



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba  
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900  
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br

**AMANDA FREIRE DE SOUZA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS HAPLÓTIPOS LIGADOS AO GENE  
DA GLOBINA  $\beta$  E INVESTIGAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DA ENZIMA G6PD EM  
PACIENTE COM DOENÇA FALCIFORME NO ESTADO DA PARAÍBA**

João Pessoa - PB

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba  
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900  
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br

**AMANDA FREIRE DE SOUZA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS HAPLÓTIPOS LIGADOS AO GENE  
DA GLOBINA  $\beta$  E INVESTIGAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DA ENZIMA G6PD EM  
PACIENTE COM DOENÇA FALCIFORME NO ESTADO DA PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos obtenção do título de mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares

João Pessoa - PB

2020

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S729c Souza, Amanda Freire de.

Caracterização molecular dos haplótipos ligados ao gene da globina beta e investigação da deficiência da enzima G6PD em paciente com doença falciforme no Estado da Paraíba / Amanda Freire de Souza. - João Pessoa, 2020.  
69 f. : il.

Orientação: Leonardo Ferreira Soares.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

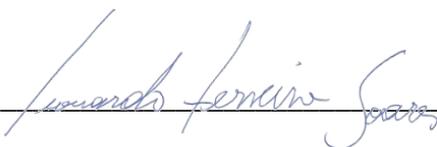
1. anemia falciforme. 2. beta-globina. 3. glicose-6-fosfato-desidrogenase. I. Soares, Leonardo Ferreira. II. Título.

UFPB/BC

AMANDA FREIRE DE SOUZA

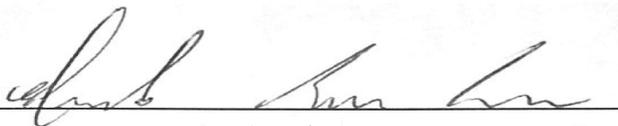
Dissertação de Mestrado avaliada em 27/02/2020

BANCA EXAMINADORA



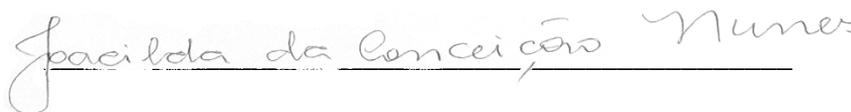
---

Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Orientador



---

Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Examinador Interno / Titular



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joacilda da Conceição Nunes  
Departamento de Pediatria e Genética  
Universidade Federal da Paraíba  
Examinador Externo / Titular

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Examinador Interno / Suplente

---

Prof. Dr. João Ricardo Gonçalves de Oliveira  
Departamento de Biologia Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Examinador Externo / Suplente

Dedico este trabalho a todos paraibanos diagnosticados com Anemia Falciforme e principalmente as crianças e adolescentes acompanhadas pelo Hospital Arlinda Marques. Sejamos resistência em defesa do Sistema Único de Saúde (SUS).

## AGRADECIMENTOS

A UFPB e ao PPGBCM pela oportunidade de realizar um mestrado acadêmico mesmo com todas as divergências e dificuldades da ciência no Brasil.

Agradeço ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Leonardo Ferreira Soares pela confiança para execução do trabalho e acolhida por assumir a orientação.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Eleonidas Moura Lima pelo apoio, por todos os ensinamentos durante o trabalho de pesquisa e por toda paciência.

A Dra. Sylvia Satomi Takeno Herrero e ao Dr. João Gonçalves de Oliveira, os melhores técnicos de laboratório que já conheci sempre solícitos a ajudar os alunos e muito gentis, agradeço as conversas, partilha de conhecimento e todo apoio e colaboração, principalmente a Dra Sylvia Satomi, a quem estava sempre por perto pra ensinar as técnicas e tirar dúvidas. Minha eterna gratidão.

Agradeço a Regina Miranda, secretária do PPGBCM, por ser tão prestativa simpática e sempre alegre com um sorriso no rosto. Isso nos conforta e nos faz se sentir em casa.

A Dra. Joacilda da Conceição Nunes por me acolher no Hospital Infantil Arlinda Marques para recrutamento dos pacientes e promover a parceria com o Laboratorio Hemato, sua ajuda foi fundamental e imprescindível na realização trabalho.

Aos funcionários do Hospital Infantil Arlinda Marques, pela ótima recepção e acolhimento, e por estarem sempre dispostos em auxiliar.

Ao Laboratorio Hemato, pela parceria e comodidade assegurando a realização do trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Bonini Domingos, Departamento de Biologia – Laboratorio de Hemoglobinas e Genética de doenças hematológicas, UNESP – São José do Rio Preto - SP, por se solidarizar e ajudar para finalização do trabalho pode ser concluída com êxito.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural Oncogenética (LBMEO) por todo apoio e compreensão e me fazerem acreditar que o sonho era possível.

Especialmente a Zhibelly de Mota Nunes, atualmente colega de trabalho, mas que também já foi colega da escola a anos atrás, obrigada pelo incentivo e toda ajuda nos momentos que mais precisei, sua coragem e generosidade foram imprescindíveis para realização do trabalho. Te admiro como profissional e pessoa.

Aos colegas de mestrado Tarcisio Bonifácio, Ray Ravilly, que também foram colegas de graduação, ao José Roberto Dantas, Jalcinês da Costa Pereira e Mariany Karla dos Santos, quem me aproximei durante as aulas do mestrado e os demais colegas de turma. Agradeço por todos os momentos de conversas, estudos, troca de ideias e descontração. Vocês tornaram essa caminhada mais leve e menos solitária.

A todos os meus amigos e familiares que estão e estiveram comigo por toda jornada, agradeço o incentivo, compreensão e todo apoio, vocês são essenciais e eternos em minha vida.

## RESUMO

A hemoglobina S resulta na troca de um único nucleotídeo (GAG → GTC) no gene da  $\beta$ -globina, onde o aminoácido valina é expresso no lugar do ácido glutâmico causando a anemia falciforme. A gravidade dos sintomas da doença é afetada, principalmente, por variações nos níveis de hemoglobina fetal; presença simultânea de  $\alpha$ -talassemia e/ou deficiência da enzima G6PD e pelos haplótipos  $\beta^S$ . Esse trabalho trata-se de um estudo transversal com coleta de dados retrospectivos de crianças e adolescentes com idades de 1 a 18 anos diagnosticadas com anemia falciforme e acompanhadas pelo Hospital Infantil Arlinda Marques em João Pessoa – PB, no período de Março/2019 a Agosto/2019, respeitando os aspectos éticos e metodológicos recomendados pela Resolução 466/2012, CNS/MS, com certificação do Comitê de Ética em Pesquisa Hospital Universitário Lauro Wanderley CEP/HULW, UFPB, protocolo Nº 95846318.4.0000.5183. Participaram do estudo 33 pacientes. Os haplótipos  $\beta^S$  foram estudados em 24 pacientes, determinados pela técnica PCR-RFLP. Os exames hematológicos e quantificação da atividade da enzima G6PD nos pacientes foram realizados em parceria com o Laboratório Hemato. A combinação dos haplotipos  $\beta^S$  foram: 15 (62%) apresentam o genótipo CAR/CAR; 05 (21%) CAR/Atp e 04 (17%) Atp/Atp. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) nos valores médios dos parâmetros hematológicos analisados entre os grupos de haplótipos  $\beta^S$  encontrados, o mesmo foi observado para os diferentes tipos de hemoglobina. Não foi diagnosticado coexistência de deficiência da G6PD e anemia falciforme nos pacientes examinados.

**Palavras-chaves:** anemia falciforme, beta-globina, glicose – 6 – fosfato desidrogenase.

## ABSTRACT

Sickle cell hemoglobin (HbS) results of a single nucleotide change (GAG  $\square$  GTC)  $\beta$ -globin gene, where valine replaces glutamic acid. The severity of the disease's symptoms is mainly affected by variation in fetal hemoglobin levels; simultaneous presence of  $\alpha$ -thalassemia and/or G6PD deficiency and by  $\beta^S$ -globin haplotype. This is a cross-section analysis with children and adolescents aged 1 to 18 years diagnosed with SCA and monitored by the Hospital Infantil Arlinda Marques in João Pessoa from March/2019 to August/2019, respecting the ethical and methodological aspects recommended by Resolution 466/2012, CNS/MS, with certification by the Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley, CEP/HULW, UFPB, protocol n° 95846318.4.0000.5183. Thirty three patients participated in the study. The  $\beta^S$ -globin haplotypes were studied in 24 patients (48  $\beta^S$  chromosomes) determined by PCR-RFLP. Hematological exams and quantification of G6PD enzyme activity in patients were carried out in partnership with Laboratório Hemato. The haplotypes  $\beta^S$  found were: 15 (62%) CAR/CAR; 05 (21%) CAR/Atp and 04 (17%) Atp/Atp. There were no statistically significant differences ( $P < 0,05$ ) in the mean values of the hematological parameters analyzed among the groups, the same was observed in the different types of hemoglobin. There was no coexistence of G6PD deficiency and sickle cell anemia in the patients who participated in the study.

**Keywords:** sickle cell anemia, beta-globin, glucose – 6 – phosphate dehydrogenase.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AS	Portador da hemoglobina normal A e da hemoglobina S
Atp	Atípico
$\beta^S$	Alelo beta S
BEN	Benin
CAM	Camarões
CAR	República Centro Africana
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DF	Doença Falciforme
dL	Decilitro
DHL	Desidrogenase Lactica Total
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
fL	Fentolitro
g	Unidade de medida de massa; grama
G6PD	Glicose 6-fosfato-desidrogenase
Hb	Hemoglobina
Hcia	Hemácia
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Hto	Hematócrito
kb	Quilobase; mil pares de base
kDa	Quilodalton

μM	Micromolar
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
pb	Pares de bases
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase; do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg	Picograma
RDW	Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos; do inglês: <i>Red Cell Distribution Width</i>
RFLP	Análise dos polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição; do inglês: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Retic	Reticulócitos
SEN	Senegal
SC	Portador das hemoglobinas variantes S e C
SS	Portador homocigoto da hemoglobina variante S
VCM	Volume Corpuscular Médio

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da hemoglobina A .....	3
Figura 2: Combinações de diferentes genes para expressão das diferentes hemoglobinas que se formam em cada estágio do desenvolvimento humano. ....	5
Figura 3: Processo de formação de polímeros e indução da falcização das hemácias decorrente da desoxigenação.....	7
Figura 4: Padrões de distribuição dos haplótipos $\beta^S$ na África e sua herança no Brasil. ....	12
Figura 5: Cluster da globina $\beta$ no cromossomo 11. ....	21
Figura 6: Localização e padrão de resposta dos cinco haplótipos principais para cada um dos seis sítios polimórficos analisados, enumerados com cada endonuclease utilizada.....	22
Figura 7: Mapa com quantidade de pacientes em número e porcentagem em cada mesorregião	25
Figura 8: Eletroforese horizontal em gel de agarose dos produtos de PCR de cada primer ....	28
Figura 9: Eletroforese horizontal em gel de agarose dos primers H0/H1 e H9/H10. ....	29
Figura 10: Eletroforese horizontal em gel de agarose dos primers H2/H3 .....	29
Figura 11: Eletroforese horizontal em gel de agarose dos primers H3/H4 .....	29
Figura 12: Eletroforese horizontal em gel de agarose dos primers H5/H6 e H7/H8 .....	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das digestões enzimáticas utilizadas para análise dos polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição. ....	21
Tabela 2: Características quanto a idade, gênero e étnica dos pacientes .....	24
Tabela 3: Resultado em porcentagem dos haplótipos $\beta$ S identificados nos 24 pacientes.....	27
Tabela 4: Resultados em médias e desvio padrão dos dados laboratoriais dos pacientes com genótipo CAR/CAR .....	30
Tabela 5: Comparação da média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos entre genótipos $\beta$ S identificados .....	31
Tabela 6: Comparação da média e desvio padrão dos diferentes tipos de hemoglobinas entre genótipos $\beta$ S identificados .....	32
Tabela 7: Valores de referencia da enzima G6PD .....	32

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	3
2.1	A hemoglobina .....	3
2.2	Gêneses da Hemoglobina .....	4
2.3	Hemoglobinopatias .....	6
2.4	A Hemoglobina S e a Fisiopatologia da Anemia Falciforme.....	6
2.5	Complicações Clínicas .....	8
2.6	Fatores associados à variabilidade clínica da anemia falciforme .....	10
2.6.1	Haplótipos.....	11
2.6.2	Enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase.....	13
3.	OBJETIVOS.....	15
3.1.	Objetivo Geral: .....	15
3.2.	Objetivos Específicos:.....	15
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
4.1	Desenho do estudo e local do desenvolvimento .....	16
4.2	Aspectos Éticos.....	16
4.3	Pacientes.....	16
4.4	Coleta de amostras .....	17
4.5	Dados Laboratoriais .....	17
4.6	Análises moleculares.....	18
4.6.1	Extração de DNA genômico .....	18
4.6.2	Reação de amplificação (PCR) .....	18
4.6.3	Polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição (RFLP).....	20
4.7	Análises Estatísticas.....	23
5.	RESULTADOS .....	24
6.	DISCUSSÃO.....	33
7.	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICA .....	38
	ANEXOS .....	46

## 1. INTRODUÇÃO

A doença falciforme (DF) é uma das hemoglobinopatias mais comuns no mundo. Decorre de uma mutação no gene que produz a hemoglobina, onde é inserido a aminoácido valina no lugar do ácido glutâmico, originando a mutante hemoglobina S (ALEXY et al., 2010). Doença falciforme é um termo genérico usado para definir o grupo de alterações genéticas que dá origem a enzima hemoglobina S (Hb S). Essas mudanças incluem anemia falciforme, determinada pela homozigose da hemoglobina S (Hb SS) e heterozigose dupla, ou seja, associações da Hb S com outras variantes de hemoglobinas mutantes, como Hb D e Hb C, e interações com talassemia (Hb S/ $\alpha$  talassemia, Hb S/ $\beta^+$  talassemia, e Hb S/ $\beta^0$  talassemia) (ARDUINI; RODRIGUES; TROVÓ DE MARQUI, 2017).

A maior incidência de anemia falciforme ocorre na África, embora seja também encontrada em países mediterrâneos, principalmente Grécia, Itália e Israel, assim como na Arábia Saudita, Índia e entre pessoas descendentes de africanos que vivem em outras partes do mundo (ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P.: PASQUINI, 2013). No Brasil, a anemia falciforme é questão de saúde pública, com importância epidemiológica em virtude da prevalência. A doença distribui-se de modo heterogêneo entre as diferentes regiões do país sendo mais prevalente no Sudeste e no Nordeste, onde há maior proporção de descendentes africanos (NAOUM, 2000). Porém é observada em parcela cada vez significativa na população caucasóide devido ao alto grau de miscigenação no Brasil (BANDEIRA et al., 2008). Seu diagnóstico precoce possibilita o início da educação em saúde para a família e a introdução da profilaxia e terapêutica necessárias, resultando em melhor sobrevida e qualidade de vida dos portadores (FERRAZ, S. T., 2012).

A gravidade das manifestações clínicas e hematológicas da anemia falciforme pode variar de uma doença grave a uma condição quase assintomática. Suas características hematológicas, bem como gravidade clínica, são afetadas por variações nos níveis de hemoglobina fetal, presença simultânea de  $\alpha$ -talassemia e/ou deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, haplótipos relacionados com o agrupamento de genes da  $\beta$ -globina e disfunção endotelial (MORENO, N., et al., 2002; RUSANOVA, I. et al., 2010 ).

Estudos realizados com pacientes falcêmicos de diferentes grupos étnicos e com características hematológicas distintas sugerem que os haplótipos dos genes da hemoglobina

podem ser úteis como um preditor da gravidade da doença (LABIE, D. et al, 1985; ZAGO, M. A. et al, 1992).

A coexistência com deficiência da enzima G6PD contribui ainda mais com as crises hemolíticas. A G6PD, por ser uma enzima antioxidante, sua deficiência associada à anemia falciforme aumenta a oxidação da Hb S, elevando a formação de produtos de degradação desta hemoglobina, fatos que causam a redução da vida média do eritrócito falcêmico, aumento do grau de hemólise e intensificação da anemia. É importante destacar a deficiência de G6PD nesses pacientes, pois não é rara a observação da associação entre anemia falciforme e deficiência de G-6PD numa mesma pessoa ( SOUZA, P.C., 1999; NAOUM, 2000; ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P; PASQUINI, 2013).

Diante o exposto, pode-se concluir que a deficiência de G6PD e os hálotipos  $\beta^S$  são importantes marcadores genéticos de etnias e populações, de povos que foram incorporados no Brasil, ao longo de sua história, das mais diferentes origens e com diversos graus de miscigenação (COMPRI, 2000). Tais moléculas têm importância no estudo da anemia falciforme por influenciarem na diversidade clínica e laboratorial da doença (NAOUM, 2000).

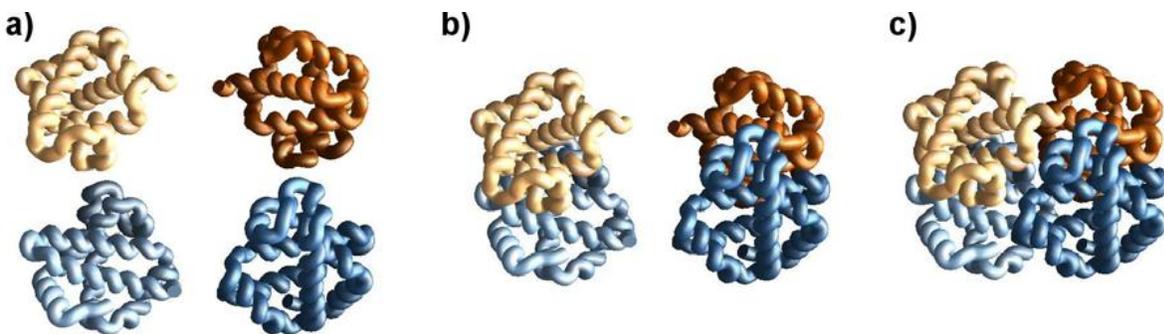
## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 A hemoglobina

As hemoglobinas são proteínas tetrâmeras globulares (64.450 Daltons) que compõe cerca de um terço da hemácia. Essa molécula é essencial à vida sua principal função é distribuir oxigênio ( $O_2$ ) a todo o organismo, sendo responsável pelo transporte de 95% do oxigênio que chega aos tecidos. (AIRES, M. M. et al., 2008; TORRES; BONINI-DOMINGOS, 2005).

É uma proteína de estrutura globular e quaternária composta por quatro cadeias polipeptídicas ou globínicas, cada cadeia está quimicamente associada a um grupo prostético heme, complexo formado por uma estrutura de protoporfirina e um íon ferro no estado ferroso. Esse íon ferroso tem a capacidade de se ligar ao  $O_2$  reversivelmente para transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos. Duas cadeias globínicas alfa ( $\alpha$ ) e duas cadeias globínicas beta ( $\beta$ ) compõem a hemoglobina A (Hb A) (Figura 01) (AIRES, M. M. et al., 2008; TORRES; BONINI-DOMINGOS, 2005).

**Figura 1:** Estrutura da hemoglobina A humana



A proteína é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias  $\alpha$  (marrom claro e marrom escuro) com 141 resíduos de aminoácidos e duas cadeias  $\beta$  (azul claro e azul escuro) com 146 resíduos de aminoácidos. Cada cadeia polipeptídica contém um grupo prostético heme ao qual se liga o  $O_2$ . Estruturalmente os quatro monômeros (a) ligam-se formando dímeros (b) que compõem o tetrâmero (c) da hemoglobina.

**Fonte:** FADEL, V., 2000

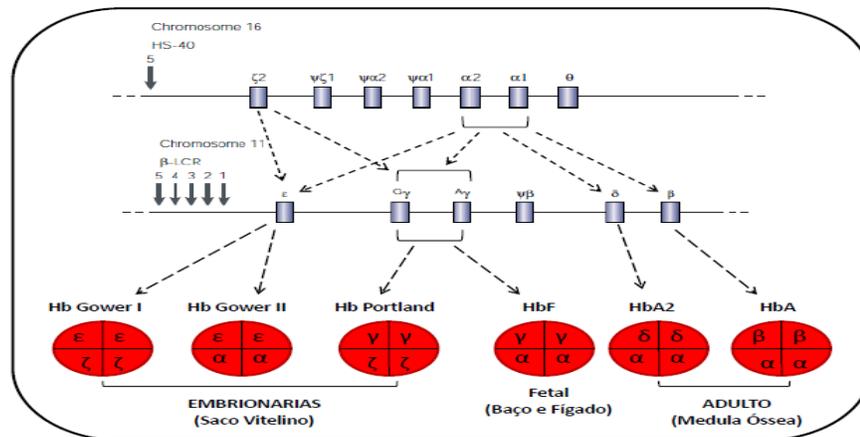
O sangue de um adulto saudável também contém pequenas quantidades de outras duas hemoglobinas: HbF e HbA<sup>2</sup>, ambas formadas por duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\gamma$  e  $\delta$ , respectivamente, sem presença da cadeia  $\beta$ .

## 2.2 Gênese da Hemoglobina

A gênese das cadeias globínicas é regulada por agrupamentos (*clusters*) de genes nos cromossomos 11 e 16. No braço curto do cromossomo 16 (16p13.3), em um segmento de DNA de 35kb, localizam-se o gene  $\zeta$  e  $\alpha$ . No cromossomo 11 (11p15.5) localiza-se o complexo de genes  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ , com uma extensão superior a 60kb. As diferentes combinações das cadeias globínicas possibilitam o surgimento de hemoglobinas distintas, isso se dá pelas diferentes condições respiratórias durante o período intra e extra-uterino de vida (BONINI-DOMINGOS, 2005; HOFFBRAND, A. V., MOSS, P. A. H, 2013) .

Nas primeiras semanas do desenvolvimento embrionário existem três hemoglobinas resultantes da expressão dos genes embrionários de hemoglobina, cadeia  $\zeta$  (agrupamento gênico  $\alpha$ ) e as cadeias  $\epsilon$  (agrupamento gênico  $\beta$ ). A expressão desses agrupamentos dá início à síntese nos eritroblastos primitivo, ainda dentro do saco vitelino, levando à formação da Hb Gower-1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ). Por volta das seis semanas os eritroblastos primitivos começam a sintetizar as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . É nesta fase as outras duas hemoglobinas, Hb Gower-2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) e Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) são expressas. Essas hemoglobinas deixam de ser produzidas no início do desenvolvimento fetal, e após isso sua síntese não é mais reativada (WEATHERALL, 2001) (Figura 02).

**Figura 2:** Combinações de diferentes genes para expressão das diferentes hemoglobinas que se formam em cada estágio do desenvolvimento humano.



**Fonte:** Adaptada de WEATHERALL, 2001

A hemoglobina fetal (HbF), predomina durante a fase fetal, acompanhada de pequena quantidade de hemoglobina A (HbA). Esta situação se inverte quando próximo ao nascimento, a síntese de HbA é intensamente ativada, e a produção de HbF vai sendo progressivamente desativada. A principal conversão para a hemoglobina A ocorre de 3 a 6 meses de vida quando a síntese de cadeia  $\gamma$  é substituída pela cadeia  $\beta$ . Em adultos saudáveis ainda há resquícios de HbF correspondentes a menos de 1% do total de hemoglobinas ( ZAGO, et al 2001; HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H., 2013).

A sequência de aminoácidos na porção polipeptídica é extremamente importante para determinar as propriedades da hemoglobina. Em caso de alterações genéticas que resultam em substituição de aminoácidos, as consequências são de alterações estruturais na cadeia polipeptídica. Dependendo do tipo e do local onde ocorre uma substituição de aminoácido em uma cadeia de globina, está poderá ou não alterar o comportamento da molécula de hemoglobina. Porém, se a modificação expressa mudanças comportamentais que causem manifestações clínicas, o paciente apresenta uma *hemoglobinopatia* (RAPAPPORT, 1990; TORRES; BONINI-DOMINGOS, 2005; SILVA, 2006).

### 2.3 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são um grupo de doenças hereditárias descritas pela primeira vez, em 1910, por Herrick, quando descreveu peculiaridades físicas e químicas que observou no sangue de pacientes com anemia, dor abdominal e artralgia (HERRICK, 2001). Com padrão de herança autossômico recessivo, são as desordens hereditárias mais comuns nos seres humanos (DAVIES et al, 2000).

Os indivíduos que possuem alterações genéticas e conseqüentemente aparecimento de hemoglobinas anormais podem ser heterozigotos ou homozigotos. No caso de heterozigotos possuem apenas um gene defeituoso; e, homozigotos se possuem um par de genes mutantes. Na maioria dos casos o portador heterozigoto de hemoglobinas anormais e de talassemias é assintomático, já o portador homozigoto, principalmente os falcêmicos, ou beta-talassemicos maior, apresentam grave anemia e crises constantes de hemólise (grande e precoce destruição de eritrócitos) (NAOUM, 1984).

Foram descritas mais de 1.200 mutações nos genes da globina, entre as variantes estruturais mais frequentemente encontradas estão as Hb S (HbB; glu6val), C (HbB; glu6lys), D (HbB;glu121gln) e E (HbB;lys26glu) (SILVA & YAMAGUCHI, 2008). Algumas variantes estruturais das hemoglobinas são prejudiciais, uma vez que a substituição do aminoácido altera a função ou a estabilidade da molécula de hemoglobina, resultando em um quadro clínico bem definido. As variantes de hemoglobinas mais freqüentemente observadas nas populações brasileiras são HbS e HbC, ambas de origem africana. Já as talassemias são mais freqüentes em locais em que se teve a colonização italiana. A variante Hb D é a mais rara encontrada em diferentes regiões (NAOUM, 1984; BONINI-DOMINGOS, C. R., 1993).

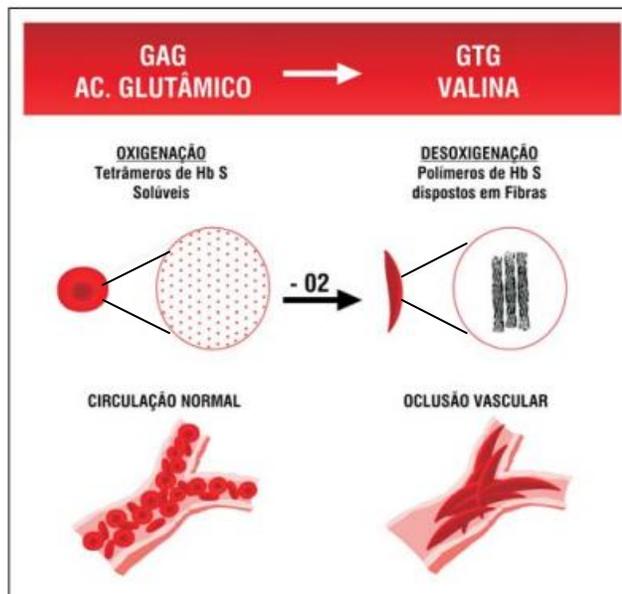
### 2.4 A Hemoglobina S e a Fisiopatologia da Anemia Falciforme

A HbS resulta de uma mutação de ponto na posição 6 do gene da globina  $\beta$  localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5), tal leva a substituição da base nitrogenada adenina (A) pela timina (T) (GAG  $\rightarrow$  GTG) trocando o ácido glutâmico por uma valina (ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P.: PASQUINI, 2013). A hemoglobina mutante possui propriedades físico-químicas

bastante diferentes da hemoglobina A devido à perda de duas cargas elétricas por molécula de hemoglobina (por causa da perda do ácido glutâmico) (NETO; PITOMBEIRA, 2003).

A hemoglobina é responsável pelo fornecimento de oxigênio e retirada de gás carbônico dos tecidos, portanto ela pode estar na sua forma oxigenada e desoxigenada. À medida que as moléculas de Hb S se tornam desoxigenadas dentro do eritrócito, ocorrem mudanças estruturais típicas de moléculas de hemoglobinas desoxigenadas, que no caso da Hb S tem conseqüências graves à sua individualidade molecular. Ao se tornarem desoxigenadas, as moléculas Hbs formam estruturas organizadas dentro das hemácias, se organizam em longos polímeros de filamentos duplos, que por sua vez se associam em feixes com um duplo filamento central rodeado de seis filamentos duplos de polímeros (Figura 03) (ZAGO; PINTO, 2007).

**Figura 3:** Processo de formação de polímeros e indução da falcização das hemácias decorrente da desoxigenação.



Fonte: LOBO et al 2007.

Esses feixes de “cristais” dentro das hemácias podem ser vistos à microscopia eletrônica e determinam deformações das células. A deformação mais conhecida é provocada por feixes de polímeros se organizando mais ou menos paralelamente, dando à hemácia uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice” ou “falcizada” (ZAGO; PINTO, 2007)

O alongamento do eritrócito provocado pela polimerização da HbS altera a estabilidade da bomba de sódio e potássio conseqüentemente ocorre perda de potássio e água, e aumento da

concentração de Hb S. Outra consequência é o aumento da concentração intracelular de cálcio pela falência da bomba de cálcio/ATPase e aumento da permeabilidade da membrana a esse íon. Fatos esses deletérios são as principais causas da irreversibilidade dos eritrócitos falcêmicos (NAOUM, 2000).

A formação de polímeros de HbS dentro das hemácias as torna mais frágeis, menos maleáveis, encurta sua vida útil e impede que o oxigênio se ligue a hemoglobina, causando o aumento de oxigênio livre e consequentemente a formação de íon superóxido. O íon superóxido reage com os ácidos graxos presentes na membrana celular causando lesões, também causa oxidação nas moléculas Hbs, transformando-as em meta Hbs que irão se agregar entre si para formar os Corpos de Heinz. Os corpos de heinz precipitam em direção à membrana alterando proteínas e expondo moléculas da membrana, como a fosfatidil-serina (PS). A fosfatidil-serina localizada na parte externa dos eritrócitos falcêmicos (enquanto que o normal seria estar internamente na membrana), altera a plasticidade da célula tornando-as com maior possibilidade de aderirem ao endotélio. A membrana é, assim, o principal espelho onde se refletem alterações moleculares que estão ocorrendo no interior da célula (BONNINI-DOMINGOS et. al., 1997; NAOUM, 2000; ZAGO; PINTO, 2007).

As modificações moleculares / celulares difundem as manifestações clínicas: a) provocam um aumento da adesão de hemácias ao endotélio, desencadeando fenômenos inflamatórios que influenciam também os granulócitos e plaquetas; b) enrijecem a membrana e toda a hemácia, encurtando sua sobrevivência em circulação; c) provocam lesões microvasculares; d) causam uma depleção de NO que contribui para vasoconstrição e ativação da inflamação; e) ativam a coagulação (ZAGO; PINTO, 2007).

## **2.5 Complicações Clínicas**

Apesar de ser uma doença fundamentalmente do sangue, a anemia falciforme afeta o corpo inteiro e as manifestações clínicas começam muito cedo na infância. É também muito variável e depende de fatores genéticos, sociais, culturais e ambientais, principalmente. (NAOUM, 2000; QUINN, 2013)

A doença em si é de natureza crônica, mas muitas de suas complicações são agudas, como as crises vaso-oclusivas, a síndrome torácica aguda e o priapismo. Estas complicações variam

consideravelmente em frequência e gravidade entre os pacientes, entre populações, com a idade e o sexo (DRISS et al., 2009; BALLAS et al., 2012).

As diferentes manifestações clínicas da AF podem ser categorizadas em três grandes grupos de acordo com o sistema ou órgão acometido: 1) Anemia hemolítica e sequelas, que compreende principalmente sequestro esplênico, crise aplásica e reação hemolítica pós-transfusão; 2) Síndromes de dor e eventos relacionados e 3) Complicações que afetam órgãos maiores e suas sequelas, como acidente vascular cerebral (AVC), retinopatia, hipertensão arterial sistêmica, síndrome torácica aguda, colelitíase, priapismo, sequestro esplênico, osteonecrose, úlcera de perna, dactilite, retardo no crescimento, dentre outros (BALLAS et al., 2010).

A anemia hemolítica é causada pela menor sobrevivência das hemácias, (que tem duração média de 10 a 20 dias na circulação sanguínea, período muito inferior de uma hemácia saudável com 120 dias), o aumento da bilirrubina indireta, hiperplasia eritróide da medula óssea e elevação dos reticulócitos. Outros fatores podem contribuir para a gênese da anemia ou agravá-la: carência de folato, insuficiência renal, crises aplásticas e esplenomegalia. As crises aplásticas são mais frequentes nos primeiros anos de vida; são causadas por infecção por parvovírus, que provoca uma parada passageira da eritropoese, agravando acentuadamente a anemia (ZAGO; PINTO, 2007).

As crises álgicas (crises de dor) pode ser um sintoma agudo ou crônico, com ampla variação de intensidade e duração. No quadro agudo, a dor está associada a isquemia tecidual aguda causada pela vaso-oclusão. A topografia mais frequentemente relatada abrange membros inferiores e superiores, mais precisamente ossos longos e articulações, podendo também envolver outros locais como tórax, face, abdômen e pelve. Em casos mais graves, a dor em região torácica acompanhada de febre, dispnéia e hipoxemia caracterizam a síndrome torácica aguda, complicação aguda com maior índice de mortalidade entre os pacientes (ZAGO; PINTO, 2007).

A evolução das doenças falciformes é marcada por um amplo espectro de complicações clínicas, que atingem a maioria dos órgãos e aparelhos. Algumas dessas complicações não reduzem a expectativa de vida do paciente, embora possam comprometer consideravelmente a qualidade de vida: úlceras de pernas, retinopatia, necrose óssea (especialmente da cabeça do fêmur), cálculos de vesícula. Outras alterações, no entanto, comprometem diretamente a função de órgãos vitais e estão diretamente associadas a risco de vida. Neste grupo destacam-se as infecções, as complicações cardiorrespiratórias (especialmente a insuficiência cardíaca

congestiva e a síndrome torácica aguda), a insuficiência renal e os acidentes vasculares cerebrais (ZAGO; PINTO, 2007).

## **2.6 Fatores associados à variabilidade clínica da anemia falciforme**

Embora seja uma doença monogênica clássica, os pacientes com doenças falciformes apresentam uma heterogeneidade fenotípica substancial. Seu quadro clínico pode variar desde uma forma leve, que pode ser clinicamente inaparente, até uma muito grave, com lesões importantes em órgãos e morte em idades relativamente jovens (LETTRE, 2012).

A heterogeneidade fenotípica ainda não é completamente compreendida, e em parte pode ser explicada por fatores ambientais e socioeconômicos, mas associado a tal fato, variações moleculares foram observadas como moduladores fenotípicos da AF (DRISS et al., 2009; HABARA et al, 2016).

Entre os fatores ambientais, o mais importante são as condições socioeconômicas dos pacientes (CHEN et al., 2002; HANKINS E WANG, 2009; PEREIRA et al., 2013). A elevada taxa de desemprego, o baixo nível de escolaridade, a renda familiar precária e o difícil acesso aos serviços de saúde, tão comum entre os indivíduos com esta doença, vão influenciar negativamente a vida destes pacientes, além de dificultar a adesão ao tratamento recomendado, podendo levar ao agravamento da saúde geral (SILVA et al., 1993; PEREIRA et al., 2013). Portanto, o conhecimento do perfil demográfico e socioeconômico é essencial para a identificação das necessidades, criação, implementação e aprimoramento de políticas de saúde pública destinadas a estes indivíduos (SANTOS, 2013).

Outro fator que pode impactar o fenotipo clinica da AF é uma co-herança com a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), uma doença que, assim como a AF, também causa hemólise e ocorre frequentemente em indivíduos de ascendência africana. Sendo assim, a co-herança com a deficiência de G6PD pode exacerbar a hemólise agravando o estado clinico do paciente com AF. Em alguns estudos foi observada uma atividade relativamente aumentada de G6PD nos reticulocitos de pacientes com AF com ou sem deficiência da G6PD, esse efeito pode afetar a eficácia da transfusão nesses pacientes. Além disso, a deficiência de G6PD pode interagir com outros modificadores genéticos como talassemia  $\alpha$ , níveis da HbF e haplotipos da  $\beta$  globina ( KARAFIN, et al, 2018).

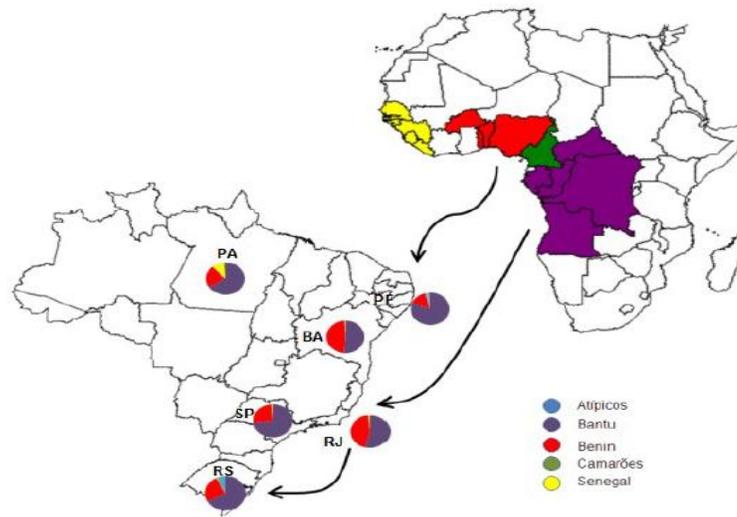
### 2.6.1 Haplótipos

Subjacente à mutação pontual que origina a AF, existe uma heterogeneidade molecular que distingue os pacientes quanto ao seu quadro clínico. Os haplótipos do gene da  $\beta$ -globina são possíveis indicadores da variação fenotípica da anemia falciforme (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

A variabilidade de manifestações clínicas entre pacientes homocigotos para HbS foi possível ser observada quando a tecnologia molecular permitiu discriminar diferenças entre cromossomos contendo a mesma mutação HbS. Estas diferenças foram determinadas ao caracterizar a região flanqueadora do gene da  $\beta$  globina, usando sítios de clivagem de endonucleases de restrição, que sugeriram a origem independente da mutação  $\beta^S$  em cinco regiões específicas do continente Africano e só posteriormente espalhou-se pelo mundo (PANTE-DE-SOUSA, MOUSINHO-RIBEIRO, DOS SANTOS, GUERREIRO, 1999).

Com isso, foi possível identificar cinco haplótipos distintos, denominados de acordo com a origem étnica e geográfica onde predominam (Figura 4). O haplótipo Benin (BEN) tem sido associado à África Ocidental; o Bantu ou República Centro Africana (CAR) à África Oriental e Centro-Sul; o Senegal à África Atlântico-Ocidental; o Árabe-Indiano à Índia e Península Arábica e o Camarões à Costa Ocidental Africana (GONÇALVES et al., 2003). Além desses, outros haplótipos menos frequentes, denominados de atípicos, são ocasionados por vários mecanismos genéticos, tais como alterações genéticas nos sítios polimórficos de restrição e conversão gênica e, devido a tal fato, não se enquadram nos cinco padrões bem estabelecidos (ZAGO e tal., 2000).

**Figura 4:** Padrões de distribuição dos haplótipos  $\beta^S$  na África e sua herança no Brasil.



**Fonte:** LINDENAU, 2009

Os diferentes haplótipos estão relacionados ao nível de hemoglobina fetal (HbF) e consequentemente também caracteriza as variadas manifestações clínicas. Isso é importante porque a HbF tem sido reconhecida como um dos moduladores genéticos mais poderosos. Além de diminuir as concentrações intracelulares de HbS, níveis elevados de HbF no interior do eritrócito irão inibir o processo de polimerização, uma vez que nem a HbF nem o tetrâmero híbrido ( $2\alpha 2\beta^S$ ) podem ser incorporados na fase polimérica da HbS desoxigenada. Portanto, qualquer incremento na sua produção apresenta um efeito benéfico para os pacientes com doença falciforme (STEINBERG et al., 2014).

Senegal e Árabe-Indiano estão associados com níveis elevados de HbF (>15%) e a um curso clínico mais brando, ao passo que os haplótipos Benin e Bantu/CAR, com níveis menores de HbF, apresentando um curso clínico intermediário (5% a 15% de Hb F) e grave (<5% de Hb F), respectivamente (POWARS, D. et al., 1991). Assim, pode-se concluir que os haplótipos desses pacientes possivelmente interagem na modulação do nível de HbF e na magnitude da anemia (SERJEANT, G.R., 1989). Portanto, os haplótipos podem ser utilizados como marcadores de características genéticas em *cis* herdadas com o gene  $\beta^S$  e que podem influenciar a expressão dos genes  $\gamma$ -globina e, consequentemente, os níveis de HbF (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

No Brasil, existe certa heterogeneidade na frequência dos diversos haplótipos entre as diferentes regiões geográficas, mas predominam os haplótipos Bantu e Benin (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

### **2.6.2 Enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase**

Em situação normal, a glicose 6 - fosfato - desidrogenase (G6PD) é uma enzima citoplasmática amplamente distribuída entre quase todos os organismos e tecidos. Nos seres humanos, apesar da ampla distribuição, é no metabolismo das hemácias que a G6PD exerce a sua função mais importante, ao atuar em uma das vias metabólicas utilizadas por estas células para obtenção de energia (BEUTLER, 1978).

Na reação catalisada pela G6PD é produzido o fosfato reduzido de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), substância redutora essencial à proteção das hemácias contra a ação de agentes oxidantes de origem endógena (peróxidos orgânicos) e exógena (drogas, alimentos e elementos atmosféricos) (BEUTLER, 1978). Sua produção ocorre no eritrócito humano e é controlada por um gene localizado no braço longo do cromossomo X (região Xq 28) que consiste de 13 exons e 12 introns, com a região codificante dividida em 12 segmentos, variando de 38 a 236 pares de base. A sua caracterização bioquímica permitiu reconhecer mais de 400 variantes genéticas descritas por técnicas padronizadas, a maioria das quais com atividade deficiente (LUZZATTO; NANNELLI; NOTARO, 2016).

A atividade da G-6-PD é indispensável à manutenção da integridade das hemácias e que acentuada deficiência dessa enzima pode produzir sérias alterações metabólicas, sobretudo na presença de substâncias oxidantes. A principal consequência dessas alterações metabólicas é a hemólise, determinada fundamentalmente pela precipitação da hemoglobina e formação de corpúsculos de Heinz, pela oxidação dos grupos tiol das enzimas citoplasmáticas e da membrana celular e, secundariamente, pela oxidação de lípidos da membrana eritrocitária (BEUTLER, 1978).

A deficiência de G6PD é uma das eritroenzimopatias mais comuns em todo mundo, sendo comumente associada a alguns grupos étnicos. A deficiência ocorre com maior frequência em indivíduos do Mediterrâneo, de origem africana ou asiática, podendo apresentar incidência de 5 a 25% em algumas populações (MEHTA, 1995). Estima-se que mais de 400 milhões de pessoas

pelo mundo são afetadas. Essa enzimopatia é causada por mutações no gene codificante para G6PD localizado no cromossomo X (locus Xq28), e a expressão fenotípica é mais freqüente em homens hemizigotos e mulheres homozigotas, tendo padrão de herança recessivo ligado ao sexo. Para que ocorra expressão total de seus efeitos adversos, o gene de G6PD não deve ser antagonizado por um cromossomo X normal (MEHTA, 1994; CAPPELLINI, et al, 2008; MONTEIRO, 2014).

Os pacientes deficientes de G6PD são, em sua maioria, assintomáticos, podendo desenvolver crises ao serem expostos a agentes causadores de estresse oxidativo, como ingestão de feijão fava, infecções e ingestão de drogas. Estas crises são identificadas por meio do surgimento de sintomas como mal-estar, dor abdominal ou lombar, fraqueza, icterícia e urina escura (LUZZATO, 2006; CAPPELLINE, 2008; GALAPPATHTHY, 2013).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral:**

O presente trabalho tem como objetivo geral a caracterização molecular dos haplótipos ligados ao gene da globina  $\beta^S$  e avaliação da enzima glicose-6-fosfato de indivíduos diagnosticados com anemia falciforme no estado da Paraíba.

#### **3.2. Objetivos Específicos:**

- 1 – Realizar a caracterização molecular dos háplotipos ligados ao gene da globina  $\beta^S$ ;
- 2 – Investigar a atividade da enzima G6PD nos indivíduos diagnosticados com AF no estado da Paraíba;
- 3 – Descrever os dados clínicos e sócio-econômicos dos pacientes com Anemia Falciforme acompanhados no Hospital Infantil Arlinda Marques

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Desenho do estudo e local do desenvolvimento**

Trata-se de um estudo transversal com coleta de dados retrospectivos de crianças e adolescentes com idades de 0 a 18 anos diagnosticadas com a anemia falciforme e acompanhadas pelo Hospital Infantil Arlinda Marques em João Pessoa – PB, no período de Março/2019 a Agosto/2019.

### **4.2 Aspectos Éticos**

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Hospital Universitário Lauro Wanderley CEP/HULW, UFPB, protocolo N° 95846318.4.0000.5183 (Anexo E). Após a aprovação, o trabalho foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na Resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Os pacientes, após explicação do que se trata a pesquisa, assinaram de forma voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) (Anexo A e B), previamente aprovado pelo CEP.

### **4.3 Pacientes**

A utilização desse grupo vulnerável se deve ao fato de que em 2013 o Ministério da Saúde publicou a portaria N° 727 de 1° de Julho, habilitando a Secretaria da Saúde do Estado da Paraíba implementar a Fase III no Programa Nacional de Triagem Neonatal, significando dizer que o estado fica habilitado para realizar exames neonatais que darão confirmação diagnóstica, o acompanhamento e o tratamento da fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, doenças falciformes e outras hemoglobinopatias e fibrose cística. Após a publicação da portaria o Hospital Infantil Arlinda Marques, foi habilitado como Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) no estado da Paraíba.

A pesquisa foi realizada com os pacientes em acompanhamento regular no ambulatório do Hospital Infantil Arlinda Marques durante o período de março a agosto de 2019. Trinta e três

pacientes foram recrutados para responder o questionário socioeconômico e os mesmos foram incluídos na análise de prontuários médicos, desses foi possível obter vinte quatro amostras de material biológico para o estudo molecular.

Os dados clínicos foram obtidos por meio da coleta das informações contidas no registro médico. Foi estruturado um formulário para orientação da coleta, para obter informações da historia clinica e dados de aspectos socioeconômicas dos pacientes.

Após a entrevista os pacientes foram encaminhados ao Laboratório Hemato para ser realizado o hemograma, contagem de reticulocitos, da desidrogenase láctica total (DHL) e análise da G6PD.

#### **4.4 Coleta de amostras**

Durante a visita do paciente ao Laboratório Hemato foi coletado sangue periférico, em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Uma vez coletadas, as amostras foram adequadamente conservadas a 4°C e transportadas em caixa térmica para o Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética – CCEN – UFPB.

#### **4.5 Dados Laboratoriais**

Os dados hematológicos foram obtidos por exames recentes requisitado pela médica responsável. O hemograma foi realizado por método automático e complementado com hematoscopia convencional, a desidrogenase láctica total pelo método cinético automatizado, os reticulócitos pelo método azul de cresil brilhante e a enzima G6PD pelo método enzimático ou cinético. Todos esses exames foram realizados pelo Laboratório Hemato.

O perfil hemoglobínico (HbF, HbS e HbA<sub>2</sub>) foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) pelo Laboratório de Hemoglobinopatias do Hemocentro da Paraíba, esse exame é realizado após resultado alterado no teste do pezinho.

## 4.6 Análises moleculares

### 4.6.1 Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos do sangue periférico pela técnica de fenol-clorofórmio. Para a primeira fase do processo de extração, o tubo de EDTA contendo sangue periférico é centrifugado a 3.500 rpm por 10 minutos, em seguida retira-se o sobrenadante contendo os leucócitos e os transfere para um microtubo. Nesse microtubo adiciona-se 600 $\mu$ L de tampão de lise I e coloca para centrifugar por 5 minutos a 6.400 rpm e retira-se o sobrenadante, esse procedimento é repetido por mais três vezes ou até não ser mais observado hemácias na solução. Quando for observado que a solução está transparente coloca-se 600 $\mu$ L do tampão de lise II + 30 $\mu$ L de DTT a 1M + 60 $\mu$ L de proteinase K e deixa a solução em banho maria a 37°, overnight.

Na segunda etapa, adiciona-se 600 $\mu$ L da solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e submete o microtubo à agitação até a formação de uma emulsão leitosa e centrifuga por 7 minutos a 9600rpm. Após centrifugação, retira-se o sobrenadante e despeja em outro microtubo onde deve-se adicionar 1mL de álcool isoamílico, agita e depois centrifuga por 5 minutos a 3000 rpm e por fim armazena da geladeira por pelo menos 24hrs.

Na terceira etapa, o microtubo é centrifugado por 10 minutos a 12000rpm, em seguida, descarta-se o sobrenadante e adiciona 1mL de álcool 70% e coloca para centrifugar a 12000rpm por 10 minutos, essa operação se repete mais uma vez. Após, retira-se o sobrenadante e leva o microtubo aberto na estufa à 37° para evaporação do álcool. Ressuspende o DNA em 100 $\mu$ L de água ultrapura.

### 4.6.2 Reação de amplificação (PCR)

A amplificação do material genético foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Foi utilizado os *primers* (iniciadores) H0/H1, H2/H3, H3/H4, H5/H6, H7/H8, H9/H10 que flanqueiam e amplificam fragmentos de diferentes localizações e tamanhos (Quadro 01).

**Quadro 1:** Primers utilizados para amplificação da região cluster  $\beta$  e localização referente ao cluster  $\beta$  no cromossomo 11 no banco de dados NCBI (ID: U01317)

Primer	Sequência	Direção	Posição	Região	Fragmento
H0	5'AACTGTTGCTTTATAGGATTTT 3'	D	33862	5' $\gamma^G$	650pb
H1	5'AGGAGCTTATTGATAACCTCAGAC 3'	R	34518		
H2	5' AAGTGTGGAGTGTGCACATGA 3'	D	36203	$\gamma^G$	780pb
H3	5' TGCTGCTAATGCTTCATTACAA 3'	R	35422		
H3	5' TGCTGCTAATGCTTCATTACAA 3'	D	40358	$\gamma^A$	760pb
H4	5' TAAATGAGGAGCATGCACACAC 3'	R	41119		
H5	5' GAACAGAAGTTGAGATAGAGA 3'	D	46426	$\Psi \beta$	701pb
H6	5' ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT 3'	R	47126		
H7	5' TCTGCATTTGACTCTGTTAGC 3'	D	49476	3' $\Psi \beta$	590pb
H8	5' GGACCCTAACTGATATAACTA 3'	R	50089		
H9	5' CTACGCTGACCTCATAAATG 3'	D	60906	5' $\beta$	380pb
H10	5' CTAATCTGCAAGAGTGTCT 3'	R	61291		

A composição e condições de amplificação variaram dependendo da região polimórfica e estão representadas nos quadros 02 e 03, respectivamente.

**Quadro 2:** Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do cluster da globina  $\beta$ .

Componentes	Xmn I	Hind III	Hinc II	Hinf I
Taq Pol Master Mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer (10uM)	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer (10uM)	1,0	1,0	1,0	1,0
DNA (150 – 200ng)	2,0	2,0	2,0	2,0
H <sub>2</sub> O	9,0	9,0	9,0	9,0
<b>Volume Final (ul)</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>

**Quadro 3:** Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do cluster da globina  $\beta$

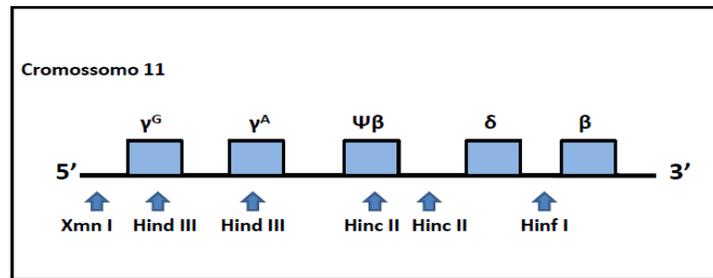
Desnaturação			35 Ciclos						Extensão	
Inicial			Desnaturação		Anelamento		Extensão		Final	
Região	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo
5' $\gamma^G$	95	5'	95	30''	55	1'30''	72	2'	72	10'
$\gamma^G$	95	5'	95	30''	55	1'30''	72	2'	72	10'
$\gamma^A$	95	5'	95	30''	55	1'30''	72	2'	72	10'
$\Psi\beta$	95	5'	95	30''	55	1'30''	72	2'	72	10'
3' $\Psi\beta$	95	5'	95	30''	55	1'30''	72	2'	72	10'
5' $\beta$	95	5'	95	30''	55	1'30''	72	2'	72	10'

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (MG96G, Peltier). Para confirmação da amplificação, alíquotas de 5  $\mu$ L do produto da PCR foi misturado com 1  $\mu$ L do corante Safer Dye da Kasvi. O master mix utilizado na reação já é apropriado para gel de agarose, não foi necessário utilizar tampão de corrida. Aplica-se a solução no gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X e submete a corrida eletroforética horizontal a 80 V por aproximadamente 40 minutos. Após a corrida o gel é exposto à luz ultravioleta para visualização e foto documentação das bandas.

#### 4.6.3 Polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição (RFLP)

Para os haplotipos  $\beta^S$  foram analisados 6 sítios polimórficos (5'  $\gamma^G$  – XMN I,  $\gamma^G$  – HIND III,  $\gamma^A$  – HIND III,  $\Psi\beta$  – HINC II, 3' $\Psi\beta$  – HINC II, 5' $\beta$  – HINF I), como descrito no quadro 01 (Sutton, Bouhassira & Nagel, 1989).

Quando confirmada a amplificação, o produto da PCR é digerido a 37°C durante 24 horas com endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico. As localizações dos sítios de reconhecimento dessas enzimas ao longo do *cluster*  $\beta$  estão representadas na figura 05. No quadro 04 mostra os tamanhos dos fragmentos obtidos após a digestão enzimática.

**Figura 5:** Cluster da globina  $\beta$  no cromossomo 11.

As setas indicam os sítios polimórficos identificados pelas endonucleases de restrição utilizadas neste estudo.

**Quadro 4:** Tamanho dos produtos amplificados antes e após clivagem pelas endonucleases de restrição.

Primers	Enzima	Região	Fragmento	Fragmento pós-clivagem
H0 e H1	Xmn I	5' $\gamma^G$	650pb	450pb + 200pb
H2 e H3	Hind III	$\gamma^G$	780pb	430pb + 340pb + 10pb
H3 e H4	Hind III	$\gamma^A$	760pb	400pb + 360pb
H5 e H6	Hinc II	$\Psi\beta$	701pb	360pb + 340pb + 1pb
H7 e H8	Hinc II	3' $\Psi\beta$	590pb	470pb + 120pb
H9 e H10	Hinf I	5' $\beta$	380pb	240pb + 140pb

Os componentes utilizados nas digestões enzimáticas variaram dependendo da região a ser analisada e estão representadas na tabela 01.

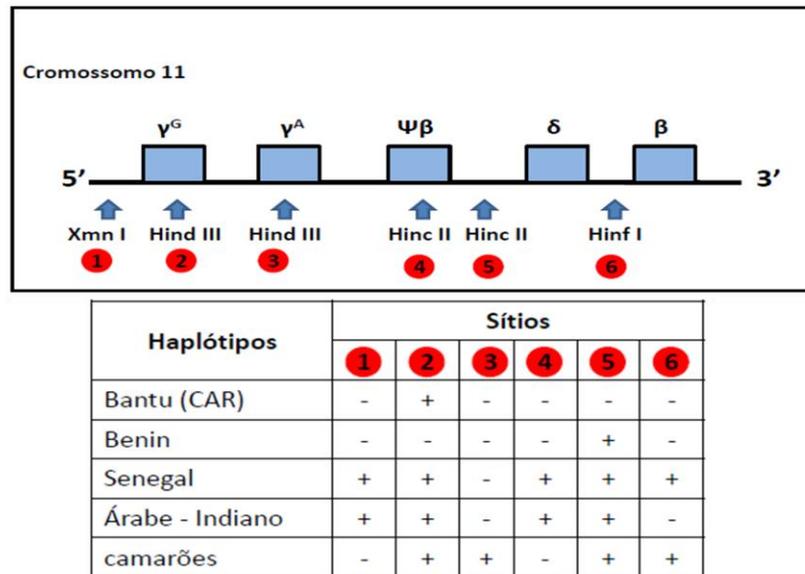
**Tabela 1:** Composição das digestões enzimáticas utilizadas para análise dos polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição.

Componentes	Regiões Polimórficas			
	5' $\gamma^G$	$\gamma^G$ e $\gamma^A$	$\Psi\beta$ e 3' $\Psi\beta$	5' $\beta$
	Xmn I	Hind III	Hinc II	Hinf I
Tampão da Enzima	1,5	1,5	1,5	1,5
BSA (albumina bovina)	0,15	-	-	-
Enzima de Restrição	0,15	0,2	0,2	0,2
Produto da PCR	10,0	10,0	10,0	10,0
H <sub>2</sub> O estéril	3,2	3,3	3,3	3,3
<b>Volume final (<math>\mu</math>L)</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

A identificação dos padrões de restrição que determinam os haplótipos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1%, semelhante ao procedimento descrito anteriormente.

Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição. De acordo com o perfil de restrição para as regiões polimórficas do *cluster* da globina  $\beta$ , é possível definir os haplótipos  $\beta^S$ . A análise dos 6 sítios polimórficos localizados no *cluster* da globina  $\beta$  definem os haplótipos mais comuns: Bantu ou CAR [ - + - - - ], Benin [ - - - - + ], Senegal [ + - + + + ], Camarões [ - + + - + ], e Árabe – Indiano [ + + - + + - ]. Tomando estes haplotipos como padrão, qualquer combinação diferente da presença e/ou ausência destes sítios foi classificada como haplotipos atípico (**figura 06**).

**Figura 6:** Localização e padrão de resposta dos cinco haplótipos principais para cada um dos seis sítios polimórficos analisados, enumerados com cada endonuclease utilizada.



**Fonte:** adaptada de SUTTON, et al, 1989

#### **4.7 Análises Estatísticas**

Os dados coletados foram descritos em média e desvio padrão. Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste T: duas amostras presumindo variância diferente, para dois grupos e ANOVA para três grupos. Todos os resultados foram obtidos utilizando *Microsoft Office Excel 2007*.

## 5. RESULTADOS

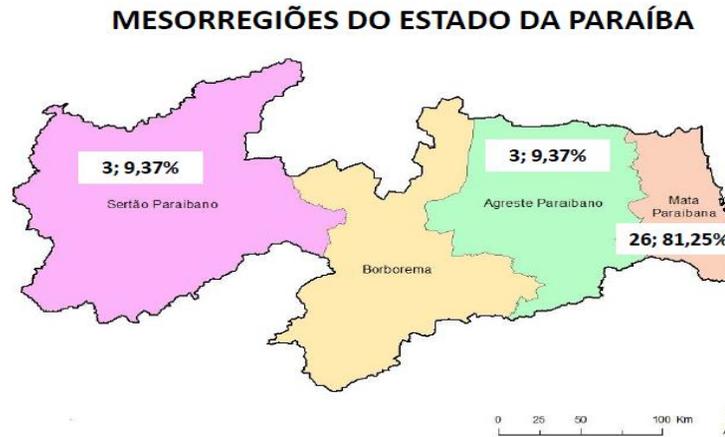
Participaram desse estudo 33 pacientes com anemia falciforme, dos quais 12 (36%) eram do sexo feminino e 21 (64%) do sexo masculino. A idade dos pacientes variaram de 1 a 18 anos, uma mediana de 09 anos e uma maior frequência de indivíduos com idade menor ou igual a 5 anos (39,4%), seguido pela faixa de 6 a 11 anos e 12 a 18 anos com 30,3% ambas. A maioria dos pacientes se declara pardos 19 (57.5%), seguido dos 13 39,4% que se declararam pretos (**Tabela 02**).

**Tabela 2:** Características quanto à idade, gênero e étnica dos pacientes

Características		Nº de Pacientes	(%)
<b>Faixa Etária (anos)</b>	≤ 5	13	39,4
	6 – 10	10	30,3
	11 – 18	10	30,3
<b>Gênero</b>	Feminino	12	36
	Masculino	21	64
<b>Grupo Étnico</b>	Preto	13	39,4
	Pardos	19	57,5
	Branco	01	3,03

Quanto à naturalidade, 32 são nascidos no estado da Paraíba, sendo 15 desses, residentes da capital de João Pessoa e 18 são de municípios vizinhos à capital ou do interior do Estado (Itaporanga, Princesa Isabel, Campina Grande, Patos, Rio Tinto, São Miguel de Itaipu, Sapé, Pedras de Fogo, Pitimbu, Guarabira, Mamanguape e Bayeux). Apenas um dos pacientes é natural de Pernambuco, (Itambé - PE). Na **figura 7** pode-se observar o percentual de pacientes de cada mesorregião do estado da Paraíba que participaram do estudo. Vale ressaltar que o Hospital Infantil Arlinda Marques, local da realização da pesquisa, fica localizado na capital de João Pessoa, mesorregião Mata Paraibana.

**Figura 7:** Mapa com quantidade de pacientes em número e porcentagem em cada mesorregião



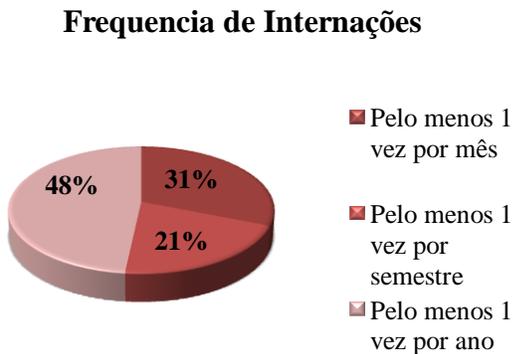
**Fonte:** adaptado: <http://www.baixarmapas.com.br/mapa-da-paraiba-mesorregioes/>

Para os dados socioeconômicos, a entrevista foi realizada apenas com os responsáveis em razão da maioria dos pacientes serem crianças menores de idade. No quadro 05 pode-se observar que a maioria dos responsáveis possui o fundamental incompleto (38%) em seguida 29% dos responsáveis possuem apenas o fundamental completo, a maioria dos responsáveis (66%) estavam desempregados até a data da entrevista. Apenas um dos responsáveis possui renda familiar entre um e dois salários mínimos. Todos os outros possuem renda de até um salário mínimo, significando dizer que dentro desse universo existem pacientes que recebem menos que um salário mínimo (1.045R\$) recebendo apenas o auxílio do governo federal.

**Quadro 5:** Dados socioeconômicos dos pacientes entrevistados em porcentagem.

<b>GRAU DE ESCOLARIDADE DOS RESPONSÁVEIS</b>	<b>QUANTIDADE DE PACIENTES (%)</b>
Não Alfabetizado	9%
Alfabetizado	5%
Fundamental Completo	29%
Fundamental Incompleto	38%
Ensino médio Completo	5%
Ensino médio Incompleto	9%
Superior completo	5%
<b>SITUAÇÃO OCUPACIONAL DO RESPONSÁVEL</b>	
Empregado (a)	16%
Desempregado (a)	66%
Autônomo (a)	6%
Aposentado (a)	6%
<b>DOMICILIO</b>	
Próprio	67%
Alugado	30%
Cedido	3%
<b>RENDA FAMILIAR EM SALÁRIOS MÍNIMOS</b>	
Até 1 salário mínimo	96,9%
Entre 1 e 2	3,1%

Em entrevista foi perguntado à frequência de internações e a quantidade de tempo que o paciente permaneceu interno. Nos gráficos 01 e 02, respectivamente, observam-se os resultados. Os motivos para internação são na maioria das vezes crise de álgica (dor nos ossos, articulações e abdômen) e infecções (pneumonia, infecção urinária). Alguns pacientes também relataram febre alta, vômito e fraqueza.

**Gráfico 1:** Quantidade em porcentagem de pacientes em relação ao tempo de internação**Gráfico 2:** Quantidade em porcentagem de pacientes em relação à frequência de internações

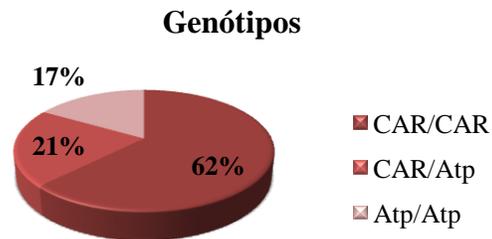
Dos 33 indivíduos participantes da pesquisa, os haplótipos  $\beta^S$  foram identificados em 24 pacientes (48 cromossomos) como mostra na tabela 03. A porcentagem de haplótipos  $\beta^S$  encontrados foram: 35 cromossomos 72,9% para Bantu (CAR) e 13 cromossomos 27,1% para os atípicos.

**Tabela 3:** Resultado em porcentagem dos haplótipos  $\beta^S$  identificados nos 24 pacientes

Haplótipos	N	%
Bantu (CAR)	35	72,9
Atípicos	13	27,1
<b>TOTAL</b>	<b>48</b>	<b>100,0</b>

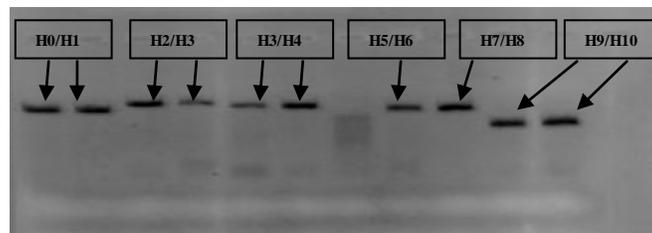
No gráfico 03 mostra a combinação dos haplótipos  $\beta^S$  encontrados nos 24 pacientes, 15 (62%) apresentam o genótipo CAR/CAR; 05 (21%) apresentam o genótipo CAR/Atp e 04 (17%) apresentam o genótipo Atp/Atp.

**Gráfico 3:** Distribuição dos haplótipos  $\beta^S$  encontrados nos 24 pacientes



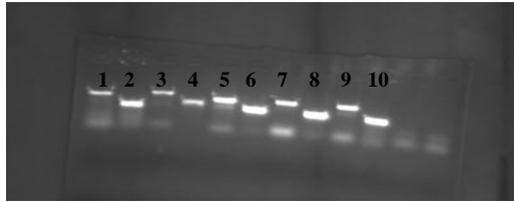
A **figura 08** mostra os fragmentos do produto da PCR de todos os primers amplificados. O tamanho da banda do fragmento amplificado foi utilizado como parâmetro para identificar a digestão enzimática em cada amostra. Quando não ocorria digestão era visualizada apenas uma banda com o mesmo perfil do gel com apenas fragmentos amplificados.

**Figura 8:** Eletroforese horizontal em gel de agarose dos produtos de PCR de cada primer



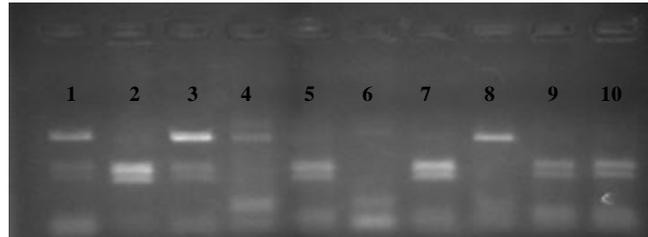
As figuras 09 a 12 representam exemplos de perfis das bandas de fragmentos de DNA obtidos após digestão enzimática, a fim de detectar os diferentes genótipos  $\beta^S$ .

**Figura 9:** Eletroforese horizontal em gel de agarose dos primers H0/H1 e H9/H10.



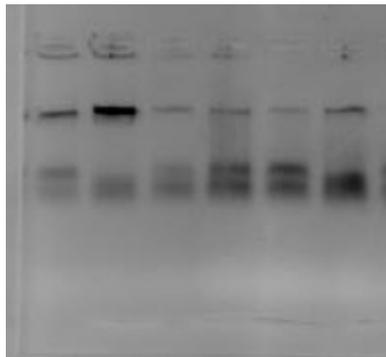
Eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% de produto PCR obtido os primers H0/H1 (região 5' $\gamma^G$ ) digerido com a enzima Xmn I (colunas com número ímpar) e H9/H10 (região 5' $\beta$ ) digerido com a enzima Hinf I (colunas com número par) *overnight* por 12 horas em termociclador a 37°C. Todas as colunas correspondem às amostras homocigotas que não sofreram cortes enzimáticos (resultado -/-).

**Figura 10:** Eletroforese horizontal em gel de agarose dos primers H2/H3

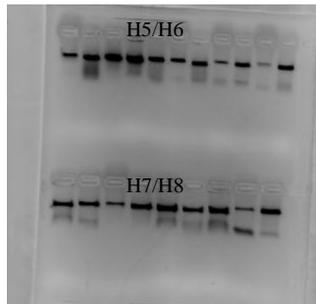


Eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% de produto PCR obtido os primers H2/H3 (região  $\gamma^G$ ) digerido com a enzima Hind III *overnight* por 12 horas em termociclador a 37°C. Colunas 4, 6 e 8 correspondem às amostras homocigotas que não sofreram cortes enzimáticos (resultado -), colunas 1 e 3 correspondem à amostras heterocigotas que sofreram cortes enzimáticos parcial (-/+), colunas 2, 5, 7, 9 e 10 correspondem à amostras homocigotas que sofreram corte enzimático total (+/+).

**Figura 11:** Eletroforese horizontal em gel de agarose dos primers H3/H4



Eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% de produto PCR obtido os primers H3/H4 (região  $\gamma^A$ ) digerido com a enzima Hind III *overnight* por 12 horas em termociclador a 37°C. Todas as colunas correspondem às amostras homocigotas que não sofreram cortes enzimáticos (resultado -/-).

**Figura 12:** Eletroforese horizontal em gel de agarose dos primers H5/H6 e H7/H8

Eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% de produto PCR obtido os primers H5/H6 (região  $\Psi\beta$ ) e H7/H8 (região  $3'\Psi\beta$ ) digerido com a enzima Hinc II *overnight* por 12 horas em termociclador a 37°C. Todas as colunas correspondem às amostras homozigotos que não sofreram cortes enzimáticos (resultado-/-).

Os dados laboratoriais de todos os pacientes estão mostrados no Anexo D. Na tabela 04 estão os resultados de médias e desvio padrão dos parâmetros hematológicos. Para essa análise foi separado apenas os pacientes com genótipo CAR/CAR, naturais do estado da Paraíba que não fazem uso da hidroxiuréia.

**Tabela 4:** Resultados em médias e desvio padrão dos dados laboratoriais dos pacientes com genótipo CAR/CAR

Nº	Parâmetros Hematológicos									Tipos de Hemoglobinas			
	Hcia (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	Hto (%)	Hb (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	RDW (%)	DHL (U/L)	Retic (%)	A2 (%)	S (%)	F (%)	C (%)
03	3,4	34	10,8	100	31	31	16	1258	8,5	1,5	76,2	22,3	
19	2,6	26	7,6	100	29	29	20	860	14	1,4	59,5	39,1	
13	2,7	27	8,3	100	30	30	19	1182	17	2	76,2	21	
11	4,2	33,6	10,6	80	25	31	20	745	5	4,5	60,1	2,8	34,6
14	2,6	26	8	100	30	30	19	936	11	3,7	85,4	10,9	
24	2,8	22	6,9	78	24	31	31	2024	15	3,9	91,7	4,6	
<b>Média</b>	3,1	28,1	8,7	93	28,2	30,3	20,8	1167,5	11,8	2,8	74,9	16,8	-
<b>Desvio Padrão</b>	0,6	4,7	1,6	10,9	2,9	0,8	5,2	462,3	4,5	1,4	13,1	13,6	-

Para comparação de médias entre os grupos de genótipos  $\beta^S$  encontrados fez-se necessário a exclusão de pacientes que faziam uso do medicamento hidroxiuréia e do paciente natural de Pernambuco.

As tabelas 05 e 06 apresentam a comparação dos valores médios dos parâmetros hematológicos analisados e dos tipos de hemoglobina entre os diferentes grupos.

O menor valor médio de hemoglobina foi encontrado no grupo CAR/CAR ( $8,7 \pm 1,6$ ), seguida do grupo CAR/Atp ( $9,5 \pm 2,6$ ). Em relação aos reticulocitos o maior valor médio foi encontrado no grupo CAR/CAR ( $11,8 \pm 4,5$ ) em seguida o grupo Atp/Atp ( $9,7 \pm 8$ ). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) entre os grupos para todos os valores médios dos parâmetros hematológicos analisados.

**Tabela 5:** Comparação da média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos entre genótipos  $\beta^S$  identificados

Parâmetros Hematológicos	Genótipos			P-valor
	CAR/CAR (n=6)	CAR/Atp (n=2)	Atp/Atp (n=6)	
Hcia ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	$3,1 \pm 0,6$	$3,5 \pm 1,5$	$3,3 \pm 1,0$	0,82
Hto (%)	$28,1 \pm 4,7$	$29,8 \pm 7,9$	$31 \pm 7,4$	0,77
Hb (g/dL)	$8,7 \pm 1,6$	$9,5 \pm 2,6$	$9,6 \pm 2,4$	0,77
VCM (fL)	$93 \pm 10,9$	$89 \pm 15,6$	$94,9 \pm 10,3$	0,84
HCM (pg)	$28,2 \pm 2,9$	$28 \pm 4,2$	$29 \pm 2,8$	0,91
CHCM (%)	$30,3 \pm 0,8$	$31 \pm 0$	$30,5 \pm 0,6$	0,53
RDW (%)	$20,8 \pm 5,2$	$17 \pm 2,8$	$19,3 \pm 3,8$	0,59
DHL (U/L)	$1167,5 \pm 462,3$	$634,5 \pm 125,2$	$716,3 \pm 266$	0,14
Retic (%)	$11,8 \pm 4,5$	$6 \pm 4,2$	$9,7 \pm 8$	0,50

O grupo CAR/CAR ( $74,9 \pm 13,1$ ) apresentou valores médios de Hemoglobina S maior que o grupo Atp/Atp ( $74,2 \pm 21,1$ ). A maior média de hemoglobina F é encontrada no grupo CAR/CAR ( $16,8 \pm 13,6$ ). Entretanto, não houve diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os grupos para cada tipo de hemoglobina.

**Tabela 6:** Comparação da média e desvio padrão dos diferentes tipos de hemoglobinas entre genótipos  $\beta$ S identificados

Tipos de Hemoglobinas	Genótipos		P-valor
	CAR/CAR (n=6)	Atp/Atp (n=3)	
Hb A <sub>2</sub>	2,8 ± 1,4	3,1 ± 0,7	0,67
Hb S	74,9 ± 13,1	74,2 ± 21,7	0,97
Hb F	16,8 ± 13,6	7,3 ± 5,8	0,18

O resultado em média e desvio padrão da enzima G6PD foi de  $19,9 \pm 4,5$  U/g Hb. De acordo com os valores de referencia na tabela 07 a atividade da enzima G6PD de todos os pacientes encontra-se normal. Todos os valores estão descritos no Anexo D.

**Tabela 7:** Valores de referencia da enzima G6PD

VALORES DE REFERENCIA DA G6PD	
Deficiente	Menor ou Igual a 2,1 U/g Hb
Intermediário	De 2,2 a 6,6 U/g Hb
Normal	Maior ou Igual 6,7 U/g Hb

## 6. DISCUSSÃO

A anemia falciforme é considerada a condição hematológica e hereditária com a maior taxa de prevalência do mundo. No Brasil, é a doença genética mais comum, que atinge majoritariamente a população preta, porém o Brasil é caracterizado por possuir ampla heterogeneidade genética, ou seja, alto grau de miscigenação, portanto a distribuição das variantes da hemoglobina está intimamente relacionada aos grupos étnicos que a compõem (NAOUM, 2000; NETO, 2003)

A determinação dos haplótipos do gene  $\beta^S$  auxilia na compreensão da heterogeneidade fenotípica da anemia falciforme, uma vez que os mesmos estão associados a concentrações variáveis de hemoglobina F, fator interferente na formação de polímeros de hemoglobina S (STEINBERG, 1996).

A distribuição de haplótipos na população mundial varia de acordo com as migrações históricas dos povos da África. Historicamente, a presença de pessoas pretas no país teve início por volta de 1550, quando os senhores de engenho passaram a utilizar povos trazidos da África como escravos para substituir a mão de obra indígena nativa. (ARRUDA; PILETTI 1997, BITOUNGUI et al., 2015).

Esses haplótipos são nomeados de acordo com sua origem étnica e geográfica: Bantu (CAR, originado na África central-sul e leste), Benin (BEN, África centro-oeste), Senegal (SEN, África atlântica oeste), Camarões (CAM, ao longo da costa oeste da África) e Árabe-Indiano (ARAB, do subcontinente indiano e da península arábica oriental). Com base na distribuição dos haplótipos ficou demonstrado que a mutação que dá origem a HbS surgiu pelo menos cinco vezes na história da humanidade (LINDENAU et al., 2016).

A Paraíba se inseria no tráfico negreiro de forma indireta e o assumia como um caráter complementar na sociedade escravista, por isso a quantidade de escravos vindos da África era inferior as principais capitanias/províncias: Salvador, Recife e Rio de Janeiro. Definir o lugar de procedência dos africanos vindos para as Américas é um trabalho árduo, embora os povos da região centro-ocidental da África, de origem bantu, possuem certa proximidade cultural a essas capitanias/províncias. Levando também em consideração as rotas do comércio atlântico, a composição demográfica dos africanos na Paraíba era de predominância bantu (GUIMARAES, 2015)

Neste trabalho foi abordado uma população de pacientes diagnosticados com AF no Estado da Paraíba acompanhados pelo Hospital Infantil Arlinda Marques. Os resultados demonstram em relação ao número de cromossomos e considerando apenas os pacientes paraibanos, as frequências de haplótipos foram: 71,7% para Bantu (CAR) e 28,2 para os atípicos. Com relação aos genótipos, a maioria (58,3%) foram identificados como portadores do genótipo CAR/CAR, incluindo o paciente natural de Pernambuco. Em seguida, os pacientes com o genótipo atípico heterozigoto e homozigoto, respectivamente, CAR/Atp (20,8%) Atp/Atp (16,6%).

Outros trabalhos realizados em estados do nordeste brasileiro corroboram com esse resultado. Em Pernambuco, estado mais próximo da Paraíba o estudo de Betania e colaboradores (2016), realizado com 706 pacientes, com 1412 cromossomos estudados, o haplótipo Bantu demonstrou frequência total de 74,3% e desses cromossomos, 6,4% foram classificados como Atípicos confirmando o estudo de Bezerra e colaboradores, trabalho realizado anteriormente, que também demonstrou prevalência do haplotipo Bantu (81,1%), em um estudo realizado com 74 crianças na mesma região (BEZERRA, et. al., 2007). No rio grande do norte, outro estado que faz fronteira com a Paraíba, um estudo realizado por Cynthia e colaboradores com 47 pacientes (94 cromossomos), as frequências de haplótipos foram de 75,5% CAR, seguido do haplotipo Benin (12,8%) e 5,3% para os atípicos. (CABRAL, 2011; HATZLHOFER, 2016).

Esse mesmo estudo, relacionado aos haplótipos  $\beta^S$  foi realizado em diversas regiões do Brasil. No nordeste, apenas no estado da Bahia, não se observa claramente o predomínio do haplótipo Bantu, nesta região as frequências dos haplótipos Bantu (41% a 48,1%) e Benin (45,6% a 55%) podem ser consideradas semelhantes (GONÇALVES et al., 2003; ADORNO et al., 2004; ADORNO et al., 2008). O historiador Pierre Verger descreveu que os escravos da Bahia foram trazidos da região do Golfo do Benin (origem do haplótipo Benin) e o restante do Brasil recebeu grande imigração de escravos do Congo e da Angola (origem do haplótipo Bantu), isso explica a diferença dos resultados de haplótipos do Estado da Bahia em relação aos outros estados (VERGER, 1987). O estudo de Galvão e colaboradores realizado em Fortaleza obtiveram o haplótipo bantu como mais prevalente (69,2%) seguido do Benin (19,2%) e 11,5 do tipo Atípico (GALVÃO, 2016).

A combinação CAR/CAR descritas nas populações brasileiras varia entre Estados. CAR/CAR também foi o haplótipo mais prevalente no Rio Grande do Sul (55,2%), Rio de

Janeiro (89,2%) e Minas Gerais (60,8%) e Paraná (76%) (LINDENAU, 2009; RODRIGUES, D. O. W., 2016; DA SILVA et al., 2014; LEAL, A. S. et al, 2016; WATANABE, A. M., 2017)

Tais resultados mostram que, de fato, no Brasil, o principal haplótipo ligado ao grupo de genes da globina beta é o CAR seguido do BEN. O haplótipo CAR está associado a concentrações reduzidas de HbF e, conseqüentemente, a uma clínica mais grave (VATHIPADIEKAL et al., 2015).

Em contrapartida, no presente estudo não foi encontrado diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios dos parâmetros hematológicos e concentrações de hemoglobinas A<sub>2</sub>, S, F nos grupos analisados, provavelmente estes resultado podem estar relacionados ao fato da comparação não ter ocorrido entre grupos de haplótipos diferentes e sim entre um grupo heterozigoto CAR/Atp e homozigoto Atp/Atp. Na literatura são raras as vezes que são comparadas com haplótipos Atípicos, porém foram os únicos grupos possíveis para fazer comparação. O numero reduzido de pacientes também contribue para essa possível interferência.

A maioria dos pacientes desse estudo relatou ter sido internado pelo menos uma vez por ano (48%) e (31%) dos pacientes se internaram pelo menos uma vez por mês. As causas são as mesmas para todos os pacientes entrevistados, independente do tipo de haplótipo encontrado, crise vaso oclusiva (dor nos ossos, articulações e abdômen) e infecções (pneumonia, infecção urinaria). O caso mais grave foi de paciente com genótipo CAR/CAR que relatou dano no rim ocasionado pelas recorrentes infecções urinaria. Crise vaso oclusiva de um paciente com anemia falciforme já é bem relatada na literatura por levar o paciente a eventos dolorosos, o qual muitas vezes resulta em internação (SOUZA, 2016).

Enquanto a anemia falciforme é uma doença genética autossômica recessiva, a deficiência de G6PD é uma desordem relacionada ao sexo, uma mutação no cromossomo X, sendo os homens mais afetados que as mulheres, portanto uma mutação não depende da outra, mas elas podem coexistir. Além disso, a alta incidência de deficiência da G6PD é relatada em alguns lugares do mundo onde há grande prevalência da anemia falciforme na população (GUINDO, 2007; FASOLA, 2019).

A deficiência da G6PD é uma das eritroenzimopatias mais comuns em todo mundo, afetando cerca de 400 milhões de pessoas, é encontrada com frequências variadas, dependendo da região e do grupo étnico. Ocorre com maior frequência em indivíduos do Mediterraneo, de origem africana ou asiática, podendo apresentar incidência de 5% a 25% em algumas populações.

Pesquisas realizadas no Brasil e em alguns países da América Latina mostraram alta prevalência (> 10%) da deficiência G6PD na população estudada (CAPPELLINI, et al, 2008; MONTEIRO, 2014)

Já foi encontradas 186 variantes genóticas conhecidas da G6PD, a maioria delas resultando em fenótipos assintomáticos até serem expostos a gatilhos hemolíticos. Essas variantes da G6PD são heterogeneamente espalhadas entre diferentes países, apresentando distribuições específicas de região distintas, que podem estar relacionadas a rotas específicas de migração humana (MUNICCI, et al, 2012; HOWES, et al, 2013).

A doença pode ter um efeito sutil na severidade da hemólise, porém piora o grau de anemia na doença falciforme quando os dois distúrbios coexistem. Portanto, em caso de pacientes nos quais as duas condições coexistem a decisão na escolha de medicamentos e de tratamento de infecções deve ser seletiva (FASOLA, 2019).

Nesse estudo, foi analisada a atividade da enzima G6PD nos pacientes com AF e de acordo com os valores de referência, os resultados mostraram que os pacientes examinados possuem atividade normal da enzima G6PD, sendo assim, não foi encontrado coexistência de anemia falciforme e deficiência da G6PD nos pacientes examinados.

## 7. CONCLUSÃO

Os haplótipos ligados ao gene da globina  $\beta^S$  encontrados foram, CAR/CAR (62%), CAR/Atp (21%) e Atp/Atp (17%).

Não houve coexistência de deficiência da enzima G6PD e anemia falciforme nos pacientes que participaram do estudo.

Os pacientes com Anemia Falciforme acompanhados no Hospital Infantil Arlinda Marques, são em sua maioria de baixa renda, a maioria dos responsáveis não tem ensino superior, o que dificulta a entrada no mercado de trabalho. Até o momento da entrevista, a maioria dos responsáveis estavam desempregados, sobrevivendo com o auxílio oferecido pelo governo federal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICA

ALEXY, T. et al. Sick cell disease: Selected aspects of pathophysiology. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 44, n. 3, p. 155–166, 2010.

ARDUINI, G. A. O.; RODRIGUES, L. P.; TROVÓ DE MARQUI, A. B. Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 52–56, 2017.

ADORNO, E. V. et al. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 621-625, 2008.

ADORNO, E. V. et al. The  $\beta$ -Globin Gene Cluster Haplotypes in Sickle Cell Anemia Patients from Northeast Brazil: A Clinical and Molecular View. **Hemoglobin**, v. 28, n. 3, p. 267-271, 2004.

ARRUDA, J. J. A.; PILETTI, N. Toda a história: história geral e história do Brasil. [S.l: s.n.], 1997.

AIRES, M. M. et al. Fisiologia. In: ZIN, W. T.; ROCCO, P. R. M.; FALLE, D. S. **Transporte de gases no organismo**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 645- 643, 2008.

BALLAS, S. K. et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American journal of hematology**, v. 85, n. 1, p. 6-13, 2010.

BALLAS, S. K. et al. Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

BANDEIRA, F. M. G. C. et al. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina " S" detectados através de triagem em sangue de cordão umbilical. **Journal Pediatrics**, v. 75, n. 3, p. 167-71, 1999.

BANDEIRA, F. M. G. C. et al. Family screening for HBB\*S gene and detection of new cases of sickle cell trait in Northeastern Brazil. **Revista de saude publica**, v. 42, n. 2, p. 234–241, 2008.

BEUTLER, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: **Hemolytic anemia in disorders of red cell metabolism**. Springer, Boston, MA, p. 23-167, 1978.

BEZERRA, M. A. C. et al. Molecular variations linked to the grouping of  $\beta$ -and  $\alpha$ -globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. **Hemoglobin**, v. 31, n. 1, p. 83-88, 2007.

BITOUNGUI, V. J. N. et al. Beta-globin gene haplotypes among cameroonians and review of the global distribution: is there a case for a single sickle mutation origin in Africa?. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 19, n. 3, p. 171-179, 2015.

BONINI-DOMINGOS, C. R. **Hemoglobinopatias no Brasil: variabilidade genética e**

**metodologia laboratorial. São José do Rio Preto, 1993.** 232 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 1993.

BONNINI-DOMINGOS, C. R. B.; NAOUM, P. C.; VIANA, L. M. S.; MATOS, L. C.; FILHO, F. A.; MOREIRA, H. W. **Hemoglobina S – uma revisão.** UNICiências, v. 1, n. 1, São Paulo – SP, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.391/GM de 16 de agosto de 2005. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2005/GM/GM-1391htm>> Acesso em 29 de Janeiro de 2018.

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

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil Sickle cell disease in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 204-206, 2007.

CAMILO-ARAÚJO, R. F. et al. Molecular analysis and association with clinical and laboratory manifestations in children with sickle cell anemia. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 36, n. 5, p. 334-339, 2014.

CAPPELLINI, M. D.; FIORELLI, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The lancet*, 2008, 371.9606: 64-74.

COMPRI, M. B.; SAAD, S. T. O.; RAMALHO, A. S. G-6-PD deficiency in a Brazilian community: an investigation involving epidemiological genetics and molecular techniques. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 2, p. 335–342, 2000.

CHEN, E., MATTHEWS, K. A.; BOYCE, W. Thomas. Socioeconomic differences in children's health: how and why do these relationships change with age?. **Psychological bulletin**, v. 128, n. 2, p. 295, 2002.

DA SILVA, M. A. L. et al.  $\beta$ -Globin gene cluster haplotypes and clinical severity in sickle cell anemia patients in Southern Brazil. **Open Journal of Blood Diseases**, 2014.

DE LEMOS CARDOSO, G., GUERREIRO, J. F. Molecular characterization of sickle cell anemia in the Northern Brazilian state of Para. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n. 5, p. 573-577, 2010.

DAVIES, S. C. et al. Screening for sickle cell disease and thalassaemia: a systematic review with supplementary research. **Health Technology Assessment (Winchester, England)**, v. 4, n. 3, p. i-v, 1-99, 2000.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. Practical haematology. 6.ed. **Edinburgh: Churchill Livingstone**, 1984.

DRISS, A., et al. Sick cell disease in the post genomic era: a monogenic disease with a polygenic phenotype. **Genomics insights**, 2009.

FADEL, V. **ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA HEMOGLOBINA ISOLADA DO LOBO GUARÁ (*Chrysocyon brachiurus*)**. 2000. Biofísica Molecular (Dissertação) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto - SP.

FASOLA, F. A., FOWODU, F. O., SHOKUNBI, W. A., & KOTILA, T. R. The effect of the coinheritance of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the severity of sickle cell disease. **Nigerian Postgraduate Medical Journal**, v. 26, n. 2, p. 118, 2019.

FERRAZ, S. T. Acompanhamento clínico de crianças portadoras de anemia falciforme em serviços de atenção primária em saúde. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 22, n. 3, p. 315-320, 2012.

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

FIGUEIREDO, M. S. et al. Effect of  $\alpha$ -thalassemia and  $\beta$ -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. **American journal of hematology**, v. 53, n. 2, p. 72-76, 1996

GALVÃO, L. M. Estudo de haplótipos da globina BS com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), hemoglobina fetal e eventos clínicos em pacientes com anemia falciforme. 2016.

GALAPPATHTHY, G. N. L; THARYAN, P.. KIRUBAKARAN, R. Primaquine for preventing relapse in people with Plasmodium vivax malaria treated with chloroquine. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 10, 2013.

GIBBS, W. N.; WARDLE, J.; SERJEANT, G. R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Homozygous Sickle Cell Disease in Jamaica. **British journal of haematology**, v. 45, n. 1, p. 73-80, 1980.

GUIMARÃES, M. S. Diáspora africana na Paraíba do Norte: trabalho, tráfico e sociabilidade na primeira metade do século XIX, 2015.

GONÇALVES, M. S. et al. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas**, v. 36, n. 10, p. 1283-8, 2003.

GUINDO, A. et al. X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. **PLoS medicine**, v. 4, n. 3, 2007.

- HABARA, A., STEINBERG, M. H. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Experimental Biology and Medicine**, 2016, 241.7: 689-696.
- HATZLHOFER, B. L. D. Influência dos haplótipos  $\beta^s$  e da alfa talassemia no perfil clínico da anemia falciforme em Pernambuco, Brasil. 2016.
- HANKINS, J., WANG, W. The painful face of poverty. **Pediatric blood & cancer**, v. 52, n. 2, p. 157, 2009.
- HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 74, n. 3, p. 179-84, 2001.
- HIGGS, D. R. The molecular Basis of  $\alpha$ -thalassemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n.1, 2013.
- HIGGS, D. R.; WOOD, W. G. Genetic complexity in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 105, n. 33, p. 11595 – 11596, 2008.
- HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em Hematologia**. In: \_\_ Distúrbios Genéticos da Hemoglobina. 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, p. 89-105, 2013.
- HOWES, R. E., et al. Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. **Malaria journal**, 2013, 12.1: 418
- KARAFIN, M. S., et al. The clinical impact of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in patients with sickle cell disease. **Current opinion in hematology**, 2018, 25.6: 494-499.
- LABIE, D. et al. Common haplotype dependency of high G gamma-globin gene expression and high Hb F levels in beta-thalassemia and sickle cell anemia patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 7, p. 2111-2114, 1985.
- LETTRE, G., et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and  $\beta$ -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2008, 105.33: 11869-11874.
- LETTRE, G. The search for genetic modifiers of disease severity in the  $\beta$ -hemoglobinopathies. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 10, p. a015032, 2012.
- LEAL, A. S., et al. Haplotypes  $\beta^s$ -globin and its clinical-haematological correlation in patients with sickle-cell anemia in Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 52, n. 1, p. 6-10, 2016
- LINDENAU, J. D. R. Frequência de mutações nos genes das cadeias alfa e beta da hemoglobina no Rio Grande do Sul. 2009.

- LINDENAU, J. D. et al. The effects of old and recent migration waves in the distribution of HBB\* S globin gene haplotypes. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 4, p. 515-523, 2016.
- LOBO, C.; MARRA, V. N.; SILVA, R. M. **Crises dolorosas na anemia falciforme**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v 29(3):47-258, 2007.
- LUZZATTO, L.; NANNELLI, C.; NOTARO, R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 30, n. 2, p. 373-393, 2016.
- MAURÍCIO, C. R. F. et al. **Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase: dados de prevalência em pacientes atendidos no Hospital Universitário Onofre Lopes, Natal – RN \* Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : prevalence in patients attended in Hospital Universitario Onofre Lopes, Natal – RN**. v. 38, n. 1, p. 57–59, 2006.
- MEHTA, A. B. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Postgraduate medical journal**, v. 70, n. 830, p. 871, 1994.
- MORENO, N. et al. Beta-globin gene cluster haplotypes in Venezuelan sickle cell patients from the State of Aragua. **Genetics and molecular biology**, v. 25, n. 1, p. 21-34, 2002.
- MINUCCI, A., et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the “old” and update of the new mutations. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 2012, 48.3: 154-165.
- MONTEIRO, W. M., et al. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2014, 109.5: 553-568.
- NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 1, p. 5–22, 2000.
- NAOUM, P.C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. Sarvier, 1997.
- NAOUM, P.C. Anemias imigrantes: a origem das anemias hereditárias no Brasil. **Ciência Hoje**, [S.l.], v. 3, nº 14, p. 59-64, 1984.
- NETO, G. C. D. G.; PITOMBEIRA, M. D. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 51–56, 2003 *apud* NAOUM, P.C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. Sarvier, 1997.
- NETO, G. C. D. G.; PITOMBEIRA, M. D. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 51–56, 2003.
- PARRA, F. C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 1, p. 177-182, 2003.
- PANTE-DE-SOUSA, G. et al. Beta-globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. **Annals of**

**human biology**, v. 26, n. 4, p. 365-373, 1999.

PEREIRA, S. A. D. S. et al. Sickle cell disease: quality of life in patients with hemoglobin SS and SC disorders. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, n. 5, p. 325-331, 2013.

PIOMELLI, S. et al. Clinical and biochemical interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle-cell anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 287, n. 5, p. 213-217, 1972.

POGGI, V. et al. Identification of a single base change in a new human mutant glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by polymerase-chain-reaction amplification of the entire coding region from genomic DNA. **Biochemical journal**, v. 271, n. 1, p. 157-160, 1990.

QUINN, C. T. Sickle cell disease in childhood: from newborn screening through transition to adult medical care. **Pediatric Clinics**, v. 60, n. 6, p. 1363-1381, 2013.

RAMALHO, A. S. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 1986.

RAMALHO, A. S. et al. Hemoglobina S em recém-nascidos brasileiros. **Journal of Pediatrics**, v. 41, p. 9-10, 1976.

RAPAPPORT, S. I. Hematologia: introdução. 2a. ed. São Paulo: Roca; 1990.

RODRIGUES, D. O., RIBEIRO, L. C., SUDÁRIO, L. C., TEIXEIRA, M. T., MARTINS, M. L., PITTELLA, A. M., & JUNIOR, F. Determinantes genéticos e Acidente Vascular Encefálico em crianças com doença falciforme. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 6, p. 602-608, 2016.

RUSANOVA, I. et al. Oxidative stress status, clinical outcome, and  $\beta$ -globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. **European journal of haematology**, v. 85, n. 6, p. 529-537, 2010.

SANTOS, J. P dos; GOMES NETO, M. Sociodemographic aspects and quality of life of patients with sickle cell anemia. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, n. 4, p. 242-245, 2013.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SERJEANT, G. R. The natural history of sickle cell disease. **Cold Spring Harbor Perspective in Medicine**, v. 3, n. 10, p. a011783, 2013.

SERJEANT, G. R. Geography and the clinical picture of sickle cell disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 565, n. 1, p. 109-119, 1989.

SILLA, L. M. R. Doença falciforme: um grave e desconhecido problema de saúde pública no

Brasil. **Jornal de Pediatria**, v. 75, n. 3, p. 145-6, 1999.

SILVA, L. B.; GONÇALVES, R. P. Características fenotípicas dos pacientes com anemia falciforme de acordo com os haplótipos do gene da  $\beta$ S-globina em Fortaleza, Ceará. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 1, p. 40-44, 2010

SILVA, R. B.; RAMALHO, A. S.; CASSORLA, R. A anemia falciforme como problema de saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, p. 54-58, 1993.

SILVA, M. A. L. **Estudo de identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme**. 2006. 105f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

SILVA, K. R.; YAMAGUCHI, M. U. Os benefícios da inclusão das hemoglobinopatias na triagem neonatal. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 11, n. 1, 2008.

SOUZA, P. C. **Avaliação dos produtos de degradação oxidativa da Hb S em eritrócitos de doentes falcêmicos de acordo com o genótipo e sob concentrações diferenciadas de hemoglobinas S**. 1999. Dissertação (Mestrado). IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto - SP, 1999.

SOUZA, J. M., ROSA, P. E. L., SOUZA, R. L., & CASTRO, G. F. P. Fisiopatologia da anemia falciforme. **Revista transformar**, v. 8, n. 8, p. 162-178, 2016.

SPARKS, R. S.; BALLUDA, M. C.; TOWNSEND, D. E. Cellulose acetate electrophoresis of human G-6-PD. **Journal of Laboratorial and Clinical Medicine**, v. 73, p. 531-534, 1969.

NGO, D. A.; STEINBERG, M. H. Genomic approaches to identifying targets for treating  $\beta$  hemoglobinopathies. **BMC medical genomics**, v. 8, n. 1, p. 44, 2015.

STEINBERG, M. H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **The Scientific World Journal**, v. 9, p. 46-67, 2009.

SUTTON M.B.; OUHASSIRA E.; NAGEL, R. L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of the  $\beta$ -like globin gene cluster haplotypes. **American Journal of Hematology**, v. 32 n. 1, p. 66-69, 1989.

THOMPSON MW, MCINNES RR, WILLARD HF. *Genética Médica* 1991

TORRES, F. R.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Human hemoglobins – malaria hypothesis or maternal effect? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 1, p. 53–60, 2005.

VALENTE, A. L. P.; COLLINS, C. H.; MANFREDI, J. E. Conceitos básico de cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, Julho, 1983.

VATHIPADIEKAL, V. et al. Polymorphisms Associated with the Arab-Indian Haplotype of Sickle Cell Anemia Are Candidate Fetal Hemoglobin Gene Modulators. *Blood*, v. 126, n. 23, p.

3388–3388, 3 dez. 2015.

WATANABE, A. M. et al. The frequency of  $\beta$ S-globin haplotypes in the state of Paraná, Brazil, and clinical manifestations of sickle cell anemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, n. 1, p. 24-30, 2017.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. In: COSTA, F. F.; CONRAN, N.; FERTRIN, K. Y. **Anemia Falciforme**. 1ªed. São Paulo: Atheneu. cap 27, p. 205–223, 2013.

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

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu, 2001. **Pediatria**.

ZAGO, M. A.; FIGUEIREDO, M. S.; OGO, S. H. Bantu  $\beta$ S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 88, n. 3, p. 295-298, 1992.

## ANEXOS

## ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E  
ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a)

Precisamos da sua autorização para que o menor, sob sua responsabilidade, seja convidado (a) de forma **voluntária** a participar desta pesquisa intitulada: “*Concentração de hemoglobinas variantes e caracterização molecular dos haplótipos ligados ao gene da globina  $\beta$  e deficiência da enzima g6pd em paciente com anemia falciforme no estado da Paraíba*” que está sendo desenvolvida pela pesquisadora Amanda Freire de Souza aluna do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação do Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares.

Neste projeto pretendemos realizar pesquisa de dados no prontuário, exames de laboratório e exames clínicos. O motivo que nos leva a desenvolver este projeto é que queremos caracterizar os diferentes quadros clínicos que afetam os pacientes com anemia falciforme no Estado da Paraíba.

Para este projeto adotaremos os seguintes procedimentos: a partir do prontuário do menor nós iremos coletar dados pessoais, clínicos e exames de laboratório já realizados sob sua responsabilidade e montar um banco de dados para facilitar as análises. Também precisamos coletar 5 ml de sangue em um tubo. Este tubo com sangue será utilizado para separar o material genético, o DNA e fazer estudos moleculares. Esse material será trabalhado no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética da Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, para estudar o material genético na busca de informações que contribuem para as variações clínicas observadas na doença falciforme.

Para participar deste projeto, o menor sob sua responsabilidade não terá nenhum custo, nem receberá dinheiro. A participação é totalmente **voluntária**, o menor estará livre para participar ou recusar-se a participar. Você, como responsável pelo menor, poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação dele a qualquer momento. A participação é voluntária e a recusa de participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido (a) pela pesquisadora que irá tratar a identidade do menor com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade. O menor não será identificado (a) em nenhuma publicação.

Este projeto apresenta pouco risco. A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas em alguns casos pode acontecer um hematoma (cor roxa) ou infecção na região do braço onde a agulha foi introduzida e poderá haver incomodo no momento da picada da agulha. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clinico, esta mesma amostra poderá ser usada para nossa pesquisa sem a necessidade de uma nova coleta. O risco de quebra de confidencialidade será diminuído com a utilização de códigos alfanuméricos para identificar as amostras coletadas, e as informações retiradas dos prontuários, do questionário e os resultados da pesquisa incluídos no banco de dados estarão em um único computador com acesso protegido por senha onde somente a pesquisadora terá acesso.

Em relação aos benefícios deste projeto podemos citar: os resultados poderão ajudar o médico a tratar a doença falciforme com outras perspectivas; de forma indireta pode trazer benefícios a outras pessoas, que como o paciente, tem a doença falciforme.

**Os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, têm direito à indenização, por parte do pesquisador (a), do patrocinador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa.**

Esclarecemos que sua participação no estudo é totalmente voluntária e, portanto, o (a) senhor (a) não é obrigado (a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador (a). Caso decida não consentir a participação do menor no estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Esse termo de consentimento de duas páginas encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma copia será arquivada pela pesquisadora responsável e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Em caso de duvidas com respeito aos aspectos éticos do presente estudo, você pode entrar em contato com:

**Comitê de Ética em Pesquisa**  
**Hospital Universitário Lauro Wanderley**  
Universidade Federal da Paraíba / UFPB  
Hospital Universitário Lauro Wanderley /  
HULW  
2º andar  
CEP: 58059-900 – João Pessoa/PB  
☎ (83) 3216-7964 / 3216-7955  
**E-mail** : comitedeetica@hulw.ufpb.br  
**Horário do Expediente:** 8h00 às 17h00

**Pesquisadora Responsável**  
Amanda Freire de Souza  
Laboratório de Biologia Molecular  
Estrutural e Oncogenética  
Universidade Federal da Paraíba / UFPB  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza /  
CCEN  
☎ (83) 3216-7436 / 9 9986-1494  
**E-mail:** amandafsbio@gmail.com  
**Pesquisador Responsável**  
Leonardo Ferreira Soares  
Universidade Federal da Paraíba / UFPB  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza /  
CCEN  
☎ (83) 9 9967-3013  
**E-mail:** leonardosoares@hotmail.com

### CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

Ao assinar esse termo natural declaro que aceito participar da pesquisa “*Concentração de hemoglobinas variantes e caracterização molecular dos haplótipos ligados ao gene da globina  $\beta$  e deficiência da enzima G6-PD em paciente com anemia falciforme no estado da Paraíba*”, depois de ter sido informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e ter esclarecido minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações. Tendo o consentimento do meu responsável, declaro que concordo em participar desta pesquisa, recebi uma via deste termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de esclarecer e tirar minhas dúvidas e entendi que não haverá nenhum problema se caso eu desistir.

João Pessoa, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do pesquisador

	Nome do responsável	Assinatura
1		
2		
3		
4		
5		

## ANEXO B

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(TALE)

Prezado (a),

Você está sendo convidado (a) como **voluntário (a)** a participar desse projeto de pesquisa intitulado: “*Concentração de hemoglobinas variantes e caracterização molecular dos haplótipos ligados ao gene da globina  $\beta$  e deficiência da enzima G6-PD em paciente com anemia falciforme no estado da Paraíba*”, coordenado pelo Professor Leonardo Ferreira Soares, contato: (83) 9 9967-3013 e a pesquisadora Amanda Freire de Souza, contato (83) 9 99861494. Seus pais permitiram que você participasse.

Nós precisamos coletar seu nome, endereço e outros dados seus que seu médico(a) escreveu em seu prontuário e precisamos que responda algumas perguntas no questionário que será entregue, apenas para enriquecimento da pesquisa. Também precisaremos coletar amostras do seu sangue para fazer estudos.

Para participar dessa pesquisa, **o responsável por você** deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum gasto, nem receberá qualquer dinheiro. Você será esclarecido de qualquer coisa que quiser saber e só precisa participar da pesquisa se quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. A sua participação é voluntária e a recusa de participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pela pesquisadora que irá tratar a sua identidade com sigilo. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação.

Este projeto apresenta pouco risco. A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas em alguns casos pode acontecer um hematoma (cor roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida e poderá haver incomodo no momento da picada da agulha. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, esta mesma amostra poderá ser usada para nossa pesquisa sem a necessidade de uma nova coleta. O risco de quebra de confidencialidade será diminuído com a utilização de códigos alfanuméricos para identificar as amostras coletadas, e as informações retiradas dos prontuários, do questionário e os resultados da pesquisa incluídos no banco de dados estarão em um único computador com acesso protegido por senha onde somente a pesquisadora terá acesso.

Em relação aos benefícios deste projeto podemos citar: os resultados poderão ajudar o seu médico(a) a tratar a doença falciforme; pode trazer benefícios a outras pessoas que como você tem doença falciforme.

A pesquisa será feita no Hospital Arlinda Marques onde será coletado amostras de sangue de crianças com Anemia Falciforme, pós coleta esse material será levado ao Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética da Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, para estudar o material genético na busca de informações que contribuem para as variações clínicas observadas na doença falciforme. Ninguém saberá que você está participando da pesquisa; não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Seu nome ou

material utilizado não será repassado a terceiros sem autorização do responsável por você. Os resultados da pesquisa vão ser utilizados para a dissertação de mestrado da pesquisadora Amanda Freire de Souza, mas sem identificar as crianças que participaram.

Esclarecemos que sua participação no estudo é totalmente voluntária e, portanto, o (a) senhor (a) não é obrigado (a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador (a). Caso decida não consentir a participação do menor no estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Esse termo de consentimento de duas páginas encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma copia será arquivada pela pesquisadora responsável e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução N° 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

=====

### CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

Ao assinar esse termo natural declaro que aceito participar da pesquisa *“Concentração de hemoglobinas variantes e caracterização molecular dos haplótipos ligados ao gene da globina  $\beta$  e deficiência da enzima G6-PD em paciente com anemia falciforme no estado da Paraíba”*, depois de ter sido informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e ter esclarecido minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações. Tendo o consentimento do meu responsável, declaro que concordo em participar desta pesquisa, recebi uma via deste termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de esclarecer e tirar minhas dúvidas e entendi que não haverá nenhum problema se caso eu desistir.

João Pessoa, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

	Nome do menor	Assinatura
1		
2		
3		

## ANEXO C



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR



## BANCO DE DADOS CLÍNICO

## IDENTIFICAÇÃO

1. Data da entrevista: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
2. Local da coleta: \_\_\_\_\_
3. Iniciais do nome do paciente: \_\_\_\_\_
4. N° do Prontuario: \_\_\_\_\_
5. Cidade de nascimento: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_
6. Data do nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
7. Sexo: ( ) F ( ) M
8. Raça: ( ) Branca ( ) Preta ( ) Parda ( ) Amarela ( ) Indígena
9. Escolaridade:  
( ) Não alfabetizado ( ) Alfabetizado ( ) Fundamental completo ( ) Fundamental incompleto ( ) Médio completo ( ) Médio incompleto ( ) Superior completo ( ) Superior incompleto
10. Grau de parentesco do responsável: \_\_\_\_\_
11. Nome do responsável: \_\_\_\_\_
12. Situação ocupacional do responsável:  
( ) empregado ( ) desempregado ( ) autônomo ( ) estudante ( ) aposentado
13. Domicílio: ( ) próprio ( ) alugado ( ) cedido ( ) outros \_\_\_\_\_
14. Renda familiar em salários mínimos:  
( ) menos de 1 ( ) 1 a 2 ( ) 3 a 4 ( ) mais que 5 a 6 ( ) não sabe
15. Uso da Hidroxiureia: ( ) sim ( ) não
16. Data de inicio de uso da hidroxiureia: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

<b>HISTÓRICO DE INTERNAÇÕES</b>
---------------------------------

**17. Com que frequência você é internado?** ( ) *1 vez por mês* ( ) *1 vez por semestre*  
 ( ) *Pelo menos 1 ou 2 vezes por ano* ( ) *Mais de 2 vezes por ano*

**18. Qual (is) o (s) motivo (s) do (s) internamento (s)?**

---



---

**19. Quando foi o ultimo internamento?** \_\_\_\_\_

**20. Por quanto tempo você ficou internado no ultimo internamento?**

( ) *De 1 a 5 dias* ( ) *De 5 a 15 dias* ( ) *15 a 1 mês* ( ) *acima de 1 mês* ( ) *Acima de 2 meses*

<b>COMPLICAÇÕES</b>
---------------------

( ) *Crise de dor* ( ) *Convulsão* ( ) *Dactilite (síndrome mão-pé)* ( ) *Crise aplástica* ( ) *Crise algicas*  
 ( ) *Doença cerebrovascular* ( ) *Doença hepática obstrutiva* ( ) *Doença renal crônica*  
 ( ) *Hipotireoidismo* ( ) *Meningite* ( ) *Esplenectomia (retirada do baço)* ( ) *Ulcera de perna*  
 ( ) *Crise de Infecções* ( ) *Síndrome torácica aguda* ( ) *Sequestro esplênico agudo*

## ANEXO D

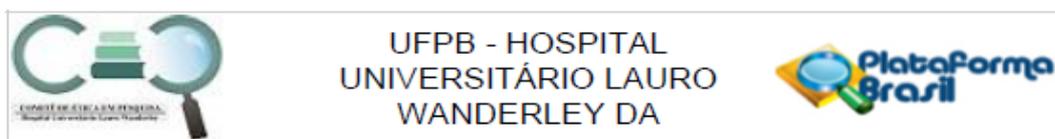
Dados laboratoriais dos 24 pacientes com anemia falciforme que participaram do estudo

Nº	S	Idade (anos)	Hcia (x10 <sup>6</sup> / mm <sup>3</sup> )	Hto (%)	Hb (g/dL)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	RDW (%)	DHL (U/L)	Retic (%)	G6PD (U/g)	Hb A2 (%)	Hb S (%)	Hb F (%)	Hb C (%)	Hb A (%)	Haplótipos
1*	F	07	1,9	22	7	115	36	31	10	1537	0,6	13,59	1,7	76,7	21,6	-	-	CAR/CAR
2	M	03	4,4	35	10,9	79,5	24,8	31	18	542	2,5	21,59						Atp/Atp
3	M	10	3,4	34	10,8	100	31	31	16	1258	8,5	23,11	1,5	76,2	22,3			CAR/CAR
4	M	18	3,8	38	12	100	31	31	15	455	3,3	23,97	2,8	49,4	1,7	6,10		Atp/Atp
5	M	13	4,5	35,4	11,3	78	25	31	15	546	3	11,2						CAR/Atp
6*	M	09	2,4	24	7,8	100	32	32	16	1245	14	23,2	3,1	96,9				CAR/CAR
7	F	03	3	30	9	100	30	30	20	837	15	26,63	2,7	84,1	13,2			Atp/Atp
8*	M	09	2,8	3,3	10,9	119	38	32	15	587	2,5	18,51	2,9	72,1	14,6			CAR/Atp
9	M	10	2,4	24,2	7,6	100	31	31	19	723	9	19,6	3,1	78,5	18,4			CAR/Atp
10*	F	05	3,1	32,5	10,1	103	31	30	17	895	9,5	28,10	3,7	82,5	13,8			CAR/CAR
11	M	09	4,2	33,6	10,6	80	25	31	20	745	5,0	11,69	4,5	60,1	2,8	34,6		CAR/CAR
12*	M	12	2,4	24,0	7,6	100	31	31	16	1262	9,6	25,82	3,0	89,8	7,2			CAR/CAR
13	F	05	2,7	27	8,3	100	30	30	19	1182	17,0	12,10	2,0	76,2	21,0			CAR/CAR
14	M	10	2,6	26	8	100	30	30	19	936	11,0	23,43	3,7	85,40	10,9			CAR/CAR
15*	M	04	2,2	23,1	7,2	107	33	31	21	643	20%	22,1	2,4	86,9	10,7			CAR/CAR
16*	M	08	3,1	31,10	9,6	100	30	30	18	1315	7	18,3	2,7	80,8	16,5			CAR/Atp
17	M	01	2,4	24	7,4	100	30	30	23	756	8,0	18,8						CAR/Atp
18*	F	03	2,1	24,3	7,5	114	35	30	17	854	21,0	18,9	1,8	54,5	40,4			CAR/CAR
19	M	04	2,6	26	7,6	100	29	29	20	860	14,0	23,9	1,4	59,5	39,1			CAR/CAR
20*	F	11	2,0	22,50	7,1	115	36	31	16	1263	8	20,9	3,0	80	13,2			CAR/CAR
21**	M	-	2,1	21	6,5	100	30	30	22	1244	15,0	19,5						CAR/CAR
22	M	10	2,1	21	6,5	100	30	30	24	1031	18,0	15,5	3,9	89,2	6,9			Atp/Atp
23**	M	-	2,8	28	8,6	100	30	30	21	1270	14,0	18,2	3,0	72	25			CAR/CAR
24	M	09	2,8	22	6,9	78	24	31	31	2024	15	16,2	3,9	91,7	4,7			CAR/CAR

\*Pacientes que usam o medicamento hidroxiuréia

\*\*Desconhecimento quanto ao uso da hidroxiuréia

## ANEXO E



Continuação do Parecer: 3.078.540

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos obrigatórios foram apresentados possibilitando adequada avaliação no que se refere aos aspectos éticos e metodológicos.

**Recomendações:**

Recomenda-se que o pesquisador responsável e demais colaboradores, CUMPRAM, EM TODAS AS FASES DO ESTUDO, A METODOLOGIA PROPOSTA E APROVADA PELO CEP-HULW. Caso ocorram intercorrências durante ou após o desenvolvimento da pesquisa, a exemplo de alteração de título, mudança de local da pesquisa, população envolvida, entre outras, o pesquisador responsável deverá solicitar a este CEP, via Plataforma Brasil, aprovação de tais alterações, ou buscar devidas orientações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A pesquisadora atendeu as solicitações feitas anteriormente pelo CEP/HULW, portanto, o estudo encontra-se adequado e exequível sob os aspectos éticos e metodológicos recomendados pela Resolução 466/2012, CNS/MS. Não há pendências nem inadequações a serem notificadas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Ratificamos o parecer de APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa, emitido pelo Colegiado do CEP/HULW, em reunião ordinária realizada em 11 de dezembro de 2018.

**OBSERVAÇÕES IMPORTANTES PARA O(S) PESQUISADORES**

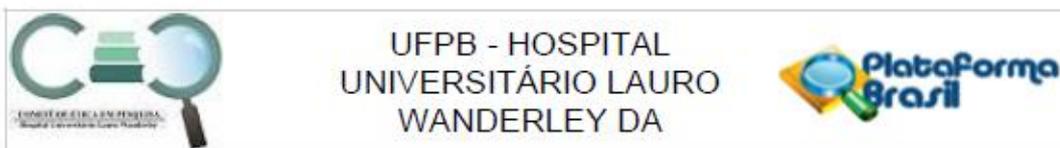
. O participante da pesquisa e/ou seu responsável legal deverá receber uma via do TCLE na íntegra, com assinatura do pesquisador responsável e do participante e/ou responsável legal. Se o TCLE contiver mais de uma folha, todas devem ser rubricadas e com aposição de assinatura na última folha. O pesquisador deverá manter em sua guarda uma via do TCLE assinado pelo participante por cinco anos.

. O pesquisador deverá desenvolver a pesquisa conforme delineamento aprovado no protocolo de pesquisa e só descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade, pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

Lembramos que é de responsabilidade do pesquisador assegurar que o local onde a pesquisa será realizada ofereça condições plenas de funcionamento garantindo assim a segurança e o bem-estar dos participantes da pesquisa e de quaisquer outros envolvidos.

Eventuais modificações ao protocolo devem ser apresentadas por meio de EMENDA ao CEP/HULW

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900  
 UF: PB Município: JOAO PESSOA  
 Telefone: (83)3216-7964 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.078.540

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

JOAO PESSOA, 12 de Dezembro de 2018

---

**Assinado por:**

**Caliandra Maria Bezerra Luna Lima**  
(Coordenador(a))

**ANEXO F**

Artigo Submetido à Revista Ciência e Saúde Coletiva

Ciência & Saúde Coletiva

**Ciência & Saúde Coletiva**

**PREVALÊNCIA DE HAPLÓTIPOS E DEFICIÊNCIA DA ENZIMA  
G6PD EM PACIENTES COM A DOENÇA FALCIFORME NO  
ESTADO DA PARAÍBA**

Journal:	<i>Ciência &amp; Saúde Coletiva</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Free Theme Article
Keywords:	sickle cell disease, Public health, black people health

SCHOLARONE™  
Manuscripts