delay time of gelation: A possible determinant of clinical severity in sickle cell disease. **Blood**, v. 47, p. 621, 1976.

EL-HAZMI, M. A.; JABBAR, F. A.; WARSY, A. S. Cholesterol and triglyceride level in patients with sickle cell anaemia. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 47, n. 4, p. 351-354, 1987.

EL-HAZMI, M. A. *et al.* Red cell genetic disorders and plasma lipids. **J. Trop. Ped.**, v. 41, p. 202-205, 1995.

ERASMUS, R. T.; OLUKOGA, O.; OJUAWO, O. Plasma lipids and lipoproteins in Nigerian children with sickle cell anaemia. **Ann. Trop. Paed.**, v. 10, p. 421-423, 1990.

EWING, B. *et al.* Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment. **Gen. Res.**, v. 8, p. 75-185, 1998.

FENANDES, A. R. C.; MENDIBURU, C. F.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Utilization of different methodologies for characterization of Hb Hasharon heterozygotes. **Gen. Mol. Res.**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2006.

FIGUEIREDO, M. S. Fatores moduladores da gravidade da evolução clínica da anemia falciforme. **Ver. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 215-217, 2007.

FRANCIS, R. B. Large-vessel occlusion in sickle cell disease: pathogenesis, clinical consequences, and therapeutic implications. **Med. Hyp.**, v. 35, p. 88-95, 1991.

FRENETTE, P. S.; ATWEB, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 4, p. 850-858, 2007.

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

GASTON, M. H. *et al.* Prophylaxis with oral penicilin in children with sickle cell anemia. **N. Eng. J. Med.**, v. 314, p. 1593-1596, 1986.

GORDON, D; ABAJIAN, C; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genet. Res.**, v. 8, p. 195-202, 1998.

HAHN, E.V.; GILLESPIE, E. B. Sickle cell anemia. **Arch. Intern. Med.**, v. 39, p. 233, 1927.

HARANO, T. *et al.* Hemoglobin Okayama: a new silent hemoglobin variant with substituted amino acid residue at the 2,3-diphosphoglycerate binding site.

HEBBEL, R. P. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickled disease pathophysiology. **Blood**, v. 77, p. 214-237, 1991.

HEBBEL, R. P. Adhesive interactions of sickle cell erythrocytes with endothelium. **Am. Soc. Clin. Invest.**, v. 99, n. 11, p. 2561-2564, 1997.

HEBBEL, R. P.; OSAROGIAGBON, R.; KAUL, D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. **Microcirculation**, v. 11, p. 129-151, 2004.

HENNESSY, L. K.; TEARE, J.; KO, C. PCR conditions and DNA denaturants affect reproducibility of single-strand conformation polymorphism patterns for BCRA1 mutation. **Clin. Chem.**, v. 44, p. 879-882, 1998.

HERRICK, J. B.; Peculiar elongated and sickle-shaped red corpuscles in a case of severe anemia. **Arch. Intern. Med.**, v. 6, p. 517-521, 1910.

HIGGS, D. R. *et al.* A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. **Blood**, v. 73, p. 1081-1104, 1989.

HINDS, D. A. *et al.* Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome. **Nat. Genet.**, v. 38, p. 82-85, 2006.

HOCKING, D. R. **The separation and identification of hemoglobin variants by isoelectric focusing electrophoresis: an interpretative guide.** Georgia: Medical College of Georgia, 1997.

HOFFBRAND, A. V.; PETTIT, J. E. **Essencial Haematology.** 3 ed. London: Blackell Science, 1993.

HOLSBACH, D. R. *et al.* Ocorrência de hemoglobina S no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 44, n. 4, p. 277-282, 2008.

HONIG, G. R.; ADAMS, J. G. **Human hemoglobin genetics.** Wien: Springer, 1986.

INGRAM, V. M.; A specific difference between the globins of normal human and sickle cell anemia hemoglobins. **Nature**, v. 178, p. 792, 1956.

JEKEL, J. F.; ELMORE, J.G.; KATZ, D. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva.** Porto Alegre: Limed, 1999.

INGRAM, V. M.; Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle haemoglobin. **Nature**, v. 180, p. 360-368, 1957.

IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, volume 88, suplemento I, Abr/2007.

IWAHANA, H.; YOSHIMOTO, K.; ITAKARA, M. Detection of point mutation by SSCP of PCR-amplified DNA after endonuclease digestion. **Biotechniques**, v. 12, p. 64-66, 1992.

KAMBLE, M. CHATRUVEDI, P. Epidemiology of sickle cell disease in a rural hospital of central India. **Ind. Pediat.**, v. 37, p. 391-396, 2000.

KAN, Y.; DOZY, A. M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β -globin structural gene: relationship to sickle mutation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 75, p. 5631-5635, 1978.

KANOKWAN, S. *et al.* Multiplex allele-specific PCR assay for differential diagnosis of Hb S, Hb D-Punjab and Hb Tak. **Clin. Chim. Acta**, v. 343, p. 129-134, 2004.

KAZAZIAN, H. H. *et al.* Beta-thalassemia due to a deletion of the nucleotide which is substituted in the beta S-globin gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 35, n. 5, p. 1028-1033, 1983.

KHELIL, A.H. *et al.* Clinical and molecular aspects of haemoglobinopathies in Tunisia. **Clin. Chim. Acta**, v. 340, p. 127-137, 2004.

KINNEY, T. R. *Et al.* Long-term management of splenic sequestration in children with sickle cell disease. **J. Pediatr.**, v. 117, p. 194-199, 1990.

KRUGER, R.P. Hammering out a treatment for a sickle cell anemia. **Cell**, v. 132, p. 5-7, 2008.

KUKITA, Y. *et al.* SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. **Hum. Mutat.**, v. 10, p. 400-407, 1997.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. J. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucl. Acid. Res.**, v. 19, p. 5444, 1991.

LEE, G. R. *et al.* **Wintrobe hematologia clínica**. São Paulo: Manole, 1998.

LEE, D. H.; ZO, Y. G.; KIM, S. J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single strand conformation polymorphism. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 3112-3120, 1996.

LESSA, E. P.; APPLEBAUM, G. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. **Mol. Ecol.**, v. 2, p. 119-129, 1993.

LEVEY, A. S.; PERRONE, R. D.; MADIAS, N. E. Serum creatinine and renal function. **Annu. Rev. Med.**, v. 39, p. 465, 1988.

LONERGAN, G. F.; CLINE, D. B.; ABBONDANZO, S. L. Sickle cell anemia. **Radiographics**, v. 21, p. 971-994, 2001.

LOREY, F. *et al.* Universal screening for hemoglobinopathies using high-performance liquid chromatography: clinical results of 2.2 million screens. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 2, p. 262-271, 1994.

LOSEKOOT, M. *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing of PCR amplified genomic DNA: a rapid and reliable diagnostic approach to beta thalassaemia. **Brit. J. Haematol.**, v.76, n. 2, p. 269-274, 1990.

MAGANÃ, M. T. *et al.* Analysis of β^S and β^A genes in a mexican population with african roots. **Blood Cells**, v. 28, n. 2, p. 121-126, 2002.

MANWANI, D.; GALDASS, M.; BIEKER, J.J. Altered regulation of b-like globin genes by a redesigned erythroid transcription factor. **Exp. Haematol.**, v. 35, p. 39-47, 2007.

MAPP, E. *et al.* Uroradiological manifestations of S-hemoglobinopathy. **Sem. Roent.**, v. 22, p. 186-194, 1987.

MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A. Cell-cell interactions: leucocyte-endothelial interactions. **Curr. Opp. Hematol.**, v. 10, p. 150-158, 2003.

MEARS, J. L. *et al.* The sickle gene polymorphism in North Africa. **Blood**, v. 58, p. 599- 601, 1981.

Ministério da Saúde. **Portaria n.o 822 de 06 de junho de 2001**. BRASÍLIA (DF), 2001a. 29p.

MIYATA, T. *et al.* Oxidation conspires with glycation to generate noxious advanced glycation end products in renal failure. **Nephrol. Dial. Transp.**, v. 12, p. 255-258, 1997.

MOHANDAS, N.; EVANS, E. Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial cells: Requeriment for both cell membrane changes and plasma factors. **Blood**, v. 64, p. 284, 1984.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**, v. 2, n. 2, p. 139-142, 2004.

einstein. 2004; 2(2):139

MYERS, R. M.; MANIATIS, T.; LERMAN, L. S. Detection and localization of single base pair changes by denaturing gradient gel electrophoresis. **Meth. Enzymol.**, v. 155, p. 501, 1987.

NAGEL, R. L.; RANNEY, H. M. Genetic epidemiology of structural mutations of the beta globin gene. **Blood**, v. 7, p. 54-59, 2004.

NAGEL, R. L. *et al.* **Malaria and hemoglobinopathies, disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, clinical management.** Cambridge: Cambridge University Press, 2001.

NAOUM, F. A. Alterações do perfil lipídico nas anemias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 3, p. 223-226, 2005.

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

NAOUM, P. C.; DOMINGOS, C. R. B. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, p. 226-228, 2007.

NAOUM, P. C; NAOUM, F. A. **Doença das Células Falciformes**. São Paulo: Sarvier, 2004.

NEWTON, C. R. *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucl. Acid. Res.**, v. 17, p. 2503-2516, 1989.

OFORUFUO, A. O.; ADEDEJI, M. O. Effect of sickle-cell gene expression on plasma cholesterol in a nigerian population. **Clin. Biochem.**, v. 27, p. 505-508, 1994.

ORITA, M. *et al.* Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 2766-2770, 1989.

ORLANDO, G. M. *et al.* Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, p. 111-121, 2000.

OTENG-NTIM, E. *et al.* Sickle cell disease in pregnancy. **Curr. Obst. Gynecol.**, v. 16, p. 353-360, 2006.

OKPALA, I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red cell disorder. **Blood**, v. 8, p. 65-73, 2004.

PAGNIER, J. *et al.* Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 81, p. 1771-1773. 1984.

PALEK, J. Red cell membrane injury in sickle cell anaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 35, p. 1, 1977.

PAPADEA, C.; CATE, J.C. Identification and qualification of hemoglobins A, F, S, and C by automated chromatography. **Clin. Chem.**, v. 42, p. 57-63, 1996.

PAULING, L. *et al.* Sickle cell anemia, a molecular disease. **Science**, v. 110, p. 543-549, 1949.

PENCHSZADEH, V. Genetics services for hemoglobinopathies in Latin-America. Joint W.H.O. In: Meeting on Prevention and Control of Hemoglobinopathies. **Nic. Cyp.**, 1993.

PEREA, F. J. *et al.* HbD Los Angeles associated with HbS or alfa-thalassemia in four Mexican mestizo families. **Haemoglobin**, v. 23, p. 231-237, 1999.

PEREIRA, M. M.; CORROMS, J-L. V. Neonatal haemoglobinopathy screening in Spain. **J. Clin. Patol.**, v. 62, p. 22-25, 2009.

PINHEIRO, L. S. *et al.* Prevalência de hemoglobina S em recém-nascidos de Fortaleza: importância da investigação neonatal. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 28, p. 122-125, 2006.

POWARS, R.D. β^S -gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. **Hemat. Oncol. Clin. North Am.**, v. 5, p. 475-493, 1991.

PROBST, C. H. *et al.* HLA polymorphism and evaluation of european, african and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. **Hum. Biol.**, v. 72, n. 4, p. 597-617, 2000.

PRUDENCIO, B. C. A. B.; COVAS, D. T.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de hemoglobina S em doadores de sangue. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n. 2, p. 99-109, 2000.

RAHIMI, Z. *et al.* Plasma lipids in Iranians with sickle cell disease: hypocholesterolemia in sickle cell anemia and increase of HDL-cholesterol in sickle cell trait. **Clin. Chim. Acta**, v. 365 p. 217-220, 2006.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; SILVA, R. B. P. A Portaria MS nº 822/01 e a triagem neonatal das hemoglobinopatias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 24, 2002.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; SILVA, R. B. P. A Portaria no 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Cad. Saúde Pública.**, v. 19, n. 4, p. 1195-1199, 2003.

REES, D. C. *et al.* Guidelines for the management of the acute painful crisis in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 120, p. 744-752, 2003.

ROSSE, W. F.; TELEN, M.; WARE, R. **Transfusion support for patients with sickle cell disease.** AABB Press: Bethesda Maryland, 1998.

ROTHER, R. P. *et al.* The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **JAMA**, v. 294, p. 1653-1662, 2005.

SAIKI, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-91, 1988.

SALMAN, E. K. *et al.* Protein and Energy Metabolism in Prepubertal Children with Sickle Cell Anemia. **Pediat. Res.**, v. 40, n. 1, p. 34-40, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.

SANGER, F. Determination of nucleotide sequences in DNA. **Science**, v. 214, p. 1205-1210, 1981.

SARKAR, G.; YOON, H. S.; SOMMER, S. S. Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism: comparison with DNA-SSCP. **Nucl. Acid. Res.**, v. 20, p. 871-878, 1992.

SCHLEICHER, E. D. *et al.* Chemistry and pathobiology of advanced glycation end products. **Contrib. Nephrol.**, v. 131, p. 1-9, 2001.

SCHMIDT, R.D. Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. **JAMA**, v. 224, p. 1276-1280, 1973.

- SERJEANT, G.R. A doença da célula falciforme. **Anal. Nest.**, v. 58, p. 11-22, 1999.
- SERJEANT, G.R. *et al.* Outbreak of aplastic crises in sickle anaemia associated with parvovirus like agent. **Lancet**, v. 2, p. 585, 1981.
- SERJEANT, G.R. *et al.* The painful crises of homozygous sickle cell disease: Clinical features. **Br. J. Haematol.**, v. 87, p. 586-591, 1994.
- SHEFFIELD, V. C. *et al.* The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitution. **Genomics**, v. 16, p. 325-332, 1993.
- SHERMAN, I. J. The sickling phenomenon, with special reference to the differentiation of sickle cell anemia from the sickle cell trait. **Johns Hopkins Med. J.**, 67:309, 1940.
- SHORES, J. *et al.* Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease. **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 38. p. 157-159, 2001.
- SOMJEE, S. S. *et al.* Advanced glycation end-products in sickle cell anaemia. **Brist. J. Haematol.**, v. 128, p. 112-118, 2004.
- SOZEN, M.; WHITTALL, R.; HUMPHRIES, S. E. Mutation detection in patients with familial hypercholesterolaemia using heteroduplex and single strand conformation polymorphism analysis by capillary electrophoresis. **Atheroscl. Suppl.**, v. 5, p. 7-11, 2004.
- STEINBERG, M. H.; ADAMS, J. G.; Laboratory diagnosis of sickling hemoglobinopathies. **Sout. Med. J.**, v. 71, p. 413-6, 1978.
- STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. **Bail. Clin. Haematol.**, v. 11, p. 163-184, 1998.
- STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Brit. J. Haematol.**, v. 129, p. 465-481, 2005.
- STEINBERG, M.H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **TRENDS Pharmacol. Sci.**, 27:204-210, 2006.
- STEVENS, M. C. G. *et al.* Prepubertal growth and skeletal maturation in children with sickle cell disease. **Pediatrics**, v. 78, p. 124-132, 1986.
- STREETLY, A.; DICK, M. Screening for haemoglobinopathies. **Curr. Paed.**, v.15, p. 32-39, 2005.
- STRAUSS, J.; ZILLERUELO, G. ABITBOL, C. The kidney and hemoglobin S. **Nephron**, v. 43, p. 241-245, 1986.
- STUART, M.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet**. v. 364, p. 1343-1360, 2004.

SUNNUCKS, P. *et al.* SSCP is not difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. **Mol. Ecol.**, v. 9, p. 1699-1710, 2000).

TELEN, M. J. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. **Sem. Hematol.**, v. 37, n. 2, p. 130-142, 2000.

VIANA-BARACIOLI, L. M. S. *et al.* Prevenção de hemoglobinopatias a partir do estudo em gestantes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 23, n. 1, p. 31-39, 2001.

WAJCMAN, H. *et al.* Abnormal hemoglobins: laboratory methods. **Hemoglobin**, v. 25, n. 2, p. 169-181, 2001.

WATANABE, A. M. *et al.* Prevalência da hemoglobina S no estado do Paraná, Brasil, obtida pela triagem neonatal. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 993-1000, 2008.

WATERFALL, C. M.; COBB, B. D. Single tube genotyping of sickle cell anaemia using PCR-based SNP analysis. **Nucle. Ac. Res.**, v. 29, n. 23, p. 1-8, 2001.

WATSON, J.; STAHPMAN, A. W.; BILLELO, F. P. The significance of the paucity of sickle cells in newborn negro infants. **Am. Med. Sci.**, v. 215, p. 419-423, 1948.

WAUTIER, J. L.; WAUTIER, M.P. Erythrocytes and platelet adhesion to endothelium are mediated by specialized molecules. **Clin. Hemorheol. Microcirc.**, v. 30, n. 3-4, p. 181-184, 2004.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Genetic disorders of hemoglobin. **Sem. Hematol.**, v. 36, p. 24-37, 1999.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. **The thalassaemia syndromes.** Oxford: Blackwell Science, 2001.

WERNER, G. D.; BALCERAZAL, S. P. Viscometric and spectrophotometric measurements of hemoglobin S polymerization kinetics. **Blood**, v. 63, p. 897, 1984.

WESTERMAN, M. P.; PIERCE, L. E.; JENSEN, W. N. Erythrocyte and plasma lipids in sickle cell anemia. **Blood**, v. 23, n. 2, p. 200-205, 1964.

WITTEWER, C. T.; KUSUKAWA, N. Nucleic acid techniques. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics.** 4 ed. Elsevier: St. Louis, 2006. p. 1407-1449.

WRÓBEL, K.; GARAY-SEVILLA, M. E.; NAVA, L. E.; MALACARA, J. M. Novel analytical approach to monitoring advanced glycosylation end products in human serum with on-line spectrophotometric and spectrofluorometric detection in a flow system. **Clin. Chem.**, v. 43, p. 1563-1569, 1997.

WU, D. Y. *et al.* Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 2757-2760, 1989.

YUE, P. MOULT, J. Identification and analysis of deleterious human SNPs. **J. Mol. Biol.**, v. 356, p. 1263-1274, 2006.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R.; **Hematologia: Fundamentos e prática.** São Paulo: Atheneu, 2004.

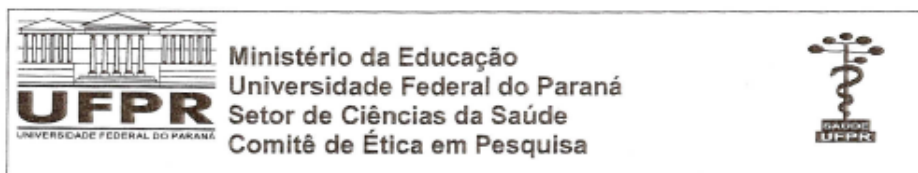
ZAGO, M.A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

ZAMARO, P. J. A. *et al.* Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à Hb S. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 38, n. 4, p. 261-266, 2002.

ZARKOWSKY, H. S. *et al.* Bacteremia in sickle hemoglobinopathies. **J. Pediatric.**, v. 109, p. 579, 1986.

ZILIN, S. *et al.* The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clin. Chim. Acta.**, v. 313, p. 69-75, 2001.

ANEXO 1
Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de
Ciências da Saúde da UFPR



Curitiba, 03 de abril de 2008.

Ilmo (a) Sr. (a)
 Débora Regina Daga

Nesta

Prezado (a) Pesquisador (a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Estudo do gene da beta globina humana por análise de conformação de fita simples(SSCP) e PCR-RFLP em indivíduos normais e portadores da hemoglobina S**”, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 26 de março de 2008 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 03 de abril de 2008.

Registro **CEP/SD**: 479.016.08.03 **CAAE**: 0010.0.091.000-08

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 03/10/2008.

Atenciosamente

Profª. Drª. Liliansa Maria Labronici
 Coordenadora do Comitê de Ética em
 Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

ANEXO 2**Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde Pública do Paraná**

Curitiba, 24 de abril de 2008.

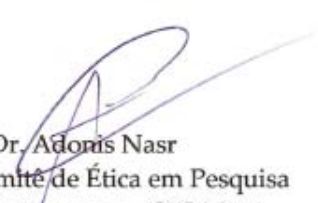
Ilma Senhora,
Débora Regina Daga
Nesta

Prezada Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná/Hospital do Trabalhador analisou na sessão do dia **24 de abril de 2008** o processo Nº. 009/2008, referente ao projeto de pesquisa: *“Estudo do gene da beta globina humana por análise de conformação de fita simples (SSCP) e PCR-RELP em indivíduos normais e portadores da Hemoglobina S”*, tendo como pesquisador responsável **Débora Regina Daga**.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos requisitos fundamentais da Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Solicita-se ao pesquisador o envio a este CEP de relatórios sobre o andamento da pesquisa bem com o envio de relatório final.



Dr. Adonis Nasr
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos - SESA/HT

ANEXO 3

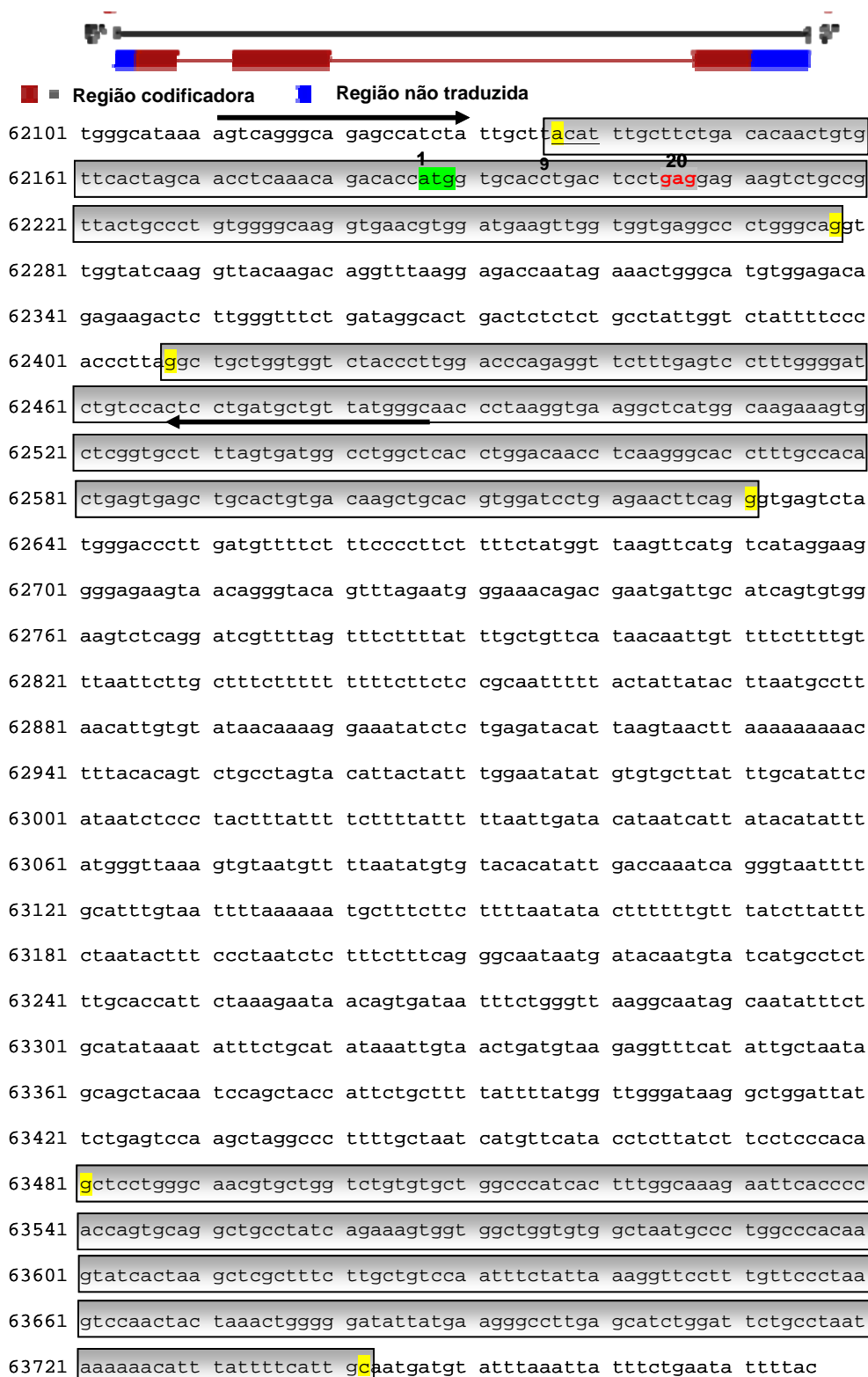
Método de extração de DNA genômico.

Modificações no método de Lahiri e Nurberger, 1991.

Etapas	Ações
1	Coletar de 3 a 5 mL de sangue total em tubo de EDTA Centrifugar o tubo de sangue por 10 min a 4000 rpm Remover o plasma Separar o creme leucocitário (<i>buffy coat</i>)
2	Em tudo Eppendorf colocar 900 µL de TKM1 contendo NP-40 (ou Triton X-100) a 2,5% Adicionar 250 µL do <i>buffy coat</i> Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 10000 rpm Desprezar quase todo o sobrenadante, deixando aproximadamente 500 µL
3	*Completar o volume do tubo com TKM1 (sem NP-40 ou Triton X-100) Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 10000 rpm Desprezar todo o sobrenadante * Repetir esta etapa até que o sedimento esteja limpo
4	Completar o volume do tubo com água ultra pura Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 13000 rpm Desprezar todo o sobrenadante
5	Adicionar ao sedimento: 40 µL de tampão de proteinase K 20 µL de proteinase K 10 µL de SDS 20% 120 µL de água ultra pura Homogeneizar em vortex Colocar em banho-maria 65 °C por 40 min Em 20 min de banho-maria, homogeneizar novamente os tubos em vortex
6	Tirar os tubos do banho-maria e esfriar em temperatura ambiente Adicionar 100 µL de Cloreto de Sódio 6M Homogeneizar Centrifugar por 10 min a 13000 rpm
7	Transferir o SOBRENADANTE para um novo tubo Eppendorf Adicionar 700 µL de etanol absoluto Homogeneizar por inversão Centrifugar por 2 min a 13000 rpm Desprezar sobrenadante
8	Adicionar 700 µL de etanol 70% Homogeneizar em vortex Centrifugar por 2 min a 13000 rpm Desprezar sobrenadante Deixar os tubos secar em temperatura ambiente, estufa a 37 °C, ou em bloco de aquecimento a 65 °C
9	Depois de seco, reconstituir com 80 a 100 µL de água ultra pura Homogeneizar bem em vortex Deixar 1 hora a 65 °C

ANEXO 4

Seqüência do gene da beta globina humana (GenBank U01317)



A seqüência U01317 do gene da beta globina humana foi obtido do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). As setas indicam o sítio de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores. Em destaque o sítio de início de tradução (ATG; A=1) e o codon 6 sítio da mutação S (GAG; A=20). Os retângulos indicam os exons.

Daga, Debora Regina

Variabilidade genética do exon 1 do gene da beta globina humana em indivíduos normais e portadores da hemoglobina S. / Debora Regina.Daga. - Curitiba, 2009.

110 f.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr.Geraldo Picheth

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Análises Clínicas.

1. Hemoglobinopatias. 2. Anemia falciforme. 3. Variabilidade genética. 4. Biologia molecular. 5. Polimorfismos genéticos.
I. Nascimento, Aguinaldo José. II. Leonart, Maria Suely Soares.
III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDD 616.151075