



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**  
**NATÁLIA DE MORAIS CASTELO**

**IDENTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS DO GENE DA GLOBINA-B<sup>S</sup> EM PESSOAS  
COM ANEMIA FALCIFORME DO ESTADO DO AMAPÁ**

**MACAPÁ-AP**  
**2013**

**NATÁLIA DE MORAIS CASTELO**

**IDENTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS DO GENE DA GLOBINA-B<sup>S</sup> EM PESSOAS  
COM ANEMIA FALCIFORME DO ESTADO DO AMAPÁ**

Dissertação apresentada à banca examinadora do Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração Ensaio Biológicos, Linha de Pesquisa Hematologia e Hemoterapia.

Orientadora: Profa. Dra. Ártemis Socorro do Nascimento Rodrigues

Co-orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini - Domingos

**Macapá-AP  
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá**

574

C348i

Castelo, Natália de Morais.

Identificação de haplótipos do gene da globina beta s ( $\beta^s$ ) em pessoas com anemia falciforme do Estado do Amapá / Natália de Morais Castelo -- Macapá, 2013.

74 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ártemis Socorro do Nascimento Rodrigues

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos

1. Anemia falciforme – Macapá (AP). 2. Hemoglobina. 3. Haplótipos. 4. Genética da população humana. 5. Polimorfismo. I. Rodrigues, Ártemis socorro do Nascimento, orient. II. Bonini-Domingos, Claudia Regina, co-orient. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

NATÁLIA DE MORAIS CASTELO

IDENTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS DO GENE DA GLOBINA-B<sup>S</sup> EM PESSOAS COM  
ANEMIA FALCIFORME DO ESTADO DO AMAPÁ

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de Ensaio Biológicos, Linha de Pesquisa Hematologia e Hemoterapia junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP).

BANCA EXAMINADORA:

---

Profa. Dra. Ártemis Socorro do Nascimento Rodrigues (Orientadora/Presidente)  
UNIFAP

---

Prof. Dra. Alessandra Azevedo Nascimento de Medeiros (Avaliadora)  
UNIFAP

---

Prof. Dr. Júlio César Sá de Oliveira (Avaliador)  
UNIFAP

---

Profa. Dra. Silma Maria Alves de Melo (Avaliadora)  
Área de Assessoramento Técnico às Talassemias (ATT) /Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados/DAE/SAS/MS.

Macapá-AP, \_\_\_\_\_ de Junho de 2013.

*Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais Dilma e Manoel Castelo, pelo apoio incansável, por não permitirem minha desistência, por me protegerem mesmo quando estavam precisando de proteção, pela sabedoria contínua, por serem as melhores pessoas do mundo, fazendo o impossível pela minha felicidade.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus pela vida, proteção em todos os momentos, por proporcionar tudo de bom durante esta caminhada.*

*A minha família, sobrinhos e afilhados (Gianna, Guilhermy, Marina e Miguel), meus dois queridos irmãos (Alexandre, Adrian) e cunhadas que sempre me apoiaram, a minha Avó, meus tios, tias e primos (toda minha família) pelo carinho de sempre.*

*As pessoas com Doença falciforme do Amapá e seus familiares, exemplos de admiração e luta, pelo apoio de sempre, disposição e alegria contagiante.*

*A minha orientadora profa. Dra. Ártemis Rodrigues, pela competência, sabedoria, disposição, ensinamentos, paciência, incentivo, conselhos e pela amizade nos momentos que sempre precisei. Sou e serei eternamente grata por tudo.*

*A minha coorientadora profa. Dra. Claudia Bonini-Domingos (profissional e pessoa maravilhosa) pelo apoio constante, por todas as oportunidades, pela disponibilidade, confiança, dedicação, por todos os ensinamentos e sugestões. Sou e serei eternamente grata por tudo.*

*A Dra. Silma Alves de Melo por me apoiar de todas as formas desde a graduação, pelo incentivo, pela ajuda de sempre em todos os momentos. Sou e serei eternamente grata por tudo.*

*A médica hematologista do hemocentro do Amapá (Hemoap) Dra. Luciana Machado pelo auxílio na triagem dos pacientes e pelo incentivo de sempre.*

*Aos amigos do LHGDH/CEQ – São José do Rio Preto pelos ótimos ensinamentos, pela maravilhosa hospitalidade, amizade, incentivo, especialmente Jéssika Okumura que sempre esteve disposta a me ensinar, com ótimas sugestões, por me ajudar em tudo. Eternamente grata a todos.*

*A todos do Hemoap, ao Diretor Daniel Amanajás por ter permitido a realização da pesquisa dentro do hemocentro, a enfermeira e amiga Witânia pelo constante apoio, ao coordenador Geisi, as amigas e secretárias Lilian, Marta e Adriana por sempre estarem dispostas a ajudar com os pacientes, ao pessoal da recepção, a todos do laboratório pelo apoio na coleta das amostras de sangue, a biomédica Helen pelo armazenamento das amostras, a todos os amigos e colegas que conheci no hemocentro que sempre foram solícitos.*

*Aos amigos do Curso de Ciências da Saúde, Rafael Espíndola que ajudou na coleta das amostras, Arialdo, Deise, Débora, Mauricio, Milagros, Andrew que proporcionaram momentos de descontração e amizade, e a todos os colegas do curso.*

*Ao meu amigo irmão André Mendonça pelo apoio desde a graduação, pelas ajudas incansáveis com as traduções, por tudo, pela amizade linda. Sou eternamente grata.*

*A querida amiga Edilene dos Santos, pela paciência e ajuda no momento da coleta de dados, além do carinho ao nos receber em sua casa.*

*A todos os meus fiéis amigos que sempre me apoiaram e me deram força, Livia, Lia, Neide, Elaine, Ana Lúcia, Otília.*

*A todos da Coordenação de Política Nacional de Atenção Integral às pessoas com Doença Falciforme – Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados/Ministério Saúde pelo incentivo e apoio.*

*A secretaria do curso PPGCS, especialmente Léa pela atenção e dedicação.*

*Sou eternamente grata a todos que sempre me apoiaram direta e indiretamente.*

## RESUMO

A anemia falciforme (AF) ou Hb SS é a doença hereditária, hematológica, de caráter multifatorial, com alta prevalência mundial; sua causa é a mutação no sexto códon do gene da globina beta ( $\beta^s$ ), onde há diversos polimorfismos, dentre os quais existem cinco principais haplótipos do gene  $\beta^s$ : Árabe -Indiano/Saudi, Senegal, Benin, Bantu e Camarões; entre as características dos haplótipos  $\beta^s$  está a possibilidade de influenciar a variabilidade e intensidade clínica da AF, de tal forma, relacionados a estudos sobre a origem étnica da população. A partir da importância desses haplótipos e, até o momento quase não existirem estudos moleculares referentes à AF no Estado do Amapá, esta pesquisa objetivou determinar os haplótipos do gene da globina  $\beta^s$  presentes em pessoas com AF do Amapá. As amostras de sangue (n= 46) coletadas dos pacientes com Hb SS foram submetidas à triagem laboratorial de hemoglobinas (eletroforese em pH alcalino e ácido; HPLC), em seguida extração de DNA para a confirmação da HbSS e determinação de haplótipos por meio de PCR-RFLP, utilizando-se endonucleases de restrição: *Xmn I*, *Hind III*, *Hinc II*, *Hinf I* para análise de seis sítios polimórficos. Sendo as análises realizadas no LHGDH/IBILCE- UNESP/São José do Rio Preto- SP. De acordo com os alelos identificados, observou-se o predomínio do haplótipo Bantu (65,2%) seguido dos haplótipos Benin (21,8%) e Senegal (13%). Com relação aos genótipos, a maioria foi identificada como Bantu/Bantu (47,8%), posteriormente Bantu/Benin (21,7%), Bantu/Senegal (13,0%), Benin/Senegal (8,7%), Benin/Benin (6,5%) e com menor frequência Senegal/Senegal (2,2%). Observa-se que foram identificados três haplótipos característicos da etnia africana, com alta frequência de Senegal e Benin divergindo da maioria dos estudos brasileiros, estando de acordo com registros sobre migração Africana para região norte; nota-se ausência de Atípicos, ou seja, pouca variabilidade genética nos dados amapaenses, sugerindo a concentração e semi-isolamento de grupos fundadores com pouca miscigenação.

**Palavras - Chave:** Anemia Falciforme. Hemoglobina. Gene  $\beta^s$ . Haplótipos; Amapá.

## ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) or HbSS is a hereditary, hematologic, multifactorial disease, with high prevalence worldwide; its cause is a mutation in the sixth codon of the beta globin gene ( $\beta^S$ ), where there are several polymorphisms, among which there are five main haplotypes of the  $\beta^S$  gene: Arabic - Indian/Saudi, Senegal, Benin, Bantu and Cameroon; between the characteristics of  $\beta^S$  haplotypes there is the possibility of influencing the variability and clinical intensity of SCA, in such a way, related to studies on the ethnic origin of the population. From the importance of these haplotypes and yet there is almost no molecular studies concerning SCA in the State of Amapá, this research aimed to determine the haplotypes of the globin gene  $\beta^S$  present in people with SCA from Amapá. Blood samples (n=46) collected from patients with HbSS were submitted to laboratory screening of hemoglobins (electrophoresis in alkaline pH and acid; HPLC), then DNA extraction for the confirmation of HbSS and determination of haplotypes by PCR-RFLP, using restriction endonucleases (*Xmn I*, *Hind III*, *Hinc II* and *Hinf I*) for analysis of six polymorphic sites. All analyzes were performed at LHGDH/IBILCE - UNESP/São José do Rio Preto-SP. According to the alleles identified, it was observed that the predominance of Bantu haplotype (65.2%) followed by Benin (21.8%) and Senegal (13%) haplotypes. Regarding genotypes, the majority was identified as Bantu/Bantu (47.8%), Bantu/Benin (21.7%), Bantu/Senegal (13.0%), Benin/Senegal (8.7%), Benin/Benin (6.5%) and less frequently Senegal/Senegal (2.2%). It was observed that it were identified three haplotypes characteristic of African ethnicity, with high frequency of Senegal and Benin diverging from the majority of Brazilian studies, which is in agreement with reports on African migration to the northern region. It is noted the absence of atypical, which indicates low genetic variability in data from people who live in Amapá, suggesting concentration and semi-isolation of the founding groups with little mixing.

**Keywords:** Sickle cell anemia. Hemoglobin.  $\beta^S$  Gene. Haplotypes. Amapá.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 –	Estrutura do tetrâmero da molécula de hemoglobina (Subunidades $\alpha_1, \alpha_2/\beta_1, \beta_2$ com ligações ao grupo heme representados nas regiões G/H).	16
Figura 02 -	Representação esquemática da localização dos genes da globina.	18
Figura 03 -	Tipos de hemoglobina de acordo com seu principal período de produção e composição de cadeia globínica.	19
Figura 04 -	Herança Genética (probabilidade) do alelo da Hb S, conseqüentemente da anemia falciforme e traço falciforme.	23
Figura 05 -	Distribuição da Doença e Traço Falciforme em alguns Estados brasileiros.	24
Figura 06 -	Prevalência estimada do gene S no Brasil.	28
Figura 07 -	Processo de indução à falcização das hemácias pela polimerização da desoxiemoglobina diante da baixa concentração de oxigênio.	30
Figura 08 -	Principais haplótipos do complexo do gene $\beta S$ , definidos pela ação de enzimas de restrição (os Haplótipos).	37
Figura 09 -	Distribuição de haplótipos do gene $\beta S$ no continente Africano.	38
Figura 10 -	Principais portos africanos fornecedores de escravos para as cidades brasileiras.	39
Figura 11 -	Mapa do Estado do Amapá.	43
Figura 12 -	Cromatograma de pessoas com anemia falciforme do Amapá.	50
Figura 13 -	Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para Hb S.	53
Figura 14 -	Representação esquemática dos sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos.	54
Figura 15 -	Fotografia do gel de agarose 1,5% contendo produtos de PCR obtido com <i>primers</i> H0H1 (região $5'\gamma^G$ ).	56
Figura 16 -	Fotografia do gel de agarose 1,5% contendo produtos de PCR obtido com <i>primers</i> H2H3 (região $\gamma^G$ ).	57
Figura 17 -	Fotografia do gel de agarose 1,5% contendo produtos de PCR obtido com <i>primers</i> H3H4 (região $\gamma^A$ ).	58

Figura 18 -	Fotografia do gel de agarose 1,5% contendo produtos de PCR obtido com <i>primers</i> H5H6 (região $\psi\beta$ ).	<b>59</b>
Figura 19 -	Fotografia do gel de agarose 1,5% contendo produtos de PCR obtido com <i>primers</i> H7H8 (região $3'\psi\beta$ ).	<b>60</b>
Figura 20 -	Fotografia do gel de agarose 1,5% contendo produtos de PCR obtido com <i>primers</i> H3H4 (região $5'\beta$ ).	<b>62</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 01</b>	Características laboratoriais da Anemia Falciforme	<b>33</b>
<b>Quadro 02</b>	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de regiões da família $\beta$	<b>54</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01 -</b>	Proporção de nascidos vivos diagnosticados com doença falciforme de acordo com o programa de triagem neonatal.	<b>28</b>
<b>Tabela 02 -</b>	Distribuição das frequências (%) dos haplótipos CAR, Benin e Senegal em diversas populações do Brasil.	<b>40</b>
<b>Tabela 03 -</b>	Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.	<b>62</b>
<b>Tabela 04 -</b>	Descrição das características dos 46 indivíduos com anemia falciforme, conforme as variáveis sócio- epidemiológicas.	<b>64</b>
<b>Tabela 05 -</b>	Distribuição alélica dos haplótipos da globina $\beta^S$ identificados em indivíduos com AF do Estado do Amapá.	<b>65</b>
<b>Tabela 06 -</b>	Distribuição genotípica dos haplótipos $\beta^S$ em pacientes com anemia falciforme do Amapá.	<b>65</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
a.C	Antes de Cristo
AVE	Acidente Vascular Encefálico
Ben	Benin
C	Citosina
CAM	Camarões
CAR	República Centro Africana
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DNA	Ácido Desexiribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etinoadaminotetracético
et al.	E Outros
G	Guanina
GAG	Ácido Glutâmico
GTG	Valina
Haplótipos $\beta^s$	Haplótipos da globina Beta S
Hb	Hemoglobina
Hb A	Hemoglobina A
Hb AS	Heterozigose para hemoglobina S
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb S	Hemoglobina S
Hb SS	Homozigose para hemoglobina S
HDL	Lipoproteína de densidade alta
Hemoap	Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Amapá
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
IEF	Eletroforese por Focalização Isoelétrica
INCRA	Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária
KB	Quilobase; mil pares de base
LHGDH	Laboratório de Hemoglobinas e genética das Doenças Hematológicas
Pb	Pares De Base
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PCR – RFLP	Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
PHHF	Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal
PM	Peso Molecular
PN	Pós Nascimento
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PTN	Programa de Triagem Neonatal
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
RCG	Região Controladora de genes
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotação por Minuto
Saudi	Índia-Arábia Saudita
SEM	Senegal
STA	Síndrome Torácica Aguda

SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCTH alo	Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas Alogênico de Medula Óssea
TEB	Tris-EDTA-Borato
Tris	Tris (hidroximetil) Aminometano
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
UV	Ultravioleta
V	Volts

### LISTA DE UNIDADES

$\mu\text{L}$	Micro litro
g/dL	Gramas por Decilitros
mg/dL	Miligramas por Decilitros
mM	Mili Molar
ng/mL	Nanograma por Mililitros
$\mu\text{M}$	Micro Molar

### LISTA DE FÓRMULAS QUÍMICAS

HCl	Ácido Clorídrico
KCl	Cloreto de Potássio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de Sódio Dibásico Anidro
NaCl	Cloreto de Sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado

### LISTA DE SÍMBOLOS

$\zeta$	Gene Zeta
$\alpha$	Gene Alfa
$\epsilon$	Gene Épsilon
$\gamma\text{G}$	Gene Gama Glicina
$\gamma\text{A}$	Gene Gama Alanina
$\delta$	Gene Delta
$\beta$	Gene Beta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2 REFERÊNCIAL TEÓRICO</b>	<b>15</b>
2.1 ESTRUTURA E SÍNTESE DA HEMOGLOBINA HUMANA	15
2.2 HEMOGLOBINOPATIAS	20
2.3 HEMOGLOBINA S	21
2.4 TRAÇO FALCIFORME	22
2.5 ANEMIA FALCIFORME	25
2.6 EPIDEMIOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME	27
2.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME	29
2.8 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ANEMIA FALCIFORME	31
2.9 TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME	33
2.10 HAPLÓTIPOS DA MUTAÇÃO DO GENE $\beta^S$	35
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>43</b>
4.1 TIPO DE ESTUDO	43
4.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ÁREA DE ESTUDO	43
4.3 LOCAL DO ESTUDO	44
4.4 PERÍODO DO ESTUDO	44
4.5 POPULAÇÃO DO ESTUDO	45
4.6 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO	45
4.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	45
4.7 MÉTODOS	45
4.7.1 Obtenção das amostras de sangue	45
4.7.2 Análises laboratoriais	46
4.7.3 Perfil hemoglobínico dos pacientes	46
4.7.4 Análise Molecular	50
4.8 ANÁLISE E PROCESSAMENTO DOS RESULTADOS	63
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>64</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>66</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>70</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	<b>71</b>

**APENDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**APENDICE B – CARTA DE AUTORIZAÇÃO DO INSTITUTO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO ESTADO DO AMAPÁ (HEMOAP)**

**ANEXO A – CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA**

## 1 INTRODUÇÃO

A população brasileira caracteriza-se por apresentar ampla heterogeneidade genética, logo, a distribuição das hemoglobinas variantes está intimamente relacionada às etnias que a compõem, ou seja, é decorrente da elevada miscigenação. Desde a descoberta das hemoglobinas variantes, grandes progressos foram surgindo, e por meio destes, pôde-se confirmar a importância das hemoglobinopatias como problema de relevância médica; um dos mais importantes progressos foi a criação de um novo campo de estudo das ciências, a Biologia Molecular, possibilitando desvendar a natureza genética de inúmeras doenças, dentre elas, a doença falciforme, considerada a doença hematológica e hereditária de maior prevalência do mundo (NAOUM, 1997; GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

A causa da doença falciforme é a mutação no gene que produz a hemoglobina A, (Hb A) originando uma alterada, denominada hemoglobina S (Hb S) (a letra S deriva da palavra inglesa *sickle*, que em português traduz-se como foice), sendo herança de caráter autossômico recessivo. Além da Hb S existem outras hemoglobinas (C, D, E etc.) que em par com a S constituem o grupo denominado doença falciforme: anemia falciforme (Hb SS), S/Beta Talassemia (S/ $\beta$  Tal.), SC, SD, SE e outras mais raras (ANVISA, 2002).

Entre as doenças falciformes, a de maior significado clínico é a anemia falciforme ou homozigose para hemoglobina S (Hb SS), doença hereditária monogênica mais comum do Brasil, sua causa é mutação de ponto (GAG  $\rightarrow$  GTG) no gene da globina beta, originando a Hb S. Esta doença destaca-se por sua variabilidade clínica e hematológica que ocorre a partir do primeiro ano e estende-se por toda vida; enquanto alguns pacientes têm quadro de elevada gravidade e estão sujeitos a inúmeras complicações e frequentes hospitalizações, outros apresentam evolução mais branda (ANVISA, 2002; BRASIL, 2009; LOUREIRO, 2006).

Os haplótipos da região dos genes da globina  $\beta^S$  possuem papel importante na determinação da gravidade da doença, pois influenciam nos níveis hemoglobina Fetal (Hb F); são caracterizados por sequências de bases nitrogenadas que compõe o ácido desoxirribonucleico (DNA) do grupamento de genes (*cluster*) que sintetizam as proteínas, e sua determinação se faz por meio de técnicas de Biologia Molecular, utilizando-se variedade de enzimas de restrição que se diferenciam pela especificidade em fragmentar o DNA conforme sequência de bases nitrogenadas reconhecida. Assim, com a utilização de técnicas de Biologia Molecular no estudo da anemia falciforme, tornou-se possível conhecer cinco haplótipos de Hb SS, denominados conforme a origem de sua procedência geográfica: Asiático (ou Indiano-Asiático), Senegal, Benin, Bantu ou CAR, e Camarões. A partir da

identificação de haplótipos obtiveram-se embasamentos para admitir que a origem da Hb S foi de caráter multirregional (NAOUM, 1997; NAOUM, 2000).

Os haplótipos são relevantes tanto para o esclarecimento da diversidade clínica da anemia falciforme, quanto para os estudos sobre a origem étnica da população. Assim, o haplótipo Senegal, raro no Brasil, está associado a níveis elevados de hemoglobina fetal (Hb F), enquanto o haplótipo Árabe-Indiano, que quase não ocorre no Brasil, tem os níveis mais elevados de Hb F e corresponde à forma mais benigna de anemia falciforme. Portanto, a partir do exposto, observa-se que a gravidade e a evolução clínica da anemia falciforme no Brasil, podem ser divergentes quando comparadas a outros países (ANVISA, 2002; PINTO; ZAGO, 2007).

Rever os aspectos moleculares da hemoglobinopatia SS possibilita melhor compreensão do surgimento da mutação do gene  $\beta^s$  no mundo, das alterações estruturais e funcionais nos eritrócitos, bem como entendimento mais profundo dos aspectos clínicos envolvidos no curso da evolução heterogênea da doença (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003). De acordo com a importância dos haplótipos, busca-se determinar a frequência destes no estado do Amapá, contribuindo principalmente com estudos relacionados à origem étnica da população amapaense.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

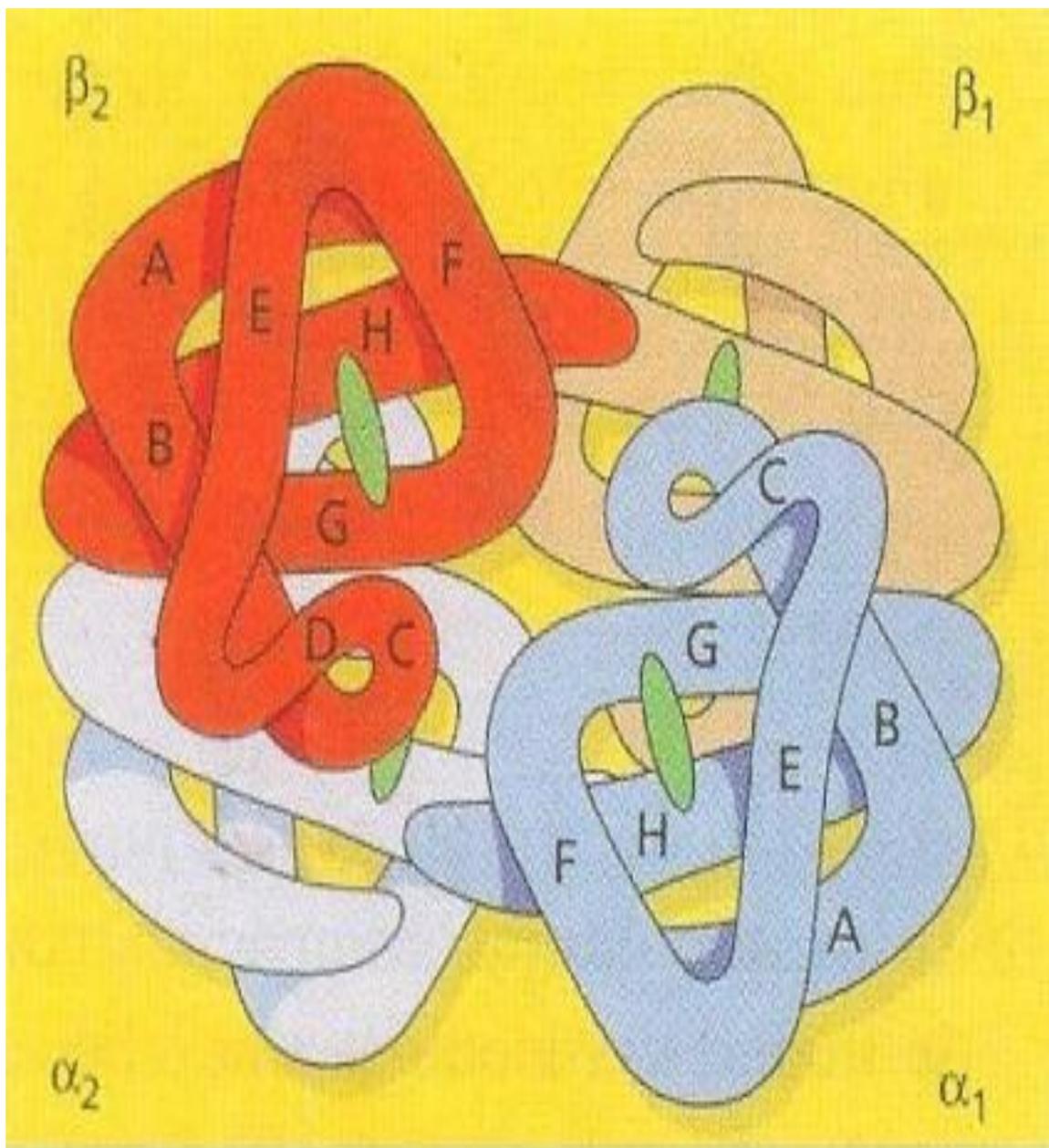
### **2.1 ESTRUTURA E SÍNTESE DA HEMOGLOBINA HUMANA**

As hemácias ou eritrócitos são normalmente células arredondadas, flexíveis, vivem em média 120 dias e devido sua conformação passam facilmente por todo o sistema sanguíneo. Dentro destas células, há um pigmento denominado hemoglobina, que dá cor vermelha ao sangue, e sua principal função é o transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos, sendo que adicionalmente, participa também do transporte de gás carbônico, mas, no sentido inverso. Os três principais componentes presentes nos eritrócitos são: a membrana, a hemoglobina, e a interação de fatores metabólicos que permitem modular o transporte de oxigênio, manter a constância do ambiente osmótico da célula, e proteger a hemoglobina do estresse oxidativo induzido por radicais livres (BONINI-DOMINGOS, 2006; KIKUCHI, 2007; NAOUM, 1997; PROVAN; WEATHERALL, 2000).

A hemoglobina humana, um dos principais componentes dos eritrócitos, é uma proteína de estrutura globular oligomérica, com peso molecular de aproximadamente 64.500 daltons, sendo formada quimicamente pela conjugação do grupo heme a quatro cadeias

polipeptídicas, nos quais os átomos de ferro estão no estado ferroso. Portanto, estruturalmente é constituída por dois pares de cadeias de globina do tipo alfa e beta que totalizam 574 aminoácidos, compondo um tetrâmero; cadeias globínicas alfa são formadas por 141 aminoácidos cada, e 146 aminoácidos compõe cada globina do tipo beta (Figura 1) (BONINI-DOMINGOS, 2006; GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003; MOTTA, 2003; NAOUM, 1997, 2012).

**Figura 1** – Estrutura do tetrâmero da molécula de hemoglobina (Subunidades  $\alpha_1, \alpha_2/\beta_1, \beta_2$  com ligações ao grupo heme representados nas regiões G/H)



**Fonte:** NAOUM, 2012.

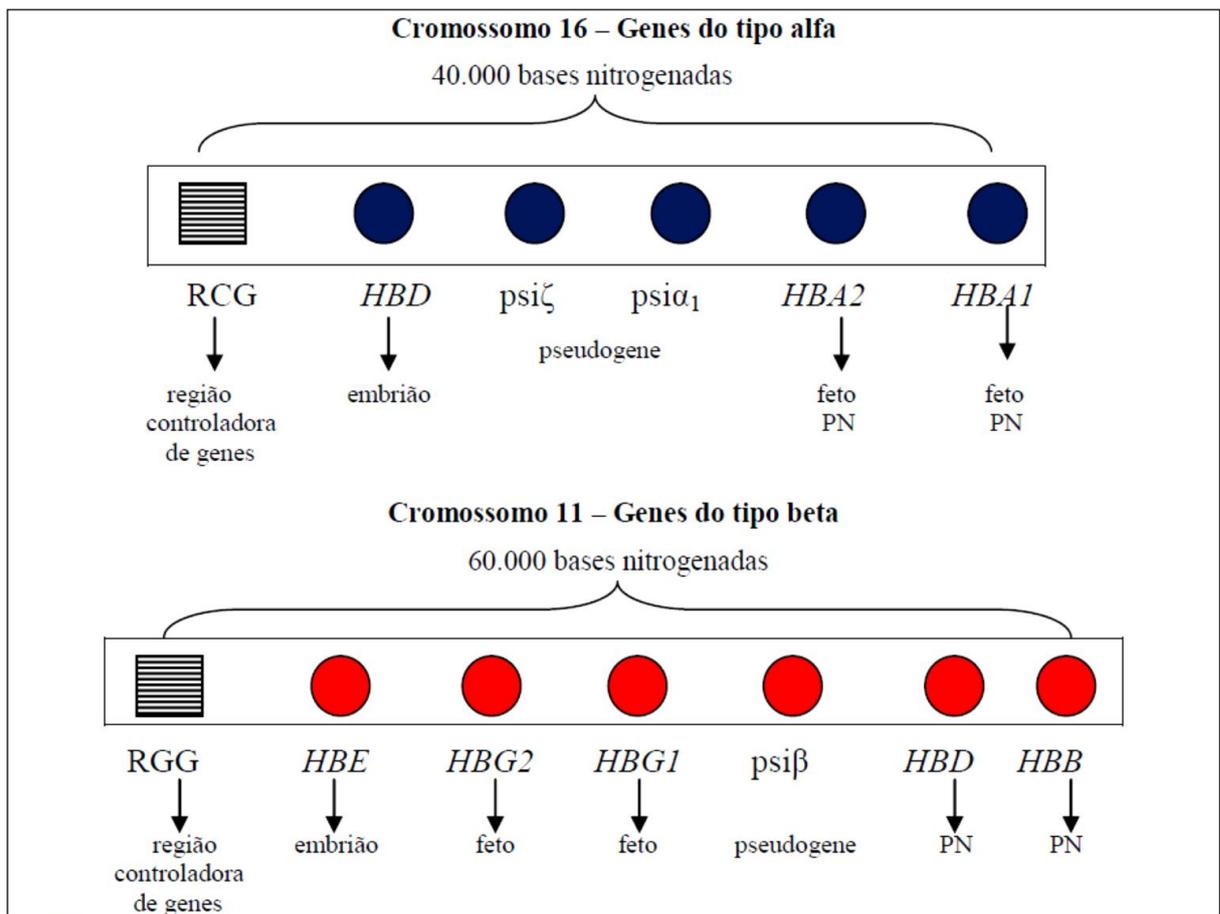
Devido às sínteses multigênicas, as cadeias globínicas dos tipos alfa e beta são agrupadas conforme suas similaridades genéticas e estruturais. A multigenicidade das cadeias do tipo alfa deve-se a presença de genes específicos (RCG –  $\zeta$  –  $\psi\zeta$  –  $\psi\alpha_1$  –  $\alpha_2$  –  $\alpha_1$ ) que produzem globina alfa ( $\alpha$ ) e globina zeta ( $\zeta$ ), todos, presentes no braço curto do cromossomo 16 em uma região de aproximadamente 40.000 pares de base (40kb); os principais genes da globina alfa são denominados alfa 1 (*HBA1*) e alfa 2 (*HBA2*), atuando durante toda a vida do indivíduo, seu ritmo normal de síntese é bastante elevado, uma vez que participam da composição de quase todas as hemoglobinas, enquanto os genes da globina zeta – genes zeta (*HBZ*) - atuam somente na fase embrionária (BONINI-DOMINGOS, 2006; NAOUM, 1997, 2012; PROVAN; WEATHERALL, 2000).

As cadeias de globina beta são sintetizadas por genes unitários (RCG –  $\varepsilon$  -  $\gamma^G$  -  $\gamma^A$  –  $\psi\beta$  -  $\delta$  -  $\beta$ ) exclusivos para globinas beta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ), gama ( $\gamma$ ) e épsilon ( $\varepsilon$ ), sendo localizados no braço curto do cromossomo 11 em uma região de aproximadamente 60kb. Os genes da globina épsilon, genes épsilon (*HBE*), são expressos na fase embrionária, enquanto os genes gama - alanina (*HBG1*) e gama - glicina (*HBG2*) são característicos do período fetal, sendo genes beta (*HBB*) e delta (*HBD*) atuantes a partir de uma fase do período fetal e expressos em toda plenitude no período pós-nascimento (PN), a partir do sexto mês de vida (BONINI-DOMINGOS, 2006; NAOUM, 1997, 2012).

Observa-se que há sequência lógica em ambos os agrupamentos, iniciando com um gene reconhecido por RCG (Região Controladora de Genes), há genes embrionários (*HBZ*; *HBE*), genes fetais (*HBG1*, *HBG2*) e genes pós-nascimento (*HBA1*, *HBA2* e *HBD*, *HBB*). Sendo as sínteses de globinas alfa e beta simultâneas e concomitantes ao grupo heme (NAOUM, 2012) (Figura 2).

De acordo com Bonini-Domingos (2006); Naoum (2012), cada gene da globina humana possui três éxons (sequências que codificam a globina) e duas sequências não codificadoras denominadas íntrons, sendo transcritos nas células eritróides. Assim, semelhante ao que acontece em outras proteínas, após a duplicação da molécula de DNA incide a tradução das sequências de bases nitrogenadas do DNA de cada gene da globina, sendo esta tradução executada pelo transcrito primário ou ácido ribonucléico heterogêneo - RNA heterogêneo - (regiões codificadoras e não codificadoras), que é modificado em suas extremidades 5' e 3' até chegar à forma original de RNA mensageiro (RNAm) funcional ou específico que possibilitará a tradução da proteína, conseqüentemente a síntese de globina alfa, beta, gama ou delta, etc.

**Figura 2** - Representação esquemática da localização dos genes da globina



PN= Pós-nascimento.

**Fonte:** NAOUM, 2012.

Após à tradução gênica diversas proteínas sofrem modificações. Cadeias polipeptídicas, produtos primários da tradução, são dobradas e associadas em estrutura tridimensional específica determinada pela própria sequência de aminoácidos. Assim, duas ou mais cadeias polipeptídicas, produtos do mesmo gene ou de genes diferentes, podem se combinar para formar um único complexo proteico final, ou seja, duas cadeias de alfa-globina e duas cadeias de beta-globina associam-se de modo não covalente para formar a molécula tetramétrica de hemoglobina  $\alpha_2\beta_2$  ou hemoglobina A (Hb A) que prevalece durante toda vida após sua estabilização a partir do sexto mês pós-nascimento (THOMPSON et al., 2002).

As sínteses de hemoglobinas são, portanto, determinadas por processo complexo de regulação, específicas dos tecidos eritróides e modificam-se ao longo do desenvolvimento ontogenético do indivíduo e também durante o processo de maturação eritrocitária. A molécula de hemoglobina é desta forma, um tetrâmero de cadeias de globina formado por cadeias do tipo alfa e beta, diferenciando-se entre si pelas características físico-químicas e

mobilidades eletroforéticas distintas, suas funções são marcantes desde os primeiros dias de gestação, até estabilizarem-se por volta do sexto mês pós-nascimento. Assim, as combinações entre as cadeias globínicas determinam os seis tipos de hemoglobinas humanas produzidas nas fases de desenvolvimento, sendo caracterizadas como: embrionária, fetal e pós-nascimento (BONINI-DOMINGOS, 2006; NAOUM, 1997).

Na fase embrionária, genes ativos presentes nos eritroblastos promovem a produção da cadeia zeta que combinada à cadeia épsilon formam a primeira hemoglobina, *Gower-1* ( $\xi_2\varepsilon_2$ ), predominando somente nas quatro semanas iniciais. Perto da décima segunda semana, esta mesma cadeia zeta combinada a cadeia gama formam a hemoglobina *Portland* ( $\xi_2\gamma_2$ ), quando ocorre a produção das cadeias alfa, estas juntam-se a cadeia épsilon e formam a hemoglobina *Gower-2* ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ). Neste período também se inicia a síntese de hemoglobina fetal (Hb F) ( $\alpha_2\gamma_2$ ), substituindo gradativamente as hemoglobinas embrionárias, atingindo a sua plenitude por volta do terceiro mês de gestação. A Hb A começa a ser sintetizada a partir da décima semana, com níveis inferiores a 10% na trigésima semana, sendo que logo após o nascimento, a Hb F e Hb A apresentam concentrações próximas de 80% e 20% respectivamente, as sínteses invertem-se rapidamente até estabilizarem-se, em média no sexto mês de vida pós-nascimento. A Hb A<sub>2</sub> tem síntese iniciada no final do período fetal, e também estabiliza no sexto mês de vida. De forma geral, as hemoglobinas sintetizadas pós-nascimento representam-se assim: Hb A (alfa<sub>2</sub>beta<sub>2</sub>), Hb A<sub>2</sub> (alfa<sub>2</sub>delta<sub>2</sub>) e Hb F (alfa<sub>2</sub>gama<sub>2</sub>), conforme a composição de suas cadeias (Figura 3) (BONINI-DOMINGOS, 2006; GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

**Figura 3** - Tipos de hemoglobina de acordo com seu principal período de produção e composição de cadeia globínica

Tipo de hemoglobina	Período preponderante de síntese	Cadeias globínicas
Gower-1	Embrião/até 3º mês de gestação	$\xi_2\varepsilon_2$
Portland	Embrião/até 3º mês de gestação	$\xi_2\gamma_2$
Gower-2	Embrião/até 3º mês de gestação	$\alpha_2\varepsilon_2$
Hb Fetal	Feto/até 6º mês de vida	$\alpha_2\gamma_2$
HbA <sub>2</sub>	Feto/vida adulta	$\alpha_2\delta_2$
HbA	Vida adulta	$\alpha_2\beta_2$

**Fonte:** GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003.

A hemoglobina humana, portanto, foi uma das primeiras estruturas proteicas a serem deduzidas; grandes progressos, especialmente a introdução das técnicas de Biologia

Molecular, contribuíram para confirmar sua importância dentro das áreas médicas, genéticas e bioquímicas, assim, a partir destes progressos, tornou-se evidente que as sínteses das hemoglobinas sofrem constantes processos de diferenciações no sentido de se adaptarem a cada fase do desenvolvimento, possibilitando também verificar que milhões de pessoas em todo mundo carregam em seu patrimônio genético hemoglobinas variantes em diversas combinações, com consequências que variam das quase imperceptíveis a letais. Deste modo, as globinas elucidaram processos de evolução tanto no nível molecular quanto no nível populacional, fornecendo um modelo de ação gênica durante o desenvolvimento humano (BONINI-DOMINGOS, 2006; NAOUM, 1997; THOMPSON et al., 2002).

## 2.2 HEMOGLOBINOPATIAS

Conforme exposto anteriormente, para desenvolver uma proteína biologicamente ativa, a informação deve ser transcrita de uma sequência de nucleotídeos do gene para o RNAm e então traduzida em polipeptídeo que sofre estágios progressivos de maturação; mudanças em algumas destas etapas decorrentes de alterações no gene estrutural, podem resultar em mutações com capacidade ou não de alterar a função de uma proteína. Desta forma, nas hemoglobinas humanas, as alterações gênicas envolvem a síntese estrutural e quantitativa dos aminoácidos que compõem as diferentes cadeias de globinas. Assim, quando determinado gene apresenta uma de suas bases nitrogenadas substituída por outra diferente, resulta na formação de moléculas de hemoglobinas com características bioquímicas alteradas em relação às hemoglobinas normais (NAOUM, 1997; THOMPSON et al., 2002).

Portanto, hemoglobinopatias são anemias hemolíticas causadas principalmente por defeitos genéticos que acarretam alterações estruturais (qualitativas), ou seja, na sequência de aminoácidos de um subtipo específico de cadeia globínica. As mais comuns e de importância clínica são: Hb S, Hb C e Hb D. Existem também defeitos genéticos que provocam alterações quantitativas na produção de cadeias globínicas, correspondendo um grupo heterogêneo de anemias hereditárias caracterizadas por diminuição (total, parcial) na síntese de uma ou mais cadeias globínicas, sendo denominadas principalmente de talassemias; por expressarem fenótipos talassêmicos estão descritas junto a este grupo: Hb E, Hb Lepore e Hb Constant Spring. Outra alteração importante é a persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF) decorrente da não desativação do gene da cadeia gama após o sexto mês de vida, levando ao aumento de Hb F (OLIVEIRA, 2007).

Assim, as hemoglobinas variantes, aproximadamente 1100 tipos diferentes, são aquelas que apresentam estrutura diferente à sua hemoglobina normal correspondente (A, A<sub>2</sub>

ou F), bem como, há também grupos de hemoglobinas com alterações quantitativas. Algumas hemoglobinas alteradas podem causar anemia hemolítica, policitemia, cianose ou falcização; outras não apresentam alterações fisiopatológicas importantes. Logo, hemoglobinas variantes e talassemias são classificadas como hemoglobinas anormais hereditárias. (ANAGNOU et al., 2013; BONINI – DOMINGOS, 2006; NAOUM, 2012).

### 2.3 HEMOGLOBINA S

O período exato do aparecimento da mutação beta-S não é preciso, mas, estudos antropológicos associados às análises biomoleculares sugerem que o gene da globina  $\beta^S$  possa ter surgido entre 50 e 100 mil anos antes de Cristo, abrangendo os períodos Paleolíticos e Mesolíticos nas regiões centro-oeste da África, Índia e leste da Ásia; mudanças nas condições climáticas e de conversão destas áreas para um deserto provocaram a migração de pessoas que poderiam ter levado o gene para a Índia, Leste da Arábia Saudita e para o sul da África Equatorial, sendo que essa hipótese foi apoiada por citar a distribuição de determinadas práticas agrícolas e as evidências antropológicas. Mas, a partir de pesquisas realizadas em populações africanas pôde-se sugerir que a expansão do gene da Hb S deu-se efetivamente no período pré-Neolítico entre 10 e 2 mil anos a.C. (DESAI; DHANANI, 2004; NAOUM, 1997).

A Hb S é das hemoglobinas variantes com maior frequência mundial. Nos países da América do Sul que apresentam elevada miscigenação, como Venezuela, Colômbia, a prevalência do gene é elevada. No Brasil a distribuição do gene S é heterogênea, devido aos diferentes processos de miscigenação nas regiões. A prevalência de heterozigotos para a Hb S é maior nas regiões norte e nordeste (6% a 10%), enquanto nas regiões sul e sudeste a prevalência é menor (2% a 3%). Portanto, é evidente que cada região do Brasil merece um estudo genético-epidemiológico específico sobre a HB S. Sendo importante ressaltar, que vários fatores, como a imigração interna e externa; a diminuição das taxas de casamentos consanguíneos, pela dissolução das comunidades rurais e dos isolados, em decorrência do processo de urbanização; o aumento da miscigenação, pelas facilidades de locomoção e comunicação, que propiciaram maior contato entre pessoas de origem diversa, etc, tornou o problema da Hb S extremamente dinâmico (CANÇADO; JESUS, 2007; GIRALDI et al., 2008; NAOUM, 2000).

O fato que motivou a mutação do gene da Hb A para originar Hb S ainda permanece desconhecido. Porém, sabe-se que no gene da globina beta S há substituição de uma base nitrogenada do códon normal do DNA (GAG para GTG), ou seja, há troca da base nitrogenada adenina por timina, portanto, substituição do sexto aminoácido presente na

globina beta (ácido glutâmico - GAG) por outro aminoácido (valina - GTG) (HBB: c.20A>T, beta 6 (A3) Glu>Val). O ácido glutâmico tem sua cadeia lateral (grupo R) carregada negativamente, com ponto isoelétrico (pI) de 2,77. A valina tem seu pI de 5,97, classificada como aminoácido sem cargas, ou neutro, assim, essa troca de aminoácidos envolvendo a saída de um com carga negativa (ácido glutâmico) e a entrada de outro sem carga elétrica (valina) resulta na perda de cargas negativas da Hb S, causando mobilidade eletroforética lenta da Hb S, com conseqüente modificação físico-química da molécula de hemoglobina (FARIAS et al., 2005; FERRAZ; MURAO, 2007; NAOUM, 2000; STEINBERG, 2005).

Portanto, a hemoglobina S possui propriedades físico-químicas divergentes da Hb A, a troca de aminoácidos que resulta esta hemoglobina, modifica estruturalmente a molécula, pois, se na Hb A o ácido glutâmico resulta no afastamento das moléculas de hemoglobinas desoxigenadas, a entrada da valina favorece a polimerização sob condições de baixo teor de oxigênio, pois, no estado desoxigenado a Hb S torna-se esticada ou “tensa” e as globinas beta S ficam mais próximas, formando número considerável de moléculas agregadas que gera longos polímeros, modificando a morfologia do eritrócito para forma “afoiçada”, alterando a viscosidade da solução (estado sólido e insolúvel) e formando cristais de Hb S, (tactóides) (NAOUM, 1997; GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Assim, em condições de baixa concentração de oxigênio ou desoxigenada a Hb S sofre interações hidrofóbicas, comprometendo a solubilidade e acarretando na formação de fibras de polímeros que torcem a membrana do eritrócito, conferindo-lhe forma de foice, que em níveis elevados causam dano celular irreversível, caracterizando-se clinicamente pelo surgimento dos sinais e sintomas da doença falciforme. As características clínicas só podem ser percebidas a partir dos sexto mês de vida, quando a síntese da globina gama é interrompida, e o gene beta sintetiza em sua plenitude globinas beta (GRISOLIA et al., 2006; NAOUM, 2000).

#### 2.4 TRAÇO FALCIFORME

A maioria da população é geneticamente Hb AA, recebendo genes de seus pais para síntese de hemoglobina. Na anemia falciforme, geralmente os pais são portadores de um único gene alterado (heterozigotos), com probabilidade de 25% a cada gestação gerarem filhos com a doença, ou seja, possuem gene que produz Hb A e gene que determina Hb S, portanto, são pessoas geneticamente Hb AS ou pessoas com traço falciforme capazes de passar o gene alterado para a criança, que poderá recebê-lo em dose dupla (homozigoto SS) (Figura 4). O traço falciforme é condição genética encontrada no Brasil com frequência que varia de 1% a

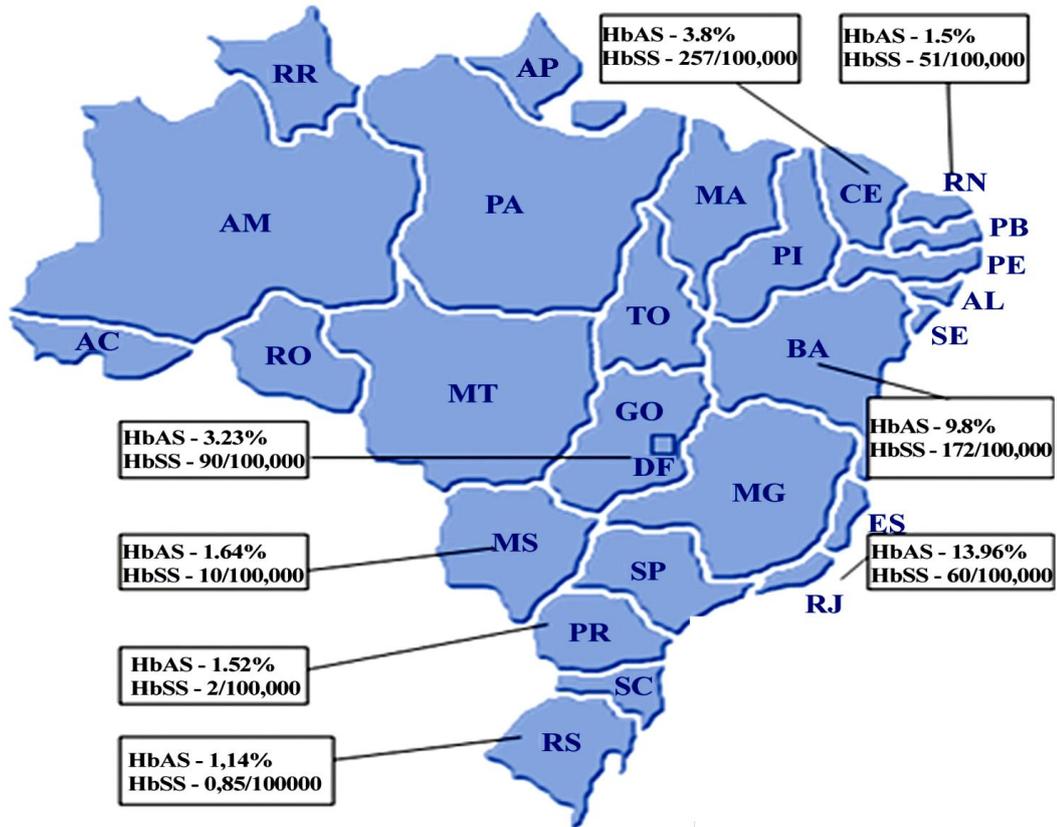
13% (Figura 5), logo, pela alta frequência do gene Hb AS é comum à união dessas pessoas (ANVISA, 2002; BALDIN et al., 2011; COELHO; GUIMARÃES, 2010).

**Figura 4** - Herança Genética (probabilidade) do alelo da Hb S, conseqüentemente da anemia falciforme e traço falciforme.

<b>AS / AS</b>	<b>A</b>	<b>S</b>
<b>A</b>	<b>AA</b>	<b>AS</b>
<b>S</b>	<b>AS</b>	<b>SS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25% Saudável (AA)</li> <li>• 50% de Traço Falciforme (AS)</li> <li>• 25% de Anemia Falciforme (SS)</li> </ul>		
<p><b>AA + SS = 100% Traço Falciforme (AS)</b>  <b>50% Traço Falciforme (AS)</b></p> <p><b>AS + SS =</b>  <b>50% Anemia Falciforme (SS)</b></p> <p><b>SS + SS = 100% Anemia Falciforme (SS)</b>  <b>50% Sem alterações (AA)</b></p> <p><b>AS + AA =</b>  <b>50% Traço Falciforme (AS)</b>  <b>25% Sem alterações (AA)</b></p> <p><b>AS + AS = 50% Traço Falciforme (AS)</b>  <b>25% Anemia Falciforme (SS)</b></p>		

Fonte: GARANITO, 2008.

**Figura 5** - Distribuição da Doença e Traço Falciforme em alguns Estados brasileiros



#### ESTADOS

Acre - AC	Paraná - PR
Alagoas - AL	Pernambuco - PE
Amapá - AP	Piauí - PI
Amazonas - AM	Rio de Janeiro - RJ
Bahia - BA	Rio Grande do Norte - RN
Ceará - CE	Rio Grande do Sul - RS
Goiás - GO	Rondônia - RO
Espírito Santo - ES	Roraima - RR
Maranhão - MA	São Paulo - SP
Mato Grosso - MT	Santa Catarina - SC
Mato Grosso do Sul - MS	Sergipe - SE
Minas Gerais - MG	Tocantins - TO
Pará - PA	Distrito Federal - DF

O diagnóstico do traço falciforme é estabelecido pela detecção da Hb S em heterozigose com Hb A, por meio de técnicas de eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino ou pH ácido, seguida do teste de falcização (pesquisa de drepanócitos), de solubilidade para confirmar se a fração observada na eletroforese é ou não a hemoglobina S. As eletroforeses em ágar citrato e pH ácido permitem diferenciar a hemoglobina S da D além de acusar com maior precisão a presença da Hb F, entretanto, nos últimos anos os procedimentos de eletroforese por focalização isoeletrica (IEF) ou cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) vêm substituindo os métodos anteriores e são procedimentos de escolha para o diagnóstico. Apesar do objetivo dos programas de triagem neonatal (PTN) para hemoglobinopatias ser a busca dos doentes, os métodos laboratoriais de triagem neonatal permitem também detectar pessoas com traço, que constituem parcela significativa da população, sendo, portanto, útil para avaliar a prevalência do traço falciforme e anemia falciforme no Brasil (BALDIN et al., 2011; FERRAZ; MURAO, 2007; NAOUM, 1997).

No Brasil, os programas de triagem neonatal, bem como, a captação de pessoas com traço falciforme encontram-se principalmente nos centros de referência para doação de sangue (COELHO; GUIMARÃES, 2010). Pessoas com traço falciforme apresentam concentrações de Hb S que variam entre 22 – 45%, caracterizando-se como condição benigna por possuírem manifestações clínicas raras, sendo estas observadas em condições incomuns que resultam de complicações relacionadas à polimerização da desoxi- hemoglobina S, tais como processos patológicos que causam hipóxia, acidose, desidratação intensa, hiperosmolalidade e hipotermia (ITANO et al., 1951; JOHN KARK, 2000).

## 2.5 ANEMIA FALCIFORME

Geneticamente determinada pela homozigose da Hb S (Hb SS), a anemia falciforme, além de ser a forma mais prevalente entre as doenças falciformes é, em geral, a que apresenta maior gravidade clínica e hematológica. Esta patologia caracteriza-se por complicações que podem afetar quase todos os órgãos e sistemas do organismo, o sofrimento causado pela doença e seus impactos levam o seu portador a sentir-se prejudicado em muitos aspectos de sua vida (ARAÚJO, 2007; NAOUM, 2000; PITALUGA, 2006).

No Brasil, caracteriza-se como importante problema de saúde pública, sobretudo por ser a doença hereditária e hematológica de maior prevalência, e comprometer por múltiplos fatores a qualidade de vida de seus portadores, configurando-se como doença crônica de caráter multidisciplinar. Assim, a Biologia Molecular explica a anemia falciforme como uma mutação no gene que produz a Hb A, fazendo as células parecerem em forma de foice; a

medicina clínica se debruça sobre as várias manifestações e conseqüências desse “afoçamento” das células, bem como sobre os tratamentos mais adequados e, a ciência genética define como herança mendeliana associada a uma mutação específica, autossômica recessiva (COELHO; GUIMARÃES, 2010; FRY, 2005).

Do ponto de vista histórico, a anemia falciforme é do conhecimento da humanidade desde os tempos imemoriais, constatada como secular na África pelo hábito que tinham diversas tribos do continente de tatuar os pacientes para identificar a doença e proibir o casamento com membros sadios do grupo (BRASIL, 2009; FARIAS et al., 2005; NAOUM, 1997; RUIZ, 2007).

No ano de 1910, James B. Herrick realizou nos Estados Unidos a primeira identificação científica da anemia falciforme, assim, com auxílio da microscopia, registrou observações realizadas a cerca do esfregaço sanguíneo de um estudante negro proveniente da América Central (Caribe). Desde então, a doença passou a ser associada ao corpo negro, a tal ponto que entre as décadas de 1920 e 1940 a doença serviu como uma espécie de marcador definidor de quem seria ou não negro, entretanto, após a descoberta da lógica mendeliana da transmissão da doença em 1949, conjecturou-se que o discurso sobre a relação entre “raça” e anemia falciforme perdesse a sua força (BUSTAMANTE et al., 2010; FRY, 2005).

Posterior à primeira identificação científica, no ano de 1917, o anatomista Emmel observou em um terceiro caso semelhante ao relatado em 1910, a transformação da hemácia na sua forma original bicôncava para a forma de foice, *in vitro*, cogitando-se a possibilidade dessa doença ser de origem hereditária pelo fato de se encontrar eritrócitos com idênticas deformações no sangue dos pais do paciente. Em 1927, Hanh e Gillespie descobriram que a falcização dos eritrócitos ocorria como consequência da exposição das células a baixa tensão de oxigênio, e em 1947, no Brasil, Accioly sugeriu que a falcização ocorria como resultado de herança autossômica dominante, e somente em 1949, através dos trabalhos de Neel e Beet, a doença foi definida apenas em estado de homozigose (Hb SS), sendo os heterozigotos (Hb AS) assintomáticos (FIGUEIREDO, 1993 apud GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003; NAOUM, 1997).

Portanto, a partir dos relatos científicos, confirmou-se que a anemia falciforme originou-se na África e foi trazida às Américas pela imigração forçada dos escravos, deste modo, a grande maioria com esta doença, no Brasil, têm sua origem proveniente de descendentes africanos, sendo que sua distribuição na população brasileira ocorreu heterogeneamente, com elevada frequência onde à proporção de antepassados africanos é

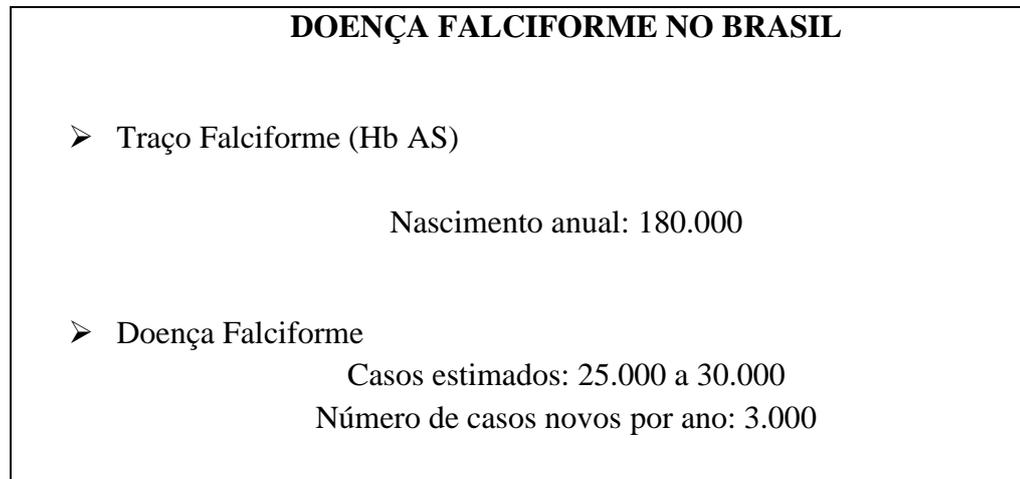
maior, todavia, além da África e Américas, é também encontrada em toda a Europa e em grandes regiões da Ásia (ANVISA, 2002, NAOUM, 2000).

Assim, se por um lado, é verdade que a anemia e o traço falciforme apresentam maior prevalência entre negros no Brasil, constituindo-se como relevante problema de saúde pública, logo, não é correto afirmar que esta é uma doença exclusiva deste grupo, certo de que a população brasileira apresenta elevada miscigenação e, como já discutido anteriormente, a distribuição da doença ocorreu de modo heterogêneo, portanto, determina-se que esta seja uma doença capaz atingir negros, brancos e pardos. (DINIZ; GUEDES, 2003).

## 2. 6 EPIDEMIOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme é a hemoglobinopatia que apresenta a maior prevalência, configurando-se como doença genética de grande destaque no cenário epidemiológico. É evidente o impacto das anemias hereditárias no crescimento e desenvolvimento das crianças e adolescentes homocigotos e, como a população brasileira se caracteriza pela miscigenação étnica, com distribuição diversificada nas várias regiões geográficas do país, isto torna esta população única sob o ponto de vista antropológico, logo, os distúrbios das hemoglobinas apresentam diferenciada prevalência, variando de região para região no Brasil (COELHO; GUIMARÃES, 2010; CANÇADO; JESUS, 2007; SILVA; YAMAGUCHI, 2007; STEINBERG, 2009).

Assim, verifica-se que a distribuição do gene  $\beta S$  é bastante heterogênea no Brasil. Com base nos dados do programa nacional de triagem neonatal (PNTN), estima-se a existência de 25.000 a 30.000 pessoas com doença falciforme no Brasil, e o surgimento de 3.000 novos casos anualmente, por conseguinte, fundamentando-se nestes dados, pode-se afirmar que as doenças falciformes são problemas de saúde pública no Brasil (Figura 6; Tabela 1) (BRASIL, 2008; MANFREDINI; ZANATTA, 2009).

**Figura 6** - Prevalência estimada do gene S no Brasil

**Fonte:** BRASIL, 2008.

**Tabela1-** Proporção de nascidos vivos diagnosticados com doença falciforme de acordo com o programa de triagem neonatal

Estados	Proporção/ Nascidos Vivos
Bahia	1:650
Rio de Janeiro	1:1.200
Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais e Goiás	1:1.400
Espírito Santo	1:1.800
São Paulo	1:4.000
Mato Grosso do Sul	1:5.850
Rio Grande do Sul	1:11.000
Santa Catarina e Paraná	1:13.500

**Fonte:** ÂNGULO et al., 2010.

Afetando parcela significativa da população brasileira, a anemia falciforme ocorre também em populações não afrodescendentes, caracterizando-se como doença eminentemente geográfica, que afeta populações da África, do Mediterrâneo e/ou da Ásia, sendo possivelmente produto de uma bem sucedida estratégia evolucionária humana para lidar com a malária causada pelo *Plasmodium falciparum* (CAMPBELL, 1996; CONNOLLY et al., 1987).

## 2.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME

Uma das características da anemia falciforme é a sua variabilidade clínica, envolvendo desde pacientes com inúmeras complicações e frequentes hospitalizações a outros quase assintomáticos. Verifica-se que as principais manifestações clínicas apresentadas são: anemia crônica acompanhada por dores osteoarticulares e abdominais, infecções e infartos pulmonares, retardo no crescimento, acidente vascular encefálico (AVE), comprometimento crônico de múltiplos órgãos, sistemas ou aparelhos, como o sistema circulatório, rins, olhos e pele, além do aparecimento de úlceras nos membros e necroses ósseas (FRY, 2005).

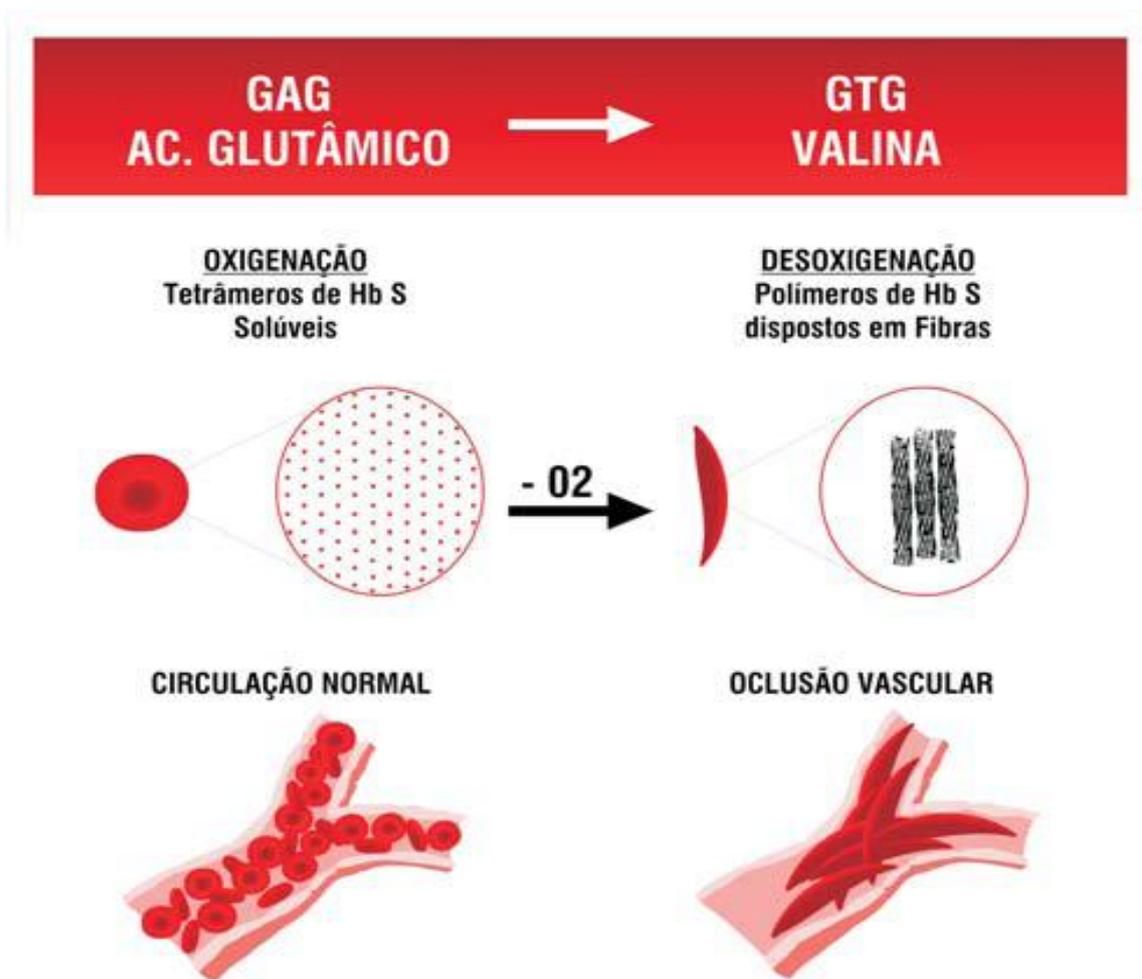
São diversos, os fatores que contribuem para esta variabilidade clínica, sendo que entre os principais, estão os genéticos (haplótipos da globina beta S; Hb F; concomitância com a talassemia alfa) e os interferentes ambientais. Os interferentes ambientais que certamente têm influência nas consequências fisiopatológicas da doença podem ser agrupados em três classes distintas: (a) meio ambiente, (b) qualidade nutricional inadequada e (c) deficiência nas assistências médicas, sociais e psicológicas (NAOUM, 2000).

No entanto, apesar da relevância clínica que os interferentes ambientais e genéticos apresentam, as manifestações clínicas da anemia falciforme derivam diretamente da anormalidade molecular representada pela presença da Hb S, devido às alterações causadas nas propriedades físico-químicas dos eritrócitos, ocasionando os principais agravos característicos da doença. Assim, no estado oxigenado, a molécula de Hb S está "relaxada", estando as globinas beta S mais separadas, entretanto, no estado desoxigenado (desoxi-Hb) a molécula torna-se tensa e as globinas beta S ficam mais próximas, alterando a morfologia dos eritrócitos, sendo também, interessante observar, o espaço de tempo durante o qual permanece desoxigenada, pois quanto maior o tempo sem oxigênio maior a possibilidade de polimerização com conseqüente falcização dos eritrócitos. Esta contínua alteração da morfologia dos eritrócitos provoca lesões crônicas na membrana celular a ponto de tornar-se irreversivelmente falcizado, acentuando os problemas clínicos não só em nível molecular e celular como também em nível circulatório (COELHO; GUIMARÃES, 2010; MANFREDINI; STYPULKOWSKI, 2009).

Assim, no nível molecular, o processo de falcização ocorre a partir do momento em que a oxi-Hb S perde o oxigênio e se torna desoxi-Hb S. A desoxi-Hb S promove a formação de pontes de hidrogênio entre os aminoácidos valina da posição número 1 e o valina mutante da posição 6, modificando a estrutura da molécula de Hb S, gerando desta forma, contatos intermoleculares com outros aminoácidos da globina beta S que participam da constituição do tetrâmero; os principais aminoácidos envolvidos são a fenilalanina da posição 85 e a leucina

da posição 88. As moléculas desoxigenadas se organizam em longos polímeros de filamentos duplos, que por sua vez agregam-se em feixes com duplo filamento central rodeado de seis filamentos duplos de polímeros, sendo que esses feixes de “cristais” dentro dos eritrócitos determinam as deformações das células. A deformação mais conhecida é provocada por feixes de polímeros se organizando mais ou menos paralelamente, modificando a morfologia discóide do eritrócito para formas bicôncavas ou alongadas conhecida por “hemácia em foice” ou “falcizada” (Figura 7) (NAOUM, 2000; PINTO; ZAGO, 2007).

**Figura 7** - Processo de indução à falcização das hemácias pela polimerização da desoxiemoglobina diante da baixa concentração de oxigênio



**Fonte:** LOBO et al., 2007

No nível celular, se o estado de saturação do oxigênio da Hb S estiver acima de 65%, os eritrócitos são conservados com a forma bicôncava, retornando à forma discóide quando oxigenados, todavia, com a desoxigenação, acumulam-se gradativamente produtos de degradação celular provenientes da falência parcial das bombas de sódio, potássio, cálcio e

ATPase, sendo que a partir da perda de potássio e água, a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) se eleva, favorecendo a polimerização, que se intensifica com a falência da bomba de cálcio/ATPase, alterando então, a permeabilidade da membrana eritrocitária, sendo este processo um dos principais motivos dos eritrócitos tornarem-se irreversivelmente falcizados. A desoxigenação da Hb S proporciona o encurtamento da vida média dos eritrócitos, pois os polimeriza, ocasionando sua falcização, distorcendo sua forma com perda de flexibilidade e adesão ao endotélio vascular, propiciando hemólise crônica e anemia (NAOUM, 2000; VERISSÍMO, 2007).

Portanto, a anemia falciforme caracteriza-se por manifestações inflamatórias crônicas, observando-se que a origem de grande parte das manifestações clínicas dessa doença liga-se a três mecanismos: a) adesão de eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas ao endotélio vascular; b) fenômenos inflamatórios crônicos, exacerbados por episódios agudos; c) produção de intermediários inflamatórios, como citocinas e alterações do metabolismo de óxido nítrico. A adesão de eritrócitos pode causar obstrução e hipóxia local, com conseqüente agravamento da falcização, ao mesmo tempo em que desencadeia os fenômenos inflamatórios, que serão mais intensos se houver necrose de tecidos; ocorrendo também, alterações de coagulação e mobilização de células inflamatórias agudas (granulócitos) e crônicas (monócitos) (PINTO; ZAGO, 2007).

## 2.8 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ANEMIA FALCIORME

O diagnóstico laboratorial da anemia falciforme, especialmente a triagem neonatal, configura-se como estratégia de prevenção, entendida como prevenção de óbito (ou de incapacidade) ou morbidade. Observa-se que o diagnóstico desta doença é complexo, e envolve uma análise que deve considerar, além dos dados clínicos e herança genética, fatores como idade, tempo de estocagem e condições de armazenamento da amostra, entre outros, sendo conveniente que o laboratório tenha um consultor especializado na área para auxiliar no esclarecimento dos casos mais complicados. Assim, espera-se que o diagnóstico laboratorial correto, sobretudo o precoce, associado às medidas terapêuticas e ao seguimento ambulatorial regular, garantam maior sobrevivência e melhor qualidade de vida as pessoas com anemia falciforme (FERRAZ; MURAO, 2007; SILVA; YAMAGUCHI, 2007).

O diagnóstico compreende primeiro passo para reduzir a morbimortalidade dos indivíduos com anemia falciforme. Observa-se quão importante é o diagnóstico precoce, todavia, em recém-nascidos, só serão encontrados traços de hemoglobina variante, sendo o perfil hemoglobínico característico obtido somente após o sexto mês de vida, desta forma, é

fundamental a repetição dos exames até o final do primeiro ano de vida (FERRAZ; MURAO, 2007; MAIA et al., 2009).

O monitoramento laboratorial da anemia falciforme é efetuado a partir da conclusiva determinação do genótipo, podendo ser realizado por meio de eletroforeses alcalina e ácida, dosagens das frações separadas na eletroforese, dosagem bioquímica e distribuição intra-eritrocitária da Hb Fetal. Porém, a maioria dos programas de triagem neonatal substituiu estes métodos convencionais pela eletroforese por focalização isoelétrica (IEF) e/ou pela cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), sendo que qualquer dessas técnicas pode ser utilizada de forma isolada para a triagem inicial, pois, constituem métodos de elevada precisão, devendo todo resultado positivo ser repetido em mesma amostra para confirmação, e todos os casos que apresentarem padrão inconclusivo ou duvidoso pela técnica de escolha, deverão ser reavaliados por outro método visando aumentar a sensibilidade e a especificidade (FERRAZ; MURAO, 2007; NAOUM, 2000).

Todavia, apesar das técnicas de eletroforese de hemoglobina e HPLC representarem um passo importante no reconhecimento da relevância das hemoglobinopatias como problema de saúde pública no Brasil e também o início da mudança da história natural da anemia falciforme no país, essas técnicas não são confirmatórias para anemia falciforme, pois não diferenciam com muita precisão a anemia falciforme das outras hemoglobinopatias. Desta forma, o diagnóstico confirmatório para esta doença é a biologia molecular por meio das técnicas de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), que consiste na amplificação seletiva de fragmento do DNA, onde é possível obter uma sequência de DNA no qual se encontra a mutação (CANÇADO; JESUS, 2007; NAOUM, 1997).

Assim, determinado o genótipo, é importante que se faça um estudo familiar, preferencialmente do pai e da mãe, para que o mesmo possa ser geneticamente estabelecido. Além da determinação do genótipo e do estudo familiar, torna-se fundamental a correlação com diagnósticos sugestivos. Desta forma, o hemograma do paciente é um dos importantes diagnósticos sugestivos, pois revela uma anemia grave com presença de degranócitos (células em foice), reticulocitose, plaquetas aumentadas em função da atrofia do baço e leucócitos elevados durante processos hemolíticos ou infecciosos. Outras alterações laboratoriais indicativas de hemólise elevada também ocorrem como o aumento da bilirrubina indireta; aumento de desidrogenase láctica e elevação da lipoproteína de densidade alta (HDL), sendo também, importante correlacionar os achados laboratoriais com os clínicos (Quadro 1) (ANVISA, 2002; NAOUM, 2000; OLIVEIRA; 2007).

**Quadro 1** - Características laboratoriais da Anemia Falciforme

Hb S → 80-100%	Fragilidade osmótica: diminuída
Hb F → 0-20%	Bilirrubina indireta: $\geq 6$ mg/Dl
Hb → 5-10g/Dl	Uroblinogênio: elevado
Células falcizadas – Anisocitose	Hematúria: frequente
Poiquilocitose – Eritroblastos	Fosfatase alcalina sérica: elevada nas crises
Células em alvo – Esferocitose	Hiperplasia das células eritróides
Corpos de Howell Jolly	Trombocitose
Reticulócitos → 5-30%	

Fonte: FERRAZ; MURAO, 2007.

Observa-se que a padronização dos resultados normais e das hemoglobinas variantes encontradas na população brasileira se faz necessária, bem como o estabelecimento dos padrões para cada laboratório, além disso, devem ser utilizadas técnicas ainda mais sensíveis para elucidação da suspeita, bem como a associação de várias delas, objetivando um diagnóstico preciso. O correto diagnóstico laboratorial é, portanto de grande importância para as formas interativas de hemoglobinas, especialmente no Brasil, tendo em vista os inúmeros casos de associação de hemoglobinopatias, além de variantes que apresentam co-migração; a ocorrência de tais associações exige que todos os recursos disponíveis, em nível laboratorial, sejam utilizados em benefício do paciente e seus familiares (FIGUEIREDO, 2007).

Deste modo, o diagnóstico precoce e a terapia adequada representam papel fundamental na redução da morbimortalidade desses pacientes. A realização do diagnóstico laboratorial desta alteração hemoglobínica o mais precocemente possível, é primordial, devido à alta mortalidade na infância. Portanto, a organização de um programa preventivo para anemia falciforme requer suporte de órgãos oficiais de saúde e diagnóstico realizado por pessoal capacitado (SILVA; YAMAGUCHI, 2007).

## 2.9 TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIORME

Na anemia falciforme a melhora da sobrevida e da qualidade de vida desses pacientes se baseia em medidas gerais e preventivas, sendo o acompanhamento ambulatorial ponto fundamental para adequado manejo do paciente com a doença, devendo este ser sempre

priorizado nos serviços de saúde. Este manejo adequado possibilita diminuição dos sinais e sintomas que acometem os doentes falciformes. O acompanhamento ambulatorial visa não só a avaliação periódica dos diversos órgãos e sistemas, com finalidade de precocemente serem detectadas alterações, mas também, a orientação do paciente e de seus familiares sobre a doença (BRAGA, 2007; DI NUZZO; FONSECA, 2004).

A transfusão de hemácias tem sido recurso terapêutico cada vez mais utilizado, sobretudo, porque é capaz de prevenir complicações graves. Estima-se que cerca de 20% a 30% dos pacientes com anemia falciforme são mantidos em regime crônico de transfusão de hemácias, desenvolvendo inexoravelmente, sobrecarga de ferro após a transfusão de 10 a 20 unidades de concentrado de hemácias. Assim, mesmo sendo um procedimento bastante utilizado, a transfusão crônica provoca valores elevados de concentrações de ferro, tornando-se perigoso, porque há acúmulo nas células de órgãos como fígado, coração e rins, o que lhes conferem maior risco de complicações, como doença cardíaca e morte precoce. Para eliminar o excesso de ferro recomenda-se quelante de ferro, devendo fazer parte integrante do tratamento dos indivíduos com anemia falciforme (FERRAZ; MURAO, 2007).

Sabe-se que o aumento no nível de Hb F está associado às manifestações clínicas mais brandas, já que esta hemoglobina interfere na polimerização da Hb S. Como consequência do papel inibitório que a Hb F exerce sobre o processo de falcização, desenvolveu-se uma busca ativa por drogas que reativassem sua síntese. Essa busca levou à descoberta do efeito terapêutico da hidroxiuréia na doença, e à investigação de numerosos outros compostos em fase experimental; a hidroxiuréia está reservada para pacientes com manifestações consideradas de moderadas a graves, entretanto, apesar dos bons resultados obtidos, cerca de 25% dos pacientes graves não apresentam melhora com este tratamento. Mas, mesmo não atingindo 100% de eficácia, verifica-se que a droga é a melhor opção terapêutica disponível para obtenção da melhora clínica e hematológica, apresentando efeitos altamente benéficos em curto prazo, elevando os níveis de hemoglobina fetal, reduzindo hemólises e crises vaso-oclusivas. No entanto, apesar de seu benefício, há necessidade de uma atenção e investigação cuidadosa quanto suas possíveis ações genotóxicas, pois, pode causar alterações irreversíveis no material genético, com sérias consequências ao organismo (FIGUEIREDO, 2007; PINTO; ZAGO, 2007; SILVA; SHIMAUTI, 2006).

O tratamento curativo para pacientes com doença falciforme é o transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico de medula óssea (TCTH alo). O objetivo do TCTH em pacientes falciformes é restabelecer uma hematopoese normal, eliminando as obstruções vasculares causadas pelas hemácias falcizadas, bem como, lesões crônicas e recorrentes do

endotélio vascular. O uso desta modalidade terapêutica no tratamento da anemia falciforme é restrito, devendo a abordagem e o peso das diferentes estratégias terapêuticas serem considerados de forma diferencial, com indicações, limitações e toxicidades próprias, com necessidade de realização de mais estudos randomizados (ÂNGULO et al., 2010; BARROS et al., 2007).

Assim, percebe-se que o diagnóstico e tratamento precoces comprovadamente aumentam a sobrevida e melhoram a qualidade de vida das pessoas com anemia falciforme que, para tanto, devem ser acompanhadas em centros de referência especializados capazes de oferecer atendimento global, multidisciplinar e multiprofissional, sendo que a partir da Portaria Nº 1.391, de 16 de agosto de 2005, institui-se no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS as diretrizes para a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com doença falciforme e outras hemoglobinopatias, cujo objetivo é mudar a história natural desta doença no Brasil, reduzindo a morbimortalidade e trazendo qualidade de vida com longevidade a todas essas pessoas, portanto, tanto o diagnóstico precoce quanto os procedimentos e medicamentos para o tratamento da doença estão disponíveis no SUS. (ÂNGULO et al., 2010; CANÇADO; JESUS, 2007).

## 2.10 HAPLÓTIPOS DA MUTAÇÃO DO GENE BETA S ( $\beta^S$ )

Todo cromossomo é constituído por enormes sequências de quatro bases nitrogenadas - adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) - que formam macromoléculas de DNA. No DNA, há segmentos (genes) em que as sequências de bases nitrogenadas são reconhecidas por RNA ribossômicos e traduzidas em aminoácidos que conseqüentemente sintetizam proteínas. Mas, apesar de todos os indivíduos possuírem DNA, eles são geneticamente diferentes e essas características são transmitidas de geração a geração; grande parte das divergências individuais representa variações patológicas do DNA, enquanto outras são variações silenciosas, sendo as variações silenciosas designadas como polimorfismos, podendo ser detectadas por análise sequencial de fragmentos de DNA clonados ou por clivagens (quebra de pedaços das regiões do complexo gênico) realizadas por diferentes enzimas de restrição (NAOUM, 1997; NAOUM, 2000).

Muitas vezes as substituições de nucleotídeos neutros podem introduzir ou remover regiões de genes sem que o produto final seja alterado, o maior exemplo neste caso é o da Hb S, que como supracitado, a mutação gênica não altera a funcionalidade da hemoglobina, e a partir do uso de enzimas de restrição, tem sido possível caracterizar esses defeitos. Assim, a presença de numerosas regiões polimórficas, ao longo do complexo gênico beta do cromossomo 11, permite clivagens realizadas por diferentes enzimas de restrição, entre as

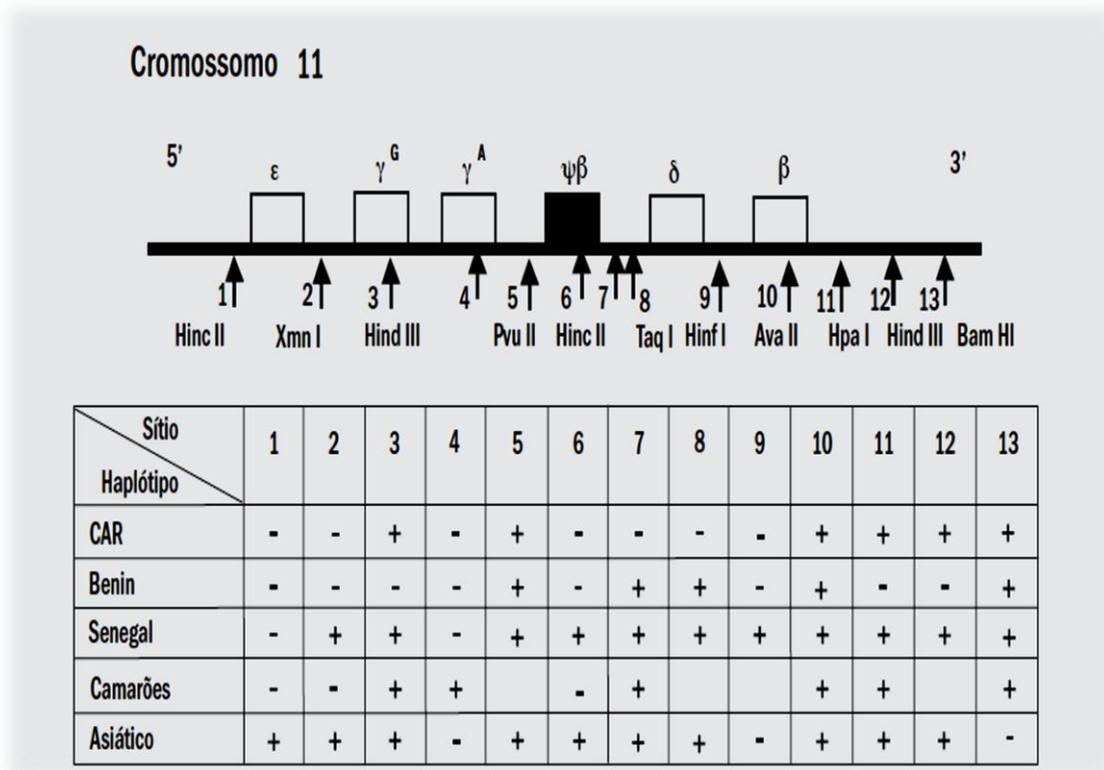
quais destacam-se: *Hinc II*, *XmnI*, *Hind III*, *Pvu II*, *Hinf I*, *Hgi II*, *Ava II*, *Hpa I*, entre outras. A ação destas enzimas permite caracterizar cinco tipos diferentes de homocigotos de Hb S, denominadas de haplótipos de Hb S (NAOUM, 1997).

Os haplótipos são, portanto, caracterizados por sequências de bases nitrogenadas que compõem o DNA, ou seja, são diferentes combinações de sítios polimórficos presentes em um cromossomo. A identificação de polimorfismos por meio das diferenças de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) é fonte de dados inestimáveis para determinação de genes polimórficos relacionados a doenças, como os haplótipos do gene  $\beta^S$ , sendo que para esta finalidade a técnica mais viável utilizada é a PCR, desta forma, a análise de haplótipos se faz por meio de técnicas de Biologia Molecular com a utilização de enzimas específicas extraídas de bactérias (enzimas de restrição) (NAOUM, 1997; NAOUM, 2000).

Assim, a partir de 1978, com as observações iniciais de Kan e Dozy um novo impulso foi dado ao estudo da Hb S, com possibilidade de se admitir que a Hb S teve múltiplas origens. Esses estudos foram realizados em populações da África, Jamaica e em afro-americanos, e pela análise do agrupamento dos genes beta S do cromossomo 11, confirmaram a existência de cinco haplótipos; todas as Hb S se apresentavam com resultado final da troca de ácido glutâmico por valina, porém, com diferentes extensões de lesões moleculares ocorridas ao longo do agrupamento beta, delta, gama - alanina, gama - glicina, pseudogene beta e épsilon, essas descobertas permitiram esclarecer a diversidade clínica e étnica que se observa em diferentes pessoas com anemia falciforme (Figura 8) (NAOUM, 1997).

Os haplótipos Hb S são denominados de acordo com sua região de origem. Na África, o gene Hb S está associado a quatro haplótipos representando mutações independentes, sendo que na Península Arábica ou Índia central a mutação falciforme ocorreu pelo menos uma vez. Os haplótipos Benin, Senegal e Bantu, respectivamente englobam: Nigéria, Marrocos, Benin, países a direita de Benin, Mediterrâneo, Norte e Centro-Oeste da África; regiões de Senegal, África Atlântico Ocidental, acima do rio Níger; Países da África Central e do Sul, e os haplótipos Camarões são procedentes da área central de Camarões. O quinto haplótipo Saudi é encontrado na província oriental da Arábia Saudita e na Índia central (Figura 9) (CONNOLLY et al., 1987; DESAI; DHANANI, 2004; MOAFI et al., 2000; RENAULD et al., 1998).

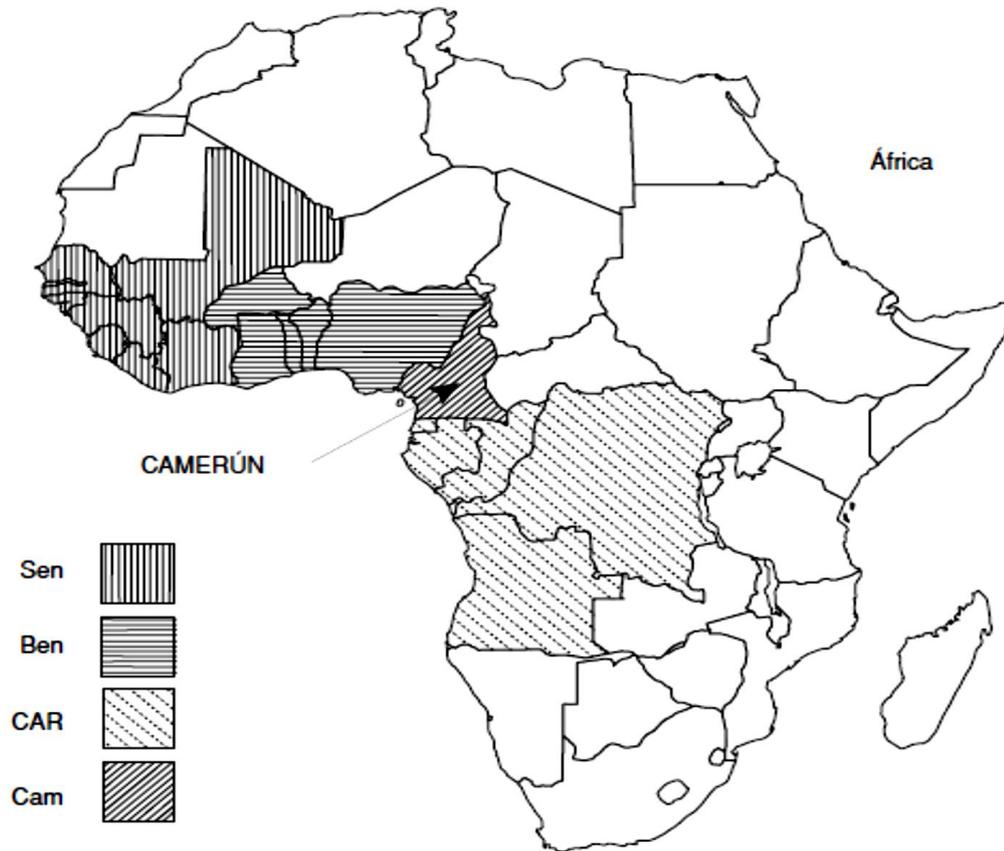
**Figuras 8** - Principais haplótipos do complexo do gene  $\beta$ S, definidos pela ação de 13 enzimas de restrição (os Haplótipos)



**Fonte:** GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003.

Portanto, os haplótipos Senegal e Árabe-Indiano ou Asiático apresentam níveis de Hb F significativamente elevados, favorecendo um desenvolvimento clínico benigno, enquanto os haplótipos Benin, Bantu (CAR) e Camarões estão associados ao aumento da gravidade clínica da doença, sendo que especialmente Benin e Bantu, além de serem os mais frequentes na população mundial, são relacionados a uma anemia falciforme mais grave, possivelmente por apresentarem uma síntese menor de Hb F (menor que 12%). Portanto, a determinação destes polimorfismos do DNA é de grande importância, pois além de influenciarem na gravidade clínica da doença, são considerados marcadores genético-antropológicos, deste modo, em países como os do continente Americano, a identificação dos haplótipos permite decifrar as origens étnicas desta população tão miscigenada (NAOUM, 1997; RENAULD et al., 1998).

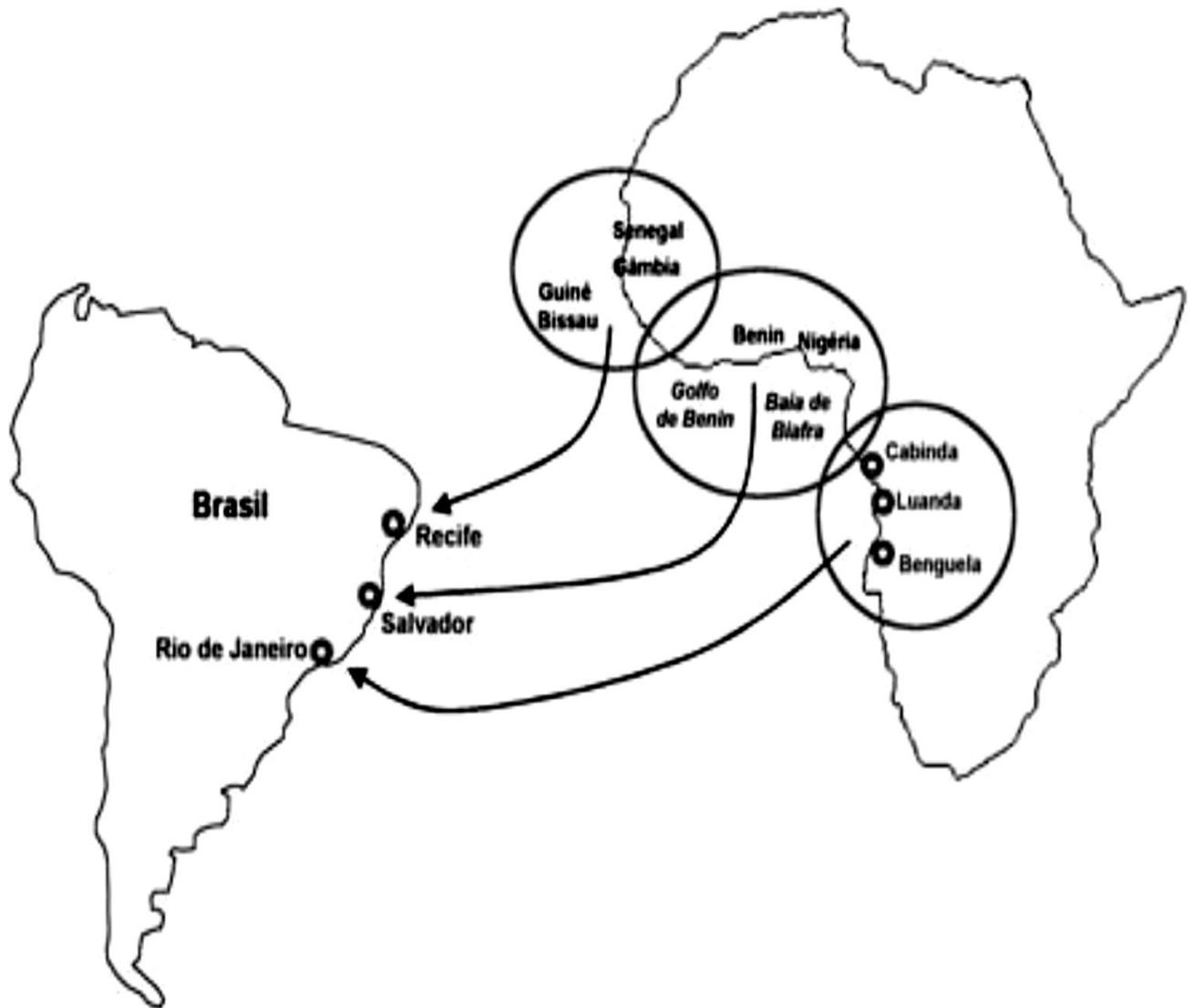
**Figura 9** - Distribuição de haplótipos do gene  $\beta^S$  no continente Africano



Fonte: RENAULD et al., 1998.

Verifica-se que os haplótipos presentes nos genes da Hb S são provenientes de regiões Africanas ou Asiáticas, assim, a proporção de pacientes com os diversos haplótipos diverge nas diferentes regiões da América, especialmente no Brasil, que apresenta uma elevada e importante miscigenação, deste modo, os haplótipos são definidos segundo a origem étnica das populações. Na América do Norte e no Caribe predomina o haplótipo Benin seguido pelo Senegal e Bantu em proporções semelhantes, no Brasil, embora haja certa diversidade regional, de um modo geral, predomina o haplótipo Bantu seguido do Benin, sendo raros os exemplos de haplótipo Senegal; esta distribuição reflete muito bem a proporção de escravos africanos de diferentes regiões trazidos ao Brasil durante o período do tráfico de escravos, sendo, portanto, muito diversa daquela observada em qualquer outra área de prevalência da anemia falciforme, e por esse motivo, esta doença apresenta características diversas na população brasileira (Figura 10; Tabela 2) (ANVISA, 2002; PINTO; ZAGO, 2007).

**Figura 10** - Principais portos africanos fornecedores de escravos para as cidades brasileiras



Fonte: FLEURY, 2007

**Tabela 2** - Distribuição das frequências (%) dos haplótipos CAR, Benin e Senegal em diversas populações do Brasil.

POPULAÇÃO	N	HAPLOTIPOS		
		BANTU (%)	BENIN (%)	SENEGAL (%)
<b>Belém (PA)<sup>1</sup></b>	60	67	30	3
<b>Belém (PA)<sup>2</sup></b>	260	66	21,8	10,9
<b>Fortaleza (CE)<sup>3</sup></b>	68	41,2	55,9	2,9
<b>Pernambuco (PE)<sup>4</sup></b>	127	81,1	14,2	0
<b>Salvador (BA)<sup>5</sup></b>	160	48,1	45,6	0,63
<b>Rio Grande do Norte (RN)<sup>6</sup></b>	94	75,5	12,8	0
<b>Rio de Janeiro (RJ)<sup>7</sup></b>	150	54	44,6	1,4
<b>Rio de Janeiro (RJ)<sup>8</sup></b>	1054	72,9	20,3	0,19
<b>Campinas (SP)<sup>9</sup></b>	142	64,7	35,2	0
<b>Porto Alegre (RS)<sup>10</sup></b>	70	70	21,4	4,3

\*N = numero de cromossomos.

**Fonte:** 1 GUERREIRO, et al. (1998); 2 CARDOSO; GUERREIRO (2006); 3 FARIAS et al. (2005); 4 ABATH et al. (2007); 5 ADORNO et al. (2003); 6 CABRAL et al. (2011); 7 FLEURY (2007); 8 OKUMURA et al. (2013); 9 ARRUDA et al. (1994); 10 CASTILHOS (2008).

Portanto, a partir do exposto, verifica-se que a determinação dos haplótipos da globina beta S seja de grande importância não só para o acompanhamento e prognóstico dos pacientes com anemia falciforme, mas também, é uma ferramenta para estudos antropológicos relacionados ao esclarecimento da origem dos afrodescendentes que tanto contribuíram na formação etnológica, econômica, cultural e social do Brasil. Porém, apesar da importância dos haplótipos em relação às manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes falciformes, é importante destacar que as referências que se fazem relacionando a gravidade clínica da anemia falciforme com os haplótipos da Hb S devem ser interpretadas com ressalvas, pois existem vários fatores hereditários que se apresentam como interferentes, entre eles está o aumento da concentração de Hb Fetal (FLEURY, 2007; NAOUM, 2000; PINTO; ZAGO, 2007).

Assim, observando a relevância dos haplótipos do gene da globina beta S nos estudos relacionados à anemia falciforme, buscou-se determinar haplótipos presentes nos pacientes do Estado Amapá, uma vez, que a identificação destes polimorfismos contribui para estudos

sobre a origem étnica da população amapaense, possibilitando também maiores conhecimentos relacionados aos aspectos moleculares da doença falciforme no Amapá.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Identificar os haplótipos da globina beta S de 46 pessoas com Anemia Falciforme atendidas no Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amapá.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar por meio dos métodos de Biologia Molecular os haplótipos da globina beta S nas pessoas com anemia falciforme do atendidas no Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Amapá.
- Determinar a frequência genotípica dos haplótipos da globina beta S identificados.
- Comparar os resultados obtidos com estudos referentes aos haplótipos do gene da globina beta S realizados em outros Estados brasileiros.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 TIPO DE ESTUDO

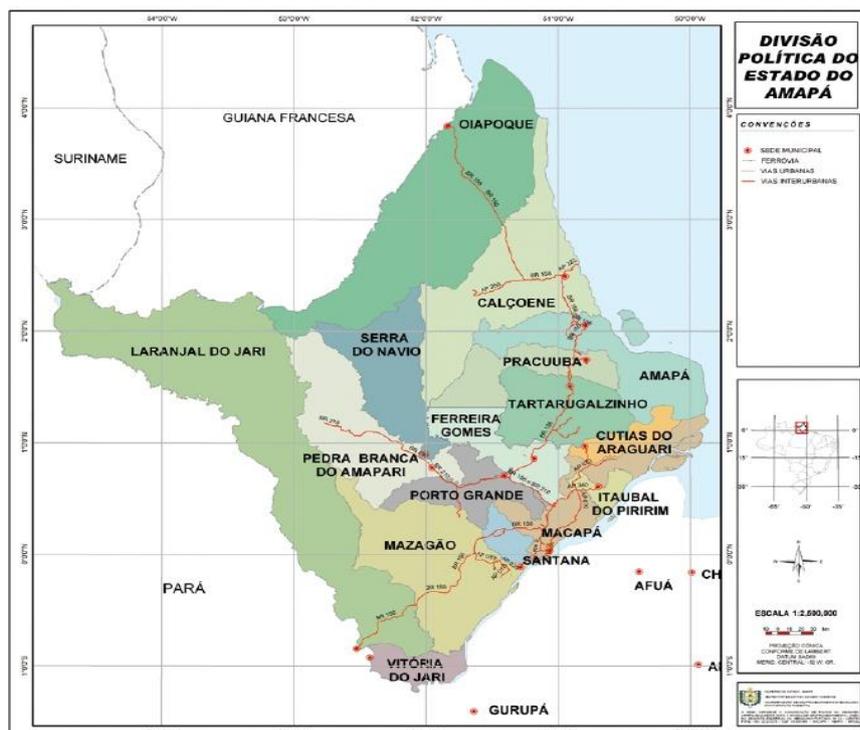
Conforme o problema abordado, esta pesquisa caracteriza-se como Quantitativa, pois requer uso de recursos e técnicas estatísticas (percentagem, média, moda, mediana, etc.), ou seja, quantifica os dados. Objetivando-se assim, verificar a frequência dos haplótipos beta S nas pessoas com anemia falciforme atendidas no hemocentro do Estado do Amapá (SILVA; MENEZES, 2001).

Do ponto de vista epidemiológico classifica-se como Transversal e de Inquérito Prospectivo, pois, visualiza a situação de uma população em determinado momento, baseados na avaliação individual e possibilitando a produção de indicadores globais de saúde para o grupo investigado (ALMEIDA FILHO; ROUQUAYROL, 2003).

### 4.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ÁREA DE ESTUDO

O Estado do Amapá está localizado no extremo Norte do Brasil, sendo uma das 27 unidades federativas do Brasil e um dos nove Estados que compõe a região Amazônica, possui área territorial de 143.828 Km<sup>2</sup> com densidade demográfica de 4, 69 (IBGE, 2012) (Figura 11).

**Figura 11** - Mapa do Estado do Amapá



Fonte: BRITO et al., 2008.

De acordo com estimativas feitas pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), no ano de 2012 a população do Estado foi de aproximadamente 608.602 habitantes, dos quais 415.554 residem na capital Macapá. A população amapaense é formada em sua grande maioria por Pardos (66,9%) e Brancos (26,2%), totalizando 93,1%, com menor frequência a população Negra (5,6%) e Amarela (1,3%) (IBGE, 2012).

O Amapá possui rica e fascinante cultura, abrigando populações tradicionais (caboclos e quilombolas) e indígenas que, durante centenas de anos convivem com ecossistemas naturais (CONSERVAÇÃO INTERNACIONAL DO BRASIL, 2009).

Segundo o INCRA (Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária) existem aproximadamente 37 áreas quilombolas no Estado do Amapá, sendo três tituladas (Quilombo do Curiau; Mel da Pedreira e Conceição do Macacoari), as outras comunidades estão em processo de titulação, observando desta forma a influência da população afrodescendente, considerando que a maioria destas comunidades é semi-isoladas. Assim, a comunidade de afrodescendente mesmo considerada pequena faz parte da formação cultural, econômica e política do Amapá (INCRA, 2012; SILVA, 2002).

Quanto à população indígena existem aproximadamente 7.411, compondo um grupo étnico formado por descendentes dos históricos grupos de origens diversas que confluíram para a região, em diferentes épocas (GALLOIS; GRUPIONI, 2003; IBGE, 2012).

#### 4.3 LOCAL DO ESTUDO

O presente estudo foi realizado no Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Amapá (Hemoap), localizado na cidade de Macapá, a partir da coleta de sangue de pessoas com Anemia Falciforme residentes no Estado do Amapá e atendidas no Hemoap. Sendo as análises laboratoriais realizadas no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das doenças Hematológicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/IBILCE) de São José do Rio Preto, São Paulo.

#### 4.4 PERÍODO DO ESTUDO

A coleta das amostras de sangue e análise laboratorial do presente estudo ocorreu durante sete meses, com intervalo determinado entre o período de Maio de 2012 a Novembro de 2012.

#### 4.5 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Participaram da pesquisa 46 pessoas com anemia falciforme, de ambos os sexos, idade variando entre 02-50 anos, com média de  $16.4 \pm 9.6$  anos, atendidas no Hemoap e residentes na área geográfica do estudo.

#### 4.6 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

Foram incluídos na pesquisa pessoas com anemia falciforme, residentes no Estado do Amapá, sem vínculo familiar (não consanguíneos), com ausência de tratamento transfusional, que concordaram em participar do estudo por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (APÊNDICE A) conforme a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Como critérios de exclusão, não foram aceitos na pesquisa pessoas com análise de hemoglobinas não confirmatórias para o perfil SS, com ligações familiares, que estavam fazendo tratamento transfusional, e que não concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### 4.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Amapá (CEP-UNIFAP), obtendo aprovação sob o número de protocolo: FR-476933/2012 (ANEXO A). A participação de crianças (0-9 anos) e de alguns Adolescentes (10-17 anos) esteve condicionada a concordância dos responsáveis. Após terem conhecimento dos objetivos do estudo foram convidados a participar e assinar o termo de consentimento livre esclarecido. A impressão digital foi o recurso utilizado para agrupar os não alfabetizados. Assim, antes da coleta de sangue esclareceu-se aos participantes, os objetivos, a beneficência, os riscos da pesquisa, bem como, devidas orientações pré e pós-coleta, sanando possíveis dúvidas.

#### 4.7 MÉTODOS

##### **4.7.1 Obtenção das amostras de sangue**

A abordagem dos pacientes ocorreu durante as consultas médicas ou quando iam coletar sangue para realização de exames de rotina. As amostras de sangue periférico foram coletadas seguindo os preceitos da biossegurança. Coletou-se de cada participante cerca de 4

mL de sangue por punção venosa em tubos contendo EDTA (ácido etileno diaminotetracético) como anticoagulante de acordo com Barbosa et al. (2010).

As amostras foram mantidas sob-refrigeração a 4°C, por no máximo 15 dias e posteriormente transportadas via correio (SEDEX) ao Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho (UNESP/IBILCE) de São José do Rio Preto, São Paulo, onde foram realizadas as análises laboratoriais.

#### **4.7.2 Análises laboratoriais**

No LHGDH foram realizadas as seguintes investigações laboratoriais para detectar presença da Hb S: eletroforese em pH alcalino (pH 8,6); eletroforese em pH ácido (pH 6,2); quantificação das frações globínicas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). Posteriormente, extração de DNA por fenol – clorofórmio para a confirmação da homozigose da Hb S por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) seguida da restrição de fragmento único (RFLP) com a endonuclease *DdeI*. A caracterização dos haplótipos da globina beta-S foi realizada (PCR - RFLP) por meio da identificação de seis sítios polimórficos reconhecidos por enzimas específicas.

#### **4.7.3 Perfil hemoglobínico dos pacientes**

- a) Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino (MARENGO-ROWE, 1965).

##### *Princípio:*

Técnica utilizada para detecção de hemoglobinas normais, e grande parte das variantes. A leitura se baseia nas diferentes cargas elétricas das hemoglobinas, devido substituições de aminoácidos de diferentes pontos isoelétricos (pI), que acarretam em mobilidades eletroforéticas diferentes das normais.

##### *Equipamento:*

- Cuba de eletroforese
- Tiras de acetado de celulose
- Papel absorvente
- Aplicador de amostra

*Reagentes:*

- Solução tampão: TRIS-EDTA-BORATO (TEB pH 8,6)
- Tris hidroximetil aminometano 10,2 g
- Ácido etileno-diamino-tetracético 0,6 g
- Ácido Bórico 3,2 g
- Água destilada q.s.p 1000 mL
- Conservado em 4° C.

*Procedimento:*

- Quantidades iguais de solução tampão TEB foram colocadas em cada compartimento eletrolítico da cuba de eletroforese;
- As fitas de acetato de celulose foram embebidas em tampão por 15 minutos, no mínimo, antes da aplicação do hemolisado;
- Após serem secas em folhas de papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão utilizado para embeber as fitas, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos por tecido absorvente (pano multiuso) para fazer a ponte de corrente elétrica na fita;
- A solução de hemoglobina foi aplicada a 1,0 cm da extremidade da fita em contato com o pólo negativo.
- Passaram-se 300 volts por aproximadamente 30 minutos do pólo negativo para positivo;
- As frações de Hb foram analisadas de acordo com o posicionamento na fita, e seguindo mapa de migração com padrão conhecido. No sentido da mais eletronegativa para a mais eletropositiva temos: Hb A2 mais eletronegativa, seguida das Hb S, Hb F e a Hb A como a mais eletropositiva.

b) Eletroforese de hemoglobinas em pH ácido (VELLA, 1968).

*Princípio:*

A eletroforese de pH ácido é específica para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas mais lentas que a Hb A, quais sejam: Hb C que migra na mesma posição que a Hb A2, e a Hb D na mesma posição que a Hb S na eletroforese alcalina. Assim, esta técnica é utilizada para

diferenciar alguns desses tipos de Hb que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino.

*Equipamento:*

- Cuba de eletroforese;
- Papel filtro;
- Aplicador de amostra;
- Erlenmeyer de 200 a 250 mL
- Lâmina de microscopia

*Reagentes:*

- Solução tampão Fosfato pH 6,2 - Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel de ágar:
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,02 g
  - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O 7,66 g
  - Água destilada q.s.p 1000 mL
- Conservar em 4° C.
- Gel de Ágar-Fosfato 49
- Ágar-agar 500 mg
- - Tampão fosfato pH 6,2 25 mL

*Procedimento:*

- Os componentes do gel de ágar-fosfato foram adicionados a um erlenmeyer de 250 mL e levados ao forno micro-ondas por um minuto ou até completa dissolução, sendo o tempo interrompido de 10 em 10 segundos para evitar fervura e evaporação;
- Foram pipetados 5,0 mL do gel, em lâminas de microscopia, para gelificarem em temperatura ambiente;
- As amostras foram aplicadas na porção média da lâmina, inserindo o aplicador com cuidado para não partir totalmente o gel;
- Para conexão, do gel com os compartimentos eletrolíticos, foi utilizado tecido absorvente (pano multiuso);
- Passaram-se 100 volts por 45 minutos no sentido do pólo positivo para o negativo;

- As frações de hemoglobina foram analisadas de acordo com o posicionamento no gel segundo mapa de migração e padrão conhecido. No sentido da mais eletropositiva para a mais eletronegativa há: Hb C, Hb S, Hb A e Hb F mais eletronegativa.
- c) Perfil hemoglobínico e Quantificação das frações por Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (BIO-RAD-Kit de Beta-Talassemia Heterozigota).

*Princípio:*

Com base na carga elétrica de cada uma das frações é possível identificar o perfil de Hb e os valores percentuais de cada uma das frações. O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD) com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota, que consiste na cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados, passam pela coluna detectando as alterações de absorvância a 415 nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorvância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorvância versus tempo.

Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra, de acordo com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da hemoglobina. Cada hemoglobina tem um tempo de retenção característico relacionado à sua carga elétrica. No final da análise de cada amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

*Procedimento:*

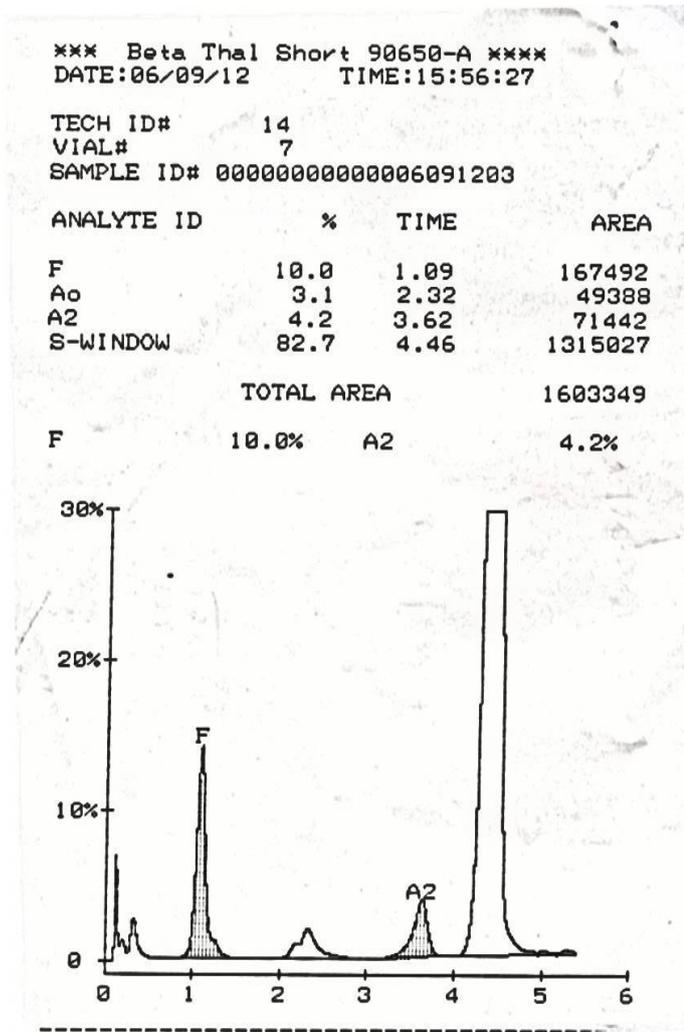
Em um tubo foram misturados 5 µL de sangue total com 1,0 mL de solução hemolisante fornecida no kit de análise. Após a hemólise total, as amostras foram acondicionadas nos recipientes adequados e alojadas no equipamento para realização dos procedimentos de leitura e análise das frações.

*Interpretação:*

A quantificação das diferentes frações de hemoglobina em uma amostra foi realizada a partir dos valores percentuais e do tempo de retenção fornecidos pela calibração específica, e

emitidos em modelo próprio, que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico (Figura 12).

**Figura 12** – Cromatograma de pessoas com anemia falciforme do Amapá.



**Fonte:** Análise laboratorial de amostras da pesquisa.

#### 4.7.4 Análise Molecular

- *Extração de DNA com fenol - clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989)*

*Princípio:*

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

*Reagentes:*

Solução de lise 1 (tampão utilizado na lise de células vermelhas)	
Sacarose 0,32 M	10,95g
Tris HCL 10mM 0,5 mL (solução estoque)	1mL (solução estoque pH 7,4) MgCl <sub>2</sub> * 5mM
Triton 1% 100x (detergente)	1mL
Água mili-Q autoclavada q.s.p	100mL
Armazenar em geladeira	
Solução estoque (Tris HCL 1M, pH 7,4)	
Tris	31,53g
Água mili-Q	200mL
Acertar o pH para 7,4 com HCL*	
Solução estoque (MgCl <sub>2</sub> 1M)	
MgCl <sub>2</sub>	40,66g
Água mili-Q	200mL
Solução de lise 2 (tampão utilizado na lise de células vermelhas brancas)	
0,075M de NaCl*	2,19g
0,02 M de EDTA	200mL (sol.estoque pH 8.0)
Água mili-Q q.s.p	500mL
Autoclavar e armazenar em geladeira	
Solução estoque (EDTA 0,5 M, pH 8.0)	
EDTA	93,05g
Água mili-Q	500mL
Acertar o pH para 8.0 com NaOH*	
Proteinase K (20mg/mL)	
Proteinase K	20mg
Água mili-Q q.s.p	1mL
Conservar em freezer	

\*MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio

\*HCL – Ácido clorídrico

\*NaCl – Cloreto de sódio

\*NaOH – Hidróxido de sódio

*Procedimento:*

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

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

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

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

- *Reação em cadeia de Polimerase por análise de restrição (PCR - RFLP) para confirmação de Hb S (SAIKI et al., 1985).*

A detecção da mutação foi realizada por reação em cadeia da polimerase seguida de análise de restrição (PCR-RFLP - polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição - *restriction fragments length polymorphisms*).

*Reação de amplificação*

H2O	13,3 µL
Tampão sem MgCl <sub>2</sub> (10X)	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	3,0 µL
dNTP (1,25 mM cada)	1,0 µL
Primer P277 (10,0 µM)	1,5 µL
Primer P278 (10,0 µM)	1,5 µL
<i>Taq</i> Polimerase (5U)	0,2 µL
DNA (150 ng/µL)	2,0 µL
Volume Final da reação	25 µL

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

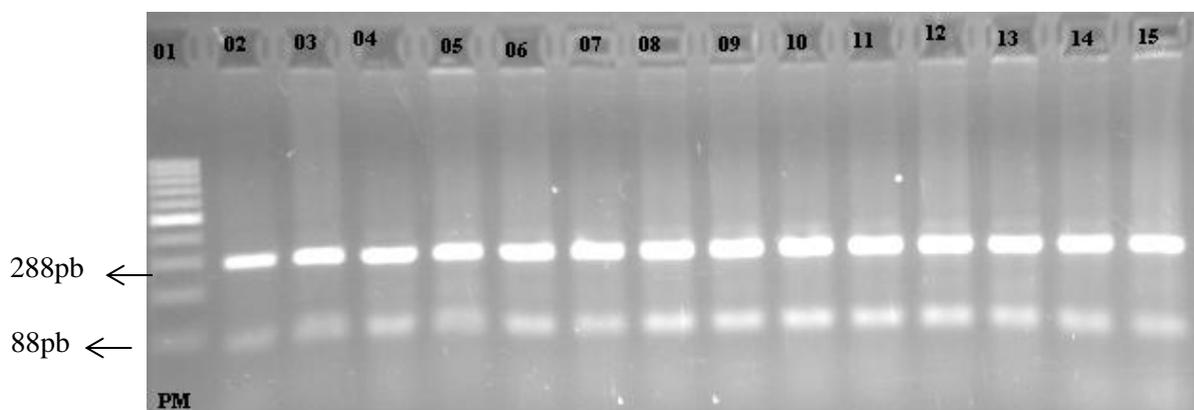
Após a amplificação, o fragmento de 382 pb foi digerido a 37 °C por 3 horas. A enzima utilizada foi a *Dde* I (C↓TNAG).

*Reação de digestão*

H2O	13,1 µL
<i>Dde</i> I	2,1 µL
PCR	5,0 µL

A mutação no sexto códon (GAG → GTG) elimina um sítio de restrição para a enzima *Dde* I; assim após a digestão o alelo mutante gerou dois fragmentos, um de 288 pb e outro de 88 pb. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV (Ultravioleta), após coloração com brometo de etídio. (Figura 13).

**Figura 13** - Produto de restrição da PCR-RFLP para Hb S (Homozigotos para Hb S)

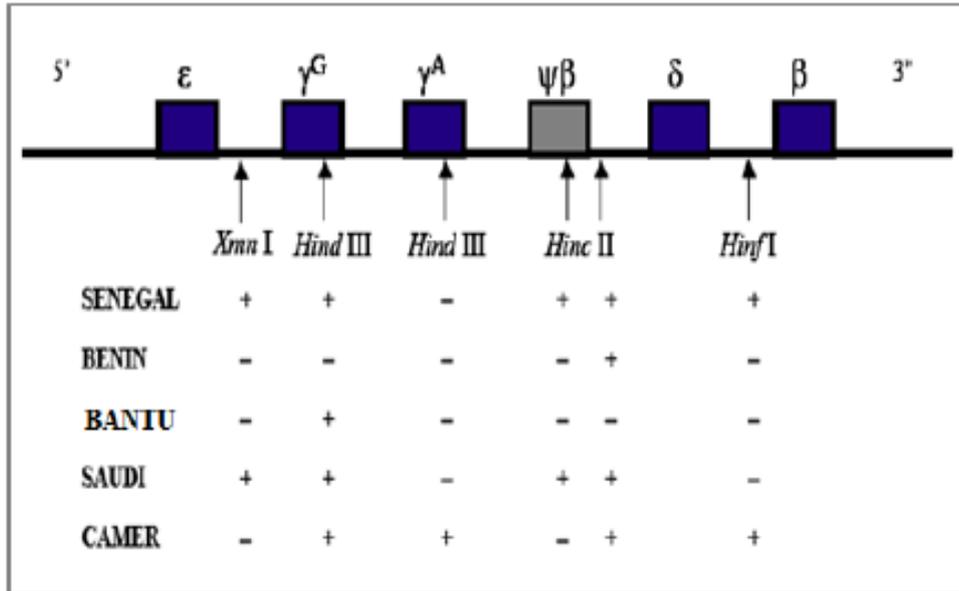


**Fonte:** Análise laboratorial de amostras da pesquisa.

➤ Análise dos Haplótipos  $\beta^S$  (SUTTON et al., 1989)

A determinação dos haplótipos foi realizada por PCR-RFLP, por meio da análise de seis sítios polimórficos, classificados segundo Sutton et al (1989) (Figura 14).

**Figura 14** - Representação esquemática dos sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos



$\beta^S$ . (+) indica presença do sítio polimórfico; (-) indica ausência do sítio polimórfico.

Fonte: SUTTON et al (1989)

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores para análise dos polimorfismos da família  $\beta$  estão listadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de regiões da família  $\beta$ .

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

→: sense ; ← anti-sense

Os reagentes, as concentrações utilizadas para a montagem da solução de reação e as condições de amplificação estão representadas a seguir.

### PCR-RFLP- primers H0/H1 - *XmnI* I (5'γ<sup>6</sup>)

#### MIX

Componentes	Volume no Mix
H2O estéril	17,125
Tampão (10X)	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,25
dNTP's (2mM)	2,5
<i>Primer</i> H0(25μM)	0,25
<i>Primer</i> H1(25μM)	0,25
<i>Taq</i> Polimerase (5U/μL)	0,125
DNA (100ng/μL)	1,0
Volume final (μL)	25

Termociclador	
94° C- 5 minutos (Desnaturação inicial)	} 35 ciclos
94° C- 45 segundos (Desnaturação)	
60°C- 45 segundos (Anelamento)	
72°C- 1 minuto e 30 segundos (Extensão)	
72°C- 7 minutos (Extensão Final)	

Leitura em Gel de agarose a 1,5% a 80V, por 20 minutos

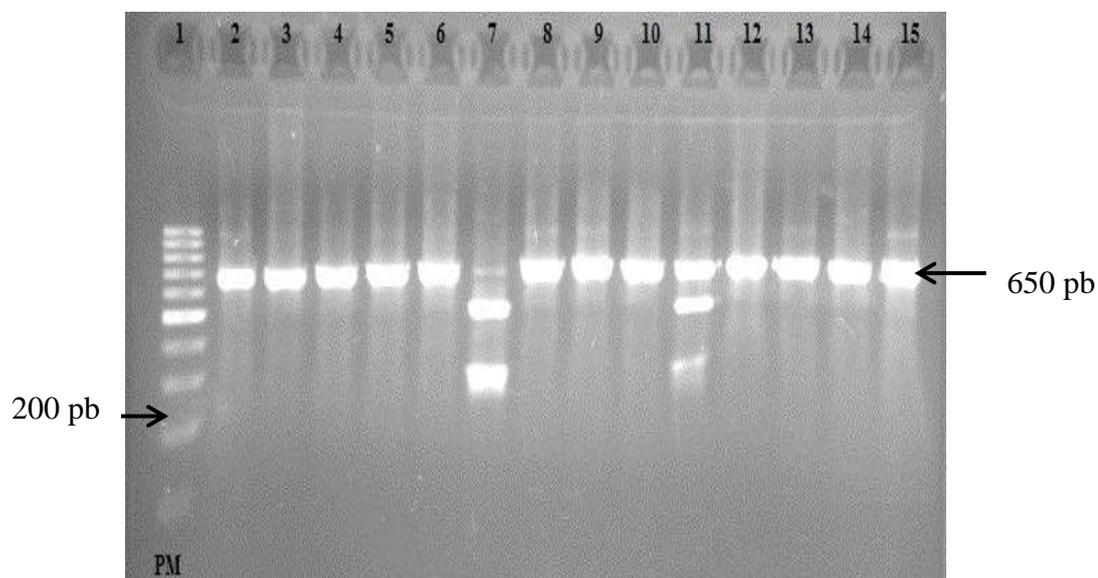
#### Digestão

MIX	Volume (μL)
H2O	3,2
Tampão da enzima (10x)	1,0
Enzima <i>XmnI</i>	0,2
BSA (100X)	0,6
Total	5,0

10 μL do produto do PCR + 5μL do MIX da enzima, digerido por 3 horas a 37°C.

Leitura em Gel de agarose 1,5% a 80V, por 30 minutos.

**Figura 15** – Fotografia do gel de agarose 1,5% contendo produtos de PCR obtido com *primers* HOH1 (região 5'γ<sup>G</sup>). Na coluna 1 foi aplicado o padrão de peso molecular (PM) em escala de 100 pares de base DNA Ladder. As colunas 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 correspondem às amostras homozigotas que não sofreram corte enzimático (-/-). A coluna 7 refere-se à amostra homozigota de sofreu corte enzimático (+/+). A coluna 11 indica amostra heterozigota que sofreu corte enzimático parcial (+/-).



**Fonte:** Análise laboratorial de amostras da pesquisa.

**PCR-RFLP H2/H3 (γ<sup>G</sup>); H3/H4 (γ<sup>A</sup>) - *Hind III*; H5/H6 (ψβ); H7/H8 (3'ψβ) - *Hinc II***

MIX

Componentes	Volume no Mix ( <i>Hind III</i> ) (γ <sup>G</sup> e γ <sup>A</sup> )	Volume no Mix ( <i>Hinc II</i> ) (ψβ e 3'ψβ)
H2O estéril	17,25	17,55
Tampão (10X)	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,0	1,0
dNTP's (10mM)	0,75	0,75
<i>Primer</i> H (10μM)	0,5	0,5
<i>Primer</i> H (10μM)	0,5	0,5
<i>Taq</i> Polimerase (1U/μL)	1,5	0,20
DNA (100ng/μL)	1,0	1,0
Volume final (μL)	25	25

Termociclador	
94° C- 5 minutos (Desnaturação inicial)	
94° C- 30 segundos (Desnaturação)	} 35 ciclos
60° C- 1 minuto (Anelamento)	
72° C- 1 minuto (Extensão)	
72° C- 7 minutos (Extensão Final)	

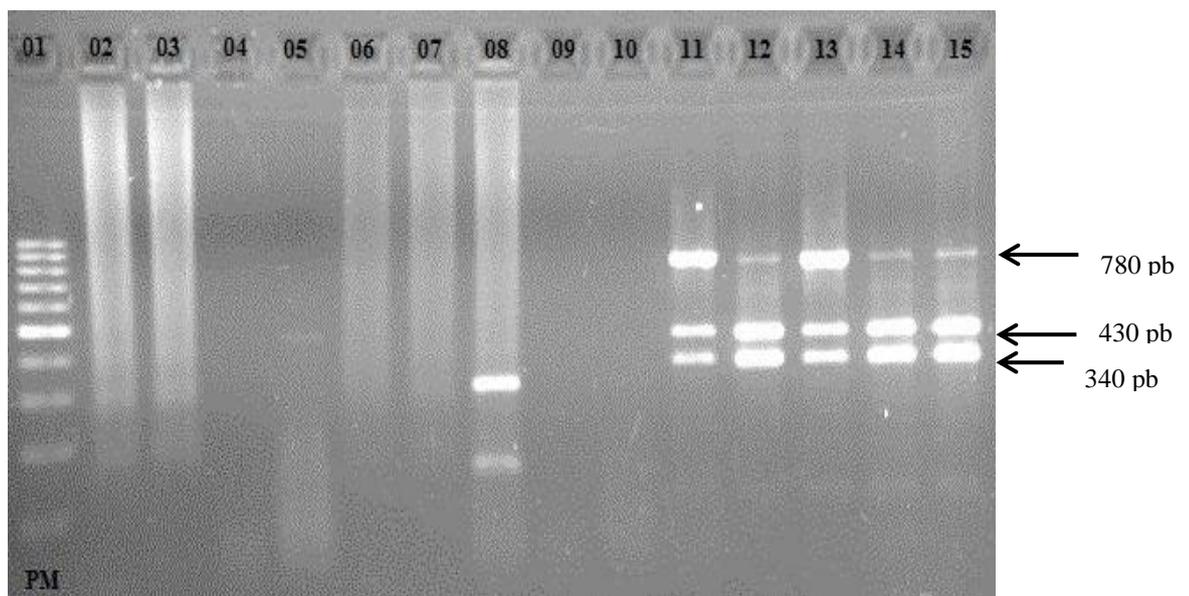
Leitura em Gel de agarose a 1,5% a 80V, por 20 minutos

### Digestão H2/H3

MIX	Volume - $\mu$ L
H2O	3,2
Tampão da enzima	1,5
Enzima <i>Hind III</i> ( $\gamma^G$ )	0,5
Produto de PCR	10

Leitura em Gel de agarose a 1,5% a 80V, por 30 minutos

**Figura 16** – Fotografia do gel de agarose 1,5% contendo produtos de PCR obtido com *primers* H2H3 (região  $\gamma^G$ ). Na coluna 1 foi aplicado o padrão de peso molecular (PM) em escala de 100 pares de base DNA Ladder. A coluna 08 corresponde à amostra homocigota que sofreu corte enzimático (+/+). As colunas 11 e 13 referem-se às amostras heterocigotas que sofreram corte enzimático parcial (+/-). As colunas 12, 14 e 15 indicam amostras homocigotas que sofreram corte enzimático (+/+). Não há amostras nas colunas 02, 03, 04, 05, 06, 07, 09 e 10.



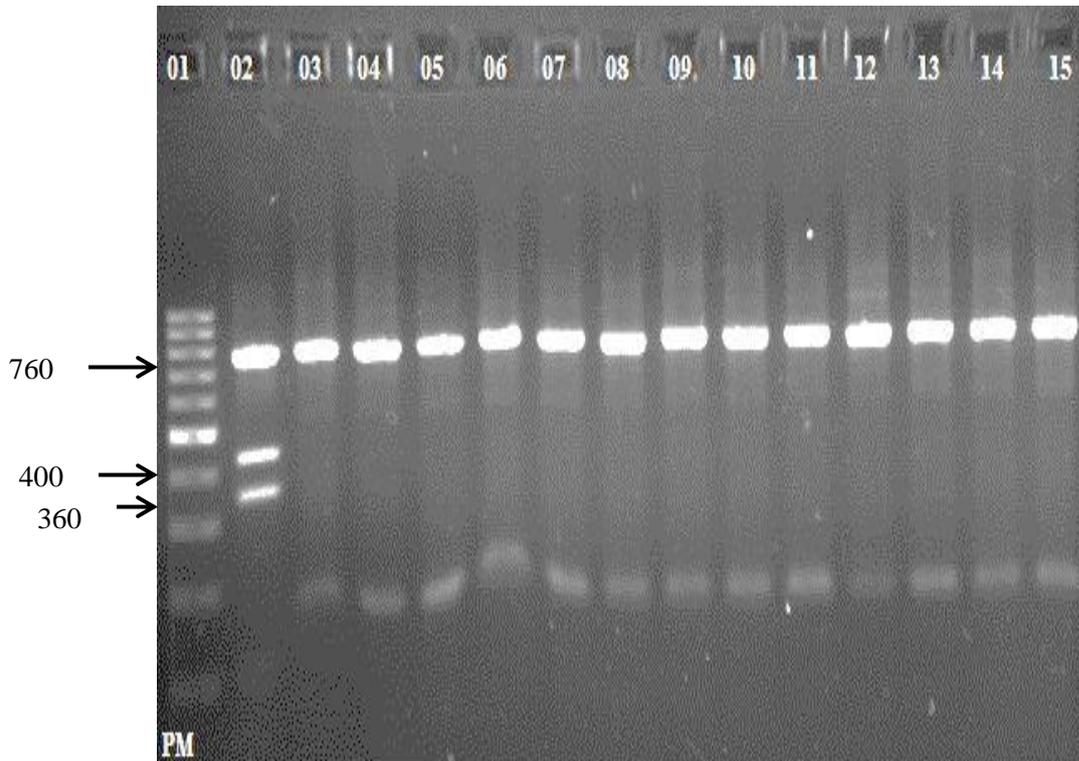
**Fonte:** Análise laboratorial de amostras da pesquisa.

## Digestão H3/H4

MIX	Volume
H2O	3,3
Tampão da enzima	1,5
Enzima <i>Hind III</i> ( $\gamma^A$ )	0,5
Total	5,3

Leitura em Gel de agarose a 1,5% a 80V, por 30 minutos

**Figura 17** – Fotografia do gel de agarose 1,5% contendo produtos de PCR obtido com *primers* H3H4 (região  $\gamma^A$ ). Na coluna 1 foi aplicado o padrão de peso molecular (PM) em escala de 100 pares de base DNA Ladder. A coluna 02 corresponde à amostra heterozigota que sofreu corte enzimático parcial (+/-). As colunas 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 referem-se às amostras homozigotas que não sofreram corte enzimático (resultado -).



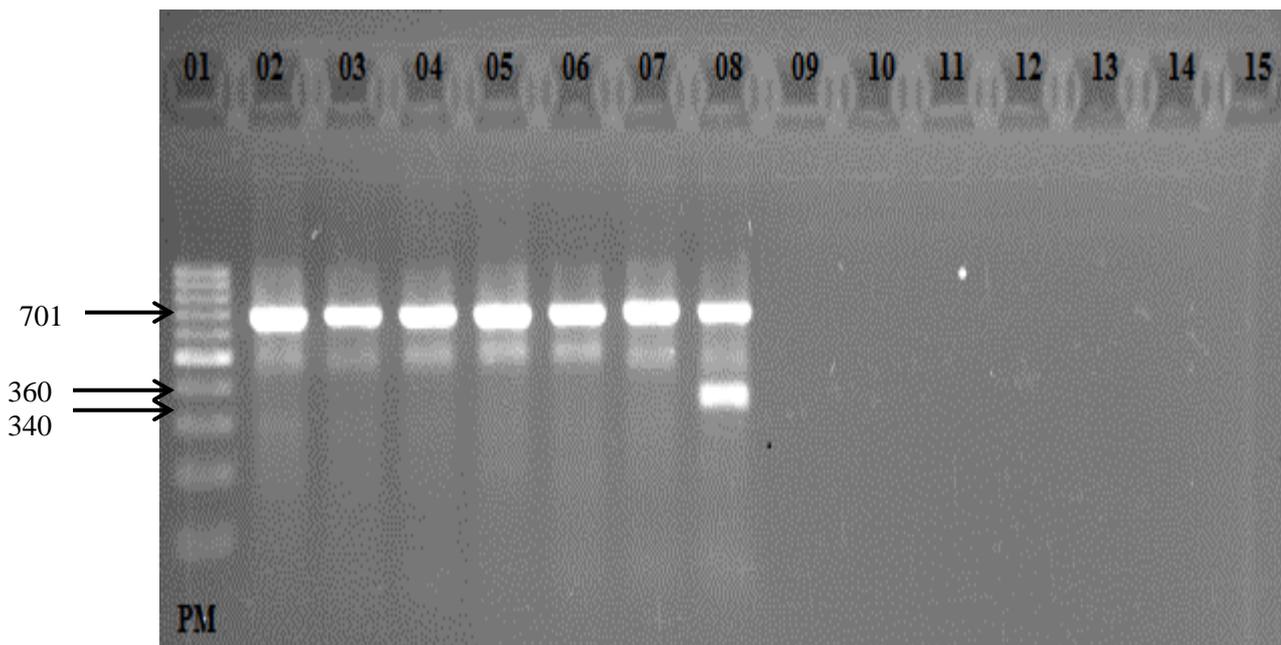
**Fonte:** Análise laboratorial de amostras da pesquisa.

## Digestão H5/H6

MIX	Volume
H2O	3,3
Tampão da enzima	1,5
Enzima <i>Hinc II</i> ( $\psi\beta$ )	0,5
Total	5,3

Leitura em Gel de agarose a 1,5% a 80V, por 30 minutos

**Figura 18** – Fotografia do gel de agarose 1,5% contendo produtos de PCR obtido com *primers* H5H6 (região  $\psi\beta$ ). Na coluna 1 foi aplicado o padrão de peso molecular (PM) em escala de 100 pares de base DNA Ladder. As colunas 02, 03, 04, 05, 06 e 07 correspondem às amostras homozigotas que não sofreram corte enzimático (resultado -). A coluna 08 é referente à amostra heterozigota que sofreu corte enzimático parcial (+/-). As colunas 09, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 não contêm amostras.



**Fonte:** Análise laboratorial de amostras da pesquisa.

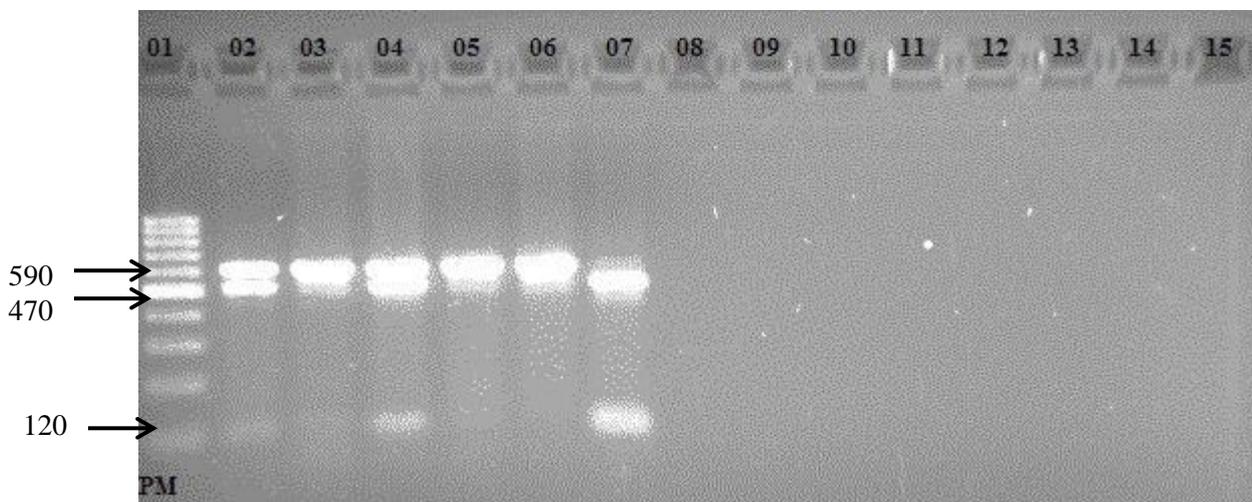
## Digestão H7/H8

MIX	Volume
H <sub>2</sub> O	3,3
Tampão da enzima	1,5
Enzima <i>Hinc</i> II (3'ψβ)	0,2
Total	5,0

Leitura em Gel de agarose a 1,5% a 80V, por 30 minutos

10 µL do produto do PCR + 5µL do MIX da enzima colocar em banho-maria a 37°C por 5 min.

**Figura 19** – Fotografia do gel de agarose 1,5% contendo produtos de PCR obtido com *primers* H7H8 (região 3'ψβ). Na coluna 1 foi aplicado o padrão de peso molecular (PM) em escala de 100 pares de base DNA Ladder. As colunas 02 e 04 correspondem às amostras heterozigotas que sofreram corte enzimático parcial (+/-). As colunas 03, 05, 06 e 07 referem-se às amostras homozigotas que não sofreram corte enzimático (resultado -). Não existem amostras nas colunas 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14 e 15.



**Fonte:** Análise laboratorial de amostras da pesquisa.

**PCR-RFLP- H9/H10 (5'β)**

Componentes	Volume no Mix ( <i>Hinf I</i> )
H <sub>2</sub> O estéril	16,6
Tampão (10X)	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,25
dNTP's (2mM)	2,5
<i>Primer H9</i> (10μM)	0,5
<i>Primer H 10</i> (10μM)	0,5
<i>Taq</i> Polimerase (5U/μL)	0,20
DNA (100ng/μL)	1,0
Volume final (μL)	25

Termociclador	
94° C- 5 minutos (Desnaturação inicial)	
94° C- 45 segundos (Desnaturação)	} 35 ciclos
60°C- 45 segundos (Anelamento)	
72°C- 1 minuto e 30 segundos (Extensão)	
72°C- 10 segundos (Extensão Final)	

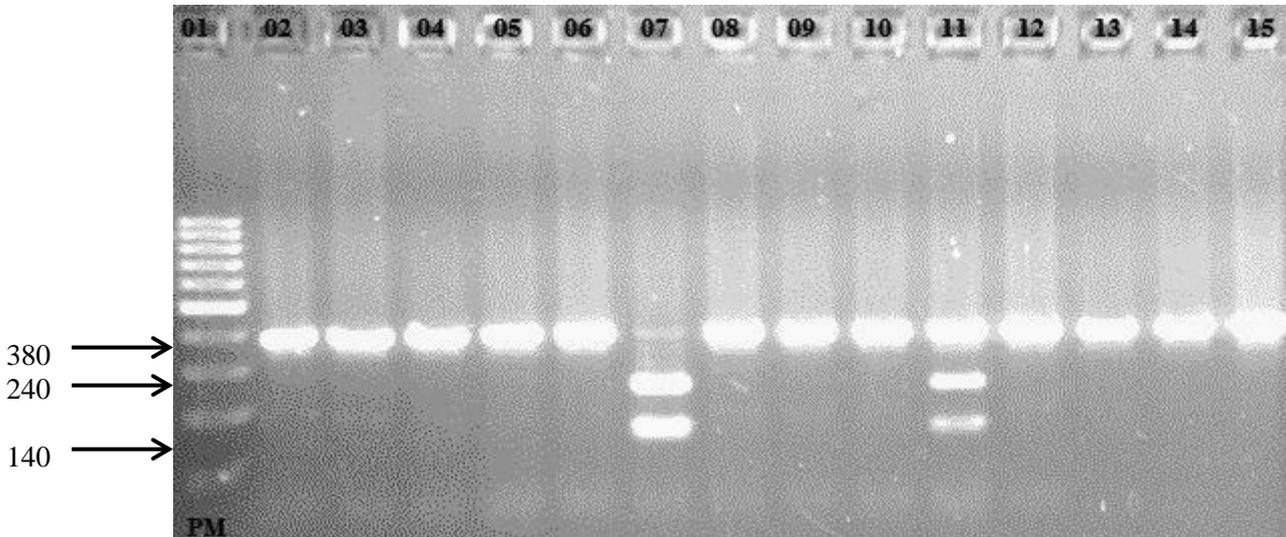
Leitura em Gel de agarose a 1,5% a 80V, por 20 minutos

**Digestão**

MIX	Volume
H <sub>2</sub> O	3,3
Tampão da enzima	1,5
Enzima <i>Hinf I</i>	0,2
Total	5,0

10μL do produto do PCR + 5μL do MIX da enzima, colocar em banho-maria por 5 min a 37°C.

**Figura 20** – Fotografia do gel de agarose 1,5% contendo produtos de PCR obtido com *primers* H3H4 (região 5'β). Na coluna 1 foi aplicado o padrão de peso molecular (PM) em escala de 100 pares de base DNA Ladder. A coluna 11 corresponde à amostra heterozigota que sofreu corte enzimático parcial (+/-). As colunas 02, 04, 05, 06, 08, 09, 10, 12, 13, 14 e 15 referem-se às amostras homozigotas que não sofreram corte enzimático (resultado -). A coluna 07 corresponde à amostra homozigota que sofreu corte enzimático (+/+).



**Fonte:** Análise laboratorial de amostras da pesquisa.

**Tabela 3** - Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.

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

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

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

#### 4.8 ANÁLISE E PROCESSAMENTO DOS RESULTADOS

Para realizar as análises e processamento dos dados, criou-se uma planilha no *software Microsoft Office Excel 2010* com os resultados das análises laboratoriais. A apresentação dos resultados ocorreu por meio de estatística descritiva pelo software estatístico *BioEstat 5.3* (AYRES et al., 2011) utilizando tabelas.

## 5 RESULTADOS

Participaram desse estudo 46 pacientes com anemia falciforme, dos quais 30 (65,2%) eram do sexo masculino e 16 (34,8%) do sexo feminino, as idades variaram entre 02 a 50 anos ( $16.4 \pm 9.6$ ), havendo predominância do grupo étnico caracterizado por negros (43,5%) e 63% residindo no município de Macapá, sendo as características distribuídas conforme a Tabela 4.

**Tabela 04** – Descrição das características dos 46 indivíduos com anemia falciforme, conforme as variáveis sócio-epidemiológicas.

<b>Características sócio-epidemiológicas</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Gênero</b>		
Masculino	30	65.2
Feminino	16	34.8
<b>Faixa etária</b>		
02 – 10 anos	10	21,7
11- 20 anos	24	52,2
21 – 50 anos	12	26,1
<b>Grupo Étnico (Cor)</b>		
Branco	08	17,4
Pardo	18	39.1
Negro	20	43.5
<b>Município que residem</b>		
Laranjal do Jari	01	2.2
Macapá	29	63
Mazagão	07	15.2
Santana	07	15.2
Pracuuba	01	2.2
Oiapoque	01	2.2

Fonte: Instrumentos de coleta de dados.

Dentre as 46 amostras analisadas identificaram-se três tipos de haplótipos (Tabela 5), sendo o haplótipo Bantu (65,2%) mais frequente, seguido do Benin (21,8%) e Senegal (13%). Os haplótipos Camarões, Saudi e atípicos não ocorreram no grupo de estudo.

**Tabela 5** - Distribuição alélica dos haplótipos da globina  $\beta^S$  identificados em indivíduos com AF do Estado do Amapá.

HAPLÓTIPOS $\beta^S$	Frequência alélica n (%)
<b>Bantu</b>	60 (65,2)
<b>Benin</b>	20 (21,8)
<b>Senegal</b>	12 (13)
<b>Total</b>	<b>92 (100)</b>

$\beta^S$ : globina beta - S.

**Fonte:** Análise Molecular.

Com relação aos genótipos (Tabela 6), identificou-se com maior frequência a combinação de haplótipos Bantu/Bantu 22 (47,8%) e com menor frequência, Senegal/Senegal 01 (2,2%).

**Tabela 6** - Distribuição genotípica dos haplótipos  $\beta^S$  em pacientes com anemia falciforme do Amapá.

Genótipos $\beta^S$	n	%
Bantu/Bantu	<b>22</b>	<b>47,8</b>
Bantu/Benin	<b>10</b>	<b>21,7</b>
Bantu/Senegal	<b>06</b>	<b>13,0</b>
Benin/Benin	<b>03</b>	<b>6,5</b>
Benin/Senegal	<b>04</b>	<b>8,7</b>
Senegal/Senegal	<b>01</b>	<b>2,2</b>
<b>Total</b>	<b>46</b>	<b>100</b>

**Fonte:** Análise Molecular

## 6 DISCUSSÃO

A anemia falciforme apresenta grande prevalência mundial, com frequência elevada entre países Africanos, ocorrendo em menor incidência entre os países do Mediterrâneo, principalmente Grécia, Itália e Israel, assim como na Arábia Saudita e Índia. Nos Estados Unidos da América, estima-se que a cada 1: 700 nascimentos há uma pessoa com anemia falciforme, afetando aproximadamente 72.000 pessoas no país; na América do Sul, a anemia falciforme é considerada um problema de saúde pública, uma vez que a Hb S foi historicamente trazida para esta região durante a imigração de africanos, com consequência de alta prevalência nestas populações miscigenadas (NAOUM, 1997; CREARY et al.; 2007; KONDYLLIS-DEBLOIS; FEINGOLD, 1998).

Em países como os do continente Americano, a identificação dos haplótipos permite decifrar as origens étnicas desta população tão miscigenada, uma vez que os haplótipos são considerados marcadores genético-antropológicos. (NAOUM, 1997; RENAULD et al., 1998).

Conforme estudos realizados sobre haplótipos Hb S observa-se que a proporção de pacientes com os diversos haplótipos diverge em diferentes regiões do continente Americano, especialmente no Brasil, que apresenta elevada e importante miscigenação. Na América do Norte e no Caribe predomina o haplótipo Benin seguido pelo Senegal e Bantu, enquanto no Brasil, embora haja certa diversidade regional, de um modo geral, prevalece o haplótipo Bantu seguido do Benin, com pouca frequência de Senegal (ANVISA, 2002; CIPOLOTTI, 2006; FLEMING; NAGEL, 1992; FLEURY, 2007; NAOUM, 2000; PINTO, ZAGO; 2007).

Os dados encontrados no estado do Amapá corroboram com a determinação dos haplótipos da maioria dos estudos brasileiros (Bantu → Benin → Senegal), na qual dentre as 46 amostras (Hb SS) analisadas, determinou-se três tipos de haplótipos: Bantu, Benin e Senegal. Assim, está de acordo com registros históricos que indicam que cerca de 90% dos escravos enviados ao Norte do Brasil eram de Angola, Congo e Moçambique, onde o haplótipo Bantu predomina, verificando-se então que os haplótipos presentes nos genes da Hb S identificados no Amapá são originários de pelo menos três regiões Africanas (CARDOSO; GUERREIRO, 2006; TAVARES, 2011).

Mesmo sendo o haplótipo Bantu prevalente na população de estudo, a frequência observada do haplótipo Senegal apresentou-se elevada em relação a outros Estados do brasileiros, como em Pernambuco, Rio Grande do Norte, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro que há predomínio do haplótipo Bantu e Benin com pouca frequência de Senegal (ABATH et

al., 2007; ADORNO et al., 2003; ARRUDA et al., 1994; CABRAL et al., 2011; FLEURY, 2007; OKUMURA et al., 2013).

Na Colômbia, país da América do Sul, observa-se que há também alta frequência de haplótipo Senegal (Bantu - 36,4 %, Senegal 30,3 %, Benin 21,2 % e Camarões - 12,1 %) (DURÁN, 2012), tal qual existe na região norte do Brasil, todavia, diverge pela baixa frequência de Haplótipo Benin. Enquanto na região Sudeste (especialmente Rio de Janeiro) que recebeu escravos oriundos principalmente de África Central e Sul corresponde ao padrão brasileiro com predominância de Bantu, seguido de Benin e baixa ou nenhuma frequência de Senegal (FLEURY, 2007; OKUMURA et al., 2013).

Esta frequência do haplótipo Senegal no Amapá confirma-se com os dados históricos, indicando que aproximadamente 10% dos escravos da África Atlântico Ocidental foram destinados na região norte brasileira, precisamente de Senegâmbia, Guiné-Bissau e Cabo Verde, onde o haplótipo Senegal é prevalente (CIPOLOTTI et al., 2006; TAVARES, 2011).

Dois estudos realizados no Pará mostraram frequência de Senegal semelhante ao encontrado (10,9% e 12%) (CARDOSO, G. L; GUERREIRO, 2006; 2010), na qual se torna referência, uma vez que o estado do Amapá pertenceu ao Pará, estimando-se assim, que a população seja de origens etnológicas equivalentes (COSTA; SARNEY, 1998).

Em uma comunidade Amapaense (Curiau) situada dentro da capital e semi-isolada, alguns resultados de estudos realizados foram semelhantes aos encontrados neste trabalho sendo 50% Bantu, 17% Benin e 33% Senegal, atribuindo-se especialmente a fatores como efeito fundador junto à contribuição da população da Guiana francesa que migrava para região norte do Brasil, uma vez que entre os escravos trazidos a este país a maioria era de Senegâmbia e Guiné na África Ocidental. Assim, estes resultados indicam que a contribuição dos povos da África Ocidental para a formação das populações amazônicas foi heterogênea (GUERREIRO 1999; AGUIAR et al., 1999).

Já a região nordeste foi fortemente abastecida com escravos da África Central Ocidental, onde o haplótipo Benin predomina (FLEURY, 2007; GUERREIRO, 1998). Desta forma, divergindo da distribuição padrão brasileira e da frequência de haplótipos amapaenses, observa-se os dados encontrados nesta região (Ceará; Bahia) (ADORNO et al., 2003; FARIAS et al., 2005) com alta frequência de haplótipo Benin, equiparando-se ao padrão de haplótipos de Venezuela e Estados Unidos da América (BLANCO et al. 2002; STEIMBERG et al. 1995).

Nos Estados Unidos, diferente do Brasil, por meio do estudo de Steimberg et al. (1995) observou-se que há maior frequência de haplótipo Benin (61,3%), seguido de Bantu

(21,5%) e Senegal (16,2%), sendo que a baixa frequência dos haplótipos Bantu e Senegal entre a população norte americana é reflexo do tráfico britânico de escravos durante o século XVIII. Igualmente, na Venezuela há maior frequência para o haplótipo Benin (47,9%), seguido pelos haplótipos CAR ou Bantu (40,6%), Atípico (6,3%), Senegal (3,1%) e Árabe-Indiano (2,1%) (BLANCO et al. 2002).

Esta distribuição reflete muito bem a proporção de africanos de diferentes regiões trazidos ao continente Americano durante o período de tráfico de escravos, especialmente ao Brasil, que possui característica diversa daquela observada em qualquer outra área de prevalência da anemia falciforme, e por esse motivo, esta doença apresenta particularidades na população brasileira (AURICCHIO, 2007; PINTO, ZAGO, 2007).

Nos dados amapaenses há considerável frequência de haplótipo Benin, divergindo dos registros históricos que sugerem menor frequência de pessoas de Benin (cerca de 2,9%), portanto, quando confrontados com a frequência padrão brasileira, tanto Pará quanto Amapá apresenta elevada frequência de Benin divergindo de dados históricos. Estes resultados provavelmente devem-se ao comércio de escravos domésticos e migrações internas de outras regiões (Bahia, Pernambuco, Maranhão e Rio de Janeiro) para o norte, já que não há registros históricos de comércio de escravos direto da África Ocidental Central para a região norte (CARDOSO; GUERREIRO, 2006; 2010; GUERREIRO et al., 1998).

Ressalta-se que no presente estudo não foram encontrados haplótipos Camarões e Saudi, semelhante ao estudo de Adorno et al., 2003 realizado na Bahia que não identificaram Camarões e Saudi, entretanto, neste estudo foram determinados haplótipos Atípicos, divergente dos dados amapaenses que não há Atípicos.

As identificações genóticas dos haplótipos amapaenses são bastante relevantes quando comparadas a outras pesquisas, pois, no Amapá determinou-se uma alta frequência de homozigose Bantu/Bantu (47,8%), divergindo de outros Estados, como na Bahia, onde a maior frequência encontra-se na heterozigose Bantu/Benin (ADORNO et al., 2008).

A análise das características de grupos de genótipos formados por haplótipos diferentes é dificultada quando há presença de heterozigose (STEINBERG, 1996). No entanto, somente na África ainda é possível o encontro de populações totalmente homozigotas, pois ao longo dos anos em outros países os haplótipos se miscigenaram. Nas populações do continente americano as pessoas com anemia falciforme são haplotipicamente heterozigotas (NAOUM; DOMINGOS, 1997).

As combinações genóticas resultando na alta frequência de homozigose Bantu/Bantu, com identificações de somente três haplótipos e principalmente ausência de

atípicos, sugerem que no Amapá há pouca miscigenação, conseqüentemente migração, com ligações restritas de seus grupos fundadores. Esta informação está de acordo com Aguiar et al., 1999 que descreve que a região amazônica brasileira abriga diversas comunidades formadas por descendentes africanos, algumas das quais ainda relativamente isoladas, apresentando pequena proporção de imigrantes, sugerindo que houve a existência de uma barreira relativamente forte contra mistura inter-étnica. Assim, observa-se que as pessoas com anemia falciforme do Amapá apresentam características únicas, revelando parâmetros incomuns quando comparados a outras regiões, pois há alta frequência de Senegal, Benin e ausência de Atípicos, Camarões e Saudi.

## 7 CONCLUSÕES

- A população de Anemia Falciforme do presente estudo apresentou frequência de três principais haplótipos originários da etnia africana: Bantu, Benin e Senegal.
- Mesmo o haplótipo Bantu sendo o mais prevalente, há significativa frequência de haplótipo Senegal e Benin, estando de acordo com os registros históricos de migração africana para região norte brasileira.
- Observa-se alta frequência genotípica de homozigose para haplótipo Bantu.
- Divergente da maioria das regiões brasileiras não houve determinação de haplótipos Atípicos na população Amapaense.
- Os resultados encontrados permitem verificar que o Amapá ainda recebe influência de seus grupos fundadores, possui pequena variabilidade genética, com pouca miscigenação, ocasionada principalmente em decorrência do semi-isolamento desses grupos.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABATH, F.G.C. et al. Molecular variations linked to the grouping of  $\beta$ - and  $\alpha$ -globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. **Hemoglobin**, v.31, n.1, p. 83–88, 2007.
- ADORNO, E. V. et al.  $\beta$ S-Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1283-1288, 2003
- AGUIAR, G. F. S. et al. Genetical-Demographic Data From Two Amazonian Populations Composed of Descendants of African Slaves: Pacoval and Curiau. **Genetics and Molecular Biology**. v.22 n.2, 1999.
- ALMEIDA FILHO, N.; ROUQUAYROL, M. Z. **Epidemiologia & saúde**. 6ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003.
- ANAGNOU, H. et al. **HbVar: A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias**. 2013. Disponível em: <<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>>. Acesso em: 05. Ago. 2013.
- ÂNGULO, Ivan et al. Consenso Brasileiro em Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas: Comitê de Hemoglobinopatias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 32, p: 46-53, 2010.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de diagnóstico e tratamento de doença falciforme**. Brasília, 2002. 142p.
- ARAÚJO, P. I. C. O autocuidado na doença falciforme. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.29, p.239-246, 2007.
- ARRUDA, V. R. et al. Sickle cell disease in a Brazilian population from São Paulo: A study of the  $\beta^S$  haplotypes. **Human Heredity**, v. 44, p. 322- 327, 1994.
- AURICCHIO, M. T. B. M. **Frequency and Origins of Hemoglobin S Mutation in African-Derived Brazilian Populations**. *Human Biology*, v. 79, n.6, p.667-677, 2007.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.3: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. 5ª ed. Belém-PA: Publicações Avulsas do Mamirauá, p. 361, 2011.
- BALDIN, P.E et al. Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.33, p. 49-54, 2011.
- BARBOSA, I.V et al. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 375-381, 2010.
- BARROS, G. M. N. et al. Transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) em doenças falciformes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, p: 327-330, 2007.

BIO-RAD. Variant  $\beta$  thalassemia short program Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories, 1999.

BLANCO, Zorella et al. **Beta-globin gene cluster haplotypes in Venezuelan sickle cell patients from the State of Aragua.** *Genetics and Molecular Biology*, v.25, n.1, 2002.

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

BONINI-DOMINGOS, C. R.; NAOUM, P. C. Doença falciforme no Brasil. Origem, genótipos, haplótipos e distribuição geográfica. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 33, n. 3, p. 145-153, 1997.

BRAGA, J. A. P. Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.29. p. 233-238, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de Educação em Saúde: autocuidado na Doença Falciforme.** Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 78p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de educação em saúde: linha de cuidado em doença falciforme.** Brasília: Ministério da Saúde, v. 2 (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2009. 35 p.

BRITO, D. M. C; DIAS, T.C.A.C; DRUMMOND, J.A. **Atlas das unidades de conservação do Estado do Amapá.** AMAPÁ: MMA/IBAMA/GEA/SEMA, 2008.

BUSTAMANTE, M. T. T. et al. Diagnóstico histórico da triagem neonatal para doença falciforme. **Revista APS**, v. 13, p. 34-45, 2010.

CABRAL, C.H.K et al. Determination of  $\beta$ s haplotypes in patients with sickle-cell anemia in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 421-424, 2011.

CAMPBELL, G. et al.  **$\beta$ -globin haplotype analysis suggests that a saior source of Malagasy ancestry is derived from Bantu-speaking negroids.** *American Journal of Human Genetics*, v.58, p.1303-1308, 1996.

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

CARDOSO, G. L; GUERREIRO, J. F. African Gene Flow to North Brazil as Revealed by HBB\*S Gene Haplotype Analysis. **American Journal of Human Biology**, v. 18, p. 93–98, 2006.

\_\_\_\_\_. Molecular Characterization of Sickle Cell Anemia in the Northern Brazilian State of Para. **American Journal of Human Biology**, v. 22, p. 573–577, 2010.

CASTILHOS, J. K. **Análise de haplótipos  $\beta$ S em pacientes com anemia falciforme de Porto Alegre – RS.** 2008. Trabalho de Conclusão de Curso II, Centro Universitário Feevale, Instituto de Ciências da Saúde, Nova Hamburgo, 2008.

CIPOLOTTI, Rosana et al. Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo bantu da anemia falciforme. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.28, p.40-44, 2006.

COELHO, G. O; GUIMARÃES, C. T. L. A importância do aconselhamento genético na anemia falciforme. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.15, p.1733-1740, 2010.

CONNOLLY, M.M. et al. The hematologic characteristics of sickle cell anemia bearing the Bantu haplotype: the relationship between G gamma and HbF level. **Blood**, v. 69, p. 1026-1030, 1987.

CONSERVAÇÃO INTERNACIONAL DO BRASIL. GOVERNO DO ESTADO DO AMAPÁ. SECRETÁRIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE DO AMAPÁ. **Corredor de Biodiversidade do Amapá**. Belém, PA, 2009.

COSTA, P; SARNEY, J. **Amapá: a terra onde o Brasil começa**. Brasília: Senado Federal, 1998, 240p.

CREARY, M.; WILLIAMSON, D.; KULKARNI, R. Sickle cell disease: current activities, public health implications, and future directions. **Journal. Womens Health**, v. 16, n. 5, p. 575-582,

DESAI, D.V; DHANANI, Hiren. Sickle cell disease: history and origin. **The internet Journal of hematology**, v.1, 2004.

DI NUZZO, Dayana V. P.; FONSECA, Silvana F. Anemia falciforme e infecções. **Jornal de Pediatria**, v.80, p.347-354, 2004.

DINIZ, D; GUEDES, C. Anemia Falciforme: Um Problema Nosso - uma abordagem bioética sobre a nova genética. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, p.1761-1770, 2003.

DURÁN, C. L. et al. **Haplotipos del gen de la globina beta en portadores de hemoglobina S en Colombia**. *Biomédica*, v. 32, p. 103 – 111, 2012.

FARIAS, D. A. B. et al. Análise dos haplótipos do gene da  $\beta$ S-globina no Ceará. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, p. 315-321, 2005.

FERRAZ M. H. C; MURAO M.. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.29, p. 218-222, 2007.

FIGUEIREDO, Maria Stella. Agentes indutores da síntese de hemoglobina fetal. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.29, p.313-315, 2007.

FLEMING, A. F; NAGEL, R.L. Genetic epidemiology of the  $\beta$ s gene. **Baillier's Clinical Hematology**, v. 5, n.2, 1992.

FLEURY, Marcos K. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista brasileira de análises clínicas**, vol. 39, p.89-93, 2007.

FRY, P. H. O significado da anemia falciforme no contexto da 'política racial' do governo brasileiro 1995-2004. **Manguinhos - História, Ciências, Saúde**, v. 12, p. 347-70, 2005.

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

GALLOIS, D. T; GRUPIONI, D. F. **Povos Indígenas no Amapá e Norte do Pará: quem são, onde estão, quantos são, como vivem e o que pensam?**. São Paulo: Instituto de Pesquisa e Formação em Educação Indígena, Núcleo de História Indígena e do Indigenismo da Universidade de São Paulo, 2003, 96 p.

GARANITO, Marlene Pereira. Hemoglobinopatias – Interpretação do teste de triagem neonatal. **Pediatria**, v. 30, p. 172-176, 2008.

GIRALDI, T; MAGNA, L. A; RAMALHO, A. S. Estudo genético-epidemiológico da hemoglobina S em uma população do Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 30, n. 2, p.89-94, 2008.

GRISÓLIA, César Kope et al. **Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil**. Caderno de Saúde Pública, v.22, p.2561-2566, 2006.

GUERREIRO, J. F. et al. Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 4, 1998.

GUERREIRO, J. F.  $\beta$ -globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. **Annals of Human Biology**, v. 26, n. 4, p. 365-373, 1999.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo 2012: população do Brasil**, 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias=1766>>. Acesso em: 10 Jul. 2012.

INCRA. Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária. **Regularização de territórios quilombolas terá reforço no Amapá**, 2012. Disponível em: <<http://www.incra.gov.br>>. Acesso em: 10 Ago. 2013.

ITANO, H.A; WELLS, I.C; NEEL, J. V. Familial differences in the proportion of abnormal hemoglobin present in the sickle cell trait. **Journal of Clinical Investigation**, v.30, p. 1120–1124, 1951.

JOHN KARK, M.D. **Sickle Cell Trait**. 2000. Disponível em: <[http://sickle.bwh.harvard.edu/Sickle\\_trait.html](http://sickle.bwh.harvard.edu/Sickle_trait.html)>. Acesso em: 03. Ago.2013.

KIKUCHI, B. A. Assistência de enfermagem na doença falciforme nos serviços de atenção básica. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 29, p. 331-338, 2007.

KONDYLIS-DEBLOIS, K.; FEINGOLD, M. Sickle cell disease. **Primary Care Update for OB/GYNS**, v. 5, n. 1, p. 28-31, 1998.

LOBO, C; MARRA, V. N; SILVA, R. M. G. Crises dolorosas na doença falciforme. **Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.29, p.247-258, 2007.

LOUREIRO, Monique Morgado. **Epidemiologia das internações hospitalares e tratamento farmacológico dos eventos agudos em Doença Falciforme**. Tese (Doutorado em Saúde pública) – Rio de Janeiro, Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz, 2006. 130p.

MAIA, Adriana Cristina Salvador et al. Incidência de anemia falciforme, traço falcêmico e perfil hemoglobínico dos casos diagnosticado na triagem neonatal no estado de Rondônia no ano de 2003. **Saber Científico**, v.2, p. 44-54, 2009

MANFREDINI, V.; ZANATTA, T. Comparação entre métodos laboratoriais de diagnóstico de Doenças Falciformes. **Revista Newslab**, v.94, p. 180-194, 2009.

MANFREDINI, Vanusa; STYPULKOWSKI, Jaíne B. Alterações hemostáticas em pacientes com doença falciforme. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, 2009.

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

MOAFI, A. R. et al.  $\beta^S$  gene in Central Iran is in linkage disequilibrium with the Indian–Arab haplotype. **American Journal of Hematology**, v. 65, p.192–195, 2000.

MOTTA, Valter T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. Porto Alegre: Médica Missau, 2003.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. 1.ed. São Paulo: Savier, 1997.

\_\_\_\_\_. Prevalência e controle da Hemoglobina S. **Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.22, p.142-148, 2000.

\_\_\_\_\_. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.22, p.05-22, 2000.

\_\_\_\_\_. **Eletroforeses: hemoglobinopatias, proteínas séricas, lipoproteínas, DNA**. São Paulo: Santos, 2012

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

OKUMURA, J.V, LOBO C.L.C, BONINI-DOMINGOS C.R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, p. 9-10, 2013.

OLIVEIRA, R. A. G. **Hemograma: Como fazer e interpretar**. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2007.

PENA, S. D. J. Razões para banir o conceito de raça da medicina brasileira. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 12, n. 1, p. 321-46, 2005.

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

PITALUGA, W. V. C. **Avaliação da qualidade de vida de portadores de anemia falciforme**. 2006. 118 f. Dissertação (Mestrado em Psicologia) – Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2006.

PROVAN, A.B; WEATHERALL, D. J. Red cells I: inherited anaemias. **The Lancet**, v. 355, p. 1169-1175, 2000.

RENAULD, G. F. S; ROMERO, W. E. R; VILLALOBOS, M. A. C. Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 3, p. 1 -6, 1998.

RUIZ, M. A. Anemia falciforme - objetivos e resultados no tratamento de uma doença de saúde pública no Brasil. **Revista brasileira de hematologia hemoterapia**, v.29, p.203-206, 2007.

SAIKI, R.K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**. v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITCSH, E.F.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, ed.2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SILVA, K. R.; YAMAGUCHI, M. U. Os benefícios da inclusão das hemoglobinopatias na triagem neonatal. **Arquivo Ciência e Saúde Unipar**, Umuarama, v. 11, p. 67-73, 2007.

SILVA, Michelle C.; SHIMAUTI, Eliana L. T. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.28, 2006.

SILVA, R. B. L. **A etnobotânica de plantas medicinais da comunidade quilombola de Curiaú, Macapá-AP, Brasil**. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2002, 172 p.

SILVA. E. L.; MENEZES. E. M. **Metodologia da pesquisa e elaboração de dissertação**. 3. ed. rev. atual. – Florianópolis: Laboratório de Ensino a Distância da UFSC, p. 121, 2001.

STEINBERG, M. H et al. A  $\beta$ -globin gene haplotype in Hb SC disease. **American Journal of Hematology**, v. 52, p. 189-191, 1996.

STEINBERG, M. H.; BALLAS, S. K.; BRUNSON; BOOKCHIN, R. Sickle cell anemia in septuagenarians. **Blood**, v. 86, p. 3997-3998, 1995.

STEINBERG, M.H. Predicting clinical severity in sickle cell anemia. **Journal of Hematology**, v. 129, p. 465–481, 2005.

\_\_\_\_\_. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **The Scientific World Journal**, v. 9, p. 46–67, 2009.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R.L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of  $\beta$ -like globin gene *cluster* haplotypes. **American Journal of Hematology**, v. 32, p. 66-69, 1989.

TAVARES, M.G.C. A Amazônia brasileira: formação histórico-territorial e perspectivas para o século XXI. **GEOUSP - Espaço e Tempo**, n. 29, p. 107 - 121, 2011.

THOMPSON, J. et al. **Genética médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

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

VERÍSSIMO, Mônica P. A. Aplasia transitória da série vermelha na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, p. 268-270, 2007.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_, nascido em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, Etnia  
(Cor) \_\_\_\_\_ e domiciliado  
à \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, município de \_\_\_\_\_.

---

Declaro que aceito participar como voluntário do projeto “**Identificação de haplótipos do gene da globina- $\beta$ S em pessoas com anemia falciforme do estado do Amapá**”, sob responsabilidade da pesquisadora **Natália de Moraes Castelo**. Declaro que fui satisfatoriamente esclarecido que: A) o estudo será realizado a partir da coleta de amostra de sangue com objetivo de realizar as análises laboratoriais, bem como, a partir da entrevista por meio de um questionário sobre os aspectos clínicos relacionados à anemia falciforme; B) que os riscos serão mínimos, não afetando a minha saúde; C) que posso consultar a pesquisadora responsável em qualquer época, pessoalmente ou por telefone, para esclarecimento de qualquer dúvida; D) que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa e que não preciso apresentar justificativas para isso; E) que todas as informações por mim fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo e que, estes últimos serão utilizados somente para divulgação em reuniões e revistas científicas sem a minha identificação; F) que serei informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato de mudar meu consentimento em participar da pesquisa; G) que não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa; H) que esta pesquisa é importante para o estudo, pois esta é a primeira pesquisa realizada no estado do Amapá que possibilitará conhecer a variabilidade genética relacionada à diversidade étnica e a gravidade clínica da doença, contribuindo desta forma, com maior e melhor

entendimento sobre aspectos moleculares e étnicos da anemia falciforme no estado do Amapá, tornando-se assim, um acréscimo para o surgimento de novas ações de políticas públicas em benefício das pessoas com anemia falciforme, uma vez que a partir da divulgação deste estudo, a sociedade passará a conhecer o perfil genético-epidemiológico da doença no estado do Amapá, bem como, tornando-se subsídio para novos estudos que possam beneficiar as pessoas falciformes. Assim, aceito participar do projeto de pesquisa em questão.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

\_\_\_\_\_  
Voluntário

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

OBS: Este termo de apresenta-se em duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante legal e a outra ao pesquisador.

---

## CONTATOS

**Pesquisadora Responsável:** Natália de Moraes Castelo

**Telefones para contato:** (96) 3217-2317 / (96) 8118-2837

**E-mail:** natalia.castelo@hotmail.com

**Orientadora:** Profa. Dra. Artemis Socorro do Nascimento Rodrigues

**Telefone para contato:** (96) 9975-3976

**E-mail:** artemis@unifap.br

**Telefone do CEP-UNIFAP:** (96) 3312-1740

**E-mail:** comitedeetica@unifap.br

**APENDICE B – CARTA DE AUTORIZAÇÃO DO INSTITUTO DE HEMATOLOGIA  
E HEMOTERAPIA DO ESTADO DO AMAPÁ (HEMOAP)**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**

**Comitê de Ética em Pesquisa**

**CARTA DE AUTORIZAÇÃO DO INSTITUTO DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO DO AMAPÁ (HEMOAP)**

Esta pesquisa tem como objetivo **IDENTIFICAR OS HAPLÓTIPOS DO GENE DA GLOBINA – B<sup>S</sup> EM PESSOAS COM ANEMIA FALCIFORME DO ESTADO DO AMAPÁ**. Portanto, necessita-se realizar coletas de amostras de sangue em pessoas com anemia falciforme do estado do Amapá.

Para tal, solicitamos auxílio deste instituto na triagem dos participantes por meio de informações do banco de dados, viabilizando o contato destes; apoio para a aplicação de nossos instrumentos de coleta de dados; e principalmente para coleta de amostras de sangue com subsídio de um profissional técnico para realização da mesma, bem como espaço para armazenamento das amostras.

O material e o contato interpessoal oferecerão riscos mínimos aos participantes e à instituição. Sendo que os riscos serão aqueles referentes à coleta de sangue, como pequenos sangramentos e hematomas que poderão desaparecer em horas ou dias, e em busca de não ocorrer ou minimizar estes riscos, solicitamos o auxílio de um profissional habilitado para realização desta coleta, na qual junto com o pesquisador responsável prestará as devidas orientações pré e pós-coleta aos participantes da pesquisa.

Os indivíduos não serão obrigados a participar da pesquisa, podendo desistir a qualquer momento. Tudo o que for falado e/ou os resultados obtidos serão confidenciais, sendo usados em publicações, sem a identificação dos participantes.

Qualquer dúvida que existir será esclarecida, bastando entrar em contato conosco no telefone abaixo mencionado.

De acordo com estes termos, favor assinar abaixo. Uma cópia ficará com a instituição e outra com os pesquisadores.

Desde já, agradecemos à colaboração.

Atenciosamente,

Pesquisadora Responsável: Natália de Moraes Castelo

Orientadora: Profa. Dra. Artemis Socorro do Nascimento Rodrigues

Telefone para contato: (96) 8118-2837/ (96) 9129-9578

Assinatura da Pesquisadora Responsável

Assinatura da Orientadora



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**

**Comitê de Ética em Pesquisa**

**CARTA DE AUTORIZAÇÃO DO INSTITUTO DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO DO AMAPÁ (HEMOAP)**

Pelo presente instrumento, que atende às exigências legais, o senhor **IVAN DANIEL DA SILVA AMANAJÁS**, responsável legal pelo Hemoap, situado na cidade de Macapá, na Av.Raimundo Alvares da Costa - Centro, está ciente dos serviços e procedimentos aos quais **serão submetidos os participantes da pesquisa**, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e do explicado, firma sua **concordância em autorizar a realização** da pesquisa proposta.

Fica claro que os participantes da pesquisa ou seu representante legal podem a qualquer momento, retirar seu **CONSENTIMENTO** e deixar de participar do estudo e fica ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial, guardada por força do sigilo profissional.

Macapá – AP, 08 de Novembro de 2011

Assinatura do representante da instituição

## ANEXO A – CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo no. FR-476933/2012 – CEP sobre **"IDENTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS DO GENE DA GLOBINA-BS EM PESSOAS COM ANEMIA FALCIFORME DO ESTADO DO AMAPÁ"**, sob a responsabilidade de **Natália de Moraes Castelo**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Humana, adotados pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), em reunião realizada em 16/02/2012.

**Data para apresentação do relatório no CEP-UNIFAP: 15/02/2013**

### **CERTIFICATE**

We certify that the protocol number FR-476933/2012 – CEP about **"IDENTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS DO GENE DA GLOBINA-BS EM PESSOAS COM ANEMIA FALCIFORME DO ESTADO DO AMAPÁ"**, **Natália de Moraes Castelo** is in agreement with the Ethical Principles in Human Research adapted by National Ethical Committee (CONEP) and was approved by the Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) – Ethical Committee for Research (CEP) in 16/02/2012.

Macapá, 16 de fevereiro de 2012

Prof. Msc. Alexandre Souto Santiago  
*Coordenador - CEP-UNIFAP*

Universidade Federal do Amapá  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP - UNIFAP  
Rod. JK km 2, Marco Zero CEP 68908-130 – Macapá – AP - Brasil  
Email: cep@unifap.br

