



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS – MACPRO

**DESCRIÇÃO DE UM PERFIL HEMATOLÓGICO/CLÍNICO E DE
ANCESTRALIDADE DA ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO DO PARÁ.**

KEITH TARSILA RODRIGUES FURTADO

BELÉM – PA

2018

KEITH TARSILA RODRIGUES FURTADO

**DESCRIÇÃO DE UM PERFIL HEMATOLÓGICO/CLÍNICO E DE
ANCESTRALIDADE DA ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO DO PARÁ.**

Artigo de mestrado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas - MACPRO, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para defesa de mestrado e obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas Profissionalizante.

Orientadora: Profa. Dra. Greice de Lemos Cardoso Costa.

BELÉM – PA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F992d Furtado, Keith Tarsila Rodrigues
Descrição de um perfil hematológico/clínico e de ancestralidade da anemia
falciforme no estado do Pará.
Keith Tarsila Rodrigues Furtado. — 2018
29 f. : il. color

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas
(MACPRO), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém,
2018.

Orientação: Profa. Dra. Greice de Lemos Cardoso Costa

1. Anemia Falciforme. 2. Parâmetros Hematológicos. 3. Ancestralidade
Genética. 4. Variantes Genéticas. I. Costa, Greice de Lemos Cardoso, *orient.* II. Título

CDD 616.1527

KEITH TARSILA RODRIGUES FURTADO

**DESCRIÇÃO DE UM PERFIL HEMATOLÓGICO/CLÍNICO E DE
ANCESTRALIDADE DA ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO DO PARÁ.**

Artigo de mestrado submetido ao programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas – MACPRO, da Universidade Federal do Pará, como requisito para defesa de mestrado e obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas Profissionalizante.

Orientadora: Prof. Dra. Greice de Lemos Cardoso Costa

Laboratório de Genética, ICB-UFPA

Banca Examinadora: Prof. Dra. Isabela Guerreiro Diniz

UFPA

Prof. Dra. Rita de Cassia Mousinho Ribeiro

UFPA

Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira

UFPA

Belém, 23 de Maio de 2018

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no oceano. Mas o oceano seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a DEUS, pois sem a sua presença eu não chegaria até aqui, vem Dele tudo que sou, o que tenho e o que espero. “Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos” (Pv 16:3).

A minha família por todo amor, paciência e compreensão que recebo todos os dias, por estarem ao meu lado nessa caminhada, sempre acreditando em minhas conquistas. Minha preciosa mãe e minha única e tão amada irmã, que são as metades do meu coração, obrigada por sonharem os meus sonhos e acreditarem neste dia. Todo amor do mundo é nosso!

Ao meu marido José Neto, por estar ao meu lado, sendo amigo e companheiro, por ter as palavras mais duras em alguns momentos, mas também as mais doces quando precisei. Nos dias de incerteza você foi o meu porto seguro. Obrigada por tudo que me ensinou, por sempre me incentivar a buscar mais conhecimentos, a ser uma pessoa melhor e por todos os dias de amor ao teu lado.

A minha áfavel e querida orientadora Prof. Dra. Greice Lemos, que me recebeu de braços abertos desde o primeiro dia. Orgulho-me muito por ter sido sua aluna e ter tido a oportunidade de adquirir grandiosos conhecimentos. Obrigada por toda a calma e paciência de sempre, por cada enorme abraço carinhoso que recebia quando nos encontrávamos. Muito além de orientadora, foi uma amiga, um ser celestial em minha jornada. Prof^a, dizer obrigada ainda é pouco para demonstrar a gratidão que sinto.

Aos meus amigos de vida, da graduação, do mestrado, da célula, da igreja, a todos que participaram de forma direta ou indireta, com palavras, conversas, mensagens ou orações; acredito que a vida é bem mais leve quando se tem amigos.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
REFERENCIAL TEÓRICO	7
1.1 A MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA	7
1.2 ANEMIA FALCIFORME	7
1.2.1 A Hemoglobina Fetal	9
1.3 TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME: HIDROXIURÉIA, EFEITOS ADVERSOS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	10
1.4 ANCESTRALIDADE GENÉTICA	12
1.5 OBJETIVO GERAL	13
1.5.1 Objetivos Específicos	14
ARTIGO	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

RESUMO

A anemia falciforme é a hemoglobinopatia predominante em todo o mundo, e no Brasil é a doença hereditária mais comum. Originou-se na África, e se distribuiu ao redor do mundo, chegando às Américas pela imigração forçada de africanos trazidos ao continente como escravos. A heterogeneidade clínica da doença está relacionada a dois principais processos patogênicos: a hemólise crônica e a elevada viscosidade/oclusão vascular. A proporção de hemoglobina fetal (HbF) persistente no organismo tem sido, sem dúvida, o principal achado favorecendo a melhora clínica desses pacientes. A hidroxiuréia (HU) é uma droga que tem a capacidade de indução do aumento dos níveis de HbF, porém, apesar de benefícios comprovados, ainda há muitas barreiras em relação ao uso desse medicamento, devido os efeitos adversos trazidos pela sua administração. Assim, para a garantia da qualidade de vida dos pacientes com anemia falciforme e o auxílio das tomadas de decisões acerca de sua terapêutica são necessários protocolos que possam estabelecer um possível prognóstico para aqueles pacientes que não estão certos sobre a adesão ao tratamento com HU, permitindo assim uma maior segurança por parte do indivíduo. Para isso, são necessárias exaustivas investigações isoladas acerca de associações gene e parâmetros hematológicos/clínicos para escolha de variantes genéticas que de forma significativa possam mostrar possíveis condutas a partir de prováveis prognósticos individuais. No entanto, essas associações, em populações particularmente miscigenadas, como do estado do Pará, podem ser ainda mais lentas de elucidação, pois o padrão pode diferir de acordo com a subestruturação populacional, mostrando resultados discordantes da maioria de outros estudos realizados. Em razão disso, o presente trabalho visa investigar as associações de parâmetros hematológicos, hemoglobina (Hb) e hemoglobina fetal (HbF), relacionados à gravidade da doença, às manifestações clínicas e ao perfil étnico prevalente entre os pacientes com anemia falciforme do estado do Pará, para servir de auxílio em futuros trabalhos que investiguem variantes genéticas prevalentes em grupos étnicos específicos, para busca de associações com a gravidade clínica da anemia falciforme.

PALAVRAS-CHAVE: Anemia falciforme; Parâmetros hematológicos; Ancestralidade genética.

ABSTRACT

Sickle cell anemia is the predominant hemoglobinopathy in the world, and in Brazil is the most common hereditary disease. It originated in Africa, and was distributed around the world, arriving at the Americas by the forced immigration of Africans brought to the continent like slaves. The clinical heterogeneity of the disease is related to two main pathogenic processes: chronic hemolysis and high vascular viscosity / occlusion. The proportion of persistent fetal hemoglobin (HbF) in the body has undoubtedly been the main finding favoring the clinical improvement of these patients. Hydroxyurea (HU) is a drug that has the ability to induce increased HbF levels, but despite proven benefits, there are still many barriers to using this drug due to the adverse effects brought about by its administration. Thus, in order to guarantee the quality of life of patients with sickle cell anemia and to help them make decisions about their therapy, protocols are needed to establish a possible prognosis for those patients who are not sure about adherence to HU treatment, allowing thus greater security on the part of the individual. For this, it is necessary to carry out exhaustive isolated investigations about gene associations and hematological / clinical parameters for the choice of genetic variants that in a significant way can show possible conducts from probable individual prognoses. However, these associations in particularly mixed populations, such as in the state of Pará, may be even slower to elucidate, since the pattern may differ according to population substructure, showing results that are discordant to most other studies. Therefore, the present study aims to investigate the associations of hematological parameters, hemoglobin (Hb) and fetal hemoglobin (HbF), related to the severity of the disease, clinical manifestations and ethnic profile prevalent among patients with sickle cell disease in the state of Pará, to serve as an aid in future research investigating genetic variants prevalent in specific ethnic groups, in order to search for associations with the clinical severity of sickle cell anemia.

KEYWORDS: Sickle cell anemia; Hematologic parameters; Genetic ancestry.

REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 A MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) é uma molécula composta por quatro subunidades formando um complexo de duas cadeias α (alfa) e duas cadeias β (beta), com peso molecular de 64.000 daltons, tendo como função principal o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e em alguns momentos participando do transporte de gás carbônico no sentido inverso. Essas quatro cadeias se dobram e se ajustam para formar um tetrâmero globular, que interagem entre si fazendo com que ocorra uma alteração alostérica cooperativa nessa molécula, permitindo assim que a hemoglobina absorva e libere oxigênio com mais eficiência do que se estivesse em cadeia única (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; WATANABE, 2015)

A Hb é constituída por um átomo central (íon de ferro) e por 2 pares de subunidades polipeptídicas idênticas, que são as cadeias globinicas, cada par dessas cadeias é codificado por um gene diferente. O grupamento de genes da globina α , está localizado no cromossomo 16, enquanto que o grupamento da globina β , encontra-se no cromossomo 11. Estes genes estão presentes nos cromossomos na mesma ordem em que são expressos no momento do desenvolvimento humano. Durante o período fetal, o tipo que predomina é a hemoglobina fetal (HbF) (MACHADO, 2015).

Alterações que possam ocorrer e modificar a estrutura da hemoglobina e alterações nas quais uma ou mais cadeias globinicas são sintetizadas com taxas reduzidas, são conhecidas como hemoglobinopatias estruturais e talassemias, respectivamente. Devido a alta miscigenação da população brasileira, ocorreu grande dispersão dos genes que originam as hemoglobinas variantes e que são determinantes nas hemoglobinopatias e talassemias. Entre as hemoglobinopatias estruturais, a Doença Falciforme inclui indivíduos com anemia falciforme (AF) e distúrbios heterozigotos compostos, sendo a patologia hereditária mais comum e impactante no mundo (LOPES, 2014, VILELA et al, 2014).

1.2 ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme (AF) é uma doença de herança autossômica recessiva que teve origem em países africanos, sendo assim de maior incidência na população negra, tendo sido descrita pela primeira vez em 1910, por James Herrick, um médico de Chicago (NAOUM, 1997). Por se tratar de uma hemoglobinopatia a AF resulta de uma má formação do eritrócito,

e este assume transitoriamente uma forma de foice, dando origem ao nome falciforme (ALVES, 2014).

A principal característica da anemia falciforme é a presença da hemoglobina S (Hb S), que é gerada em função de uma mutação na cadeia beta da globina. Essa Hb S causa a polimerização da hemoglobina que forma a hemácia em foice gerando diversos danos, dentre eles a retirada precoce do eritrócito da corrente sanguínea e, como consequência maiores chances de haver processos de obstrução do fluxo sanguíneo (ALEXANDRE, 2012).

Em todo continente americano o gene da HbS é bem frequente, por conta da imigração forçada. Já no Brasil, as regiões Sudeste e Nordeste apresentam maior frequência. De acordo com o Programa Nacional de Triagem Neonatal do Ministério da Saúde, nascem a cada ano no Brasil 3.500 crianças com doença falciforme e 200.000 com traço falciforme, e segundo estimativas 7.200.000 pessoas são portadoras do traço falcêmico (HbAS). Dentre os estados brasileiros, a incidência maior de doença falciforme ocorre na Bahia, seguida de Rio de Janeiro, Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais e Goiás (SABINO E GADELHA, 2016).

Além de ser a forma mais prevalente entre as doenças falciformes, a AF geralmente apresenta maior gravidade clínica e hematológica. Por se tratar de uma alteração da globina beta, características clínicas dessa doença, muitas vezes, são notadas apenas depois da estabilização na produção das globinas, que ocorre por volta do sexto mês de vida, quando a síntese da globina gama é interrompida e o gene beta sintetiza as globinas beta normais (NAOUM, 2000). A AF apresenta importância clínica, hematológica, bioquímica, genética, antropológica e epidemiológica, entre outras, devida a alta morbidade e mortalidade que apresenta.

A sintomatologia clínica apresenta grande variação entre os pacientes com AF, porém todos possuem um mesmo defeito genético, então as diferenças clínicas observadas nos pacientes dependem de algumas variáveis, tais como: fatores ambientais e genéticos. E dentre os fatores genéticos que permitem a melhor compreensão da heterogeneidade clínica da AF, pode-se destacar os níveis de HbF, que pode ser considerado um fator de modulação genética da doença (MOUSINHO *et al*, 2008).

1.2.1 A Hemoglobina Fetal

Formada por duas cadeias α e duas cadeias γ (gama), a hemoglobina fetal é característica do período fetal de desenvolvimento, pertencendo à família da beta globina humana. Encontrase localizada no cromossomo 11 e 16, os genes dessa família atuam em diversas fases do desenvolvimento, gerando a redução na síntese logo após o nascimento. Na vida adulta, os níveis de Hb fetal representam 1% ou menos de Hb totais, a média fica em torno de 0,4% (ZAMARO et al, 2003).

Sendo produzida pelos genes da globina γ , a HbF é encontrada em um pequeno contingente de eritrócitos (células F), cujo o número é geneticamente determinado. Os níveis de HbF aumentados muitas vezes são associados a uma redução na morbidade e mortalidade de doenças como a Anemia Falciforme (AF). Diversos agentes citotóxicos, fatores de crescimento hematopoiético e ácidos graxos de cadeia curta, estão sendo estudados para o tratamento de AF, pois estes estimulam uma síntese maior de HbF (SILVA et al, 2009).

Adultos normais apresentam uma taxa pequena de HbF em torno de 0,4%, porém uma pequena parcela dessa população pode apresentar níveis que variam até 5%. Em pacientes com AF, essa concentração de HbF pode variar entre 0,5 a 30%, com média próxima a 8%. Esse grau de variação na persistência de HbF entre adultos normais é uma variação geneticamente controlada, não possuindo consequências clínicas. Em pacientes com doenças falciformes, essa persistência de altos níveis de HbF pode trazer grandes benefícios clínicos. As bases moleculares para a persistência da HbF em adultos são muito heterogêneas. A identificação de mecanismos moduladores da HbF, envolve não apenas a identificação das variantes causais ou dos genes cuja expressão alteram, como também as consequências funcionais subsequentes (GUALANDRO, 2009).

Devido ao declínio dos níveis de HbF após o sexto mês de vida, pode ocorrer uma anemia hemolítica representando um dos sintomas iniciais de AF, sendo essa HbF um fator de proteção em combate ao fenômeno de falcização das hemácias, devido a sua grande afinidade com o oxigênio. Diversos estudos demonstram que a proteção conferida pela persistência dos níveis de HbF, interfere positivamente no combate às manifestações clínicas, além de gerar uma condição clínica chamada de Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF), a qual tem como principais características síntese de HbF na vida adulta e diminuição/ausência de alterações hematológicas (MOUSINHO et al, 2008).

Polimorfismos genéticos associados a pelo menos 30% da variação que ocorre nos níveis basais de HbF têm sido descritos em genes como *HBG2*, *HBSIL-MYB* e *BCL11A*. LETTRE et al. 2008 e MA et al. 2007, estudaram pacientes com doença falciforme que faziam uso de HU e observaram dezessete SNPs significativamente associados com alterações dos níveis de HbF. Esses SNPs estão localizados nos genes MAP3K5 (rs9376230, rs9483947), TOX (rs826729, rs765587, rs9693712, rs172652, rs380620), NOS1 (rs816361, rs7977109), FLT1 (rs9319428, rs2182008, rs8002446), ARG2 (rs10483801, rs10483802), HAO2 (rs10494225) e NOS2A (rs1137933, rs944725).

1.3 TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME: HIDROXIURÉIA, EFEITOS ADVERSOS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A hidroxiuréia (HU) é um agente citotóxico que tem sido utilizado no tratamento de doenças reumáticas e leucemia mielóide crônica. Em pacientes com doença falciforme, esse medicamento passou a ser utilizado devido sua capacidade de indução do aumento dos níveis de produção de HbF nas células, diminuindo assim as tendências de afoiçamento dos glóbulos vermelhos. O mecanismo exato de como essa droga age ainda não foi completamente compreendido; mas sabe-se que ela atua na parada da replicação das células falciformes durante as diferentes fases do processo de divisão celular, o que favorece o aumento da produção de HbF (LAL E VINCHINSKY, 2011).

É indiscutível a maior sobrevida e a melhor qualidade adquirida pelos pacientes com doença falciforme, durante o tratamento com HU. A maioria dos pacientes que realizam o tratamento respondem de maneira satisfatória ao aumento dos níveis de HbF na corrente sanguínea, embora esses níveis variem consideravelmente.

A hidroxiuréia é o maior avanço terapêutico para o tratamento da doença falciforme, embora tratamentos adicionais sejam necessários. Isso ocorre porque cerca de 40% dos pacientes não se beneficiará em longo prazo, seja por causa de sua má administração, seja pela não adesão ao tratamento (pelo paciente), seja ainda ausência de resposta devido a toxicidades causadas pelas reações adversas ao medicamento. Uma vez que, por ser a única droga comercializada para o tratamento da doença falciforme, ela precisa estar adequadamente prescrita, pois sua utilização será durante a vida inteira desses pacientes, garantindo assim sua maior expectativa de vida.

Covas et al., (2004) mostraram que a HU tem muitos efeitos sobre a linhagem eritrocitária, promovendo elevação no nível de HbF (60% dos pacientes tratados), aumento dos

níveis de hemoglobina (Hb) e volume corpuscular médio (VCM), e redução da quantidade de reticulócitos. Em portadores de anemia falciforme, a redução na taxa de hemoglobina total e microcitose, associada à acentuada reticulocitose caracteriza a gravidade da anemia hemolítica. Dessa forma, a redução no nível de reticulócitos durante o tratamento, sugere a redução de hemólise e gravidade da doença (ANDRADE et al., 2001).

O tratamento com HU pode causar supressão da medula, e por isso a administração da droga é interrompida, para permitir a recuperação medular, e então reiniciada com uma dose inferior àquela que provoca a mielosupressão (CHARACHE et al., 1995; DAVIES E GILMORE, 2003). Experiências clínicas confirmam que, em curto prazo, os efeitos tóxicos da HU mais grave é o da mielosupressão (transitória e reversível), principalmente os casos de neutropenia. A diminuição dos neutrófilos circulantes torna os pacientes mais suscetíveis a infecções bacterianas e, sem a devida atenção médica, o estado do paciente pode tornar-se risco de morte. Dessa forma, a contagem absoluta dos neutrófilos é usada como limiar de toxicidade e ajuste de dose de HU durante o tratamento (KINNEY et al., 1999; HEENEY E WARE, 2008).

As principais desvantagens do uso da HU são a necessidade de monitoramento frequente dos efeitos citotóxicos do fármaco, devido geração de radical livre no organismo (PRZYBYSZEWSKI, 2006). Além disso, o potencial carcinogênico e o teratogênico do fármaco têm um peso maior na hora de prescrição para crianças, e isso serve como barreira sobre a segurança e eficácia do tratamento e conseqüentemente, sua adesão por parte dos pacientes (WALSH et al., 2014, MUELLER 2008, FRIEDRISCH et al., 2008, HANKINS et al., 2005, VICHINSKY et al., 1988). Em longo prazo, é que começam as dúvidas de maiores complicações, como é o caso do aparecimento de câncer devido efeitos teratogênicos, anormalidades neonatais e infertilidade (THORNBURG et al., 2012, TAYLOR et al., 2008). Dessa forma, apesar de benefícios comprovados, ainda há muitas barreiras em relação ao uso da HU no mundo (OYEKU et al., 2013).

A razão para a intensa variação fenotípica observada em relação aos pacientes com doença falciforme que fazem tratamento com HU ainda é indefinida, mas é provável que fatores genéticos estejam interferindo em diferentes vias regulatórias envolvidas no controle da produção de globinas-gama e no metabolismo desse medicamento (MA et al., 2007, WARE et al, 2010).

Futuramente, com o aumento do conhecimento sobre os fatores genéticos que modulam a resposta ao tratamento da doença falciforme com HU, bem como associação de parâmetros hematológicos/clínicos e variantes genéticas, será possível constituir um painel de marcadores

genéticos a ser investigado com o objetivo de adequar o tratamento com a utilização mais personalizada do uso da HU, diminuindo, assim, os efeitos citotóxicos do fármaco.

Outra possibilidade com a criação desse protocolo genético seria sua utilização justificada para adiantar o transplante de medula óssea em pacientes que pudessem ter confirmado um mau prognóstico no caso de adesão ao tratamento com HU, e por isso “adiantar etapas” (uma vez que existe um protocolo para indicação do transplante, independente de ter ou não doador compatível) para utilização do transplante de forma “profilática”, o que aumentaria a sobrevida livre das manifestações clínicas advindas da doença nesses pacientes (Ministério da Saúde, Portaria nº 2.139/GM/MS, de 18 de dezembro de 2015).

1.4 ANCESTRALIDADE GENÉTICA

A população brasileira é uma das que apresenta maior contribuição genética de povos de diferentes origens do mundo. Estimativas antes da colonização sugerem que havia cerca de 2,5 milhões de nativos brasileiros, os chamados ameríndios. Com a colonização, imigrantes europeus, principalmente portugueses vieram para o país, e na segunda metade do século XIV teve início o comércio de escravos, sendo trazidos ao Brasil cerca de 3,5 milhões de escravos, segundo dados oficiais (VERGOLINO-HENRY, 1983). Por volta de meados do século XX, cerca de 4 milhões de pessoas chegaram ao Brasil, provenientes em sua maioria de Portugal, Itália, Espanha e Alemanha, estabelecendo-se em maior parte nas regiões Sul e Sudeste do país (SANTOS, 2009).

A contribuição africana é alta no Nordeste do Brasil e os ameríndios têm pouca contribuição nessa miscigenação. No Sul, esse predomínio inverte, se comparado as demais regiões geográficas, sendo maior a contribuição ameríndia que a contribuição africana. A população do estado do Pará teve origem por meio da miscigenação de europeus, africanos e ameríndios, sendo os europeus representados em sua maioria pelos portugueses (SANTOS, 2009).

A anemia falciforme teve origem na África e foi trazida as Américas por meio da imigração forçada de escravos. Apesar de ser uma doença predominante em negros, no Brasil, a população parda vem sendo bastante atingida (NAOUM, 1997).

Devido o intenso processo de miscigenação ocorrido entre grupos europeus, africanos e ameríndios no Brasil, o país tem ampla distribuição das frequências de anemia falciforme. Uma vez que se trata de uma doença que exhibe intensa variabilidade clínica, e tem a HbF como um

parâmetro fundamental para melhora desses pacientes, o trabalho propõe investigar o perfil de ancestralidade genética do povo brasileiro e possíveis associações com a variabilidade dos níveis de HbF nesses indivíduos, e conseqüentemente sua relação com a heterogeneidade clínica observada desses pacientes do estado do Pará.

Isso porque, doenças como anemia falciforme necessitam da observação de características peculiares inerentes ao perfil genético de cada paciente, sendo necessária uma investigação individual, como se propõem a farmacogenética, pois facilitaria a tomada de decisão dos tratamentos disponíveis baseando-se nas estimativas de seus prováveis prognósticos. O Laboratório de Genética Humana e Médica dedica-se sobre tais estudos na tentativa de propor um painel de variantes genéticas que estimem a gravidade clínica e perfil genético e metabólico do paciente para utilização de determinadas drogas com grande impacto em relação aos seus efeitos adversos, como é o caso da hidroxiuréia, o único medicamento disponível e eficaz para o tratamento das doenças falciformes.

O estudo realizado por Cardoso et al. (2014) mostrou uma maior correlação de polimorfismos nos genes BCL11A e região HMIP em comparação ao polimorfismo XmnI no gene HBG2. Esse estudo sugere que a variação genética observada em populações de elevado grau de miscigenação pode ser decorrente desse processo de subestruturação populacional ocorrida preferencialmente no continente Americano. Porém, outros estudos são necessários para validação de tal sugestão.

Diversos têm sido os trabalhos que investigam associações de genes e aumento dos níveis de HbF, como resposta ao bom prognóstico da doença. No entanto, tais variantes têm prevalências diversas de acordo com os diversos grupos étnicos existentes. Dessa forma, estabelecer o padrão de subestruturação populacional pode se justificar em grupos populacionais que exibem intensa miscigenação, como é o caso dos pacientes do estado do Pará, que provavelmente não exibirão as mesmas associações gene-prognóstico-doença que os demais trabalhos publicados sobre o assunto.

1.5 OBJETIVO GERAL

Investigação da concentração de hemoglobina, hemoglobina fetal, médias de manifestações clínicas e sua associação ao grupo étnico prevalente entre os pacientes, com anemia falciforme do estado do Pará.

1.5.1 Objetivos Específicos

Determinar o perfil de variação dos parâmetros hematológicos (Hb e HbF) nos pacientes.

Relacionar as variações dos parâmetros ao perfil de manifestações clínicas desses pacientes.

Relacionar os parâmetros hematológicos e as manifestações clínicas com o perfil de ancestralidade genética observado nos pacientes.

ARTIGO

Título: DESCRIÇÃO DE UM PERFIL HEMATOLÓGICO/CLÍNICO E DE ANCESTRALIDADE DA ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO DO PARÁ.

Autores: Keith Tarsila Rodrigues Furtado, Greice de Lemos Cardoso-Costa

Status: Não Submetido

Revista: Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

ISSN: 1516-8484

DESCRIÇÃO DE UM PERFIL HEMATOLÓGICO/CLÍNICO E DE ANCESTRALIDADE DA ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO DO PARÁ.

Keith Tarsila Rodrigues Furtado e Greice de Lemos Cardoso-Costa

Universidade Federal do Pará (UFPA). Instituto de Ciências Biológicas - Laboratório de Genética Humana e Médica

E-mail: keythfurtado@hotmail.com

RESUMO

Extensos estudos são conduzidos na busca de associação gene-doença, para escolha adequada de quais variantes genéticas estão mais fortemente associadas à investigação que se quer realizar. Em populações brasileiras, onde há elevado grau de miscigenação entre diferentes grupos que contribuíram para essa formação, essas relações gene-doença são ainda mais difíceis de serem mostradas, e não seguem um padrão claro de associação, muitas vezes, devido ao elevado grau de mistura étnica com grupos que interferem nesses resultados. Dessa forma, estabelecer padrões de subestruturação populacional, em grupos de pacientes, que já apresentam consideráveis graus de mistura entre diferentes populações é fundamental para escolha de quais variantes genéticas, prevalentemente observadas em grupos específicos poderão ser mais fortemente associados a esses estudos. O trabalho investigou 178 pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação HEMOPA, do estado do Pará, e estimou o padrão de subestruturação populacional, por meio do protocolo descrito por Santos et al., (2009), para testar possíveis associações com parâmetros hematológicos e clínicos relacionados à doença. Diferente do esperado, os pacientes apresentaram 54% de contribuição européia, seguido de 25% de contribuição indígena e 21% de africanos. As menores médias de Hb e HbF foram observadas entre os pacientes com maior ancestralidade africana, o que sugere uma maior gravidade clínica. Dessa forma, futuros estudos devem direcionar para investigação de variantes genéticas prevalentemente de origem africana que estejam associadas à diminuição dos parâmetros hematológicos e maior gravidade clínica da anemia falciforme, servindo de informação para traçar um perfil genético de pacientes que possivelmente terão maiores agravos da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Anemia Falciforme, Parâmetros Hematológicos, Ancestralidade Genética e Variantes Genéticas.

INTRODUÇÃO

Diferentes frequências alélicas são observadas entre variantes genéticas em associação com doenças nas diferentes populações do mundo. Esse paradigma é importante quando se investigam associações genes-doenças, pois muitas vezes a ausência de correlação pode ser resultado de subestruturas populacionais presentes em populações miscigenadas (Goldstein e Hirschhorn, 2004).

A população brasileira é uma das que apresenta maior contribuição genética de povos de diferentes origens do mundo. Estimativas antes da colonização sugerem que havia cerca de 2,5 milhões de nativos brasileiros, os chamados ameríndios. Com a colonização, imigrantes europeus, principalmente portugueses vieram para o país, e na segunda metade do século XIV teve início o comércio de escravos africanos, sendo trazidos ao Brasil cerca de 3,5 milhões de indivíduos, segundo dados oficiais (Vergolino-Henry, 1983).

Essa peculiaridade em relação à população brasileira é ainda mais importante de ser analisada quando a investigação se refere a doenças que exibem amplo espectro de heterogeneidade clínica e distribuição no país, como a anemia falciforme, pois padrões diversos de subestruturação populacional podem exibir associações inesperadas com variantes genéticas, gerando assim complicações acerca das decisões terapêuticas que necessitam serem tomadas, além de aumentar o espectro de clínicas observado por essas doenças.

O único tratamento disponível para anemia falciforme é a hidroxiuréia (HU), um agente citotóxico que passou a ser utilizado devido sua capacidade de indução do aumento dos níveis de produção de hemoglobina fetal (HbF) nas células, aumento dos níveis de Hb e VCM, diminuindo assim as tendências de falcização dos glóbulos vermelhos (Lal e Vinchinsky, 2011). Diversos são os benefícios desse tratamento (Kovacic, 2011, Davies e Gilmore, 2003), no entanto, efeitos adversos como supressão medular (Charache et al., 1995; Davies e Gilmore, 2003), efeitos citotóxicos, devido geração de radical livre no organismo (Przybyszewski, 2006) e potencial carcinogênico e teratogênico (Walsh et al., 2014, Mueller 2008, Friedrisch et al., 2008, Hankins et al., 2005), isso serve como barreira sobre a segurança e eficácia do tratamento e conseqüentemente, sua adesão por parte dos pacientes.

Com o advento da farmacogenética, diversos trabalhos têm proposto painel de marcadores genéticos que possibilite traçar um perfil genético dos pacientes que necessitam de auxílio para tomada de decisões terapêuticas, baseando-se em prováveis prognósticos de doenças, que devido ampla variabilidade clínica, e por isso, uma vasta gama de possibilidades de melhora ou agravamento da doença, como é o caso da anemia falciforme. Para criação de

um painel de marcadores genéticos para anemia falciforme que, de forma segura, mostre o prognóstico do paciente, são necessários extensos estudos de associação dos parâmetros clínicos e hematológicos com variantes genéticas que já tenham sido previamente descritas em associação com a doença em outras populações investigadas (Ma et al., 2007, Lettre et al., 2008, Thornburg, 2013).

Com base nesse cenário, aprofundar conhecimentos sobre parâmetros hematológicos relacionados à gravidade clínica e variantes genéticas que possam contribuir para a construção de um painel de marcadores que sirva para adequar o tratamento a utilização mais personalizada do uso da HU, diminuindo, assim, os efeitos citotóxicos do fármaco, a insegurança gerada na família durante a administração da droga, bem como os encargos clínicos relacionados com a sua frequente monitoração (de acordo com protocolo vigente) será fundamental para melhor qualidade de vida dos pacientes.

Outra possibilidade, com a criação desse protocolo genético, seria a utilização justificada para adiantar o transplante de medula óssea em pacientes que pudessem ter confirmado um mau prognóstico no caso de adesão ao tratamento com HU, e por isso “adiantar etapas” (uma vez que existe um protocolo para indicação do transplante, independente de ter ou não doador compatível) para utilização do transplante de forma “profilática”, o que aumentaria a sobrevida livre das clínicas advindas da doença nesses pacientes (Ministério da Saúde, Portaria nº 2.139/GM/MS, de 18 de dezembro de 2015).

Em populações miscigenadas, como do presente trabalho, esses estudos são ainda mais controversos, e não seguem um padrão rígido de reprodução de análises, pois a maioria dos estudos fora do Brasil tem populações menos, ou ainda, não miscigenadas. Por esse motivo, investigações de subestruturação populacional deve ser o ponto inicial para a decisão de que variantes genéticas serão escolhidas para a criação desse painel de marcadores que irão auxiliar tomadas de decisões em grupos populacionais específicos.

Dessa forma, tendo a hemoglobina fetal (HbF) como um parâmetro fundamental para melhora clínica desses pacientes e os níveis de hemoglobina (Hb) como informativo de gravidade de hemólise, o trabalho propõe investigar o perfil de ancestralidade genética dos pacientes com anemia falciforme no estado do Pará com a variabilidade observada nesses parâmetros (Hb e HbF), e conseqüentemente sua relação com a heterogeneidade clínica dos pacientes do estado do Pará, servindo ainda como dados primários para a escolha futura de

novas investigações de variantes genéticas mais relacionadas com as características desse grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram investigados 178 pacientes com anemia falciforme que são atendidos na Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará (HEMOPA), e posteriormente encaminhados ao Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará, para a realização de confirmação do diagnóstico por métodos de biologia molecular. Esses pacientes não fazem uso do medicamento hidroxiuréia para que os parâmetros hematológicos que foram obtidos não tenham nenhum viés de informação e não gere associações parâmetros hematológicos-ancestralidade genética “falso-positivas”. De cada indivíduo foram obtidos 5mL de sangue periférico, em sistema de coleta a vácuo, utilizando EDTA como anticoagulante, para dosagem dos níveis de HbF, seguido de extração de DNA, segundo método descrito por Old e Higgs (1993) para genotipagem do perfil de ancestralidade desses pacientes.

Para análise molecular foi utilizado o protocolo descrito por Santos et al., (2009) que emprega um PCR Multiplex e um painel de 48 Marcadores (bialélicos do tipo INDEL- Inserção e Deleção de pequenos fragmentos de DNA) Informativos de Ancestralidade (os chamados MIA), para estabelecer o controle genômico de ancestralidade desses pacientes. Análises relativas à subestruturação populacional foram realizadas empregando-se o programa STRUCTURE V (Pritchard et al., 2000).

O índice hematológico analisado, hemoglobina (Hb), foi coletado em nível de prontuário. Na análise estatística foi utilizado o programa Bioestat 5.0, em que foram executados Test T para obter as médias comparativas dos grupos étnicos, média de Hb e HbF e regressão logística para investigar possíveis associações das manifestações clínicas e a ancestralidade dos pacientes com hemoglobinopatias. Para assim, estimar a contribuição genética de ancestralidade dos pacientes com anemia falciforme, de acordo com os três principais grupos formadores da população do estado do Pará, sendo eles: (i) africanos, (ii) europeus e (iii) indígenas.

RESULTADOS

As amostras foram divididas de acordo com a maior porcentagem (%) de ancestralidade apresentada por cada indivíduo. Entre as amostras analisadas, 39 (21%) pacientes apresentaram maior contribuição de ancestralidade africana, 47 (25%) de ancestralidade indígena e 100 (54%) de ancestralidade europeia (Gráfico 1). Oito (3%) amostras apresentaram duas (2) ancestralidades com a mesma prevalência.

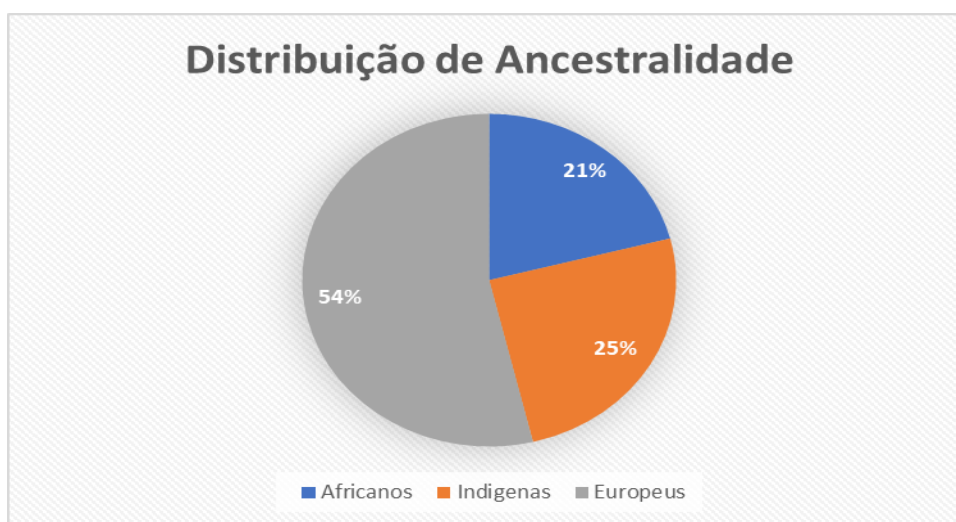


Gráfico 01: Distribuição de ancestralidade de acordo com os grupos étnicos analisados em pacientes com anemia falciforme no estado do Pará.

A ausência de pacientes com anemia falciforme que estejam em tratamento foi realizada no intuito de evitar uma menor gravidade clínica e/ou hematológica observada que não refletisse o perfil genético do indivíduo e sim, fatores externos atuando nesse melhor prognóstico.

Quando analisadas as manifestações clínicas presentes nos pacientes, tais como: crises vaso oclusivas (CVO), algias, acidente vascular encefálico (AVE), síndrome torácica aguda (STA), priaprismo, úlceras de perna e úlceras em geral não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas aos grupos étnicos presentes no padrão de miscigenação da amostra, embora tenha sido possível observar que o grupo de europeus apresenta maior quantidade de manifestações clínicas ao longo dos anos quando comparados com indígenas e africanos (gráfico 2).

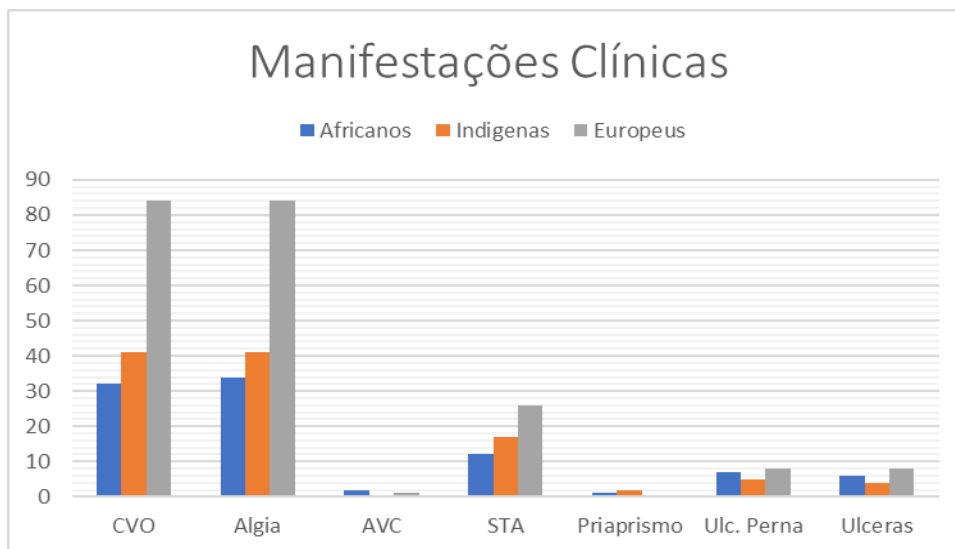


Gráfico 02: Manifestações clínicas observadas de acordo com os três grupos étnicos investigados entre os pacientes com anemia falciforme do estado do Pará.

Para a análise dos parâmetros hematológicos, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de africanos e europeus para os níveis de HbF. No entanto, o grupo de indígenas apresentou maiores médias de HbF quando comparados com os pacientes de origem africana ($p=0,0004$) e em relação ao grupo de europeus ($p=0,02$), com resultados estatisticamente significativos, tendo o grupo de africanos apresentado as menores médias de HbF em comparação aos demais grupos.

Os níveis de Hemoglobina e Volume Corpuscular Médio foram mostrados com menores médias entre o grupo de africanos, com resultados estatisticamente significativos quando comparados aos de indígenas ($p=0,011$, $p<0,0001$) e europeus ($p=0,030$, $p<0,0001$).

Esses resultados mostram que pacientes com ancestralidade prevalente de africanos apresentam a possibilidade de uma maior gravidade clínica, devido as menores médias observadas entre Hb e HbF, que sugere uma maior gravidade clínica, devido maior grau de hemólise e menor quantidade de hemoglobina fetal que melhore a oxigenação sistêmica, sugerindo também, que os diferentes graus de miscigenação com outros grupos étnicos podem favorecer o prognóstico da doença.

É importante ressaltar, que a maior “gravidade hematológica” (menores níveis de Hb e HbF) observada no grupo de pacientes com maior contribuição africana poderia favorecer a menor quantidade de pacientes (21%) com “gravidade hematológica/clínica” dos pacientes do

estado do Pará, uma vez que não estão em maior quantidade quando comparados ao grupo com contribuição europeia (54%). No entanto, a ausência de resultados estatisticamente significativos entre a comparação de manifestações clínicas e contribuição étnica entre ambos grupos pode sugerir que mesmo em menor quantidade de pacientes com contribuição africana, esses apresentam uma quantidade expressiva de manifestações clínicas durante o período de investigação do estudo, concordando com os resultados no parágrafo anterior.

Embora a anemia falciforme tenha peculiarmente, uma intensa heterogeneidade clínica, essas manifestações clínicas, muitas vezes, apresentam-se ao longo da vida, comumente reclamadas, variando em intensidades e períodos de maior ou menor agravo da doença. Não há estudos que comprovem parâmetros que induzam uma maior ou menor gravidade do indivíduo, sendo diagnosticado por um padrão de adoecimento, embora alguns estudos já tenham apontado para essa possibilidade de subdivisão clínica, tais como de Ballas (1991); Alexander (2004) e Steinberg (2005). Por esse motivo, e dado amplo espectro clínico que varia em quantidade e intensidade ao longo da vida desses pacientes, há necessidade, de forma complementar, que mecanismos genéticos possam auxiliar esse processo terapêutico para melhor qualidade de vida do paciente.

Futuros estudos devem direcionar para investigação de variantes genéticas prevalentemente de origem africana que estejam associadas à diminuição dos parâmetros hematológicos e maior gravidade clínica da anemia falciforme, servindo de informação para traçar um perfil genético de pacientes que possivelmente terão maiores agravos da doença, e que, por isso, necessitam de precoces intervenções terapêuticas, e melhor manejo da relação médico-paciente-família para tomada de decisões. De forma contrária, a investigação de variantes genéticas prevalentes em populações europeias poderá contribuir para estudos de associação positiva do perfil genético e satisfatório prognóstico da doença.

Estudos complementares de variantes genéticas para escolha desses potenciais marcadores já foram iniciados no estado do Pará, e os dados de Cardoso et al. (2014) corroboram associações positivas, mais fortes com variantes genéticas mais comuns em grupos de origem europeia em contradição aos de origem africana. Esse estudo, mostrou uma maior correlação entre pacientes com anemia falciforme do estado do Pará e polimorfismos nos genes BCL11A e região HMIP e elevação dos níveis de HbF, confirmando uma melhora clínica desses pacientes, em comparação a outras regiões do mundo, em que esses SNPs não são os mais fortemente associados (Akinsheye et al., 2012; Gilman e Huisman, 1984; Lettre et al., 2008).

No estado do Pará, para escolha de variantes genéticas que expressem, de forma segura, o padrão de expressão clínica e possível bom prognóstico da anemia falciforme não se pode investigar o esperado, de acordo com a origem da doença. Pois, como ela chegou ao país há pelo menos quatro séculos, o padrão de miscigenação já contribuiu para a diferenciação de manifestações clínicas esperadas de acordo com essa nova miscigenação populacional ocorrida durante esse tempo, fazendo-se necessária a investigação cuidadosa de variantes genéticas mais associadas com o perfil étnico observado nos grupos atuais, para um melhor auxílio e melhores condutas visando o bem-estar desses pacientes e condutas terapêuticas mais seguras para o bom prognóstico, ocasionando mínimos efeitos advindos dessas terapias medicamentosas utilizadas e disponíveis.

CONCLUSÃO

Constata-se no presente trabalho que para a criação de um protocolo de associação fatores hematológicos – clínica – variantes genéticas para utilização entre os pacientes com anemia falciforme, serão necessárias investigações de variantes genéticas prevalentemente de origem africana para avaliação de maior possibilidade de gravidade clínica. E, de forma contrária, a investigação de variantes genéticas prevalentes em populações européias para contribuir com estudos de associação positiva do perfil genético e satisfatório prognóstico da doença. Utilizando-se, a partir daí um protocolo de forma segura para tomada de decisões futuras sobre condutas terapêuticas que necessitam de maiores cuidados e precoces intervenções.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER N, HIGGS D, DOVER G and SERJEANT GR. Are there clinical phenotypes of homozygous sickle cell disease? **British Journal of Haematology** (2004) 126:606-611.

ALEXANDRE, J. M., MARINI, D. C. Conhecendo e tratando as hemoglobinopatias: anemia falciforme e beta talassemia. **Foco**, ano 4 – nº 5 – julho/dezembro 2012.

ALVES, E. D. L. **Estudo do efeito da hidroxauréia no mecanismo de gelatinização das suspensões de colágeno e hemoglobina**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Belo Horizonte, Universidade Estadual de Minas Gerais, 2014. 122p.

Andrade SR, et al. Características hematológicas e bioquímicas da doença falciforme no estado do Rio Grande do Norte. **Rev Bras Anál Clín** 2001; 33(4): 205-210.

BALLAS, S.K. Sickle Cell Anemia With Few Painful Crises Is Characterized by Decreased Red Cell Deformability and Increased Number of Dense Cells. **American Journal of Hematology** (1991) 36: 122-130.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretária de Atenção à Saúde. Departamento de atenção especializada à temática. **Orientações para diagnóstico e tratamento das Talassemias**. Brasília: MS, 2016. 184p.

CARDOSO, G. L. C. et al, DNA polymorphisms at BCL11A, HBS1L-MYB and Xmn1-HBG2 site loci associated with fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia patients from Northern Brazil. **Blood Cells, Molecules and Diseases** 53 (2014) 176–179.

CHARACHE S, TERRIN ML, MOORE RD. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in Sickle cell anemia. **The New England Journal of Medicine**, vol. 332, no. 20, (1995) pp. 1317–1322.

COVAS DT, et al. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica** 2004;89(3):273-280.

DAVIES SC AND GILMORE G. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. **Blood Reviews**, (2003) 17 (2): 99–109.

FRIEDRISCH JR, PRÁ D, MALUF SW, BITTAR CM, MERGENER M, POLLO T, KAYSER M, DA SILVA MA, HENRIQUES JA, DA ROCHA SILLA LM. DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. **Muta Res.** (2008) 649:213-220.

GOLDSTEIN, D.B., HIRSCHHORN, J.N. In genetic control of disease, does 'race' matter? **Nature Genetics**, (2004) 36(12), 1243-1244

GUALANDRO, S. F. M. A associação anemia falciforme e hemoglobina fetal. **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**. 2009;31(6):403-404.

HANKINS JS, WARE RE, ROGERS ZR. Long-term hydroxyurea therapy for infants with sickle cell anemia: the HUSOFT extension study. **Blood**: (2005)106(7):2269-75.

HEENEY MM, WARE RE. Hydroxyurea for children with sickle cell disease. **PediatrClin North Am.** (2008) 55(2):483-501.

I. AKINSHEYE, N. SOLOVIEFF, D. NGO, A. MALEK, P. SEBASTIANI, M.H. STEINBERG, D.H. Chui, Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: molecular characterization of the unusually high fetal hemoglobin phenotype in African Americans, **Am. J. Hematol.** 87 (2) (2012) 217–219.

J.G. GILMAN, T.H.J. HUISMAN. Two Independent Genetic Factors in the j9-Globin Gene Cluster Are Associated With High G7. Levels in the HbF of SS Patients. **Blood**, Vol 64. No 2 (August), 1984: pp 452-457.

KINNEY TR, HELMS RW, O'BRANSKI EE. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial. Pediatric Hydroxyurea Group. **Blood**. (1999) 94(5):1550-1554.

KOVACIC P. Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): Metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. **Medical Hypotheses**:(2011) 76(1): 24–31.

LAL A AND VINCHINSKY EP (2011). Sickle cell disease, in **Postgraduate Haematology**, A.V.Hoffbrand, D. Catovsky, E. G. D. Tuddenham, and A. R. Green, Eds., vol. 7, pp. 109–125, Blackwell Publishing, 6th edition.

LETTRE G, SANKARAN VG, BEZERRA MA, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS11-MYB and β -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. (2008); 105:11869–11874.

LOPES, K. K. **Análise de expressão gênica das peroxirredoxinas em pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e doença falciforme por hemoglobina SC**. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2014. 77p.

MACHADO, R. P. G. **Modulação genética do BCL11A no perfil inflamatório, hemolítico, estresse oxidativo e nos níveis de hemoglobina fetal em pacientes com anemia falciforme**. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - Fortaleza, 2015. 88p.

MOUSINHO -RIBEIRO R. C, CARDOSO G. L., SOUSA I. E. L., MARTINS P. K. C. Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. **RBHH**. 2008 30 (2): 136-141.

MUELLER BU. When should hydroxyurea be used for children with sickle cell disease? **Pediatrics** (2008) 122:1365-1366.

NAOUM, P. C. Hemoglobinopatias e talassemias. **Ed. Sarvier**, São Paulo, 1997, 171 p.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematologia e hemoterapia.**, 2000, 22(1): 05-22.

OYEKU SO, DRISCOLL MC, COHEN HW, et al. Parental and other factors associated with hydroxyurea use for pediatric sickle cell disease. **Pediatric Blood Cancer**, (2013). 60, 653-658b.

PRZYBYSZEWSKI WM, KASPERCZYK J. Radical mechanism of hydroxyurea side toxicity. **Postepy Hig Med Dosw**, (2006)60:516–526

SABINO, M. F., GADELLA, D. B. T. Perfil epidemiológico de pacientes internados por doença falciforme no estado do Espírito Santo, Brasil (2001-2010). **Rev. Bras. Pesq. Saúde**, Vitória, 18(2): 35-41, 2016.

SANTOS, N. P. C., RODRIGUES, E. M. R., SANTOS, A. K. C. R., PEREIRA, R., GUSMÃO, L., AMORIM, A., GUERREIRO, J. F., ZAGO, M. A., MATTE, C., HUTZ, M. H., SANTOS, S. E. B. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48 – insertion – deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Human mutation, official journal human genome variation Society*. Vol. 31, No. 2, 184–190, 2009.

SILVA, L. B. GONÇALVES, R. P., MARTINS, M. F. Estudo da correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e o prognóstico dos pacientes com anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**. 2009.

S.L. THEIN, S.MENZEL, X. PENG, S. BEST, J. JIANG, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 104 (2007) 11346–11351.

STEINBERG MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **British Journal Haematology**;129(4):465-81, 2005.

TAYLOR JG, NOLAN VG, MENDELSON L, et al. Chronic Hyper-Hemolysis in Sickle Cell Anemia: Association of Vascular Complications and Mortality with Less Frequent Vasooclusive Pain. **PLoS ONE**. (2008) 3(5): e2095.

THORNBURG, CD. Sickle cell anemia: time for personalized prescription of hydroxyurea? Focus on “Organic anion transporting polipeptide 1B transporters modulate hydroxyurea pharmacokinetics”. **Am J Physiol Cell Physiol** (2013) 149: C1209-1210.

VERGOLINO-HENRY, A. FIGUEIREDO. A presença africana na Amazônia colonial: uma notícia histórica. **Arq. Público do Pará** 1:(1990) 27-66

VICHINSKY E, HURST D, EARLES A, et al. (1988). Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality. **Pediatrics** 81 (6):749-755.

VILELA, R. C., SÁ, J. L. M., RABELO, M. S., MOURA, K. K. V. R., PENNA, K. G. B. D., Detecção de hemoglobina C por PCR-AE em pacientes doo laboratório clínico da PUC-Goiás. **Estudos**, Goiânia, v.41, n.3, p. 487- 493, jul/set. 2014.

WALSH KE, CUTRONA SL, KAVANAGH PL, et al. Medication adherence among pediatric patients with sickle cell disease: A systematic review. **Pediatrics**, (2014)134, 1175-1183.

WARE R.E. How I use hydroxyurea to treat Young patients with sickle cell anemia. **Blood**, (2010) 115: 5300-5311.

WATANABE, A. M. **Frequência de haplótipos das hemoglobinas nas doenças falciformes no estado do Paraná e evolução clínica**. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e Adolescente) - Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2015. 161p.

ZAMARO, P. J. A. Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em indivíduos da população brasileira. **Rev. Bras. Hematologia e hemoterapia**. 2003;25(4):223-229.