



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E  
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DE MEDICAMENTOS

LILIANNE BRITO DA SILVA ROCHA

LESÃO NO DNA, ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS E SUA  
CORRELAÇÃO COM POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PACIENTES  
COM ANEMIA FALCIFORME TRATADOS COM HIDROXIURÉIA

FORTALEZA

2014

LILIANNE BRITO DA SILVA ROCHA

LESÃO NO DNA, ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS E SUA  
CORRELAÇÃO COM POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PACIENTES  
COM ANEMIA FALCIFORME TRATADOS COM HIDROXIURÉIA

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação em  
Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de  
Medicamentos da Universidade Federal do Ceará  
para a Obtenção do Título de Doutor em  
Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de  
Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pinheiro  
Gonçalves Lemes

FORTALEZA  
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- R5741 Rocha, Lillianne Brito da Silva.  
Lesão no DNA, alterações cromossômicas e sua correlação com polimorfismos genéticos em pacientes com anemia falciforme tratados com hidroxiuréia/ Lillianne Brito da Silva Rocha. – 2014.  
91 f. : il.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, Fortaleza, 2014.  
Orientação: Profª. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.
1. Anemia Falciforme. 2. Hidroxiuréia. 3. Genotoxicidade. 4. Ensaio Cometa. 5. Testes de Mutagenicidade. 6. Citogenética. 7. Polimorfismo Genético. I. Título.

---

CDD 616.1527

**LILIANNE BRITO DA SILVA ROCHA**

**LESÃO NO DNA, ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS E SUA CORRELAÇÃO COM  
POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME  
TRATADOS COM HIDROXIURÉIA**

Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos.

Aprovada em: 29/04/ 2014

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profª. Dra. Alice Maria Costa Martins  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profª. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profª. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof. Dr. Expedito Rogildo Cordeiro Carlos  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Dedico este trabalho ao meu marido Daniel e aos meus filhos: Bianca e Daniel, presentes que Deus me enviou e que proporciona luz e felicidade para minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Obrigada ao meu bom Deus por estar sempre presente em minha vida.

Obrigada à Professora Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves, minha orientadora, uma pessoa mais do que fundamental para a conclusão deste trabalho, pela sua força, determinação, competência e, principalmente, amizade. Uma pessoa rica não só em conhecimentos, mas também como ser humano de beleza interior inquestionável.

Obrigada aos meus pais, aos meus irmãos e à minha família por sempre estarem presentes em todas as fases da minha vida, presença esta que forma a minha pessoa, o meu caráter e a minha repleta felicidade de viver.

Obrigada ao meu marido, por toda compreensão, apoio irrestrito, força e amor que tem me proporcionado, enriquecendo minha vida ainda mais de felicidades e sucessos.

Obrigada à minha filha, por simplesmente existir, pelo seu amor e por todos os ensinamentos e felicidades que me tem dado.

Obrigada à minha amiga Darcielle Bruna por todo apoio e ajuda que me proporcionou.

Obrigada ao amigo Diego Silva Lima por toda a colaboração e conhecimentos repassados sobre a análise citogenética.

Obrigada a todos os alunos do Laboratório de Hematologia da Universidade Federal do Ceará pela amizade, ajuda, apoio e conhecimentos compartilhados.

Obrigada a todos os doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos pelo apoio e amizade durante esta etapa inesquecível a todos nós.

Obrigada a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos e outros Programas pelos ensinamentos, apoio e formação que me foram proporcionados.

Obrigada aos pacientes, que acreditaram na pesquisa e sem dúvida foram o motivo para o desenvolvimento desse estudo.

Obrigada à Raimundinha, secretária do curso de Pós-Graduação, pela amizade e atenção dispensada durante a realização deste curso.

Obrigada a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

*"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."*

(Martin Luther King)



## RESUMO

**Introdução:** A anemia falciforme é o resultado de uma mutação pontual (GAG→GTG) no códon do gene da globina  $\beta$ , conduzindo a uma substituição de ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia polipeptídica. A Hidroxiuréia (HU) é o quimioterápico considerado como principal agente farmacológico capaz de prevenir as complicações e aumentar a qualidade de vida dos pacientes com anemia falciforme (AF). Embora a HU tenha sido associada com um aumento do risco de neoplasias em alguns pacientes com doenças mieloproliferativas e AF, seu potencial mutagênico e carcinogênico ainda não está bem estabelecido. **Objetivo:** Investigar os níveis de lesão no DNA em leucócitos de sangue periférico e possíveis alterações cromossômicas em células de medula óssea e correlacioná-los com o tratamento com HU e com os polimorfismos genéticos em pacientes com AF em Fortaleza, Ceará. **Metodologia:** Foram analisadas amostras de 41 pacientes com AF. Em um segundo momento, foram selecionados os 10 pacientes que apresentaram os maiores níveis de lesão no DNA. O grupo controle foi composto por 26 indivíduos saudáveis. Todos os pacientes eram adultos e de ambos os sexos. A presença de HbS e a análise dos haplótipos do cluster do gene da beta-globina foram realizadas por meio da técnica da reação em cadeia mediada pela polimerase para polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP); a determinação dos níveis de lesão no DNA foi realizada pelo teste do cometa; e a análise de possíveis alterações cromossômicas foi realizada pela técnica de citogenética por bandeamento G. O nível de significância foi de 0,05 para todos os testes, e os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). **Resultados:** O índice de dano (ID) no grupo dos pacientes com anemia falciforme tratados com hidroxiuréia (AFHU) foi significativamente maior do que no grupo controle ( $p < 0,001$ ). Sexo e idade não foram associados à lesão no DNA nos controles ou pacientes com AFHU. No grupo de pacientes com AFHU, o ID foi significativamente influenciado pelo tempo de tratamento com HU ( $p=0,0039$ ) e índice de massa corporal (IMC) ( $p= 0.001$ ). Pacientes com tempo de tratamento  $\geq 20$  meses e  $IMC \leq 20 \text{ kg/m}^2$  tiveram um ID significativamente maior do que aqueles com tempo de tratamento  $< 20$  meses e  $IMC > 20 \text{ kg/m}^2$ . Nenhuma diferença significativa em relação à dose média diária de HU foi observada sobre o ID ( $p=0,950$ ), contudo pacientes que receberam uma dose de HU  $\geq 20,0 \text{ mg/kg/dia}$  mostraram um maior ID do que aqueles que receberam  $< 20.0 \text{ mg/kg/dia}$ . Além disso, foi observada uma associação entre ID e haplótipos do gene da beta-globina. Os valores de ID para o haplótipo Bantu/Bantu foram maiores

quando comparados ao haplótipo Benin/Benin; e o haplótipo Bantu/Benin teve um menor ID do que o haplótipo Bantu/Bantu e maior do que o haplótipo Benin/Benin. Nenhuma alteração cromossômica foi identificada nos 10 pacientes que apresentaram os maiores níveis lesão no DNA. **Conclusões:** O resultado mostra que a lesão no DNA na AF não está somente associada ao tratamento com HU, mas também a polimorfismos genéticos. Além disso, foi encontrado que a presença de genotoxicidade e polimorfismo genético favorável não significam a presença de mutagenicidade.

**Palavras-chave:** Anemia Falciforme. Hidroxiuréia. Genotoxicidade. Testes de Mutagenicidade. Polimorfismos.

## ABSTRACT

**Introduction:** The sickle cell anemia is the result of a point mutation in the  $\beta$ -globin gene, leading to a substitution of glutamic acid by valine at the sixth position of the polypeptide chain. The Hydroxyurea (HU) is the chemotherapeutic agent considered as the main pharmacologic agent capable of preventing the complications and improving the quality of life of sickle cell anemia (SCA) patients. Although HU has been associated with an increased risk of neoplasia in some patients with myeloproliferative disorders and SCA, the mutagenic and carcinogenic potential of HU has not been established. **Objective:** Investigate the levels of DNA damage in peripheral blood leukocytes and possible chromosomal abnormalities of bone marrow cells and correlate with the therapy with HU and with the genetic polymorphisms in patients with SCA in Fortaleza, Ceara. **Methods:** We analyzed 41 patients with SCA. In a second step, we selected 10 patients who had the highest levels of DNA damage. The control group was composed of 26 healthy individuals. All patients were adults of both sexes. The presence of HbS and the analysis of the haplotypes of the beta S gene cluster were done by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP); to measure levels of DNA damage was done by comet assay; and the analysis of possible chromosomal abnormalities was done by G banding cytogenetics. The significance level was 0.05 for all tests, and data were presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). **Results:** The damage index (DI) in the group of patients with sickle cell anemia treated with hydroxiurea (SCAHU) was significantly higher than in controls ( $p < 0,001$ ). Gender and age were not associated DNA damage in controls or SCAHU patients. In the group of SCAHU patients, DI was significantly influenced by length of HU treatment ( $p=0,0039$ ) and BMI ( $p= 0.001$ ). Patients with length of HU treatment  $\geq 20$  months and BMI  $\leq 20$  kg/m<sup>2</sup> had a significantly greater DI than those with length of HU treatment  $< 20$  months and BMI  $> 20$  kg/m<sup>2</sup>. No influence significant of mean dose of HU was observed on DI ( $p=0,950$ ), however patients who received a mean HU dose  $\geq 20,0$  mg/kg/day showed a higher DI than those who received  $< 20.0$  mg/kg/day. Futhermore, an association was observed between DI damage and beta-globin gene haplotypes. DI values for the Bantu/Bantu haplotype was greater when compared to the Benin/Benin haplotype; and the Bantu/Benin haplotype had a less DI than Bantu/Bantu haplotype and greater than Benin/Benin haplotype. Any chromosomal abnormality was identified in 10 patients who showed higher levels of DNA damage. **Conclusions:** The result shows that the DNA damage in SCA is not only

associated to treatment with HU, but in addition to genetic polymorphisms. Furthermore, was found that the presence of genotoxicity and favorable genetic polymorphism do not mean the presence of mutagenicity.

Keywords: Sickle Cell Anemia. Hydroxyurea. Genotoxicity. Mutagenicity Tests. Polimorphism Genetic.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Estrutura da Hemoglobina normal.....	16
<b>Figura 2.</b>	Representação dos locis dos genes da globina $\alpha$ e dos genes da beta-globina humana. (A) grupo de genes da globina $\alpha$ , localizado no cromossomo 16p13.3. (B) grupo de genes da beta-globina, localizado no cromossomo 11p15.5; as setas indicam o gene da beta-globina expandido, sendo composto por 3 éxons e 2 íntrons, totalizando 1587 pb.....	18
<b>Figura 3.</b>	Representação esquemática da expressão dos genes da globina e principais sítios de produção durante os diferentes períodos do desenvolvimento ontogênico humano .....	19
<b>Figura 4.</b>	Relação entre fenômenos fisiopatológicos e manifestações clínicas nas doenças falciformes .....	24
<b>Figura 5.</b>	Representação esquemática dos sítios hipersensíveis à DNase I e sua localização na região controladora do locus da beta-globina no cromossomo 11.....	29
<b>Figura 6.</b>	O locus da beta-globina e interação com outros loci em populações normais e de adultos com AF.....	30
<b>Figura 7.</b>	Sequência de polimorfismos genéticos localizados no cromossomo 11, com o padrão de clivagem para diferentes endonucleases de restrição .....	31
<b>Figura 8.</b>	Distribuição geográfica dos haplótipos ligados ao gene da globina $\beta^S$ na África e regiões do Oriente Médio.....	32
<b>Figura 9.</b>	Estrutura química da HU.....	36
<b>Figura 10.</b>	ID para cada haplótipo do gene da beta-globina nos pacientes com AFHU.....	57
<b>Figura 11</b>	Citogenética com banda G de um paciente do sexo feminino.....	59
<b>Quadro 1.</b>	Sequência dos oligonucleotídeos e enzimas utilizadas para a detecção dos haplótipos da anemia falciforme; regiões dos sítios polimórficos; tamanho dos fragmentos gerados antes e após clivagem.....	44
<b>Quadro 2.</b>	Padrão de polimorfismos para cada haplótipo.....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Distribuição dos haplótipos, cromossomos e genótipos na população estudada (n=41).....	<b>53</b>
<b>Tabela 2.</b>	Determinação dos haplótipos dos pacientes.....	<b>54</b>
<b>Tabela 3.</b>	Lesão no DNA de acordo com o sexo e idade no grupo controle e nos pacientes com AFHU.....	<b>54</b>
<b>Tabela 4.</b>	Lesão no DNA de acordo com o tempo de tratamento com HU, dose media diária de HU e IMC dos pacientes com AFHU.....	<b>55</b>
<b>Tabela 5.</b>	Lesão no DNA de acordo com os haplótipos do gene da beta-globina e valores de ID segundo o tempo de tratamento com HU, dose media diária de HU e IMC para cada haplótipo nos pacientes com AFHU.....	<b>56</b>
<b>Tabela 6.</b>	Haplótipos, valores de ID e análise citogenética nos pacientes estudados (n=10).....	<b>58</b>

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	A molécula de hemoglobina .....	16
1.2	Hemoglobinopatias .....	19
1.3	Epidemiologia da HbS .....	21
1.4	Anemia falciforme: do defeito molecular às manifestações clínicas .....	22
1.5	Fatores genéticos moduladores da anemia falciforme .....	27
1.6	Distribuição dos haplótipos da anemia falciforme no Brasil .....	33
1.7	Tratamento da Anemia Falciforme.....	34
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
2.1	Objetivos gerais .....	38
2.2	Objetivos específicos .....	38
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
3.1	Considerações éticas.....	40
3.2	Desenho do estudo.....	40
3.3	Casuística.....	40
3.4	Locais do estudo.....	41
3.5	Seleção da amostra.....	41
3.6	Coleta.....	41
3.7	Testes realizados.....	42
3.7.1	Análises moleculares.....	42
3.7.2	Identificação dos níveis de lesão no DNA.....	47
3.7.3	Análise de alterações cromossômicas.....	49
3.8	Análises estatísticas.....	49
4	<b>RESULTADOS</b> .....	52
4.1	Características gerais dos pacientes estudados.....	53
4.2	Distribuição e determinação dos haplótipos do gene da beta-globina.....	53
4.3	Valores de ID dos pacientes e dos controles e a correlação com o sexo e idade.....	54
4.4	Valores de ID e sua correlação com o tempo de tratamento com HU, dose média diária de HU e IMC dos pacientes com AFHU.....	55
4.5	Valores de ID dos pacientes e a associação entre os haplótipos do gene da beta-globina.....	56
4.6	Perfil dos pacientes selecionados para análise de alterações cromossômicas.....	58

4.7	Determinação dos haplótipos do gene da beta-globina, valores de ID e resultados da análise de alterações cromossômicas .....	58
4.8	Análise de alterações cromossômicas por citogenética por bandeamento G.....	59
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	60
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	68
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	70
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	72
	<b>ANEXOS</b> .....	87
	<b>ANEXO A - Termo de consentimento (primeira etapa)</b> .....	88
	<b>ANEXO B - Termo de consentimento (segunda etapa)</b> .....	90



# INTRODUÇÃO

---

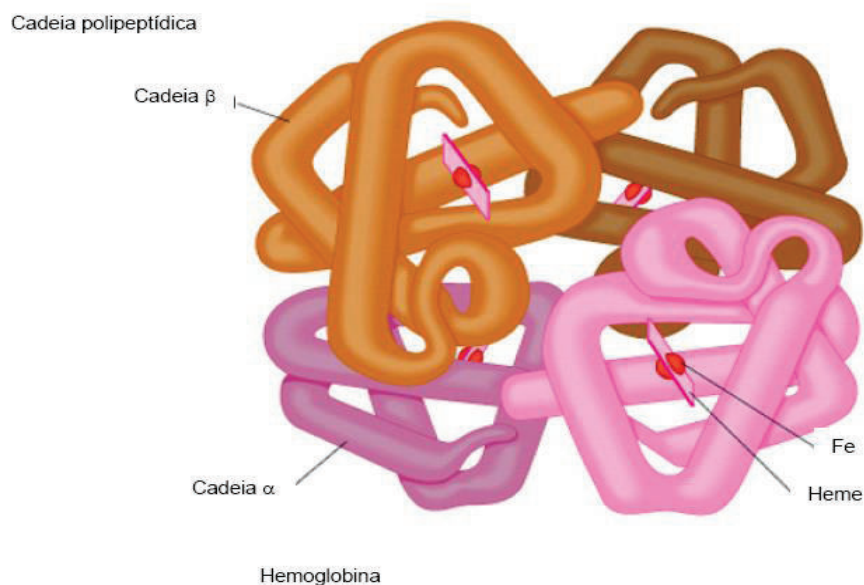
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A molécula de hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma proteína com peso molecular aproximado de 64 kilodáltons (KD), representando 95% das proteínas dos eritrócitos. Sua principal função é a absorção, o transporte e a distribuição de oxigênio para os diversos tecidos do organismo (BUNN; FORGET, 1986; MACKA; KATOA, 2006).

A molécula de hemoglobina é formada por quatro subunidades, sendo cada subunidade composta por uma cadeia polipeptídica, denominada globina, e um grupo heme (Figura 1). O grupo heme é formado pelo complexo ferro-protoporfirina IX, sendo o átomo de ferro o sítio de ligação com o oxigênio, portanto cada molécula de hemoglobina é capaz de combinar-se com quatro moléculas de oxigênio. As cadeias globínicas se agrupam normalmente em pares, de acordo com o tipo de hemoglobina, sendo um par denominado de cadeias alfa ( $\alpha$ - alfa,  $\zeta$ - zeta) e outro de cadeias beta ( $\beta$ -beta,  $\delta$ -delta,  $\gamma$ -gama,  $\epsilon$ -épsilon). As cadeias das globinas alfa possuem uma sequência de 141 aminoácidos e as cadeias das globinas beta uma sequência de 146 aminoácidos. Combinações entre as cadeias globínicas dão origem às diferentes hemoglobinas presentes nos eritrócitos, desde o período embrionário até a fase adulta, sendo produzidas no decorrer das etapas do desenvolvimento humano (BUNN; FORGET, 1986; WEATHERALL; PROVAN, 2000; MARENGO-ROWE, 2006).

**Figura 1-** Estrutura da Hemoglobina normal.



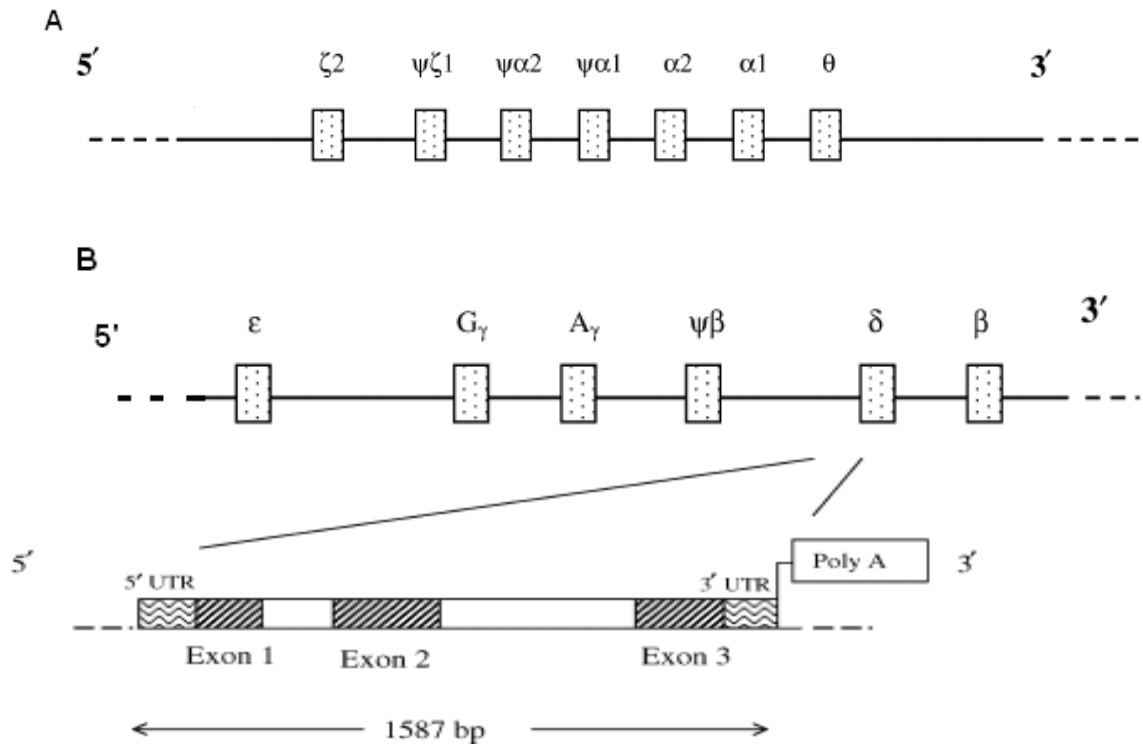
Fonte: Silva *et al.*, 2006.

A gênese das cadeias globínicas é regulada por agrupamentos (*clusters*) de genes nos cromossomos 11 e 16 (Figura 2). Os genes das globinas  $\alpha$  estão localizados em um segmento de DNA de 40 kilobases (Kb) no braço curto do cromossomo 16. Os genes das globinas  $\beta$  estão localizados em um segmento de DNA de 60 kb no braço curto do cromossomo 11. A organização dos genes nos cromossomos 11 segue a mesma ordem em que são expressos nos períodos embrionário, fetal e adulto. O conjunto de todos estes genes é o resultado da duplicação de um gene primordial que existiu a aproximadamente 500 milhões de anos, sendo provavelmente resultado de uma diferenciação posterior ao longo do processo evolutivo (STEINBERG; BENZ JUNIOR, 1995; HARDISON, 2001).

O grupo de genes  $\alpha$  é constituído pelos genes  $\alpha^1$  e  $\alpha^2$ , que diferem apenas no segundo íntron; pseudogenes  $\alpha$  ( $\psi \alpha^1$  e  $\psi \alpha^2$ ); gene  $\zeta^2$ ; pseudogene  $\zeta$  ( $\psi \zeta^1$ ) e gene  $\Theta^1$  (teta) (Figura 2A). Os pseudogenes, apesar de apresentarem uma estrutura similar aos seus genes correspondentes, não expressam cadeias polipeptídicas; e o gene  $\Theta$ , até o presente momento, não está associado à expressão de hemoglobina funcional (STEINBERG; BENZ JUNIOR, 1995; WEATHERALL; PROVAN, 2000)

O grupo de genes  $\beta$  é constituído pelo gene  $\epsilon$ , genes  $\gamma$  ( $\gamma^A$  e  $\gamma^G$ ), pseudogene  $\beta$  ( $\psi \beta$ ) e os genes  $\delta$  e  $\beta$  (Figura 2B). As cadeias polipeptídicas decorrentes da expressão do gene  $\gamma$ , devido a mecanismos de duplicação e conversão gênica, diferem no aminoácido da posição 136, podendo ser uma glicina ( $\gamma^G$ ) ou alanina ( $\gamma^A$ ) (STAMATOYANNOPOULOS; NIENHUIS, 1994; WEATHERALL; PROVAN, 2000; NAGEL; STEINBERG, 2001).

**Figura 2-** Representação dos locis dos genes da globina  $\alpha$  e dos genes da beta-globina humana.



(A) grupo de genes da globina  $\alpha$ , localizado no cromossomo 16p13.3.

**Fonte:** Weatherall e Provan, 2000.

(B) grupo de genes da beta-globina, localizado no cromossomo 11p15.5; as setas indicam o gene da beta-globina expandido, sendo composto por 3 éxons e 2 íntrons, totalizando 1587 pb.

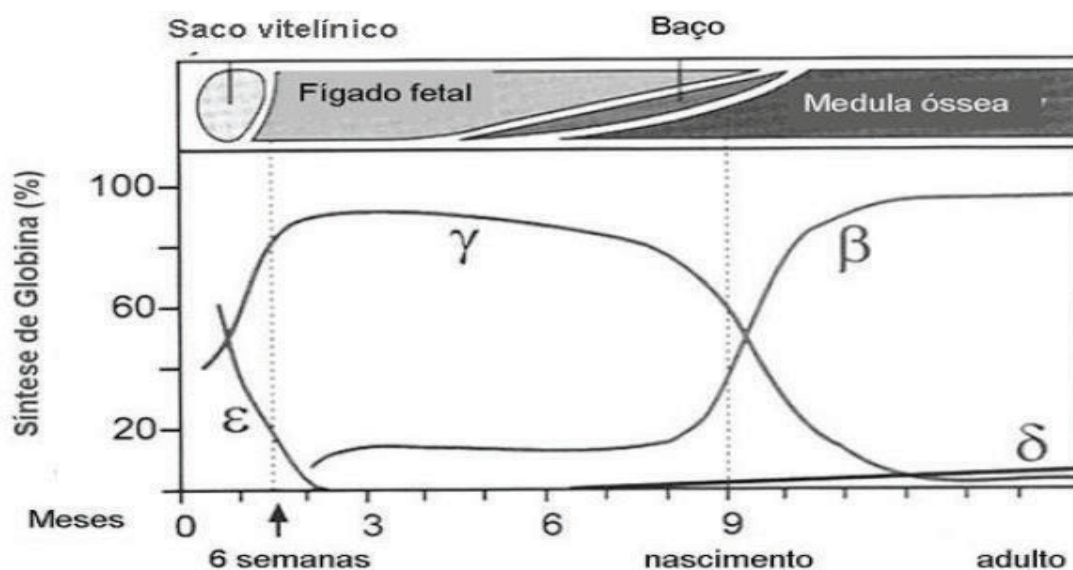
**Fonte:** Clark e Thein, 2004.

A regulação da expressão dos genes da globina envolve mecanismos sequenciais de ativação e inativação, resultando na síntese das diferentes cadeias globínicas. Os mecanismos de regulação ainda estão sendo estudados, mas alguns trabalhos demonstram que as interações de fatores transcricionais em estágios específicos, a região controladora do locus (LCR) no grupo de genes  $\beta$ , a presença de sítios hipersensíveis à DNase I (HS-40) no grupo de genes  $\alpha$ , as sequências cis que atuam positiva ou negativamente na regulação da transcrição e os fatores de transcrição eritróides ou não-eritróides possam estar envolvidos (NAGEL;

STEINBERG, 2001; STAMATOYANNOPOULOS, 2005; BANK, 2006; MAHAJAN; WEISSMAN, 2006; ADORNO *et al.*, 2008a).

Diferentes hemoglobinas foram identificadas durante o processo de desenvolvimento ontogênico humano, sendo que as hemoglobinas Gower 1 ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), Gower 2 ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) e Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) são encontradas somente nos primeiros estágios da embriogênese, por um período de até três meses do início da evolução gestacional; a hemoglobina fetal (HbF) ( $\alpha_2\gamma_2$ ) é produzida na vida intra-uterina, decaindo logo após os seis meses de vida, apresentando quantidades menores que 2 % no adulto normal; e as hemoglobinas A<sub>1</sub>( $\alpha_2\beta_2$ ) e A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) estão presentes na vida adulta, alcançando níveis médios de 97% e 3,5%, respectivamente (Figura 3). As proporções entre as cadeias  $\gamma^G / \gamma^A$  da HbF é de 70/30 no período fetal e 40/60 na vida adulta (WEATHERALL; PROVAN, 2000; NAGEL; STEINBERG, 2001).

**Figura 3-** Representação esquemática da expressão dos genes da globina e principais sítios de produção durante os diferentes períodos do desenvolvimento ontogênico humano.



Fonte: Steinberg, 2001.

## 1.2 Hemoglobinopatias

A herança do intenso processo de miscigenação ocorrido no Brasil refletiu nos aspectos culturais, sociais e gênicos da população. Dentre as várias características herdadas, estão as modificações ou mutações gênicas que podem resultar em doenças. Como exemplo

pode-se citar as hemoglobinopatias, que constituem uma das principais e mais frequentes doenças genéticas que acomete os seres humanos (DI NUZZO; FONSECA, 2004; SILVA FILHO *et al.*, 2005).

As hemoglobinopatias são um grupo de doenças genéticas, caracterizadas por alterações na porção protéica da molécula de hemoglobina. Estas alterações são classificadas como estruturais ou de síntese. As alterações estruturais incluem substituição, deleção e inserção de um ou mais aminoácidos, além da fusão de duas cadeias polipeptídicas. As alterações de síntese de hemoglobina, denominadas talassemias, envolvem a redução ou ausência de síntese de um ou mais tipos de cadeias polipeptídicas, dependendo do mecanismo e genótipo envolvido (BUNN, 1997; WEATHERALL; PROVAN, 2000).

Existem aproximadamente 1.594 variantes de hemoglobina descritas no mundo inteiro (GLOBIN GENE SERVER, 2014). Entre as hemoglobinas variantes mais frequentes encontram-se as hemoglobinas S, C, D e E (BUNN, 1997; WEATHERALL; PROVAN, 2000; OLD, 2003). Segundo o Boletim da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças da hemoglobina estão atualmente presentes em 71% de 229 países do mundo. Estima-se que 5% da população mundial seja portadora dos genes da hemoglobina S (HbS) e de talassemias (MODELL; DARLISON, 2008).

O grupo de alterações genéticas caracterizadas pelo predomínio da HbS denomina-se Doença Falciforme (DF), que inclui: a anemia falciforme (HbSS), as interações com talassemias (S/  $\beta^0$  talassemia e S/  $\beta^+$  talassemia) e a associação com outras variantes de hemoglobina (HbSC, HbSD). Traço falcêmico é a denominação dada a indivíduos heterozigotos para a hemoglobina S (AS) (BONINI-DOMINGOS, 2006).

Os indivíduos heterozigotos para a HbS (AS) possuem hemácias com aproximadamente 20 a 45% da hemoglobina variante e são geralmente assintomáticos; os homozigotos (SS) possuem hemácias contendo 80% ou mais de HbS, sendo portadores de anemia hemolítica crônica grave, acompanhada por manifestações clínicas variáveis (CHANG *et al.*, 1997; WEATHERALL; PROVAN, 2000).

### 1.3 Epidemiologia da HbS

A HbS possui distribuição mundial, sendo mais frequente na África, Oriente Médio, Sul da Europa, Índia, Paquistão, América do Sul e Caribe (METCALFE *et al.*, 2007). A África possui a maior frequência da hemoglobina variante, principalmente na região Centro-Ocidental, Atlântico-Occidental e Sul (COSTA, 2001).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a cada ano nasçam 300 mil crianças com DF; entre estas, somente na África nascem 200 mil crianças com a forma mais grave, a AF (BRASIL, 2009).

No Brasil, segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) do Ministério da Saúde, nascem 3.500 crianças por ano com DF e 200.000 com traço falciforme. Estima-se que 7.200.000 pessoas sejam portadoras do traço falcêmico e entre 25.000 a 30.000 possuam DF (BRASIL, 2008; FELIX; SOUZA; RIBEIRO, 2010).

O maior estudo de prevalência e distribuição de hemoglobinopatias realizado no Brasil, em 1987, indicou que 3,08% dos 55.217 indivíduos analisados apresentavam padrões de hemoglobina alterados, e destes, 2,49% eram variantes estruturais. Os indivíduos que apresentavam HbAS representaram 60,95% do total dos portadores de hemoglobinopatias, enquanto que a condição HbAC foi detectada em 14,27% dos casos e a frequência de HbSS foi de 0,04% (NAOUM *et al.*, 1987).

O gene  $\beta^S$  apresenta distribuição heterogênea entre os diferentes estados brasileiros, variando de acordo com a região estudada. Estudos de triagem neonatal para hemoglobinopatias foram realizados, principalmente, nas regiões Sudeste, Sul e Nordeste do país.

Na região Sudeste, Ducatti *et al.* (2001) encontraram a presença de 3,7% de traço falcêmico em 913 amostras de recém-nascidos em São José do Rio Preto; Brandelise *et al.* (2004) descreveram a prevalência de 0,02% para a DF (SS e SC) ao estudarem 281.884 recém-nascidos durante o programa de triagem neonatal em Campinas. No estado do Rio de Janeiro, foi observada a presença de 4,7% de traço falcêmico em um estudo com 99.260 recém-nascidos (LOBO *et al.*, 2003). No estado de Minas Gerais, o programa de triagem neonatal detectou um caso (0,06%) de DF para cada 1.591 nascimentos (SERJEANT, 2000).

Na região Sul do Brasil, em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, foi encontrado apenas um caso (0,0008%) de AF e 1,14% de traço falcêmico em 117.320 recém-nascidos (SOMMER *et al.*, 2006). Daudt *et al.* (2002) encontraram 1,2% do gene S entre recém-nascidos de Porto Alegre. A prevalência da AF no estado do Paraná, determinada pelas amostras das crianças que se submeteram ao "teste do pezinho", foi de 2,2% em cada 100.000 nascidos vivos (WATANABE *et al.*, 2008).

Na região Nordeste, Bandeira *et al.* (1999) descreveram a frequência de 5,1% para o traço falcêmico e de 0,2% para a DF em 1.988 recém-nascidos no estado de Pernambuco; em Natal, Rio Grande do Norte, Araújo *et al.* (2004) encontraram 1,5% de recém-nascidos com traço falcêmico e 0,05% de portadores da AF. No estado da Bahia, onde se encontra uma significativa heterogeneidade genética, Adorno *et al.* (2005) descreveram a frequência de 9,8% de traço falcêmico, 0,9% de heterozigotos duplos SC e 0,2% de portadores da AF em recém-nascidos de uma maternidade pública da cidade de Salvador-BA; Silva *et al.* (2006), em um estudo de triagem neonatal na região do Recôncavo Baiano, descreveram que entre 9,5 e 11,4% dos recém-nascidos são portadores de hemoglobina S. Em Fortaleza, Pinheiro *et al.* (2006) encontraram a prevalência de 4,1% de portadores de HbS em 389 amostras de recém-nascidos.

Analisando as pesquisas realizadas nas diferentes regiões do Brasil, a HbS é mais frequente na região Nordeste, o que corrobora com os dados do Ministério da Saúde (ZAGO, 2002). É conhecido que a presença da hemoglobina variante está relacionada com o componente afro-descendente e, segundo dados do IBGE, o Nordeste é a região que possui a maior população de descendentes negros, quando somados o número de indivíduos pretos e pardos (Mapa da Distribuição Espacial da População, segundo a cor ou raça – Pretos e Pardos - IBGE, 2010).

#### **1.4 Anemia falciforme: do defeito molecular às manifestações clínicas**

A AF é caracterizada pela homozigose da hemoglobina S (SS) (BONINI-DOMINGOS, 2006), em decorrência de uma mutação pontual ( $G\text{A}G \rightarrow G\text{T}G$ ) no códon do gene da globina  $\beta$ , conduzindo a substituição de um ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia polipeptídica. A hemácia contendo a HbS pode sofrer polimerização em tensões diminuídas de oxigênio, formando estruturas filamentosas que se depositam no interior da mesma, modificando sua forma e tornando-as falciformes. O fenômeno de

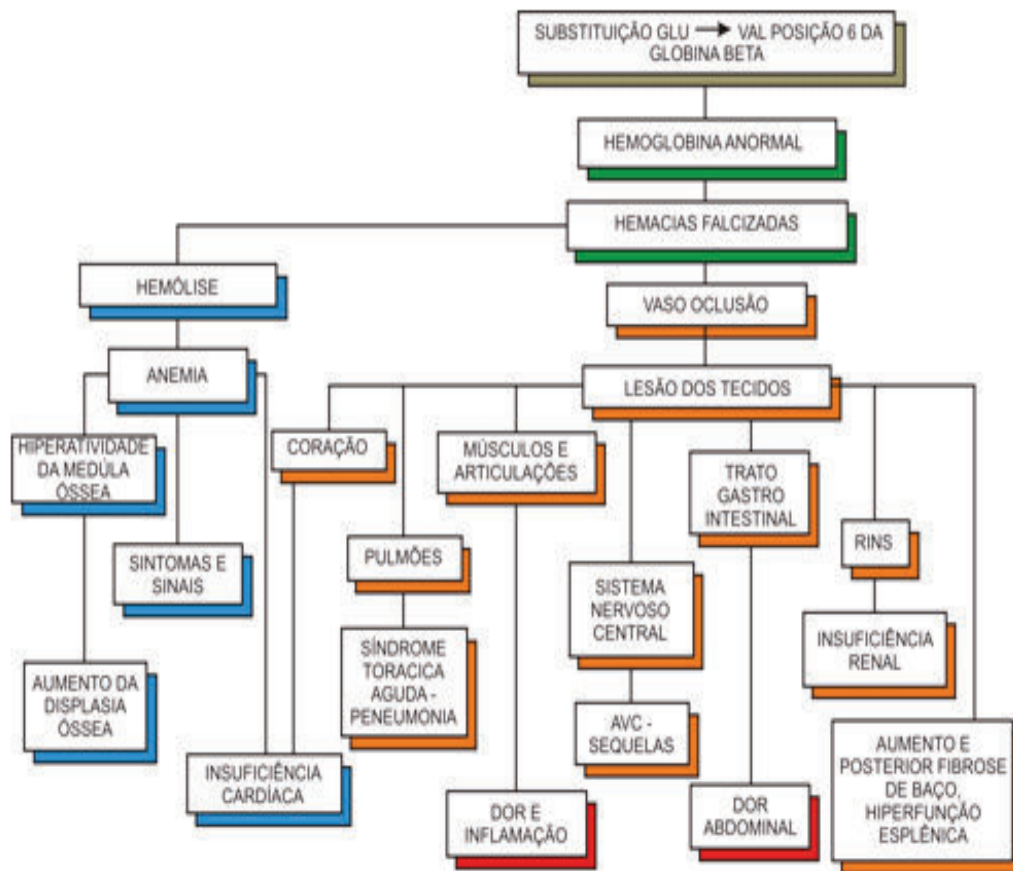


falcização pode ser revertido quando concentrações elevadas de oxigênio são novamente atingidos, sendo que falcizações sucessivas alteram a estrutura da membrana da hemácia, favorecendo a formação de células irreversivelmente falcizadas (CHANG *et al.*, 1997; GONÇALVES *et al.*, 2003).

A primeira descrição de hemácias falciformes foi devido à observação de células alongadas e em forma de “foice” no sangue periférico de um paciente anêmico da Índia, pelo médico Robert Herrick, em Chicago, no ano de 1910 (MARENCO-ROWE, 2006).

A formação de polímeros de HbS no interior das hemácias acarreta múltiplas alterações na célula, tais como o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular e de membrana, a formação de polímeros da Hb com proteínas da membrana e a exposição de moléculas de adesão da membrana celular, entre outras. Além disso, essas alterações são responsáveis por modular vários processos na doença, tais como o inflamatório crônico, dano endotelial, aumento do estresse oxidativo e o estado de hipercoagulabilidade, através do aumento da adesão de hemácias ao endotélio, desencadeando fenômenos inflamatórios que alteram também os granulócitos e as plaquetas; enrijecem a membrana da hemácia, encurtando sua sobrevivência na circulação; promovem lesões microvasculares; causam uma depleção de óxido nítrico (NO), que contribui para vasoconstrição, ativação da inflamação e ativação da cascata da coagulação. Toda a cadeia de alterações que ocorrem nas moléculas, células, tecidos e órgãos do paciente com AF ligam o defeito molecular às manifestações clínicas da doença (Figura 4) (ZAGO; PINTO, 2007).

**Figura 4-** Relação entre fenômenos fisiopatológicos e manifestações clínicas no paciente com anemia falciforme.



**Fonte:** Zago e Pinto, 2007.

Os pacientes com AF possuem um quadro clínico heterogêneo. Alguns pacientes apresentam evolução clínica desfavorável; com retardo no crescimento e desenvolvimento, além de alterações em vários órgãos, que são provenientes da hemólise contínua e dos fenômenos de vaso-oclusão ocorridos durante o curso da doença; enquanto outros apresentam evolução menos grave (BUNN; FORGET, 1986; WEATHERALL; PROVAN, 2000; SILVA *et al.*, 2009a; SILVA *et al.*, 2010).

A heterogeneidade clínica da doença tem sido relacionada a fatores adquiridos e genéticos. Entre os fatores adquiridos destaca-se o nível sócioeconômico, com as consequentes variações nas qualidades de alimentação, prevenção de infecções e assistência médica (ZAGO, 2002; ZAGO; PINTO, 2007). Entre os fatores genéticos estão as variações na

concentração de HbF, o tipo de haplótipo associado ao gene da HbS e a co-existência de alfa-talassemia (STEINBERG, 2001; ZAGO, 2002; SILVA *et.al.*, 2009a; SILVA *et al.*, 2010).

Entre as manifestações clínicas mais frequentes da doença estão à anemia, úlceras de perna, crises aplásticas, sequestro esplênico, crises álgicas, síndrome torácica aguda (STA), acidente vascular cerebral (AVC), alterações pulmonares e oftalmológicas, priapismo, retardo no crescimento e desenvolvimento, suscetibilidade aumentada a infecções e alterações em vários órgãos (WEATHERALL; PROVAN, 2000; STUART; NAGEL, 2004).

A principal causa da anemia nesses pacientes é a de natureza hemolítica, outros fatores podem contribuir para a gênese da anemia ou agravá-la, como a carência de folato, insuficiência renal, crises aplásticas e esplenomegalia, que também podem ocorrer no curso da doença. Embora a maioria dos pacientes com AF tenham autoesplenectomia em virtude dos repetidos episódios de enfartes esplênicos, a preservação do baço é mais frequente nos pacientes que receberam transfusões irregularmente durante a infância (ZAGO; PINTO, 2007).

Os sintomas e conseqüências da anemia fazem parte da evolução da doença, podendo ser associada com o retardo da maturação sexual, com a sobrecarga cardíaca e insuficiência cardíaca na terceira década de vida, além do aparecimento de úlceras de perna (ZAGO; PINTO, 2007).

As crises aplásticas são mais frequentes nos primeiros anos de vida e são causadas por infecção por parvovírus B19, que apresentam citotoxicidade principalmente aos precursores eritróides. Em indivíduos normais, a aplasia transitória produzida pela infecção viral passa despercebida, pois resulta em queda discreta da concentração de hemoglobina, no entanto, nos pacientes com AF, a supressão da eritropoese por alguns dias é suficiente para agravar acentuadamente a anemia (BORSATO *et al.*, 2000; STUART; NAGEL, 2004; YOUNG; BROWN, 2004; ZAGO; PINTO, 2007).

O sequestro esplênico é mais frequente nos dois primeiros anos de vida, sendo caracterizado pelo aumento do baço, diminuição da concentração de hemoglobina e reticulocitose, podendo acarretar um colapso circulatório que pode conduzir a óbito por anemia e choque hipovolêmico (STUART; NAGEL, 2004). Quando ocorrem numerosos enfartes, levando à fibrose e desaparecimento do baço nos primeiros 2-5 anos de vida, o que

pode ser precedido de perda da função (asplenia funcional), há um aumento do risco de infecções graves, especialmente por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e *Klebsiella* sp., entre outros, que podem acarretar meningites ou septicemias graves associadas a elevada mortalidade. Essa é a principal causa de óbito na AF dos pacientes na primeira infância. O uso de medidas profiláticas como vacinas antipneumocócicas e profilaxia com penicilina reduziram drasticamente o óbito das crianças com a doença (ZAGO; PINTO, 2007).

A dor no paciente falciforme pode ser aguda ou crônica. A abordagem da dor crônica é mais complexa, principalmente porque na maioria das situações não há uma causa única que pode ser tratada. Geralmente está associada à necrose asséptica da cabeça do úmero ou do fêmur, causada pela isquemia óssea crônica em locais pouco vascularizados. Os eventos de dor aguda se desenvolvem de forma bastante heterogênea e correspondem às manifestações clínicas mais comuns da AF, sendo associados à isquemia tecidual aguda causada por vaso-occlusão. A topografia mais frequentemente relatada abrange membros inferiores e superiores (ZAGO; PINTO, 2007).

Os episódios de dor e inchaço dos pés e das mãos (dactilite) correspondem a um processo inflamatório iniciado por necrose da medula óssea nas porções distais dos membros, sendo mais frequente nos dois primeiros anos de vida, pois com o crescimento a medula óssea dessa região é substituída por medula gordurosa e a manifestação não mais ocorre. Após esse período, a interrupção de fluxo sanguíneo nas extremidades de ossos grandes e estruturas periarticulares favorecem o desenvolvimento de crises de dor, principalmente na tíbia, úmero e fêmur. Crises de dor abdominal são frequentemente atribuídas a pequenos infartos de mesentério (COSTA, 2001; ZAGO; PINTO, 2007).

A STA está associada a um elevado índice de mortalidade entre os portadores da doença, sendo caracterizada por febre, dispnéia, dor no peito, leucocitose e infiltrado pulmonar (KLINGS *et al.*, 2006; ZAGO; PINTO, 2007). Envolve episódios de vaso-occlusão e infecção, que estão na maioria das vezes combinados. Há evidências de que em muitos desses casos ocorram infecções primárias ou secundárias por *Mycoplasma*, *Legionella* e *Chlamidia*, embora muitas vezes as culturas de escarro e hemoculturas para bactérias resultem negativas (ZAGO; PINTO, 2007). A complicação é geralmente precedida ou acompanhada de dor em 10% a 25% dos pacientes quando ocorre até a idade de 10 anos, e em menos de 5% dos pacientes após essa idade; por outro lado, 5% a 25% dos pacientes do primeiro grupo têm

febre, em comparação com cerca de 50% dos pacientes mais velhos (VICHINSKY *et al.*, 1997).

O AVC é uma complicação também grave que pode afetar pacientes com AF e está associado à elevada mortalidade, principalmente em crianças entre 2 e 5 anos de idade, com redução de incidência entre 10 e 19 anos. Alguns fatores de risco estão relacionados à ocorrência de AVC, como concentrações diminuídas de hemoglobina total e de HbF, leucocitose, hipertensão, ocorrência prévia de acidente isquêmico transitório e de STA (BUCHANAN *et al.*, 2004; STUART; NAGEL, 2004).

A evolução da AF é marcada por um amplo espectro de complicações clínicas, que atingem a maioria dos órgãos. Algumas dessas complicações não reduzem a expectativa de vida do paciente, embora possam comprometer consideravelmente a qualidade de vida, tais como: úlceras de pernas, retinopatia, necrose óssea, especialmente da cabeça do fêmur, e cálculos de vesícula. Outras alterações, no entanto, comprometem a função de órgãos vitais e estão diretamente associadas a risco de vida, destacando-se as infecções, as complicações cardiorrespiratórias, a STA, a insuficiência renal e o AVC (HEENEY, 2005).

Algumas das manifestações têm uma acentuada predominância ou estão limitadas a uma faixa etária, sendo que os mecanismos nem sempre são evidentes. A insuficiência cardíaca, a insuficiência renal e a retinopatia são manifestações tipicamente tardias, pois exigem uma longa evolução da lesão tissular para se manifestarem. Da mesma forma, os cálculos biliares acumulam-se após vários anos de hemólise crônica e excreção aumentada de bilirrubinas (HEENEY, 2005). Por outro lado, a dactilite limita-se aos primeiros anos de vida (ZAGO; PINTO, 2007).

### **1.5 Fatores genéticos moduladores da Anemia Falciforme**

Embora o mecanismo dos processos que influenciam a polimerização da HbS estejam bem caracterizados, a explicação para a heterogeneidade fenotípica e a ampla variabilidade clínica da AF permanece um mistério. Vários são os fatores identificados como moduladores da clínica da AF, entre eles estão a concentração de HbF, grupos de haplótipos da beta-globina e a coexistência de alfa-talassemia (STEINBERG, 2001; ZAGO, 2002; FIGUEIREDO, 2007; LETTRE *et al.*, 2008; ADORNO *et al.*, 2008a ; SILVA *et al.*, 2009a;

SILVA *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012; BANDEIRA *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2013).

### **Hemoglobina fetal**

A HbF inibe a polimerização da HbS devido a formação de um híbrido assimétrico, que é composto por cadeias polipeptídicas das duas hemoglobinas ( $\alpha_2\beta^S\gamma$ ) (STUART; NAGEL, 2004). O híbrido formado entre a HbS/HbF possui maior estabilidade quando constituído pelas cadeias  $\gamma^G$  do que pelas cadeias  $\gamma^A$ . A presença da alanina na posição 136 da cadeia  $\gamma$  parece interferir com a interação entre as cadeias  $\gamma$  e  $\beta^S$ , diminuindo o efeito na prevenção da polimerização da HbS (BHAUMIK, 1994).

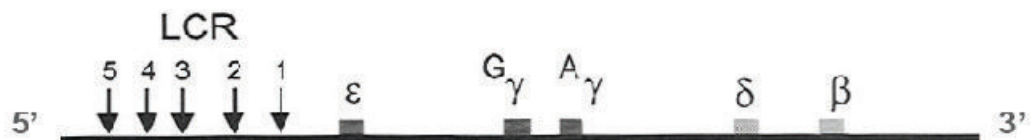
A HbF é um dos moduladores do fenótipo clínico da AF (FIGUEIREDO, 2007; SILVA *et al.*, 2009a). O aumento dos níveis de HbF está associado à redução da morbidade e mortalidade da doença (STEINBERG *et al.*, 2003). Atualmente diversos agentes citotóxicos, como a hidroxiuréia (HU), têm sido utilizados e amplamente estudados no tratamento da AF, pois estimulam a síntese de HbF (STEINBERG, 2001; FRANCESCHI; CORROCHER, 2004; STUART; NAGEL, 2004; PLATT, 2008).

A concentração de HbF é geneticamente controlada. Os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina  $\beta$  e alterações na região controladora do locus (LCR) da globina  $\beta$  são importantes fatores que podem alterar a concentração de HbF, além desses, estão sendo recentemente estudados diferentes SNPs (polimorfismos de nucleotídeos simples) que parecem ser determinantes na regulação dessa hemoglobina (FIGUEIREDO, 2007; THEIN *et al.*, 2009; GALARNEAU *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010).

Os haplótipos podem refletir variações polimórficas em elementos cis regulatórios, os quais podem alterar a ligação de proteínas que ativam ou inibem a transcrição de um gene, modificando o balanço recíproco entre a expressão dos genes  $\beta^S$  e  $\gamma$ . Uma das variações de elementos cis é a ocorrência do polimorfismo C-T, localizado na posição -158 da região promotora do gene  $\gamma^G$  (-158C-T $\gamma^G$ ), presente nos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano, sendo fortemente relacionado a níveis elevados de HbF, expressão aumentada do gene  $\gamma^G$ , quando comparado ao gene  $\gamma^A$  e, conseqüentemente, menor gravidade das manifestações clínicas (STUART; NAGEL, 2004; STEINBERG, 2005; STEINBERG; ADEWOYE, 2006).

A região controladora do locus (LCR) da globina  $\beta$  compreende uma série de cinco sítios hipersensíveis a ação da DNase I (HS-1 a HS-5), presentes entre 6 a 18 Kb na posição 5' antes do gene  $\epsilon$ , que desempenham papel importante na expressão específica de tecidos e de genes do grupo da globina  $\beta$  (STEINBERG; BENZ JUNIOR, 1995). Cada um dos sítios contém diferentes combinações de domínios conservados, onde ocorre a ligação de proteínas que influenciam o processo de transcrição. Alterações nas sequências destes domínios podem conduzir a ligações que modificam a expressão destes genes. Entre os sítios, o HS-2 é o que possui maior evidência de associação com os níveis elevados de HbF descritos em pacientes com AF (Figura 5)(STEINBERG; BENZ JUNIOR, 1995; STEINBERG, 2001; ADORNO *et al.*, 2008a).

**Figura 5-** Representação esquemática dos sítios hipersensíveis à DNase I e sua localização na região controladora do locus da beta-globina no cromossomo 11.

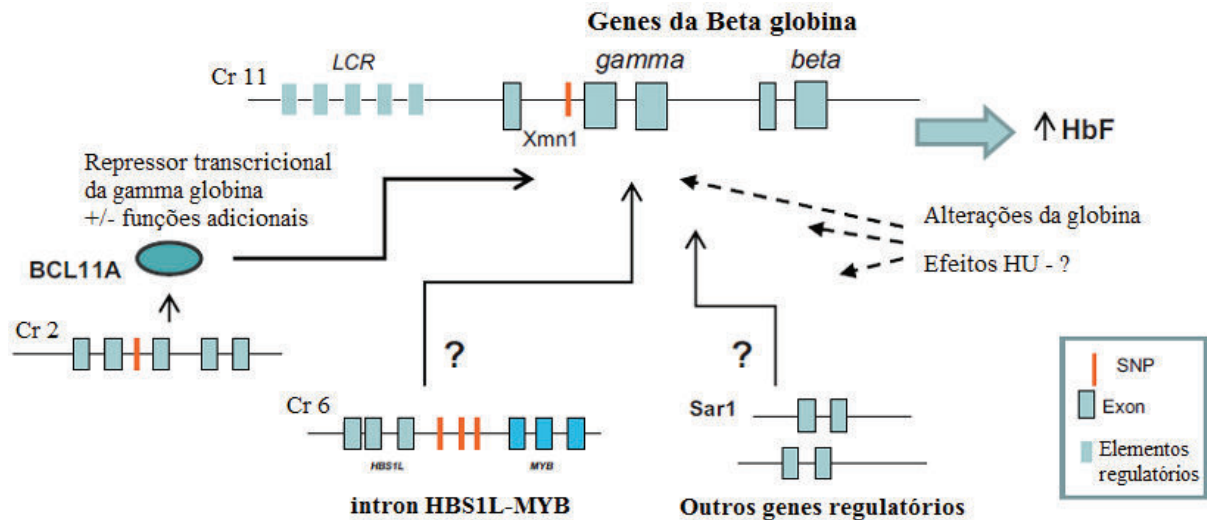


Fonte: Nagel e Steinberg, 2001.

Os diferentes SNPs determinantes na regulação da HbF foram determinados através dos estudos de associação em todo o genoma, o qual revelou forte associação de SNPs em três diferentes genes ou locus gênicos com a expressão de HbF: Xmn1-HBG2, HBS1L-MYB, e BCL11A (Figura 6) (GREEN; BARRAL, 2011).



**Figura 6** - O locus da beta-globina e interação com outros loci em populações normais e de adultos com AF.



Fonte: Green e Barral, 2011.

As variantes intrônicas dos SNPs nos genes estão associadas a maior ou menor produção de HbF. Desta forma, os SNPs regulam a expressão de HbF modificando a globina através de uma mutação estrutural que afeta a cinética de crescimento e a diferenciação dos glóbulos vermelhos (THEIN *et al.*, 2009).

### Haplótipos ligados ao grupo de genes da beta-globina

É bem conhecido que os indivíduos são geneticamente diferentes e que algumas das diferenças entre as pessoas representam mudanças genéticas patológicas. Entretanto, muito provavelmente, podem representar variações silenciosas no DNA. Tais variações, também designadas como comuns ou neutras, são denominadas de polimorfismos do DNA (ANTONARAKIS; KAZAZIAN; ORKIN, 1985).

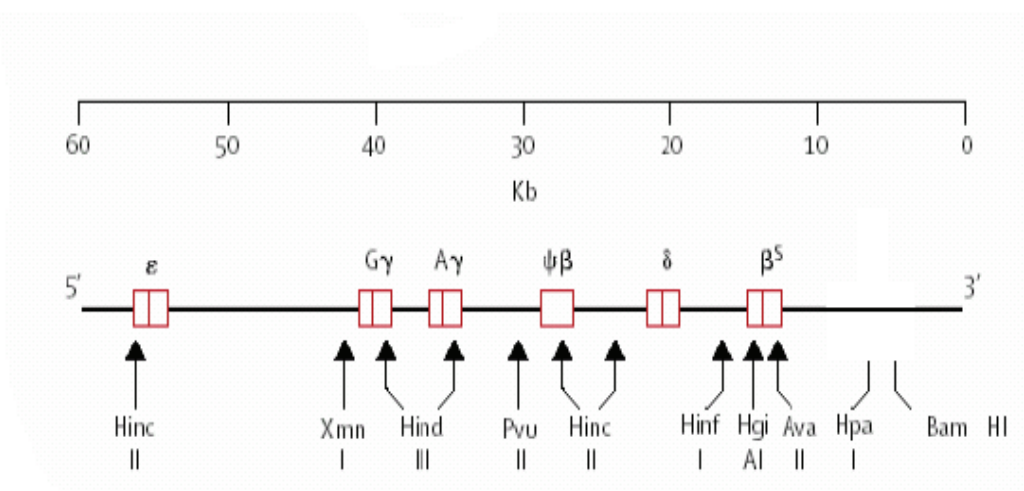
O tipo de variabilidade mais comum no complexo gênico da globina beta é aquele produzido por variações de sequências que alteram o sítio de reconhecimento de uma enzima de restrição. Usando uma série de enzimas de restrição, que identificam alterações específicas no DNA, é possível identificar a constituição das regiões adjacentes ao locus beta. O padrão de combinação dos sítios polimórficos para qualquer cromossomo é chamado de haplótipo (ANTONARAKIS; KAZAZIAN; ORKIN, 1985).



O primeiro polimorfismo associado ao gene  $\beta^S$  foi descrito por Kan e Dozy em 1978, no sítio para a enzima de restrição Hpa I, localizado na posição 3' do gene, seguindo-se novas descrições de outros sítios de polimorfismos de restrição (Figura 7). Mais de duas dezenas de sítios polimórficos foram descritos no complexo dos genes da globina beta (ANTONARAKIS; KAZAZIAN; ORKIN, 1985).

A descoberta dos haplótipos do gene  $\beta^S$  apresentou um importante elemento de análise antropológica para estudo das composições populacionais, bem como elementos de estudo clínico, os quais podem fornecer dados preditivos acerca da evolução da doença e seu nível de gravidade (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

**Figura 7-** Sequência de polimorfismos genéticos localizados no cromossomo 11, com o padrão de clivagem para diferentes endonucleases de restrição.



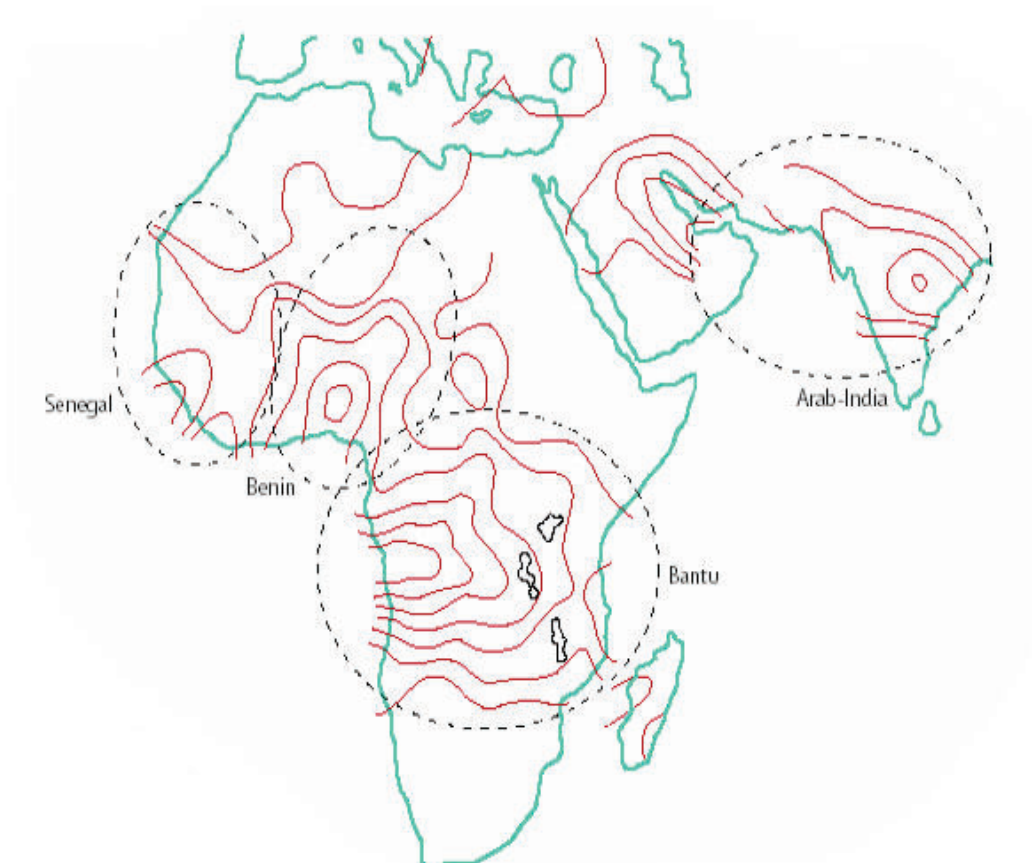
**Fonte:** Stuart e Nagel, 2004.

Os haplótipos da AF têm sido relatados em diferentes regiões do mundo. São classificados em cinco tipos diferentes, de acordo com a origem étnica e geográfica onde predominam. O haplótipo Benin tem sido associado à África Ocidental; o Bantu à África Oriental e Centro-Sul; o Senegal à África Atlântico-Occidental; o Árabe-Indiano à Índia e Península Arábica e o Camarões à Costa Ocidental Africana (Figura 8) (NAGEL, 1984; SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989; GONÇALVES *et al.*, 2003).

A maioria dos cromossomos com o gene  $\beta^S$  tem um dos cinco haplótipos comuns, contudo existe uma minoria de cromossomos, aproximadamente 5%, que estão associados

com haplótipos menos comuns, geralmente designados como haplótipos atípicos (ZAGO *et al.*, 2001). Segundo Zago *et al.* (2000), os haplótipos atípicos são produzidos por diversos mecanismos genéticos, tais como: substituição de um nucleotídeo em um dos sítios polimórficos de restrição; recombinação entre dois haplótipos  $\beta^S$  típicos ou, mais frequentemente, entre um haplótipo  $\beta^S$  típico e um haplótipo  $\beta^A$  diferente; e conversão não recíproca entre cromossomos de uma sequência de DNA, dentre esses, o mecanismo de recombinação parece ser o mais comum.

**Figura 8-** Distribuição geográfica dos haplótipos ligados ao gene da globina  $\beta^S$  na África e regiões do Oriente Médio.



**Fonte:** Stuart e Nagel, (2004).

Os diferentes haplótipos da AF estão relacionados a um quadro clínico e níveis de HbF variados, sendo o haplótipo Senegal associado a níveis elevados de HbF (> 15%) e curso

clínico menos grave da doença; o Benin a níveis medianos de HbF (5 a 15%) e curso clínico intermediário; o Bantu a níveis diminuídos de HbF (<5%) e quadro clínico mais grave; e o haplótipo Árabe-Indiano que apresenta níveis elevados de HbF e curso clínico heterogêneo (NAGEL, 1984; POWARS, 1991; SILVA *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012; BANDEIRA *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2013).

### **Alfa-talassemia**

As talassemias envolvem a redução ou ausência de síntese de um ou mais tipos de cadeias globínicas. As talassemias alfa se devem à deficiência parcial ou completa da síntese da globina  $\alpha$  nas hemácias de indivíduos afetados (WAYE; CHUI, 2001).

A presença de  $\alpha$ -talassemia em indivíduos com AF tem sido associada a um efeito inibitório na polimerização intracelular da hemoglobina S, diminuição dos níveis de hemoglobina corpuscular média (HCM) e uma diminuição nos episódios de hemólise que, conseqüentemente, resultam em um aumento na concentração de hemoglobina e no número de eritrócitos, promovendo assim uma diminuição da gravidade clínica da doença (ADORNO *et al.*, 2008b).

No Brasil, cerca de 20% dos pacientes com AF apresentam  $\alpha$ -talassemia (COSTA *et al.*, 1989; FIGUEIREDO *et al.*, 1996). Eventos vaso-oclusivos que são devidos à hemólise, tais como AVC, úlceras de pernas, priapismo e hipertensão pulmonar se beneficiam com a associação de  $\alpha$ -talassemia. Entretanto, episódios de dor, síndrome torácica aguda e osteonecrose, complicações mais dependentes da viscosidade sanguínea, são mais prevalentes na presença dessa associação (STEINBERG; EMBURY, 1986; FIGUEIREDO *et al.*, 1996; STEINBERG, 2005; STEINBERG; ADEWOYE, 2006).

### **1.6 Distribuição dos haplótipos da anemia falciforme no Brasil**

A AF atinge milhões de pessoas em todo o mundo. Do século XVI ao século XIX, aproximadamente 10 milhões de escravos africanos foram trazidos para as Américas, deste total, 400.000 foram para os Estados Unidos e 3 milhões para o Brasil. Nos Estados Unidos o haplótipo Benin é o mais frequente, seguido pelo Bantu e Senegal em proporções equivalentes (ZAGO; SILVA; FRANCO, 1999). Nas Américas do Norte e Sul, no Caribe e no Reino Unido, o haplótipo Benin também é o mais frequente, embora o haplótipo Bantu seja o mais presente no Brasil (ZAGO; FIGUEIREDO; OGO, 1992; PANTE-DE-SOUSA *et al.*, 1998). O

haplótipo Senegal está irregularmente distribuído no país, uma consequência do pequeno tráfico de escravos provenientes de Senegal, Gambia, Serra Leoa e Guiné (ZAGO; SILVA; FRANCO, 1999). Os escravos trazidos ao Brasil vieram principalmente das regiões de Angola e ilha de São Tomé, das regiões da Costa da Mina e, em menor número, da Costa do Marfim, Costa dos Escravos, Congo, Moçambique, Madagascar e Cabo Verde (NAOUM; DOMINGOS, 1997).

O historiador Pierre Verger descreveu que os escravos da Bahia foram trazidos da região do Golfo do Benin (principalmente haplótipo Benin) e o restante do Brasil recebeu grande imigração de escravos do Congo e Angola (principalmente haplótipo Bantu) (VERGER, 1987).

Sobre as origens da população negra trazida ao estado do Ceará, cita-se como advinda, na sua maioria, das regiões de Angola, Congo e Moçambique. Os escravos negros eram introduzidos no estado a partir, principalmente, dos portos de Recife, São Luís e, em menor quantidade, de Salvador e Rio de Janeiro (RIEDER, 1988).

Os resultados das análises dos haplótipos nos diferentes estudos realizados no Brasil estão, em sua maioria, condizentes com a história da formação da população brasileira, inclusive no Ceará, que obteve o haplótipo Bantu com maior prevalência (SILVA *et al.*, 2009b).

### **1.7 Tratamento da Anemia Falciforme**

As opções terapêuticas utilizadas no tratamento da AF são ácido fólico, HU, transfusão sanguínea e transplante de medula óssea. Entretanto, com as novas descobertas a cerca da fisiopatologia da doença têm surgido perspectivas no sentido de se buscar novas propostas terapêuticas, com a finalidade de atenuar os processos de inflamação, estresse oxidativo, a disponibilidade de óxido nítrico, entre outras, colaborando para amenizar com os episódios de vaso-oclusão e de hemólise (SILVA; SHIMAUTI, 2006; BALIGA *et al.*, 2010; SCAVELLA *et al.*, 2010; ELIAS *et al.*, 2013; MANWANI; FRENETTE, 2013; MORRIS *et al.*, 2013).

Atualmente a HU é o quimioterápico considerado como principal agente farmacológico capaz de prevenir as complicações e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com AF (FRANCESCHIA; CORROCHERE, 2004; DEBAUN; FIELD, 2007;

BRAWLEY *et al.*, 2008; LANZKRON *et al.*, 2008; PLATT, 2008; WARE; AYGUN, 2009; STEINBERG *et al.*, 2010; VOSKARIDOU *et al.*, 2010). É um hidroxycarbamato inibidor seletivo da síntese da enzima ribonucleotídeo difosfato redutase (RR), interrompendo o mecanismo normal de redução de desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos no passo limitante da biossíntese de DNA, mantendo assim as células na fase G1/S do ciclo celular (MALUF *et al.*, 2009; WARE, 2010; SANTOS *et al.*, 2011). É usada principalmente em neoplasias do sistema hematopoético, como na leucemia mieloide crônica (LMC). Foi aprovada tanto pela *Food and Drug Administration* (em 1999) como pela Agência Europeia de Medicamentos (em 2008) para o uso na AF. (HANFT *et al.*, 2000).

A droga ao inibir a enzima RR promove a parada do ciclo celular e permite que o gene da  $\beta$ -globina seja mais ativamente expressado. Ao interferir na divisão celular, a HU altera a cinética da proliferação eritróide, forçando que mais eritrócitos sejam produzidos a partir de células progenitoras primitivas, além de estimular diretamente a produção de HbF (FRANCO *et al.*, 2006). A eficácia da HU no tratamento da AF é geralmente atribuído à sua capacidade de aumentar a HbF (PLATT *et al.*, 1984; NOGUCHI *et al.*, 1988; CHARACHE *et al.*, 1992; BORGNA-PIGNATTI, 2007; VOSKARIDOU *et al.*, 2010).

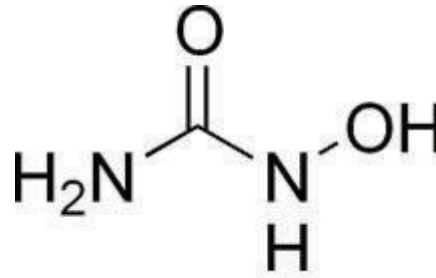
Alguns estudos mostram que a HU é também um doador de NO (óxido nítrico). É oxidada pela hemoglobina gerando a nitrosilhemoglobina (HbNO) e NO (GLADWIN *et al.*, 2002; JAIN; GLADWIN, 2010), além de gerar NO através das enzimas peroxidase, urease e catalase (JIANG *et al.*, 1997). Outros estudos mostram que a HU estimula a fosforilação e a ativação da eNOS que resultam na produção de NO (AGIL; SADRZADEH, 2000; CANALLI *et al.*, 2008; COKIC *et al.*, 2008; ELIAS *et al.*, 2012).

Foi observado que a HU apresenta propriedades antioxidantes contribuindo com a redução da peroxidação lipídica e formação de meta-hemoglobina na AF (AGIL; SADRZADEH, 2000).

A HU é considerada como um agente citotóxico, mutagênico, recombinogênico e antineoplásico. É composta por uma estrutura molecular simples semelhante à uréia, diferenciando-se apenas no que diz respeito à hidroxilação do átomo de nitrogênio adjacente à cetona da uréia, presumindo-se, dessa forma, que sua atuação medicamentosa esteja associada a esse átomo (Figura 9). A droga é indicada para pacientes com AF, incluindo crianças, com três ou mais episódios de crises vaso-oclusivas com necessidade de atendimento médico; uma

crise torácica aguda recidivante; um ou mais acidentes vasculares encefálicos; priapismo recorrente e anemia grave e persistente, nos últimos 12 meses (SILVA; SHIMAUTI, 2006; CANÇADO *et al.*, 2009).

**Figura 9** – Estrutura química da HU.



**Fonte:** Nascimento e Melo, 2012.

A despeito desta série de efeitos benéficos, o tratamento com HU pode gerar efeitos adversos como mielossupressão, hiperpigmentação cutânea, lesões ulcerativas em membros inferiores e aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , agravando as crises álgicas (NAHAVANDI *et al.*, 2000). Além disso, estudos têm demonstrado que a droga parece ter efeitos mutagênicos, clastogênicos, teratogênicos e carcinogênicos (BYRD *et al.*, 1999; HANFT *et al.*, 2000; GILMORE, 2003; BARBUI, 2004; DAVIES; PLATT, 2008; AYGUN, 2009; STEINBERG *et al.*, 2010; WARE, 2010).

Na literatura, a capacidade da HU causar câncer é controverso e a eficácia e segurança no tratamento a longo prazo de pacientes com AF permanece indefinido (STEINBERG *et al.*, 2010). Alguns estudos têm demonstrado que a hidroxíureia é genotóxica, enquanto outros estudos sugerem que a HU tem baixa mutagenicidade *in vivo* (HANFT *et al.*, 2000; FRIEDRISCH *et al.*, 2008).

Neste contexto é importante o desenvolvimento de estudos que avaliem a segurança da HU, a fim de se obter informações mais consolidadas sobre a genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade desse medicamento, para que os riscos e benefícios sobre o tratamento sejam avaliados individualmente para cada paciente.

# **OBJETIVOS**

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Identificar os níveis de lesão no DNA e as possíveis alterações cromossômicas e correlacioná-los com o tratamento com hidroxiuréia e com os polimorfismos genéticos em pacientes com anemia falciforme, atendidos no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) em Fortaleza-Ceará.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar os polimorfismos genéticos (haplótipos) dos pacientes com anemia falciforme;
- Analisar a distribuição dos haplótipos da anemia falciforme em relação às origens étnicas da população cearense;
- Identificar os níveis de lesão no DNA em pacientes com anemia falciforme tratados com hidroxiuréia;
- Identificar possíveis alterações cromossômicas em pacientes com anemia falciforme tratados com hidroxiuréia;
- Analisar a influência da hidroxiuréia nos níveis de lesão no DNA e em possíveis alterações cromossômicas;
- Analisar a influência do sexo e da idade nos níveis de lesão no DNA;
- Analisar a influência do tempo de tratamento com hidroxiuréia, da dose média diária da droga e do índice de massa corporal (IMC) dos pacientes nos níveis de lesão no DNA;
- Analisar a influência dos haplótipos nos níveis de lesão no DNA e em possíveis alterações cromossômicas;
- Avaliar o risco do tratamento com HU no desenvolvimento de genotoxicidade e mutagenicidade.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Considerações Éticas**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal do Ceará sob protocolo N°110.10.10.

### **3.2 Desenho do Estudo**

Trata-se de um estudo corte transversal e analítico desenvolvido segundo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, contida na Resolução de nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

### **3.3 Casuística**

Foram selecionados para a identificação dos níveis de lesão no DNA e para a determinação dos haplótipos, 41 pacientes adultos (20 do sexo masculino e 21 do sexo feminino) com diagnóstico clínico e laboratorial de AF (forma homocigótica SS), confirmado por biologia molecular, com idade entre 20 a 62 anos e em tratamento com HU por pelo menos 6 meses. A amostra representa aproximadamente 50% dos pacientes atendidos no ambulatório do serviço de hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), hospital de referência em doenças hematológicas em Fortaleza, CE, Brasil. Os pacientes foram selecionados no período de fevereiro de 2011 a junho de 2012. Devido à gravidade da AF, a maioria dos indivíduos do serviço hematológico onde fora realizado o estudo recebia tratamento, de modo que as comparações entre pacientes com AF tratados e não tratados com HU não foram possíveis. Foi utilizado para comparação apenas um grupo controle. O grupo controle foi constituído por 26 indivíduos (6 do sexo masculino e 20 do sexo feminino), com idade entre 60 a 78 anos, atendidos no ambulatório do HUWC. Estes pacientes não eram tabagistas ou etilistas, gestantes, nem possuíam diabetes mellitus ou algum quadro de insuficiência renal ou hepática, e/ou alguma doença crônica que pudesse influenciar nos resultados.

Para a análise de possíveis alterações cromossômicas foram selecionados os pacientes que demonstraram maiores níveis de lesão no DNA, de acordo com as seguintes características: haplótipo Bantu/Bantu, IMC  $\leq 20 \text{ kg/m}^2$ , em uso de HU em uma dose  $\geq 20,0 \text{ mg/Kg/dia}$  e tempo de tratamento com a droga  $\geq 20$  meses. Dentre os 41 pacientes analisados

anteriormente, foram selecionados 10 pacientes (5 sexo masculino e 5 do sexo feminino), com idade entre 25 a 49 anos, no período de julho de 2012 a julho de 2013.

### **3.4 Locais de Estudo**

O estudo foi realizado no Laboratório de Hemoglobina e Doenças Genéticas Hematológicas da Universidade Federal do Ceará e no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Centro de Referência no Diagnóstico do Câncer da Criança e do Adolescente Dr. Murilo Martins do Hospital Infantil Albert Sabin.

### **3.5 Seleção da Amostra**

Os pacientes foram selecionados aleatoriamente tendo os seguintes critérios de inclusão e exclusão do estudo:

#### **Critérios de Inclusão:**

- Pacientes adultos de ambos os sexos com AF em uso de HU por pelo menos 6 meses;
- Diagnóstico de HbSS confirmada por PCR -RFLP.

#### **Critérios de Exclusão:**

- Pacientes não portadores de AF ou quando se recusarem a participar do estudo, não assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- Aqueles que tenham realizado terapêutica transfusional nos últimos três meses;
- Pacientes em uso de quelante de ferro e de vitaminas antioxidantes;
- Pacientes tabagistas e etilistas, gestantes, com diabetes mellitus, com algum quadro de insuficiência renal ou hepática e/ou alguma doença crônica que pudesse influenciar nos resultados.

### **3.6 Coleta**

Os pacientes do estudo foram selecionados após a assinatura do TCLE, de acordo com as orientações do Comitê de Ética do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará (ANEXO). Foram apresentados dois termos de consentimento: na primeira etapa, para a coleta de sangue periférico; e na segunda etapa, para a coleta de sangue medular.

Amostras de dez mililitros de sangue periférico heparinizado foram coletadas, sendo imediatamente protegidas da luz, e armazenadas a 4° C para a realização do ensaio do cometa (identificação dos níveis de lesão no DNA). Amostras de dez mililitros de sangue periférico com EDTA foram coletadas para a biologia molecular (determinação dos haplótipos). Amostras de três mililitros de células de medula óssea heparinizadas foram coletadas por médico hematologista para a análise citogenética por bandeamento G (análise de alterações cromossômicas).

### **3.7 Testes realizados**

#### **3.7.1 Análises moleculares**

Primeiramente foi realizada a confirmação da HbSS e em seguida a determinação dos haplótipos. Os procedimentos foram realizados através da extração do DNA de leucócitos, seguido da técnica da reação em cadeia mediada pela polimerase para polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (PCR- RFLP).

#### **Extração do DNA genômico**

O DNA foi isolado de leucócitos, a partir de amostras de sangue total, colhidas em tubos contendo o anticoagulante EDTA, seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados kits de extração da BIOPUR® (Biometrix Diagnóstica, Brasil).

Após a realização do protocolo de extração, todas as amostras de DNA extraído foram quantificadas no aparelho NANODROP (Thermofisher- USA), para posterior amplificação gênica. As amostras foram armazenadas por até 24 horas, a -20° C, até o momento da utilização.

#### **PCR-RFLP**

Tanto a confirmação da HbSS quanto a determinação dos haplótipos foram realizadas por essa técnica de PCR. A técnica utiliza enzimas de restrição para detecção de mutações e polimorfismos genéticos. As enzimas de restrição reconhecem sítios específicos na sequência do DNA amplificada, que é clivada somente quando o sítio está presente, gerando fragmentos de vários tamanhos que são separados e analisados por eletroforese, sendo posteriormente

detectados pela coloração com brometo de etídio ou outro corante fluorescente (CLARK; THEIN, 2004).

### **Confirmação da HbSS**

A reação foi realizada para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . No eppendorf foram adicionados 11  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 12,5  $\mu\text{L}$  de PCR Master Mix; 0,25  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo P277; 0,25  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo P278; e 1  $\mu\text{L}$  de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5  $\mu\text{L}$  do mix da enzima *Dde I* (3,3  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 0,2  $\mu\text{L}$  da enzima *Dde I*; 1,5  $\mu\text{L}$  do tampão da enzima) a 10  $\mu\text{L}$  do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas (SAIKI *et al.*, 1985).

### **Determinação dos haplótipos**

Foram analisados seis sítios polimórficos de restrição, seguindo a metodologia de Sutton; Bouhassira e Nagel (1989): 1. *XmnI* 5' $\gamma^G$ , 2. *Hind III*  $\gamma^G$ , 3. *Hind III*  $\gamma^A$ , 4. *Hind II*  $\psi\beta$ , 5. *Hinc II* 3' $\psi\beta$ , 6. *Hinf I* 5' $\beta$ . As informações sobre a sequência dos oligonucleotídeos, enzimas utilizadas para cada região, tamanho do fragmento após amplificação e o tamanho dos fragmentos após clivagem com enzimas de restrição para a confirmação da HbSS e determinação dos haplótipos estão representadas no Quadro 1.

**Quadro 1-** Sequência dos oligonucleotídeos e enzimas utilizadas para a detecção dos haplótipos da anemia falciforme; regiões dos sítios polimórficos; tamanho dos fragmentos gerados antes e após clivagem.

Oligonucleotídeos	Enzima	Região	Tamanho do fragmento	Fragmentos após clivagem
P277: 5'GGCAGAGCCATCTATTGCTTA 3' P278: 5'ACCTTAGGGTTGCCATAAC 3'	<i>Dde I</i>	códon 6 (GAG-GTG)	382pb	288pb+88pb
H0: 'AACTGTTGCTTTATAGGATTTT 3' H1: 5'AGGAGCTTATTGATAACCTCAG 3'	<i>Xmn I</i>	5'γ <sup>G</sup>	650pb	450pb+200pb
H2: 5'AAGTGTGGAGTGTGCACATGA 3' H3: 5'TGCTGCTAATGCTTCATTACAA 3'	<i>HindIII</i>	γ <sup>G</sup>	780pb	430pb+340pb+10pb
H3: 5'TGCTGCTAATGCTTCATTACAA 3' H4: 5'TAAATGAGGAGCATGCACACAC 3'	<i>Hind III</i>	γ <sup>A</sup>	760pb	400pb+360pb
H5: 5'GAACAGAAGTTGAGATAGAGA 3' H6: 5'ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT 3'	<i>Hind II</i>	ψβ	701pb	360pb+340pb+1pb
H7: 5'TCTGCATTTGACTCTGTTAGC 3' H8: 5'GGACCCTAACTGATATAACTA 3'	<i>Hinc II</i>	3'ψβ	590pb	470pb+120pb
H9: 5'CTACGCTGACCTCATAAATG 3' H10: 5'CTAATCTGCAAGAGTGTCT 3'	<i>Hinf I</i>	5'β	380pb	240pb+140pb

**Fonte:** Sutton, Bouhassira e Nagel, 1989.

Todas as amostras foram analisadas para os seis sítios polimórficos seguindo os seguintes protocolos:

**H0 e H1:** A reação foi realizada para um volume final de 25 µL. No eppendorf foram adicionados 11 µL de água para injeção; 12,5 µL de Master Mix; 0,25 µL do oligonucleotídeo H0; 0,25 µL do oligonucleotídeo H1; e 1 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4°C por até no máximo 6 horas Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5 µL do mix da enzima *XmnI*

(3,3 µL de água para injeção; 0,2 µL da enzima *XmnI*; 1,5 µL do tampão da enzima) a 10 µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

**H2 e H3:** A reação foi realizada para um volume final de 33 µL. No eppendorf foram adicionados 18,5 µL de água para injeção; 12,5 µL de Master Mix; 0,5 µL do oligonucleotídeo H2; 0,5 µL do oligonucleotídeo H3; e 1 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4°C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5 µL do mix da enzima *HindIII* (3,3 µL de água para injeção; 0,2 µL da enzima *HindIII*; 1,5 µL do tampão da enzima) a 10 µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

**H3 e H4:** A reação foi realizada para um volume final de 33 µL. No eppendorf foram adicionados 18,5 µL de água para injeção; 12,5 µL de Master Mix; 0,5 µL do oligonucleotídeo H3; 0,5 µL do oligonucleotídeo H4; e 1 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4°C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5 µL do mix da enzima *HindIII* (3,3 µL de água para injeção; 0,2 µL da enzima *HindIII*; 1,5 µL do tampão da enzima) a 10 µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

**H5 e H6:** A reação foi realizada para um volume final de 33 µL. No eppendorf foram adicionados 18,5 µL de água para injeção; 12,5 µL de PCR Master Mix; 0,5 µL do oligonucleotídeo H5; 0,5 µL do oligonucleotídeo H6; e 1 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5 µL do mix da enzima *Hind II* (3,3 µL de água para injeção; 0,5 µL da enzima *Hind II*; 1,5 µL do tampão da enzima) a 10 µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

**H7 e H8:** A reação foi realizada para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . No eppendorf foram adicionados 10,5  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 12,5  $\mu\text{L}$  de PCR Master Mix; 0,5  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo H7; 0,5  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo H8; e 1  $\mu\text{L}$  de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5  $\mu\text{L}$  do mix da enzima *Hinc II* (3,3  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 0,2  $\mu\text{L}$  da enzima *Hinc II*; 1,5  $\mu\text{L}$  do tampão da enzima) a 10  $\mu\text{L}$  do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

**H9 e H10:** A reação foi realizada para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . No eppendorf foram adicionados 10,5  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 12,5  $\mu\text{L}$  de PCR Master Mix; 0,5  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo H9; 0,5  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo H10; e 1  $\mu\text{L}$  de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 57°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 10 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5  $\mu\text{L}$  do mix da enzima *Hinf I* (3,3  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 0,2  $\mu\text{L}$  da enzima *Hinf I*; 1,5  $\mu\text{L}$  do tampão da enzima) a 10  $\mu\text{L}$  do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

O PCR Master Mix utilizado nos protocolos foi da marca Fermentas (0,025 de Taq DNA Polimerase; 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM de cada dNTP) e as reações de amplificação foram desenvolvidas no termociclador Eppendorf.

Os resultados da amplificação foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 15 minutos, e visualizados em câmara de UV (ultravioleta) após coloração com brometo de etídio.

Os resultados da digestão enzimática foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos, e visualizados em câmara de UV (ultravioleta) após coloração com brometo de etídio.



Os resultados da digestão enzimática das amostras foram analisados de acordo com o padrão de polimorfismos para cada haplótipo que está representado no Quadro 2.

**Quadro 2-** Padrão de polimorfismos para cada haplótipo.

Região/ Enzima	$5'\gamma^G$ <i>Xmn I</i>	$\gamma^G$ <i>HindIII</i>	$\gamma^A$ <i>Hind III</i>	$\psi\beta$ <i>Hind II</i>	$3'\psi\beta$ <i>Hinc II</i>	$5'\beta$ <i>Hinf I</i>
Haplótipo						
Senegal	+	+	-	+	+	+
Benin	-	-	-	-	+	-
Bantu	-	+	-	-	-	-
Camarões	-	+	+	-	+	+
Arábe-Indiano	+	+	-	+	+	-

Fonte: modificado de Stuart e Nagel, 2004.

### 3.7.2 Identificação dos níveis de lesão no DNA

Os níveis de lesão no DNA foram identificados utilizando-se o ensaio do cometa. O ensaio vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido às suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. O teste não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Assim, o teste pode ser utilizado em estudos de reparo do DNA, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo. O resultado poderá avaliar se houve ou não um efeito e estimar o tamanho deste efeito, podendo ser importante no diagnóstico precoce, prognóstico e tratamento do câncer. Na AF o ensaio pode ser utilizado para detectar a intensidade da lesão no DNA e a resposta à medicação utilizada na doença, a HU (MCKENNA; OLIVE; BANATH, 2006; MCKEOWN; MCKELVEY, 2008; BARBERINO; JUNIOR; DOMINGOS, 2012).

De forma sucinta, no ensaio do cometa, quando as células são submetidas à eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão em condições alcalinas, demonstram a existência de lesão no DNA em forma de cometa, quando visualizadas em um microscópio de fluorescência. A lesão de cada célula é quantificada de acordo com classes padronizadas e pré-estabelecidas (SINGH *et al.*, 1988; OLIVE; BANATH; DURAND, 1990; FAIRBAIRN; MALUF; ERDTMANN, 2000).

O protocolo utilizado no presente estudo seguiu a metodologia descrita por Singh *et al.* (1988). O ensaio foi realizado de acordo com protocolos gerais para o uso *in vivo* do ensaio do cometa (TICE *et al.*, 2000; HARTMANN *et al.*, 2003).

### **Preparação das lâminas**

As lâminas foram previamente cobertas por solução de agarose de ponto de fusão normal a 1,5% e, posteriormente, mantidas em temperatura ambiente até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão da segunda camada de agarose de baixo ponto de fusão. Aproximadamente 20.000 células em 10 $\mu$ L foram misturadas com 120 $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão a 0,8% para formar a suspensão de células. Em seguida, a suspensão de células foi aplicada rapidamente sobre a primeira camada de agarose, sendo a lâmina, então, coberta com a lamínula (24x60mm) e mantida em baixa temperatura (4-8°C) por 5min até solidificar a agarose. A lamínula foi retirada e a lâmina mergulhada em solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO e 1% N-Lauroyl sarcosine; pH 10) a 4°C e protegida da luz.

### **Eletroforese**

Ao serem removidas da solução de lise, foram mergulhadas rapidamente em solução de neutralização (0,4M tris; pH 7,5) e colocadas na posição horizontal na cuba de eletroforese. Esta deve estar em um “banho de gelo”, para manter a temperatura da eletroforese constante em torno dos 4°C. A cuba foi preenchida com a solução de eletroforese (1mM EDTA, 300mM NaOH; pH>13) recém-preparada, a um nível superior (0,25cm, em média) às lâminas. Estas ficaram em repouso por 20min para permitir o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios alcali-lábeis. A eletroforese foi conduzida usando 25V e 300mA por 20min. Todos esses passos foram realizados na ausência de luminosidade. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas na solução de neutralização por 5min.

### **Coloração**

As lâminas foram fixadas com etanol a 100% e, posteriormente, coradas com 50ul de solução de Brometo de Etídio (20ug/mL), cobertas com lamínula e analisadas no microscópio de fluorescência.

### **Análise das lâminas**

Para a avaliação dos danos ao DNA, 100 células por paciente foram analisadas em um microscópio de fluorescência (aumento de 200x). As células foram avaliadas visualmente e receberam pontuação de 0 (ausência de migração) a 4 (migração máxima) de acordo com a intensidade da cauda (forma e tamanho). A pontuação total (ID) para 100 células variou de 0 (todas as células sem migração) a 400 (todas as células com a migração máxima). Lâminas de pacientes e controles foram processadas, codificadas e avaliadas em conjunto.

- ✓ 0= sem danos (<5%)
- ✓ 1= baixo nível de danos (5-20%)
- ✓ 2 = médio nível de danos (20-40%)
- ✓ 3 = alto nível de danos (40-95%)
- ✓ 4 = dano total (95%)

### **3.7.3 Análise de alterações cromossômicas**

Os pacientes onde foram observados maiores níveis de lesão no DNA foram submetidos à análise de alterações cromossômicas através da análise citogenética por bandeamento G. A citogenética constitui uma ciência que estuda e analisa os cromossomos humanos com o intuito de identificar possíveis alterações numéricas (ganho e perda de cromossomos) e/ou estruturais (translocações, inversões, deleções, dentre outras), a fim de diagnosticar e determinar o prognóstico de diversas condições patológicas (GERSEN; KEAGLE, 2005).

O genoma humano é constituído por 46 cromossomos (ou 23 pares), sendo 44 autossômicos e 2 sexuais, contribuindo de forma decisiva para estudos de doenças genéticas e de evolução. Os cromossomos não se apresentam uniforme ao longo de todo o seu comprimento, uma vez que possuem uma contração primária, o centrômero, que divide o cromossomo em dois braços (braço curto – p; braço longo – q) e podem apresentar constrições secundárias, como as regiões organizadoras do nucléolo. Além dessas diferenças, cada cromossomo apresenta um padrão característico de bandas. Por meio de técnicas de coloração especial, que coram seletivamente o DNA, cada par cromossômico é individualmente identificado; isto ocorre por apenas um breve período, durante a mitose, na

metáfase, quando estão condensados ao máximo e quando os genes são transcritos em baixos níveis (GERSEN; KEAGLE, 2005).

As técnicas de bandeamento cromossômico expandiram os horizontes da citogenética. A primeira aplicação do bandeamento deu-se no pareamento cromossômico. Essas técnicas têm possibilitado compreender melhor as alterações cromossômicas que se estabelecem em cada genótipo. Na análise citogenética por bandeamento G, os cromossomos são desproteinizados por ação da tripsina e, posteriormente, corados com Giemsa (de onde deriva o nome bandas G). Os cromossomos mostram um padrão de bandas claras e escuras, no qual as faixas escuras correspondem ao DNA rico em bases AT e poucos genes ativos; e as bandas claras têm DNA rico em bases GC e apresentam muitos genes ativos (GERSEN; KEAGLE, 2005).

O protocolo utilizado no presente estudo seguiu a metodologia descrita por Chauffaille *et al.* (1997). A medula óssea previamente colhida com heparina, de forma estéril, foi dividida em dois frascos contendo RPMI (pH 7,0), 3mL de soro fetal bovino e 100µL L-glutamina. Este material foi cultivado por 24 horas a 37°C. Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 50µL de colchicina por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCl 0,075M e fixado em solução de Carnoy, ácido acético e metanol na proporção de 3:1, por 4 vezes. Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia e deixado para secagem ao ar. As bandas foram feitas pela técnica de tripsina-giemsa (GTG), sendo analisadas, quando possível, pelo menos 20 metáfases de cada paciente, sendo o cariótipo montado de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura em Citogenética Humana (SHAFFER; LOVAK; CAMPBELL, 2009). As metáfases foram capturadas em sistema computadorizado (CHROMU) com software para cariotipagem, e o cariótipo digitalizado.

### **3.8 Análises estatísticas**

Duas análises univariadas foram realizadas para testar o efeito de todas as variáveis com os valores de ID (Índice de Dano) detectados no ensaio do cometa. Na primeira análise, os indivíduos foram agrupados de acordo com sexo e idade, de modo a comparar o dano ao DNA entre os pacientes com Anemia Falciforme tratados com Hidroxiuréia (AFHU) e os controles. A segunda análise foi realizada dentro do grupo de pacientes com AFHU para avaliar o efeito das seguintes variáveis com o ID: índice de massa corporal [IMC = peso (kg)

/altura (m<sup>2</sup>)], dose média diária de HU por peso, tempo de tratamento com HU e haplótipos do gene da beta-globina.

A idade, IMC, dose média diária de HU e duração do tratamento foram separados em duas categorias de acordo com a mediana. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para analisar os valores de ID e para comparar variáveis que resultaram diferença significativa na análise univariada. Esta comparação foi também utilizada para testar as diferenças entre os indivíduos com AFHU e os controles, e entre os indivíduos com AFHU. O teste não paramétrico Kruskal -Wallis e o pós-teste de Dunn foram utilizados para analisar a lesão ao DNA de acordo com os haplótipos do gene da beta-globina avaliados utilizando o ensaio do cometa e os valores de duração do tratamento, dose média diária de HU e IMC de cada haplótipo em pacientes com AFHU.

O programa estatístico (SPSS 10.0) para Windows foi utilizado para todas as análises de dados e gráficos foram construídos com o GraphPad Prism 5.0 para Windows . O nível de significância foi de 0,05 para todos os testes, e os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

# **RESULTADOS**

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características gerais dos pacientes estudados

Foram avaliados a extensão da lesão no DNA e identificados os haplótipos do gene da beta-globina de 41 pacientes (20 homens e 21 mulheres) com AF (hemoglobinopatia SS), com idade entre 20-62 ( $35,5 \pm 2,3$ ) anos, que estavam recebendo doses orais de HU entre 15-25 ( $20,0 \pm 0,6$ ) mg/kg/dia, durante 6-60 ( $18 \pm 3,4$ ) meses. O grupo controle foi composto por 26 indivíduos normais (6 homens e 20 mulheres) com idade entre 60-78 ( $66 \pm 2,1$ ) anos.

### 4.2 Distribuição e determinação dos haplótipos do gene da beta-globina

As combinações de haplótipos identificados nos 41 pacientes com AF estudados foram: Bantu/Bantu (41%), Benin/Benin (15%) e Bantu/Benin (44%). Dos cromossomos analisados, 63% foram do tipo Bantu e 27% do tipo Benin.

A tabela 1 mostra o número de cromossomos e pacientes com os haplótipos Bantu e Benin na população estudada. O haplótipo Bantu foi o mais prevalente (52 cromossomos Bantu, 17 pacientes Bantu/Bantu homocigoto e 18 pacientes Bantu/Benin heterocigoto), seguido pelo haplótipo Benin (30 cromossomos Benin, 6 pacientes Benin/Benin homocigoto e 18 pacientes Bantu/Benin heterocigoto).

**Tabela 1** - Distribuição dos haplótipos, cromossomos e genótipos na população estudada (n=41).

Haplótipo	Cromossomos (n)	Genótipo	Pacientes (n)
Bantu	52	Bantu/Bantu	17
Benin	30	Benin/Benin	6
		Bantu/Benin	18

n, número.

Os haplótipos do gene da beta-globina foram apresentados a partir da ausência (-) e presença (+) de cada sítio de restrição nos 41 indivíduos com HbSS. O haplótipo Bantu/Bantu é (+) para  $\gamma^G$ - Hind III, o Benin/Benin é (+) para 3'  $\psi\beta$ - Hinc II e o haplótipo Bantu/Benin é (+) para  $\gamma^G$ - Hind III e 3'  $\psi\beta$ - Hinc II (Tabela 2).

**Tabela 2-** Determinação dos haplótipos dos pacientes.

Genótipo dos pacientes	RFLPs*					
	$5', \gamma^G$	$\gamma^G$	$\gamma^A$	$\psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' $\beta$
	<i>Xmn I</i>	<i>HindIII</i>	<i>Hind III</i>	<i>Hind II</i>	<i>Hinc II</i>	<i>Hinf I</i>
Bantu/Bantu		+				
Bantu/Benin		+			+	
Benin/Benin					+	

\* RFLPs, sítios de restrição.

### 4.3 Valores de ID dos pacientes e dos controles e a correlação com o sexo e idade

A tabela 3 mostra que os valores de ID para os pacientes com AFHU (ID= 25,0  $\pm$  2,6) foram maiores quando comparados ao grupo controle (ID=5,0  $\pm$  0,2) (p < 0,001). O ID não foi influenciado pelo sexo para ambos pacientes (p=0,49) e controles (0,77). Indivíduos jovens (< 35 anos) do grupo AFHU tiveram um menor ID quando comparados a indivíduos do mesmo grupo com maior idade ( $\geq$  35 anos), embora a diferença não tenha sido significativa. A influência da idade não foi avaliada no grupo controle, pois todos os indivíduos eram idosos.

**Tabela 3 -** Lesão no DNA de acordo com o sexo e idade no grupo controle e nos pacientes com AFHU.

	ID $\pm$ EPM	p	ID $\pm$ EPM	P	
<b>Grupo Controle</b>	5,0 $\pm$ 0,2		<b>Grupo AFHU</b>	25,0 $\pm$ 2,6	< 0,001*
Sexo (n)			Sexo (n)		
Masculino (6)	5,4 $\pm$ 0,4	0,87	Masculino (20)	18,5 $\pm$ 3,7	0,49
Feminino (20)	5,0 $\pm$ 0,3		Feminino (21)	28,0 $\pm$ 3,9	
Idade (26)			Idade (n)		
60-78 anos	5,0 $\pm$ 0,2		< 35 anos (21)	15,1 $\pm$ 4,1	0,77
			$\geq$ 35 anos (20)	25,0 $\pm$ 4,6	

AFHU: pacientes com anemia falciforme tratados com hidroxiuréia; ID: índice de dano; EPM: erro padrão da média; n: número de indivíduos; p: significância estatística.

\* Significância estatística de acordo com o teste Mann-Whitney.



#### 4.4 Valores de ID e sua correlação com o tempo de tratamento com HU, dose média diária de HU e IMC dos pacientes com AFHU

A tabela 4 mostra que os valores de ID foram significativamente influenciados pelo tempo de tratamento com HU ( $p=0,0039$ ) e IMC ( $p= 0.001$ ). Indivíduos com tempo de tratamento  $\geq 20$  meses e  $IMC \leq 20 \text{ kg/m}^2$  tiveram um ID significativamente maior do que aqueles com tempo de tratamento  $< 20$  meses e  $IMC > 20 \text{ kg/m}^2$ . Nenhuma diferença significativa foi observada sobre o ID em relação à dose média diária de HU ( $p=0,950$ ), contudo os indivíduos que receberam uma dose média  $\geq 20,0 \text{ mg/kg/dia}$  apresentaram um maior ID ( $DI=35,0 \pm 6,2$ ) que aqueles que receberam  $< 20,0 \text{ mg/kg/dia}$  ( $DI = 14,2 \pm 4,5$ ).

**Tabela 4** - Lesão no DNA de acordo com o tempo de tratamento com HU, dose média diária de HU e IMC dos pacientes com AFHU.

	ID $\pm$ EPM	p
<b>Tempo de tratamento (n)</b>		
< 20 meses (17)	12,0 $\pm$ 3,8	0,0039*
$\geq 20$ meses (24)	42,0 $\pm$ 4,6	
<b>Dose média diária de HU (n)</b>		
< 20,0 mg/kg HU (16)	14,2 $\pm$ 4,5	0,950
$\geq 20,0 \text{ mg/Kg}$ HU (25)	35,0 $\pm$ 6,2	
<b>IMC (n)</b>		
$\leq 20 \text{ kg/m}^2$ (29)	46,7 $\pm$ 2,0	< 0,001*
$> 20 \text{ kg/m}^2$ (12)	14,6 $\pm$ 2,2	

IMC: índice de massa corporal; HU: hidroxiuréia; AFHU: pacientes com anemia falciforme tratados com HU; ID: índice de dano; EPM: erro padrão da média; n: número de indivíduos; p: significância estatística na comparação do ID entre os grupos.

\* Significância estatística de acordo com o teste Mann–Whitney.

#### 4.5 Valores de ID dos pacientes e a associação entre os haplótipos do gene da beta-globina

A tabela 5 e a figura 10 mostram uma associação importante entre ID e haplótipos. Os valores de ID para o haplótipo Bantu/Bantu foram maiores quando comparados ao haplótipo Benin/Benin ( $p=0,0276$ ). Além disso, o haplótipo Bantu/Benin teve um menor ID que o haplótipo Bantu/Bantu e maior ID que Benin/Benin, embora sem diferença significativa. Nenhuma diferença em relação ao tempo de tratamento com HU, dose média diária de HU e IMC foi encontrada na análise dos haplótipos.

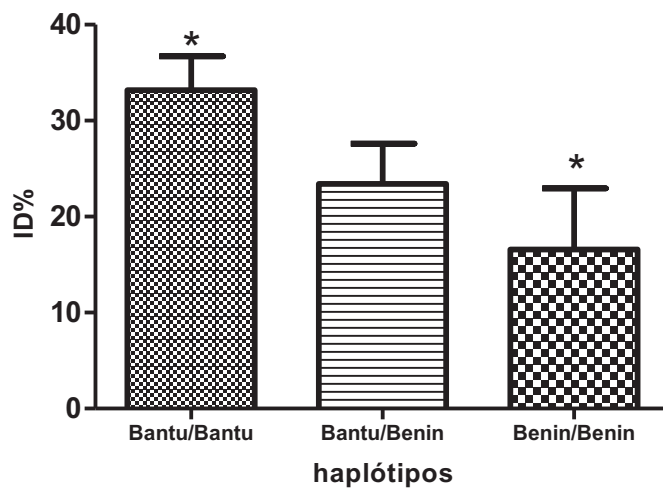
**Tabela 5** - Lesão no DNA de acordo com os haplótipos do gene da beta-globina e valores de ID segundo o tempo de tratamento com HU, dose média diária de HU e IMC para cada haplótipo nos pacientes com AFHU.

	Haplotipos (n)			p
	Bantu/Bantu (17)	Bantu/Benin (18)	Benin/Benin (6)	
ID $\pm$ EPM	35,0 $\pm$ 3,5	12,4 $\pm$ 4,2	8,8 $\pm$ 6,3	0,0276*
Tempo de tratamento (meses)	36,5 $\pm$ 6,3	14,5 $\pm$ 1,8	20,0 $\pm$ 5,7	0,11
Dose média diária de HU (mg/Kg)	22,0 $\pm$ 1,0	17,5 $\pm$ 1,3	20,0 $\pm$ 1,5	0,9540
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	19,0 $\pm$ 1,7	18,0 $\pm$ 2,0	19,0 $\pm$ 2,3	0,87

IMC: índice de massa corporal; HU: hidroxiuréia; AFHU: pacientes com anemia falciforme tratados com HU; ID: índice de dano; EPM: erro padrão da média; n: número de indivíduos; p: significância estatística.

\* Significância estatística de acordo com o teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's Multiple Comparison.

**Figura 10-** ID para cada haplótipo do gene da beta-globina nos pacientes com AFHU.



\*grupos que apresentaram diferença estatisticamente significativa.

#### 4.6 Perfil dos pacientes selecionados para análise de alterações cromossômicas

Para análise de alterações cromossômicas foram avaliados 10 pacientes (5 homens e 5 mulheres) com AFHU que demonstraram maiores níveis de lesão no DNA, com idade entre 25–49 ( $35,4 \pm 3,0$ ) anos, haplótipo Bantu/Bantu, IMC  $\leq 20$  ( $19,4 \pm 0,3$ ) kg/m<sup>2</sup>, em uso de HU em uma dose  $\geq 20,0$  ( $21,6 \pm 0,7$ ) mg/Kg/dia e tempo de tratamento com a droga entre 24-70 ( $49 \pm 4,1$ ) meses.

#### 4.7 Determinação dos haplótipos do gene da beta-globina, valores de ID e resultados da análise de alterações cromossômicas

Os haplótipos do gene da beta-globina foram apresentados a partir da ausência (-) e presença (+) de cada sítio de restrição nos 10 indivíduos com HbSS. A tabela 6 mostra o perfil de restrição dos pacientes estudados na análise citogenética, o haplótipo identificado foi o Bantu/Bantu; mostra também os valores de ID e os resultados da análise citogenética.

**Tabela 6** - Haplótipos, valores de ID e análise citogenética nos pacientes estudados (n=10).

Haplótipos	(RFLPs*)	ID $\pm$ EPM	Análise Citogenética
Bantu/Bantu	- + - - - -	$37 \pm 3,4$	46,XX ou 46,XY

XX(sexo feminino), XY(sexo masculino)

RFLP, sítios de restrição.

Os seis RFLP's usados para definir os haplótipos estão na seguinte ordem: 5'  $\gamma^G$ - XmnI,  $\gamma^G$ - Hind III,  $\gamma^A$ - Hind III,  $\psi\beta$ - Hind II, 3'  $\psi\beta$ - Hinc II, 5'  $\beta$ - Hinf I.

#### 4.8 Análise de alterações cromossômicas por citogenética por bandeamento G

Todos os pacientes apresentaram cariótipo normal. A figura 11 mostra o cariótipo com banda G de um paciente do sexo feminino: o resultado da análise das células em metáfase pode ser descrito como 46, XX, ou seja, 46 cromossomos sem alterações de um paciente do sexo feminino.

**Figura 11-** Resultado da Citogenética com banda G de um paciente do sexo feminino.



Paciente apresentando cariótipo normal, composto por 46 cromossomos sem anormalidades.

## **DISCUSSÃO**

---

## 5 DISCUSSÃO

A AF é uma doença hereditária comum no Brasil. Conforme visto anteriormente, apresenta uma variedade de complicações clínicas que podem levar os pacientes a óbito (ZAGO; PINTO, 2007). A maior susceptibilidade a infecções bacterianas, resultante da destruição do baço ainda nos primeiros anos de vida, pode ser considerada a principal causa de morte dos pacientes com AF, entre as mais importantes infecções estão: síndrome torácica aguda, meningite, septicemia, gastroenterite e crise aplástica (PLATT *et al.*, 1994). Segundo Zago (2002), essas infecções têm uma evolução fatal rápida, portanto podem ser responsáveis por mortes súbitas ou por causas não diagnosticadas nos primeiros anos de vida em crianças sem diagnóstico precoce da doença.

Países como os Estados Unidos e a Jamaica já demonstraram que a maneira mais eficiente e efetiva para reduzir a morbimortalidade da AF é a triagem neonatal, uma vez que o diagnóstico precoce permite a inserção do paciente em programas de saúde multidisciplinares, com a utilização de cuidados preventivos e orientação aos pais, proporcionando melhoria na qualidade e sobrevida desses pacientes (PLATT *et al.*, 1994; WIERENGA; HAMBLETON; LEWIS, 2001). No Brasil, a portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde incluiu as hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal, permitindo assim o diagnóstico precoce e reconhecendo a doença como um problema de saúde pública no país (ZAGO, 2002). Apesar do diagnóstico precoce, vários fatores importantes sobre a doença ainda não foram completamente esclarecidos, tais como: os motivos da heterogeneidade fenotípica e as consequências do tratamento medicamentoso disponível a longo prazo.

Muitos autores têm atribuído a heterogeneidade fenotípica da doença aos diferentes haplótipos da AF. Existem trabalhos realizados por nosso grupo que demonstram que o perfil inflamatório, o perfil oxidativo, os níveis de hemoglobina fetal, o aparecimento de doença renal e diferentes manifestações clínicas estão correlacionados com os diferentes haplótipos (SILVA *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012; BANDEIRA *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2013).

O tratamento medicamentoso disponível trata-se da HU. Conforme mencionado anteriormente, a HU é o quimioterápico considerado como principal agente farmacológico capaz de prevenir as complicações e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com AF (FRANCESCHIA; CORROCHERE, 2004; DEBAUN; FIELD, 2007; BRAWLEY *et al.*,

2008; LANZKRON *et al.*, 2008; PLATT, 2008; WARE; AYGUN, 2009; STEINBERG *et al.*, 2010; VOSKARIDOU *et al.*, 2010). A eficácia clínica da terapia com HU, bem como a facilidade da administração oral, fazem da droga uma atrativa opção terapêutica para pacientes com doenças mieloproliferativas e AF. No entanto, embora a literatura muitas vezes não relate os perigos associados à terapia com a droga, é conhecida a possibilidade de efeitos mutagênicos e carcinogênicos em tratamentos mais duradouros (FRIEDRISCH *et al.*, 2008).

No presente estudo avaliamos os níveis de lesão no DNA em sangue periférico de pacientes com AF tratados com HU e em indivíduos saudáveis como controles, utilizando o teste do cometa. Além disso, avaliamos a associação entre os níveis de lesão no DNA em sangue periférico de pacientes com AF tratados com HU e os haplótipos do gene da beta-globina, a fim de conhecermos se a influência dos haplótipos relacionada à heterogeneidade fenotípica da doença, também está correlacionada à toxicidade da HU nos pacientes, uma análise nunca realizada anteriormente. É importante destacar que o teste do cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação, portanto, em um segundo momento, avaliamos a presença de alterações cromossômicas nos pacientes pela técnica da citogenética clássica por bandeamento G (OLIVE; BANATH, 2006; MCKENNA; MCKEOWN; MCKELVEY, 2008; BARBERINO; JUNIOR; DOMINGOS, 2012).

Em relação aos haplótipos identificados no presente estudo, na análise dos 82 cromossomos  $\beta^S$  foi encontrada uma maior prevalência do haplótipo Bantu, seguido do haplótipo Benin. O resultado está em conformidade com um trabalho realizado por nosso grupo anteriormente, que determinou em 68 cromossomos a presença de 66% do haplótipo Bantu e 23% do haplótipo Benin (SILVA *et al.*, 2009b).

O Brasil é um país de grande heterogeneidade étnica. Um dos fatores mais marcantes da história do país foi a grande influência africana, fazendo-se de forma mais ou menos intensa, a depender da região do país e da diversidade étnica dos imigrantes. A distribuição geográfica da HbS no Brasil tem frequências menores entre as populações da região Sul e Sudeste (2,71% e 2,35%, respectivamente) e maiores nas regiões Norte e Nordeste (5,93% e 6,13%, respectivamente) (ÁLVARES FILHO *et al.*, 1995).

A composição dos haplótipos da AF no Brasil foi analisada dentre outros estudos em Salvador, Belém, Ceará, Rio de Janeiro, Amazonas, Porto Alegre, Campinas e Ribeirão Preto.



A prevalência do haplótipo Bantu foi mostrada em: Belém, Ceará Rio de Janeiro, Amazonas, Porto Alegre, Campinas e Ribeirão Preto (ZAGO; FIGUEIREDO; OGO, 1992; GONÇALVES *et al.*, 1994; WAGNER *et al.*, 1996; PANTE-DE-SOUZA *et al.*, 1999; FLEURY, 2001; CARDOSO; GUERREIRO, 2006; SILVA *et al.*, 2009b). A análise dos haplótipos no estado da Bahia tem relatado conflitantes prevalências entre o haplótipo Bantu (COSTA *et al.*, 1984) e o haplótipo Benin (QUEIROZ, 1996), embora estudos mais recentes tenham mostrado prevalência no haplótipo Bantu (GONÇALVES *et al.*, 2003; ADORNO *et al.*, 2004; ADORNO *et al.* 2008b).

Os resultados confirmam a heterogeneidade étnica existente no Brasil e os estudos sobre a história da formação da população brasileira, que descreve que os escravos negros foram trazidos principalmente do Congo e Angola, com exceção ao estado da Bahia que receberam imigração do Golfo do Benin (VERGER, 1987).

Em relação ao tratamento com HU, existem estudos conflitantes em relação à lesão no DNA após exposição humana à droga. Alguns estudos têm mostrado que a HU é genotóxica (ZIEGLER-SKYLAKAKIS; SCHWARZ; ANDRAE, 1985; JUUL *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011) enquanto outros sugerem uma baixa mutagenicidade *in vivo* ((DAWKINS *et al.*, 1997; HANFT *et al.*, 2000; MONTALEMBERT; DAVIES, 2001; MOSCHOVI *et al.*, 2001). Como a HU tem sido cada vez mais utilizada em crianças com AF, o que significa uma longa exposição, e como é considerada potencialmente mutagênica, estudos adicionais e uma vigilância constante a condições malignas são de extrema importância.

Um possível mecanismo da toxicidade da HU é a redução de dNTP intracelular resultante da inibição da RR, o que prejudica os mecanismos de reparação de DNA, devido à falta de nucleotídeos para a DNA polimerase. Assim, a instabilidade do DNA potencialmente leva a carcinogênese, principalmente pela transformação leucêmica (LI; KAMINSKAS, 1987). Além disso, a natureza oxidativa e inflamatória da AF, motivos pelo qual os pacientes são tratados com HU, também devem ser levados em consideração. Este estado da doença está associado a danos lipídicos, proteicos e no material genético, através da geração de espécies reativas de oxigênio (ANDERSON *et al.*, 2000; KUMAR; BANDYOPADHYAY, 2005).

Os resultados deste estudo mostraram níveis significativamente maiores de danos no DNA em indivíduos com AF tratados com HU quando comparados aos controles. Indivíduos

tratados com  $\geq 20,0$  mg/kg/dia de HU apresentaram cerca de duas vezes mais danos ao DNA do que aqueles tratados com doses mais baixas, mas a diferença não foi significativa. Por outro lado, houve uma diferença significativa entre o tempo de tratamento e os níveis de dano no DNA: indivíduos tratados por períodos mais longos ( $\geq 20$  meses) mostraram cerca de três vezes mais danos no DNA do que pacientes tratados por períodos mais curtos; além disso, o ID foi inversamente correlacionado ao IMC no grupo AFHU, indivíduos com  $\text{IMC} \leq 20$  kg/m<sup>2</sup> tiveram níveis significativamente maiores de danos no DNA. Nossos dados não mostraram nenhuma correlação entre o dano no DNA e idade ou sexo.

O grupo controle utilizado no estudo foi composto de indivíduos idosos. Essa característica não interfere em nenhum dos resultados, pois é esperado que esses pacientes possuam uma condição mais propícia a maiores níveis de lesão no DNA e que o reparo aconteça de forma menos ativa do que em pacientes mais jovens (GARM *et al.*, 2013). Portanto, provavelmente, o grupo controle selecionado seja uma comparação mais rígida do que seria se esse fosse constituído por indivíduos jovens.

Estes resultados são semelhantes a um estudo que utilizou o ensaio do cometa para avaliar o nível de dano no DNA em leucócitos do sangue periférico em 28 pacientes com AFHU e 28 indivíduos não tratados: pacientes que receberam uma dose média de  $> 20$  mg/kg/dia de HU mostraram um aumento de 1.7 vezes de danos no DNA quando comparados àqueles que receberam doses mais baixas; os indivíduos tratados durante um período de 42 meses mostraram maiores danos no DNA que os pacientes tratados por menos de 42 meses; e o índice de dano foi inversamente correlacionado com o IMC (FRIEDRISCH *et al.*, 2008). Estudos que usam outros testes de genotoxicidade também sugerem a duração do tratamento, a dose de HU e o IMC como determinantes da genotoxicidade em pacientes com AFHU (LE FEVRE *et al.*, 2007; MALUF *et al.*, 2009; FLANAGAN *et al.*, 2010)

Interessante a correlação negativa encontrada entre o IMC e os danos no DNA em pacientes com AF, pois geralmente o que se encontra é uma correlação positiva entre essas variáveis (JANG *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2003; HOFER; KARLSSON; MOLLER, 2006). Alguns estudos mostram que a criança portadora de AF apresenta um retardo de crescimento somático, que afeta o peso e a altura e que se acentua progressivamente até os 18 anos (VERISSIMO, 2007). Importante destacar que crianças com AF tratadas com HU tem peso e altura superiores em relação às crianças com AF não tratadas, e peso e altura similares em relação aos valores normais quando colocadas nas curvas pediátricas padrão (WANG *et al.*,

2002; HANKINS *et al.*, 2005). Portanto, o resultado pode ser um indicador de saúde geral entre os pacientes do grupo AFHU, pois pode indicar que os indivíduos mais propensos a ganhar peso são mais saudáveis e, portanto, apresentam uma melhor homeostase em seu DNA.

Muito interessante foi a associação entre ID e haplótipos. Os valores de ID para o haplótipo Bantu/Bantu foram maiores quando comparados ao haplótipo Benin/Benin, e o haplótipo Bantu/Benin teve um ID menor que o haplótipo Bantu/Bantu e maior que o haplótipo Benin/Benin. Uma análise foi realizada para a duração do tratamento com HU, dose de HU e IMC para cada haplótipo, no entanto nenhuma diferença estatística foi encontrada. Esta análise excluiu a possibilidade de associação entre ID e haplótipos a partir desses fatores. O resultado nunca foi encontrado e é novo para a comunidade científica, porque mostra que a genotoxicidade na AF não está apenas associada ao tratamento com HU, mas também a polimorfismos genéticos. A afirmação é reforçada quando analisamos alguns artigos onde os autores observaram que adultos tratados e não tratados com AF tiveram níveis similares de mutações (HANFT *et al.*, 2000; SCHULTZ; WARE, 2003; WARE, 2010).

Estudos anteriores sugerem que o haplótipo Bantu está associado a uma maior incidência de lesões a órgãos e o haplótipo Benin com uma forma mais branda da AF (GONÇALVES *et al.*, 2003; ADORNO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2010). Além disso, artigos mostram que os indivíduos com AF e haplótipo Bantu têm frequentemente níveis de HbF inferiores a 5%, enquanto aqueles com o haplótipo Benin mostram níveis de HbF intermediários de 5 a 10% (NAGEL; STEINBERG, 2001; SILVA *et al.*, 2009a; TESTA, 2009). O presente estudo mostra que o haplótipo Bantu teve maior ID que o haplótipo Benin. Vários estudos foram desenvolvidos com a finalidade de prever o prognóstico, prevenir os danos a órgãos e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com AF, mas o entendimento de que o risco de genotoxicidade pode aumentar de acordo com o polimorfismo genético do paciente é um conhecimento novo.

É importante destacar que os pacientes com maiores ID foram avaliados em relação à presença de alterações cromossômicas, no entanto esses pacientes demonstraram um cariótipo normal. O resultado mostra que maiores níveis de lesão no DNA e a presença de polimorfismo genético favorável não significam a presença de mutagenicidade.

Apesar de muitos anos de estudos experimentais sobre agentes indutores de anormalidades cromossômicas, e o recente progresso na elucidação dos mecanismos moleculares de lesão no DNA, a associação entre lesão, reparo e anormalidade cromossômica permanece obscura. (DURANTE *et al.*, 2013). A correlação entre lesão no DNA, anormalidade cromossômica e o desenvolvimento de neoplasias é relevante não somente no tratamento com HU, mas também para outros agentes com potencial carcinogênico. Numerosos ensaios clínicos randomizados, estudos observacionais e relatos de caso de pacientes com AF tratados com HU já foram realizados e relatam que existe evidência para o desenvolvimento de neoplasias, contudo considerada de baixo risco (RAUCH *et al.*, 1999; WILSON, 2000; AL-JAMA *et al.*, 2002; SCHULTZ; WARE, 2003; GULBIS *et al.*, 2005; LANZKRON *et al.*, 2008; VOSKARIDOU *et al.*, 2010).

Um estudo de revisão sobre o desenvolvimento de neoplasias durante o uso de HU mostrou que (LANZKRON *et al.*, 2008) somente 6 pacientes com AF desenvolveram leucemia ou Síndrome Mielodisplásica (SMD): um paciente do sexo feminino, idade 10 anos, apresentou Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) após 1,5 anos de tratamento (MONTALEMBERT *et al.*, 1999); um paciente do sexo masculino, idade 14 anos, desenvolveu LLA após 3 meses de tratamento (SCHULTZ; WARE, 2003); um paciente do sexo feminino, idade 21 anos, apresentou Leucemia Promielocítica aguda após 8 anos de tratamento (GULBIS *et al.*, 2005); um paciente do sexo feminino, idade 25 anos, desenvolveu Leucemia Mielóide Aguda (LMA) após 2 anos de tratamento (AL-JAMA *et al.*, 2002); um paciente do sexo feminino, idade 27 anos, apresentou LMA/SMD após 8 anos de tratamento (RAUCH *et al.*, 1999); e um paciente do sexo feminino, idade 42 anos, apresentou LMA após 6 anos de tratamento (WILSON, 2000). Para examinar os riscos e benefícios do uso a longo prazo de HU, 299 pacientes com AF foram incluídos em um ensaio clínico randomizado e seguidos por 17,5 anos, desses somente 3 pacientes desenvolveram neoplasia durante o tratamento com HU; já em um outro estudo desenvolvido por 17 anos, nenhum paciente apresentou SMD, leucemia ou câncer (STEINBERG *et al.*, 2003; STEINBERG *et al.*, 2010; VOSKARIDOU *et al.*, 2010). Poucos casos de neoplasias em pacientes com AF têm sido descritos, e somente em parte deles foi realizado um ensaio de mutagenicidade *in vivo* antes e após a inclusão do tratamento com HU, portanto a afirmação de que a neoplasia foi desenvolvida após o tratamento com a droga é incerta (MONTALEMBERT *et al.*, 1999; RAUCH *et al.*, 1999; WILSON, 2000; AL-JAMA *et al.*, 2002; FESTER; SARIBAN; MEULEMAN, 2003; SCHULTZ; WARE, 2003; STEINBERG *et al.*, 2003; GULBIS *et al.*,

2005; LANZKRON *et al.*, 2008;; STEINBERG *et al.*, 2010; VOSKARIDOU *et al.*, 2010; TAYLOR *et al.*, 2011).

Os múltiplos benefícios do tratamento com HU são notáveis (SAAD *et al.*, 2004; FITZHUGH; WIGFALL; WARE, 2005; HANKINS *et al.*, 2005; KRATOVIL *et al.*, 2006; ZIMMERMAN *et al.*, 2007; HANKINS *et al.*, 2008; HEENEY; WARE, 2010; WARE, 2010; WANG *et al.*, 2011; LEBENSBURGER *et al.*, 2012), contudo a indicação para expandir o tratamento a crianças e a outros pacientes com AF precisa de estudos que determinem se esses raros casos de desenvolvimento de neoplasias representam significância no tratamento com a droga.

## CONCLUSÃO

---

## 6 CONCLUSÃO

Os principais haplótipos determinados nos pacientes com AF em Fortaleza foram o haplótipo Bantu (63%), seguido do haplótipo Benin (27%), o que apresentou conformidade com os dados históricos sobre as origens da população negra trazida ao estado do Ceará.

Os níveis de lesão no DNA em pacientes com AF tratados com HU foram maiores quando comparados a um grupo controle, o que mostrou a importância da genotoxicidade do medicamento.

Os pacientes com os maiores níveis de lesão no DNA apresentaram um cariótipo normal, o que demonstrou que a genotoxicidade da HU não significa necessariamente a presença de mutagenicidade;

Os pacientes não apresentaram influência do sexo e da idade em relação aos níveis de lesão no DNA;

A lesão no DNA dos pacientes apresentou uma correlação positiva em relação à dose média diária e ao tempo de tratamento com HU, e uma correlação negativa em relação ao IMC;

Os pacientes com haplótipo Bantu apresentaram maiores níveis de lesão no DNA quando comparados aos pacientes com haplótipo Benin. A genotoxicidade na AF também parece estar associada a polimorfismos genéticos, portanto mais pesquisas são necessárias a fim de esclarecer os fatores de risco para a genotoxicidade da terapia com HU na AF.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstraram que os níveis de lesão no DNA podem estar associados tanto com o tratamento com HU quanto com os polimorfismos genéticos da AF. O conhecimento de que os haplótipos influenciam a heterogeneidade fenotípica da doença já é bem estudado, mas a correlação desses com a genotoxicidade na AF é um conhecimento novo. O resultado deve ser mais extensamente pesquisado pela comunidade científica mundial, pois possivelmente possa ser reconhecido como um fator de risco para a genotoxicidade na doença.

Além disso, o trabalho também mostrou que maiores níveis de lesão no DNA e polimorfismo genético favorável não significam a presença de mutagenicidade, o que corrobora com diversos estudos que demonstram que o desenvolvimento de neoplasias nesses pacientes não é uma consequência comum. O mais importante é reconhecer que, embora raros, existem casos de neoplasia em pacientes com AF em tratamento com HU, que precisam ser melhor estudados, a fim de proporcionar ao paciente uma maior segurança no tratamento com o medicamento.

O estudo realizado reforça um ponto importante: a mutagenicidade e a carcinogenicidade dos pacientes com AF tratados com HU, de significância ainda incerta, deve ser avaliada contra os claros benefícios da terapia, e ainda, caso o risco relacionado ao desenvolvimento de neoplasia seja provado, precisa ser avaliado contra a morbimortalidade intrínseca dos pacientes com AF não tratados.

## **REFERÊNCIAS**

---

## REFERÊNCIAS

- AGIL, A.; SADRZADEH, S. M. H. Hydroxyurea protects erythrocytes against oxidative damage. **Redox Report**, v. 5, n.1, p. 29-34, 2000.
- ADORNO, E. V.; COUTO, F. D.; MOURA NETO, J. P.; MENEZES, J. F.; REGO, M.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 292-298, 2005.
- ADORNO, E. V.; MOURA NETO, J. P.; LYRA, I.; ZANETTE, A.; SANTOS, L. F. O.; SEIXAS, M. O.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. Sequence change in the HS2-LCR and  $\gamma$ -globin gene promoter region of sickle cell anemia patients. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, n. 2, p. 95-98, 2008a.
- ADORNO, E. V.; ZANETTE, A.; LYRA, I.; SEIXAS, M. O.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, v. 31, n. 3, p. 621-625, 2008b.
- ADORNO, E. V.; ZANETTE, A.; LYRA, I.; SOUZA, C. C.; SANTOS, L. F.; MENEZES, J. F.; DUPUIT, M. F.; ALMEIDA, M. N.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. 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.
- AL-JAMA, A. H.; AL-DABBOUS, I. A.; AL-KHATTI, A. *et al.* Are we underestimating the leukemogenic risk of hydroxyurea. **Saudi Med J**, v. 23, p. 1411–1413, 2002.
- ÁLVARES FILHO, F.; NAOUM, P. C.; MOREIRA, H. W; CRUZ, R.; MANZATO, A. J.; DOMINGOS, C. R. B. Distribución geográfica etária y racial de la hemoglobina S en Brasil. **Sangre**, v. 40, p. 97-102, 1995.
- ANDERSON, D.; YARDLEY-JONES, A.; VIVES-BAUZA, C.; CHUA-ANUSORN, W.; COLE, C.; WEBB, J. Effect of iron salts, haemosiderins, and chelating agents on the lymphocytes of a thalassaemia patient without chelation therapy as measured in the comet assay. **Teratog. Carcinog. Mutagen**, v. 20, p. 251–264, 2000.
- ANTONARAKIS, S. E.; KAZAZIAN, H. H.; ORKIN, S. H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. **Hum. Genet.**, v. 69, n. 1, p. 1-14, 1985.
- ARAÚJO, M. C.; SERAFIM, E. S.; DE CASTRO JR, W. A.; DE MEDEIROS, T. M. Prevalence of abnormal hemoglobins in newborns in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 123-128, 2004.
- BALIGA, B. S.; HAYNES, J. R.; J., OBIAKO, B.; MISHRA, N. Combined effects of arginine and hydroxyurea on BFU-E derived colony growth and HbF synthesis in erythroid progenitors isolated from sickle cell blood. **Cellular and molecular biology**, v. 156, n. 8, p.1290–1298; 2010.

- BANDEIRA, F. M. G. C.; LEAL, M. C.; SOUZA, R. R.; FURTADO, V. C.; GOMES, Y. M.; MARQUES, N. M. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina “S” detectados através de triagem de sangue de cordão umbilical. **J. Pediatr. (Rio de Janeiro)** v. 75, n. 3, p. 167-171, 1999.
- BANDEIRA, I. C. J.; ROCHA, L. B. S.; BARBOSA, M. C.; ELIAS, D. B. D.; QUEIROZ, J. A. N.; FREITAS, M. V. C.; Gonçalves, R. P. Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB\*S haplotype. **Cytokine**, v. 65, p. 217-221, 2013.
- BANK, A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 435-443, 2006.
- BARBERINO, W. M.; JUNIOR, E. B.; DOMINGOS, C. R. B. Comet Assay as a technique to evaluate DNA damage in sickle cell anemia patients. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, v.34, n. 1, p. 67, 2012.
- BARBUI, T. The leukemia controversy in myeloproliferative disorders: is it a natural progression of disease, a secondary sequela of therapy, or a combination of both? **Semin. Hematol.**, v. 41, p. 15-17, 2004.
- BHAUMIK, K. Fetal hemoglobin synthesis in sickle cell anemia: some molecular considerations. **Am. J. Hematol.**, v. 46, n. 2, p. 101-106, 1994.
- BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias**. São José do Rio Preto: HN, 2006.
- BORGNA-PIGNATTI, C. Modern treatment of thalassaemia intermedia. **Br J Haematol**, v. 138, p. 291–304, 2007.
- BORSATO, M. L.; BRUNIERA, P.; CUSATO, M. P.; SPEWIEN, K. E.; DURIGON, E. L.; TOPOROVSKI, J. Aplastic crisis in sickle cell anemia induced by parvovirus B19. **J. Pediatr.**, v. 76, n. 6, p. 458-460, 2000.
- BRANDELISE, S.; PINHEIRO, V.; GABETTA, C. S.; HAMBLETON, I.; SERJEANT, B.; SERJEANT, G. Newborn screening for sickle cell disease in Brazil: the Campinas experience. **Clin. Lab. Haematol.**, v. 26, n. 1, p.15-19, 2004.
- BRAWLEY, O. W; CORNELIUS, L. J. *et al.* National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: Hydroxyurea treatment for sickle cell disease. **Ann Intern Med**, v. 148, p. 932–938, 2008.
- BUCHANAN, G. R.; DEBAUN, M. R.; QUINN, C. T.; STEINBERG, M. H. Sickle cell disease. **Hematology**, n. 1, p. 35-47, 2004.
- BUNN, H. F.; FORGET, B. G. **Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986.
- BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, n. 11, p.762-769, 1997.

BYRD, D. C.; PITTS, S. R.; ALEXANDER, C. K. Hydroxyurea in two pregnant women with sickle cell anemia. **Pharmacotherapy**, v. 19, p. 1459-1462, 1999.

CANALLI, A. A.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; SAAD, S. T. O.; CONRAN, N.; COSTA, F. F. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. **Haematologica**, v. 93, n. 4, p. 605-609, 2008.

CANÇADO, R. D.; LOBO, C.; ÂNGULO, I. L.; ARAÚJO, P. I. C.; JESUS, J. A. Protocolos clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxíureia na doença falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**. v.31, n.5, p. 361-366, 2009.

CARDOSO, G. L.; GUERREIRO, J. F. African gene flow to north Brazil as revealed by HBB\*S gene haplotype analysis. **Am. J. Hum. Biol.**, v. 18, n. 1, p. 93-98, 2006.

CARVALHO DOS SANTOS, B. S.; DIAS-ELIAS, D. B.; DA SILVA-ROCHA, L. B.; CAVALCANTE-BARBOSA, M.; PINHEIRO-GONÇALVES, R. Impact of  $\beta$ S-Globin Haplotypes on Oxidative Stress in Patients with Sickle Cell Anemia in Steady State. **Archives of Medical Research**, v. 43, p. 536-540, 2012.

CHANG, Y. P.; MAIER-REDELSPERGER, M.; SMITH, K. D. *et al.* The relative importance of the X-linked FCP locus and beta-globin haplotypes in determining haemoglobin F levels: a study of SS patients homozygous for beta S haplotypes. **Br. J. Haematol.**, v. 96, n. 4, p. 806-814, 1997.

CHARACHE, S.; DOVER, G. J.; MOORE, R. D. *et al.* Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 79, p. 2555–2565, 1992.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F.; COUTINHO, V.; YAMAMOTO, M.; KERBAUY, J. Combined method for simultaneous morphorlogy, immunophenotype and karyotype (MAC) in leukemias. **Sao Paulo Med J**, v. 115, p.1336-1342, 1997.

CLARK, B. E.; THEIN, S. L. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. **Clin. Lab. Haematol.**, v. 26, n. 3, p. 159-176, 2004.

COKIC, V. P.; ANDRIC, S. A.; STOJIKOVIC, S. S.; NOGUCHI, C. T.; SCHECHTER, A. N. Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1117-1123, 2008.

COSTA, F. F. Anemia falciforme. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia, fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 289-308.

COSTA, F. F.; ARRUDA, V. R.; GONÇALVES, M. S.; MIRANDA, S. R.; CARVALHO, M. H.; SONATI, M. F.; SAAD, S. O.; GESTEIRA, F.; FERNANDES, D.; NASCIMENTO, M. L.  $\beta^S$ -Gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from two regions of Brazil. **Am. J. Hematol.**, v. 45, n. 1, p. 96-97, 1984.

COSTA, F. F.; TAVELLA, M. H.; ZAGO, M. A. Deletion type  $\alpha$  -thalassemia among Brazilian patients with sickle cell anemia. **Braz. J. Genet.**, v. 12, p. 605-611, 1989.

DAUDT, L. E.; ZECHMAISTER, D.; PORTAL, L.; CAMARGO NETO, E.; SILLA, L. M.; GIUGLIANI, R. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 833-841, 2002.

DAVIES, S. C.; GILMORE, A. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. **Blood Rev.**, v. 17, p. 99-109, 2003.

DAWKINS, F.; KIM, K. S.; SQUIRES, R.S. *et al.* Cancer incidence rate and mortality rate in sickle cell disease patients at Howard University Hospital: 1986-1995. **Am J Hematol.**, v. 55, p. 188-192, 1997.

DEBAUN, M. R.; FIELD, J. J. Limitations of clinical trials in sickle cell disease: a case study of the Multi-center Study of Hydroxyurea (MSH) trial and the Stroke Prevention (STOP) trial. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 482-488, 2007.

DI NUZZO, D. V. P.; FONSECA, S. F. Anemia falciforme e infecções. **J. Pediatr.**, v. 80, n. 5, p. 347-354, 2004.

DUCATTI, R. P.; TEIXEIRA, A. E. A.; GALÃO, H. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; FETT-CONTE, A. C. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 23, n. 1, p. 23-29, 2001.

DURANTE, M.; BEDFORD, J. S.; CHEN, D. J. *et al.* From DNA damage to chromosome aberrations: Joining the break. **Mutation Research**, v. 756, p. 5-13, 2013.

ELIAS, D. B. D.; ROCHA, L. B. S.; CAVALCANTE, M. B.; PEDROSA, A. M.; JUSTINO, I. C. B.; GONÇALVES, R. P. Correlation of low levels of nitrite and high levels of fetal hemoglobin in patients with sickle cell disease at baseline. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, p. 265-269, 2012.

ELIAS, D. B. D.; BARBOSA, M. C.; ROCHA, L. B. S.; DUTRA, L. L. A.; SILVA, H. F.; MARTINS, A. M. C.; GONÇALVES, R. P. L-arginine as an adjuvant drug in the treatment of sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 160, p. 410-412, 2013.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The Comet assay: a comprehensive review. **Mutat Res.**, v.339, n.1, p. 37-59, 1995.

FELIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, n. 3, p. 203-208, 2010.

FESTER, A.; SARIBAN, E.; MEULEMAN, N. Belgian Registry of Sickle Cell Disease patients treated with Hydroxyurea. Malignancies in sickle cell disease patients treated with hydroxyurea. **Br J Haematol**, v. 123, p. 368-369, 2003.

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

FIGUEIREDO, M. S.; KERBAUY, J.; GONÇALVES, M. S.; ARRUDA, V. R.; SAAD, S. T.; SONATI, M. F.; STOMING, T.; COSTA, F. F. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. **Am. J. Hematol.**, v. 53, n. 2, p. 72-76, 1996.

FITZHUGH, C. D.; WIGFALL, D. R.; WARE, R. E. Enalapril and hydroxyurea therapy for children with sickle nephropathy. **Pediatr Blood Cancer**, v. 45, p. 982–985, 2005.

FLANAGAN, J. M.; HOWARD, T. A.; MORTIER, N.; AVLASEVICH, S. L. *et al.* Assessment of genotoxicity associated with hydroxyurea therapy in children with sickle cell anemia. **Mutat. Res.**, v. 698, p. 38–42, 2010.

FLEURY, M. K. Haplotypes of beta-globin gene in sickle cell anemia patients of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 23, n. 1, p. 57-58, 2001.

FRANCESCHIA, L.; CORROCHER, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica**, v. 89, n. 3, p. 348-356, 2004.

FRANCO, R. S.; YASIN, Z.; PALASCAK, M. B.; CIRAOLO, P.; JOINER, C. H.; RUCKNAGEL, D. L. The effect of fetal hemoglobin on the survival characteristics of sickle cells. **Blood**, v. 108, p. 1073–1076, 2006.

FRIEDRISCH, J. R. *et al.* DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. **Mutation Research**, v. 649, p. 213–220, 2008.

GALARNEAU, G.; PALMER, C. D.; SANKARAN, V. G.; ORKIN, S. H.; HIRSCHHORN, J. N.; LETTRE, G. Fine-Mapping at Three Loci Known to Affect Fetal Hemoglobin Levels Explains Additional Genetic Variation. **Nature Genetics**, v. 42, p. 1049-1051, 2010.

GALIZA NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

GARM, C.; MORENO-VILLANUEVA, M.; BÜRKLE, A.; PETERSEN, I.; BOHR, V. A.; CHRISTENSEN, K.; STEVNSNER, T. Age and gender effects on DNA strand break repair in peripheral blood mononuclear cells. **Ageing Cell**, v. 12, p. 58–66, 2013.

GERSEN, S. L.; KEAGLE, M. B. **The principles of clinical cytogenetics**. 2nd ed. Totowa: HumanPress, 2005. Disponível em: <<http://www.springer.com/biomed/human+genetics/book/978-1-4419-1687-7>>. Acesso em: 25 fev. 2014.

GLADWIN, M. T.; SHELFHAMER, J. H.; OGNIBENE, F. P.; PEASE-FYE, M. E.; NICHOLS, J. S.; LINK, B.; PATEL, D. B.; JANKOWSKI, M. A.; PANNELL, L. K.; SCHECHTER, A. N.; RODGERS, G. P. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 116, n. 2, p. 436-444, 2002.

GONÇALVES, M. S.; BOMFIM, G. C.; MACIEL, E.; CERQUEIRA, I.; LYRA, I.; ZANETTE, A.; BOMFIM, G.; ADORNO, E. V.; ALBUQUERQUE, A. L.; PONTES, A.; DUPUIT, M. F.; FERNANDES, G. B.; REIS, M. G.  $\beta$ S-Haplotypes in sickle cell anemia



patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n. 10, p. 1283-1288, 2003.

GONÇALVES, M. S.; NECHTMAN, J. F.; FIGUEIREDO, M. S.; KERBAUY, J.; ARRUDA, V. R.; SONATI, M. F.; SAAD, S. O. T.; COSTA, F. F.; STOMING, T. A. Sick cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the beta s haplotypes. **Hum. Hered.**, v. 44, n. 6, p. 322-327, 1994.

GREEN, N. S.; BARRAL, S. Genetic Modifiers of HbF and Response to Hydroxyurea in Sick Cell Disease. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 56, p. 177–181, 2011.

GULBIS, B.; HABERMAN, D.; DUFOUR, D. *et al.*, Hydroxyurea for sickle cell disease in children and for prevention of cerebrovascular events: the Belgian experience. **Blood**, v. 105, p. 2685–2690, 2005.

HANFT, V. N.; FRUCHTMAN, S. R.; PICKENS, C. V.; ROSSE, W. F.; HOWARD, T. A.; WARE, R. E. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. **Blood**, v.95, n.11, p. 3589-3593, 2000.

HANKINS, J. S.; WARE, R. E.; ROGERS, Z. R.; WYNN, L. W.; LANE, P. A.; SCOTT, J. P.; WANG, W. C. Long-term hydroxyurea therapy for infants with sickle cell anemia:the HUSOFT extension study. **Blood**, v. 106, p. 2269-2275, 2005.

HANKINS, J. S.; HELTON, K. J; MACCARVILLE, M. B.; LI, C. S.; WANG, W. C.; WARE, R. E. Preservation of spleen and brain function in children with sickle cell anemia treated with hydroxyurea. **Pediatr Blood Cancer**, v. 50, p. 293–297, 2008.

HARDISON, R. Organization, evolution and regulation of the globin genes. In: STEINBERG, M. H.; FORGET, B. G.; HIGGS, D. R.; NAGEL, R. **Disorders of hemoglobin- genetics, pathophysiology and clinical management**. 2<sup>nd</sup>. ed. New York: Cambridge University Press, 2001. p. 174-196.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v.18, p. 45–51, 2003.

HEENEY, M. M. Risk of cholelithiasis in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 90, n. 2, p. 147, 2005.

HEENEY, M. M.; WARE, R.E. Hydroxyurea for Children with Sickle Cell Disease. **Hematol. Oncol. Clin. N. Am.**, v. 24, p. 199–214, 2010.

HOFER, T.; KARLSSON, H. L.; MOLLER, L. DNA oxidative damage and strand breaks in young healthy individuals: a gender difference and the role of life style factors. **Free Radic. Res.**, v. 40, p. 707–714, 2006.

IBGE. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios**. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2010/default.shtm>>. Acesso em: 03 fev. 2014.



JAIN, S.; GLADWIN, M. T. Arginine Metabolism and Nitric Oxide Bioavailability in Sickle Cell Disease. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 32, n. 7, p. 247-248, 2010.

JANG, Y.; KIM, O. Y.; RYU, H. J.; KIM, J. Y.; SONG, S. H.; ORDOVAS, J. M.; LEE, J. H. Visceral fat accumulation determines postprandial lipemic response, lipid peroxidation, DNA damage, and endothelial dysfunction in nonobese Korean men. **J. Lipid Res**, v. 44, p. 2356–2364, 2003.

JIANG, J.; JORDAN, S. J.; BARR, D. P.; GUNTHER, M. R.; MAEDA, H.; MASON, R. P. In vivo Production of Nitric Oxide in Rats after Administration of Hydroxyurea. **Molecular Pharmacology**, v. 52, p. 1081-1086, 1997.

JUUL, T.; MALOLEPSZY, A.; DYBKAER, K. *et al.* The in vivo toxicity of hydroxyurea depends on its direct target catalase. **J. Biol. Chem.**, v. 285, p. 21411-21415, 2010.

KLINGS, E. S.; WYSZYNSKI, D. F.; NOLAN, V. G.; STEINBERG, M. H. Abnormal pulmonary function in adults with sickle cell anemia. **Am. J. Respir. Crit. Care Méd.**, v. 173, p. 1264-1269, 2006.

KRATOVIL, T.; BULAS, D.; DRISCOLL, M. C. *et al.* Hydroxyurea therapy lowers TCD velocities in children with sickle cell disease. **Pediatr Blood Cancer.**, v. 47, p. 894–900, 2006.

KUMAR, S.; BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicol. Lett.**, v. 157, p. 175, 2005.

LANZKRON, S.; STROUSE, J. J.; WILSON, R. *et al.*, Systematic review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. **Ann Intern Med**, v. 148, p. 939–955, 2008.

LE FEVRE, A. C.; BOITIER, E.; MARCHANDEAU, J. P. *et al.* Characterization of DNA reactive and non-DNA reactive anticancer drugs by gene expression profiling. **Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen**, v. 619, p. 16–29, 2007.

LEBENSBURGER, J. D.; HOWARD, T.; HU, Y.; PESTINA, T. I.; GAO, G.; JOHNSON, M.; ZAKHARENKO, S. S.; WARE, R. E.; TUOMANEN, E. I.; PERSONS, D. A.; ROSCH, J. W. Hydroxyurea therapy of a murine model of sickle cell anemia inhibits the progression of pneumococcal disease by down-modulating E-selectin. **Blood**, v. 119, p. 1915-1921, 2012.

LETTRE, G.; SANKARAN, V. G.; BEZERRA, M. A. C.; ARAÚJO, A. S.; UDA, M. *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. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 105, n. 33, p. 11869–11874, 2008.

LI, J.C; KAMINSKAS, E. Progressive formation of DNA lesions in cultured Ehrlich ascites tumor cells treated with hydroxyurea. **Cancer Res.**, v. 47, p. 2755–2758, 1987.

LOBO, C. L. C.; BUENO, L. M.; MOURA, P.; OGEDA, L. L.; CASTILHO, S.; CARVALHO, S. M. F. Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Panam. Salud Pública**, v. 13, n. 2, p. 154-159, 2003.

MACKA, A. K.; KATOA, G. J. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 38, n. 8, p. 1297-1243, 2006.

MAHAJAN, M. C.; WEISSMAN, S. M. Multi-protein complexes at the beta-globin locus. **Brief Funct. Genomic Proteomic**, v. 5, n. 1, p. 62-65, 2006.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. **Mutat. Res.**, v. 471, p. 21–27, 2000.

MALUF, A.; PRAB, D.; FRIEDRISCH, J. R. *et al.*, Length of treatment and dose as determinants of mutagenicity in sickle cell disease patients treated with hydroxyurea. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 26–29, 2009.

MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.**, v. 2013, n.1, p. 362-369, 2013.

MARENGO-ROWE, A. J. Structure-function relations of human hemoglobins. **Proc. Bayl Univ Med Cent**, v. 19, n. 3, p. 239-245, 2006.

MCKENNA, D. J.; MCKEOWN, S. R.; MCKELVEY-MARTIN, V. J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 183–190, 2008.

METCALFE, S. A.; BARLOW-STEWART, K.; CAMPBELL, J.; EMERY, J. Genetics and blood Haemoglobinopathies and clotting disorders. **Aust. Fam. Physician**, v. 36, n. 10, p. 812-819, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil), Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. Manual de Educação em Saúde: Linha de cuidado em Doença Falciforme. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009. 8p

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil), Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. Manual de Educação em Saúde: auto-cuidado na Doença Falciforme. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. 78p

MODELL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bull. World Health Org.**, v. 86, n. 6, p. 417-496, 2008.

MONTALEMBERT, M.; DAVIES, S. C. Is hydroxyurea leukemogenic in children with sickle cell disease? **Blood**, v. 98, p. 2878-2879, 2001.

MONTALEMBERT, M.; BEGUE, P.; BERNAUDIN, F. *et al.*, Preliminary report of a toxicity study of hydroxyurea in sickle cell disease. French Study Group on Sickle Cell Disease. **Arch Dis Child**, v. 81, p. 437–439, 1999.

MORRIS, C. R.; KUYPERS, F. A.; LAVRISHA, L.; ANSARI, M.; SWEETERS, N.; STEWART, M.; GILDENGORIN, G.; NEUMAYR, L.; VICHINSKY, E. P. A randomized, placebo-control trial of arginine therapy for the treatment of children with sickle cell disease hospitalized with vaso-occlusive pain episodes. **Haematologica**, v. 98, n. 9, p. 1375-1382, 2013.

MOSCHOVI, M.; PSYCHOU, F. *et al.* Hodgkin's disease in a child with sickle cell disease treated with hydroxyurea. **Pediatr. Hematol. Oncol.**, v, 18, p. 371-376, 2001.

NAGEL, R. L. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. **Einstein Quart. J. Biol. Med.**, v. 2, p. 53-62, 1984.

NAGEL, R. L.; STEINBERG, M. H. Genetics of  $\beta^S$  gene: origins, genetic, epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In: STEINBERG, M. H.; FORGET, B. G.; HIGGS, D. R.; NAGEL, R. (Eds). **Disorders of hemoglobin- genetics, pathophysiology and clinical management**. Rock Island Ct.: Matthews Book, 2001. p. 711-755.

NAHAVANDI, M.; PERLIN, E.; KASSIM, O. *et al.* Upregulation of TNF-alpha by hydroxyurea in patients with sickle cell anemia. **Blood.**, v. 96, n. 1, p. 44, 2000.

NAOUM, P. C.; ÁLVARES FILHO, F.; DOMINGOS, C. R. B.; FERRARI, F.; MOREIRA, H. W.; SAMPAIO, Z. A.; MAZIERO, P. A.; CASTILHO, E. M. Hemoglobinas anormais no Brasil: prevalência e distribuição geográfica. **Rev. Bras. Patol. Clín.**, v. 23, n. 3, p. 68-72, 1987.

NAOUM, P. C.; DOMINGOS, C. R. B., Doença falciforme no Brasil: origem, genótipos, haplótipos e distribuição geográfica. **J. Bras. Patol.**, v.33, p.145-153, 1997.

NASCIMENTO, N. M. J; MELO, T. R. F., Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Compostos Híbridos para o Tratamento dos Sintomas da Anemia Falciforme. **Rev. Virtual Quim.**, v. 3, p. 447-451, 2012.

NOGUCHI, C. T.; RODGERS, G. P.; SERJEANT, G. R. *et al.*, Levels of fetal hemoglobin necessary for treatment of sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 318, p. 96–99, 1988.

OLD, J. M. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. **Blood**, v. 17, n. 1, p. 43-53, 2003.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature**, v.1, n.1, 2006.

OLIVE, P. L.; BANATH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet" assay. **Radiat Res.**, v.122, n.1, p.86-94, 1990.

PANTE-DE-SOUSA, G.; MOUSINHO-RIBEIRO, R. C.; SANTOS, E. J.; GUERREIRO, J F. Beta-globin haplotype analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. **Am. J. Hum. Biol.**, v. 26, p. 365-373, 1999.

PANTE-DE-SOUSA, G.; RIBEIRO, R. C. M.; SANTOS, E. J. M.; ZAGO, M. A.; GUERREIRO, J. F. Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. **Genet. Mol. Biol.**, v. 21, n. 4, p. 427-430, 1998.

PINHEIRO, L. S.; GONÇALVES, R. P.; TOMÉ, C. A. S; ALCÂNTARA, A. E. E; MARQUES, A. R. C; SILVA, M. M. Prevalência de hemoglobina S em recém-nascidos de Fortaleza: importância da investigação neonatal. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 28, n. 2, p.122-125, 2006.

PLATT, O. S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, n. 13, p. 1362-1369, 2008.

PLATT, O. S.; BRAMBILLA, D. J.; ROSSE, W. F.; MILNER, P. F.; CASTRO, O.; STEINBERG, M. H. *et al.* Mortality in sickle cell disease: life expectancy and risk factors for early death. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, n. 23, p. 1639-1644, 1994.

PLATT, O.S.; ORKIN, S.H.; DOVER, G. *et al.*, Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. **J Clin Invest**, v. 74, p. 652–656, 1984.

POWARS, D. R. Beta-S-Gene-Cluster haplotypes in sickle cell anemia: clinical and hematological features. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 5, n. 3, p. 475-493, 1991.

QUEIROZ, I. M. L. P. **Características clínicas, hematológicas e genéticas em pacientes homocigotos para a hemoglobinopatia S da Bahia e de São Paulo**. 1996. 111f. Dissertação (Mestrado em Hematologia)- Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1996.

RAUCH, A.; BORROMEO, M.; GHAFOR, A. *et al.*, Leukemogenesis of hydroxyurea in the treatment of sickle cell anemia. **Blood**, v. 94, p. 415, 1999.

RIEDER, O. O escravo no Ceará. In: COLETÂNEA. Da Senzala para os Salões. Fortaleza: Secretaria de Cultura, Turismo e Desporto, 1988.

ROCHA, L. B. S; JÚNIOR, G. B. S; DAHER, E. F.; ROCHA, H. A. L; ELIAS, D. B. D.; GONÇALVES, R. P. Kidney dysfunction and beta S-haplotypes in patients with sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, p. 171-173, 2013.

SAAD, S. T.; LAJOLO, C.; GILLI, S. *et al.* Follow-up of sickle cell disease patients with priapism treated by hydroxyurea. **Am J Hematol**, v. 77, p. 45–49, 2004.

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

SANTOS, J. L.; BOSQUESI, P. L.; ALMEIDA, A. E. *et al.*, Mutagenic and Genotoxic Effect of Hydroxyure. **Int J Biomed Sci**, v. 7, p. 263-267, 2011.

SCAVELLA, A.; LEIVA, L.; MONJURE, H. *et al.* Effect of L-Arginine supplementation on Immune Responsiveness in Patients with Sickle Cell Disease. **Pediatr Blood Cancer**, v. 55, p. 318-323, 2010.

SCHULTZ, W. H.; WARE, R. E. Malignancy in sickle cell disease. **Am J Hematol**, v. 74, p. 249-253, 2003.

SERJEANT, G. R. Screening for sickle-cell disease in Brazil. **Lancet**, v. 356, p. 168-169, 2000.

SHAFFER, L. G.; LOVAK, M. L.; CAMPBELL, L. J. ISCN: An International System for Chromosome Nomenclature, Basel: Karger 2009.

SINGH, N.; MCCOY, M.; TICE, R.; SCHNEIDER, E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p.184–191, 1988.

SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T.; Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 2, p. 144-148, 2006.

SILVA FILHO, I. L.; GONÇALVES, M. S.; ADORNO, E. V.; CAMPOS, D. P.; FLEURY, M. K. Triagem de hemoglobinopatias e avaliação da degeneração oxidativa da hemoglobina em trabalhadores portadores do traço falciforme (HbAS), expostos a riscos ocupacionais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 27, n. 3, p. 183-187, 2005.

SILVA, L. B.; GONÇALVES, R. P.; MARTINS, M. F. Study of the correlation between fetal hemoglobin levels and the prognosis of patients with sickle cell anemia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, n. 6, p. 417-420, 2009a.

SILVA, L. B.; GONCALVES, R. P; RABENHORST, S.H.B. Analysis of sickle cell anemia haplotypes in Fortaleza reveals the ethnic origins of Ceará state population. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 45, n. 2, p.115-118, 2009b.

SILVA, L. B.; GONCALVES, R. P. Phenotypic characteristics of patients with sickle cell anemia related to  $\beta$ S-Globin gene haplotypes in Fortaleza, Ceara. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, n. 1, p.40-44, 2010

SILVA, W. S.; LASTRA, A.; OLIVEIRA, S. F.; KLUTAU-GUIMARÃES, M.; GRISOLIA, C. K. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 2, p. 2561-2566, 2006.

SMITH, T. R.; MILLER, M. S.; LOHMAN, K. K.; CASE, L. D; HU, J. J. DNA damage and breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 883–889, 2003.

SOMMER, C. K.; GOLDBECK, A. S.; WAGNER, S. C.; CASTRO, S. M. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 8, p. 1709-1714, 2006.

STAMATOYANNOPOULOS, G.; NIENHUIS, A. W. Hemoglobin Switching. In: STAMATOYANNOPOULOS, G.; NIENHUIS, A.W.; MAJERUS, P.W.; VARNUS, H. **The molecular basis of blood disease**. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p. 107-156.

STAMATOYANNOPOULOS, G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. **Exp. Hematol.**, v. 33, p. 259-271, 2005.

STEINBERG, M. H.; ADEWOYE, A. H. Modifiers genes and sickle cell anemia. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 13, p. 131-136, 2006.

STEINBERG, M. H.; BENZ JUNIOR, E. J. Hemoglobin synthesis, structure and function. In: HOFFMAN, R.; BENZ JUNIOR, E.J.; SHATTIL, S.J.; FURIE, B.; COHEN, H.J.; SILBERSTEIN, L.E. **Hematology**. 2<sup>nd</sup>. ed. New York: Churdhill Livingstone, 1995. p. 458-468.

STEINBERG, M. H. Modulation of fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Hemoglobin**, v. 25, p. 195-211, 2001.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 129, p. 465-481, 2005.

STEINBERG, M. H.; BARTON, F.; CASTRO, O. *et al.* Effect of hydroxiurea on mortality and morbidity in adults sickle cell anemia: risk and benefits up to 9 years of treatment. **JAMA**, v. 289, n. 13, p. 1645- 1651, 2003.

STEINBERG, M. H.; EMBURY, S. H.  $\alpha$ -thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **Blood**, v. 68, p. 985-990, 1986.

STEINBERG, M.H.; McCARTHY, W.F.; CASTRO, O.; BALLAS, S.K.; ARMSTRONG, F.D.; SMITH, W.; ATAGA, K.; SWERDLOW, P.; KUTLAR, A.; DeCASTRO, L.; WACLARWIN, M.A. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: a 17.5 year follow-up. **Am J Hematol.**, v.85, p.403-408, 2010.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364, n. 9442, p. 1343-1360, 2004.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R. L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. **Am. J. Hematol.**, v. 32, n. 1, p. 66-69, 1989.

TAYLOR, J. G.; DEEPIKA, S.; DARARI, M. D. *et al.* Therapy-Related Acute Myelogenous Leukemia in a Hydroxyurea-Treated Patient With Sickle Cell Anemia. **Ann Intern Med**, v. 15, p. 722–724, 2011.

TESTA, U. Fetal hemoglobin chemical inducers for treatment of hemoglobinopathies. **Ann Hematol**, v. 88, p. 505–528, 2009.

THEIN, S. L.; MENZEL, S.; LATHROP, M.; GARNER, C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 2, p. 216–223, 2009.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206–221, 2000.



VERGER, P. **Fluxo e refluxo do tráfico de escravos entre o Golfo do Benin e a Bahia de Todos os Santos**: dos séculos XVII a XIX. São Paulo: Corrupio, 1987.

VERISSIMO, M. P. A. Crescimento e desenvolvimento nas doenças falciformes. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v 29, n. 3, p. 271-274, 2007.

VICHINSKY, E. P.; STYLES, L. A.; COLANGELO, L. H.; WRIGHT, E. C.; CASTRO, O.; NICKERSON, B. Acute chest syndrome in sickle cell disease: clinical presentation and course. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood**, v. 89, p. 1787-1792, 1997.

VOSKARIDOU, E.; CHRISTOULAS, D.; BILALIS, A. *et al.* The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17-year, single center trial (LaSHS). **Blood**, v. 115, p. 2354-2363, 2010.

WAGNER, S. C.; FRIEDRICH, J. R.; JOB, F.; HUTZ, M. H. Caracterização molecular da anemia falciforme em pacientes de Porto Alegre. **Rev. Bras. Genet.**, v. 190, p. 244, 1996.

WANG, W.C.; HELMS, R.W.; LYNN, H.S. *et al.* Effect of hydroxyurea on growth in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS Study. **J Pediatr.**, v.140, p. 225-229, 2002.

WANG, W.C.; WARE, R.E.; MILLER, S.T. *et al.* Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). **Lancet**, v. 377, p. 1663-1672, 2011.

WARE, R. E.; AYGUN, B. Advances in the use of hydroxyurea. **Hematology**, p. 62-69, 2009.

WARE, R. E. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 115, p. 5300-5311, 2010.

WATANABE, A. M.; PIANOVISK, M. A. D; ZANIS NETO, J.; LICHTVAN, L. C. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; DOMINGOS, M. T.; WITTIG, E. O. Prevalência da hemoglobina S no Estado do Paraná, Brasil, obtida pela triagem neonatal. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 993-1000, 2008.

WAYE, J. S.; CHUI, D. H. K. The  $\alpha$ -globin gene cluster: genetics and disorders. **Clin. Invest. Med.**, v. 24, p. 103-109, 2001.

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

WIERENGA, K. J.; HAMBLETON, I. R.; LEWIS, N. A. Survival estimates for patients with homozygous sickle-cell disease in Jamaica: a clinic-based population study. **Lancet**, v. 357, n. 9257, p. 680-683, 2001.

WILSON, S. Acute leukemia in a patient with sickle-cell anemia treated with hydroxyurea. **Ann Intern Med**, v. 133, p. 925-926, 2000.

YOUNG, N. S.; BROWN, K. E. Parvovirus B19. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 6, p. 586-597, 2004.

ZAGO, M. A. Considerações gerais. In: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes**. Brasília, 2002. p. 7-12.

ZAGO, M. A.; FIGUEIREDO, M. S.; OGO, S. H. Bantu beta S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v. 88, n. 3, p. 295-298, 1992.

ZAGO, M. A.; SILVA, W. A.; DALLE, B.; GUALANDRO, S.; HUTZ, M. H.; LAPOUMEROUILLIE, C.; TAVELLA, M. H.; ARAUJO, A. G.; KRIEGER, J. E.; ELION, J.; KRISHNAMOORTHY, R. Atypical beta (S) haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. **Am. J. Hematol.**, v. 63, n. 2, p. 79-84, 2000.

ZAGO, M. A.; SILVA, W. A.; FRANCO, R. F. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the Brazilian population. **Cienc. Cult. (Sao Paulo)**, v. 51, p. 226-234, 1999.

ZAGO, M. A.; SILVA, W. A.; GUALANDRO, S.; YOKOMIZU, I. K.; ARAUJO, A. G.; TAVELA, M. H.; GERARD, N.; KRISHNAMOORTHY, R.; ELION, J. Rearrangements of the beta-globin gene cluster in apparently typical beta S haplotypes. **Haematologica**, v. 86, n. 2, p. 142-145, 2001.

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

ZIEGLER-SKYLAKAKIS, K.; SCHWARZ, L.R.; ANDRAE, U. Microsome and hepatocyt-mediated mutagenicity of hydroxyurea and related aliphatic hydroxamic acids in V79 Chinese hamster cells. **Mutat. Res.**, v. 152, 225-231, 1985.

ZIMMERMAN, S.A.; SCHULTZ, W.H.; BURGETT, S. *et al.* Hydroxyurea therapy lowers transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 110, p. 1043-1047, 2007.







**ANEXO A**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E**  
**ENFERMAGEM (FFOE)**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA  
 (PRIMEIRA ETAPA)**

**Prezado (a) paciente,**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada: **“LESÃO NO DNA, ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS E SUA CORRELAÇÃO COM POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME TRATADOS COM HIDROXIURÉIA”**, que tem como objetivo principal avaliar se o tratamento com Hidroxiuréia representa alguma preocupação em relação à genotoxicidade e mutagenicidade, e se fatores genéticos estariam envolvidos. A pesquisa é relevante para todos os pacientes com anemia falciforme, pois seus resultados colaborarão para a busca de uma maior segurança dos pacientes com a doença.

Para o desenvolvimento deste estudo será necessário um grupo de pacientes com anemia falciforme tratados com hidroxiuréia. É necessário que os participantes deste estudo colem uma amostra de sangue (10 mL) em tubo com EDTA e uma amostra de sangue (10 mL) em um tubo com heparina. A coleta será realizada por profissional habilitado e com todas as técnicas adequadas.

A coleta de sangue será realizada no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará - HEMOCE, localizado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo; em dias em que os pacientes já estarão realizando outros exames, por conta do seu acompanhamento médico. Caso seja necessária a vinda do paciente, exclusivamente, para a participação em nossa pesquisa, os pesquisadores se responsabilizarão por seu transporte até o local da coleta.

Os riscos associados ao estudo são apenas os da coleta de sangue, podendo haver o aparecimento de um pequeno hematoma, isto é, um pequeno derramamento de sangue no local da coleta. Lembrando que todo material utilizado é descartável e estéril, e os profissionais envolvidos são capacitados para tal função.

Convido o(a) Sr(a) a participar da pesquisa, em caso de dúvida, poderá comunicar-se com a pesquisadora Ms. Lillianne Brito da Silva Rocha, que reside na rua Silva Paulet, 2830, Apto 1104, bairro Aldeota, Fortaleza, CE, fone: (0xx85)-33668264; (0xx85)- 99228002. Para informações quanto aos aspectos éticos da pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídeo, situado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1290, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE ou através do telefone (0xx85) 3366 8589. Para tanto, necessitamos que o Senhor (a) autorize a obtenção da coleta de sangue e das informações para que seja realizada a pesquisa.

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material. O participante pode desistir de participar, a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda

assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa.

Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com o entrevistado e a outra com o pesquisador.

Eu, \_\_\_\_\_ fui informado (a) do objetivo deste trabalho de forma clara e detalhada, assim como dos desconfortos previstos e benefícios esperados. Certo e ciente dos detalhes acima descritos, e, por concordar na íntegra com todos os termos acima expostos, manifesto, por vontades própria, livre e consciente, o propósito de participar do presente estudo.

O (a) profissional \_\_\_\_\_ certificou-me de que todas as informações por mim fornecidas serão utilizadas apenas para fins do presente projeto de pesquisa e serão divulgadas de forma anônima.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do participante da pesquisa

---

Assinatura de quem obteve o termo

## ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E  
ENFERMAGEM (FFOE)

---

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA  
(SEGUNDA ETAPA)**

**Prezado (a) paciente,**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada: **“LESÃO NO DNA, ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS E SUA CORRELAÇÃO COM POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME TRATADOS COM HIDROXIURÉIA”**, que tem como objetivo principal avaliar se o tratamento com Hidroxiuréia representa alguma preocupação em relação à genotoxicidade e mutagenicidade, e se fatores genéticos estariam envolvidos. A pesquisa é relevante para todos os pacientes com anemia falciforme, pois seus resultados colaborarão para a busca de uma maior segurança dos pacientes com a doença.

Para o desenvolvimento deste estudo será necessário um grupo de pacientes com anemia falciforme tratados com hidroxiuréia, e que foram selecionados da primeira etapa do estudo em que foram coletadas uma amostra de sangue (10 mL) em tubo com EDTA e uma amostra de sangue (10 mL) em um tubo com heparina para análises de genotoxicidade e perfil genético. Neste segundo momento será coletada uma amostra de sangue medular (3mL) em tubo com heparina por médico hematologista habilitado.

A coleta será realizada no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará - HEMOCE, localizado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo; em dias em que os pacientes já estarão realizando outros exames, por conta do seu acompanhamento médico. Caso seja necessária a vinda do paciente, exclusivamente, para a participação em nossa pesquisa, os pesquisadores se responsabilizarão por seu transporte até o local da coleta.

Os riscos associados ao estudo são apenas os da coleta sangue medular, podendo haver o aparecimento de um pequeno hematoma, isto é, um pequeno derramamento de sangue no local da coleta. O paciente também poderá ficar sentido uma pequena dor no local da coleta. Lembrando que todo material utilizado é descartável e estéril, e os profissionais envolvidos são capacitados para tal função.

Convido o(a) Sr(a) a participar da pesquisa, em caso de dúvida, poderá comunicar-se com a pesquisadora Ms. Lilianne Brito da Silva Rocha, que reside na rua Silva Paulet, 2830, Apto 1104, bairro Aldeota, Fortaleza, CE, fone: (0xx85)-33668264; (0xx85)- 99228002. Para informações quanto aos aspectos éticos da pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídeo, situado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1290, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE ou através do telefone (0xx85) 3366 8589. Para tanto, necessitamos que o Senhor (a) autorize a obtenção da coleta de sangue e das informações para que seja realizada a pesquisa.

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material. O participante pode desistir de participar, a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente

proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa.

Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com o entrevistado e a outra com o pesquisador.

Eu, \_\_\_\_\_ fui informado (a) do objetivo deste trabalho de forma clara e detalhada, assim como dos desconfortos previstos e benefícios esperados. Certo e ciente dos detalhes acima descritos, e, por concordar na íntegra com todos os termos acima expostos, manifesto, por vontade própria, livre e consciente, o propósito de participar do presente estudo.

O (a) profissional \_\_\_\_\_ certificou-me de que todas as informações por mim fornecidas serão utilizadas apenas para fins do presente projeto de pesquisa e serão divulgadas de forma anônima.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do participante da pesquisa

---

Assinatura de quem obteve o termo