

Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Medicina Clínica

Estudo dos haplótipos da anemia falciforme e sua relação com
as origens étnicas da população negra no Ceará

Gentil Claudino de Galiza Neto

Dra. Maria da Silva Pitombeira
Orientadora

Dra. Maria Laíse Chaves Vieira
Co-orientadora

Dissertação apresentada
como requisito final
do curso de pós-graduação
em Medicina Clínica da
Universidade Federal do Ceará
para obtenção do Título
de Mestre em Clínica Médica

Fortaleza – 2001



13841967
25/08/05

G156e Galiza Neto, Gentil Claudino de
Estudo dos haplótipos da anemia falciforme e sua relação com as origens étnicas da população negra no Ceará / Gentil Claudino de Galiza Neto. – Fortaleza, 2001.
94 f. : il.
Orientadora: Profª. Dra. Maria da Silva Pitombeira
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Departamento de Medicina Clínica.

1. Anemia Falciforme. 2. Doença falcêmica. 3. Anemia hemolítica. 4. Haplótipos da Hb S. I. Título.

CDD 616.1527

Ao Prof. Dr. Mário Rigatto,
in memoriam,
exemplo ímpar de humanismo
dedicado à pesquisa e ao ensino da MEDICINA.



AGRADECIMENTOS

A DEUS, nosso Senhor, pela dádiva eterna da vida.

A Prof.^a Dra. Maria da Silva Pitombeira (Dra. Helena), por seu apoio e confiança na execução desse trabalho, exemplo maior de amor a nossa hematologia.

Ao Serviço de Hematologia e Hemoterapia da UFC, especialmente a Prof.^a Dra. Clara Maria Bastos Eloy da Costa, Dra. Rosângela Albuquerque Ribeiro R. Holanda, Dr. Ormando R. Campos, Dr. Herivaldo F. Silva, Dra. Vânia F. Gomes, pelo estímulo contínuo para a execução deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFC, especialmente a Prof.^a Dra. Maria Laise Chaves Vieira, ao Prof. Dr. Hélio Frota Vieira e aos Farmacêuticos Dr. Danúbio Andrade B. Farias, Dra. Aíla Maria F. Duarte, e ao Técnico em Química Francisco Rodrigo de L. Caldas, por possibilitarem a realização da análise molecular e pelo apoio científico.

Aos Farmacêuticos, Dr. Marcos Antônio Martins da Silva, Dra. Ana Cláudia M. Sobreira, Dra. Rita Marinei de V. Coelho, Dra. Fátima Marques B. Lima; a auxiliar de laboratório Kátia Valéria L. Oliveira, a secretária executiva Maria Jeovani A. Souza, profissionais do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará-Hemoce, pelo apoio técnico e calor humano.



A Prof^a Rosa Maria Salani Mota, do Departamento de Estatística da UFC, pelo competente auxílio nas análises dos nossos resultados.

Ao Departamento de Medicina Clínica da UFC, em especial a Prof^a Dra. Lúcia Libanez Bessa C. Braga, pela consideração e estímulo ao longo deste estudo.

Aos pacientes com anemia falciforme, do Serviço de Hematologia da UFC, por me permitirem atendê-los e estudá-los através deste trabalho, com o qual espero contribuir para a melhoria de seu atendimento.

Aos colegas do curso de mestrado em Clínica Médica, pelos exemplos de companheirismo e estímulo mútuos, exercitados ao longo do profícuo caminho da pós-graduação.

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa – Funcap, pelo apoio financeiro a esse projeto de pesquisa.



SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Siglas/Abreviaturas

Resumo

1. Introdução

1.1- A Hemoglobina..... 17

1.2- A Anemia Falciforme..... 22

1.3- Os Haplótipos da mutação β^S 28

1.4- A anemia falciforme no Brasil e no Ceará..... 32

1.5- As origens étnicas da população negra no Ceará..... 34

2. Objetivos..... 39

3. Material e Métodos

4.1- Casuística..... 41

4.2- Análise hematológica..... 42

4.3- Análises eletroforéticas da hemoglobina..... 42

4.4- Análise molecular..... 43

4.5- Pesquisa e análise antropológica, histórica e geográfica..... 48

4.6- Método estatístico..... 49

4. Resultados

5.1-Dados gerais..... 51

5.2- Estudos eletroforéticos..... 54

5.3- Estudo dos haplótipos..... 55

5.4- Dados demográficos do Brasil e do Ceará..... 66

5. Discussão.....	69
6. Conclusão.....	76
7. <i>Summary</i>	78
8. Referências Bibliográficas.....	80
9. Apêndices.....	89

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados hematológicas dos 22 pacientes falcêmicos.....53
- Tabela 2.** Dados laboratoriais dos 22 pacientes falcêmicos segundo o sexo.....53
- Tabela 3.** Resultados das digestões enzimáticas dos produtos PCR de cada um dos 22 pacientes com anemia falciforme.....64
- Tabela 4.** Distribuição percentual das frequências dos haplótipos, por cromossomo, no grupo de 22 pacientes estudados.....65
- Tabela 5.** Distribuição das variáveis laboratoriais dos pacientes portadores de anemia falciforme, de acordo com seus haplótipos.....65
- Tabela 6.** Distribuição dos valores laboratoriais médios (X) hematológicos dos pacientes com haplótipo CAR, Benin e Senegal.....66
- Tabela 7.** Distribuição da população brasileira por etnia/cor.....67
- Tabela 8.** Distribuição da população do estado do Ceará por etnia/cor.....67

Tabela 9. Distribuição das frequências (%) dos haplótipos CAR, Benin e Senegal em diversas populações do Brasil.....72

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da cadeia β da Hemoglobina.....18
- Figura 2.** Complexo do gene alfa localizado no cromossomo 16 e complexo do gene beta localizado no cromossomo 11.....19
- Figura 3.** Representação esquemática da produção relativa das cadeias polipeptídicas das hemoglobinas presentes no período fetal e pós-nascimento.....21
- Figura 4.** Representação esquemática da mutação gênica responsável pelo surgimento da hemoglobina S.....24
- Figura 5.** Representação esquemática do processo de indução à falcização das hemácias pela polimerização da desoxihemoglobina diante da baixa concentração de oxigênio.....26
- Figura 6.** Mapa do continente africano com a localização das regiões de origem dos principais haplótipos da anemia falciforme.....30
- Figura 7.** Principais haplótipos do complexo do gene β^S definido por 13 enzimas de restrição, adaptado de Powars D.R. (1991).....31

Figura 8. Direção, posição e seqüência dos primers utilizados nas ampliações dos sequências do gene β^S , seguindo adaptação de Sutton e colaboradores.....	47
Figura 9. Localização dos sítios polimórficos utilizados para a definição dos haplótipos ligados ao gene β^S	48
Figura 10. Distribuição por faixa etária, dos 22 pacientes com anemia falciforme avaliados no presente estudo.....	52
Figura 11. Apresentação dos resultados dos estudos de eletroforese de hemoglobina em pH 8,6 (alcalino) e 6,2 (ácido).....	54
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, para visualização do produto de amplificação do DNA por técnica de PCR.....	57
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose do fragmento amplificado com os <i>primers</i> H2-H3, após digestão enzimática com a enzima Hind III.....	58
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado pelo brometo de etídio, para visualização do resultado da digestão enzimática com a enzima Ava II, do fragmento amplificado com os <i>primers</i> CD5A-CD6A.....	59

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado pelo brometo de etídio, para visualização do resultado da digestão enzimática com a enzima Hinc II, do fragmento amplificado com os *primers* H7-H8.....60

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado pelo brometo de etídio, para visualização do resultado da digestão enzimática com a enzima Hinf I, do fragmento amplificado com os *primers* H9-H10.....61

Figura 17. Distribuição percentual das freqüências dos genótipos, relativos aos haplótipos, no grupo de 22 pacientes estudados.....63

LISTA DE SIGLAS/ABREVIATURAS

AVC	Acidente vascular cerebral
BA	Bahia
CE	Ceará
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
DNA	Ácido desoxirribonucléico
CLB	Solução de extração de DNA leucocitário
DO	Densidade óptica
Hb	Hemoglobina
Hb A ₂	Hemoglobina A 2 (dois)
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb S	Hemoglobina S (“esse”)
Hb SS	Hemoglobinopatia SS
IVS	Seqüência interveniente
IRC	Insuficiência Renal Crônica
Kb	Quilo base
LDH	Lactatodesidrogenase
MMII	Membros inferiores
PCR	Reação em cadeia mediada pela Polimerase
SP	São Paulo
SLB	Solução de extração de DNA leucocitário
UV	Ultravioleta
ψ	Phí (Fi)
μL	microlítro

RESUMO

A anemia falciforme é uma das mais importantes patologias hematológicas que acomete expressiva parcela da população mundial. As pesquisas realizadas para a elucidação da sua natureza genética deram origem a um novo ramo da ciência, denominado biologia molecular. A descoberta dos polimorfismos da mutação β^S definiu os cinco principais haplótipos da doença e possibilitou a compreensão das variações clínicas com que ela se apresenta em diferentes regiões. O presente trabalho estudou um grupo de 22 pacientes, originários do Ceará até a terceira geração, os haplótipos da anemia falciforme, e correlacionou os resultados obtidos das análises moleculares aos registros históricos sobre as origens da população negra deste estado. Foram realizadas as seguintes análises laboratoriais: determinação da Hb e do Ht, VCM, HCM, CHCM e concentração da Hb Fetal. Realizou-se ainda o estudo dos haplótipos da anemia falciforme com as enzimas Hind III, Hinc II, Hinf I e Ava II. Os resultados de laboratório mantiveram-se dentro dos padrões já conhecidos para a patologia, apenas observando-se uma macrocitose mais intensa ($VCM = 105 \pm 5,57$ fL). Em relação aos haplótipos verificou-se um predomínio para o subtipo Benin e CAR, respectivamente 43% e 32%, no grupo analisado e esse resultado assemelha-se com o encontrado na cidade de Salvador/Bahia. Na correlação com os dados históricos, a análise molecular parece confirmar as origens da população negra trazida ao Ceará, como oriunda de Angola, Costa da Mina, Congo e Moçambique.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1 A Hemoglobina

A hemoglobina é a proteína respiratória presente no interior dos eritrócitos dos mamíferos que tem, como principal função, o transporte de oxigênio (O₂) por todo o organismo. A sua estrutura (**Figura 1**) é de uma proteína esferóide, globular, formada por quatro sub-unidades, compostas de dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas, sendo um par denominado de cadeias tipo alfa (α -alfa e ζ -zeta) e o outro de cadeias tipo não alfa (beta- β , delta- δ , gama- γ e ϵ -épsilon). Essa estrutura, quimicamente ligada a um núcleo prostético de ferro, forma a ferroprotoporfirina IX (heme), o qual detém a propriedade de receber, reter e/ou liberar o oxigênio nos tecidos (Dacie, 1984; Fairbanks, 1987). A concentração molecular de hemoglobina no interior de uma hemácia é de, aproximadamente, 300 milhões de moléculas (Wintrobe, 1999; Ranney & Sharma, 2001).

Cada cadeia polipeptídica da globina é composta por uma seqüência de aminoácidos, tendo as cadeias alfa 141 aminoácidos e as cadeias não alfa 146 aminoácidos. As combinações entre as diferentes cadeias de proteínas dão origem às diferentes hemoglobinas presentes nos eritrócitos, desde o período embrionário (intra-uterino) até a fase adulta, sendo produzidas no decorrer das distintas etapas do desenvolvimento humano (Bunn & Forget, 1986).

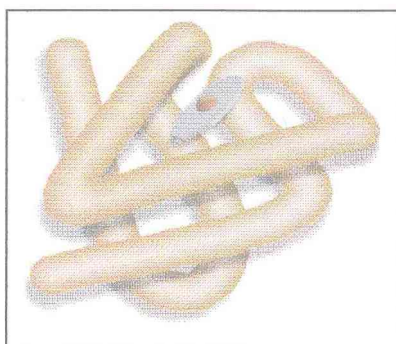


Figura 1: Representação esquemática da cadeia β da Hemoglobina. Adaptado de Diekerson, R.E.: X-ray analysis and protein structure. In *The Protein: Composition, Structure and Function*, Vol. 2. 2nd Ed. New York, Academic Press, 1964.

A gênese das cadeias globínicas é regulada por agrupamentos (*clusters*) de genes nos cromossomos 11 e 16 (**Figura 2**) na ordem cronológica em que são expressos (sentido 5'→3'), nos períodos embrionário, fetal e adulto, quando diferentes grupos de genes são ativados ou suprimidos e diferentes cadeias globínicas são sintetizadas independentemente. As diferentes combinações das cadeias globínicas possibilitam o surgimento de hemoglobinas distintas e para que o tetrâmero funcional seja formado é necessário um perfeito equilíbrio na produção destas cadeias (Serjant, 1992; Hoffbrand, 1993).

No braço curto do cromossomo 16, em um segmento de DNA de 35 Kb, localizam-se o gene zeta (ζ) que codifica a cadeia zeta globínica, dois pseudo-genes ($\psi\zeta$) e ($\psi\alpha$) e os genes alfa ($\alpha 1$) e alfa ($\alpha 2$) que no ser humano estão duplicados, devendo-se esse fato provavelmente à duplicação gênica no decorrer do processo evolutivo.

Estes genes duplos são responsáveis pela codificação das cadeias globínicas alfa (Higgs, 1989).

No cromossomo 11 localiza-se o complexo dos genes beta, com uma extensão superior a 60 Kb, onde observam-se no sentido 5'→3' os genes epsilon- ϵ , gama glicina- γ^G , gama alanina- γ^A , um pseudo-gene ($\psi\beta$) e os genes delta- δ e beta- β (Nathan & Oisk, 1993).

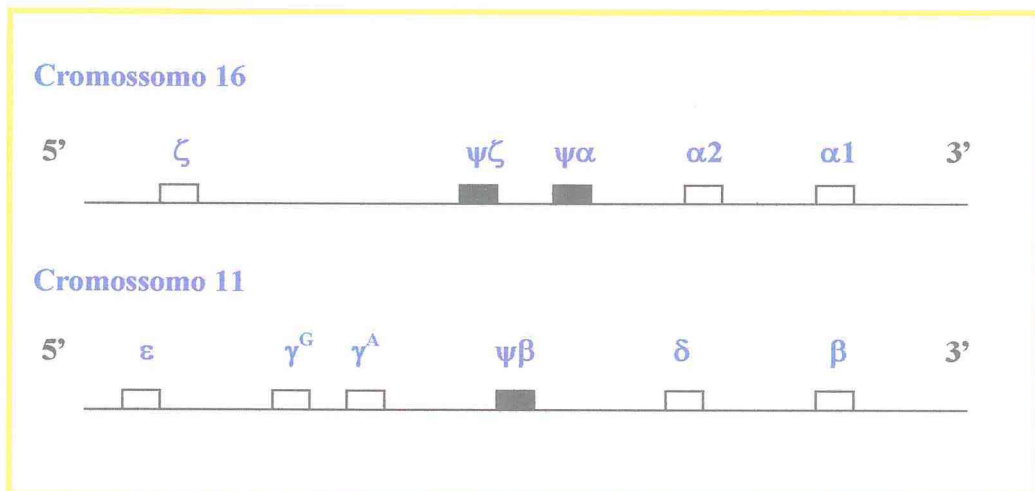


Figura 2: Complexo do gene alfa localizado no cromossomo 16 e complexo do gene beta localizado no cromossomo 11.

No período embrionário os genes ativos presentes nos eritroblastos, localizados no saco vitelino, promovem a produção da cadeia zeta (ζ), que combinada a cadeia epsilon (ϵ), forma a hemoglobina Gower-1 ($\zeta_2\epsilon_2$); esta mesma cadeia zeta combinada com a cadeia gama (γ), forma a hemoglobina Portland ($\zeta_2\gamma_2$); quando ocorre a produção das cadeias alfa (α) estas se combinam com a cadeia epsilon e formam a hemoglobina Gower-2 ($\alpha_2\epsilon_2$).

A produção das hemoglobinas embrionárias ocorre por um período de até três meses do início da evolução gestacional (Henry, 1991). Por grande parte da vida intra-uterina prepondera a produção da hemoglobina fetal (HbF), devido ao incremento da produção das cadeias alfa e gama e a sua combinação ($\alpha_2\gamma_2$), decaindo logo após os primeiros seis meses de vida (**Figura 3**).

O gene da cadeia beta (β) globínica é expresso, com pouca intensidade, nas primeiras seis semanas de vida fetal, mas a partir deste período ocorre uma mudança na expressão gênica, quando a síntese de cadeia γ é amplamente substituída pela síntese de cadeia β , dando origem à produção da hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$). O mecanismo de como esta mudança ocorre ainda é desconhecido, parece dever-se ao estado de metilação do gene, ou talvez ao acondicionamento cromossomial, entre outras condições que podem afetar ou influir na transcrição genética (Hoffbrand, 1993).

A produção das cadeias delta (δ) tem seu início por volta da 25^a semana da gestação, em concentrações reduzidas, e nestes níveis permanece até o nascimento, aumentando lentamente, estabilizando-se por volta do sexto mês de vida em diante. Estas cadeias quando ligadas às cadeias alfa (α), dará origem a hemoglobina A₂ ($\alpha_2\delta_2$) (Naoum, 1997).

As hemoglobinas presentes nos eritrócitos após os seis meses iniciais de vida e perdurando por todo o período da vida adulta, são denominadas: hemoglobina A, hemoglobina A₂ e hemoglobina F, cada uma composta por dois pares de cadeias polipeptídicas, denominadas

respectivamente: α_2/β_2 , α_2/δ_2 e α_2/γ_2 . A distribuição proporcional das diferentes hemoglobinas nas hemácias do indivíduo, a partir deste período fica assim definida: Hb A = 96 – 98% ; Hb A2 = 2,5 – 3% e Hb F = 0 – 1% (Fairbanks in Tietz, 1987).

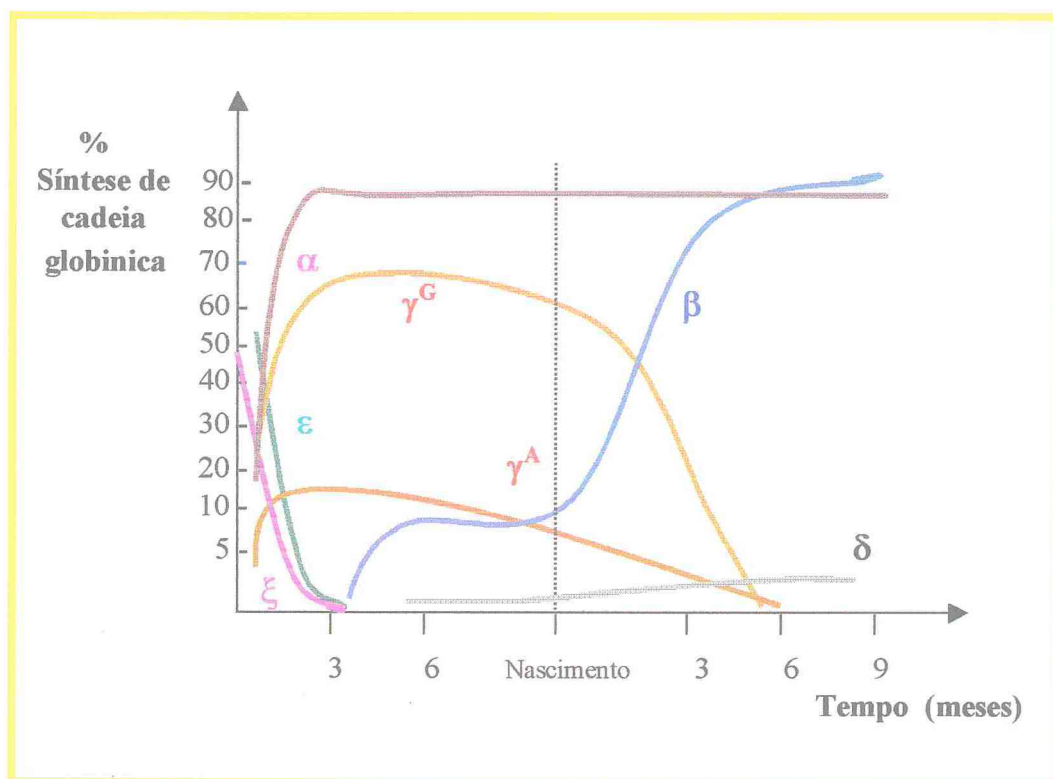


Figura 3: Representação esquemática da produção relativa das cadeias polipeptídicas das hemoglobinas presentes no período fetal e pós-nascimento. Adaptado de Bunn, H.F., Forget, B.G. and Ranney, H.M.: Human Hemoglobins. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1977.

1.2 A Anemia Falciforme

É uma das doenças hematológicas herdadas mais comuns em todo o mundo, atingindo grande número de indivíduos nos mais diferentes países. Esta doença surgiu nos países do centro-oeste africano, na Índia e leste da Ásia, há cerca de 50.000 – 100.000 anos, entre os períodos paleolítico e mesolítico (WHO - Working Group, 1982; Naoum, 1997). O que motivou a mutação do gene codificante da hemoglobina A normal (HbA) para o gene da hemoglobina S mutante (HbS) ainda permanece desconhecido. A frequência do gene mutante é maior na África central, principalmente nas áreas onde a malária é endêmica. Em algumas localidades da Nigéria, mais de 30% da população é portadora heterozigota do gene para Hb S. Verificou-se assim uma ação “protetora” da mutação contra o *Plasmodium falciparum*, diminuindo a mortalidade dos pacientes frente à malária e perpetuando o gene da Hb S no continente africano (Bunn, 1997).

A primeira descrição na literatura médica (Herrick, 1910) de um caso clínico de anemia falciforme, deveu-se à observação de hemácias alongadas e em forma de “foice” no esfregaço sangüíneo de Walter Clement Noel, jovem negro, originário de Granada (Índias Ocidentais) estudante do primeiro ano do *Chicago College of Dental Surgery*, admitido no *Presbyterian Hospital* com anemia (Savit & Goldberg, 1986). Em 1917, Emmel observou a transformação da hemácia da sua forma original, bicôncava, para a forma de foice, *in vitro*, e em 1922, o termo anemia falciforme foi utilizado por Mason. Em 1927, Hanh e Gillepsie, descobriram que a falcização dos eritrócitos ocorria como

conseqüência da exposição das células a uma baixa tensão de O₂. Em 1947, Accioly, no Brasil, pela primeira vez, havia sugerido que a falcização ocorria como conseqüência de uma herança autossômica recessiva. Em 1949, através dos trabalhos de Neel e Beet é que se definiu a ocorrência da doença somente na condição de homozigote, sendo os heterozigotos portadores assintomáticos (Figueiredo, 1993).

Ainda em 1949, Linus Pauling e colaboradores demonstraram que havia uma diferente migração eletroforética da hemoglobina de pacientes com anemia falciforme quando comparada à hemoglobina de indivíduos normais. Posteriormente coube a Ingram, em 1956, elucidar a natureza bioquímica desta doença, através de um processo de eletroforese bidimensional associada com cromatografia (técnica de *fingerprint*), fracionado a hemoglobina e estudando os seus peptídeos. Ficou caracterizado que a anemia falciforme era ocasionada pela substituição do aminoácido ácido glutâmico pelo aminoácido valina, na cadeia β da hemoglobina, dando origem ao conceito de doença molecular (Wintrobe, 1999). Em 1978, com os estudos pioneiros de Kan e Dozy, novo impulso foi dado ao estudo da Hb S, pela introdução de técnicas de biologia molecular (Antonarakis, 1985; Nagel, 1990)

A simples substituição pontual de uma base nitrogenada, timina por adenina (GAT → GTT), no sexto códon do exon um no DNA do cromossomo 11 (Figura 4), ocasiona o surgimento de uma hemoglobina patológica (Ballas & Mohandas, 1996). A troca de bases nitrogenadas no DNA, ao invés de codificar a produção (transcrição) do ácido glutâmico irá, a partir daí, determinar a produção da valina, que entrará na posição seis da seqüência de aminoácidos que compõem

a cadeia β da hemoglobina, modificando sua estrutura molecular (Bunn & Forget, 1986).

CROMOSSOMO 11 NORMAL				
• Códons (N°)		5	6	7
• Seqüência das bases nitrogenadas	→	CCT	- GAG	- GAG
• Seqüência dos aminoácidos cadeia β	→	Pro	- Ác.GLU	- Pro
CROMOSSOMO 11 MUTANTE				
• Códons (N°)		5	6	7
• Seqüência das bases nitrogenadas	→	CCT	- GTG	- GAG
• Seqüência dos aminoácidos cadeia β^S	→	Pro	- VAL	- Pro

Figura 4: Representação esquemática da mutação gênica responsável pelo surgimento da hemoglobina S.

A aparente simples troca de um único aminoácido na composição da cadeia beta globínica ocasiona o surgimento de uma estrutura hemoglobínica “nova”, denominada hemoglobina S (a letra “s” derivada da palavra inglesa *sickle* que em português traduz-se como foice). A hemoglobina mutante (α_2 / β^S_2) possui propriedades físico-químicas bem distintas em relação à hemoglobina normal, devido à perda de duas cargas elétricas ocasionada pela perda do aminoácido específico: ácido glutâmico. Exibe ainda diferenças quanto à estabilidade e solubilidade, demonstrando uma forte tendência para formação de polímeros (**Figura 5**) quando se apresenta, principalmente

em condições de hipóxia, como desoxihemoglobina (Bunn & Forget, 1986). Decorre daí uma série de alterações na estrutura da hemácia, ocasionando a deformação e o enrijecimento de sua membrana celular, concorrendo para o surgimento do epifenômeno patológico que é a vasooclusão. Este fenômeno é o responsável por toda a seqüência de importantes alterações estruturais e funcionais, nos mais diversos órgãos e sistemas do paciente falcêmico (Dean & Schechter, 1978).

A hemoglobina S, no estado de baixa tensão de oxigênio, sofre uma modificação na sua conformação molecular devido à presença do aminoácido valina, que interage com o receptor fenilalanina (β -85) e leucina (β -88) na molécula adjacente de hemoglobina S (Ballas & Mohandas, 1996). Essa interação de natureza hidrofóbica, desencadeia a formação de polímeros (**Figura 5**), compostos por 14 fibras de desoxihemoglobinas, enoveladas entre si, num processo denominado nucleação, que progride com o alongamento e alinhamento de mais fibras, criando uma estrutura multipolimérica, na forma de um eixo axial no interior da célula. Está criado o mecanismo de transformação da clássica forma bicôncava do eritrócito, em uma nova estrutura celular no formato de foice (Bunn, 1997).

A velocidade e extensão da formação dos polímeros no interior das hemácias falcizadas depende, primariamente, de três variáveis independentes: grau de desoxigenação, concentração intracelular de hemoglobina S e a maior ou menor concentração de hemoglobina F (Bunn, 1997).

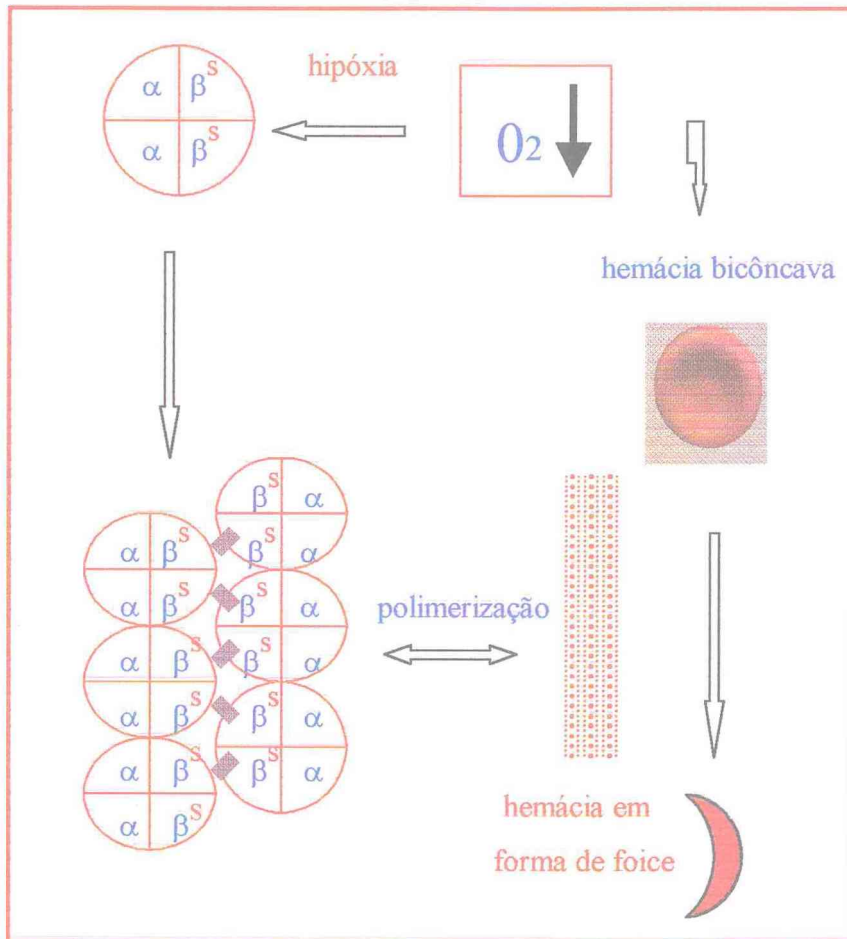


Figura 5: Representação esquemática do processo de indução à falcização das hemácias pela polimerização da desoxihemoglobina diante da baixa concentração de oxigênio.

Uma das conseqüências da polimerização da HbS é a desidratação celular devido às perdas dos íons potássio (K^+) e água. Os principais mecanismos destas perdas ocorrem pela ativação excessiva do canal de transporte dos íons potássio e cloro (K^+Cl^-), estimulada pela acidificação e edema celular (este canal está muito ativo nos

reticulócitos, onde a desidratação desempenha papel importante na formação das células densas) e igualmente pelo canal de Gardos, devido ao aumento da concentração dos íons cálcio (Ca^{++}) (Ballas & Mohandas, 1996).

Outra importante alteração da hemácia, na anemia falciforme, se deve a perda do seu poder de deformabilidade, fato que lhe impossibilita transpor o menor diâmetro dos capilares da microcirculação. A perda da elasticidade da célula deve-se ao incremento da concentração intracelular de Hb S, resultando no aumento da viscosidade no citosol, na polimerização da Hb S e na rigidez da membrana (Fabry & Kaul, 1991). Estes fatores, associados a uma maior adesão do eritrócito falcizado ao endotélio, mediada pelo complexo de integrina $\alpha 4\beta 1$, trombospondina, fator de von Willebrand e fibronectina, favorecem a formação de trombos na micro e macrocirculação (Ballas & Mohandas, 1996).

A ocorrência de vaso-oclusões, principalmente nos pequenos vasos, representa o evento fisiopatológico determinante, na origem e persistência, da grande maioria dos sinais e sintomas observados no quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme. Dentre os principais eventos clínicos que surgem no decorrer da evolução da doença destacam-se a crise álgica, a crise hemolítica, a úlcera de MMII, a síndrome torácica aguda, o seqüestro esplênico, o priapismo, a necrose asséptica de fêmur, a retinopatia, a colelitíase, a IRC, a autoesplenectomia, e o AVC, entre outros (Ballas & Mohandas, 1996).

1.3 Os haplótipos da mutação β^S

É do conhecimento universal que os indivíduos são geneticamente diferentes e que algumas das diferenças entre as pessoas representam mudanças genéticas patológicas. Entretanto, muito provavelmente, podem representar variações silenciosas no DNA. Tais variações, também designadas como comuns ou neutras, são denominadas de polimorfismos do DNA (Antonarakis et al., 1985).

O tipo de variabilidade mais comum no complexo gênico das globinas alfa ou beta é aquele produzido por variações nas seqüências de bases nitrogenadas que compõem os genes e assim alteram o sítio de reconhecimento de uma enzima de restrição. Essas alterações ocorrem aproximadamente a cada 100 bases ao longo do genoma. O padrão de combinação dos sítios polimórficos para qualquer cromossomo é chamado de haplótipo (Antonarakis et al., 1985). O primeiro polimorfismo associado ao gene β^S foi descrito por Kan e Dozy em 1978, no sítio para a enzima de restrição Hpa I localizado na posição 3' do gene β , seguindo-se novas descrições de outros sítios (Figura 7) de polimorfismos de restrição (Mears et al., 1981; Antonarakis, 1982).

Foram descritos dezessete sítios polimórficos no complexo dos genes da globina alfa e mais de duas dezenas no complexo da globina beta (Antonarakis et al., 1985). A descoberta dos haplótipos do gene β^S apresentou-se como importante elemento de análise antropológica, para estudo das composições populacionais, bem como elementos de estudo

clínico, os quais podem fornecer dados preditivos a cerca da evolução da doença e do seu nível de gravidade (Powars et al., 1991).

Os cinco principais haplótipos da mutação β^S (Figura 6) têm sido relatados em diferentes regiões do mundo e são relacionados com países ou áreas do continente africano ou próximo a este, estando ligados a grupos populacionais específicos, recebendo as denominações de acordo com os locais de sua origem: Benin, República Centro-africana (CAR), Senegal, Camarões, Arábia-Saudita e Índia (Nagel & Ranney, 1990). Inicialmente acreditava-se que a mutação do gene β^S teria uma única origem, mas estudos posteriores evidenciaram origens independentes e multifocais para a doença (Pagnier et al., 1984; Zago, 1993).

Estudos populacionais, realizados por Lehmann & Huntsman (1974) no continente africano, demonstraram importantes diferenças na intensidade e na evolução clínica da doença acometendo pessoas de diferentes regiões africanas. Na região do leste da África onde predomina o haplótipo CAR, dificilmente observava-se a presença de pacientes em idade adulta. Igualmente em outra localidade da República Centro Africana, foram encontrados somente três pacientes falcêmicos, com idade acima de 16 anos, de um total de 224 indivíduos portadores da doença. Em contraste, na Nigéria, país onde predomina o haplótipo Senegal, foram encontradas crianças com alta concentração de Hb F e com boa condição clínica e capazes de sobreviver à malária (Powars, 1991) Análises mais aprofundadas definiram, que mudanças em sequências de bases nitrogenadas tais como a perda de (-) 158 bases em 5' do gene γ^G levava ao incremento da produção de cadeia

γ^G , resultando no aumento da concentração de Hb Fetal nos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano (Ásia). Tal fato determinava uma mudança da morbidade da doença e melhor prognóstico para os pacientes portadores desse haplótipos (Powars, 1991).

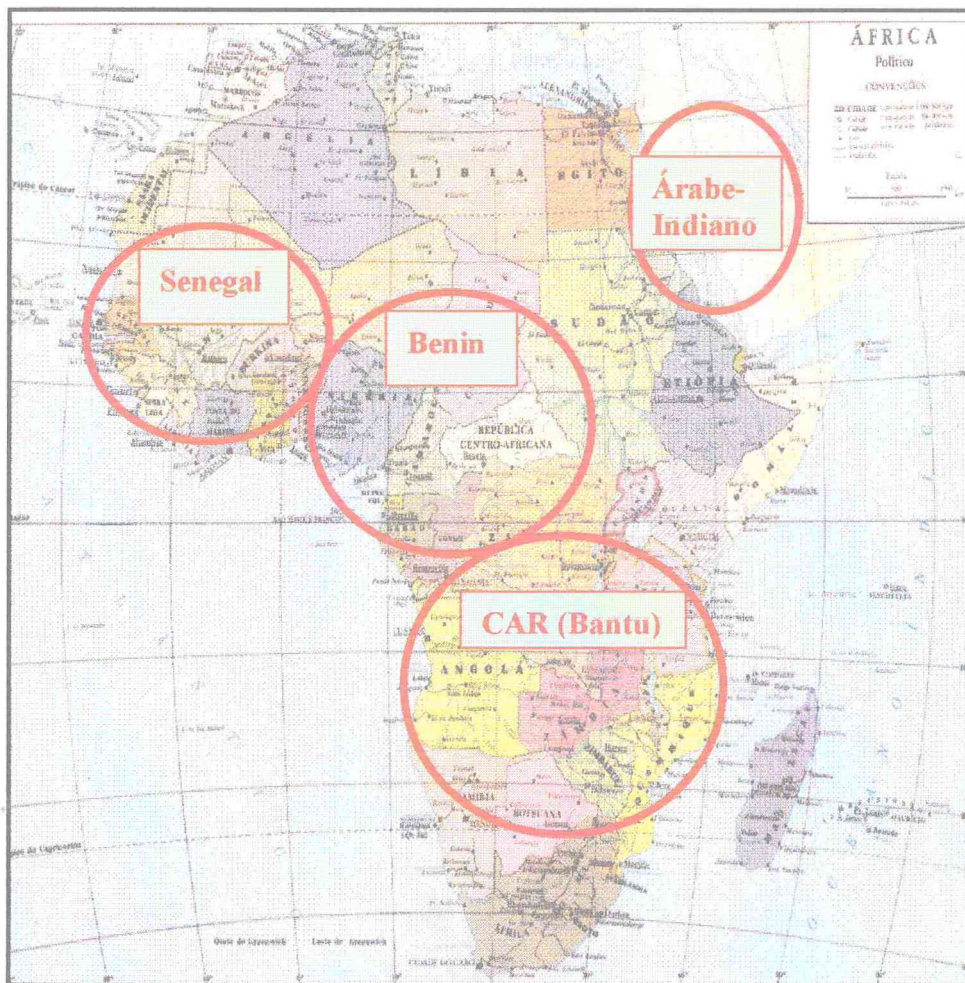


Figura 6. Mapa do continente africano com a localização das regiões de origem dos principais haplótipos da anemia falciforme.

Os haplótipos do gene β^S têm papel importante na regulação variável da síntese da Hb Fetal, na relação final entre as concentrações de Hb S e Hb F no adulto e na intensidade da redução da Hb F durante a infância. A concentração de Hb F está aumentada nos haplótipos Senegal e Asiático (Árabe) e decresce nos haplótipos CAR e Benin, devido a uma velocidade de translação no sentido $5' \rightarrow 3'$ e de substituição da Hb F por Hb S, mais lentas nos dois primeiros que nos dois últimos haplótipos (Powars, 1991).

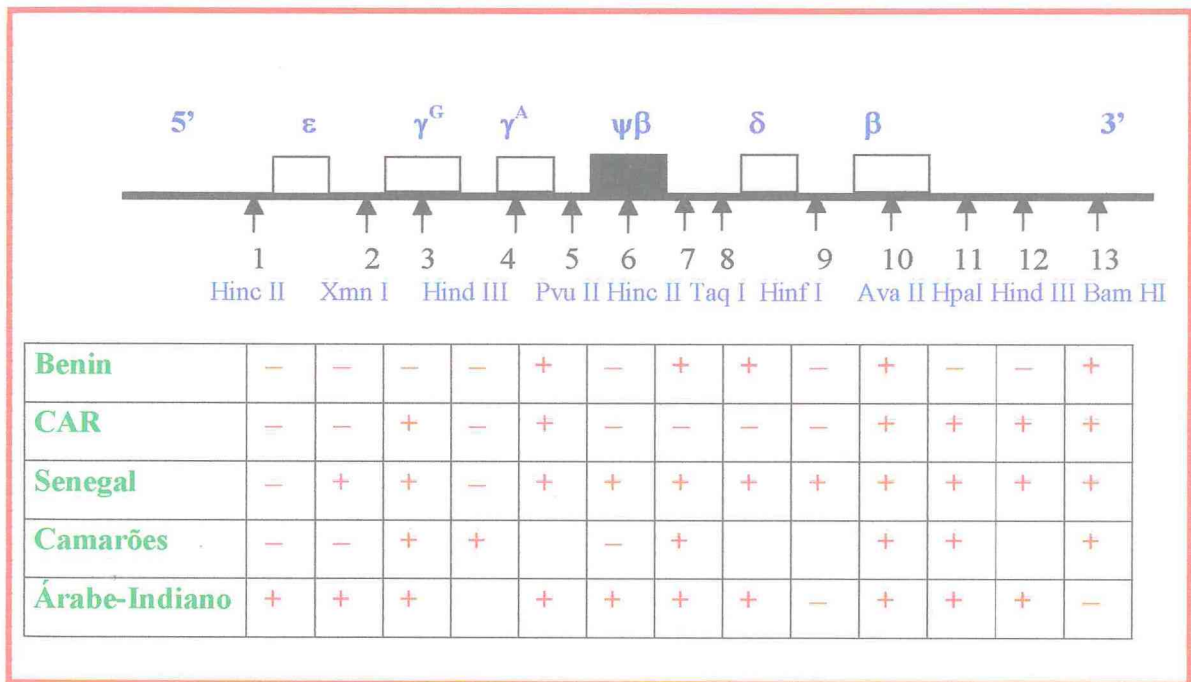


Figura 7: Principais haplótipos do complexo do gene β^S definido por 13 enzimas de restrição, adaptado de Powars D.R. (1991).

A importância dos haplótipos da mutação β^S , na evolução clínica dos pacientes com anemia falciforme, foi determinada através

das observações quanto ao surgimento e a intensidade das complicações de natureza orgânica e da curva de sobrevivência dos pacientes, sugerindo melhores prognósticos para os portadores dos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano (Ásia) e pior evolução clínica para os pacientes portadores dos haplótipos CAR e Benin (Powars, 1991). Os pacientes portadores do haplótipo Senegal apresentam maior concentração de Hb sérica e Hb F, menor formação de células densas, menor grau de hemólise representado por uma contagem inferior de reticulócitos, níveis séricos mais baixos de LDH e bilirrubinas. Esses dados sugerem para este sub-grupo, um quadro de anemia hemolítica mais leve que os haplótipos CAR e Benin (Nagel et al., 1991).

1.4 A anemia falciforme no Brasil e no Ceará

A anemia falciforme é uma doença hematológica constitucional, diagnosticada com grande frequência em todo o mundo. Sua entrada no Brasil deveu-se ao intenso tráfico de escravos negros, provenientes de diversas regiões africanas. Estima-se que nos 306 anos de duração do tráfico, entre os anos de 1551 e 1857, entraram cerca de 3.500.000 africanos, vindos principalmente das regiões de Angola e ilha de São Tomé, das regiões de Costa da Mina e em menor número das regiões da Costa do Marfim, Costa do Ouro, Costa dos Escravos, Congo, Moçambique, Madagascar e Cabo Verde (Salzano, 1986; Naoum, 1997).

Em nosso país a doença encontra-se distribuída na população, de forma indistinta, por força da imensurável miscigenação racial entre negros, índios e brancos. Na região sudeste, a prevalência de portadores falcêmicos (heterozigotos) é, em média, de 2% para a população miscigenada, mas eleva-se para 6,9% na população negra (Zago, 1993). Estimativas com base em estudos de prevalência permitem prever a existência de mais de três milhões de portadores do gene da hemoglobina S no Brasil e segundo dados da OMS estima-se o surgimento de 4.500 novos casos da doença (homozigotos) por ano no continente americano e destes, 2.300 nascem na América do Sul (Zago, 1993; Naoum, 1997).

A composição dos haplótipos da anemia falciforme no Brasil foi analisada em estudos realizados nas cidades de Belém, Salvador, Campinas, Ribeirão Preto e Porto Alegre (Pante-de-Souza et al., 1998). Os resultados mostraram tendência de homogeneidade para a prevalência do haplótipo CAR: Belém-PA (66%), Salvador-BA (55%), Campinas-SP (67%) e Ribeirão Preto-SP (73%). O haplótipo Benin é o segundo mais freqüente com prevalência média de 36 %. Em terceiro o haplótipo Senegal ficou com baixa freqüência (<1%) nas populações estudadas.

No estado do Ceará, os dados estatísticos em relação à anemia falciforme são originários das pesquisas clínicas e epidemiológicas, realizadas nas unidades do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará - HEMOCE, Hospital Universitário Walter Cantídio - Universidade Federal do Ceará e no Hospital Infantil Albert Sabin - HIAS, estando relacionadas ao diagnóstico dos portadores do traço

falcêmico (AS), principalmente em doadores de sangue. Os dados de prevalência da doença, de morbidade, de intensidade das complicações clínica ou da curva de sobrevida, são parciais devido à escassez de estudos mais aprofundados e também por se ter atendimentos médicos, ambulatoriais e hospitalares, descentralizados no estado. Os levantamentos de dados, mesmo incompletos, fazem presumir que o número de indivíduos com anemia falciforme (homozigotos), entre adultos e crianças, situa-se em torno de 200 a 300 pacientes. Em relação aos portadores heterozigotos da anemia falciforme (traço falciforme/AS), as pesquisas mostraram uma incidência de 3,3% em 179 pacientes atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídio (Martins et al. 1965), de 2,41% nos doadores do HEMOCE-Crato (Figueiredo, 1994), 2% nos doadores do HEMOCE-Fortaleza (Souza, 1997) e de 2,81% nos pacientes atendidos no hospital infantil Albert Sabin (HIAS). Todos esses resultados situam-se próximo a média nacional, em torno de 2%. Em relação aos haplótipos do gene β^S e as suas frequências, não há estudo anterior ao do presente trabalho, no estado do Ceará.

1.5 As origens étnicas da população negra do Ceará

A presença da anemia falciforme em nosso meio está intrinsecamente ligada a entrada dos escravos negros no Estado do Ceará. Segundo dados da literatura (Silva, 1988), a entrada do negro

neste estado foi ocasional até meados do século XVIII. As economias existentes, pecuarista e agrícola de subsistência, à época, não comportavam uma mão-de-obra de alto custo. O trabalho indígena supria as necessidades obreiras, principalmente no meio rural. Uma das primeiras referências à chegada de africanos neste Estado, se faz presente no relato do Frei Vicente do Salvador, ao descrever os fatos ocorridos com Pero Coelho de Souza em 1604, na serra da Ibiapaba, quando cita a presença de um mulato e um mameluco, crioulos da Bahia (Sturdart, 1892; in Girão, 1984).

No documento a “relação do Siará”, escrita em 1618 pelos administradores portugueses, se faz menção ao trabalho de colonização de Martins Soares Moreno. Esta relação documental, descreve a intenção do Capitão-mor de introduzir indivíduos negros de Angola, que viriam como parte do pagamento dos seus soldados (Girão, 1984). Os primeiros escravos introduzidos legalmente na capitania do Ceará, com a finalidade de realizar trabalho definido, vieram com o surgimento da "Companhia do ouro das minas de São José dos Cariris”, entre os anos de 1756 e 1758. Os 69 escravos africanos e crioulos, executavam serviços de mineração, sendo sua origem da região da Costa da Guiné e de Angola (Sturdart, 1892; in Girão, 1984). No período entre os séculos XVI e XVII, os africanos eram trazidos ao Ceará em pouco número e eram preferencialmente incluídos na criadagem das casas-grandes. Em sua publicação *Geografia do Ceará* de 1924, Barão de Sturdart afirma que no primeiro quartel do século XVII havia em nosso estado escravos africanos, vindos de Pernambuco

e da Bahia. Só no início do século XIX é que se faria a importação direta da costa da África para o Ceará (Girão, 1984).

Sobre as origens da população negra trazida a este estado, cita-se como advinda na sua maioria, das regiões de Angola, Congo e Moçambique, e eram introduzidos no Ceará a partir, principalmente, dos portos de Recife, São Luís e em escala diminuta, de Salvador e Rio de Janeiro (Riedel, 1988). As complexidades étnicas e culturais, ressaltam do exame detalhado das culturas sudanesa, guineano-sudanesa islamizada e banto, às quais estavam ligados por sua origem os escravos trazidos para o Brasil. À cultura banto estavam ligadas as tribos do grupo angolano-congolês, e da contra-costa, os moçambiques. Das sudanesas destacam-se as etnias ioruba ou nagô, preferidas no mercado escravista da Bahia (Riedel, 1988).

Outra referência quanto à etnia, se faz ver quando da descrição física do escravo. O corpo era descrito como franzino, ou regular, ou ainda como “bonita-figura” quando se tratava de escravos jovens; porém, o comum era o corpo seco, o qual com a estatura alta e as pernas finas e compridas dão idéia de possível mescla sudanesa-banto para muitos escravos no Ceará (Riedel, 1988). Os dentes representavam importantes sinais de identificação. Raros os escravos com dentição perfeita, mas a ocorrência de dentes limitados ou a falta de incisivos indicava, muitas vezes, distinção tribal. Neste caso é oportuno frisar a falha dos incisivos que caracterizava os Benguelas (por isso na linguagem popular do Brasil, banguela é sinônimo de “desdentado”). Observam-se ainda algumas citações sobre as origens dos escravos em raros registros, nas escrituras cartoriais ou em notas

de fuga, quando se definia a nação africana a que pertenciam, predominam nestes registros as origens dos escravos vindos de Angola, Cabinda e Benguela (Campos, 1988.).

Estima-se que, entre 1551 e 1857, ano em que foi extinto o tráfico de escravos, desembarcaram no Brasil cerca de 3.500.000 africanos vindos principalmente das regiões de Angola, ilha de São Tomé e Costa da Mina (Salzano, 1985). Segundo Philip Curtain (in Queiroz, 1996) o povo africano trazido (tráfico) ao Brasil veio principalmente de Angola, Congo e Moçambique, sendo os escravos provenientes de Benin levados principalmente para a Bahia e aqueles de Angola foram traficados mais intensamente para os Estados do Rio de Janeiro e de São Paulo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Originada de uma ampla mistura étnica, a população brasileira possui uma acentuada heterogeneidade genética. Durante cerca de três séculos, observou-se intenso tráfico de escravos oriundos de diferentes regiões do continente africano para o Brasil. A emigração populacional forçada veio a se tornar importante elemento na composição populacional do Brasil. Mercê de fatores econômicos, a distribuição dos escravos traficados ao Brasil destinou-se mais intensamente para os estados da Bahia, Pernambuco, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. A sua redistribuição para outros estados se deu de forma heterogênea, em menor intensidade e em menor número de indivíduos (Salzano, 1986).

Estudos sobre os haplótipos da anemia falciforme no Brasil foram realizados em São Paulo, Salvador, Belém, Alagoas e Porto Alegre e os resultados exibem algumas diferenças, sugerindo que cada uma dessas populações de pacientes falcêmicos pode apresentar frequências diferentes entre os diversos haplótipos, como exemplifica o trabalho de Costa et al. (1994), confirmados pelos dados de Queiroz (1996). Conhecendo as origens da formação étnica da população cearense, o presente estudo objetiva, ao definir em laboratório os haplótipos da anemia falciforme e as suas frequências para um grupo de pacientes nascidos no Ceará, testar a hipótese de confirmação das origens históricas dos negros em nosso estado.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Participaram do presente estudo pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de anemia falciforme (forma homozigótica SS), atendidos no ambulatório do serviço de hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (HUWC-UFC), de ambos os sexos, todos nascidos no estado do Ceará, com seus antepassados, até a segunda ascendência (pais e avós), igualmente naturais deste estado. Outro critério de inclusão foi a ausência de tratamento transfusional com concentrado de hemácias, por um período mínimo de 90 dias, antes da coleta das amostras sanguíneas para a realização dos estudos laboratoriais.

Pacientes portadores de outras doenças falcêmicas, tais como hemoglobinopatia SC, SD, S- β talassemia, são excluídos do estudo.

As coletas de sangue para proceder as análises dos parâmetros laboratoriais são realizadas somente nos pacientes que estão em atendimento clínico ambulatorial regular e que apresentam quadro clínico estável em relação à sua doença. Os pacientes que aceitam participar da pesquisa, após explicação verbal, firmam seu consentimento formal, com assinatura do termo de consentimento, de acordo com as normas do comitê de ética da Faculdade de Medicina da UFC.

4.2 Análise hematológica

Foram coletados cinco ml de sangue de cada um dos pacientes, em tubos tipo *vacutainer*, contendo o anticoagulante EDTA. O estudo hematológico foi procedido em contador automatizado, marca *Coulter* modelo T-890, sendo analisados os seguintes parâmetros: número absoluto de hemácias (Hm), concentração de hemoglobina (Hb), determinação de hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

4.3 Análises eletroforéticas da hemoglobina

A partir de cinco mL de sangue total, coletados em tubos *vacutainer* contendo anticoagulante EDTA, foram preparados os hemolisados pela técnica tradicional (**Apêndice 1**), com salina a 0,85% e água destilada, para a posterior identificação dos padrões fenotípicos de hemoglobina, em dois tipos diferentes de análises eletroforéticas: em pH 8,6 (alcalino) e pH 6,2 (ácido), (Dacie, 1984).

As eletroforeses de hemoglobinas em pH alcalino foram realizadas em fita de acetato de celulose, em tampão tris-EDTA-borato, 0,025M, pH 8,6 e coradas com solução *Ponceau*. As eletroforeses de hemoglobinas em pH ácido foram realizadas em fita de ágar ácido, em tampão fosfato, pH 6,2 e coradas com solução *Ponceau*.

A determinação da concentração de hemoglobina F (fetal) foi realizada pelo método de desnaturação alcalina, conforme as técnicas

de Betke e Singer (Apêndice 2) que permitem a quantificação de concentrações de Hb F superiores a 4% (Naoum, 1997).

4.4 Análise molecular

O estudo dos haplótipos da mutação β^S no gene da cadeia beta globínica foi realizado através da técnica da reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) e digestão com enzimas de restrição específicas.

4.4.1 Extração do DNA genômico

O DNA foi obtido dos leucócitos de cada um dos pacientes por dois métodos distintos, a partir das amostras de sangue total coletados em tubos *vacutainer*, com EDTA. No primeiro método de extração as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm para separação do plasma. A camada de leucócitos foi transferida para tubos de dois mL, em seguida foi adicionado CLB (Apêndice 3) a 4°C, homogenizados e centrifugados, repetindo-se as lavagens com CLB até obter-se sedimentos livres de hemácias. Foi adicionado 200 μ L de SLB (Apêndice 4) e os tubos colocados em banho-maria a 55°C por duas horas, agitados a cada vinte minutos e em seguida centrifugados. Adicionou-se 80 μ L de NaCl 5M, homogenizados e deixados em repouso por dez minutos; após nova centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e transferidos para tubos *ependorf*. Foi adicionado

álcool P.A. gelado numa proporção de duas vezes o volume das amostras, observando-se a formação da “medusa” (formato de “nuvem” ocasionada pela flocculação das moléculas de DNA). Foram centrifugados, desprezando-se os sobrenadantes e adicionando-se etanol a 70%, decantados os sobrenadantes por inversão sobre papel absorvente, após secagem adicionado 200 μ L de tampão TE (Apêndice 5) e colocados em banho-maria a 55°C por dez minutos. Após total dissolução, foram homogenizados, centrifugados e cada tubo com 10 μ L de DNA foi diluído para 600 μ L de água estéril e congelando-os a -20 °C.

O outro método de extração foi realizado numa segunda amostra de sangue dos pacientes. Cada amostra foi centrifugada para separação dos plasma sobrenadante, as hemácias lisadas pela adição do cloreto de amônio (NH₄Cl 0,144M), cinco vezes o volume de células e do bicarbonato de amônio (NH₄CO₃ 0,01M), na proporção de ½ volume em relação ao volume de células. Após nova centrifugação e após repetições deste processo obteve-se sedimentos compostos de leucócitos livres de hemácias. Estes leucócitos foram dissolvidos em 10 mL do tampão de lise composto por: NaCl 0,3M; EDTA 10 mM; Tris HCl pH 7,5; Uréia 7M; SDS (duodecil sulfato de sódio) a 5% e incubados por cinco minutos em banho-maria a 37°C por 12 a 18 h. A extração do DNA dos leucócitos das amostras foi realizada pela adição de 1mL da mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), saturado com tris/HCL, agitada por inversão e centrifugada; repetiu-se a operação e na terceira extração usou-se clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), repetida a centrifugação e em seguida o DNA foi precipitado

pela adição e ação do acetato de sódio (NaOH) 0,3M e de etanol PA gelado (20°C) numa proporção de dois e meio volumes. O DNA foi diluído com água estéril, em um volume de 500µL e estocado em congelador.

A concentração do DNA obtido de cada amostra, extraído pelos dois métodos supracitados, foi determinada através da leitura das densidades óticas (D.O.) em espectrofotômetro, nas faixas de 260 e 280 nm. As amostras foram consideradas satisfatórias quando exibiam uma relação entre as D.O.'s (260/280) na faixa de 1,8 a 2,0.

4.4.2 Amplificação gênica

A amplificação do DNA extraído das amostras foi realizada pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR), com algumas modificações (Saiki & col.,1988). Utilizou-se termociclador modelo *Minicycler* da marca *M.J.Research*.

O protocolo das reações de amplificação para um volume final de 25µL para cada amostra foi constituído por: 1 a 3µL de DNA genômico; 2,5µL de tampão da Taq; 2,5µL de cloreto de magnésio (MgCl₂); 2,5µL de dNTP (constituído pelos desoxinucleotídeos dATP, dCTP, dTTP e dGTP); 0,25µL de cada iniciador (*primer*); 0,1µL da enzima *Taq polimerase*, completando-se com água estéril (qsp) e acrescido de 20µL de óleo mineral. As reações foram processadas inicialmente por uma desnaturação a 94°C durante cinco minutos, seguindo-se com 40 ciclos compreendendo desnaturação a 94° C por

90 segundos, pareamento dos *primers* a 55°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 120 segundos. O último ciclo foi de extensão a 72°C por sete minutos e mantido por 4°C por 12 a 24h. Os resultados das amplificações foram verificados através de corrida eletroforética em gel de agarose a 1% corados com brometo de etídio e visualizados em câmara de UV (ultravioleta).

A descrição, localização e seqüência dos *primers* utilizados nas reações de amplificação encontram-se dispostos na **figura 8**.

4.4.3 Digestão enzimática do DNA amplificado

Na etapa de digestão enzimática foram utilizadas as seguinte enzimas: Hind III; Hinc II; Ava II; e Hinf I das marcas Promega e Gibco. A cada 5µL do DNA amplificado foi adicionado 2µl do tampão da enzima, 1µL da enzima e 12µL de água estéril; a mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por cerca de 12 horas (período noturno). Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizados em câmara de luz ultravioleta (UV). Os resultados das diversas digestões enzimáticas foram registrados em câmara fotográfica *Kodac*[®], com revelação instantânea em filme preto e branco e também através de câmara digital *Sony-Mavica*[®], com arquivamento eletrônico das fotos.

Primer	Seqüência	Posição	Sítio Polimórfico	Gene
CD 57 CD 58 H3 H4	GCCAGTGACTAGTGCAAGAAGAA AAAGCTCTGCATCATGGGCAGTGA TGCTGCTAATGCTTCATTAC TAAATGAGGAGCATGCACACA	35440/40371 41137	Hind III	$\gamma^G \gamma^A$
CD33A CD48A H7 H8	AAGCTGTTATGCTCACGGATGACCTC CCATAGGTACAAACATAGTGGACAGGG TCTGCATTTGACTCTTGTTAG GGACCCTAACTGATATAACTA	49529 50121	Hinc II	$\psi\beta$ 3' $\psi\beta$
CD5A CD6A	ATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGT TCATTCGTCTGTTCCCATTTCTAAAC		Ava II	β IVS2
H9 H10	CTACGCTGACCTCATAAATG CTAATCTGCAAGAGTGTCT	60958 61341	Hinf I	5' β

Figura 8: Direção, posição e seqüência dos primers utilizados nas amplificações dos seqüências do gene β^S , seguindo adaptação de Sutton e colaboradores.

As enzimas utilizadas estudaram os seguintes sítios de restrição, respectivamente: Hind III na região IVS2 do gene γ^A e na região IVS2 do gene γ^G ; Hinc II em $\psi\beta$ e na extremidade 3' de β ; Ava II na região IVS2 de β ; e Hinf I na extremidade 5' de β (Sutton & col.1989 / comunicação pessoal – Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira-Unesp de Araraquara/SP).

As posições desses sítios de polimorfismos gênicos situados no complexo gênico da β -globina estão representados na **figura 9**.

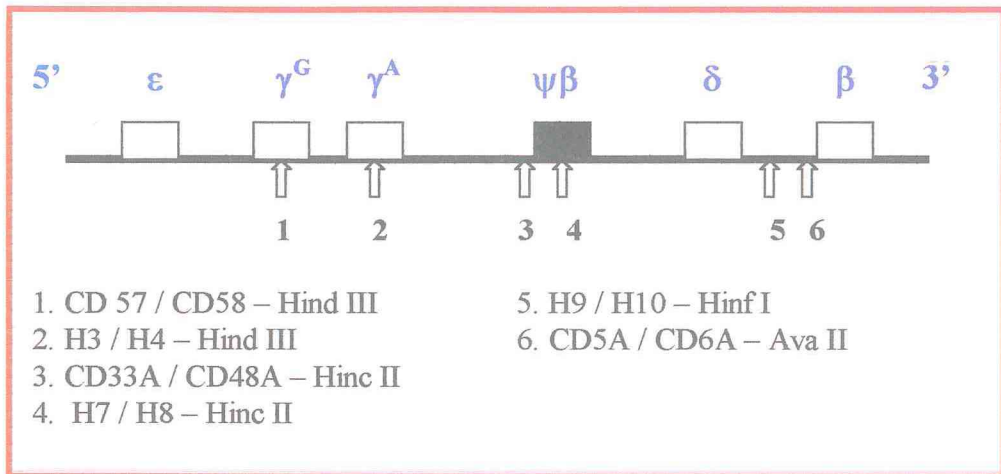


Figura 9: Localização dos sítios polimórficos utilizados para a definição dos haplótipos ligados ao gene β^S .

4.5 Pesquisa e análise antropológica, histórica e geográfica

Os dados referentes às origens étnicas dos escravos negros que foram traficados para o Brasil e para o estado do Ceará, no início de suas colonizações, desde o século XVI, foram obtidos através dos artigos e das publicações literárias de diversos autores, brasileiros e de outras nacionalidades. Os dados sobre a composição e distribuição racial, qualitativos e quantitativos, da população brasileira e cearense foi obtida junto ao Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, já atualizados pela censo demográfico mais recente, referente ao ano de 2000.

4.6 Método estatístico

Na análise dos resultados foram aplicados os seguintes testes estatísticos (Vieira, 1981):

- Teste “z” de Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis, para comparar os resultados das médias para as variáveis estudadas, para o grupo e os subgrupos de pacientes.
- Teste do “qui-quadrado” para avaliar as associações em relação a comparação dos nossos resultados frente aos resultados da literatura.

Foi observado o nível alfa (α) de 5% para os testes acima realizados ou 0,05 ($\alpha \leq 0,05$) como nível de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

10/10/2011

5. RESULTADOS

5.1 Dados gerais

Os resultados foram obtidos das análises laboratoriais realizadas em 22 pacientes portadores de Hb SS, todos naturais do estado do Ceará, não aparentados entre si e com ascendentes (pais e avós) nascidos no mesmo estado da federação (CE). A faixa etária dos pacientes situou-se entre 15 e 51 anos de idade, com uma idade média geral de $29,33 \pm 11,92$ anos (média e desvio padrão), sendo que o grupo masculino ($n = 9$ indivíduos) teve média de idade de $28,87 \pm 13,02$ anos e o grupo feminino ($n = 13$ indivíduos) $30,36 \pm 9,75$ anos. Em relação a faixa etária, observamos que 45% dos pacientes têm idade entre 15 e 25 anos (**Figura 10**).

A **tabela I** exibe os dados hematológicos gerais e os índices hematimétricos de todos os pacientes (Hb, Ht, VCM, HCM, CHCM e Hb F) e a **tabela II** mostra os dados laboratoriais hematológicos dos pacientes agrupados por sexo. Dos dados analisados, o VCM mostrou uma média de $105,57 \pm 10,05$ fL, demonstrando uma acentuada macrocitose ($VCM > 100$ fL) para ambos os sexos, sem diferença estatística entre eles. A concentração de Hb Fetal para todo o grupo foi de 7,61%, tendo concentração em nível mais elevado no grupo feminino com 8,49%, em relação ao grupo masculino com 7,44%, esta diferença entretanto não teve significância estatística.

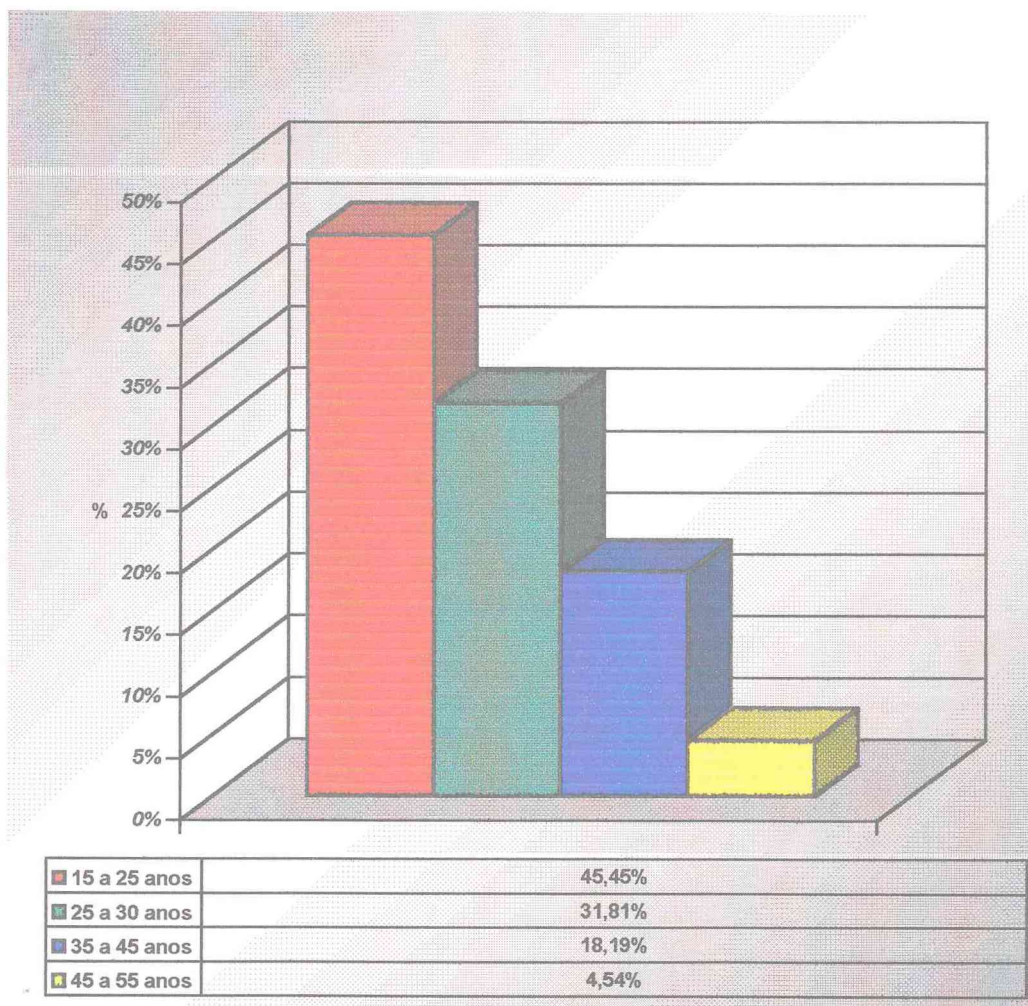


Figura 10: Distribuição dos pacientes com anemia falciforme, por faixa etária.

Tabela I: Dados hematológicos dos 22 pacientes falcêmicos.

Parâmetros Laboratoriais	Resultados X ± dp
Hb (g/dL)	8,077 ± 1,036
Ht (%)	24,147 ± 2,968
VCM (fL)	105,57 ± 10,05
HCM (pg)	33,95 ± 2,98
CHCM (g/dL)	32,49 ± 1,65
Hb F (%)	7,61% ± 1,00

Tabela II: Dados hematológicos dos 22 pacientes falcêmicos segundo o sexo.

Parâmetros Laboratoriais	Masculino (n = 9) X ± dp	Feminino (n = 13) X ± dp	Análise estatística*
Hb (g/dL)	8,23 ± 1,21	7,97 ± 0,87	Ns (z cal.= 0,5560)
Ht (%)	25,12 ± 3,6	24,40 ± 2,37	Ns (z cal.= 0,4710)
VCM (fL)	101,85 ± 4,02	107,91 ± 11,57	Ns (z cal.= 0,0820)
HCM (pg)	32,70 ± 1,85	33,94 ± 3,88	Ns (z cal.= 0,3240)
CHCM(g/dL)	32,06 ± 0,68	32,72 ± 1,96	Ns (z cal.= 0,8450)
Hb F (%)	7,44 ± 4,59	8,49 ± 3,72	Ns (z cal.= 0,3930)

Nota: X = média ; dp = desvio padrão ; Ns = não significante

*Análise estatística realizada pelo teste de Mann-Whitney (z).

5.2 Estudos eletroforéticos

Os resultados das eletroforeses de Hb realizadas para os 22 pacientes, em pH 8,6 (alcalino) e em pH 6,2 (ácido), estão expostos na **figura 11**. As análises demonstraram a presença exclusiva do padrão fenotípico SS, em ambos os métodos.

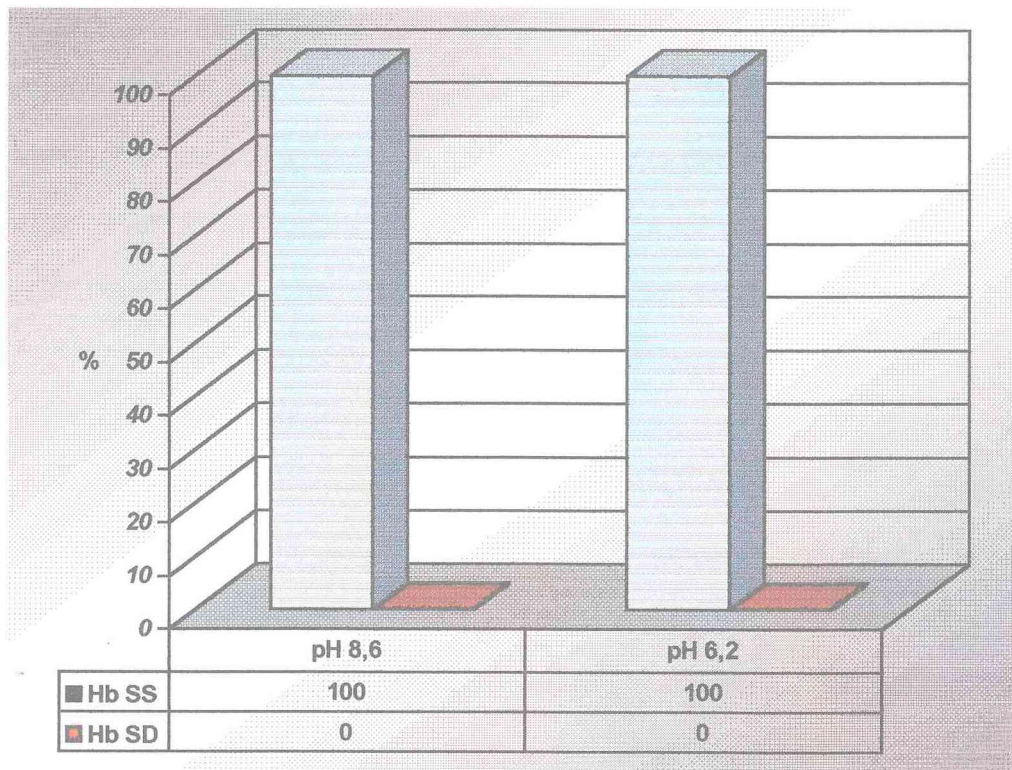


Figura 11: Apresentação dos resultados dos estudos de eletroforese de hemoglobina em pH 8,6 (alcalino) e 6,2 (ácido).

5.3 Estudo dos haplótipos

O estudo molecular dos haplótipos do complexo do gene β^S foi realizado, seguindo as recomendações contidas no trabalho de Sutton (Sutton & col, 1989), com modificações. Estudou-se, na região do cromossomo 11, seis sítios, com enzimas de restrição, para determinar os haplótipos mais freqüentes: CAR (Bantu), Benin (Ben) e Senegal (Sen).

A determinação dos diferentes sítios de polimorfismos foi realizada pela amplificação dos fragmentos de DNA que flanqueiam o local das clivagens, com posterior digestão por enzimas de restrição específicas e análise dos fragmentos através de eletroforese em gel de agarose. Abaixo encontram-se descritos os resultados possíveis de serem encontrados, e/ou os que foram obtidos, para cada um dos sítios polimórficos analisados.

- A amplificação com os *primers* CD57 e CD58 gera um fragmento de 342 pb, referente à extremidade 5' do gene γ^G . Após a digestão deste fragmento com a enzima Hind III, podem ser observados dois fragmentos, produtos da ação enzimática digestiva, um de 242 pb e outro de 100 pb (resultado +/+), ou fragmento intacto de 342 pb (resultado -/-), ou ainda três fragmentos: o intacto de 342 pb e os dois resultantes da digestão, 242 e 100 pb (resultado +/-).
- A amplificação com os *primers* H3 e H4 gera um fragmento de 760 pb, referente a região do gene γ^A . Após a digestão deste fragmento com a enzima Hind III, podem ser observados dois fragmentos, produtos da ação enzimática digestiva, um de 400 pb e outro de 360

pb (resultado +/+), ou fragmento intacto de 760 pb (resultado -/-), ou ainda três fragmentos: o intacto de 760 pb e os dois resultantes da digestão, 400 e 360 pb (resultado +/-).

- A amplificação com os *primers* CD33A e CD48A gera um fragmento de 1103 pb, referente a região do gene $\psi\beta$. Após a digestão deste fragmento com a enzima Hinc II, podem ser observados dois fragmentos, produtos da ação enzimática digestiva, um de 740 pb e outro de 363 pb (resultado +/+), ou fragmento intacto de 1103 pb (resultado -/-), ou ainda três fragmentos: 1103 pb e os dois resultantes da digestão, 740 e 363 pb (resultado +/-).
- A amplificação com os *primers* H7 e H8 gera um fragmento de 590 pb, referente à extremidade 3' do gene $\psi\beta$. Após a digestão deste fragmento com a enzima Hinc II, podem ser observados dois fragmentos, produtos da ação enzimática digestiva, um de 470 pb e outro de 120 pb (resultado +/+), ou fragmento intacto de 590 pb (resultado -/-), ou ainda três fragmentos: de 590 pb e os dois resultantes da digestão, 470 e 120 pb (resultado +/-).
- A amplificação com os *primers* CD5A e CD6A gera um fragmento de 417 pb, referente a região β IVS2. Após a digestão deste fragmento com a enzima Ava II, podem ser observados dois fragmentos, produtos da ação enzimática digestiva, um de 313 pb e outro de 104 pb (resultado +/+), ou fragmento intacto de 417 pb (resultado -/-), ou ainda três fragmentos: de 417 pb e os dois resultantes da digestão, 313 e 104 pb (resultado +/-).
- A amplificação com os *primers* H9 e H10 gera um fragmento de 620 pb, referente a extremidade 5' do gene β . Após a digestão deste

fragmento com a enzima Hinf I, podem ser observados dois fragmentos, produtos da ação enzimática digestiva, um de 460 pb e outro de 160 pb (resultado ++), ou fragmento intacto de 620 pb (resultado -/-), ou ainda três fragmentos: o intacto de 620 pb e os dois resultantes da digestão, 460 e 160 pb (resultado +/-).

Nas **figuras 12, 13, 14, 15 e 16** encontram-se exemplificados alguns dos registros fotográficos das eletroforeses realizadas em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio, para visualização dos produtos das digestões enzimáticas dos DNA's amplificados por PCR, para definição dos haplótipos dos 22 pacientes estudados.

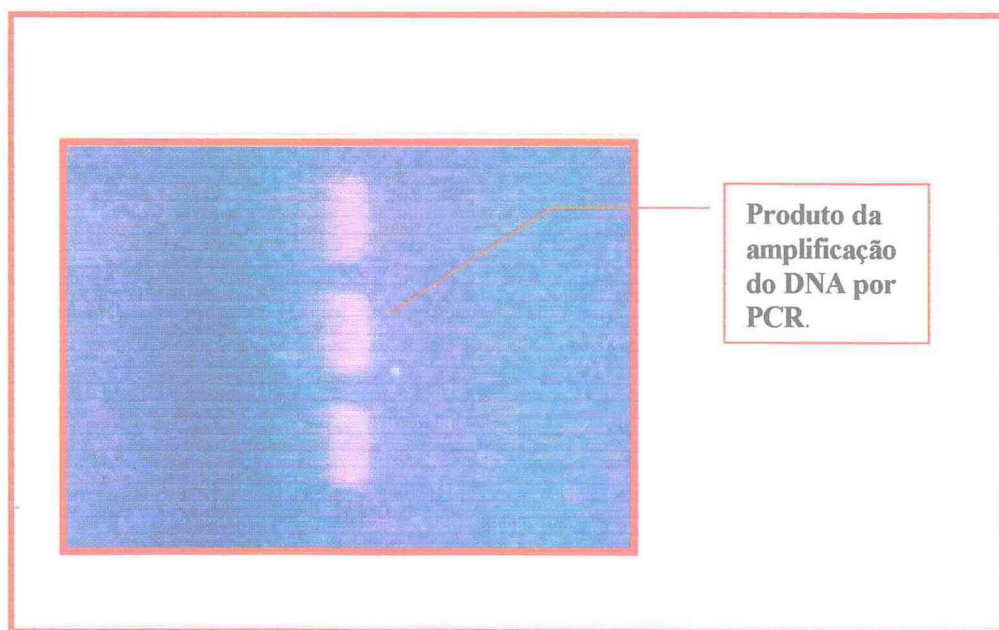


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, para visualização do produto de amplificação do DNA por técnica de PCR.

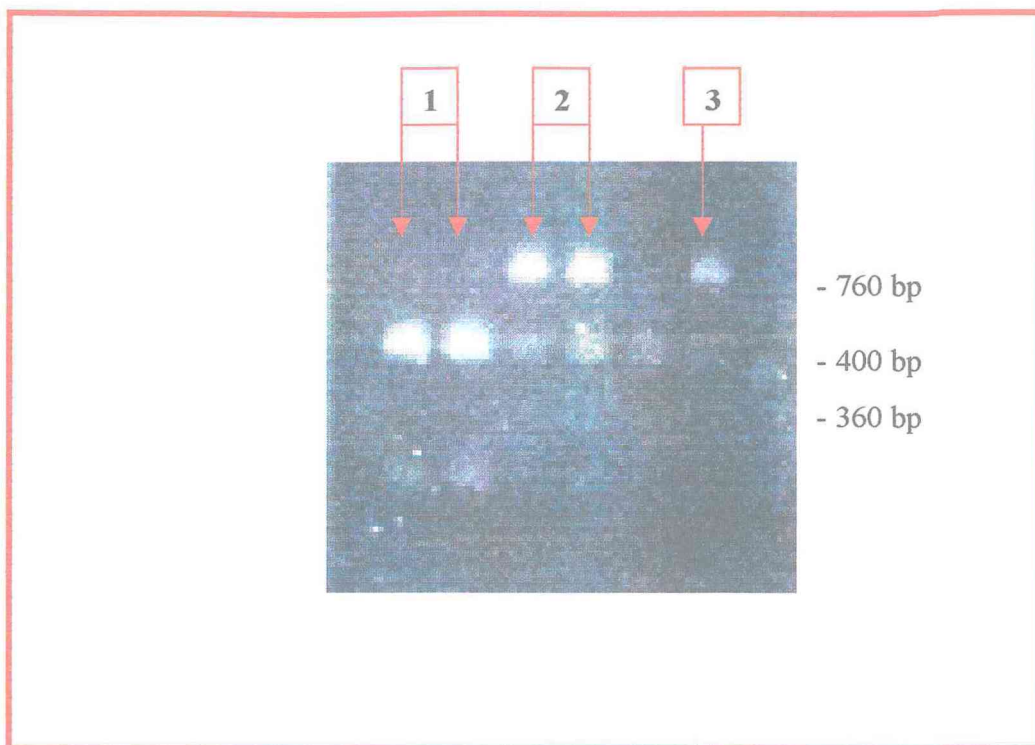


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose do fragmento amplificado com os *primers* H3-H4, após digestão enzimática com a enzima Hind III: paciente 1 – homozigoto (+/+), paciente 2 – heterozigoto (+/-), paciente 3 – homozigoto (-/-). Resultados reproduzidos em duplicata.

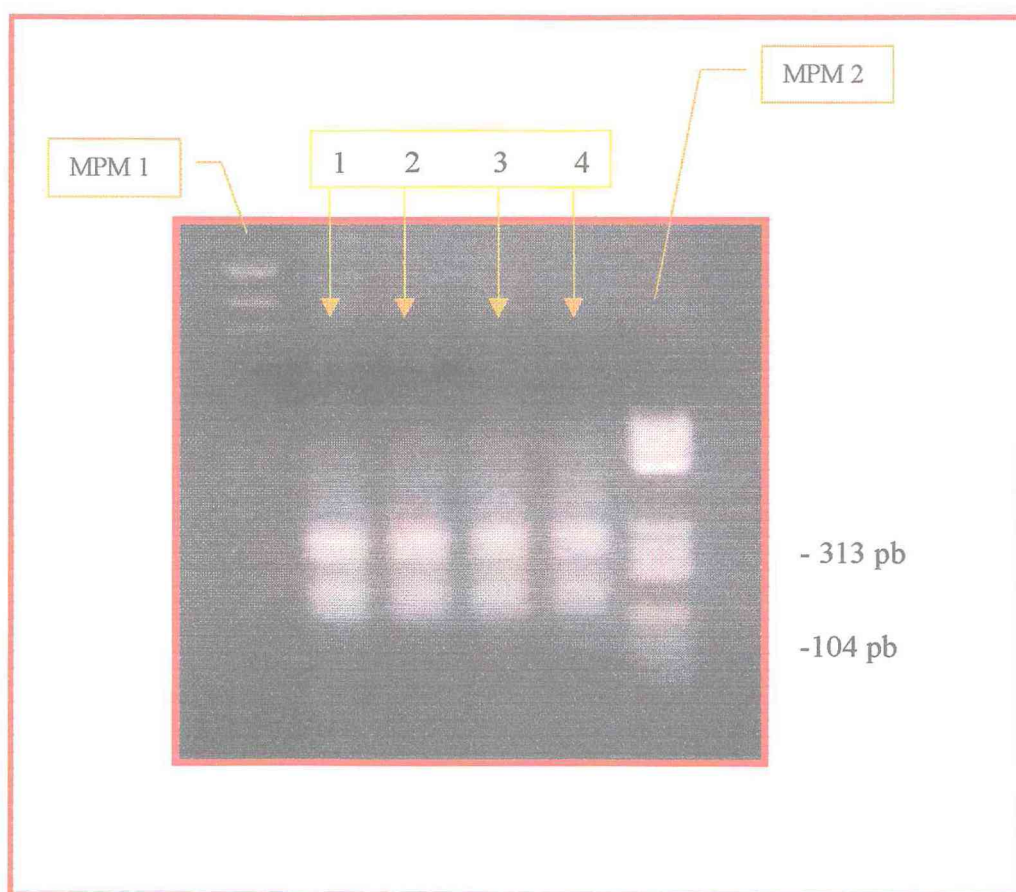


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado pelo brometo de etídio, para visualização do resultado da digestão enzimática com a enzima Ava II, do fragmento amplificado com os *primers* CD5A-CD6A: todos os pacientes são homozigotos (+/+), demonstrados aqui pelo pelos DNA's digeridos.

MPM 1: pGM (Marcador de peso molecular)

MPM 2: Marker V(Marcador de peso molecular)

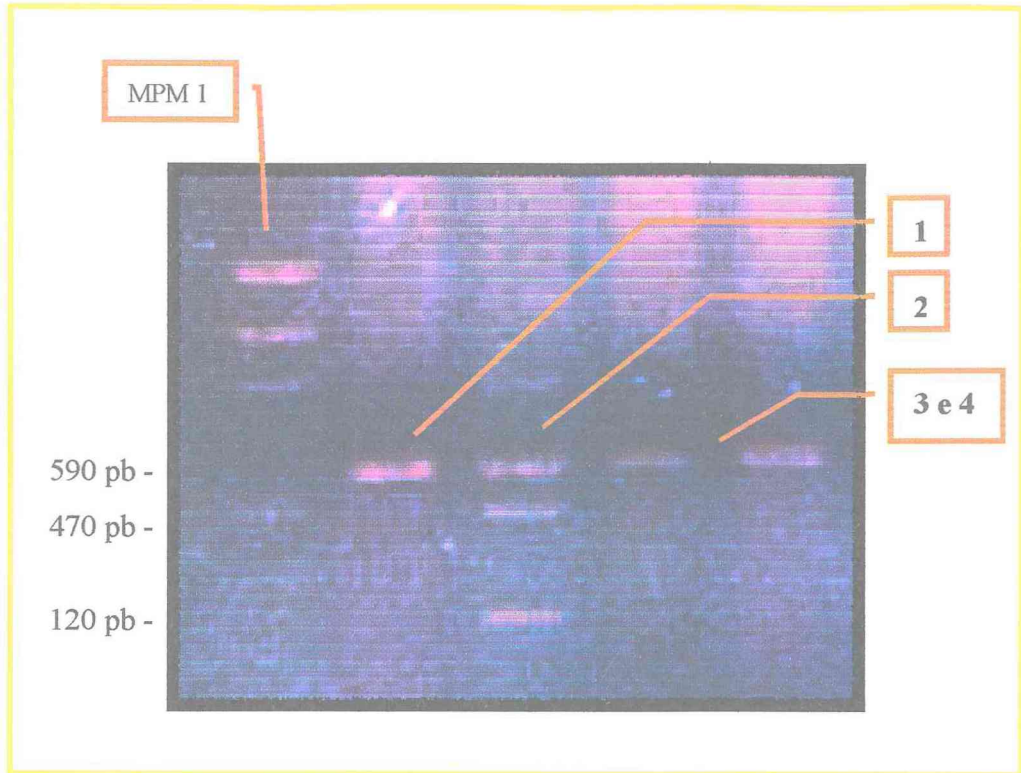


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado pelo brometo de etídio, para visualização do resultado da digestão enzimática com a enzima Hinc II, do fragmento amplificado com os *primers* H7-H8: os pacientes 1, 3 e 4 são homocigotos (-/-) e o paciente 2 é heterocigoto (+/-).

MPM 1: pGM (Marcador de peso molecular).

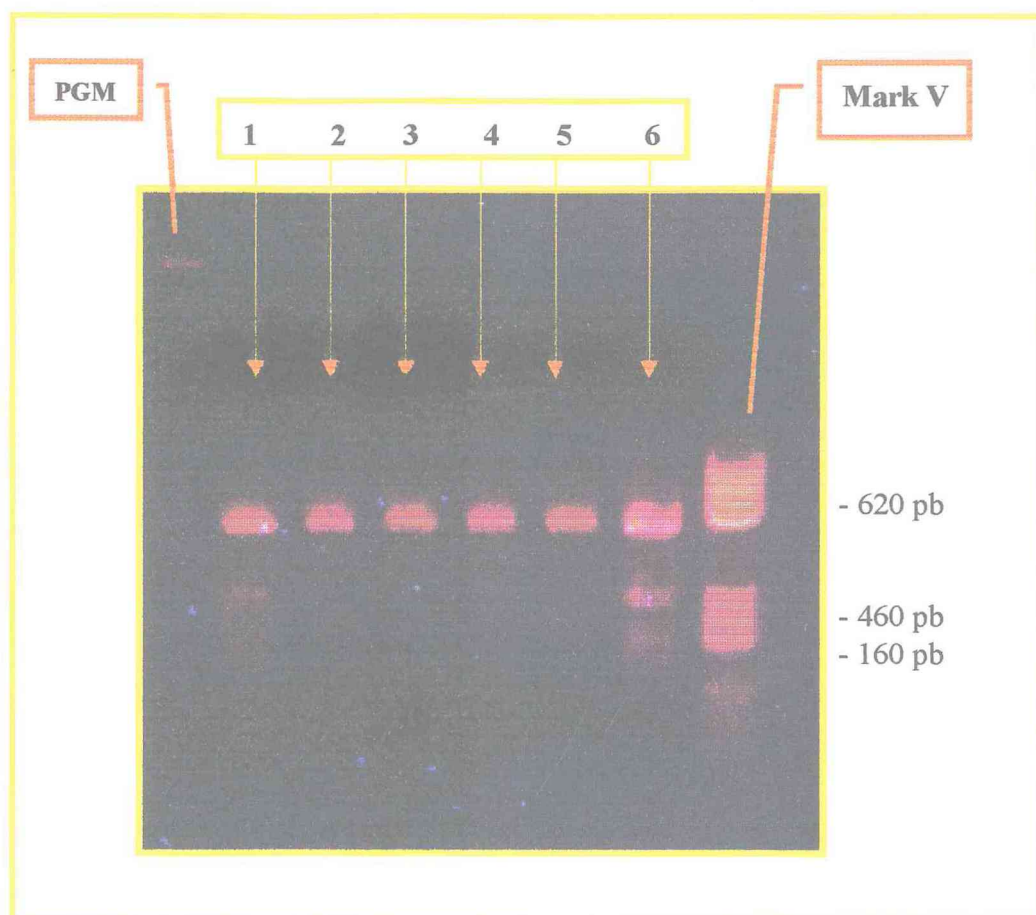


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado pelo brometo de etídio, para visualização do resultado da digestão enzimática com a enzima *Hinf I*, do fragmento amplificado com os *primers* H9-H10: os pacientes 2, 3, 4 e 5 são homocigotos (-/-). O paciente 1 e 6 representam a mesma amostra e foram estudados em duplicata, com o mesmo resultado heterocigoto (+/-).

MPM 1: pGM (Marcador de peso molecular).

MPM 2: Marker V (Marcador de peso molecular).

O padrão dos sítios polimórficos que caracterizou o haplótipo CAR foi definido como [+ - - - + -]. A caracterização do haplótipo Benin foi definido pela seqüência [- - - + + -] e o haplótipo Senegal ficou definido pela combinação [- - - - + +]. Na **tabela III** encontram-se os resultados das reações de digestão enzimática para os pacientes analisados.

Nos casos de heterozigose para dois haplótipos, definiu-se de acordo com as observações anteriores de Kulozik et al. (1986) e Rieder et al. (1991), pela presença de um haplótipo comum, presente em combinação com um haplótipo raro, ao invés de dois haplótipos raros. Em nosso trabalho observamos a presença de cinco haplótipos com a combinação [- - - - + -], sem possibilidade de serem definidos.

A distribuição geral dos genótipos, para o grupo de pacientes, encontra-se disposta na **figura 17**. Os genótipos mais freqüentes foram Ben/Ben e CAR/Ben, ambos com 27,27%. Evidenciamos ainda a ocorrência de um paciente heterozigoto para o haplótipo Senegal, o qual tem baixa freqüência no Brasil e a presença de haplótipos indeterminados em 22,72% dos pacientes.

Em relação a freqüência dos haplótipos, estudados por cromossomos, observamos a presença, em maior número, do haplótipo Benin, com 43,18%, seguido pelo haplótipo CAR com 31,82%, como exposto na **tabela IV**.

Quanto aos resultados das análises laboratoriais dos pacientes subdivididos por haplótipos, não se observou diferenças estatísticas significantes. Entretanto o índice hematimétrico VCM apresentou-se

elevado para os haplótipos CAR e CAR/Benin em relação ao haplótipo Benin, ficando próximo ao limite de significância estatística. O nível de concentração de Hb F, outro importante parâmetro laboratorial, não apresentou diferença estatística significativa entre os distintos haplótipos (tabela V).

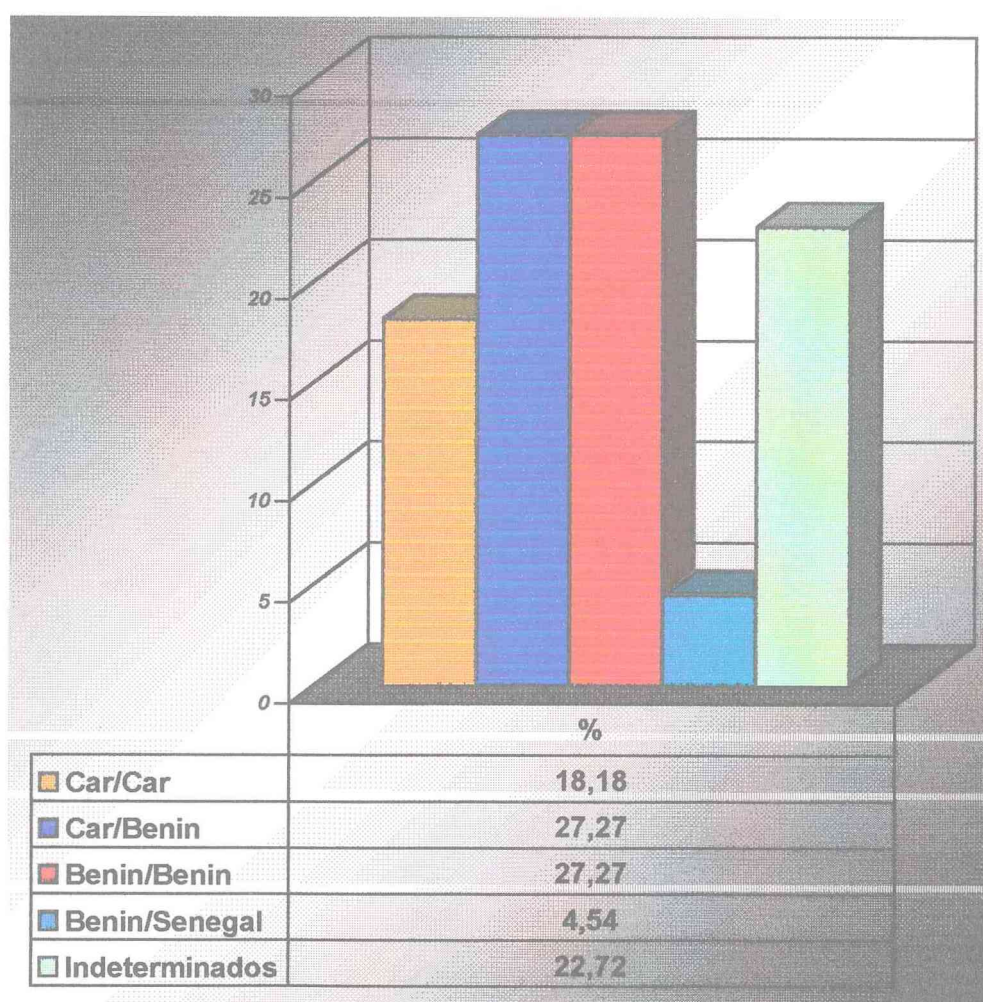


Figura 17: Distribuição das frequências dos genótipos, relativos aos haplótipos, no grupo de 22 pacientes estudados.

Tabela III: Resultados das digestões enzimáticas dos produtos PCR de cada um dos 22 pacientes com anemia falciforme.

Enzima	Hind III (γ^G)	Hind III (γ^A)	Hinc II ($\psi\beta$)	Hinc II(3' β)	Ava II (β)	Hinf (5' β)	Haplótipo
Paciente							
1	+	-	-	-	+	-	CAR
2	+	-	-	+	+	-	CAR/ Benin
3	-	-	-	+	+	-	Benin
4	-	-	-	-	+	+	Benin /Senegal
5	+	-	-	-	+	-	CAR
6	+	-	-	+	+	-	CAR/ Benin
7	+	-	-	+	+	-	CAR/ Benin
8	-	-	-	-	+	-	Indeterminado
9	-	-	-	+	+	-	Benin
10	-	-	-	+	+	-	Benin
11	-	-	-	-	+	-	Indeterminado
12	-	-	-	+	+	-	Benin
13	+	-	-	+	+	-	CAR/ Benin
14	-	-	-	-	+	-	Indeterminado
15	+	-	-	-	+	-	CAR
16	+	-	-	+	+	-	CAR/ Benin
17	+	-	-	+	+	-	CAR/ Benin
18	-	-	-	-	+	-	Indeterminado
19	+	-	-	-	+	-	CAR
20	-	-	-	+	+	-	Benin
21	-	-	-	-	+	-	Indeterminado
22	-	-	-	+	+	-	Benin

Tabela IV: Distribuição das frequências dos haplótipos, por cromossomo, no grupo de 22 pacientes estudados.

Frequência dos haplótipos por cromossomo	Resultados	
	n	%
CAR (Bantu)	14	31,82 %
BENIN	19	43,18 %
SENEGAL	01	2,27 %
Indeterminados	10	22,72 %
Total	44	100 %

Tabela V: Distribuição das variáveis laboratoriais dos pacientes portadores de anemia falciforme, de acordo com seus haplótipos.

Características Laboratoriais	CAR X±dp	Benin X±dp	Car/Benin X±dp	Análise estatística*
Hb (g/dL)	8,45 ± 0,9	7,65 ± 0,97	8,08 ± 1,05	Ns (p=0,61)
Ht (%)	24,75 ± 2,21	23,72 ± 2,63	24,85 ± 3,4	Ns (p=0,76)
VCM (fL)	107,75 ± 3,09	95,75 ± 9,11	109,31 ± 8,63	NS (p=0,054)
HCM (pg)	34,57 ± 0,88	30,72 ± 2,58	34,63 ± 2,81	NS (p=0,096)
CHCM(g/dL)	32,25 ± 0,55	32,13 ± 1,49	32,16 ± 0,60	Ns (p=0,92)
Hb F (%)	6,15 ± 3,61	8,63 ± 3,03	8,65 ± 4,55	Ns (p=0,37)

* Nota: X = média ; dp = desvio padrão ; Ns = não significante

Análise estatística pelo Teste de Kruskal-Wallis

Os valores médios dos dados laboratoriais dos pacientes pertencentes aos haplótipos CAR, Benin e Senegal estão distribuídos na **tabela VI**. Nota-se as concentrações mais elevadas de Hb (8,9 g/dL) e de Hb F (13,4%) para os pacientes do haplótipo Senegal.

Tabela VI: Distribuição dos valores médios (X) hematológicos dos pacientes com haplótipo CAR, Benin e Senegal.

<i>Características</i>	<i>CAR</i>	<i>Benin</i>	<i>Senegal</i>
<i>Laboratoriais</i>	(X)	(X)	(X)
Hb (g/dL)	8,45	7,65	8,9
Ht (%)	24,75	23,72	23
VCM (fL)	107,75	95,75	92
HCM (pg)	34,57	30,72	35,6
CHCM (g/dL)	32,25	32,13	38,7
Hb F (%)	6,15	8,63	13,4

5.4 Dados demográficos do Brasil e do Ceará

A atual composição étnica da população do Brasil, com 56% de brancos, 37,7% de pardos ou mestiços, 5,4% de negros e 0,59% de amarelos (índios e asiáticos), encontra-se disposta na **tabela VII**. A composição étnica referente ao estado do Ceará, com 67% de brancos, 32,4% de pardos ou mestiços, 1% de negros e 0,2% de amarelos (índios e asiáticos), encontram-se disposta na **tabela VIII**, sendo estes números originados do censo demográfico realizado no ano de 2000 pelo IBGE. Os números populacionais observados no estado do Ceará demonstram uma certa semelhança aos números populacionais referentes aos dados nacionais. Observa-se, entretanto, uma importante diferença para os valores referentes à população negra, sendo menor

(1%) a participação deste segmento racial na composição demográfica no estado do Ceará em contraste com o observado no Brasil (5%).

Tabela VII: Distribuição da população brasileira por etnia / cor.

População por raça	Nº absoluto	Nº relativo
Branços	95.851.775	56%
Negros	8.645.506	5,4%
Pardos	64.043.050	37,70%
Amarelos	742.372	0,44%
Índios	261.740	0,15%
Total	169.590.693	100%

Fonte: Censo demográfico 2000/IBGE

Tabela VIII: Distribuição da população do estado do Ceará por etnia / cor.

População por raça	Nº absoluto	Nº relativo
Branços	4.932.572,00	66,4%
Negros	74.174	1%
Pardos	2.410.656	32,4%
Amarelos	7.418	0,1%
Índios	7.418	0,1%
Total	7.418.476	100%

Fonte: Censo demográfico 2000/IBGE

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

No decorrer dos quase cem anos desde os primeiros estudos relacionados a anemia falciforme, grandes progressos foram obtidos por vários e renomados pesquisadores. Como resultado de todos esses conhecimentos, um novo campo de estudo das ciências surgiu, a biologia molecular. De posse dessa poderosa ferramenta, passou-se a desvendar a natureza genética de inúmeras patologias e/ou microorganismos potencialmente patogênicos que acometem a humanidade.

A substituição da base nitrogenada timina (T) por adenina (A), ocasionando a substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina, na posição seis da cadeia β globínica é a mesma para todo paciente falcêmico. No entanto a ampla variação de apresentação clínica dos pacientes, em diferentes localidades do mundo, variando de formas quase assintomáticas à formas com alta taxa de mortalidade, continua a ser fonte de inúmeras pesquisas. A polimerização da Hb S e a falcização das hemácias são extremamente bem conhecidas. As variações das condições climáticas, sociais, econômicas e o acesso aos cuidados médicos são fatores importantes nessa diferença, mas não explicam todo seu contexto (Nagel et al., 1987).

Com a primeira descrição da existência de duas mutações distintas para a Hb S, detectadas pela ação da enzima de restrição *Hpa* I no sítio de 5 kb a 3' do gene β , estabeleceu-se o conceito de origem

multicêntrica para esta doença (Kan & Dozy, 1978). Estudos subsequentes definiram os três principais haplótipos para a anemia falciforme: CAR (República Centro Africana), Benin e Senegal, originados em regiões distintas do continente africano (Pagnier, 1984) e um outro haplótipo, também de origem independente, foi descrito em populações provenientes da península arábica e da Índia (Kulozik, 1986). A ocorrência dessa diversidade genética em torno da mutação permitiu uma melhor compreensão da heterogeneidade clínica da doença, além de sua importância para o estudo antropológico (Zago, 1993).

O estudo dos haplótipos pode ser utilizado com diferentes objetivos: para a determinação da origem unicêntrica ou multicêntrica de uma mutação, para discriminar eventos epistáticos (quando outros genes interferem com a expressão fenotípica do gene mutante) e para definir o caminho de fluxo de um gene específico mutante. Quando os dados e informações estão suficientemente consolidados como no caso do agrupamento codificante do gene β mutante, então os haplótipos podem ser úteis no estudo da origem e evolução da raça humana (Nagel & Ranney, 1990).

O presente trabalho representa a primeira análise dos haplótipos da anemia falciforme em pacientes naturais do Ceará.

A distribuição das frequências dos haplótipos em Belém/PA foi de 66,7% para o haplótipo CAR, 30% para o haplótipo Benin e 3,3% para o haplótipo Senegal (Pante-de-Souza et al., 1998). Em Salvador/BA, a distribuição das frequências dos haplótipos foi de 55% para o haplótipo CAR, 45% para o haplótipo Benin e não houve

ocorrência do haplótipo Senegal (Figueiredo et al., 1994). Na região de Campinas/SP, a distribuição das frequências dos haplótipos foi de 64,7% para o haplótipo CAR, 35,2% para o haplótipo Benin e não houve ocorrência do haplótipo Senegal (Gonçalves, 1994). Em Ribeirão Preto/SP, a distribuição dos haplótipos foi de 73% para o haplótipo CAR, 25,5% para o haplótipo Benin e 1,5% de ocorrência do haplótipo Senegal (Zago et al., 1992). A distribuição das frequências dos haplótipos na cidade de Porto Alegre/RS foi de 79,6% para o haplótipo CAR, 18,4% para o haplótipo Benin e 2% para o haplótipo Senegal (Wagner, 1996).

A distribuição das frequências dos haplótipos encontrados, considerando apenas os haplótipos que puderam ser determinados, para este grupo (Ceará) foi de: 55,9% para o haplótipo Benin, 41,2% para o haplótipo CAR e 2,9% para o haplótipo Senegal. Os nossos dados, em comparação aos dos demais estudos realizados no Brasil, mostram associação entre os seus valores para um alfa de 5% ($\alpha = 0,05$ onde $X^2 = 17,02 / p < 0,05$).

Avaliando qualitativamente os resultados obtidos no nosso meio, verificamos uma tendência para a presença em maior número do haplótipo Benin em relação ao haplótipo CAR, divergindo das frequências encontradas nas cidades de Belém, Campinas, Ribeirão Preto e Porto Alegre, onde a presença do haplótipo CAR é preponderante (Tabela IX). Entretanto assemelha-se aos encontrados na cidade de Salvador/Bahia e isso pode se dever ao fato dessa cidade ter sido importante entreposto do comércio escravagista, tornando-se

uma fonte importante de fornecimento de escravos para o Ceará (Girão, 1984).

O paciente portador do haplótipo Senegal identificado neste estudo, mostra alguns valores hematológicos distintos dos encontrados para as médias dos pacientes com outros haplótipos. As principais diferenças devem-se ao valor mais elevado da sua Hb ($X = 8,9$ g/dL) e da Hb F ($X = 13,4\%$). Entretanto o valor do VCM ($X = 92$ fL) para este indivíduo, ao contrário, ficou abaixo dos resultados observados nos demais haplótipos. Estes valores são compatíveis com o descrito por Nagel et al. (1991), que estudando 60 indivíduos, com pelo menos um cromossomo pertencente ao haplótipo Senegal, evidenciaram uma concentração de Hb de $9,6 \pm 1,1$ g/dL g/dL, VCM de $91,2 \pm 9,2\%$ e concentração de Hb Fetal igual a $9,9 \pm 5,4\%$.

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

Populações	Nº de cromossomos	CAR	Benin	Senegal
Belém(PA)	60	66,7	30,0	3,3
Salvador (BA)	42	55,0	45,0	0,0
R. Preto (SP)	67	73,0	25,5	1,5
Campinas (SP)	142	64,7	35,2	0,0
Porto Alegre (RS)	49	79,6	18,4	2,0
Fortaleza (CE) / presente estudo	34	41,2	55,9	2,9

As análises hematológicas não apresentaram diferenças em relação aos valores usualmente encontrados e amplamente descritos na literatura (Queiroz, 1996) para os portadores da hemoglobinopatia SS. A exceção deveu-se a uma presença de valores aumentados para o VCM, principalmente relacionados ao haplótipo CAR. Sabe-se que a macrocitose faz parte do quadro eritrocitário da anemia falciforme, em decorrência da intensa produção de reticulócitos e presença, em grande número, das células densas e ainda agravada por uma deficiência no aporte nutricional e medicamentoso (de reposição) do substrato ácido fólico.

Não há dados na literatura associando os haplótipos do gene β^S ao aumento do VCM. Não podemos descartar ainda a possibilidade de que, por conta da pouca contribuição dos povos mediterrâneos na formação étnica da população cearense, termos uma diminuta associação de anemia falciforme com α -talassemia. Sabe-se que o valor do VCM observado nessa hemoglobinopatia é menor que o encontrado na anemia falciforme (Charache, 1991). A associação destas duas patologias foi descrita pela primeira vez em uma família da Arábia Saudita por Wheatherall em 1969 (Queiroz, 1996) e no Brasil foi identificada essa associação para pacientes do Estado de São Paulo, em 22% de heterozigotos (Costa et al., 1993) e 17% (Figueiredo, 1993). A menor associação da α -talassemia com anemia falciforme no nosso meio poderia se expressar pelo falta do seu efeito redutor no VCM dos pacientes.

A média da concentração de hemoglobina fetal, para o grupo de pacientes foi de $7,61 \pm 1,0\%$, e equiparou-se as médias observadas nos

demais estudos da literatura. A concentração de Hb F média encontrada por Queiroz (1996) na Bahia foi de 6,45%. Em São Paulo, Figueiredo (1993) encontrou uma Hb F de 6,35% e em Alagoas, Costa (1999) encontrou concentração média de Hb F de 9,28%.

Os estudos dos haplótipos, realizados neste grupo de pacientes, constituem fonte pioneira de dados referentes ao diagnóstico molecular da anemia falciforme no estado do Ceará. Contribui-se dessa forma, com mais informações sobre a doença e a expressão do seu polimorfismo genético, para serem analisadas em conjunto aos demais dados provenientes de outras localidades e regiões do Brasil.

As informações sobre os haplótipos definidos nesse trabalho indicam uma aparente predominância do grupo Benin em nosso meio e parecem confirmar as informações obtidas através dos documentos históricos sobre nossa origem étnica. Os dados hematológicos, avaliados junto ao contexto molecular da anemia falciforme, serão referência para o aprofundamento do conhecimento clínico da doença, bem como, valioso apoio no seguimento clínico dos pacientes ao longo do tempo.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

7.1 A distribuição dos genótipos em relação aos haplótipos da anemia falciforme para o grupo de 22 pacientes estudados no presente trabalho foi de: 18,18% para o haplótipo CAR/CAR, 27,27% para o haplótipo CAR/Benin, 27,27% para o haplótipo Benin/Benin e 4,54% para o haplótipo Benin/Senegal.

7.2 A distribuição dos haplótipos da anemia falciforme, por cromossomo, para o grupo de 22 pacientes foi de: 31,82% para o haplótipo CAR, 43,18% para o haplótipo Benin, e 2,27% para o haplótipo Senegal. Os haplótipos não puderam ser determinados em 22,72% dos pacientes avaliados.

7.4 Os parâmetros hematológicos revelaram valores médios: Hb-8,07 ± 1,03 g/dL, Ht-24,14 ± 2,9%, VCM-105,57 ± 10,05 fL, HCM-33,95 ± 2,98 pg, CHCM-32,49 ± 1,65 g/dL e Hb Fetal-7,61 ± 1,0 %. Esses resultados não apresentaram diferenças estatísticas significantes em comparação com os dados da literatura.

7.5 A distribuição dos genótipos para este grupo de pacientes com anemia falciforme, nascidos no Ceará, está em consonância com os dados históricos e geográficos referentes às origens étnicas da população negra do estado do Ceará. Confirma assim serem nossos negros oriundos principalmente de Angola, Congo e Moçambique exibindo haplótipo CAR, e da África ocidental (Guiné, Costa do Marfim, Benin, Nigéria) com haplótipo Benin.

SUMMARY

8. SUMMARY

The sickle cell anemia is one the most important hereditary haematology disorder which affect a great number of the population in the whole world. Researches done to elucidate its genetic nature gave origin to a new branch of science that today is called molecular biology. The discovery of the β^S mutation polymorphisms defined five main illness haplotypes and made it possible to understand the clinic variation found in different regions. These haplotypes are identified by names and numbers: CAR (20), Benin (19), Senegal (3), Asian (31), Cameroon type (17). The present work studied the β^S mutation haplotypes in 22 patients born in Ceará and related the molecular analysis results to the historical records found on the origin of the black population of the former state. The following laboratory analysis were made: Hb, Ht, VCM, HCM, CHCM and Hb F concentrations. It was also made the study of the haplotypes by analysis of the polymorphic restriction sites: Hind III- γ^G , Hind III- γ^A , Hinc II- $\psi\beta$, Hinc II-3' $\psi\beta$, Hinc II-3' β , Ava II β IVS2 and Hinf I-5' β . The hematology results followed the already know , with exception of a macrocitosis (VCM > 100 fL) that presented rates above refence values. In relation to the haplotypes, the subtypes Benin and CAR was the most frequently noticed (43% and 32%) and the result is similar to the one forend in Salvador-BA. Confronting the historical dates, we came to the conclusion that molecular analysis seems to prove the origin of the negro population of Ceará, which comes from Angola, Congo Mozambique and Gold Coast.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEKILE, A.D., Historical and anthropological correlates of β^S haplotypes and α -thalassemia and β -thalassemia alleles in the Arabian peninsula. **Hemoglobin**, v.21, n.3, p. 281-296, 1997.
- ALVARES FILHO, F., NAOUM, P.C., MOREIRA, H.W., CRUZ, R., MANZATO, A. J. & DOMINGOS, C.R.B., Distribución geográfica etaria y racial de la hemoglobina S em Brasil. **Sangre**, v.40, p. 97-102, 1995.
- ANTONARAKIS, S.E., BOEHM, C.D., GIARDINA, P.J.V. & KAZAZIAN Jr., H.H., Nonradon association of polymorphic restriction sites in the β -globin gene cluster. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.79, p.137-141, 1982.
- ANTONARAKIS, S.E., KAZAZIAN Jr., H.H. & ORKIN, S. H., DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. **Hum. Genet.**,v.69, p.1-14, 1985.
- BACHIR, D. & GALACTÉROS, F., Prise em charge des maladies drépanocytaires – dans de bonne conditions l'espérance de vie des drépanocytaires dépasse 40 ans. **La Revue du praticien – medecine generale**, n.71, p.53-66, 1989.
- BALLAS, S.K. & MOHANDAS, N., Pathophysiology of vaso-occlusion. In: CHARACHE, S. & JONHSON, C.S. (Ed.), **Hematology/Oncology Clinics of North America – Sickle Cell Disease**, v.10, n.6, p. 1221-1240, December, 1996.
- BUNN, H, F., Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, n.11, pp.762-769, 1997.
- BUNN, H, F. & FORGET, B.G., **Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects**. W.B. Saunders Company. 1^a ed., 1986, 690 p.
- CAMPOS, E., Revolução da condição de vida dos cativos do Ceará. In: COLETÂNEA, **Da Senzala para os Salões**. Secretaria de Cultura, Turismo e Desporto,1988, p. 21-74.
- CHARACHE, S., LUBIN, B. & REID, C.D.(Ed.), **Management and Therapy of Sickle Cell Disease**. U.S. Department of Health and Human services - Public Health Services - National Institute of Health, August,1991.

COSTA, F.F., GESTEIRA, F., SAAD, S.O.T., ARRUDA, V.R., GONÇALVES, M.S., FERNANDES, D., NASCIMENTO, M.L., MIRANDA, S.R.P. CARVALHO, M.H., SONATI, M.F. & QUIROZ, I.L., β^S – gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia from two regions of Brazil. **Am. J. Hematology**, v.46, p.96-97, 1993.

COSTA, P.J.M.S., **Anemia falciforme: diversidade clínica e laboratorial em crianças e adolescentes portadores do haplótipo Bantu do gene da globina β^S** . 1999, p.64. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 1999.

DACIE, J.V. & LEWIS, S.M., **Practical hematology**. Churchill Livingstone, sexta edição, 1984.

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

EMBURY, S. H., DOZY, A.M, MILLER, J., DAVIS Jr., J. R., KLEMAN, K.M., PREISLER, H., VICHINSKY, E., LANDE, W.N., LUBIN, B. H., KAN, Y.W. & MENTZER, W.C., Concurrent sickle-cell anemia and α -thalassemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 306, n.5, p.270-274, 1982.

FABRY, M.E. & KAUL, D.K. Sickle cell vaso-occlusion. In: NAGEL, R.L. (Ed.), **Hematology/Oncology Clinics of North America – Hemoglobinopathies**, v.5, n.3, p. 375-398, June, 1991.

FAIRBANKS, V.F. & KLEE, G.G., Biochemical aspects of Hematology. In: TIETZ, N.W., **Fundamentals of clinical chemistry**, 3^a ed., Philadelphia, USA: W.B. Saunders company, 1987, v.2, chp.24, p.789-824.

FIGUEIREDO, M.S., **Efeitos da talassemia α e dos haplótipos do complexo da globina β nas alterações clínicas e laboratoriais da anemia falciforme no Brasil**. 1993, 79 p. Tese de Doutorado da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1993.

FIGUEIREDO, M.F., **Pesquisa do traço falcêmico em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará - regional Crato**. 1994, 36 p., Monografia do Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1994.

FIGUEIREDO, M.S., KERBAUY, J., GONÇALVES, M.S., ARRUDA, V.R., SAAD, S.O.T., SONATI, M.F., STOMING, T.A & COSTA, F.F., Effect of α -thalassemia and β -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of Sickle-cell anemia in Brazil. **Am. J. Hematology**, v.53, p.72-76, 1996.

- FIGUEIREDO, M.S., SILVA, M.C.B.O., GUERREIRO, J.F., SOUZA, G.P., PIRES, A.C.R. & ZAGO, M.A, The heterogeneity of β^S cluster haplotypes in Brazil. **Gene Geography**, 8, 7 – 12, 1994.
- GIRÃO, R., **A abolição no Ceará**. Imprensa Oficial do Ceará, Secretaria de Cultura Turismo e Desporto, 1984, Capítulo III, p. 47-55.
- GONÇALVES, M.S., NECHTMAN, J.F., FIGUEIREDO, M.S., KERBAUY, J., ARRUDA, V.R., SONATI, M.F., COSTA, F.F. & STOMING, T.A., Sickle cell disease in a brazilian population from São Paulo: a study of the β^S haplotypes. **Hum. Hered.**, v. 44, p.322-327, 1994.
- GOOSENS, M., Recent developments in the diagnosis of the hemoglobin disorders. **Nouv. Rev. Fr. Hematol.**, v.32, p. 63-65, 1990.
- GOOSENS, M. & KAN, Y. Y., DNA analysis in the diagnosis of the hemoglobin disorders. **Methods in enzymology**, v. 76, p. 805-817, 1981.
- HENRY, J. B. et al (ed.), **Clinical diagnosis & management by laboratory methods**. 18^a ed., Philadelphia, USA: W. B. Saunders company, chp.25, p.627-716, 1991.
- HERRICK, J.B., Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Arch. Intern. Med.**, v.6, p. 517 – 521, 1910.
- HEWITT, R., KRAUSE, A., GOLDMAN, A., CAMPBELL, G & JENKINS, T., β – globin haplotype analysis suggests that a major source of malagasy ancestry is derived from bantu – speaking negroids, **Am. J. Hum. Genet.**, v.58, p.1303-1308, 1996.
- HIGGS, D.R., VICKERS, M. A., WILKIE, A.O. M., PRETORIUS, I.M., JARMAN, A.P. & WHETERALL, D.J., A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. **Blood**, 73 p:1081 –1104, 1989.
- HOFFBRAND, A.V. & PETTIT, J.E., **Essential Haematology**. London,UK, Third edition, Blackwell Science, 1993. 437p.
- KAN, Y.M. & DOZY, A.M., Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β – globin structural gene: relationship to sickle mutation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.75, p.5631-5635, 1978.
- KULOZIK, A. E., WAINSCOAT, J. S., SERJEANT, G. R., KAR, B. C., AL-AWAMY, B., ESSAN, G. J. F., FALUSI, A. G., HAQUE, S. K., HILALI, A. M., KATE, S., RANASINGHE, W.A. E.P. & WEATHERALL, D.J., Geographical survey of β^S – globin gene haplotypes: evidence for na

- independent Asian origin of the sickle-cell mutation. **Am. J. Hum. Genet.**, v.39, p.239-244, 1986.
- LABIE, D. & NAGEL, R.L., Genetic heterogeneity of sickle mutations. **Acta Haemat.**, v.78, p. 184 –185, 1987.
- LANCLOS, K.D., ÖNER, C., DIMOVSKI, A.J., GU, Y.-C. & HUISMAN, T.H.J., Sequence variations in the 5' flanking and IVS-II regions of the γ^G and γ^A – globin genes of β^S chromosomes with five different haplotypes. **Blood**, v.77, n.11, p. 2488-2495, 1991.
- LEHMANN, H., HUNTSMAN, R.C., **Man's Haemoglobins**, ed. 2, Amstardam, North Holland Publishing, 1974.
- LEW, V.L. & BOOKCHIN, R.M., Pathophysiology of Sickle Cell Anemia. . In: CHARACHE, S. & JONHSON, C.S. (Ed.), **Hematology/Oncology Clinics of North America – Sickle Cell Disease**, v.10, n.6, p.1241- 1254, December, 1996.
- MARTINS, J. M., PITOMBEIRA, M. S. & CUNHA, R. V., Hemoglobinopatias. Estudos feitos no estado do Ceará. **Hospital**, v. 68, p.701-709, 1965.
- MEARS, J.L., LACHMAN, H.M., CABANES, R. et al, Th sickle gene polymorphism in North Africa. **Blood**, v.58, p. 599 – 601, 1981.
- MARTINS, V. S., **Pesquisa de hemoglobinas anormais em pacientes do Hospital Infantil Albert Sabin no período de outubro à dezembro de 2000**. 2001, 40 p., Monografia do XV Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2001.
- MONTH, S. R., WOOD, R. W., TRIFILLIS, P. T., ORCHOWSKI, P. J., SHARON, B., BALLAS, S. K., SURREY, S. & SCHWARTZ, E., Analysis of 5' flanking regions of the gamma globin genes from major african haplotype backgrounds associated with sickle cell disease. **J. Clin. Invest.**, v.83, p. 364-370, 1990.
- MOTULSKY, A.G., Frequency of sickling disorders in U.S. blacks. **N. Engl. J. Med.**, v. 288, n.1, p.31-33, 1973.
- MUNIZ, A., CORRAL, L., ALAEZ, C., SVARCH, E., ESPINOSA, E., CARBONELL, N., DI LEO, R., FELICETTI, L., NAGEL, R.L. & MARTINEZ, G., Sickle cell anemia and β – gene cluster haplotypes in Cuba. **Am. J. Hematology**, v.49, p.163-164, 1995.

- MUKHERJEE, M. B., LU, C. Y., DUCROCQ, R., GANGAKHEDKAR, R.R., COLAH, R.B., KADAM, M.D., MOHANTY, D., NAGEL, R.L. & KRISHNAMOORTHY, R., Effect of α -thalassemia on sickle cell anemia linked to the Arabia-Indian haplotype in India, the β -like globin gene cluster haplotypes. **Am. J. Hematology**, v.55, p.104-109, 1997.
- NAGEL, R.L., ERLINGSSON, S., FABRY, M.E., CROIZAT, H., SUZUKA, S.M., LACHMAN, H., SUTTON, M., DRISCOLL, C., BOUHASSIRA, E. & BILLET, H.H., The Senegal DNA haplotype is associated with amelioration of anemia in African-American sickle cell anemia patients. **Blood**, v.77, n.6 p. 1371-1375, 1991.
- NAGEL, R.L. & RANNEY, H. M., Genetic epidemiology of structural mutations of the β - globin gene. **Seminars in hematology**, v.27, p.342-359, 1990.
- NAGEL, R.L., RAO, S. K., DUNDA-BELKHODJA, O., CONNOLLY, M. M., FABRY, M.E., GEORGES, A., KRISHNAMOORTHY, R. & LABIE, D., The hematologic characteristics of sickle cell anemia bearing the bantu haplotype: the relationship between γ^G and Hb F level. **Blood**, v.69, n.4, p. 1026-1030, 1987
- NAGEL, R.L., FABRY, M.E., PAGNIER, J., ZAHOUN, I., WAJCMAN, H., BAUDIN, V., & LABIE, D., Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. **N. Engl. J. Med.**, v.312, p. 880-884, 1985.
- NAOUM, P. C., **Hemoglobinopatias e Talassemias**. Sarvier, 1997.
- NAOUM, P. C., Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemot.**, v.22(1), p. 5-22, 2000.
- NAOUM, P. C. & DOMINGOS, C.R.B., Doença falciforme no Brasil, origem, genótipos, haplótipos e distribuição geográfica. **J. Bras. Patol.**, v.33, p.145-153, 1997.
- NATHAN, D.G., **Hematology of infancy and childhood**. W.B. Saunders company, 4 th edition, 1886 p., 1992.
- NELSON, D.A., & DAVEY, F.R., Erythrocytic disorders. In: HENRY, J. B. et al (ed.), **Clinical diagnosis & management by laboratory methods**. 18^a ed. Philadelphia, USA: W.B. Saunders company, 1991, chp.25, p.627-716.
- ÖNER, C., DIMOVSKI, A.J., OLIVIERI, N. F., SCHILIRO, G., CODRINGTON, J. F., FATTOUM, S., ADEKILE, A D., ÖNER, R., YÜREGIR, G. T., ALTAY, C., GURGEY, A, GUPTA, R. B., JOGESSAR, V. B., KITUNDU, M. N., LOUKOPOULOS, D., TAMAGNINI, G.,

- RIBEIRO, M. L. S., KUTLAR, F., GU L-H., LANCIOS, K. D. & HUISMAN, T.H.J., β^S haplotypes in various world populations. **Hum. Genet.**, v.89, p. 99-104, 1992.
- PAGNIER, J., MEARS, G., DUNDA-BELKHODIA, O, SCHAEFER-REGO, K.E., BELDJORD, C., NAGEL, R.L. & LABIE, D., Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.81, p.1771-1773, 1984.
- PANTE-DE-SOUZA, G., RIBEIRO, R. C. M., SANTOS, E. J. M., ZAGO, M.A. & GUERREIRO, J. F., Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the effect of slave trade and internal migrations. **Genet. Mol. Biol.**, v.21, n.4, p. 1-10,1998.
- PANTE-DE-SOUZA, G., RIBEIRO, R. C. M., SANTOS, E. J. M. & GUERREIRO, J. F., β -globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon regions for a significant gene flow from Atlantic west Africa. **Annals of Human Biology**, v.26, n.4 , p. 365-373,1999.
- PAULING, L., ITANO, H., SINGER, S. J. & WELLS, I.C., Sickle cell anemia: a molecular disease. **Science**, v. 110, p. 543 – 548, 1949.
- POWARS, R.D., β^S -gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. In: NAGEL, R.L. (Ed.), **Hematology/Oncology Clinics of North America – Hemoglobinopathies**, v.5, n.3, p. 475-493, June, 1991.
- PROUDFOOT, N. J., SHANDER, M. H. M., MANLEY, J. L. GEFTER, M. L. & MANIATIS, T., Structure and in vitro transcripton of human globin genes. **Science**, v.209, p.1329-1336, 1980.
- QUEIROZ, I.M.L P., **Características clínicas, hemetológicas e genéticas em pacientes homozigotos para a hemoglobinopatia S da Bahia e de São Paulo**. 1996, 111p., Dissertação (Mestrado em Hematologia), Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo,1996.
- QUEIROZ, I.M.L P. *apud* NATHAN, D.G. & OISK, F.A., **Hematology of infancy and childhood**. W.B. Saunders Company, 4^a ed., 1992, 1886 p.
- RIEDEL, O., O escravo no Ceará. In: COLETÂNEA, **Da Senzala para os Salões**. Secretaria de Cultura, Turismo e Desporto,1988, p. 15-20.
- RIEDER, R.F., SAFAYA, S., GILLETEE, P., FRYD, S., HSU, H., ADAMS III, J.G. & STEINBERG, M.H., Effect of β -globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. **Am. J. Hemat.**, 36: 184 – 189, 1991.

- SAIKI, R. K., SCHARF, S. J., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G.T., & ERLICH, H. A. & ARNHEIM, N., Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D.H.,STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A., Primer-direct enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-491, 1988
- SALDANHA, P. H., Mistura de raças, mistura de genes. **Ciência hoje**, v.9, pp.49-54.1989.
- SALZANO, F. M., Incidence, effects, and management of sickle cell disease in Brazil. **Am. J. Pediatr. Hemat. Oncol.**, 7 : 240 – 244, 1985.
- SAVIT, T.L. & GOLDBERG, M.F., Herrick's 1910 case report of sickle cell disease: the rest of the history, **J.A.M.A.**, 261: 266 – 271, 1989.
- SERJANT, G.R., **Sickle cell disease**. Oxford University Press. Segunda edição, 631, p. 1992.
- SILVA, P.A.O., **O declínio da escravidão no Ceará**. Universidade Federal de Pernambuco, 1988.
- SMETANINA, N. S., GU, L-H. & HUISMAN, T.H.J., Comparison of the relative quantities of γ - mRNA and fetal hemoglobin in SS patients with different haplotypes. **Acta Haemat.**, v.100, p. 4 –8, 1998.
- SOUTHERN, E.M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, v. 98, p. 503–517,1975.
- SOUZA, I.P., SILVA, M. J. & ARRUDA, A.B.L., Frequência de hemoglobinas anormais detectadas em doadores de sangue – HEMOCE. **News Lab.**, n.26, p. 96-100, 1997.
- STEINBERG, M. H., NAGEL, R. L., LAWRENCE, C., SWAMINATHAN, V., LU, Z-H, PLONCZYNSKI, M. & HARRELL, A., β -globin gene haplotype in Hb SC disease. **Am. J. Hematology**, v.52, p.189-191, 1996.
- STEINBERG, M. H., Management of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v.340, n.13, p. 1021-1029, 1999.

- SUTTON, M., BOUHASSIRA, E. & NAGEL, R.L., Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of the β -like globin gene cluster haplotypes. **Am. J. Hematology**, v.32, p.66-69, 1989.
- TIETZ, N.W., **Fundamentals of clinical chemistry**, 3^a ed., Philadelphia, USA: W.B. Saunders company, 1987, v.2, chp.24, p.789-824.
- VICHINSKI, E. P., Understating the morbidity of sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 49, p974-982, 1997.
- VIEIRA, S., **Introdução a estatística**. Rio de Janeiro: Editora Campos, 289 p., 1981.
- WAGNER, S.C., FRIEDRICH, J.R., JOB, F., & HUTZ, M.H., Caracterização molecular da anemia falciforme em pacientes de Porto Alegre. **Rev. Bras. de Genet. (Suppl.)** 19: 244 (*Abstract*), 1996.
- WINTROBE'S, **Clinical Hematology**, 10 ed., v.2, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 1999.
- W.H.O., Working Group – Hereditary anemias: genetics basis, clinical features, diagnosis and treatment. **Bull. WHO**, v.60, p.643-660, 1982.
- ZAGO, M. A., FIGEIREDO, M.S., and OGO, S. H., Bantu β S cluster haplotype predominantes among Brazilian blacks. . **Am. J. Phys. Anthropol.** 88: 295 – 298, 1992.
- ZAGO, M. A., Origem e heterogeneidade da anemia falciforme. **Boletim**, v. XV, n° 162, p.3-8, 1993.

APÊNDICES

10. APÊNDICES

Apêndice 1: análise eletroforética da hemoglobina

- Os hemolisados para proceder eletroforese de hemoglobina em pH 8,6 alcalino, foram preparados com solução de saponina a 1% .
- Os hemolisados para proceder eletroforese de hemoglobina em pH 6,2 ácido foram preparados com solução de clorofórmio.
- Centrifugou-se 2 mL de sangue total a 2000 rpm por cinco minutos, removendo-se o plasma . Os eritrócitos foram lavados em solução salina 0,85%, descartando-se o sobrenadante.
- Ao volume de hemácias lavadas, adicionou-se o mesmo volume de água destilada. Homogeneizou-se e após 15 minutos, adicionou-se um volume de saponina ou clorofórmio igual ao do hemolisado. Agitou-se vigorosamente o tubo com a mistura e após 24 h na geladeira foi centrifugado novamente por 15 minutos a 2000 rpm.
- As corridas eletroforéticas em pH 8,6 foram realizadas em fita de acetato de celulose, marca celm (cellogel) e em pH 6,2 em filmes de ágar ácido, marca celm(celmgel)

- Reagentes para eletroforese pH 8,6:

Solução tampão Tris-EDTA-borato pH 8,6

Ácido etileno-diamino-tetracético – 10,2g

Ácido bórico – 3,2 g

H₂O destilada qsp – 1000 mL

Solução corante Ponceau

Ponceau S – 0,5g

Ácido tricloroacético – 5,0g

H₂O destilada qsp – 1000 mL

Solução descorante

Ácido acético glacial – 100 mL

Metanol – 50 mL

H₂O bidestilada qsp – 1000 mL

- Reagentes para eletroforese pH 6,2:

Solução tampão fosfato pH 6,2

NA HPO – 2,02g

NAH PO.HO – 7,66g

H₂O destilada qsp – 100 mL

Solução corante Ponceau

Ponceau S – 0,5g

Ácido tricloroacético – 5,0g

H₂O destilada qsp – 1000 mL

Solução descorante

Ácido acético glacial – 100 mL

Metanol – 50 mL

H₂O bidestilada qsp – 1000 mL

Apêndice 2: determinação da concentração da Hb Fetal

- Método de Singer

1-Equipamentos:

espectrofotômetro, pipetas de 5mL, 20 e 100 μ L, cronômetro, papel de filtro 44, tubos de vidro 13x100 mm, funis de 3 a 4 cm e banho-maria a 20°C.

2- Reagentes:

a) Solução de NaOH N/12 (3,3g/1000mL H₂O)

b) Solução saturada de sulfato de amônio

(NH₄)₂ SO₄ – 500g

H₂O bidestilada qsp – 500mL

- Método de Betke

1-Equipamentos:

espectrofotômetro, pipetas de 1 mL, 2 mL, 5 mL e 10 mL, cronômetro, papel de filtro 01, tubos de vidro 17x100 mm, funis de 3 a 4 cm.

2-Reagentes:

a) Solução de Drabkin (cianeto)

$K_3 Fe (Cn)_6$ – 200mg

KCN – 200mg

H₂O bidestilada qsp – 1000mL

b) NaOH 1,2 N

NaOH – 48g

H₂O destilada – 1000mL

c) Solução saturada de sulfato de amônio

$(NH_4)_2 SO_4$ – 500g

H₂O bidestilada qsp – 1000mL

Apêndice 3 – análise do DNA

1) Solução de lise dos leucócitos

NaCl (0,3 M) – 6mL

EDTA (10 mM) – 5mL

Tris-HCl (10 mM pH7,5) – 0,5mL

Uréia (7M) – 4,2g

H₂O bidestilada qsp – 1000mL

2) Solução SLB

Tris-HCl 2 M pH 7,6

EDTA 0,5 M pH 8,0

NaCl 5M

SDS 10%

3) Solução CLB

Sacarose 15%

Tris-HCl 2 M pH 7,6

MgCl₂

Triton x100

H₂O bidestilada qsp – 1000mL

4) Tampão TE

Tris-HCl pH 8

EDTA 0,2 M

H₂O bidestilada qsp – 1000mL**Apêndice 4 – análises estatísticas****Sumário****Casos**

Haplótipos		HB	HT	VCM	HBCM	CHBCM	HBFETA L
Ben	n	4	4	4	4	4	4
	média	7,65	23,7	95,75	30,72	32,125	8,625
	Dpadrão	0,97	2,63	9,106	2,581	1,4863	3,028
	mínimo	6,2	20	83	28,1	30,8	6,4
	mediana	8,1	24,5	98	30,31	31,9	7,5
	máximo	8,2	26	104	34,16	33,9	13,1
Ben /Car	n	13	13	13	13	13	13
	média	8,08	24,9	109,3	34,63	32,1631	8,654
	Dpadrão	1,05	3,4	8,63	2,814	0,5908	4,549
	mínimo	6,6	20	98,2	30,8	31,3	3,5
	mediana	8,3	25	109	34	32,1	7,9
	máximo	9,6	29,7	122	40	33,6	17
Car	n	4	4	4	4	4	4
	média	8,45	24,8	107,8	34,58	32,25	6,15
	Dpadrão	0,9	2,22	3,096	0,881	0,5508	3,608
	mínimo	7,6	22	105	33,7	31,7	3,5

	mediana	8,35	25	107	34,5	32,2	4,95
	máximo	9,5	27	112	35,6	32,9	11,2
Total	n	21	21	21	21	21	21
	média	8,07	24,6	106,4	33,87	32,1724	8,171
	Dpadrão	1	2,99	9,333	2,885	0,7668	4,093
	mínimo	6,2	20	83	28,1	30,8	3,5
	mediana	8,2	25	105,4	34	32,1	7,5
	máximo	9,6	29,7	122	40	33,9	17

Sumários

Casos

Sexo		HB1	HT1	VCM1	HBCM1	CHBCM1	HBFETA L1
masculino	n	9	9	9	9	9	9
	média	8,23	25,1	101,9	32,7	32,0611	7,444
	Dpadrão	1,22	3,6	4,032	1,864	0,6803	4,593
	mínimo	6,6	20	96,3	29,6	30,76	3,5
	mediana	8,2	26	102,3	32,8	32,2	6,1
	máximo	9,6	29,7	108	35,6	32,9	17
feminino	n	13	13	13	13	13	13
	média	7,97	24,4	107,9	33,94	32,7254	8,492
	Dpadrão	0,87	2,37	11,57	3,884	1,9663	3,728
	mínimo	6,2	20	82,9	27	31	3,5
	mediana	8,1	24	112	34,4	32,1	7,9
	máximo	9,4	29	122	40	38,69	14,2
Total	n	22	22	22	22	22	22
	média	8,08	24,7	105,4	33,43	32,4536	8,064
	Dpadrão	1,01	2,88	9,591	3,215	1,5803	4,032
	mínimo	6,2	20	82,9	27	30,76	3,5
	mediana	8,15	25	105	33,4	32,1	7,05
	máximo	9,6	29,7	122	40	38,69	17

Teste Kruskal- Wallis

a tabela abaixo os valores para o cálculo do p
Ranks

	haplótipos	N	Mean Rank
HB	ben	4	8,5

	bencar	13	11,2
	car	4	12,8
	Total	21	
HT	ben	4	9
	bencar	13	11,4
	car	4	11,9
	Total	21	
VCM	ben	4	4,25
	bencar	13	12,6
	car	4	12,5
	Total	21	
HBCM	ben	4	5
	bencar	13	12,2
	car	4	13,1
	Total	21	
CHBCM	ben	4	10,4
	bencar	13	10,9
	car	4	12
	Total	21	
HBFETAL	ben	4	12,4
	bencar	13	11,8
	car	4	7,13
	Total	21	

**RESULTADO DO TESTE DE Kruskal-Wallis
PARA OS haplótipos**

o valor de p
está abaixo

Test

Statistics(a,b)

	HB	HT	VCM	HBCM	CHBCM	HBFETAL
Chi-Square	0,987	0,54	5,85	4,692	0,149	1,96
Df	2	2	2	2	2	2
Asymp. Sig. = p	0,6100	####	####	#####	0,9280	0,3750

a Kruskal
Wallis Test

b Grouping
Variable:
haplótipos

**COMPARADO OS SEXOS - SERÁ USADO O
TESTE DE Mann-Whitney**

**Teste de
Mann-Whitney**

Ranks

	Sexo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
HB1	masculino	9	12,6	113
	feminino	13	10,8	140
	Total	22		
HT1	masculino	9	12,7	114,5
	feminino	13	10,7	138,5
	Total	22		
VCM1	masculino	9	8,56	77
	feminino	13	13,5	176
	Total	22		
HBCM1	masculino	9	9,83	88,5
	feminino	13	12,7	164,5
	Total	22		
CHBCM1	masculino	9	11,1	100
	feminino	13	11,8	153
	Total	22		
HBFETAL1	masculino	9	10,1	90,5
	feminino	13	12,5	162,5
	Total	22		

**RESULTADO
DO TESTE DE
Mann-Whitney
PARA OS
sexos**

	HB	HT	VCM	HBCM	CHBCM	HBFETAL
Test Statistics(b)	49	47,5	32	43,5	55	45,5
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] = p	0,5560	####	####	#####	0,8450	0,3930
a Not corrected for ties.						
b Grouping Variable: Sexo						

Apêndice 5 – Resultados dos exames laboratoriais

Pacientes	Hm X10 ⁶	Hb g/dL	Ht %	VCM fL	HBM pG	CHBM g/dL	HbF %	Haplótipos
1.IRS	2,5	8,9	27	108	35,6	32,9	7,5	CAR
2.ALS	2,4	8,6	27	112,5	35,8	31,85	4,5	CAR/ Benin
3.JCF	2,88	8,1	23,9	83	28,1	33,9	11,2	Benin
4.JNP	2,5	8,9	23	92	35,6	38,7	13,4	Benin /Senegal
5.FAG	3,0	8,1	26	86,6	27	32,1	7,5	CAR
6.MLL	2,5	9,4	29	116	37,6	32,41	7,5	CAR/ Benin
7.FASJAS	2,3	7,8	23	109	34	32	13,1	CAR/ Benin
8.JNS	2,1	8,4	25	119	40	33,6	8,1	Indeterminado
9.RNP	2,4	8,2	25	104,2	34,2	32,8	3,5	Benin
10.RMSR	2,0	6,2	20	100	31,0	31,0	3,6	Benin
11.GFO	2,9	9,5	29,6	102,6	32,75	32,1	11,2	Indeterminado
12.AMLN	2,7	8,0	26	96,3	29,6	30,8	6,3	Benin
13.MHSS	2,1	6,6	20,4	98,8	31,8	32,2	7,0	CAR/ Benin
14.ILS	2,34	8,3	26,4	112,6	35,9	31,4	6,6	Indeterminado
15.MDP	2,2	7,6	24	112	35	31,7	13,1	CAR
16.MMDP	1,98	7,7	23,9	121	38,9	32,1	10,7	CAR/ Benin
17.FVL	3,0	9,6	29,7	98,2	31,3	32,4	4,0	CAR/ Benin
18.APC	2,1	6,9	21,9	122	33,1	31,8	3,5	Indeterminado
19.AVF	2,81	9,5	29,7	105	33,7	31,9	6,4	CAR
20.FPS	2,3	7,1	22,3	98,6	30,8	31,3	5,0	Benin
21.FVC	1,98	6,7	20	105,4	33,9	32,2	7,9	Indeterminado
22.AES	2,5	8,5	25,9	104,9	34,4	32,8	4,7	Benin