

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Anemia de células falciformes e hemoglobina fetal: avaliação da HbF e das cadeias G gama/A gama da HbF num grupo de crianças angolanas antes e após o tratamento com hidroxiureia

Priscilla Silva de Almeida

Mestrado em Análises Clínicas

2022

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Anemia de células falciformes e hemoglobina fetal: avaliação da HbF e das cadeias G gama/A gama da HbF num grupo de crianças angolanas antes e após o tratamento com hidroxiureia

Priscilla Silva de Almeida

Dissertação de Mestrado em Análises Clínicas apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

**Orientadora: Professora Doutora Isabel Bettencourt Moreira da Silva,
Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa**

**Coorientadora: Mestre Armandina Madeira Miranda, Farmacêutica
Especialista em Análises Clínicas e Genética Humana do Instituto Nacional
de Saúde Doutor Ricardo Jorge**

2022



SNS SERVIÇO NACIONAL
DE SAÚDE



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge



PREFÁCIO

A anemia de células falciformes (ACF) é uma hemoglobinopatia que afeta significativamente as populações da África Subsaariana, nomeadamente a população angolana. A doença representa um problema de saúde pública global e está associada a uma elevada morbidade. A hidroxiureia (HU) ou hidroxicarbamida foi o primeiro fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), em 1998, para o tratamento desta doença, inicialmente apenas para adultos, mas, em 2017, foi também aprovada para crianças com idade superior a dois anos. A Agência Europeia de Medicamentos (EMA) também aprovou a HU para prevenir a recorrência de crises vaso-oclusivas em ambas as faixas etárias. A eficácia do fármaco no aumento dos níveis de hemoglobina fetal (HbF) justifica o seu benefício no tratamento, uma vez que o aumento dos níveis de HbF permite melhorar, significativamente, o quadro clínico dos doentes com ACF.

A presente investigação, de colaboração no âmbito do projeto - *Sickle Cell Anemia and Fetal Hemoglobin, Genetic modifiers in an Angolan Children Cohort* - entre a Escola Superior de Tecnologia da Saúde, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, pretendeu, mediante a aprovação relativamente recente pela FDA e depois pela EMA, da HU para o tratamento de crianças com idade superior a dois anos, contribuir para a avaliação da resposta ao tratamento com HU de crianças angolanas, com idades entre 3 e 12 anos, através da determinação e quantificação dos níveis de HbF e das respetivas cadeias G gama e A gama, antes e após o tratamento com HU.

Este projeto científico foi desenvolvido laboratorialmente no Departamento de Promoção da Saúde - Unidade de diagnóstico laboratorial e referência, no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), na sede em Lisboa. O INSA, fundado em 1899 pelo médico e humanista Ricardo Jorge, é um organismo público integrado na administração indireta do Estado, sob a tutela do Ministério da Saúde, dotado de autonomia científica, técnica, administrativa, financeira e património próprio. Como apoio laboratorial do sistema de saúde português, atua como laboratório do Estado no setor da saúde, laboratório nacional de referência e observatório nacional de saúde.

O trabalho esteve sob a orientação da professora doutora Isabel Silva, professora auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL) e coorientação da mestre Armandina Miranda, farmacêutica especialista em Análises Clínicas e Genética Humana e, responsável pela área de Hemoglobinopatias do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis (DPS), do INSA. Este trabalho foi



SNS SERVIÇO NACIONAL
DE SAÚDE



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge



elaborado de acordo com o disposto no Artigo 40º do Regulamento Geral do Ciclo de Estudos conducente ao Grau de Mestre da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, n.º 999/2021, DR, 2ª série – N.º 236, de 7 de dezembro de 2021.

Este projeto de investigação é relevante para as crianças que sofrem de ACF e para as quais se pretende uma maior qualidade e expectativa de vida. Importa também salientar que este projeto, tendo em vista um bem comum, envolveu a colaboração entre diferentes instituições nacionais e países de língua oficial portuguesa, o que é sempre importante para estreitar relações de cooperação e criar sinergias. Por todas estas razões, recomendo com orgulho e grata satisfação o presente trabalho. Boa leitura a todos!



SNS SERVIÇO NACIONAL
DE SAÚDE



Instituto **Nacional de Saúde**
Doutor Ricardo Jorge

U
LISBOA
UNIVERSIDADE
DE LISBOA



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha tia Raquel, uma mulher de virtudes inenarráveis. Uma amiga leal, que me apoiou em todos os momentos.



AGRADECIMENTOS

À mestre Armandina Miranda, responsável pela área de Hemoglobinopatias do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis (DPS), por ter me concedido a oportunidade de participar deste projeto, pela tutoria e apoio a mim prestados e acima de tudo pela amizade. Foi um prazer inenarrável conhecê-la e trabalhar com você! Muito obrigada!

À Dra. Alcina Costa, que directamente ou indirectamente contribuiu para este trabalho, por sua simpatia e amizade. Muito obrigada!

À Filomena Seuanes, técnica superior de diagnóstico e terapêutica da área da hematologia/hemoglobinopatias, pelo apoio que me proporcionou na execução dos procedimentos laboratoriais.

Ao Dr. João Pedro Xavier Santos, técnico superior do DPS, Grupo de Neurogenética e Saúde Mental, pela sua valiosa colaboração na análise estatística.

Aos colegas Filomena, Feliz, Francisco e Gisela, pela solidariedade, disponibilidade e amizade que eu muito prezo.

À doutora Astrid Vicente, Coordenadora do DPS, por me ter aceite no DPS para a realização da minha tese de mestrado.

À professora doutora Isabel Silva, por aceitar ser minha orientadora na Faculdade de Farmácia, por todo o seu apoio, disponibilidade e incentivo manifestados na concretização deste trabalho.

Às minhas colegas de mestrado, Lúvia, Carolina, Etelvina e Beatriz pela amizade, companheirismo e torcida. Agradeço por todos os momentos especiais e muito divertidos que passamos juntas durante esta etapa das nossas vidas. Desejo muito sucesso a todas vocês.

Aos meus primos e ao meu irmão, meus melhores amigos, que me apoiaram e torceram por mim durante esta jornada. Muito obrigada!



RESUMO

A anemia de células falciformes (ACF) é uma anemia hereditária autossómica recessiva caracterizada pela presença de hemoglobina S (HbS) em homozigotia, encontrando-se entre as doenças genéticas mais comuns. Os dados da Iniciativa de Anemia Falciforme em Angola, entre 2011 e 2018, indicam que das 323930 crianças submetidas à triagem neonatal da ACF, 7748 (2,39%) possuem a doença e 58043 (17,91%) são portadoras do traço falciforme. Estima-se que surjam anualmente mais de quinze mil novos casos da doença em Angola ¹. O evento primário da patogénese da ACF é a polimerização da HbS que ocorre quando desoxigenada, resultando na distorção do glóbulo vermelho (GV) e na diminuição da sua flexibilidade. A sua fisiopatologia resulta direta ou indiretamente da obstrução vascular devida à presença de células falciformes, com conseqüente enfarte tecidual. A hipoxia tecidual causada pela vaso-oclusão na microcirculação e a conseqüente lesão multiorgânica, constitui a principal causa de morbidade e mortalidade nesta doença. Apesar de ser uma doença monogénica, o seu fenótipo clínico é heterogéneo, variando de relativamente moderado a muito grave. Alguns doentes apenas apresentam sintomas moderados associados à anemia hemolítica crónica, enquanto que outros sofrem de crises dolorosas de repetição e lesões graves multiorgânicas. Este facto deve-se à influência modificadora tanto de fatores ambientais, como de fatores genéticos. Entre estes últimos salienta-se o nível de expressão da hemoglobina fetal (HbF), não só por diminuir a concentração da HbS no interior do GV, mas também pelo facto de inibir a sua polimerização. Na ACF a concentração da HbF varia entre 0,1% e 30%, com uma média de 8% ². Os níveis de HbF aumentados conferem grandes benefícios clínicos e encontram-se associados a uma progressão da doença mais suave e com menos complicações clínicas. A hidroxiureia (HU) é um fármaco muito explorado em relação ao seu efeito indutor da síntese da cadeia de γ -globina e conseqüente aumento dos níveis de HbF, efeito este promissor para tratar a ACF. A resposta dos doentes à HU é altamente variável e, aproximadamente 30% dos doentes com ACF não respondem ao tratamento ³. Realizou-se um estudo exploratório com 36 crianças angolanas com ACF, 19 do género feminino e 17 do género masculino, cuja média de idade foi de 7 anos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os níveis de HbF antes e após 6 e 12 meses de tratamento com HU, utilizando como amostra sangue hemolisado. As cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ pré-tratamento foram também analisadas. Fez-se ainda uma avaliação da concordância entre os métodos cromatográficos de troca iónica e fase reversa para a quantificação de HbF, através da análise de Bland-Altman. A HbF pré-tratamento e após 6 e 12 meses de tratamento foi determinada



pelo método de cromatografia líquida de troca iónica (IEX-HPLC) e as cadeias de globina $G\gamma$ e $A\gamma$ pré-tratamento foram determinadas por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC). Os dados foram tratados estatisticamente. A média da HbF nas 36 crianças com ACF avaliadas, no pré-tratamento foi de 6,3%, após 6 meses de tratamento foi de 14,7% e após 12 meses de tratamento foi de 12,9%. Em 2,8% dos doentes verificou-se um aumento mínimo dos níveis de HbF após 6 meses de tratamento com HU. Os níveis de HbF após 6 meses de tratamento duplicaram em 47,2% dos doentes, triplicaram em 27,8% dos doentes e 22,2% dos doentes apresentaram níveis de HbF aumentados em quatro vezes ou mais. Após 6 meses de tratamento, 50% dos doentes adquiriram um nível de HbF entre 10% e 20%, enquanto que apenas 19,4% dos doentes apresentaram esses níveis de HbF na fase de pré-tratamento, e 22,2% dos doentes obtiveram níveis de HbF $\geq 20\%$. Em nenhum dos 36 doentes se detetou níveis de HbF $\geq 20\%$ no pré-tratamento. Após 12 meses de tratamento, a percentagem de doentes que mantiveram e/ou alcançaram níveis de HbF entre 10% e 20% foi de 52,8% e, dos que alcançaram níveis de HbF acima ou iguais a 20% foi de 11,1%. Os resultados evidenciaram que a HU foi eficaz na elevação dos níveis de HbF logo após 6 meses de tratamento. Após 12 meses de tratamento verificou-se uma estabilização ou ligeira diminuição nos níveis de HbF. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no aumento do nível de HbF, após tratamento com HU, entre os géneros feminino e masculino, nem entre os grupos etários de 3 a 7 e 8 a 11 anos. Na fase de pré-tratamento nas 36 crianças, obteve-se uma média da cadeia $G\gamma$ de 38,17% e da cadeia $A\gamma$ de 61,83%. A análise preliminar das cadeias de globina mostrou em 4 amostras a relação $G\gamma/A\gamma > 1$, enquanto 32 amostras mostraram valor compatível com o padrão do adulto de relação < 1 . Relativamente à avaliação dos dois métodos cromatográficos IEX-HPLC e RP-HPLC para quantificação da HbF, a análise de Bland-Altman demonstrou que a média das diferenças entre os métodos é 0,3 unidades, o que significa que há concordância de resultados. Conclui-se, que a HU é um fármaco eficaz na elevação dos níveis de HbF, logo nos 6 primeiros meses de tratamento e, portanto, pode contribuir positivamente para o tratamento da ACF na população em estudo, uma vez que a HbF é um dos principais moduladores da gravidade da doença. A avaliação da concordância entre os métodos cromatográficos para a quantificação da HbF mostrou que ambos são adequados para o fim pretendido.

Palavras chave: anemia, células falciformes, hemoglobina S, hemoglobina fetal, hidroxíureia.



ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is an autosomal recessive hereditary anemia characterized by the presence of hemoglobin S (HbS) in homozygosity, being among the most common genetic diseases. Data from the Sickle Cell Anemia Initiative in Angola, between 2011 and 2018, indicate that of the 323,930 children undergoing neonatal screening for SCD, 7,748 (2.39%) have the disease and 58,043 (17.91%) are carriers of the sickle cell trait. It is estimated that more than fifteen thousand new cases of the disease are born annually in Angola ¹. The primary event in the pathogenesis of SCD is the polymerization of HbS that occurs when deoxygenated, resulting in red blood cell distortion (RBC) and decreased flexibility. Its pathophysiology results directly or indirectly from vascular obstruction due to the presence of sickle cells, with consequent tissue infarction. Tissue hypoxia caused by vaso-occlusion in the microcirculation and the consequent multiorgan damage is the main cause of morbidity and mortality in this disease. Despite being a monogenic disease, its clinical phenotype is heterogeneous, ranging from relatively moderate to very severe. Some patients only have mild symptoms associated with chronic hemolytic anemia, while others suffer from recurrent painful attacks and severe multiorgan damage. This fact is due to the modifying influence of both environmental and genetic factors. Among the latter, the expression level of fetal hemoglobin (HbF) stands out, not only because it reduces the concentration of HbS inside the RBC, but also because it inhibits its polymerization. In SCD the concentration of HbF varies between 0.1% and 30%, with an average of 8% ². The increased levels of HbF confer great clinical benefits and are associated with a smoother progression of the disease and with fewer clinical complications. Hydroxyurea (HU) is a drug widely explored in relation to its effect inducing the synthesis of the γ -globin chain and consequently increasing the levels of HbF, an effect that is promising to treat ACF. The response of patients to HU is highly variable and approximately 30% of patients with SCD do not respond to treatment ³. An exploratory study was carried out with 36 Angolan children with SCD, 19 female and 17 male, whose mean age was 7 years. The present study aimed to evaluate HbF levels before and after 6 and 12 months of treatment with HU, using hemolyzed blood as a sample. Pretreatment $G\gamma$ and $A\gamma$ chains were also analyzed. An evaluation of the agreement between the ion exchange and reversed-phase chromatographic methods for the quantification of HbF was also carried out, using the Bland-Altman analysis. HbF pre-treatment and after 6 and 12 months of treatment was determined by ion exchange liquid chromatography (IEX-HPLC) method and pre-treatment $G\gamma$ and $A\gamma$ globin chains were determined by reversed-phase liquid chromatography (RP-



HPLC). Data were treated statistically. The mean HbF in the 36 children with SCD evaluated was 6.3% before treatment, 14.7% after 6 months of treatment and 12.9% after 12 months of treatment. In 2.8% of patients, there was a minimal increase in HbF levels after 6 months of treatment with HU. HbF levels after 6 months of treatment doubled in 47.2% of patients, tripled in 27.8% of patients, and 22.2% of patients had fourfold or greater HbF levels. After 6 months of treatment, 50% of patients acquired an HbF level between 10% and 20%, while only 19.4% of patients had such HbF levels in the pre-treatment phase, and 22.2% of patients obtained HbF levels $\geq 20\%$. None of the 36 patients had HbF levels $\geq 20\%$ pre-treatment. After 12 months of treatment, the percentage of patients who maintained and/or reached HbF levels between 10% and 20% was 52.8% and HbF levels above or equal to 20% was 11.1%. The results showed that HU was effective in raising HbF levels after 6 months of treatment. After 12 months of treatment, there was a stabilization or slight decrease in HbF levels. No statistically significant differences were found in the increase in the level of HbF, after treatment with HU, between females and males, nor between ages 3 to 7 and 8 to 11 years. In the pre-treatment phase in the 36 children, an average of the $G\gamma$ chain of 38.17% and of the $A\gamma$ chain of 61.83% was obtained. Preliminary analysis of globin chains showed a $G\gamma/A\gamma$ ratio >1 in 4 samples, while 32 samples showed a value compatible with the adult standard of ratio <1 . Regarding the evaluation of the two chromatographic methods IEX-HPLC and RP-HPLC for HbF quantification, the Bland-Altman analysis showed that the average of the differences between the methods is 0.3 units, which means that there is agreement of results. It is concluded that HU is an effective drug in the elevation of HbF levels, in the first 6 months of treatment and, therefore, can contribute positively to the treatment of SCD in the study population, since HbF is one of the main modulators of disease severity. The evaluation of the agreement between the chromatographic methods for the quantification of HbF showed that both are suitable for the intended purpose.

Keywords: anemia, sickle cell, hemoglobin S, fetal hemoglobin , hydroxyurea



ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

A2AR: *Adenosine A2A receptor* (Recetor de Adenosina A2A)

ACF: Anemia de Células Falciformes

ACMG: *American College of Medical Genetics and Genomics* (Colégio Americano de Genética Médica e Genômica)

ADP: Adenosina Difosfato

ATP: Adenosina Trifosfato

BCL11A: *B-Cell Lymphoma/Leukemia 11A* (Linfoma de Células B/leucemia 11A)

BHE: Barreira Hematoencefálica

cAMP: Adenosina-3'5'-monofosfato cíclico

CAR: *Central African Republic* (República Centro-Africana)

CCl₃COOH: Ácido Tricloroacético

cGMP: Guanosina-3'5'-monofosfato cíclico

CHGM: Concentração de Hemoglobina Globular Média

CISA: Centro de Investigação em Saúde de Angola

CO: Monóxido de Carbono

CO₂: Dióxido de Carbono

CREB1: Proteína 1 de Ligação ao Elemento de Resposta do cAMP

CVT-3146: Regadenoson

DAMP: *Damage-Associated Molecular Pattern* (Padrão Molecular Associado ao Dano)

df: *degrees of freedom* (Graus de Liberdade)

DF: Doença Falciforme

DMT: Dose Máxima Tolerada

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNMT: *DNA methyltransferase* (DNA metiltransferase)

DP: Desvio Padrão

DPS: Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis

EMA: *European Medicines Agency* (Agência Europeia de Medicamentos)

eNOS: *Endothelial Nitric Oxide Synthase* (Óxido Nítrico Sintase Endotelial)

EP: Erro Padrão

FDA: *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos)

FDP: Frutose-1,6-Difosfato

FE: Fase Estacionária



Fe²⁺: Ferro Ferroso

Fe³⁺: Ferro Férrico

FIE: Focagem Isoelétrica

FM: Fase Móvel

GBT-440: Voxelotor

Gi/JNK/Jun: Ativação Dependente de Gi da Cinase N-Terminal de C-Jun

Glu: Ácido Glutâmico

GMI-1070: Rivipansel

GV: Glóbulo Vermelho

h: hora

H⁺: Hidrogénio

HCl: Ácido Clorídrico

Hb: Hemoglobina

HbA: Hemoglobina A

HbA₂: Hemoglobina A₂

HbAC: Hemoglobina AC

HbC: Hemoglobina C

HbE: Hemoglobina E

HbF: Hemoglobina Fetal

HbS: Hemoglobina S

HDAC: *Histone Deacetylase* (Histona Desacetilase)

HGM: Hemoglobina Globular Média

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de Hidrogénio

HPFH: *Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin* (Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal)

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

Ht: Hematócrito

HU: Hidroxiureia

IEX-HPLC: *Ion Exchange-High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Troca Iónica)

IL-1 β : Interleucina-1 beta



iNKT: Invariante *Natural Killer T* (Invariante Assassino Natural T)

I-R: Isquemia-Reperfusão

IVIG: Imunoglobulina intravenosa

kg: kilograma

KLF3: *Kruppel Like Factor 3* (Fator 3 Semelhante a Krüppel)

LCR: *Locus Control Region* (Região de Controlo de Lócus)

LDH: Lactato Desidrogenase

MAPK-p38: Proteína Cinase Ativada Por Mitogénio

mA: miliampere

min.: minutos

miR: micro RNA

mL: mililitro

mm: milímetro

MP4CO: Hemoglobina Peguilada Saturada com Monóxido de Carbono

MYB: *Myeloblastosis* (Oncogene de Mieloblastose)

NaCl: Cloreto de Sódio

NADPH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina)

NETs: *Neutrophil Extracellular Traps* (Armadilhas Extracelulares dos Neutrófilos)

NF-KB: *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells* (Fator Nuclear Intensificador da Cadeia Leve Kappa de Células B Ativadas)

nm: nanómetro

NO: Óxido Nítrico

NO₂: Dióxido de Azoto ou Dióxido de Nitrogénio

NO₃⁻: Nitrato

O₂: Oxigénio

O₃: Ozono

OH•: Radical hidroxilo

P-188: Poloxamer-188

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PEG: Peguilada

pI: Ponto Isoelétrico

PKG: *Protein Kinase G* (Proteína Cinase G)



PM: *Particle Material* (Material Particulado)

pO₂: Pressão Parcial de Oxigénio

QTL: *Quantitative Trait Loci* (Lócus de Característica Quantitativa)

RBC: *Red Blood Cell*

RNA: *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

RNR: *Ribonucleotide reductase* (Ribonucleotídeo Redutase)

ROS: *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigénio)

RP-HPLC: *Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa)

SCD: *Sickle cell disease*

SelG1: Crizanlizumab

sGC: *Soluble Guanylate Cyclase* (Guanilato Ciclase Solúvel)

SNP: *Single-nucleotide polymorphism* (Polimorfismo de nucleotídeo único)

SO₂: Dióxido de Enxofre

SP1: *Specificity Protein 1* (Proteína de especificidade 1)

TA: Temperatura Ambiente

TLR4: *Toll-Like Receptor 4* (Recetor do Tipo Toll 4)

tR: Tempo de Retenção

UV: Ultravioleta

Val: Valina

v: volt

VGM: Volume Globular Médio

W: Watt

XO: Xantina Oxidase

α: Alfa

β: Beta

δ: Delta

ε: Épsilon

γ: Gama

ζ: Zeta

°C: Grau Celsius

g/mol: gramas por mol

p/v: peso por volume



MΩ: Megaohm

μL: microlitro

μm: micrómetro

μvolt: micro volt

%: percentagem

2,3-DPG: 2,3-Difosfoglicerato

5-HMF/Aes-103: 5-hidroximetilfurfural

Símbolos usados nas fórmulas:

H: altura de pratos teóricos

Kc: constante de distribuição

K: fator de retenção

L: comprimento da coluna cromatográfica

N: número de pratos teóricos

Rs: resolução da coluna cromatográfica

t₀ ou t_M: Tempo Morto

t_E: tempo na fase estacionária

w: largura da base do pico de um cromatograma

α: fator de seletividade



ÍNDICE GERAL

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 25 |
| 2 | MOTIVAÇÃO | 27 |
| 3 | REVISÃO DA LITERATURA | 28 |
| 3.1 | O GLÓBULO VERMELHO E A HEMOGLOBINA..... | 28 |
| 3.2 | ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES..... | 32 |
| 3.2.1 | Epidemiologia..... | 32 |
| 3.2.2 | Fisiopatologia..... | 36 |
| 3.2.3 | Manifestações Clínicas..... | 39 |
| 3.2.4 | Diagnóstico..... | 41 |
| 3.2.5 | Tratamento..... | 44 |
| 3.3 | HIDROXIUREIA..... | 46 |
| 3.3.1 | Estrutura..... | 46 |
| 3.3.2 | Farmacocinética..... | 47 |
| 3.3.3 | Mecanismo de ação..... | 47 |
| 3.3.4 | Efeitos adversos..... | 49 |
| 3.3.5 | Hidroxiureia e hemoglobinopatias..... | 49 |
| 3.3.6 | Variabilidade de resposta ao tratamento com hidroxiureia..... | 52 |
| 3.4 | CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA..... | 54 |
| 3.4.1 | Cromatografia líquida de alta eficiência de troca iónica..... | 57 |
| 3.4.2 | Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa..... | 58 |
| 3.5 | ELETROFORESE..... | 59 |
| 3.5.1 | Focagem isoeletrica..... | 60 |
| 4 | OBJETIVOS | 62 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL..... | 62 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 62 |
| 5 | PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 63 |



| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.1 | AMOSTRAGEM | 63 |
| 5.1.1 | Amostra populacional | 63 |
| 5.1.2 | Amostra biológica | 63 |
| 5.2 | MATERIAIS E MÉTODOS | 63 |
| 5.2.1 | Deteção e quantificação das frações de hemoglobina e das cadeias de globina normais e anómalas, como a β^S , e $G\gamma$ e $A\gamma$ da HbF | 63 |
| 5.2.1.1 | Cromatografia líquida de alta eficiência de troca iónica | 64 |
| 5.2.1.2 | Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa | 65 |
| 5.2.2 | Avaliação qualitativa das frações de hemoglobina | 66 |
| 5.2.3 | Tratamento estatístico | 68 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 69 |
| 6.1 | CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO | 69 |
| 6.2 | AVALIAÇÃO PRÉ-TRATAMENTO | 69 |
| 6.3 | AVALIAÇÃO PÓS-TRATAMENTO | 71 |
| 6.4 | AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE DOIS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DA HbF | 79 |
| 7 | CONCLUSÃO | 82 |
| 8 | PERSPETIVAS FUTURAS | 85 |
| 9 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 87 |
| | ANEXOS | 98 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 3.1 (a) Sequência de maturação eritroide. À medida que os parâmetros de proliferação e o tamanho da célula diminuem, a acumulação de proteínas específicas da linhagem eritroide, como a hemoglobina, aumenta e as células adaptam as suas características morfológicas. (b) Regulação da eritropoiese..... | 28 |
| Figura 3.2 Morfologia de um GV de um indivíduo saudável..... | 29 |
| Figura 3.3 Sangue periférico de um indivíduo saudável, mostrando GVs e plaquetas normais. | 29 |
| Figura 3.4 (a) Hemoglobina: um tetrâmero de quatro cadeias polipeptídicas de globina, com um grupo heme ligado a cada cadeia. As ligações $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ estão localizadas entre os dímeros. As ligações $\alpha_1\beta_1$ estão na frente enquanto as ligações $\alpha_2\beta_2$ estão atrás. (b) Heme é a protoporfirina IX que carrega um ião ferroso central (Fe^{2+}). (c) Molécula de hemoglobina ilustrando o dobramento terciário das quatro cadeias polipeptídicas. O heme está suspenso entre as hélices E e F de cada cadeia polipeptídica. A cor rosa representa α_1 (esquerda) e α_2 (direita); a cor amarelo representa não α_2 (esquerda) e não α_1 (direita). As cadeias polipeptídicas formam primeiro dímeros α_1 -não- α_1 e α_2 -não- α_2 e, em seguida, agrupam-se num tetrâmero (estrutura quaternária) com ligações α_1 -não- α_2 e α_2 -não- α_1 | 30 |
| Figura 3.5 (a) Agrupamentos dos genes das cadeias de globina nos cromossomas 16 e 11. As diferentes cadeias de globina são sintetizadas independentemente e, então, combinam-se entre si para produzir as diferentes hemoglobinas. LCR, região de controlo do locus. (b) Síntese de cadeias individuais de globina na vida pré e pós-natal..... | 31 |
| Figura 3.6 Polimorfismo compensado, onde a desvantagem dos homozigotos SS é equilibrada pela vantagem dos heterozigotos AS. HbAA (normal); HbAS (traço falciforme); HbSS (ACF)..... | 32 |
| Figura 3.7 Distribuição histórica (a) e contemporânea (2010) (b) da doença falciforme. HbS: hemoglobina S para doença falciforme..... | 33 |
| Figura 3.8 Modificadores genéticos e não genéticos de gravidade fenotípica na doença falciforme. As setas indicam se o fator está geralmente associado a um fenótipo mais suave ou mais grave. A escala para biomarcadores não genéticos é apenas indicativa, uma vez que muitas das evidências são inconsistentes. CAR (República Centro-Africana), monóxido de carbono (CO), hemoglobina fetal (HbF), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrogênio (NO_2), ozono (O_3), material particulado (PM) e dióxido de enxofre (SO_2). | 34 |



| | |
|--|----|
| Figura 3.9 Localizações dos cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que atuam como QTL (<i>Quantitative Trait Loci</i>) no nível de HbF em adultos. Eles podem atuar directamente na expressão dos genes da γ -globina ou afetar o processo de eritropoiese para aumentar a produção de células F..... | 35 |
| Figura 3.10 Relação entre ACF e infeções sob a influência potencial de determinantes ambientais: a ACF aumenta a suscetibilidade a infeções, assim como as infeções também desencadeiam alterações fisiopatológicas específicas de ACF. A terapia profilática pode levar a uma melhoria substancial em países de baixo e alto rendimento <i>per capita</i> | 36 |
| Figura 3.11 Glóbulo vermelho de doente com ACF e de indivíduo normal. (a) GVs com Hb falciforme em vasos (desenhado pelo software 3ds Max 2013); (b) e (c) Diagramas esquemáticos do GV com Hb normal e com Hb falciforme (desenhado pelo software 3ds Max 2013). | 37 |
| Figura 3.12 Polimerização da HbS e deformação eritrocitária. Polímeros longos de HbS alinham-se em fibras, que então se agrupam em hastes paralelas. O polímero possui uma estrutura helicoidal com 14 moléculas de HbS em cada seção. A polimerização da HbS depende de muitos fatores, incluindo a concentração de HbS, pressão parcial de oxigénio (pO_2), temperatura, pH, concentração de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e a presença de diferentes moléculas de Hb. O conceito básico da cinética de polimerização da HbS é o mecanismo de dupla nucleação..... | 38 |
| Figura 3.13 A fisiopatologia molecular da doença falciforme é considerada um ciclo vicioso de quatro processos principais: (a) polimerização da HbS, (b) biorreologia prejudicada e aumento da adesão mediada por vaso-oclusão, (c) disfunção endotelial mediada por hemólise e (d) ativação combinada de inflamação estéril (recetor <i>Toll-like 4</i> – e vias imunes inatas dependentes de inflamassoma). | 39 |
| Figura 3.14 Complicações clínicas da doença falciforme. A dor é a complicação aguda mais comum. À medida que os indivíduos com ACF envelhecem, as complicações crónicas produzem disfunções orgânicas que podem contribuir para uma morte precoce. As complicações da gravidez incluem pré-eclâmpsia, restrição do crescimento intrauterino, parto prematuro e mortalidade perinatal. | 40 |
| Figura 3.15 Esfregaços sanguíneos (a) e (b) com células em forma de “foice” (→). | 42 |
| Figura 3.16 Teste de solubilidade..... | 42 |
| Figura 3.17 Abreviaturas / Chave: F, S, A, C e V = As hemoglobinas vistas na triagem neonatal; HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência; FIE: Focagem isoelétrica. É | |



necessário repetir o teste aos 6 meses de idade se a genotipagem não for realizada para confirmar o resultado da triagem neonatal.....43

Figura 3.18 Processo básico do teste de hemoglobinopatia.....43

Figura 3.19 O equilíbrio entre os riscos potenciais de curto prazo do exercício agudo e os benefícios de longo prazo do exercício regular em indivíduos com traço falciforme e ACF. .46

Figura 3.20 Estrutura da HU.....47

Figura 3.21 Mecanismo de ação antineoplásico da HU.....48

Figura 3.22 Múltiplos efeitos benéficos da HU para ACF. **(1)** Indução de hemoglobina fetal através da ativação da guanilil ciclase solúvel e cinética eritroide alterada; **(2)** menor contagem de neutrófilos e reticulócitos pela inibição da ribonucleotídeo redutase e citotoxicidade da medula; **(3)** adesividade diminuída e reologia melhorada de neutrófilos e reticulócitos circulantes; **(4)** redução da hemólise por melhoria da hidratação dos GVs, macrocitose e redução da falciformação intracelular; e **(5)** libertação de óxido nítrico (NO) com potencial vasodilatação local e melhoria da resposta vascular.49

Figura 3.23 Efeitos da HU nas hemoglobinopatias. A HU exerce alterações favoráveis nos GVs, endotélio vascular e medula óssea em doentes com β -hemoglobinopatias por meio de várias vias celulares e moleculares. Abreviaturas: GVs, glóbulos vermelhos; Hb, hemoglobina; sGC, guanilato ciclase solúvel; PKG, proteína cinase dependente de cGMP; Gi/JNK/Jun, ativação dependente de Gi da cinase N-terminal de c-Jun; MAPK-p38, proteína cinase ativada por mitogénio; CREB1, proteína 1 de ligação ao elemento de resposta do cAMP; DNMT, DNA metiltransferase; HDAC, histona desacetilase; cGMP, guanosina 3',5'-monofosato cíclico; cAMP, adenosina 3',5'-monofosfato cíclico.....50

Figura 3.24 Um diagrama do efeito postulado da HU na inibição da polimerização da HbS, aumentando os níveis de HbF (cerca de 25%) em cada GV falciforme e, portanto, diminuindo o grau de obstrução microvascular em qualquer nível de oxigénio. O efeito mitigador da HbF, maior que o da HbA, ocorre porque o híbrido misto $\alpha_2\beta^S\gamma$ que se forma no interior do GV não entra na fase polimérica.51

Figura 3.25 Vias de microRNAs envolvidas no efeito de indução de HbF pela HU. O agrupamento da β -globina humana consiste numa região de controlo do locus (LCR) e quatro genes de função (ϵ , γ , δ e β). A γ -globina é ativa durante a vida fetal e é suprimida em adultos pela ação de vários fatores de transcrição que incluem a proteína de especificidade 1 (SP1), fator 3 semelhante a Krüppel (KLF3), oncogene de mieloblastose (MYB) e linfoma de células B/leucemia 11A (BCL11A). A HU altera a expressão de vários microRNAs (miR) que atuam



nesses alvos moleculares para induzir a HbF. miR-26b e miR-151-3 estimulam a γ -globina na dose máxima tolerada (DMT) de HU.53

Figura 3.26 Aplicações da cromatografia líquida. Pode-se observar que os tipos de cromatografia à direita do diagrama são mais adequados para os compostos polares. As técnicas na parte de baixo do diagrama são mais adequadas para as espécies de alta massa molecular.....55

Figura 3.27 Diagrama de blocos mostrando os componentes típicos de um sistema para HPLC.56

Figura 3.28 O cromatograma e suas características. tO ou tM : tempo de retenção da FM (tempo morto); tR : tempo de retenção do analito; w : largura da base do pico.57

Figura 3.29 Cromatograma de HPLC (Bio-Rad Variant II) de um doente com ACF, mostrando HbS glicosilada com o mesmo tempo de retenção da HbA (seta preta) e HbF, incluindo a forma acetilada (seta branca).59

Figura 3.30 Análise por RP-HPLC de sangue total, obtido de um doente com ACF transfundido com GVs de dadores saudáveis. As cadeias de globina são eluídas na seguinte ordem, das globinas mais hidrofílicas para as mais hidrofóbicas: βA , β^S , δ , α , $G\gamma$ e $A\gamma$. A identificação das cadeias de globina é baseada no perfil de eluição. Tempo de retenção, área, altura e % de área são descritos para cada pico.60

Figura 3.31 Princípio da FIE. Duas proteínas, com pontos isoelétricos variados, irão migrar na presença de um gradiente de pH e campo elétrico, até que a carga líquida de uma proteína seja zero, altura em que a migração cessará.61

Figura 3.32 Gel de FIE mostrando amostras de adultos e neonatos usando o sistema RESOLVE.....62

Figura 6.1 Cromatograma de RP-HPLC de uma rapariga de 8 anos com ACF, cuja cadeia $G\gamma$ (57%) é superior à cadeia $A\gamma$ (43%).70

Figura 6.2 Cromatograma de RP-HPLC de uma rapariga de 3 anos com ACF, cuja cadeia $A\gamma$ (55%) é superior à cadeia $G\gamma$ (45%).70

Figura 6.3 Percentagem de HbF nas 36 crianças com ACF, pré e após o tratamento com HU. O local onde a linha vertical começa (de baixo para cima) indica o valor mínimo e, onde a linha termina indica o valor máximo. O retângulo possui três linhas horizontais, a linha de baixo indica o primeiro quartil (25%), a linha intermédia indica o segundo quartil ou mediana (50%) e, a linha de cima indica o terceiro quartil (75%). O intervalo interquartil é dado pela distância entre o primeiro e o terceiro quartil.72



- Figura 6.4** Distribuição da HbF, em valor percentual, (a) pré-tratamento, (b) após 6 meses de tratamento e (c) após 12 meses de tratamento com HU, na variável género.73
- Figura 6.5** Distribuição da HbF, em valor percentual, (a) pré-tratamento, (b) após 6 meses de tratamento e (c) após 12 meses de tratamento com HU, na variável idade.73
- Figura 6.6** Cromatograma de IEX-HPLC (Bio-Rad Variant II) de um menino de 11 anos com ACF, mostrando o aumento da percentagem de HbF (seta preta) após o tratamento com HU. (a) pré-tratamento; (b) após 6 meses de tratamento; (c) após 12 meses de tratamento.75
- Figura 6.7** Histogramas de frequência da HbF, expressos em valor percentual. (a) % HbF pré-tratamento; (b) % de HbF após 6 meses de tratamento; (c) % de HbF após 12 meses de tratamento.75
- Figura 6.8** Linha de regressão entre as medidas do nível de HbF feitas pelos métodos cromatográficos IEX-HPLC e RP-HPLC. A equação de regressão é expressa como: $y = 0,946x - 0,008$. A linha de regressão tem uma inclinação de 1,06 (1,02 a 1,09) e uma interceptação de -0,008 (-0,168 a 0,152). O coeficiente de correlação entre os dois métodos é $r = 0,970$81
- Figura 6.9** Gráfico de Bland-Altman para os dados obtidos através da quantificação da HbF, pelos métodos IEX-HPLC e RP-HPLC, com a representação dos limites de concordância (linha pontilhada), de $-1,96s$ a $+1,96s$. DP: desvio padrão.81



ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1 Tipos de hemoglobinas nas fases embrionária, ao nascimento e no adulto, e respetivas percentagens..... | 31 |
| Tabela 3.2 Técnicas de diagnóstico da ACF e suas finalidades..... | 41 |
| Tabela 3.3 Novos agentes terapêuticos em estudo direcionados para o tratamento da ACF... | 44 |
| Tabela 3.4 Variantes genómicas associadas ao nível de HbF induzido por HU. | 52 |
| Tabela 3.5 Resumo dos mecanismos de produção de HbF em resposta à HU. | 53 |
| Tabela 3.6 Variáveis que influenciam na eficiência de separação das colunas cromatográficas. | 57 |
| Tabela 5.1 Número e percentagem de doentes em cada grupo (feminino, masculino, 3 a 7 e 8 a 11 anos de idade)..... | 63 |
| Tabela 5.2 Materiais e reagentes utilizados na IEX-HPLC. | 64 |
| Tabela 5.3 Preparação do calibrador, <i>primer</i> , controlos nível I e II e amostras, utilizados na IEX-HPLC. | 64 |
| Tabela 5.4 Componentes do equipamento AGILENT 1100 SERIES e seus respetivos modelos..... | 65 |
| Tabela 5.5 Tipos de eluentes utilizados na RP-HPLC e respetivas referências..... | 65 |
| Tabela 5.6 Condições de separação no processo cromatográfico e gradiente linear dos quatro eluentes utilizados na RP-HPLC..... | 66 |
| Tabela 5.7 Materiais e reagentes utilizados na FIE. | 67 |
| Tabela 5.8 Procedimento utilizado na técnica de FIE..... | 67 |
| Tabela 6.1 Média, mediana, mínimo e máximo da idade dos 36 doentes aquando da colheita pré-tratamento. | 68 |
| Tabela 6.2 Média, mediana, mínimo e máximo da percentagem de HbF e das cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ pré-tratamento. | 69 |
| Tabela 6.3 Média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão da % HbF pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU, nas 36 crianças com ACF. | 71 |
| Tabela 6.4 Média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão da percentagem de HbF, pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU, na variável género..... | 71 |
| Tabela 6.5 Média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão da percentagem de HbF, pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU, na variável idade..... | 71 |



| | |
|--|----|
| Tabela 6.6 Média, desvio padrão, quartis, valores mínimo e máximo, limites superior e inferior e dispersão interquartílica da percentagem de HbF, antes e após 6 e 12 meses de tratamento com HU..... | 72 |
| Tabela 6.7 Testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk que avaliam o padrão de distribuição do nível de HbF pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU. | 75 |
| Tabela 6.8 Teste t de Student realizado para comparar o nível de HbF entre as variáveis pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU. | 76 |
| Tabela 6.9 Teste de Wilcoxon realizado para comparar o nível de HbF entre os grupos pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU. | 76 |
| Tabela 6.10 Teste de Mann-Whitney utilizado para comparar o nível percentual de HbF, pré-tratamento, entre as variáveis género e idade. | 77 |
| Tabela 6.11 Teste t Independente utilizado para comparar o nível percentual de HbF, após 6 e 12 meses de tratamento, entre as variáveis género e idade..... | 77 |
| Tabela 6.12 Número e percentagem de doentes com HbF $\leq 10\%$, $>10\%$ e $<20\%$, e $\geq 20\%$, pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU. | 78 |
| Tabela 6.13 Número e percentagem de doentes em cada nível (1, 2, 3 e 4) de aumento da HbF, após 6 e 12 meses de tratamento com HU..... | 78 |



1 INTRODUÇÃO

O termo hemoglobinopatias abrange todos os distúrbios genéticos da hemoglobina (Hb), os quais estão entre as doenças monogénicas mais comuns e constituem um dos principais problemas de saúde pública do mundo. Todas as hemoglobinopatias são causadas por mutações e/ou deleções nos genes que codificam para as cadeias de globina. Quando o defeito genético afeta a síntese de Hb denomina-se talassemia, sendo as mais frequentes as talassemias α e β . Quando a alteração genética provoca uma mudança estrutural na Hb, com produção de uma Hb anormal, dá-se o nome de variante estrutural da Hb, sendo as principais a hemoglobina S (HbS), hemoglobina E (HbE) e hemoglobina C (HbC). Além destes dois grupos existem ainda subtipos com diferentes padrões de doença. As manifestações clínicas das hemoglobinopatias variam de anemia hipocrómica leve a doença hematológica moderada a anemia grave dependente de transfusão e vitalícia com envolvimento de vários órgãos. A expectativa de vida de um doente devidamente tratado é de cerca de 50 a 60 anos ⁴.

A anemia das células falciformes (ACF), relatada pela primeira vez por Herrick em 1910, constitui um distúrbio genético autossómico recessivo, decorrente de uma mutação pontual de um único par de bases no gene da β -globina, resultando na substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina na cadeia da β -globina, o que gera uma Hb anormal referida como HbS. Foi a primeira doença a ser caracterizada molecularmente. A ACF é uma das doenças hereditárias com risco de vida mais comuns em humanos, e afeta predominantemente pessoas de ascendência africana, indiana e árabe. A diversidade fenotípica é patognomónica da doença. É uma patologia multissistémica com complicações agudas e crónicas que se manifestam quando a hemoglobina fetal (HbF) diminui para o nível do adulto. Com o aumento da sobrevivência, a ACF está mudando o seu padrão clínico na infância, com doentes que agora sobrevivem até à idade adulta e mesmo na velhice. Os cuidados abrangentes incluem profilaxia com antibiótico, terapia com hidroxiureia (HU), outras terapias preventivas e promoção da saúde ⁵.

A HU é, atualmente, o principal medicamento usado no tratamento eficaz de pacientes com ACF. Ela melhora o curso clínico da doença aumentando progressivamente os níveis de HbF e, portanto, reduzindo a concentração de HbS, limitando assim seus efeitos deletérios ⁶. A HU tem muitas características de um fármaco ideal para ACF e fornece benefício terapêutico através de múltiplos mecanismos de ação. É um fármaco barato, administrado por via oral, uma vez por dia, aumenta a HbF e a Hb total, reduz o número de leucócitos e reticulócitos, diminui a lactato desidrogenase (LDH), melhora a anemia, leva a menos eventos



SNS SERVIÇO NACIONAL
DE SAÚDE



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge



vaso-oclusivos e hospitalizações, diminui a hemólise, atua em todas as faixas etárias, previne eventos agudos e disfunção orgânica crónica, não possui toxicidades importantes, os benefícios continuam ao longo do tempo e ainda apresenta amplo índice terapêutico ⁷.



2 MOTIVAÇÃO

A ACF está entre as doenças genéticas mais comuns e mais estudadas em todo o mundo. Estima-se que nasçam anualmente mais de quinze mil novos casos de ACF em Angola ¹. A HU foi o primeiro fármaco aprovado pela *Food and Drugs Administration* (FDA) para o tratamento da ACF em adultos. Para além do seu efeito antineoplásico, a HU também é conhecida por induzir o aumento da γ -globina nos glóbulos vermelhos (GVs) humanos, aumentando a produção de HbF, sendo esta a sua ação mais importante no tratamento das β -hemoglobinopatias. ⁸.

Face à complexidade genética da ACF, e por sofrer ainda a influência de fatores ambientais, a doença resulta numa incrível diversidade clínica. A HbF é considerada o mais potente modificador da doença e tem sido o modulador genético mais amplamente estudado. Elucidar a relação entre a concentração de HbF e a ACF é um desafio. A maioria dos indivíduos normais produz menos de 0,6% de HbF, embora uma pequena proporção da população normal produza até 5%. Entre os doentes com ACF, a concentração de HbF varia de 0,5% a 30%, com uma média de aproximadamente 8%. O grau de persistência de HbF varia amplamente entre os adultos e esta variação é geneticamente controlada. A persistência de produção de níveis elevados de HbF pode conferir grandes benefícios clínicos a doentes com síndromes falciformes. ^{2; 9}.

A HbF consiste no maior inibidor da polimerização da HbS desoxigenada. Com isso, evita a falciformação do GV, a anemia hemolítica crónica, as crises dolorosas vaso-oclusivas, o infarto e a necrose em diversos órgãos, melhorando a clínica e a expectativa de vida dos doentes ¹⁰. Por estes motivos, é importante continuar o estudo da HU, um indutor da produção de HbF, como modelo terapêutico promissor na ACF ¹⁰.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O GLÓBULO VERMELHO E A HEMOGLOBINA

O GV é o produto de uma série de etapas de diferenciação e maturação, com início numa célula estaminal pluripotente. Este complexo e ordenado processo é conhecido como eritropoiese (figura 3.1) e envolve redes hierárquicas de citocinas. As células estaminais hematopoiéticas da medula óssea estimuladas pela hormona eritropoietina (produzida pelo rim e fígado) e outros fatores, proliferam e diferenciam-se e, numa última fase, sofrem extrusão do núcleo da célula para facilitar a reologia do GV após a produção e acumulação de alta concentração de Hb e enzimas. Na fase final os reticulócitos perdem o RNA residual, sendo a sua quantificação útil para a avaliação qualitativa e quantitativa da taxa de eritropoiese do sangue periférico (figura 3.1a). Os GVs maduros possuem uma vida média de 100 a 120 dias na circulação sanguínea e são removidos da circulação por macrófagos no baço e outras células do sistema reticuloendotelial. A diminuição da pressão do oxigénio (O_2), seja pela perda de sangue, altitude elevada ou *shunts* cardíacos leva à produção de eritropoietina iniciando o ciclo (figura 3.1b) ¹¹.

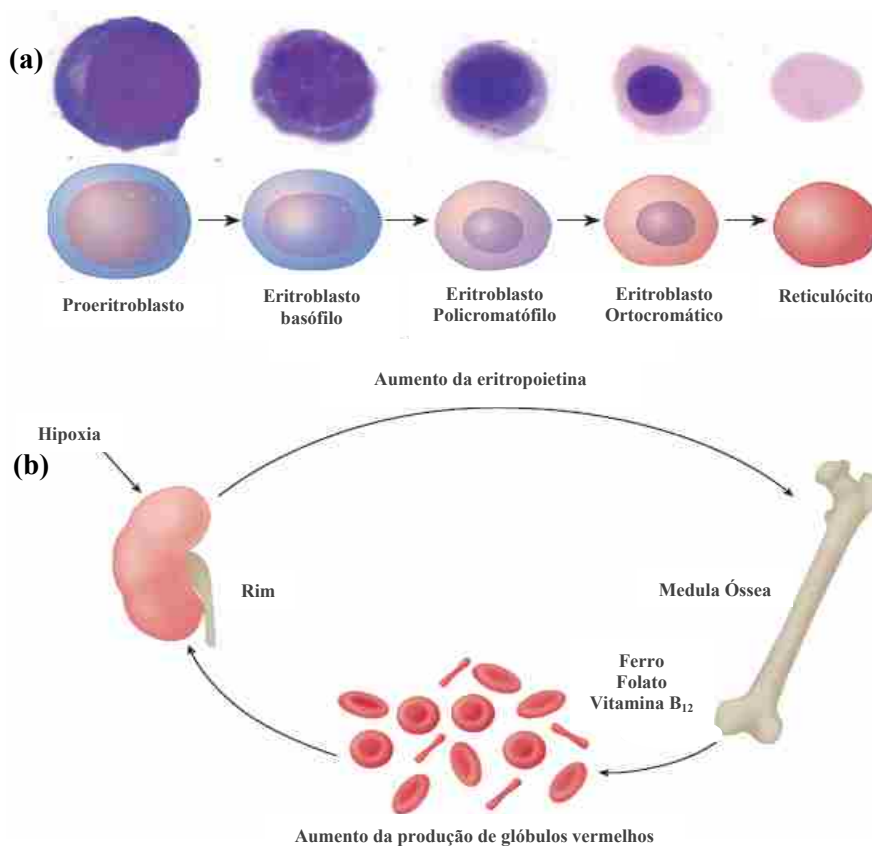


Figura 3.1 (a) Sequência de maturação eritroide. À medida que os parâmetros de proliferação e o tamanho da célula diminuem, a acumulação de proteínas específicas da linhagem eritroide, como a hemoglobina, aumenta e as células adaptam as suas características morfológicas. (b) Regulação da eritropoiese. Adaptado de (11).



Os GVs são células sanguíneas que possuem formato de disco bicôncavo (figura 3.2), uma minoria possui concavidade unilateral. No esfregaço sanguíneo corado apresentam um contorno circular e uma região central mais pálida que ocupa aproximadamente um terço da célula (figura 3.3). O diâmetro médio é de cerca de 7,5 μm , exibindo pouca variabilidade quanto ao formato e tamanho. A membrana dos GVs compõe-se de uma dupla camada lipídica na qual estão inseridas várias proteínas transmembranares, principalmente a proteína 3 e as glicoforinas. Ligado à membrana lipídica está o citoesqueleto, composto especialmente por espectrina, uma proteína que forma heterodímeros α e β que se combinam em tetrâmeros formando uma rede complexa, cuja integridade é imprescindível para a manutenção do formato e flexibilidade da membrana ^{12; 13}.

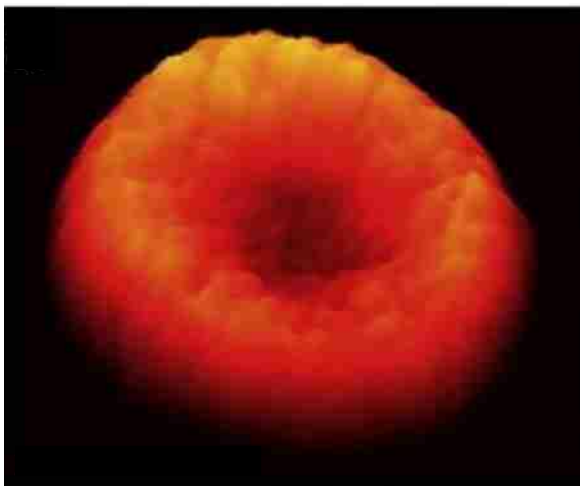


Figura 3.2 Morfologia de um GV de um indivíduo saudável. Adaptado de (13).

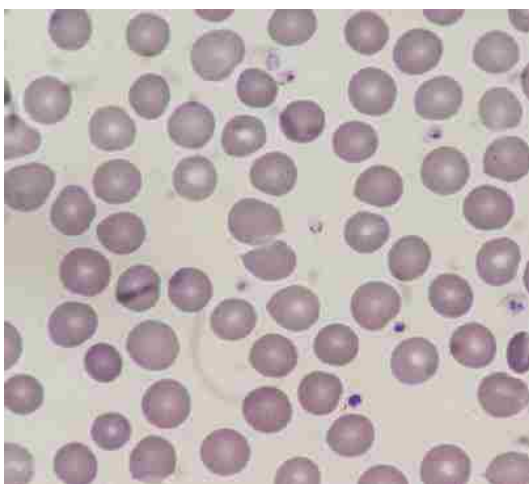


Figura 3.3 Sangue periférico de um indivíduo saudável, mostrando GVs e plaquetas normais. Adaptado de (12).

A Hb é uma proteína globular composta por dois pares diferentes de cadeias polipeptídicas, designadas por letras gregas, e quatro grupos heme, um em cada cadeia (figura

3.4). Cada grupo heme possui uma molécula de ferro ferroso (Fe^{2+}) que quando se liga à molécula de O_2 oxida ao estado férrico (Fe^{3+}) e a Hb oxidada passa a ser denominada metahemoglobina. A Hb compreende cerca de 95% do conteúdo citoplasmático dos GVs, sendo sua concentração intracelular de aproximadamente 34 g/dL e o seu peso molecular de aproximadamente 64.000 Daltons. A principal função da Hb consiste em transportar O_2 dos pulmões para os tecidos e dióxido de carbono (CO_2) dos tecidos para os pulmões, mas também contribui para o equilíbrio ácido-base ao libertar iões hidrogênio (H^+) e transportar óxido nítrico (NO), um regulador do tónus vascular ¹⁴.

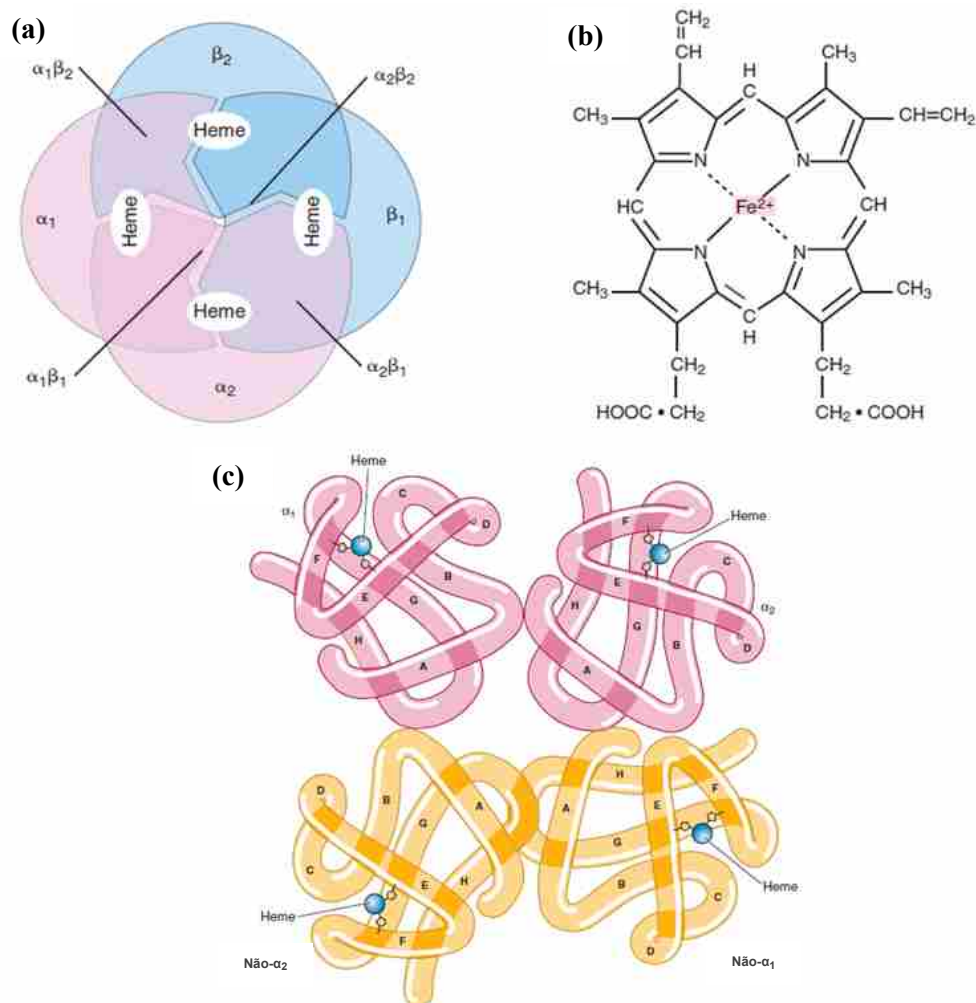


Figura 3.4 (a) Hemoglobina: um tetrâmero de quatro cadeias polipeptídicas de globina, com um grupo heme ligado a cada cadeia. As ligações $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ estão localizadas entre os dímeros. As ligações $\alpha_1\beta_1$ estão na frente enquanto as ligações $\alpha_2\beta_2$ estão atrás. (b) Heme é a protoporfirina IX que carrega um ião ferroso central (Fe^{2+}). (c) Molécula de hemoglobina ilustrando o dobramento terciário das quatro cadeias polipeptídicas. O heme está suspenso entre as hélices E e F de cada cadeia polipeptídica. A cor rosa representa α_1 (esquerda) e α_2 (direita); a cor amarelo representa não α_2 (esquerda) e não α_1 (direita). As cadeias polipeptídicas formam primeiro dímeros α_1 -não- α_1 e α_2 -não- α_2 e, em seguida, agrupam-se num tetrâmero (estrutura quaternária) com ligações α_1 -não- α_2 e α_2 -não- α_1 . Adaptado de (14).

Os genes que codificam para as cadeias de Hb estão organizados nos cromossomas 11 (ϵ, γ, δ e β) e 16 (ζ e α). No embrião e no feto predominam as Hbs *Gower 1*, *Portland*, *Gower 2* e HbF. No sangue de um adulto normal prevalece a hemoglobina A (HbA) e em menor quantidade a HbF e a hemoglobina A₂ (HbA₂). A principal conversão de Hbs ocorre 3 a 6 meses após o nascimento, período em que a síntese da cadeia γ é substituída pela síntese da cadeia β , e a HbA passa a predominar em detrimento da HbF (figura 3.5 e tabela 3.1). O gene da cadeia α é duplicado (α_1 e α_2) e a cadeia γ é codificada por dois genes, o gene *HBG1* codifica para $^A\gamma$ expressando alanina, enquanto o gene *HBG2* codifica para $^G\gamma$ expressando glicina¹⁵. A proporção entre $^G\gamma/^A\gamma$ é de cerca de 70:30 ao nascimento e geralmente de 40:60 no adulto, variações nessa proporção são observadas em vários distúrbios da Hb¹⁶; ¹⁷. Os genes que codificam para as cadeias de globina contém três exões e dois intrões, sendo regulados por vários fatores transcricionais, em particular o fator BCL11A. O estado de metilação dos genes, o empacotamento do cromossoma e várias sequências amplificadoras também participam no processo de transcrição destes genes¹⁵.

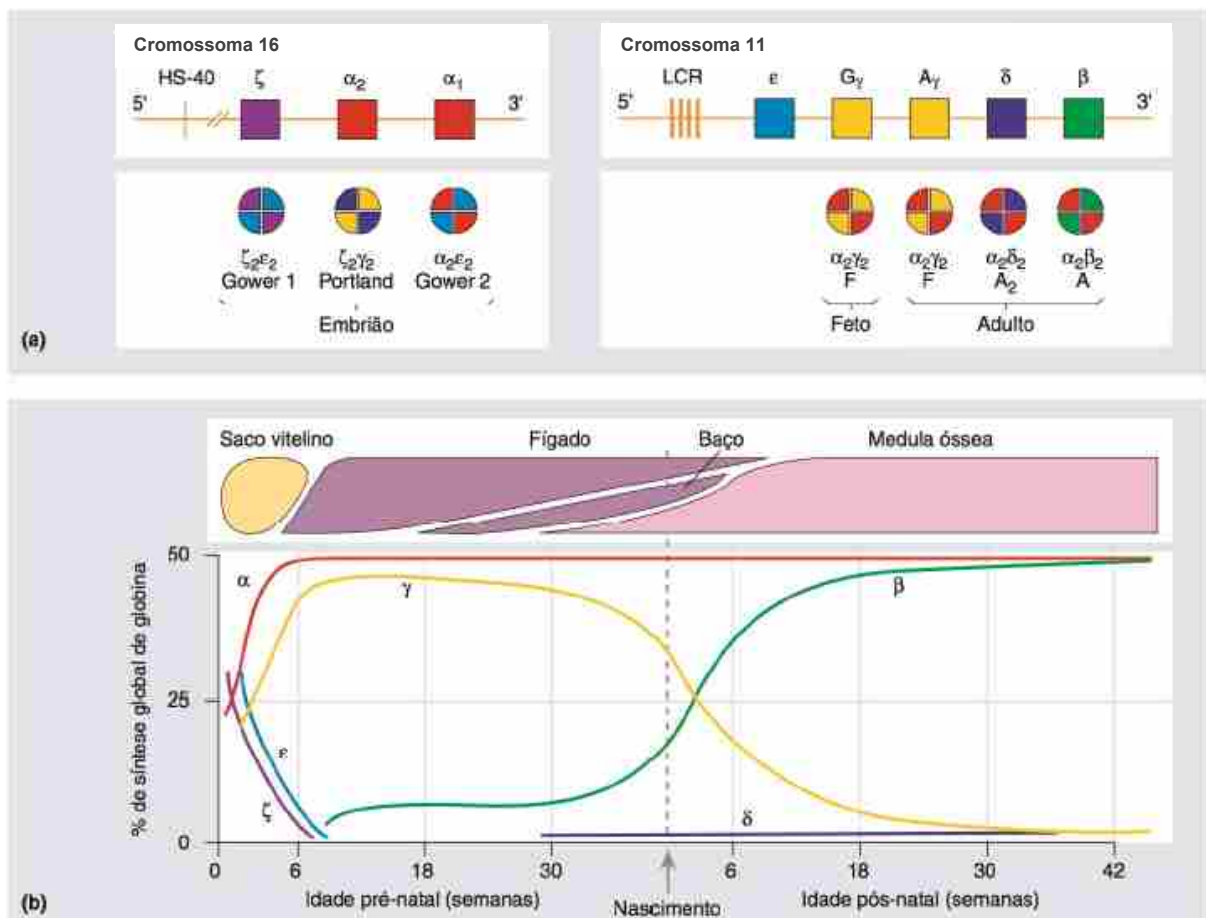


Figura 3.5 (a) Agrupamentos dos genes das cadeias de globina nos cromossomas 16 e 11. As diferentes cadeias de globina são sintetizadas independentemente e, então, combinam-se entre si para produzir as diferentes hemoglobinas. LCR, região de controlo do locus. (b) Síntese de cadeias individuais de globina na vida pré e pós-natal. Adaptado de (15).

Tabela 3.1 Tipos de hemoglobinas nas fases embrionária, ao nascimento e no adulto, e respetivas percentagens. Adaptado de (11).

| HEMOGLOBINAS EMBRIONÁRIAS | HEMOGLOBINAS (% AO NASCIMENTO) | HEMOGLOBINAS (% EM ADULTOS) |
|---------------------------------|--------------------------------|---|
| Gower 1 $\zeta_2\varepsilon_2$ | HbF $\alpha_2\gamma_2$ (75) | HbA $\alpha_2\beta_2$ (97) |
| Portland 1 $\zeta_2\gamma_2$ | HbA $\alpha_2\beta_2$ (25) | HbA ₂ $\alpha_2\delta_2$ (2,5) |
| Gower 2 $\alpha_2\varepsilon_2$ | - | HbF $\alpha_2\gamma_2$ (<1) |

3.2 ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES

3.2.1 Epidemiologia

A doença falciforme (DF) abrange um grupo de doenças genéticas do sangue que resultam da herança de genes mutados da Hb e inclui a ACF, HbSS, HbSC, HbSD, HbSO^{Arabe} e HbS β ¹⁸. O genótipo mais comum ao nascimento é a doença falciforme homozigótica (SS), cuja manifestação clínica é mais severa e apresenta maior mortalidade. Já o traço falciforme, caracterizado pela herança de um gene anormal da célula falciforme de um dos pais e de um gene normal para HbA do outro, é geralmente inofensivo porque os portadores possuem HbA e HbS (heterozigotia), com níveis de HbS entre 20% e 45% que, normalmente, não são suficientes para causar problemas relacionados com a falciformação, portanto não é considerado DF ¹⁹. Os genótipos da Hb normal, da Hb no traço falciforme e da Hb na ACF estão esquematizados na figura 3.6.

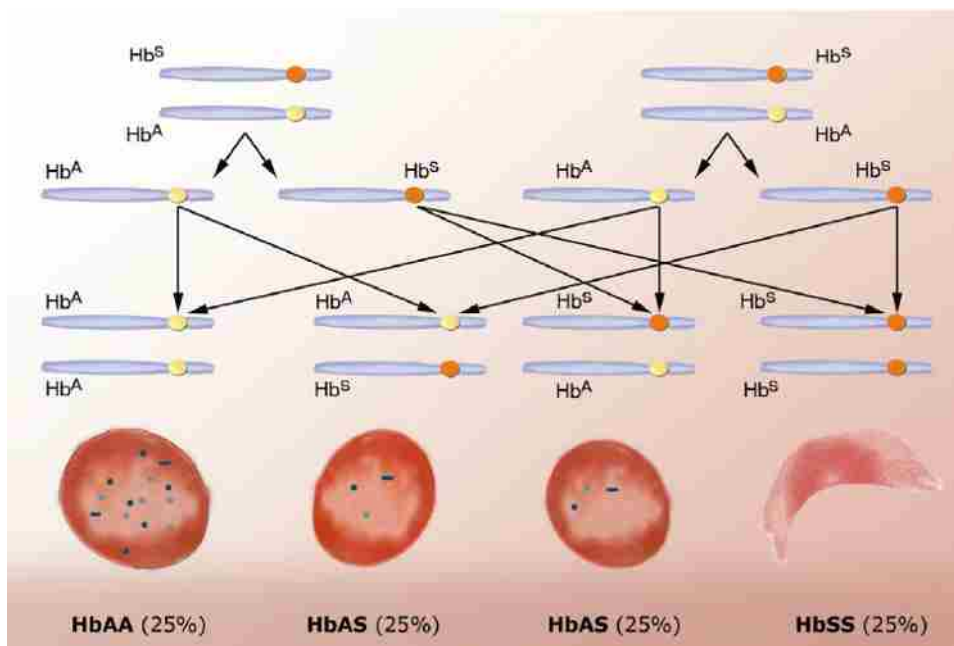


Figura 3.6 Polimorfismo compensado, onde a desvantagem dos homozigotos SS é equilibrada pela vantagem dos heterozigotos AS. HbAA (normal); HbAS (traço falciforme); HbSS (ACF). Adaptado de (28).

Indivíduos com traço falciforme possuem resistência relativa à infecção de malária por *Plasmodium falciparum*, mais pronunciada na infância, no período entre a perda da imunidade materna adquirida e o desenvolvimento da imunidade ativa. Em 1949, foi sugerido que altas frequências do gene da célula falciforme são atingidas devido a essa vantagem de sobrevivência dos heterozigotos (HbAS) em relação aos indivíduos normais (HbAA), considerando a relação da distribuição global do gene e a hipótese de malária ²⁰.

A prevalência do gene da célula falciforme ocorreu, originalmente, em áreas endêmicas para a malária como na África Subsaariana, na bacia do Mediterrâneo (Grécia e Itália, principalmente), no Médio Oriente e em partes do subcontinente indiano. Com os movimentos populacionais ao longo dos últimos séculos, a distribuição do gene espalhou-se paulatinamente, independentemente da malária, principalmente ao longo das costas orientais das Américas, nas Caraíbas e na Europa (figura 3.7). As frequências alélicas do gene mais elevadas concentram-se no norte da Angola, África Central e Ocidental, bem como em partes da Arábia Saudita e Índia ²¹. Atualmente, cerca de 5% da população mundial é portadora de genes característicos para distúrbios da Hb, principalmente DF e talassemia e mais de 300.000 crianças com distúrbios graves da Hb nascem a cada ano ²².

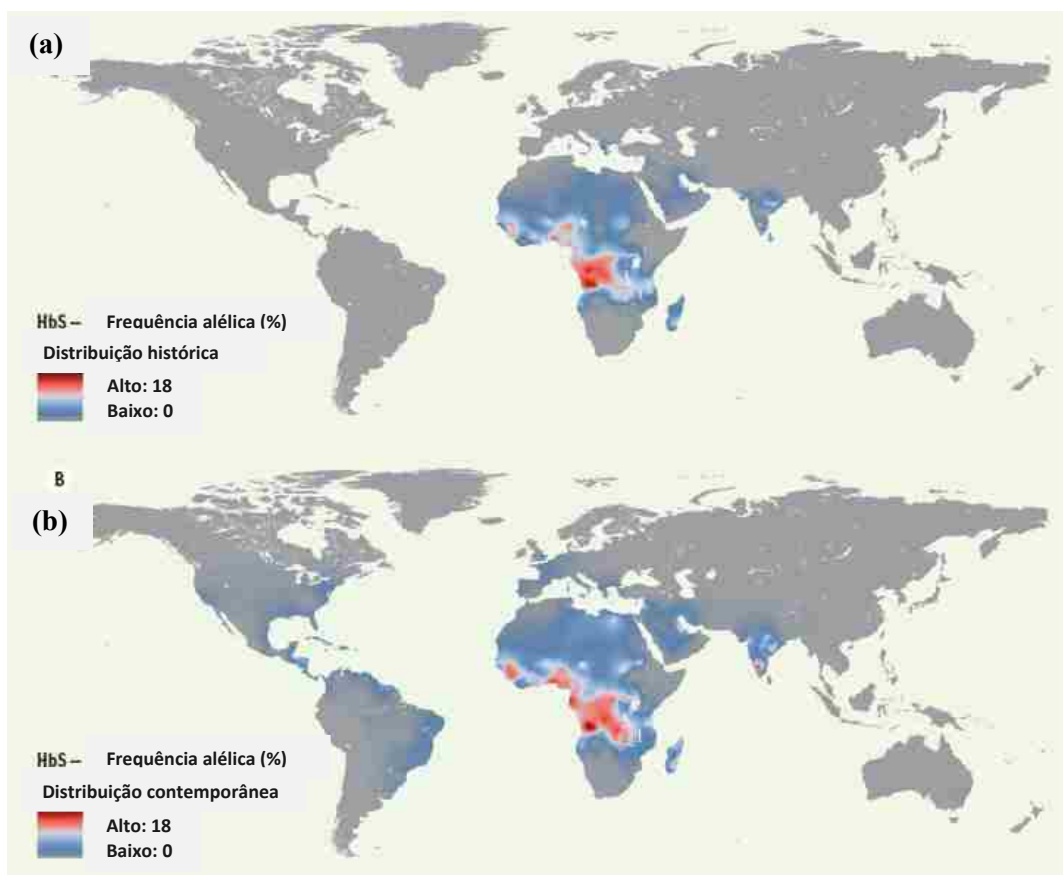


Figura 3.7 Distribuição histórica (a) e contemporânea (2010) (b) da doença falciforme. HbS: hemoglobina S para doença falciforme. Adaptado de (21).

A complexidade biológica da ACF reflete uma diversidade fenotípica que é regulada, em parte, por fatores genéticos (figura 3.8) e ambientais, que modulam a gravidade da doença. Os moduladores genéticos não ligados ao agrupamento da β -globina incluem genes envolvidos na expressão da HbF (figura 3.9), sendo que altos níveis de HbF conferem proteção contra crises vaso-oclusivas e eventos hemolíticos da doença; a herança de α -talassemia heterozigótica tende a diminuir a concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e assim reduz a falciformação intravascular; a coexistência de α -talassemia homozigótica reduz ainda mais o CHGM, porém, por mecanismo compensatório, gera um aumento da Hb total, elevando o hematócrito (Ht) e prejudicando o fluxo sanguíneo em vasos de maior calibre. As diferentes origens da mutação que resultaram nos vários haplótipos do gene HbS (Bantu, Benim, Camarões, Senegal e árabe-indiano) também podem explicar as diferenças fenotípicas ^{19, 23}.

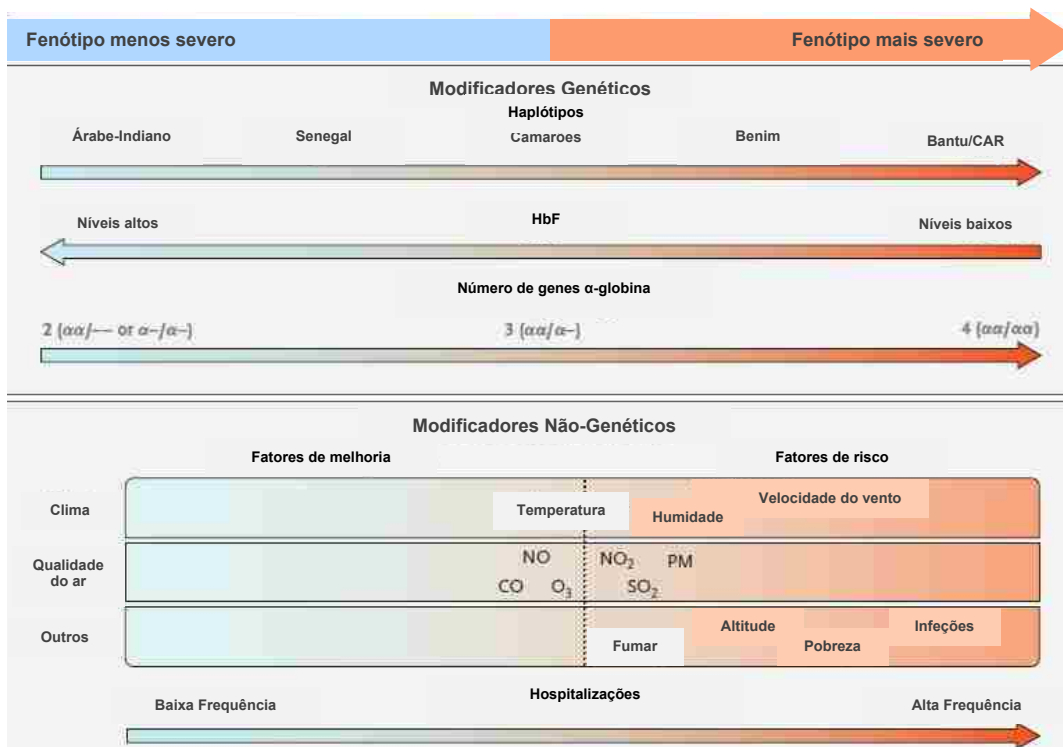


Figura 3.8 Modificadores genéticos e não genéticos de gravidade fenotípica na doença falciforme. As setas indicam se o fator está geralmente associado a um fenótipo mais suave ou mais grave. A escala para biomarcadores não genéticos é apenas indicativa, uma vez que muitas das evidências são inconsistentes. CAR (República Centro-Africana), monóxido de carbono (CO), hemoglobina fetal (HbF), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrogênio (NO₂), ozono (O₃), material particulado (PM) e dióxido de enxofre (SO₂). Adaptado de (23).

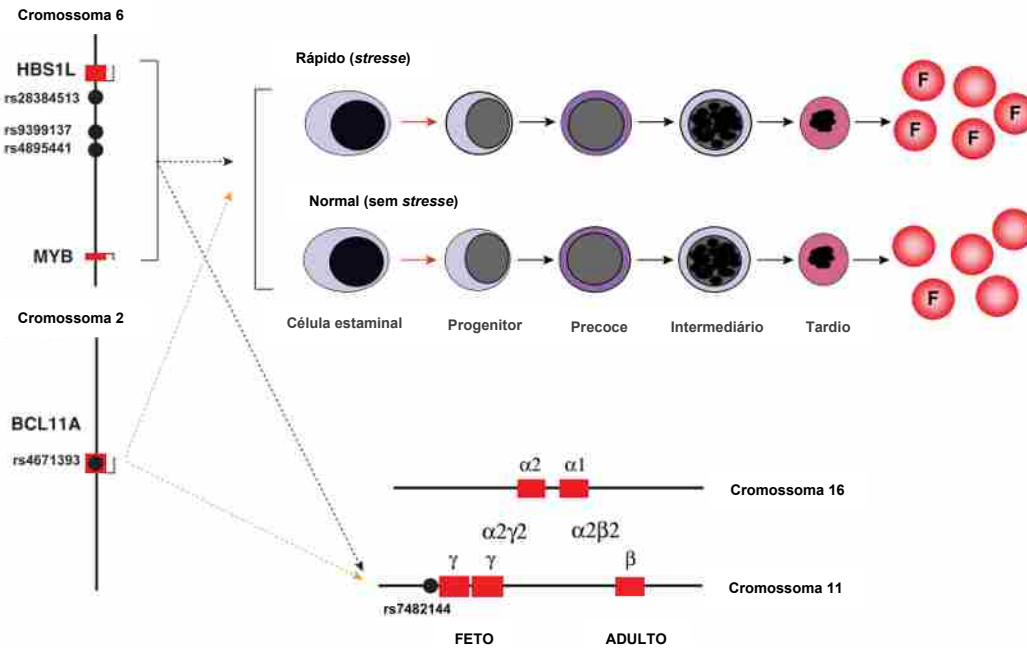


Figura 3.9 Localizações dos cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que atuam como QTL (*Quantitative Trait Loci*) no nível de HbF em adultos. Eles podem atuar directamente na expressão dos genes da γ -globina ou afetar o processo de eritropoiese para aumentar a produção de células F. Adaptado de (9).

Fatores ambientais (figura 3.10) também influenciam o fenótipo da ACF, incluindo o clima, a qualidade do ar, a habitação, a situação socioeconómica e atividade física. Os fatores ambientais interferem na taxa de polimerização da HbS ao alterar condições de hipóxia, pH, temperatura e hidratação do doente. O tempo frio pode causar aumento de infeções e vasoconstrição periférica, levando a uma maior desoxigenação, o que leva ao aumento das crises dolorosas. Episódios aumentados de dor aguda também estão relacionados com ventos fortes, humidade alta e baixa e estação chuvosa em climas tropicais. Em países com condições socioeconómicas mais precárias, a deficiência em nutrientes pode afetar a função imunológica e contribuir para a suscetibilidade à infeção ²⁴.

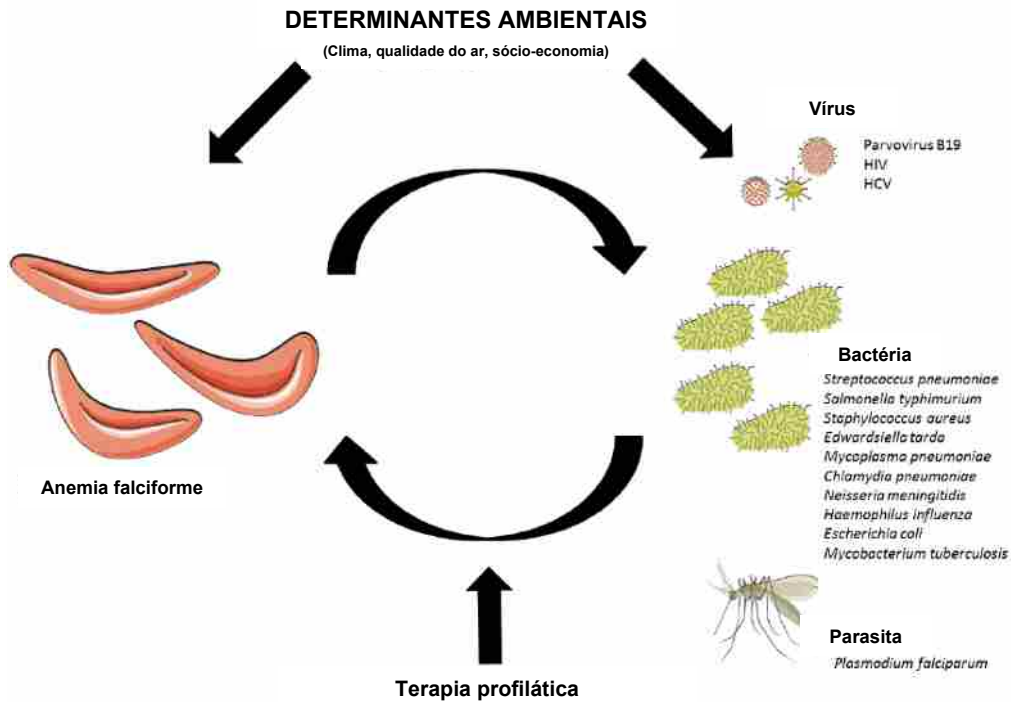


Figura 3.10 Relação entre ACF e infeções sob a influência potencial de determinantes ambientais: a ACF aumenta a suscetibilidade a infeções, assim como as infeções também desencadeiam alterações fisiopatológicas específicas de ACF. A terapia profilática pode levar a uma melhoria substancial em países de baixo e alto rendimento *per capita*. Adaptado de (24).

3.2.2 Fisiopatologia

A ACF é uma doença genética autossómica recessiva, causada pela homozigotia do alelo β^S (HbSS), localizado no cromossoma 11p15.5, que difere do alelo β normal devido a um polimorfismo de nucleotídeo único dbSNP rs334(T;T), em que a base nitrogenada adenina é substituída pela timina no sexto codão do gene da β -globina (GAG→GTG). Isso leva à substituição do aminoácido hidrofílico ácido glutâmico (Glu) pelo aminoácido hidrofóbico valina (Val), resultando na formação de uma Hb tetramérica mutada, a HbS ($\alpha_2\beta^S_2$) nos GVs de indivíduos com ACF, como ilustra a figura 3.11 ⁵; ²⁵.

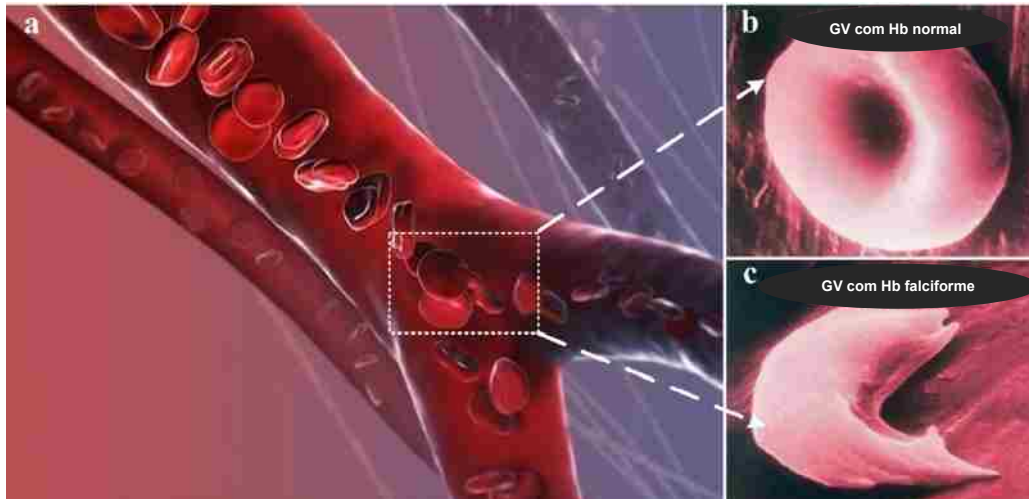


Figura 3.11 Glóbulo vermelho de doente com ACF e de indivíduo normal. **(a)** GVs com Hb falciforme em vasos (desenhado pelo software 3ds Max 2013); **(b)** e **(c)** Diagramas esquemáticos do GV com Hb normal e com Hb falciforme (desenhado pelo software 3ds Max 2013). Adaptado de (29).

Quatro processos fisiopatológicos principais da ACF foram descritos nas últimas décadas, sendo eles a polimerização da HbS (figura 3.12), a vaso-oclusão, a disfunção endotelial mediada por hemólise e a inflamação estéril, todos ilustrados na figura 3.13. Diferentes tetrâmeros de HbS desoxigenados ligam-se entre si, ocultando os domínios hidrofóbicos, dando início à nucleação de um polímero de HbS. Estes polímeros aumentam rapidamente para formar fibras longas que elevam a rigidez celular, distorcem a membrana eritrocitária, levando à falciformação dos GVs, falha energética celular e stresse, desidratação, reologia prejudicada e promovem a agregação dos GVs falciformes com neutrófilos, plaquetas e células endoteliais, o que gera a estase do fluxo sanguíneo, conhecida como vaso-oclusão. A vaso-oclusão promove lesão de isquemia-reperfusão (I-R). Os feixes de Hb também promovem hemólise, libertando Hb livre na circulação sanguínea. A Hb oxigenada (Fe^{2+}) promove a disfunção endotelial ao esgotar as reservas endoteliais de NO para formar nitrato (NO_3^-) e metahemoglobina (Fe^{3+})^{26; 27}.

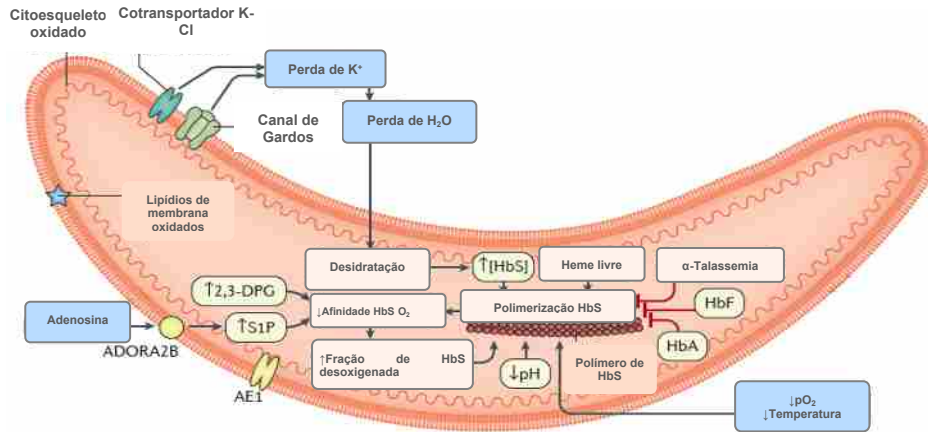


Figura 3.12 Polimerização da HbS e deformação eritrocitária. Polímeros longos de HbS alinham-se em fibras, que então se agrupam em hastas paralelas. O polímero possui uma estrutura helicoidal com 14 moléculas de HbS em cada seção. A polimerização da HbS depende de muitos fatores, incluindo a concentração de HbS, pressão parcial de oxigénio (pO_2), temperatura, pH, concentração de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e a presença de diferentes moléculas de Hb. O conceito básico da cinética de polimerização da HbS é o mecanismo de dupla nucleação. Adaptado de (31).

Alternativamente, a Hb também pode reagir com o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) através da reação de Fenton para formar o radical livre hidroxilo ($OH\bullet$) e metahemoglobina (Fe^{3+}). Além disso, a NADPH oxidase, a xantina oxidase (XO) e a NO sintase endotelial desacoplada (eNOS) geram radicais livres de oxigénio para promover a disfunção endotelial. A metahemoglobina (Fe^{3+}) é degradada para libertar heme livre, que é um dos principais padrões moleculares associados a danos nos GVs (DAMP). A geração de espécies reativas de oxigénio (ROS), ativação do recetor tipo *Toll 4* (TLR4), geração de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), libertação de DAMPs derivados de células, tecidos ou DNA e, outros fatores como o heme livre ou lesão de I-R podem contribuir para a inflamação estéril, ativando a via do inflamassoma em células vasculares e inflamatórias para libertar interleucina 1β (IL- 1β). Finalmente, a inflamação estéril promove ainda mais a vaso-oclusão por meio de um ciclo de *feedback*, promovendo a adesividade dos neutrófilos, plaquetas e células endoteliais ^{26; 28; 29; 30}.

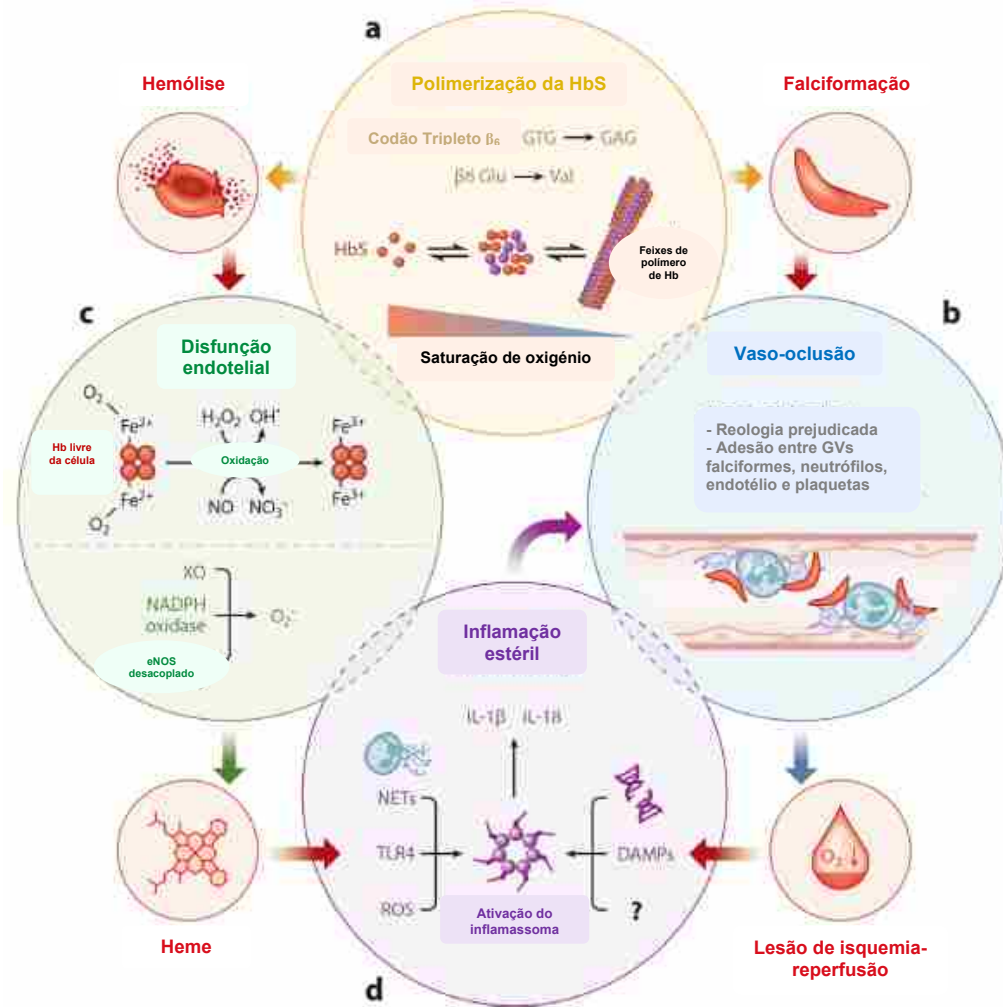


Figura 3.13 A fisiopatologia molecular da doença falciforme é considerada um ciclo vicioso de quatro processos principais: (a) polimerização da HbS, (b) biorreologia prejudicada e aumento da adesão mediada por vaso-oclusão, (c) disfunção endotelial mediada por hemólise e (d) ativação combinada de inflamação estéril (recetor *Toll-like 4*- e vias imunes inatas dependentes de inflamassoma). Adaptado de (26).

3.2.3 Manifestações Clínicas

A ACF é conhecida por ser uma doença com notável complexidade fenotípica, esta variabilidade mostra uma distribuição geográfica específica e associa-se a variantes genéticas. Algumas complicações agrupam-se a subfenótipos, como (1) subfenótipo vaso-oclusivo (Ht alto e maior viscosidade sanguínea; predisposição a crises dolorosas, síndrome torácica aguda e osteonecrose); (2) subfenótipo de hemólise e vasculopatia (níveis elevados de LDH e bilirrubina, indicando anemia hemolítica mais grave; risco de acidente vascular cerebral isquémico, hipertensão pulmonar, úlcera de perna, cálculos biliares, priapismo e possivelmente nefropatia; a diminuição do NO e a exposição ao heme estão associadas a complicações vasculopáticas; a anemia grave aumenta o débito cardíaco como compensação e o fluxo sanguíneo excessivo pode promover vasculopatia no rim e em outros órgãos); (3)

subfenótipo de HbF alta (a expressão persistente de HbF na faixa de 10 a 25% tende a reduzir a gravidade clínica da doença; níveis de expressão de 25 a 50% de HbF em todos os GVs - distribuição pancelar - melhora quase completamente os sintomas da ACF); (4) subfenótipo da dor (a sensibilidade diferencial à dor entre indivíduos faz com que eles sintam a dor de maneira diferente; um exemplo de modificador genético da dor é o gene *GCHI*). A figura 3.14 representa a condição multissistémica complexa da ACF, caracterizada por complicações agudas e crónicas ^{31; 32; 33}.

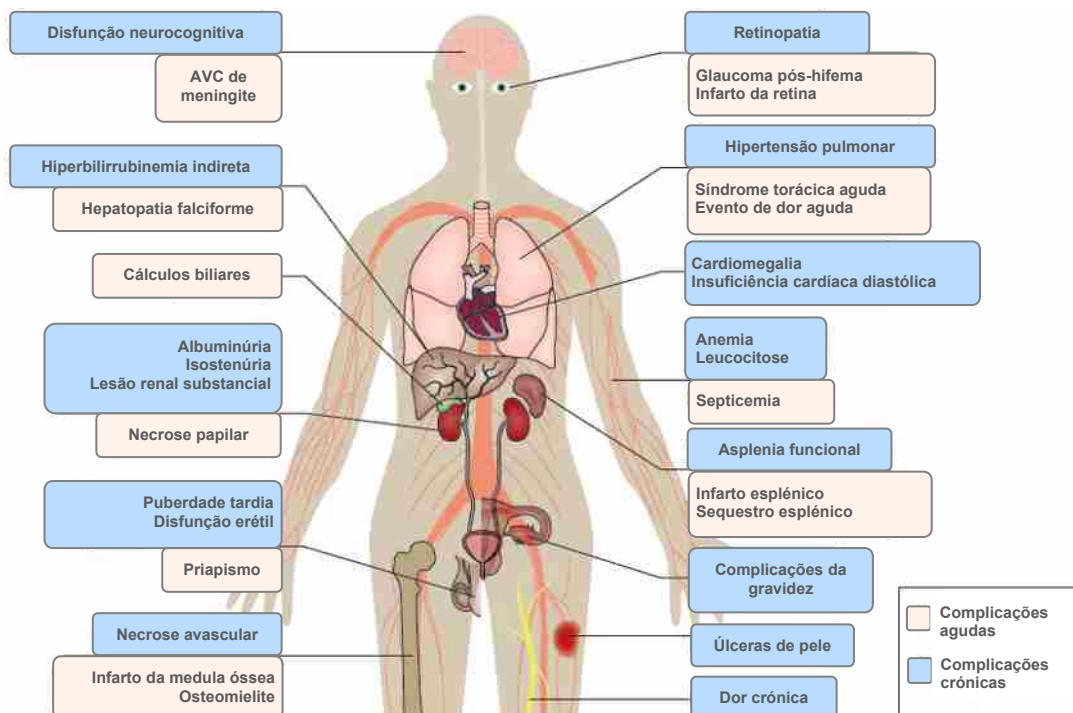


Figura 3.14 Complicações clínicas da doença falciforme. A dor é a complicação aguda mais comum. À medida que os indivíduos com ACF envelhecem, as complicações crônicas produzem disfunções orgânicas que podem contribuir para uma morte precoce. As complicações da gravidez incluem pré-eclâmpsia, restrição do crescimento intrauterino, parto prematuro e mortalidade perinatal. Adaptado de (31).

A persistência hereditária da hemoglobina fetal (do inglês HPFH, *Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin*) é uma condição benigna que resulta na persistência da cadeia fetal de γ -globina na idade adulta. A expressão contínua desta cadeia é devida a grandes deleções que estão a jusante do gene γ -globina no agrupamento β -globina (mutações de HPFH deletivas) e a mutações nos promotores dos genes γ -globina (mutações não deletivas de HPFH). A co-herança de ACF ou mutações da talassemia com mutações HPFH diminui a gravidade da doença, pois a presença de γ -globina compensa as cadeias de β -globina diminuídas ou alteradas ³⁴.

A ACF afeta adversamente a gravidez levando a complicações maternas e perinatais como pré-eclâmpsia, risco aumentado de diabetes gestacional, agravamento da anemia, maior



predisposição a infeções, icterícia no feto, limitação do crescimento intra-uterino, parto prematuro, abortos entre outros. As mudanças fisiológicas da gravidez, como aumento da atividade metabólica, aumento da viscosidade do sangue e a hipercoagulabilidade agravam-se em doentes com ACF, levando ao aumento da incidência de complicações como crises vaso-occlusivas, síndrome torácica aguda, osteonecrose, necrose hepática, úlceras de perna e eventos tromboembólicos ³⁵.

No contexto da pandemia de COVID-19, foram realizados estudos para avaliar a associação do traço falciforme e da ACF com o aumento do risco para a infeção grave pelo coronavírus. O traço falciforme, por aumentar o risco de hipercoagulabilidade durante a intercorrência de COVID-19, pode levar a desfechos clínicos desfavoráveis. Entretanto, ainda não há evidências da correlação putativa entre o genótipo da Hb e a gravidade da COVID-19. Outro estudo investigou se a ACF é um fator de risco para infeção grave por COVID-19, em relação à necessidade de ventilação não invasiva/cânula nasal de alto fluxo, ventilação mecânica ou óbito em doentes hospitalizados e concluiu-se que a ACF não é um fator de risco para piores desfechos da COVID-19 em doentes hospitalizados ^{36; 37}.

3.2.4 Diagnóstico

Os exames laboratoriais utilizados na pesquisa de ACF procuram detetar a HbS nos GVs, genotipar a Hb, determinar haplótipos e monitorizar a doença. As técnicas laboratoriais e suas finalidades estão apresentadas na tabela 3.2. A figura 3.15 ilustra esfregaços sanguíneos característicos da ACF e a figura 3.16 ilustra um teste de solubilidade. Um indivíduo normal tem genótipo HbAA, o traço falciforme tem genótipo HbAS e a ACF tem genótipo HbSS ^{38; 39; 40}.

Tabela 3.2 Técnicas de diagnóstico da ACF e suas finalidades. Adaptado de (38).

| ANÁLISE | TÉCNICAS | FINALIDADE |
|------------------------------------|---|---|
| Deteção de HbS nos GVs | Teste de falciformação dos GVs Teste de solubilidade | Avaliação qualitativa para determinar a presença ou ausência de HbS nos GVs |
| Genotipagem de Hb | Eletroforese de Hb em meio alcalino em acetato de celulose Eletroforese de Hb em meio ácido em agarose Isoeletrofocalização Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Doseamento de HbF | Qualificação dos principais genótipos de doença falciforme Doseamento de HbF: auxilia no entendimento da evolução clínica HPLC: diagnóstico pré-natal e neonatal de hemoglobinopatias |
| Determinantes de haplótipos | Reação em cadeia da polimerase (PCR) | Diferenciação da HbS de outras Hbs variantes Estabelecer associação entre haplótipos e diversidade clínica nos doentes com doença falciforme |

| ANÁLISE | TÉCNICAS | FINALIDADE |
|---------------|--|---|
| Monitorização | Hemograma Contagem de reticulócitos Morfologia eritrocitária Doseamento de ferritina Bilirrubinas Ácido úrico Fosfatase alcalina Lactato desidrogenase (LDH) Metahemoglobina Pesquisas intracelulares de corpos de Heinz Pesquisa de HbH e HbF | Avaliação qualitativa e quantitativa dos componentes celulares do sangue para monitorização |

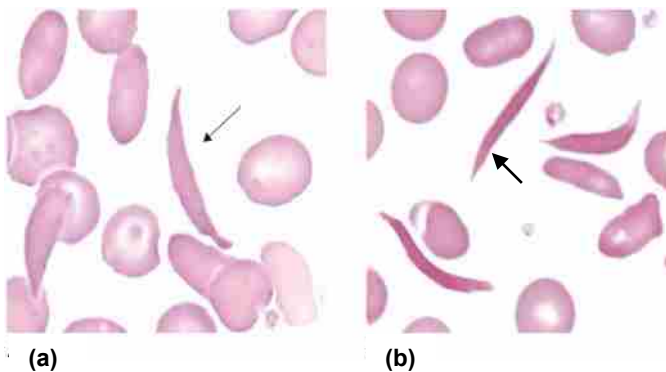


Figura 3.15 Esfregaços sanguíneos (a) e (b) com células em forma de “foice” (→). Adaptado de (39).

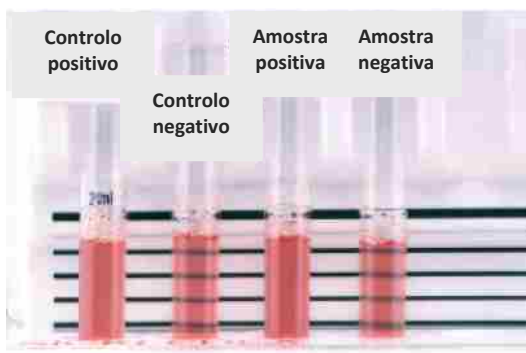


Figura 3.16 Teste de solubilidade. Adaptado de (40).

O *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) delineou um algoritmo especificamente para rastreio e confirmação de HbS e ações subsequentes para ACF confirmada e traço de HbS (figura 3.17). O algoritmo envolve o uso de métodos de primeira linha para identificação e métodos secundários para confirmação, estes métodos incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), focagem isoeétrica (FIE), eletroforese e estudo do DNA, diferindo na capacidade de detetar Hbs diferentes. O processo básico do teste de hemoglobinopatia consta na figura 3.18 ⁴¹.

Triagem da HbS

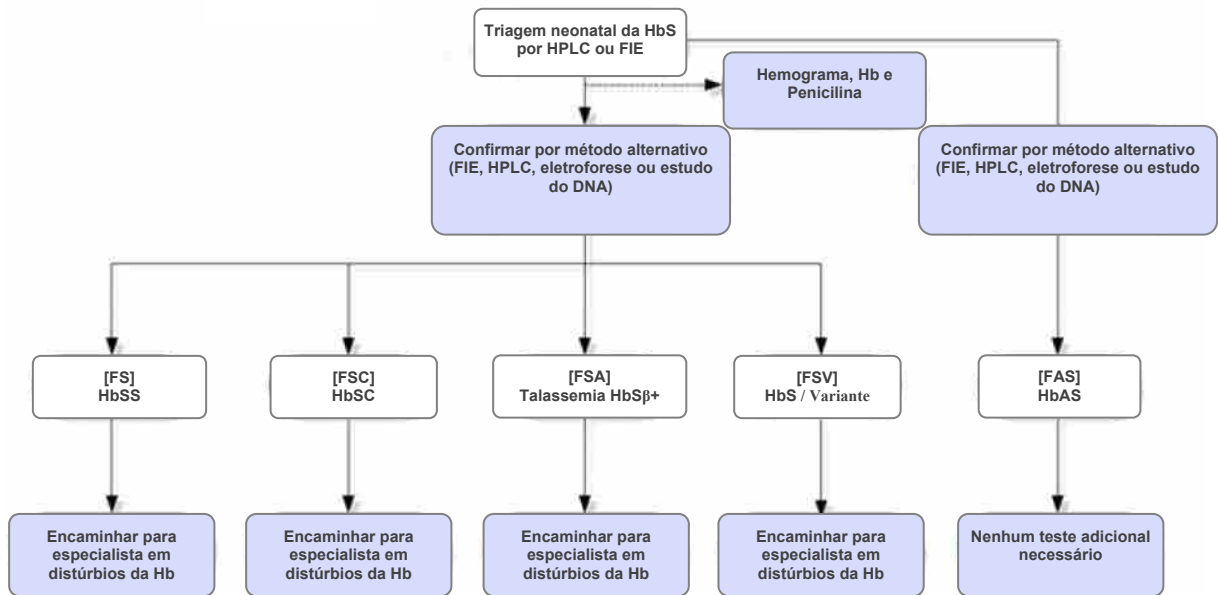
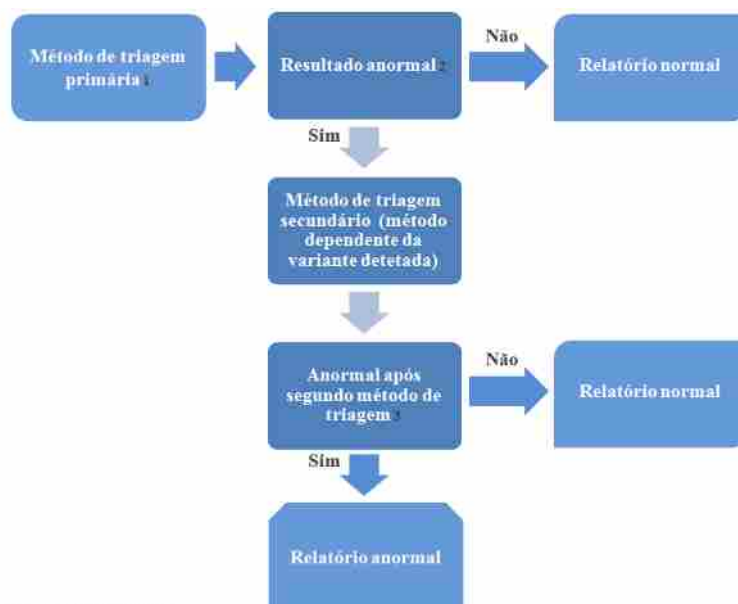


Figura 3.17 Abreviaturas / Chave: F, S, A, C e V = As hemoglobinas vistas na triagem neonatal; HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência; FIE: Focagem isoelétrica. É necessário repetir o teste aos 6 meses de idade se a genotipagem não for realizada para confirmar o resultado da triagem neonatal. Adaptado de (41).



1. Geralmente FIE ou HPLC.
2. Se for inadequado, devido à qualidade da amostra ou do teste, o resultado é obtido da triagem primária, o método de triagem primário é geralmente repetido antes de passar para a próxima etapa.
3. Geralmente FIE, HPLC ou métodos moleculares, dependendo do tipo de variante detetada pelo método de triagem primário.

Figura 3.18 Processo básico do teste de hemoglobinopatia. Adaptado de (41).



3.2.5 Tratamento

Os doentes com ACF são tratados por um hematologista, de maneira individualizada e de acordo com a condição do doente, juntamente com apoio psicossocial. Deve-se evitar a desidratação, clima frio e ambientes com menor teor de O₂ no ar inspirado, como a permanência em altitudes elevadas. Prevenção primária e medidas de prevenção de infeção, como profilaxia antibiótica, vacinação e transfusão de sangue para crianças com risco aumentado de acidente vascular cerebral, reduziram a mortalidade. Outro tratamento geral é principalmente sintomático, comumente o tratamento com O₂, fluidos, antipiréticos, analgésicos, antibióticos, exercícios respiratórios, broncodilatadores e anticoagulantes. O tratamento modificador da doença engloba: transfusão de sangue, HU e transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas ⁴².

Muitos agentes terapêuticos estão sendo investigados em ensaios clínicos para tratar a ACF, no intuito de prevenir as crises dolorosas, controlar a anemia e aliviar os sintomas. A polimerização da HbS têm sido um importante alvo terapêutico uma vez que consiste numa etapa fundamental na cascata de eventos que culminam nas manifestações clínicas da doença. Os agentes indutores de HbF têm grande impacto na redução das crises vaso-oclusivas, porém outros agentes terapêuticos direcionados a outros tipos de células e processos inflamatórios também podem contribuir para o tratamento da ACF. A tabela 3.3 apresenta um resumo dos novos agentes, atualmente em ensaios clínicos. O transplante de células estaminais hematopoiéticas na ACF é curativo e deve ser considerado em doentes sintomáticos ^{31, 43}.

Tabela 3.3 Novos agentes terapêuticos em estudo direcionados para o tratamento da ACF. Adaptado de (31, 43).

| CATEGORIA | AGENTE TERAPÊUTICO | MECANISMO DE AÇÃO |
|-----------------------|--|--|
| Aumento da HbF | Hidroxiureia | Potente indutor da HbF; Reduz a frequência de eventos de dor aguda, síndrome torácica aguda e transfusões em bebés e adultos |
| | Vorinostat, panobinostat, dimetilbutirato de sódio | Inibidor da histona desacetilase |
| | Decitabina | Desmetilação do DNA |
| | Pomalidomida | Acetilação de histona do promotor γ -globina |
| Adesão | Rivipansel (GMI-1070) | Inibidor de pan-selectina |
| | Imunoglobulina intravenosa (IVIG) | Inibe a ativação de neutrófilos e captura de GVs |
| | Crizanlizumab (SelG1) | Anticorpo monoclonal anti-P-selectina humanizado |
| | Heparina (tinzaparina) | Inibe a P-selectina |
| Inflamação | Propranolol | Inibe a adesão de GVs ao endotélio |
| | Regadenosona (CVT-3146) | Agonista do recetor de adenosina A2A (A2AR), bloqueia a ativação do invariante <i>natural killer</i> T (iNKT) |
| | Estatinas | Anti-inflamatório |
| | Zileuton | Inibidor de 5-lipoxigenase, usado na asma |
| | Frutose-1,6-difosfato (FDP) Hb peguilada saturada com monóxido de carbono (MP4CO) | Reduz o dano tecidual induzido por isquemia Carboxihemoglobina peguilada (PEG) |



| CATEGORIA | AGENTE TERAPÊUTICO | MECANISMO DE AÇÃO |
|-----------------------------------|--|--|
| Terapia antiplaquetária | Prasugrel | Bloqueio do recetor de adenosina difosfato (ADP) |
| | Eptifibatida | Antagonista do complexo de glicoproteína IIb/IIIa |
| Lesão oxidativa | Ácidos gordos ómega-3 | |
| | Glutamina | Aumenta o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) |
| | N-acetilcisteína | Glutaciona aumentada |
| | Ácido alfa-lipóico | Inibe o fator nuclear Kappa B (NF-kB), aumenta a glutaciona |
| | Acetil-L-carnitina | Diminui a peroxidação lipídica |
| Agente anti-falciformação | 5-hidroxiacetilfurfural, 5-HMF (Aes-103) | Liga a hemoglobina falciforme e desloca a curva de dissociação da oxihemoglobina para a esquerda |
| Viscosidade | Poloxamer-188 (P188) | Surfactante não iónico, melhora o fluxo microvascular |
| Tónus vascular | Magnésio intravenoso | Vasodilatação |
| NO | L-arginina | Substrato para NO |
| Polimerização da HbS | Voxelotor (GBT440) | Inibe a polimerização da HbS |
| | Sickle cell disease 101 (SCD-101) | |
| Acidente vascular cerebral | Transfusão de GVs | Reposição de GVs normais |
| Engenharia genética | Inserção de gene por meio de vetores lentivirais | Inserção de genes que codificam β -globinas modificadas por engenharia genética |

Indivíduos com ACF têm função esplénica diminuída (asplenia funcional) em decorrência dos processos vaso-oclusivos que acometem o baço, o que leva a uma deficiência imunológica no combate a infeções. Deve-se considerar, também, que a necessidade de transfusões de sangue expõe esses doentes a maior risco de contrair doenças transmissíveis pelo sangue, como a hepatite B. Recomenda-se, portanto, um programa de vacinação especial precoce associado ao uso de antibiótico profilático para reduzir a incidência e mortalidade por infeções nesses doentes ⁴⁴.

A prescrição de exercícios físicos para indivíduos com doenças crónicas é importante para a prevenção de comorbilidades e, em alguns casos, os exercícios podem conferir efeitos modificadores da doença. Foram realizados estudos acerca do equilíbrio entre os riscos e benefícios do exercício regular em pacientes com traço falciforme e ACF. Evidências de rabiomólise por esforço e morte súbita associada, denominado colapso de exercício associado ao traço falciforme, levantou preocupações para exercícios de alta intensidade no traço falciforme. Na ACF, existem especulações para uma associação entre exercício de intensidade moderada a alta e complicações vaso-oclusivas, como dor. É fundamental descobrir a “dose” certa de exercício que otimiza o equilíbrio entre riscos e benefícios, como mostra a figura 3.19 ⁴⁵.

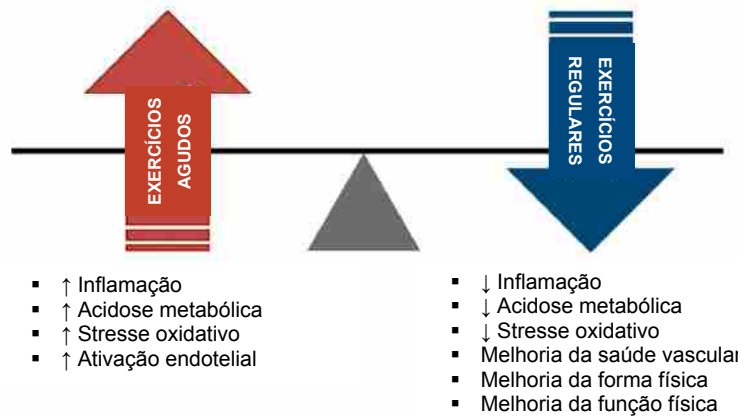


Figura 3.19 O equilíbrio entre os riscos potenciais de curto prazo do exercício agudo e os benefícios de longo prazo do exercício regular em indivíduos com traço falciforme e ACF. Adaptado de (45).

3.3 HIDROXIUREIA

A HU, também conhecida como hidroxycarbamida, é um agente antineoplásico de grande importância clínica. Os seus efeitos biológicos incluem uma ação citotóxica através do bloqueio da divisão celular (efeito antiproliferativo), aumento da expressão de HbF e radiosensibilização ⁴⁶.

Tem sido utilizada no tratamento de síndromes mieloproliferativas (particularmente nas leucemias mieloides aguda e crónica, policitemia vera, metaplasia mieloide e trombocitose essencial) e no tratamento paliativo da ACF (aprovada pela FDA em 1998 e pela EMA em 2007) ⁴⁷; ⁴⁸. Concomitantemente com a irradiação e com outros fármacos é, também, usada no tratamento do carcinoma cervical, tumores cerebrais primários, cancro de cabeça e pescoço e cancro de pulmão de células não pequenas ⁴⁶, além de ser útil no tratamento da infeção por HIV (controverso) e psoríase ⁴⁹. A HU é considerada um fármaco relativamente seguro, podendo ser administrada a longo prazo, mesmo em crianças ⁴⁷.

3.3.1 Estrutura

A HU é um antimetabolito de ureia mono-hidroxil-substituída (hidroxycarbamato), de massa molecular de 76.055 g/mol e fórmula molecular (CH₄N₂O₂), cuja estrutura pode ser observada na figura 3.20. Apresenta-se sob a forma de um sólido cristalino, branco, inodoro, insípido e solúvel em água ⁵⁰. Foi sintetizada, pela primeira vez, em 1869, embora a descoberta dos seus efeitos farmacológicos tenha acontecido anos mais tarde ⁴⁶. A porção =C–NHOH é responsável pela atividade biológica do composto ⁵¹.

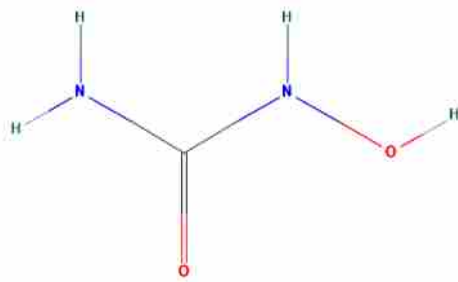


Figura 3.20 Estrutura da HU. Adaptado de (50).

3.3.2 Farmacocinética

O fármaco é administrado por via oral ou intravenosa e possui biodisponibilidade oral excelente (80-100%). A dosagem oral varia entre 15-85 mg/kg/dia, conforme o uso pretendido, e alcança níveis plasmáticos máximos cerca de 1 a 4 horas (h) após a administração. A absorção dá-se no intestino e o fármaco distribui-se rápido e amplamente pelo corpo, concentrando-se nos GV's e leucócitos. O metabolismo é hepático e em menor grau a HU pode ser degradada pela urease encontrada na microbiota intestinal. A eliminação é principalmente renal (primeira ordem), com semi-vida de 3,5-4,5 h, sendo que concentrações significativas da substância são encontradas no leite humano. Atravessa com facilidade a barreira hematoencefálica (BHE). As dosagens devem ser adaptadas para doentes com comprometimento renal e/ou hepático. Não há relatos de variação farmacocinética significativa entre género, idade ou raça e de interações medicamentosas relevantes. ^{46; 52}.

A dose de início recomendada para tratar a ACF é de 15 mg/kg/dia em adultos e de 20 mg/kg/dia em crianças. A dose pode ser aumentada em 5 mg/kg a cada 8 a 12 semanas. A dose máxima tolerada está dependente da contagem de neutrófilos ($<1 \times 10^9/L$) ou se houver outra toxicidade hematológica ⁵³.

3.3.3 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação melhor estabelecido da HU está relacionado com o seu efeito antineoplásico. A HU inibe seletivamente e de modo reversível a atividade enzimática da ribonucleotídeo redutase (RNR) por meio da sua ligação a moléculas de ferro essenciais para ativação de um radical tirosil no sítio ativo da enzima (hRRM2). A RNR converte ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos e, dessa forma, a HU bloqueia a interfase G₁/S do ciclo celular e intuitivamente a biossíntese do DNA (figura 3.21) ^{46; 47; 54}. Nas fases G₁/S as células são muito sensíveis à irradiação, o que revela um sinergismo nos efeitos antitumorais entre a HU e a irradiação ⁴⁶.

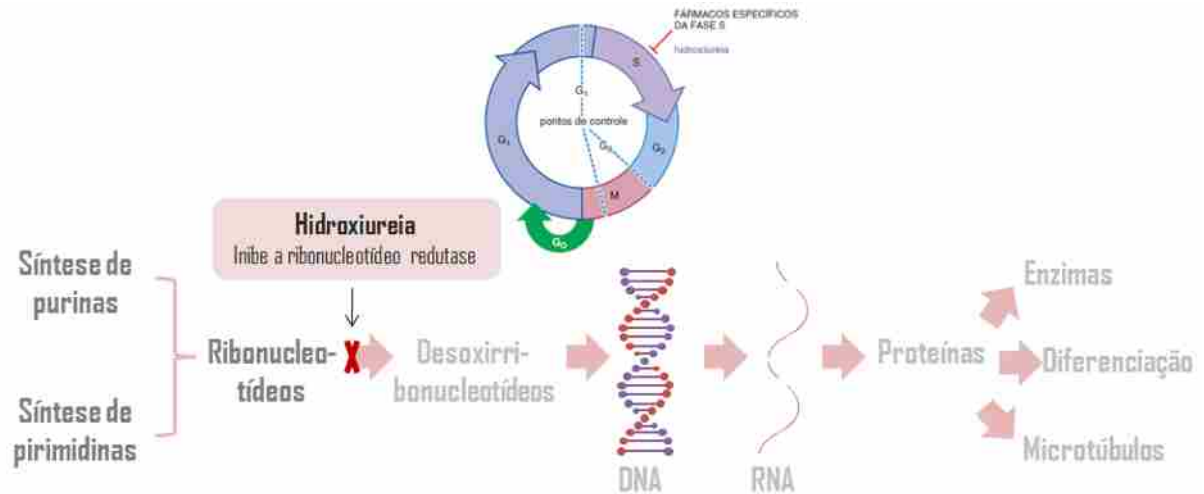


Figura 3.21 Mecanismo de ação antineoplásico da HU. Adaptado de (46).

O mecanismo pelo qual a HU aumenta a síntese de HbF é incerto e parece não se relacionar com a inibição da RNR ⁴⁷. Acredita-se que envolva a supressão da proliferação de precursores eritroides que expressam a HbS e que, de modo compensatório, o organismo passe a estimular células produtoras de HbF para manter a produção dos GV's (figura 3.22). Sugere-se também que a HU, através da geração de NO, provoque nitrosilação de GTPases, o que induz a produção de γ -globinas. A HU também reduz a expressão de moléculas de adesão e ainda suprime a produção de leucócitos e plaquetas. Todas essas ações parecem ser benéficas no tratamento da ACF. ^{46; 47; 55}.

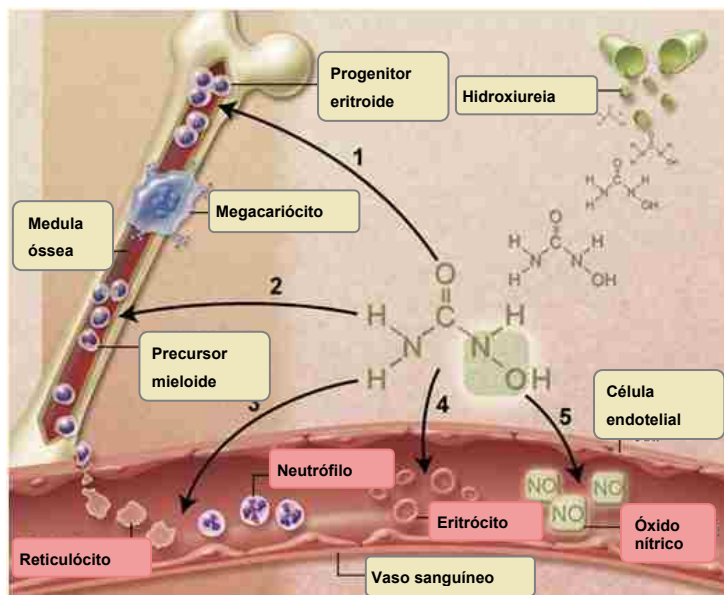


Figura 3.22 Múltiplos efeitos benéficos da HU para ACF. (1) Indução de hemoglobina fetal através da ativação da guanil ciclase solúvel e cinética eritroide alterada; (2) menor contagem de neutrófilos e reticulócitos pela inibição da ribonucleotídeo redutase e citotoxicidade da medula; (3) adesividade diminuída e reologia melhorada de neutrófilos e reticulócitos circulantes; (4) redução da hemólise por melhoria da hidratação dos GV's, macrocitose e redução da falciformação intracelular; e (5) libertação de óxido nítrico (NO) com potencial vasodilatação local e melhoria da resposta vascular. Adaptado de (56).



3.3.4 Efeitos adversos

Apesar de ser um fármaco relativamente seguro, a HU apresenta alguns efeitos adversos que variam conforme a dose utilizada, o período de tratamento e a sensibilidade individual. São eles a mielossupressão (pancitopenia, sobretudo neutropenia); distúrbios gastrointestinais como náuseas, vômitos, dor abdominal e obstipação ⁷; cefaleia ⁵⁶; efeitos mucocutâneos, como úlceras ⁵⁷, hiperpigmentação da mucosa, das unhas e da pele, especialmente da palma das mãos e dos pés ⁵⁸; ⁵⁹; efeitos negativos sobre a espermatogénese (oligospermia e azoospermia) ⁶⁰; ⁶¹; teratogenicidade ⁶²; ⁶³; não há evidência concreta de potencial cancerígeno embora a genotoxicidade possa estar relacionada com doses mais elevadas, longos períodos de tratamento e idade ⁶⁴. Contudo, observa-se a recuperação da maioria dos eventos adversos após a interrupção do fármaco.

3.3.5 Hidroxiureia e hemoglobinopatias

A HU foi um dos primeiros e mais promissores fármacos a ser utilizado no tratamento de hemoglobinopatias, em especial nas β -talassemias e na ACF. A ação mais importante da HU nas β -hemoglobinopatias consiste na indução da síntese de γ -globina nos GVs humanos, uma cadeia semelhante à cadeia β . Nas β -hemoglobinopatias há ausência de cadeias β normais e o aumento das cadeias γ pode ser útil, pois estas combinam-se com as cadeias α normais para formar a HbF. Os benefícios da HU na ACF estão relacionados, principalmente, com a quantidade de HbF produzida. A HU demonstrou aumentar a percentagem de células F na circulação através de vários mecanismos (figura 3.23) ⁸.

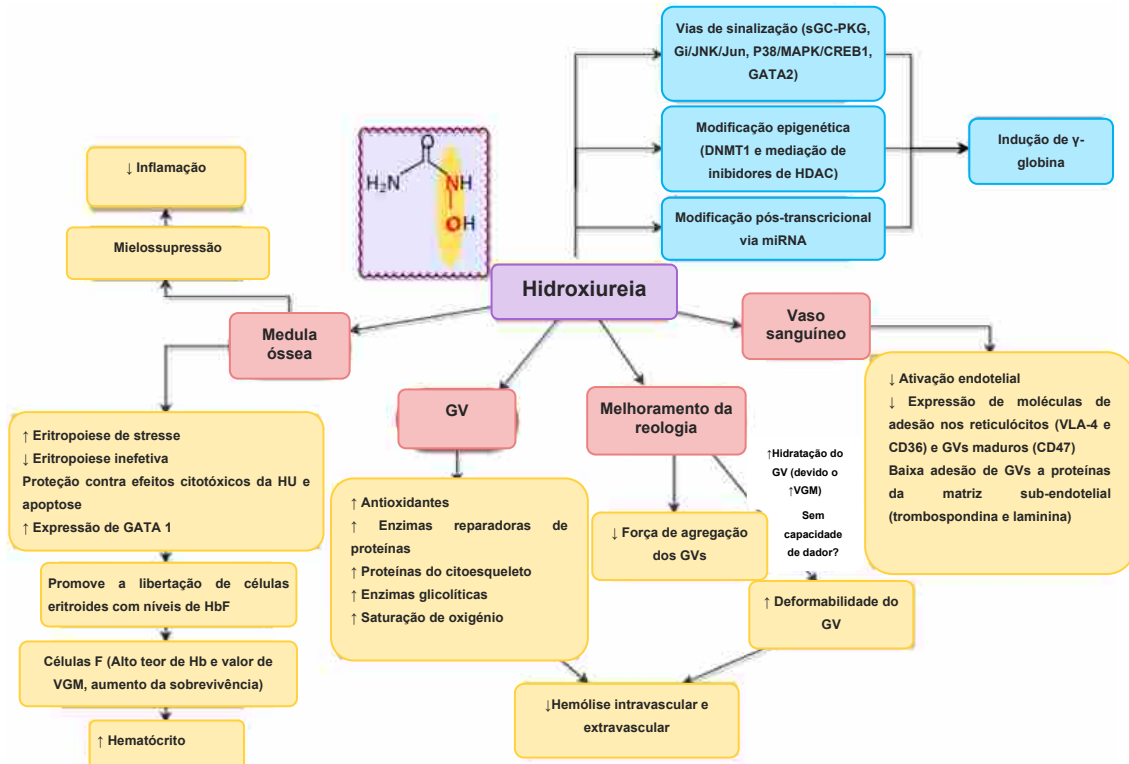


Figura 3.23 Efeitos da HU nas hemoglobinopatias. A HU exerce alterações favoráveis nos GV, endotélio vascular e medula óssea em doentes com β -hemoglobinopatias por meio de várias vias celulares e moleculares. Abreviaturas: GVs, glóbulos vermelhos; Hb, hemoglobina; sGC, guanilato ciclase solúvel; PKG, proteína cinase dependente de cGMP; Gi/JNK/Jun, ativação dependente de Gi da cinase N-terminal de c-Jun; MAPK-p38, proteína cinase ativada por mitogénio; CREB1, proteína 1 de ligação ao elemento de resposta do cAMP; DNMT, DNA metiltransferase; HDAC, histona desacetilase; cGMP, guanosina 3',5'-monofosfato cíclico; cAMP, adenosina 3',5'-monofosfato cíclico. Adaptado de (8).

O primeiro indício do efeito protetor da HbF na doença falciforme está no facto de que, nos primeiros meses de vida, indivíduos com ACF são assintomáticos por apresentarem níveis elevados de HbF, níveis estes que decrescem e representam uma fração mínima no adulto. A HbF diminui a concentração intracelular da HbS e impede a sua polimerização, evitando assim a deformação eritrocitária (figura 3.24). Desse modo, ao induzir a produção de HbF, a HU tende a reduzir a incidência dos episódios vaso-oclusivos e das crises dolorosas provocadas pela circulação das células falciformes nos vasos ⁶⁵, amenizando as complicações agudas da doença falciforme e suas variantes (Hb β^0 S e HbSC), reduzindo a morbidade e mortalidade e melhorando a qualidade de vida dos doentes ^{66; 67; 68}.

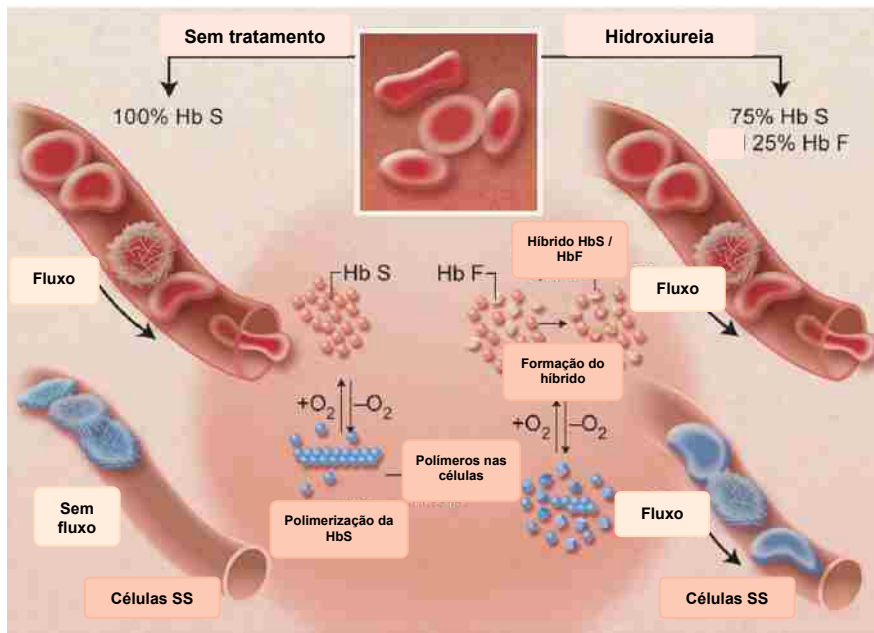


Figura 3.24 Um diagrama do efeito postulado da HU na inibição da polimerização da HbS, aumentando os níveis de HbF (cerca de 25%) em cada GV falciforme e, portanto, diminuindo o grau de obstrução microvascular em qualquer nível de oxigênio. O efeito mitigador da HbF, maior que o da HbA, ocorre porque o híbrido misto $\alpha_2\beta^S\gamma$ que se forma no interior do GV não entra na fase polimérica. Adaptado de (55).

A eritropoiese ineficaz é uma das principais causas de anemia nas β -hemoglobinopatias, e a HU inibe a eritropoiese ineficaz através da diminuição de GVs nucleados e dos níveis de proteína 1 do recetor solúvel de transferrina, da supressão de progenitores eritroides e da indução da hematopoiese de stress, dando assim uma vantagem seletiva à expansão da população de células F sobre os progenitores eritroides que se dividem rapidamente e que produzem HbA ^{69; 70}. A HU também melhora os parâmetros hematológicos, como os níveis de Hb, Ht, volume globular médio (VGM) e hemoglobina globular média (HGM) ^{8; 71}.

A hemorreologia anormal é uma das características predominantes da ACF e a HU tem alguma influência sobre a hemorreologia por meio da melhoria na deformabilidade dos GVs, o que acontece pelo aumento do Ht, dos níveis de Hb, do VGM que melhora a hidratação dos GVs e da nitrosilação S de β -espectrina do NO da HU ^{6; 72}. A HU também possui efeitos na proteómica, afetando proteínas antioxidantes, oxidoredutases, proteínas estruturais da membrana, proteínas de degradação e de reparação, anidrases carbónicas, Hb associada à membrana, entre outras ⁷³.

A ACF está associada a uma desregulação das respostas oxidativas, sugerindo que haja uma resposta inflamatória irregular no sangue periférico, e a HU pode mitigar essa perturbação oxidativa, o que pode justificar a diminuição dos danos tecidulares e melhoria clínica com a terapia. ^{73; 74; 75}. Outra complicação da ACF é a adesão celular e o uso da HU



atenua a interação de GVs com o endotélio vascular ⁷⁶; ⁷⁷. A HU também reduz a LDH e a arginase 1, que são marcadores de hemólise ⁷⁸; ⁷⁹. A melhoria nos quadros de hemólise e atividade eritropoiética, pela ação da HU, também se reflete nos níveis séricos aumentados de haptoglobina e hemopexina após o tratamento, visto que esses são marcadores hemolíticos e de atividade eritropoiética e estão diminuídos em hemoglobinopatias e doenças hemolíticas ⁸⁰; ⁸¹; ⁸²; ⁸³. O NO libertado pela ação terapêutica da HU promove vasodilatação, melhorando o fluxo sanguíneo e compensando o NO consumido na hemólise.

Outro contributo importante da HU consiste na diminuição das hospitalizações e da frequência e/ou volume de transfusões sanguíneas crónicas necessárias para atenuação dos episódios de dor e prevenção de acidente vascular cerebral nos doentes falciformes - efeito especialmente importante no contexto da pandemia de COVID-19, em que há uma diminuição do número de dadores de sangue, de profissionais de saúde responsáveis pelo processo e ainda restrições às visitas hospitalares ⁸⁴; ⁸⁵.

3.3.6 Variabilidade de resposta ao tratamento com hidroxiureia

Muitos estudos clínicos ressaltam a variabilidade de resposta ao tratamento com HU. Alguns sugerem que a indução de células F e de HbF acontece apenas em doentes que respondem à terapia ⁸⁶. Outros propuseram que a HU induz a HbF em todos os doentes, porém isso só é visível nos que respondem à terapia, pois estes possuem nível basal de HbF mais alto ⁸⁷. Variações genómicas que interferem na expressão de γ -globina e nos níveis de HbF induzidos pela HU foram identificadas e estão listadas na tabela 3.4. A HU regula positivamente genes que conferem papel protetor na ACF e esta regulação é encontrada apenas em doentes que respondem à terapia. Foi relatada a expressão diferencial de determinadas proteínas, assim como níveis diferenciais de determinados microRNAs (figura 3.25) entre doentes que respondem à terapia e os que não respondem. Isto sinaliza que polimorfismos em promotores de genes específicos, a proteómica, modificações epigenéticas e transcricionais, vias de sinalização e fatores pós-transcricionais podem ser considerados marcadores preditivos de resposta ao tratamento com HU (tabela 3.5) ⁸⁸.

Tabela 3.4 Variantes genómicas associadas ao nível de HbF induzido por HU. Adaptado de (88).

| GENE | SNPs | CROMOSSOMA |
|--|-----------|------------|
| Haplótipo de cluster de gene <i>HBB</i> | rs7482144 | 11:5254939 |
| BCL11A | rs1427407 | 2:60490908 |
| | rs4671393 | 2:60491212 |
| | rs7606173 | 3:60493111 |
| | rs7557939 | 2:60494212 |
| | rs1186868 | 2:61764103 |

| GENE | SNPs | CROMOSSOMA |
|-----------|------------|-------------|
| ARG1/2 | rs2295644 | 14:67599842 |
| | rs17599586 | 6:131583579 |
| | rs28384513 | 6:135055071 |
| HBS1L-MYB | rs9399137 | 6:135097880 |
| SAR1 | rs2310991 | 3:142444839 |
| | rs4282891 | 10:70171890 |
| | rs76901216 | 10:70170313 |
| SALL2 | rs61743453 | 14:21523209 |

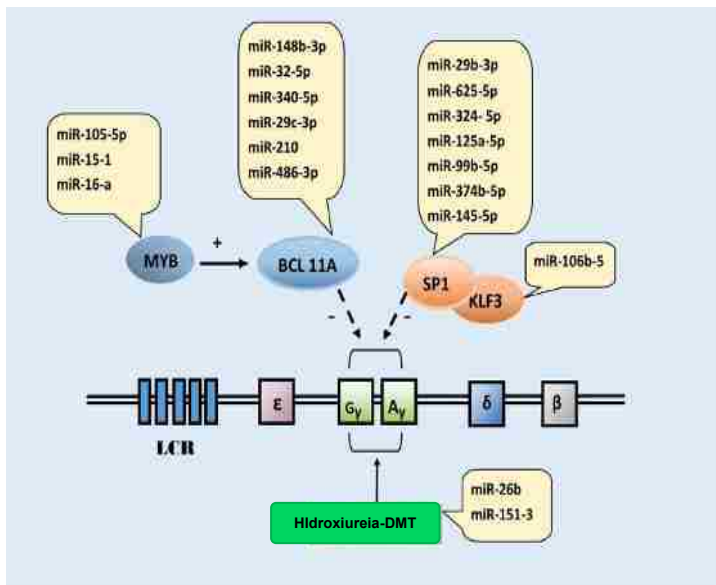


Figura 3.25 Vias de microRNAs envolvidas no efeito de indução de HbF pela HU. O agrupamento da β -globina humana consiste numa região de controlo do locus (LCR) e quatro genes de função (ϵ , γ , δ e β). A γ -globina é ativa durante a vida fetal e é suprimida em adultos pela ação de vários fatores de transcrição que incluem a proteína de especificidade 1 (SP1), fator 3 semelhante a Krüppel (KLF3), oncogene de mieloblastose (MYB) e linfoma de células B/leucemia 11A (BCL11A). A HU altera a expressão de vários microRNAs (miR) que atuam nesses alvos moleculares para induzir a HbF. miR-26b e miR-151-3 estimulam a γ -globina na dose máxima tolerada (DMT) de HU. Adaptado de (8).

Tabela 3.5 Resumo dos mecanismos de produção de HbF em resposta à HU. Adaptado de (88).

| NÍVEL DE SINAL | VIA | MECANISMO DE INDUÇÃO DE γ -GLOBINA |
|---|---------------------------------------|---|
| Eventos epigenéticos e transcripcionais | Remodelação do DNA | Mi-2 / NuRD; Acetilação e metilação DNMT-1 |
| | Metilação do DNA | |
| Vias de sinalização | G α /JNK/Jun | Indução NF κ B de SAR1 |
| | cGMP | sGC-PKG e NO induzido por sGC-PKG |
| | cAMP | Controlo transcripcional MYB |
| | MAPKs | Erk1-2/p38/JNK/CREB1 |
| | Óxido nítrico | eNOS, ATP induzido pelo fluxo e anti-falciforme |
| | Fosforilação | EIF2 α |
| | Fatores de transcrição | GATA-1/2; p21; EPO; KLF1 |
| Sinais de stresse | ROS (radicais superóxido e hidroxilo) | |
| Pós-transcrição | Regulação traducional | miR-494; 15a; 16-1; 151-3p; 148b |

3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) é uma das técnicas analíticas mais utilizadas para a separação, identificação e quantificação de compostos em misturas complexas. É um método altamente sensível, de fácil automatização, adequado para separação de compostos não voláteis ou termicamente frágeis e aplicável a uma gama de moléculas de grande interesse para muitos campos da ciência, como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, carboidratos, fármacos, terpenoides, inseticidas, espécies organometálicas e uma variedade de substâncias inorgânicas ⁸⁹.

Os tipos de cromatografia (figura 3.26) são definidos pelo modo de separação ou pelo tipo de fase estacionária e incluem cromatografia de (1) partição ou líquido-líquido, (2) adsorção ou líquido-sólido, (3) troca iónica, (4) exclusão, (5) afinidade e (6) quiral. Todos estes métodos empregam duas fases, uma fase estacionária (FE) e uma fase móvel (FM). A FE é constituída por diminutas partículas (3 a 10 μm) imobilizadas numa coluna, a mais utilizada é a de sílica, que pode estar ligada a cadeias alquila C_{18} e C_8 para conferir maior estabilidade química. A FM corresponde a um solvente líquido (eluente), o qual contém a amostra e que flui em alta pressão. A eluição dos solventes pode ser isocrática (a composição do solvente permanece constante) ou por gradiente (a composição do solvente é alterada continuamente) ⁹⁰.

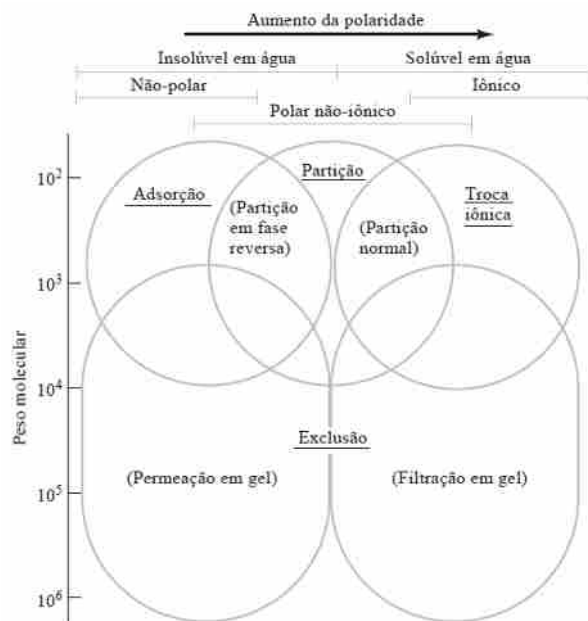


Figura 3.26 Aplicações da cromatografia líquida. Pode-se observar que os tipos de cromatografia à direita do diagrama são mais adequados para os compostos polares. As técnicas na parte de baixo do diagrama são mais adequadas para as espécies de alta massa molecular. Adaptado de (90).

Os componentes típicos de um HPLC são apresentados na figura 3.27. Eles incluem reservatórios de FM, sistemas de tratamento de solventes, sistema de bombeamento, sistemas de injeção da amostra, colunas analíticas (geralmente de aço inoxidável), colunas de proteção (aumentam a vida útil da coluna analítica), termostato para colunas, detetores (os mais empregados são baseados na absorção de radiação UV ou visível) e um registrador/integrador de dados/computador ^{90; 91}.

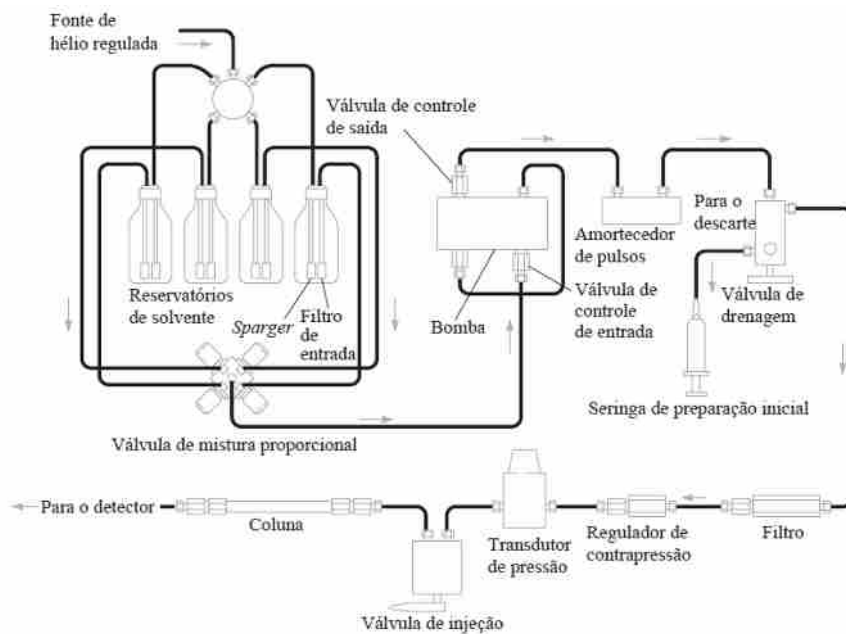


Figura 3.27 Diagrama de blocos mostrando os componentes típicos de um sistema para HPLC. Adaptado de (90).

Os analitos de uma mistura são transportados através da FE pelo fluxo da FM e são separados, de acordo com as diferenças de afinidade de cada um por ambas as fases. Idealmente, as diferenças nas velocidades de migração levam os analitos a se separar em bandas ou zonas ao longo do comprimento da coluna. Um detetor, no final da coluna, responde à concentração do analito e emite um sinal que é registado em função do tempo ou do volume de FM, com a geração de vários picos em formato gaussiano. A este gráfico dá-se o nome de cromatograma (figura 3.28). A área dos picos corresponde à concentração de cada analito na amostra ^{90; 92; 93}.

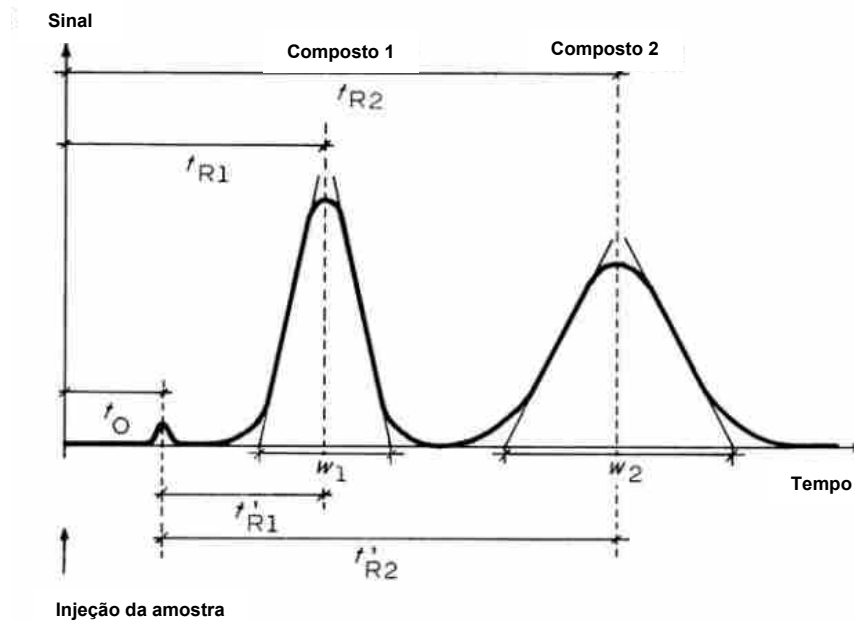


Figura 3.28 O cromatograma e suas características. t_0 ou t_M : tempo de retenção da FM (tempo morto); t_R : tempo de retenção do analito; w : largura da base do pico. Adaptado de (93).

A eficiência das colunas cromatográficas a separar compostos é obtida pelo controlo das variáveis que aumentam a velocidade de separação das bandas ou que diminuem a velocidade de alargamento delas (tabela 3.6). Os fatores que afetam a velocidade de migração dos solutos são a constante de distribuição (K_c), o tempo de retenção (t_R), o fluxo de FM, o fator de retenção (k) e o fator de seletividade (α). O alargamento das bandas é influenciado pelo número (N) e altura (H) de pratos teóricos, e a eficiência cromatográfica é tanto maior quanto maior for o N e menor o H dos pratos. O tipo de coluna e de FM e FE também influenciam na eficiência ^{90; 93; 94}.

Tabela 3.6 Variáveis que influenciam na eficiência de separação das colunas cromatográficas. Adaptado de (90, 93).

| VARIÁVEL | DEFINIÇÃO | FÓRMULA |
|--------------------------------------|---|---|
| Constante de distribuição (K_c) | Razão entre a concentração do soluto na fase estacionária (c_E) e na fase móvel (c_M) | $K_c = \frac{c_E}{c_M}$ |
| Tempo de retenção (t_R) | Tempo decorrido entre a injeção da amostra e o aparecimento do pico do soluto no detetor | $t_R = t_E + t_M$ |
| Tempo na fase estacionária (t_E) | Tempo que o analito permanece na fase estacionária | |
| Tempo morto (t_M) | Tempo necessário para que um soluto não retido passe através da coluna | |
| Fator de retenção (k) | Intervalo de tempo que um soluto permanece na fase estacionária relativo ao tempo que este permanece na fase móvel - idealmente entre 1 e 5 | $k_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_E}{t_M}$ |
| Fator de seletividade (α) | Razão entre a constante de distribuição do soluto mais retido e do menos retido - indica o quão bem a coluna vai separar os compostos A e B | $\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$ |



| VARIÁVEL | DEFINIÇÃO | FÓRMULA | |
|--------------------------|---|--|---|
| Pratos teóricos | Considera a coluna como sendo feita de uma série de pratos nos quais há equilíbrio na partição dos analitos entre a fase móvel e estacionária | $N = \frac{L}{H}$ | |
| | Altura dos pratos (H) | | Quanto menor a altura dos pratos, melhor a separação |
| | Número de pratos (N) | | Diretamente proporcional ao comprimento da coluna (L) e inversamente proporcional ao diâmetro das partículas; quanto maior o N melhor a separação |
| Resolução da coluna (Rs) | Medida quantitativa da sua habilidade em separar analitos A e B - idealmente >1,5 | $R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1 + k_B} \right)$ | |

3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência de troca iónica

A cromatografia líquida de alta eficiência de troca iónica (*Ion Exchange-High Performance Liquid Chromatography*, IEX-HPLC) é um método de separação de espécies iónicas em misturas complexas, que utiliza uma FE constituída de resinas trocadoras de catiões e aniões. Os sítios ativos mais empregados nos trocadores catiónicos são o grupo ácido sulfónico (ácido forte) e ácido carboxílico (ácido fraco), e nos trocadores aniónicos os grupos amina terciária (base forte) ou primária (base fraca). A FM é uma solução aquosa, que pode conter um solvente orgânico miscível em água, como o metanol, e também contém iões que servem de tampão e competem com os iões do analito pelos sítios ativos da FE. O tipo e a concentração desses componentes determinam a força e seletividade do solvente. Supressores foram desenvolvidos para limitar a ionização dos solventes e otimizar a deteção dos analitos por condutividade ⁸⁹.

A cromatografia de troca catiónica é a técnica de escolha para a separação e quantificação percentual de Hbs normais (HbA₀, HbA₂, HbA_{1c}, HbF) e de variantes (HbS, HbE, HbC, HbO-Arab, HbD, HbLepore entre outras). Uma FM contendo os analitos flui, sob pressão, ao longo da coluna, e as moléculas são separadas conforme a sua interação iónica com a FE. Após a separação, é gerado um cromatograma (figura 3.29) com todas as frações de Hb eluídas, os *t*R, as áreas dos picos e os valores, em percentagem, de cada Hb. Algumas variantes de Hb eluem na mesma janela que outras variantes mais comuns e, nestes casos, testes genéticos adicionais devem ser realizados para sua caracterização definitiva ^{95; 96}.

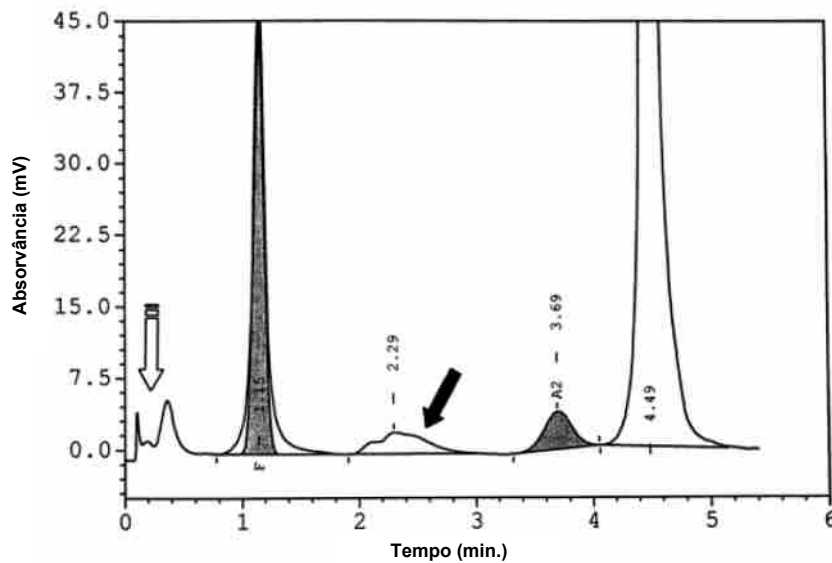
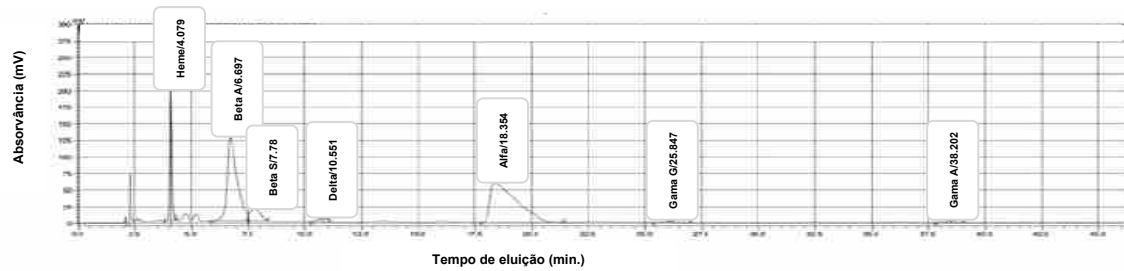


Figura 3.29 Cromatograma de HPLC (Bio-Rad Variant II) de um doente com ACF, mostrando HbS glicosilada com o mesmo tempo de retenção da HbA (seta preta) e HbF, incluindo a forma acetilada (seta branca). Adaptado de (40).

3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

Na cromatografia líquida de fase reversa (*Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC), uma FE não polar, habitualmente um hidrocarboneto (sílica ligada a C₈ ou C₁₈), e uma FM polar (água, metanol, acetonitrilo ou tetraidrofurano) são utilizadas. A separação dos analitos acontece por partição, em que as moléculas do analito se dissolvem na fase ligada. A hidrofobicidade dos solutos e da FE, bem como a polaridade da FM, determinam o tR dos compostos, assim, os mais hidrofóbicos ficam retidos por mais tempo na coluna enquanto os menos hidrofóbicos eluem mais rápido (figura 3.30). Cerca de 90% dos processos de separação utilizam a fase reversa em detrimento da normal^{97, 98}.



| Pico | Nome | Tempo de retenção (min.) | Área | Altura | Área (%) |
|------|--------------|--------------------------|----------|--------|----------|
| 1 | Heme | 4.079 | 1152893 | 185316 | 10.96 |
| 2 | Beta A | 6.697 | 3865773 | 124621 | 36.75 |
| 3 | Beta S | 7.78 | 532278 | 16833 | 5.06 |
| 4 | Delta | 10.551 | 76298 | 3053 | 0.725 |
| 5 | Alfa | 18.354 | 4770262 | 59301 | 45.349 |
| 6 | Gama G | 25.847 | 52141 | 1425 | 0.496 |
| 7 | Gama A | 38.202 | 69364 | 2550 | 0.659 |
| | Total | | 10519008 | 393099 | 100 |

Figura 3.30 Análise por RP-HPLC de sangue total, obtido de um doente com ACF transfundido com GV de dadores saudáveis. As cadeias de globina são eluídas na seguinte ordem, das globinas mais hidrofílicas para as mais hidrofóbicas: β A, β S, δ , α , γ e γ A. A identificação das cadeias de globina é baseada no perfil de eluição. Tempo de retenção, área, altura e % de área são descritos para cada pico. Adaptado de (98).

A RP-HPLC é uma técnica importante no campo dos distúrbios da Hb. É usada para medir as razões da cadeia γ em várias condições genéticas e caracterizar algumas variantes de Hb, principalmente no caso de variantes que eluem na janela da HbS, para distinguir doentes homocigotos para HbS de heterocigotos compostos. É ainda importante na identificação de variantes de Hb neutras, que por não apresentarem alteração da sua carga elétrica, não são detetadas por outras metodologias. De modo geral, a RP-HPLC é utilizada como uma segunda etapa na estratégia de caracterização de variantes de Hb ⁹⁹.

3.5 ELETROFORESE

A eletroforese é uma técnica de separação de moléculas com base na migração diferencial que ocorre, em função das suas cargas e tamanhos, numa solução tampão, através da qual um campo elétrico é aplicado. É um método adequado para numerosas moléculas, como aniões, catiões, aminoácidos, catecolaminas, vitaminas, peptídeos, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos entre outros ⁸⁹. O perfil de migração e a resolução dependem da força do campo elétrico aplicado, da massa e hidrofobicidade das moléculas e da força iónica e temperatura do tampão ⁹⁵. São vários os métodos eletroforéticos, tomados como exemplo (1) eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida, (2) eletroforese em gel bidimensional, (3) eletroforese capilar, (4) isotacoforese, entre outros ¹⁰⁰.

3.5.1 Focagem isoelétrica

A FIE é um método eletroforético de separação de proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos (pIs) (figura 3.31). O pI é o pH no qual a carga líquida (soma das cargas positivas e negativas dos aminoácidos e grupos ionizáveis amino e carboxilo) da molécula é zero. As proteínas são carregadas positivamente quando o $\text{pH} < \text{pI}$ e negativamente quando o $\text{pH} > \text{pI}$. As moléculas migram num gradiente de pH determinado por anfólitos e sob a influência de um campo elétrico. Proteínas com carga líquida positiva migram em direção ao cátodo e as com carga líquida negativa migram em direção ao ânodo, até à região onde a carga líquida for zero (pI)^{95; 100}.

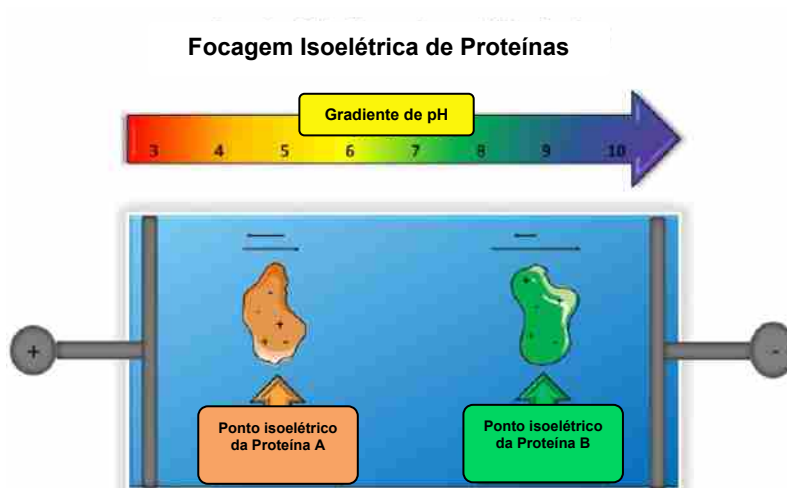


Figura 3.31 Princípio da FIE. Duas proteínas, com pontos isoelétricos variados, irão migrar na presença de um gradiente de pH e campo elétrico, até que a carga líquida de uma proteína seja zero, altura em que a migração cessará. Adaptado de (100).

A FIE requer um suporte sólido, como o gel de agarose ou de poliacrilamida, e necessita de alta tensão (≥ 1000 v). As moléculas separadas no gel são visualizadas em formato de bandas e comparadas com padrões (figura 3.32). Amostras antigas podem produzir bandas de envelhecimento, que correspondem a processos de degradação ou oxidação de moléculas. A técnica oferece ótimas separações e alta resolução, que está dependente do gradiente de pH, da espessura do gel, do tempo de eletroforese, da carga elétrica aplicada e da difusão das moléculas no gel^{95; 101}.

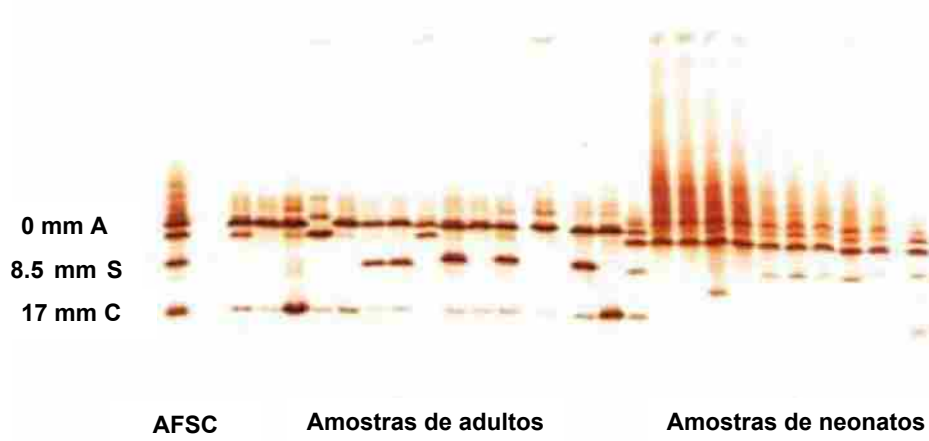


Figura 3.32 Gel de FIE mostrando amostras de adultos e neonatos usando o sistema RESOLVE. Adaptado de (95).



4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis de HbF em crianças angolanas com ACF, antes e após tratamento com HU, para compreender a relevância desse fármaco como modelo terapêutico para a doença na população em estudo e, ainda, avaliar a influência de fatores como o período temporal de tratamento, género e idade nos níveis de HbF e, conseqüentemente, na eficácia do fármaco.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar as frações de Hb pela metodologia de IEX-HPLC, antes e após tratamento com HU (6 e 12 meses).
- Avaliar a influência dos fatores género e idade nos níveis de HbF, antes e após tratamento com HU (6 e 12 meses).
- Avaliar as cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ da HbF pela metodologia de RP-HPLC, antes do tratamento com HU.
- Avaliar a concordância entre os métodos IEX-HPLC e RP-HPLC para a quantificação da HbF, através da análise de Bland-Altman.



5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 AMOSTRAGEM

5.1.1 Amostra populacional

A amostra populacional inicial consistiu em 206 crianças angolanas com ACF, 109 do género feminino e 97 do género masculino, com idades entre 3 e 12 anos, estudadas no Hospital Pediátrico David Bernardino e no Centro de Investigação em Saúde de Angola (CISA) no Hospital Geral do Bengo. Consideraram-se como critérios de elegibilidade que nenhum dos doentes tivesse sido tratado previamente com HU ou tivesse feito terapia de transfusão sanguínea nos três meses que antecederam a colheita das amostras.

Foram selecionadas para este estudo 36 crianças, 19 do género feminino e 17 do género masculino, com idades entre 3 e 11 anos, que receberam tratamento com HU e cujas HbF foram avaliadas antes e após 6 e 12 meses de tratamento. Esta população foi agrupada por género e idades, de 3 a 7 e de 8 a 11 anos, para avaliar se esses fatores influenciavam o nível de HbF. A tabela 5.1 indica o número e percentagem de doentes em cada grupo.

Tabela 5.1 Número e percentagem de doentes em cada grupo (feminino, masculino, 3 a 7 e 8 a 11 anos de idade).

| | ESTUDO POPULACIONAL | | | | | | | | |
|---|---------------------|--------------|---------------|------------|--------------|---------------|-------------|--------------|---------------|
| | Total (%) | Feminino (%) | Masculino (%) | 3 a 7 anos | | | 8 a 11 anos | | |
| | | | | Total (%) | Feminino (%) | Masculino (%) | Total (%) | Feminino (%) | Masculino (%) |
| N | 36 (100,0) | 19 (52,8) | 17 (47,2) | 24 (66,7) | 11 (45,8) | 13 (54,2) | 12 (33,3) | 8 (66,7) | 4 (33,3) |

5.1.2 Amostra biológica

A amostra biológica utilizada para análise foi sangue hemolisado, obtido a partir do sangue periférico total colhido em EDTA. A colheita de sangue e a preparação do hemolisado foram efetuados por profissionais dos respectivos locais que forneceram as amostras.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Deteção e quantificação das frações de hemoglobina e das cadeias de globina normais e anómalas, como a β^S , e $G\gamma$ e $A\gamma$ da HbF

A HbF, pré e pós-tratamento com HU, foi quantificada por IEX-HPLC. A deteção e quantificação relativa das cadeias individuais de globina $G\gamma$ e $A\gamma$ da HbF, pré-tratamento, foram executadas por RP-HPLC.



5.2.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência de troca iónica

O equipamento de IEX-HPLC utilizado para a quantificação da HbF foi o cromatógrafo automático Variant II da Bio-Rad (*Beta-thal short program*). Este equipamento baseia-se no princípio de cromatografia líquida de alta eficiência de troca iónica e separa biomoléculas com base nas suas características de carga elétrica. A tabela 5.2 indica o material e os reagentes utilizados e a tabela 5.3 descreve como foram preparados o calibrador, o *primer*, os controlos nível I e II e as amostras para serem inseridos no equipamento. As amostras foram analisadas a um comprimento de onda de 415 nm e a corrida cromatográfica teve um tempo de duração de 6 minutos para cada amostra.

Tabela 5.2 Materiais e reagentes utilizados na IEX-HPLC.

| MATERIAL / REAGENTES |
|--|
| Agitador de rolos |
| Vortex |
| Pipetas 20 e 1000 µL |
| Adaptador de frascos de 1,5 mL+ Racks |
| Kit de reagentes: <i>Elution Buffer</i> 1 (3), <i>Elution Buffer</i> 2 (2), conjunto de calibradores (6), diluente (1), colunas (2), <i>Primer</i> de sangue total (10), Solução <i>wash/diluent</i> (2), <i>vials</i> /tubos de 1,5 mL com tampas perfuráveis (100) |
| Controlo da Hb, 2 níveis (nível I e nível II) |
| Sangue hemolisado |
| Água desionizada |

O ensaio foi validado pela avaliação do cromatograma (perfil de eluição das frações de Hb) e avaliação dos resultados do controlo da qualidade interno (nível I e nível II), bem como da área total de cada análise, que deve variar entre 1000000 e 3000000 µvolt/segundo. A exatidão da quantificação do pico esteve dependente da resolução do pico e do seu tempo de retenção, assim como do processo de integração. As quantificações são avaliadas em percentagem.

Tabela 5.3 Preparação do calibrador, *primer*, controlos nível I e II e amostras, utilizados na IEX-HPLC.

| PREPARAÇÃO DO CALIBRADOR, PRIMER, CONTROLOS E AMOSTRAS | | |
|--|--|-------------------------------------|
| Calibrador | Reconstituição - 10 mL de diluente do calibrador no frasco | |
| Primer | Adição de 1 mL de água desionizada ao frasco de sangue total | |
| Amostras / Controlos | Adição de 1 mL de diluente em cada amostra/controlo, e pipetagem de 5 µL de amostra/controlo para o respetivo frasco | |
| Rack | Primer | Posição 1- 1 mL de <i>primer</i> |
| | Branco | Posição 2- 1 mL de água desionizada |



| | |
|--------------------|---|
| Calibrador | Posição 3- 1 mL de calibrador |
| Calibrador | Posição 4- 1 mL de calibrador |
| Controlo I | Posição 5- 1 mL controlo nível I |
| Controlo II | Última Posição - 1 mL controlo nível II |

5.2.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

As cadeias individuais de globina $G\gamma$ e $A\gamma$ da HbF foram detetadas e quantificadas percentualmente por RP-HPLC. O equipamento utilizado para esse fim foi o cromatógrafo AGILENT 1100 SERIES, cujos componentes estão listados na tabela 5.4, que se baseia nos princípios de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, um método analítico vantajoso na separação de proteínas de acordo com a sua hidrofobicidade.

Tabela 5.4 Componentes do equipamento AGILENT 1100 SERIES e seus respetivos modelos.

| EQUIPAMENTO | |
|------------------------------------|---|
| Componente | Modelo |
| Módulo de Solventes e Bomba | <i>QuartPump</i> (bomba quaternária) G1311A |
| Desgaseificador | Degasser G1379A |
| Injetor | ALS G1313A |
| Coluna | ColCom G1316A (coluna Lichrospher 100 RP-8 (250'4mm), 5 μ m (diâmetro da partícula) e com diâmetro do poro de cerca de 100 Å) |
| Detetor | VWD G1314A |
| Computador com Software | <i>Chemstation for LC and LC/MS Systems</i> |

Neste método, a FE é constituída por cadeias hidrocarbonadas (C_8) ligadas aos grupos silanol ($\geq Si-OH$) das partículas de sílica presentes na superfície interna da coluna. A FM é constituída por uma mistura de quatro eluentes (tabela 5.5), sendo a separação efetuada com um gradiente linear. A corrida cromatográfica teve um tempo de duração de aproximadamente 75 minutos para cada amostra e as cadeias globínicas foram detetadas a 215 nm num detetor espectrofotométrico de ultravioleta (UV). As condições de separação estão indicadas na tabela 5.6.

Tabela 5.5 Tipos de eluentes utilizados na RP-HPLC e respetivas referências.

| TIPO DE ELUENTE | REFERÊNCIA |
|---|------------------------|
| Acetonitrilo* | Carlo Erba ref. 412392 |
| Metanol* | Carlo Erba ref. 412532 |
| NaCl* 0,155M (acidificado com HCl 3N a pH 2,7) | Merck ref. 519 K346604 |
| Água desionizada | 18 M Ω |

* O acetonitrilo e o metanol têm um grau de pureza adequado para HPLC e o NaCl é preparado com água desionizada.



Tabela 5.6 Condições de separação no processo cromatográfico e gradiente linear dos quatro eluentes utilizados na RP-HPLC.

| CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO NO PROCESSO CROMATOGRÁFICO | | | | |
|---|----------------------------|-------------------------|--|----------------------------|
| Fluxo | | 0,7 mL/minuto | | |
| Temperatura da coluna | | 40°C | | |
| Volume de amostra | | 18 µL | | |
| Comprimento de onda | | 215 nm | | |
| Detetor | | Espectrofotómetro de UV | | |
| GRADIENTE LINEAR DOS ELUENTES | | | | |
| Tempo (min) | % Eluente A (acetonitrilo) | % Eluente B (metanol) | % Eluente C (H ₂ O desionizada) | % Eluente D (NaCl, pH 2,7) |
| 0 | 31 | 31,2 | 7,8 | 30 |
| 75 | 46,2 | 19,6 | 4,2 | 30 |

A validação do ensaio foi efetuada pela verificação, no perfil de eluição, da presença do pico do grupo heme e picos correspondentes às cadeias globínicas normais (β , δ , α e eventualmente γ) e na conformidade das áreas das cadeias, ou seja, área $\alpha \approx$ área não α da Hb. O método foi implementado com base nos artigos de Leone L., sob o título *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography of Human Haemoglobin Chains*, e de Wajcman H., sob o título *Globin Chain Analysis By Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography: Recent Developments*, publicados em revistas de circulação internacional e com arbitragem científica.

Os resultados foram interpretados com base no perfil de eluição obtido, nos tempos de retenção e nas quantificações percentuais obtidas através das áreas dos picos do cromatograma. A percentagem de cada cadeia globínica foi calculada através da razão entre a área do pico correspondente e a área não- α (considerando área não $\alpha =$ área $\beta +$ área $\delta +$ área γ).

5.2.2 Avaliação qualitativa das frações de hemoglobina

Algumas amostras que apresentaram valores elevados de algumas frações de Hb na HPLC, sugestivos de alterações pós-traducionais, foram submetidas a FIE para avaliação qualitativa.

5.2.2.1 Focagem isoeletrica

A FIE é uma técnica de eletroforese em gel de agarose, em gradiente estável de pH, sob alta voltagem que permite a separação das Hbs com base no seu pI. Para a execução da FIE foi utilizado o *Resolve Hemoglobin Kit FR-9120-PerkinElmer*. A tabela 5.7 apresenta a



composição do *Kit* FR-9120 e os demais materiais e reagentes não fornecidos pelo *Kit*, mas que foram utilizados na técnica.

Tabela 5.7 Materiais e reagentes utilizados na FIE.

| EXTRA KIT | | KIT FR-9120 |
|------------------------------|--|--|
| Material | Reagentes | Gel agarose (5) |
| Fonte e tina de focagem | H ₂ O desionizada | Solução do ânodo (<5% ácido acético) - 30 mL |
| Banho de refrigeração | Ácido Tricloroacético (CCl ₃ COOH) M=163,38 g/mol Solução a 10% (p/v) | Solução do cátodo (<5% etanolamina) - 30 mL |
| Micropipetas 20 e 100 µL | | Solução de eluição de Hb (amostra) - 30 mL |
| Pipetas <i>Pasteur</i> | | Tiras de eletrodo (12) |
| Tubos <i>ependorff</i> 1,5mL | Controlo interno AFSC | Papel absorvente (6) |
| | | Tiras absorventes (6) |
| | | Modelos de aplicação das amostras (5) |

Os detalhes do procedimento constam na tabela 5.8, desde a preparação e aplicação da amostra, programação da fonte de alimentação, até à fixação das amostras. A migração eletroforética decorreu durante aproximadamente 1 h. O ensaio foi validado pela avaliação do perfil de migração dos controlos AFSC utilizados, que devem apresentar quatro bandas separadas, correspondentes às frações de Hb (HbA, HbF, HbS e HbC) na corrida eletroforética. Os resultados das amostras foram interpretados através da comparação do seu perfil de migração com o perfil de migração do sangue controlo e com a cartografia da FIE das Hbs.

Tabela 5.8 Procedimento utilizado na técnica de FIE.

| PROCEDIMENTO | | |
|---|---|------------|
| Diluição das amostras | 15 µL amostra / 100 µL diluente - em tubo de <i>ependorff</i> | |
| Aplicação do gel e das tiras de eletrodo | Pipetou-se 1 mL de água sobre o centro da placa, onde o gel de agarose foi colocado; as tiras de eletrodo foram saturadas com 3-4 mL de solução de ânodo e cátodo cada, e ambas colocadas sobre o gel | |
| Aplicação das amostras | 5 µL amostra diluída e 5 µL de controlo AFSC (aplicado a cada 10 amostras) - Total de 27 poços | |
| Programação da fonte de alimentação | Voltagem | 1500 volts |
| | Corrente | 150 mA |
| | Potência | 16 W |
| Fixação das amostras | Cobriu-se o gel com ácido tricloroacético a 10% (≈100 mL) por 10 minutos; lavou-se com água desionizada; retiraram-se as tiras do eletrodo e deixaram-se secar por 24 h à TA | |



5.2.3 Tratamento estatístico

Os testes estatísticos foram realizados nos *softwares* IBM SPSS 20.0 e JAMOVI. Para avaliar a normalidade da distribuição dos dados foram executados os testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Os resultados foram avaliados por meio dos testes paramétricos t de Student e t Independente, e dos testes não paramétricos Wilcoxon e Mann-Whitney. O nível de significância considerado no estudo foi de $p < 0,05$.

A abordagem estatística utilizada para a avaliação da concordância entre os dois métodos quantitativos de medição de HbF (cromatografia de troca iónica e cromatografia de fase reversa) foi a análise de Bland Altman, por meio do estudo da diferença média e construção de limites de concordância. Os dados foram analisados como gráfico de diferenças de unidade. O gráfico segue um modelo de dispersão XY, em que o eixo Y mostra a diferença entre as duas medidas emparelhadas (método A – método B) e o eixo X representa a média dessas medidas $((\text{método A} + \text{método B})/2)$. Os limites estatísticos foram calculados usando a média e o desvio padrão das diferenças entre as medições de cada método [limite inferior = $(\text{média} - 1,96 \times \text{desvio padrão})$; limite superior = $(\text{média} + 1,96 \times \text{desvio padrão})$].



6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO

A amostra populacional inicial consistiu em 206 crianças angolanas com ACF, 109 do género feminino e 97 do género masculino, com idades entre 3 e 12 anos. As frações de Hb foram analisadas por FIE e quantificadas por IEX-HPLC e a quantificação relativa das cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ da HbF foram executadas por RP-HPLC.

Neste estudo um total de 36 crianças angolanas com ACF, 19 do género feminino e 17 do género masculino, com idades entre 3 e 11 anos, foram avaliadas antes e após tratamento com HU. Avaliaram-se os resultados da quantificação dos níveis de HbF pré-tratamento e após 6 e 12 meses de tratamento. Os participantes foram agrupados por género e idade (3 a 7 e 8 a 11 anos), com o objetivo de investigar se essas variáveis influenciavam os níveis de HbF (tabela 6.1). A base de dados do presente trabalho encontra-se em anexo.

Tabela 6.1 Média, mediana, mínimo e máximo da idade dos 36 doentes aquando da colheita pré-tratamento.

| | IDADE (ANOS) | | | | |
|----------------|--------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|
| | TOTAL (n=36) | FEMININO (n=19) | MASCULINO (n=17) | 3 a 7 ANOS (n=24) | 8 a 12 ANOS (n=12) |
| Média | 7 | 7 | 6 | 5 | 9 |
| Mediana | 6,5 | 7 | 6 | 6 | 9,5 |
| Mínimo | 3 | 3 | 3 | 3 | 8 |
| Máximo | 11 | 10 | 11 | 7 | 11 |

6.2 AVALIAÇÃO PRÉ-TRATAMENTO

A tabela 6.2 descreve a média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão da percentagem de HbF e das cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ pré-tratamento.

Tabela 6.2 Média, mediana, mínimo e máximo da percentagem de HbF e das cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ pré-tratamento.

| | TOTAL (n=36) | | | FEMININO (n=19) | | | MASCULINO (n=17) | | | 3 a 7 ANOS (n=24) | | | 8 a 12 ANOS (n=12) | | |
|----------------|--------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|
| | %HbF | %G γ | %A γ | %HbF | %G γ | %A γ | %HbF | %G γ | %A γ | %HbF | %G γ | %A γ | %HbF | %G γ | %A γ |
| Média | 6,3 | 38,17 | 61,83 | 6,8 | 38,89 | 61,11 | 5,6 | 37,35 | 62,65 | 6,7 | 36,96 | 63,04 | 5,3 | 40,58 | 59,42 |
| Mediana | 5,6 | 36 | 64 | 6,0 | 35 | 65 | 5,5 | 39 | 61 | 6,6 | 36 | 64 | 3,6 | 37 | 63 |
| Mínimo | 1,2 | 22 | 39 | 1,2 | 24 | 39 | 1,3 | 22 | 49 | 1,2 | 22 | 49 | 1,5 | 25 | 39 |
| Máximo | 14,6 | 61 | 78 | 14,6 | 61 | 76 | 12,0 | 51 | 78 | 14,6 | 51 | 78 | 13,3 | 61 | 75 |

A HbF, que é formada pelas cadeias globínicas $G\gamma$ e $A\gamma$, apresenta uma proporção $G\gamma/A\gamma$ de 70:30 (>1) durante o desenvolvimento fetal até o nascimento, ocorrendo uma mudança quantitativa na composição das cadeias γ nos adultos, em que a proporção $G\gamma/A\gamma$ passa a ser de

aproximadamente 40:60 (<1). Neste estudo a média da % da cadeia $G\gamma$ foi de 38,17 e da cadeia $A\gamma$ foi de 61,83. A análise preliminar das cadeias de globina mostrou, em 4 amostras, a relação $G\gamma/A\gamma > 1$, enquanto 32 amostras mostraram valor compatível com o padrão adulto de relação (<1). A determinação da razão $G\gamma/A\gamma$ é interessante em várias circunstâncias, como caracterização molecular da HPFH, composição de HbF ligada a haplótipos em talassemias, controlo da expressão de HbF na DF ou durante ensaios terapêuticos com fármacos que estimulam a síntese de HbF, como a HU, e ainda em distúrbios de HbF em recém-nascidos ou estudos genéticos de populações.

A figura 6.1 ilustra o cromatograma de RP-HPLC da amostra 21 (feminino, 8 anos), em que se observa uma proporção $G\gamma/A\gamma$ superior a 1, ou seja, a cadeia $G\gamma$ (57%) é superior à cadeia $A\gamma$ (43%). Já na figura 6.2, o cromatograma de RP-HPLC da amostra 5 (feminino, 3 anos) apresenta o contrário, uma proporção $G\gamma/A\gamma$ inferior a 1, com a cadeia $A\gamma$ (55%) superior à cadeia $G\gamma$ (45%).

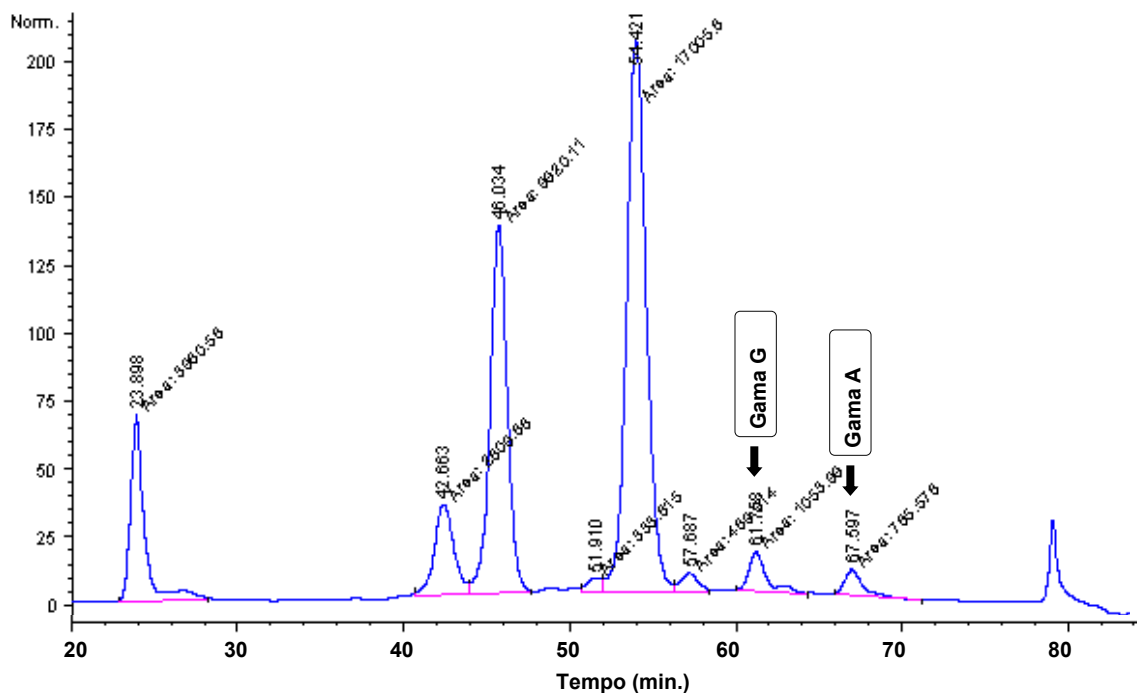


Figura 6.1 Cromatograma de RP-HPLC de uma rapariga de 8 anos com ACF, cuja cadeia $G\gamma$ (57%) é superior à cadeia $A\gamma$ (43%).

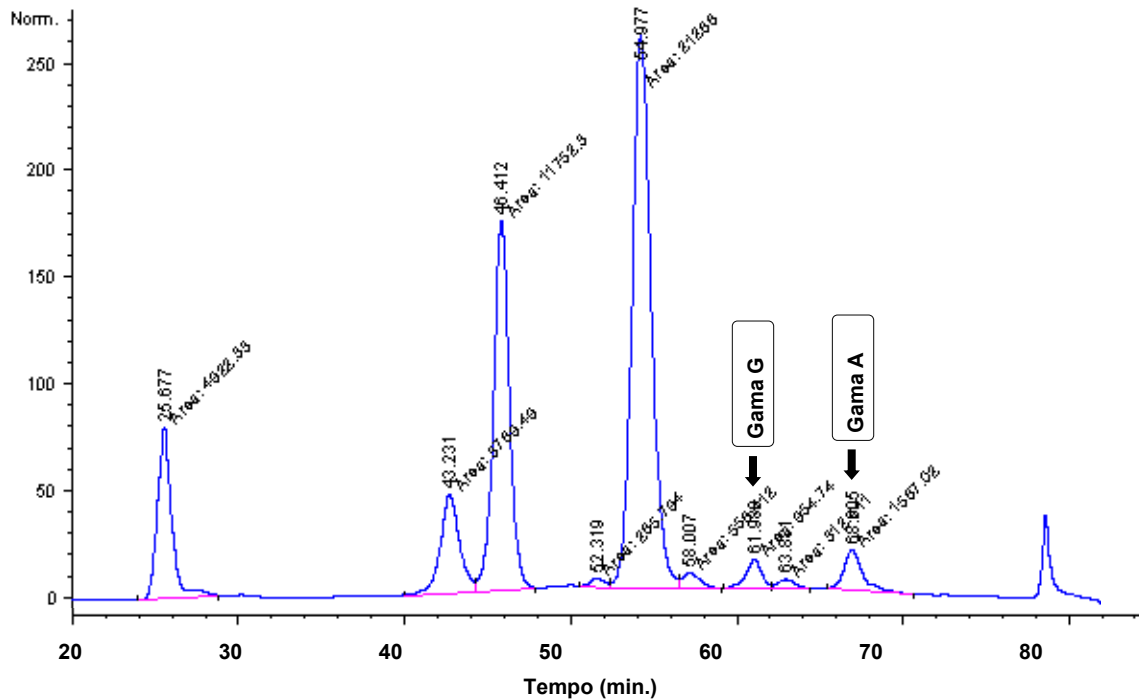


Figura 6.2 Cromatograma de RP-HPLC de uma rapariga de 3 anos com ACF, cuja cadeia $\Delta\gamma$ (55%) é superior à cadeia $G\gamma$ (45%).

A acetilação da HbF corresponde a uma modificação pós-traducional que ocorre na HbF, e que pode ser observada como um prolongamento dos picos correspondentes às cadeias gama G e gama A.

6.3 AVALIAÇÃO PÓS-TRATAMENTO

Os níveis de HbF foram avaliados em três períodos, pré-tratamento, após 6 meses de tratamento e após 12 meses de tratamento com HU. A média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão da percentagem de HbF foram calculados para os três períodos de tratamento, e ainda nas variáveis género e idade (tabelas 6.3, 6.4 e 6.5). A investigação da eficácia da HU em elevar os níveis de HbF é importante uma vez que a HbF exerce um papel fundamental na ACF, estando os seus níveis inversamente associados à gravidade da doença. Testes estatísticos foram aplicados para avaliar se essa elevação dos níveis de HbF foi significativa para um impacto positivo no curso clínico da doença.



Tabela 6.3 Média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão da % HbF pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU, nas 36 crianças com ACF.

| | TOTAL (n=36) | | |
|----------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|
| | % HbF pré-tratamento | % HbF após 6 meses de HU | % HbF após 12 meses de HU |
| Média | 6,3 | 14,7 | 12,9 |
| Mediana | 5,6 | 13,8 | 12,7 |
| Mínimo | 1,2 | 3,2 | 4,2 |
| Máximo | 14,6 | 26,2 | 23,5 |
| DP | 3,83 | 6,05 | 5,26 |

Tabela 6.4 Média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão da percentagem de HbF, pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU, na variável género.

| | FEMININO (n=19) | | | MASCULINO (n=17) | | |
|----------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|
| | % HbF pré-tratamento | % HbF após 6 meses de HU | % HbF após 12 meses de HU | % HbF pré-tratamento | % HbF após 6 meses de HU | % HbF após 12 meses de HU |
| Média | 6,8 | 14,2 | 12,4 | 5,6 | 15,2 | 13,6 |
| Mediana | 6,0 | 12,8 | 12,0 | 5,5 | 15,8 | 14,0 |
| Mínimo | 1,2 | 3,2 | 4,2 | 1,3 | 4,8 | 4,5 |
| Máximo | 14,6 | 26,2 | 23,5 | 12,0 | 25,2 | 23,3 |
| DP | 4,1 | 6,1 | 5,3 | 3,5 | 6,1 | 5,3 |

Tabela 6.5 Média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão da percentagem de HbF, pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU, na variável idade.

| | 3 a 7 ANOS (n=24) | | | 8 a 11 ANOS (n=12) | | |
|----------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|
| | % HbF pré-tratamento | % HbF após 6 meses de HU | % HbF após 12 meses de HU | % HbF pré-tratamento | % HbF após 6 meses de HU | % HbF após 12 meses de HU |
| Média | 6,7 | 15,3 | 13,8 | 5,3 | 13,5 | 11,2 |
| Mediana | 6,6 | 15,4 | 13,8 | 3,6 | 12,9 | 11,7 |
| Mínimo | 1,2 | 3,2 | 4,2 | 1,5 | 4,8 | 4,5 |
| Máximo | 14,6 | 26,2 | 23,5 | 13,3 | 22,8 | 17,1 |
| DP | 3,7 | 6,5 | 5,7 | 4,1 | 5,1 | 3,9 |

A figura 6.3 representa um gráfico da distribuição da HbF, em valor percentual, nas variáveis pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU. Os 36 doentes, antes do tratamento com HU, tinham em média um nível de HbF de $6,3\% \pm 3,83$. Após 6 meses de tratamento o nível de HbF subiu para $14,7\% \pm 6,05$ e, após 12 meses de tratamento, decresceu ligeiramente para $12,9\% \pm 5,26$. Os dados para a construção do gráfico da figura 6.3 encontram-se na tabela 6.6.

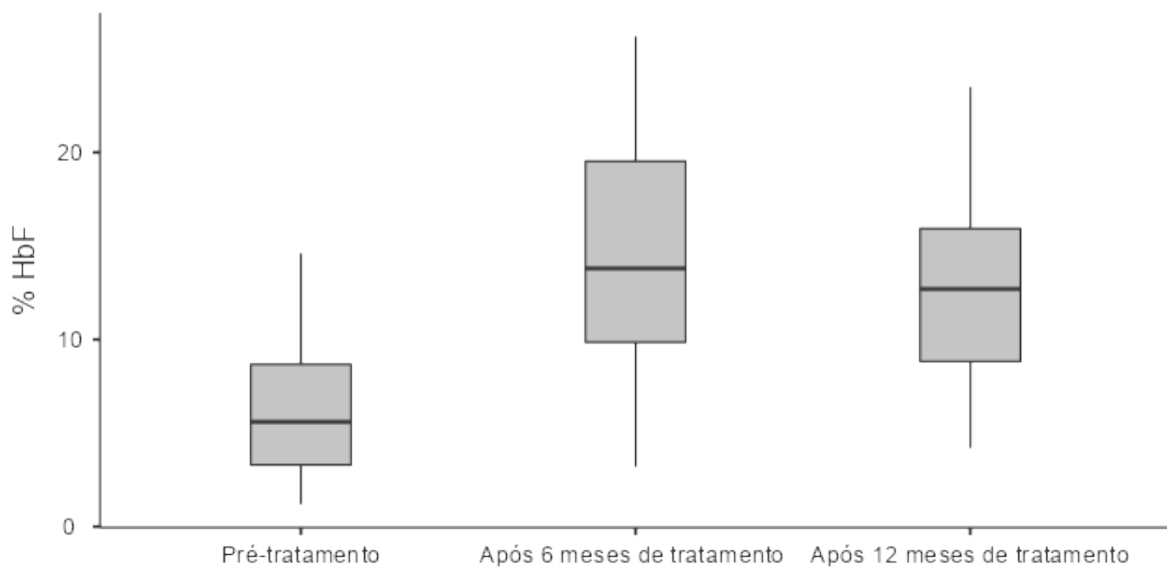


Figura 6.3 Percentagem de HbF nas 36 crianças com ACF, pré e após o tratamento com HU. O local onde a linha vertical começa (de baixo para cima) indica o valor mínimo e, onde a linha termina indica o valor máximo. O retângulo possui três linhas horizontais, a linha de baixo indica o primeiro quartil (25%), a linha intermédia indica o segundo quartil ou mediana (50%) e, a linha de cima indica o terceiro quartil (75%). O intervalo interquartil é dado pela distância entre o primeiro e o terceiro quartil.

Tabela 6.6 Média, desvio padrão, quartis, valores mínimo e máximo, limites superior e inferior e dispersão interquartilica da percentagem de HbF, antes e após 6 e 12 meses de tratamento com HU.

| n=36 | % HbF pré-tratamento | % HbF após 6 meses de tratamento | % HbF após 12 meses de tratamento |
|----------------------------------|----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Média | 6,3 | 14,7 | 12,93 |
| Desvio padrão | 3,83 | 6,05 | 5,26 |
| Mínimo | 1,2 | 3,2 | 4,2 |
| Máximo | 14,6 | 26,2 | 23,5 |
| 1° Quartil | 3,3 | 9,7 | 8,9 |
| 2° Quartil | 5,7 | 13,7 | 12,5 |
| 3° Quartil | 8,6 | 19,5 | 15,9 |
| Limite superior | 6 | 6,7 | 7,6 |
| Limite inferior | 2,1 | 6,5 | 4,7 |
| Dispersão Interquartilica | 5,3 | 9,8 | 7 |

A distribuição do nível percentual de HbF nas variáveis género e idade, antes e após 6 e 12 meses de tratamento com HU, está apresentada nos gráficos das figuras 6.4 e 6.5, respetivamente. No género feminino, a percentagem de HbF subiu, em média, de 6,8% \pm 4,1 para 14,2% \pm 6,1 após 6 meses de tratamento com HU e, decresceu ligeiramente para 12,4% \pm 5,3 após 12 meses de tratamento. No género masculino, a elevação da percentagem de HbF foi, em média, de 5,6% \pm 3,5 para 15,2% \pm 6,1 após 6 meses de tratamento que, decresceu,

para $13,6 \pm 5,3$ após 12 meses de tratamento. Crianças com idades entre 3 e 7 anos obtiveram, em média, um nível percentual de HbF de $6,7\% \pm 3,7$, que aumentou para $15,3\% \pm 6,5$ após 6 meses de tratamento e, depois decresceu para $13,8\% \pm 5,7$ após 12 meses de tratamento. Já as crianças com idades entre 8 e 11 anos obtiveram, em média, um aumento percentual de HbF de $5,3\% \pm 4,1$ para $13,5\% \pm 5,1$ com 6 meses de tratamento e, um decréscimo para $11,2\% \pm 3,9$ com 12 meses de tratamento.

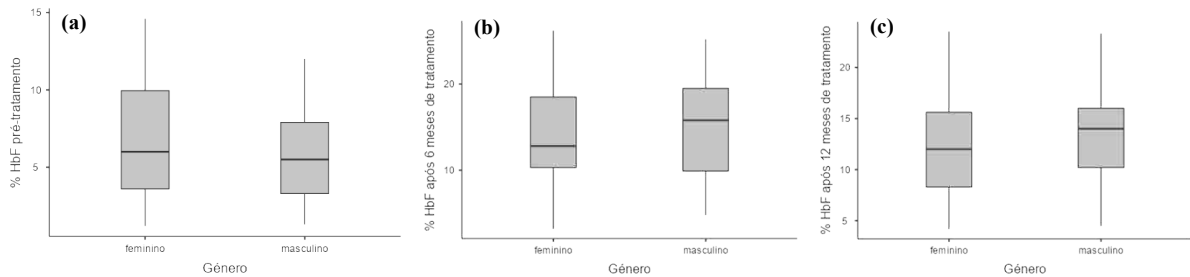


Figura 6.4 Distribuição da HbF, em valor percentual, (a) pré-tratamento, (b) após 6 meses de tratamento e (c) após 12 meses de tratamento com HU, na variável gênero.

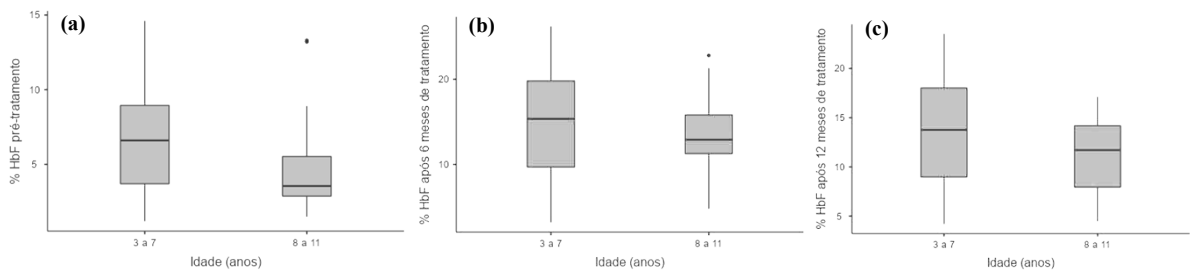


Figura 6.5 Distribuição da HbF, em valor percentual, (a) pré-tratamento, (b) após 6 meses de tratamento e (c) após 12 meses de tratamento com HU, na variável idade.

O aumento dos níveis de HbF em decorrência do uso da HU pode ser observado, de maneira ilustrativa e, a título de exemplo, pela visualização dos cromatogramas. A figura 6.6 ilustra os cromatogramas, pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU, da amostra 29 (gênero masculino, 11 anos). Antes do tratamento com HU a criança apresentava 1,5% de HbF e 86,8% de HbS. Após 6 meses de tratamento, a percentagem de HbF subiu para 12,8%, aproximadamente oito vezes o valor inicial, e a de HbS reduziu para 75,5%. Ao fim de 12 meses de tratamento a criança manteve 12,5% de HbF e 76,8% de HbS.

A fração A_2 no HPLC pode estar artificialmente aumentada pela presença de carbamilação ou outra modificação pós-traducional da HbS, pelo que apesar de algumas amostras apresentarem esta elevação, isso não é de importância prática.

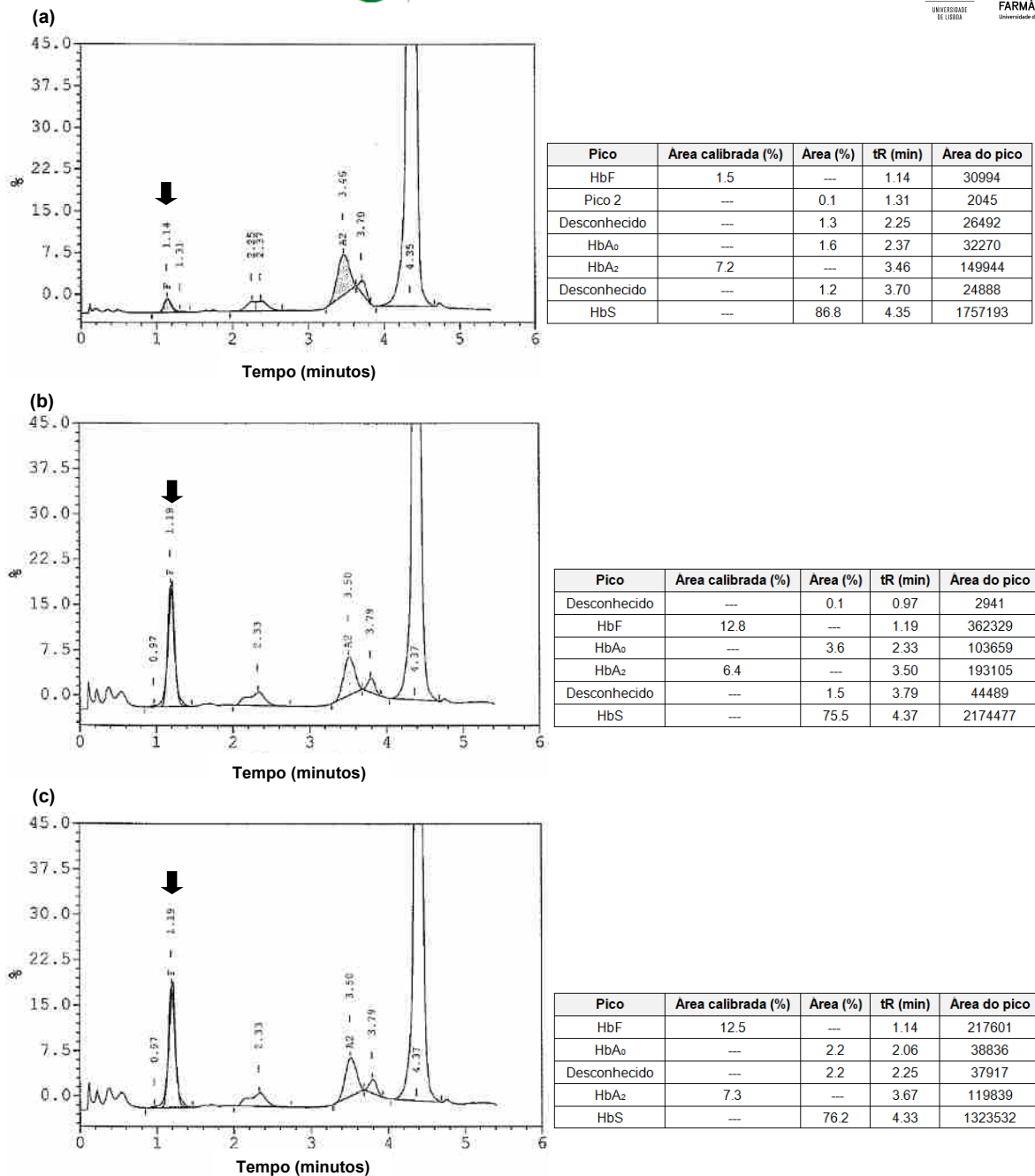


Figura 6.6 Cromatograma de IEX-HPLC (Bio-Rad Variant II) de um menino de 11 anos com ACF, mostrando o aumento da percentagem de HbF (seta preta) após o tratamento com HU. **(a)** pré-tratamento; **(b)** após 6 meses de tratamento; **(c)** após 12 meses de tratamento.

Os resultados foram sujeitos a estatística inferencial (teste de Kolmogorov-Smirnov, teste de Shapiro-Wilk, teste t de Student, teste t Independente, teste de Wilcoxon e teste de Mann-Whitney).

O pressuposto da normalidade não se cumpre apenas para a variável pré-tratamento ($p < 0,05$). Os resultados dos testes de normalidade estão listados na tabela 6.7. Os histogramas

de frequência da percentagem de HbF pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU estão apresentados na figura 6.7.

Tabela 6.7 Testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk que avaliam o padrão de distribuição do nível de HbF pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU.

| n=36 | TESTES DE NORMALIDADE | | | | | |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------|----------|--------------|-----------------|----------|
| | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
| | Estadística | df ¹ | P-valor* | Estadística | df ¹ | P-valor* |
| Pré-tratamento | 0,184 | 36 | 0,003 | 0,923 | 36 | 0,015 |
| Após 6 meses de tratamento | 0,099 | 36 | 0,200 | 0,975 | 36 | 0,565 |
| Após 12 meses de tratamento | 0,075 | 36 | 0,200 | 0,974 | 36 | 0,553 |

* Valores de $p \geq 0,05$ indicam que os dados possuem distribuição normal, sendo assim, não se rejeita a hipótese nula (H_0).

¹ Graus de liberdade

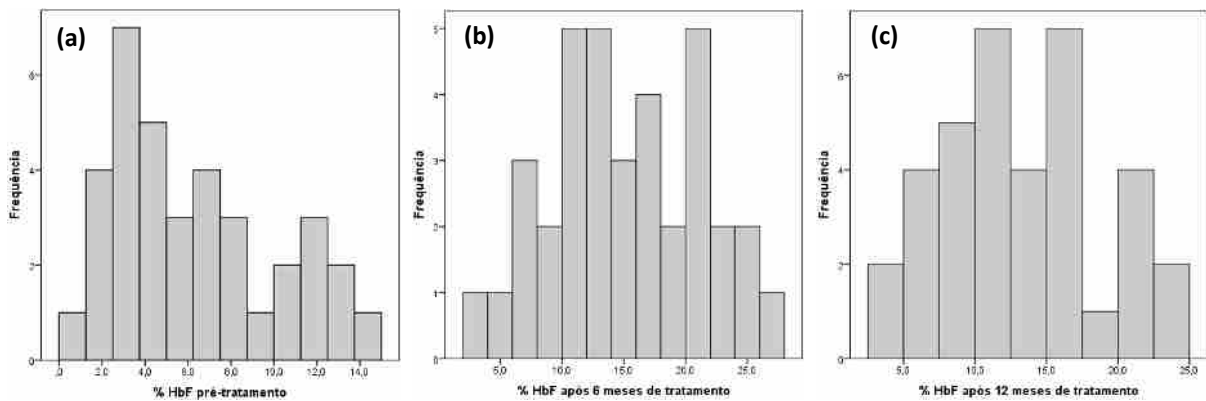


Figura 6.7 Histogramas de frequência da HbF, expressos em valor percentual. (a) % HbF pré-tratamento; (b) % de HbF após 6 meses de tratamento; (c) % de HbF após 12 meses de tratamento.

O aumento de HbF mediante o tratamento com HU foi avaliado através de testes de comparação. Executaram-se testes estatísticos de comparação paramétricos (teste t de Student e teste t Independente) e não paramétricos (teste de Wilcoxon e teste de Mann-Whitney), uma vez que se obtiveram variáveis com e sem distribuição normal. As variáveis foram comparadas em pares, a saber (1) pré-tratamento e após 6 meses de tratamento, (2) após 6 meses de tratamento e após 12 meses de tratamento, e (3) pré-tratamento e após 12 meses de tratamento. O nível de significância estatística foi aceite para $p < 0,05$.

O teste t de Student rejeita a hipótese nula e assume que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos níveis de HbF antes e após o tratamento com HU (tabela 6.8). Em média, a HbF nos primeiros 6 meses de tratamento ($M=14,667$; $EP=1,012$) foi maior que a HbF pré-tratamento ($M=6,242$; $EP=0,639$), $t(35) = -12,848$, $p=0,000$. A HbF após 12 meses de tratamento ($M=12,953$; $EP=0,893$) foi menor que a HbF após 6 meses de tratamento



(M=14,667; EP=1,012), $t(35)= 3,988$, $p=0,000$. A HbF após 12 meses de tratamento (M=12,953; EP=0,893) foi maior que a HbF pré-tratamento (M=6,242; EP=0,639), $t(35)= -11,637$, $p=0,000$. Houve um aumento estatisticamente significativo dos níveis de HbF após 6 meses de tratamento e uma diminuição estatisticamente significativa após 12 meses de tratamento.

Tabela 6.8 Teste t de Student realizado para comparar o nível de HbF entre as variáveis pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU.

| n=36 | TESTE t DE STUDENT | | |
|---|--------------------|-----------------|----------|
| | t | df ¹ | p-valor* |
| Pré-tratamento / após 6 meses de tratamento | -12,848 | 35 | 0,000 |
| Após 6 meses de tratamento / após 12 meses de tratamento | 3,988 | 35 | 0,000 |
| Pré-tratamento / após 12 meses de tratamento | -11,637 | 35 | 0,000 |

* Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos.

¹ Graus de liberdade

O teste de Wilcoxon (tabela 6.9) mostrou que o nível de HbF após 6 meses de tratamento é superior ao nível de HbF pré-tratamento ($z=-5,232$; $p=0,000$). A partir de então, após 12 meses de tratamento, houve uma redução do nível de HbF em relação aos 6 meses de tratamento ($z=-3,233$; $p=0,001$), parecendo demonstrar que a indução de HbF pela HU foi mais significativa nos primeiros 6 meses de tratamento. Comparando os valores de HbF pré-tratamento e após 12 meses de tratamento notou-se que, de facto, houve um aumento estatisticamente significativo do nível de HbF em decorrência da intervenção da HU ($Z=-5,216$; $p=0,000$).

Tabela 6.9 Teste de Wilcoxon realizado para comparar o nível de HbF entre os grupos pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU.

| n=36 | TESTE DE WILCOXON | | |
|---|-------------------|-----------------|----------|
| | z | df ¹ | p-valor* |
| Pré-tratamento / após 6 meses de tratamento | -5,232 | 35 | 0,000 |
| Após 6 meses de tratamento / após 12 meses de tratamento | -3,233 | 35 | 0,001 |
| Pré-tratamento / após 12 meses de tratamento | -5,216 | 35 | 0,000 |

* Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos.

¹ Graus de liberdade

Para além do período temporal de tratamento, os níveis percentuais de HbF também foram comparados considerando-se as variáveis género e idade. O teste de Mann-Whitney mostrou que as variáveis género ($U=133$; $p=0,375$) e idade ($U=105$; $p=0,190$) não influenciaram de forma significativa o nível percentual de HbF pré-tratamento (tabela 6.10).



O teste t Independente revelou que o nível percentual de HbF após 6 e 12 meses de tratamento com HU não foi significativamente influenciado pelas variáveis género [após 6 meses com HU ($t(34)=-0,499$; $p=0,621$); após 12 meses com HU ($t(34)=-0,695$; $p=0,492$)] e idade [após 6 meses com HU ($t(34)=0,808$; $p=0,424$), após 12 meses com HU ($t(34)=1,380$; $p=0,176$)], como mostra a tabela 6.11.

Tabela 6.10 Teste de Mann-Whitney utilizado para comparar o nível percentual de HbF, pré-tratamento, entre as variáveis género e idade.

| n=36 | TESTE DE MANN-WHITNEY | |
|--------------------------|-----------------------|----------|
| | Pré-tratamento | |
| | Estatística | p-valor* |
| Feminino / Masculino | 133 | 0,375 |
| 3 a 7 anos / 8 a 11 anos | 105 | 0,190 |

* Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos.

Tabela 6.11 Teste t Independente utilizado para comparar o nível percentual de HbF, após 6 e 12 meses de tratamento, entre as variáveis género e idade.

| n=36 | TESTE t INDEPENDENTE | | | | | |
|--------------------------|----------------------------|-----------------|----------|-----------------------------|-----------------|----------|
| | Após 6 meses de tratamento | | | Após 12 meses de tratamento | | |
| | Estatística | df ¹ | p-valor* | Estatística | df ¹ | p-valor* |
| Feminino / Masculino | -0,499 | 34 | 0,621 | -0,695 | 34 | 0,492 |
| 3 a 7 anos / 8 a 11 anos | 0,808 | 34 | 0,424 | 1,380 | 34 | 0,176 |

* Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos.

¹ Graus de liberdade

Apesar de não se ter encontrado diferenças estatisticamente significativas entre os géneros feminino e masculino, nem entre os grupos etários de 3 a 7 e 8 a 11 anos, deve-se considerar a limitação relativa ao tamanho da amostra. Cada grupo possui menos de 30 indivíduos e, além disso, para as idades, o grupo de 3 a 7 anos possui o dobro do tamanho do grupo de 8 a 11 anos. Essas limitações da população podem interferir no poder estatístico do estudo, de modo que não se encontre significância estatística, mesmo que ela exista.

O papel da HbF no subfenótipo clínico da ACF encontra-se descrito como variável e incongruente, de modo que mesmo níveis próximos de 20% podem ser encontrados em indivíduos com doença grave. O limite para redução significativa de episódios agudos de dor, síndromes torácicas e priapismo é de 20%, e para danos a órgãos, 10% ¹⁰².

Após 6 meses de tratamento, 50% dos doentes adquiriram um nível de HbF entre 10% e 20%, enquanto que apenas 19,4% dos doentes apresentaram esses níveis de HbF na fase de pré-tratamento, e 22,2% dos doentes obtiveram níveis de HbF $\geq 20\%$. Em nenhum dos 36



doentes se detetou níveis de HbF $\geq 20\%$ no pré-tratamento. Após 12 meses de tratamento, a percentagem de doentes que mantiveram e/ou alcançaram níveis de HbF entre 10% e 20% foi de 52,8 e, níveis de HbF acima ou igual a 20% foi de 11,1 (tabela 6.12).

Tabela 6.12 Número e percentagem de doentes com HbF $\leq 10\%$, $>10\%$ e $<20\%$, e $\geq 20\%$, pré e após 6 e 12 meses de tratamento com HU.

| n=36 | DOENTES (%) | | |
|------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | HbF $\leq 10\%$ | 10% < HbF < 20% | HbF $\geq 20\%$ |
| Pré-tratamento | 29 (80,6) | 7 (19,4) | 0 (0) |
| Após 6 meses de tratamento | 10 (27,8) | 18 (50) | 8 (22,2) |
| Após 12 meses de tratamento | 13 (36,1) | 19 (52,8) | 4 (11,1) |

Para avaliar em que proporção se deu o aumento da HbF nos períodos de 0 a 6 meses, de 6 a 12 meses e de 0 a 12 meses de tratamento com HU, foi feita a razão entre HbF pré e pós-tratamento (tabela 6.13). Em 2,8% dos doentes verificou-se um aumento mínimo dos níveis de HbF após 6 meses de tratamento com HU. Os níveis de HbF após 6 meses de tratamento duplicaram em 47,2% dos doentes, triplicaram em 27,8% dos doentes e 22,2% dos doentes apresentaram níveis de HbF aumentados em quatro vezes ou mais. Os resultados evidenciaram que a HU foi eficaz na elevação dos níveis de HbF logo após 6 meses de tratamento. Após 12 meses de tratamento verificou-se uma estabilização ou ligeira diminuição nos níveis de HbF. Ao comparar os níveis de HbF pré-tratamento e após 12 meses de tratamento percebeu-se que 50% das crianças apresentaram uma duplicação desses níveis e apenas 11,2% das crianças exibiram aumento mínimo de HbF.

Tabela 6.13 Número e percentagem de doentes em cada nível (1, 2, 3 e 4) de aumento da HbF, após 6 e 12 meses de tratamento com HU.

| n=36 | DOENTES (%) | | |
|--|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 0 a 6 meses de tratamento | 6 a 12 meses de tratamento | 0 a 12 meses de tratamento |
| Nível 1- aumento mínimo de HbF* | 1 (2,8) | 7 (19,4) | 4 (11,2) |
| Nível 2- HbF duplicada | 17 (47,2) | 0 (0,0) | 18 (50) |
| Nível 3- HbF triplicada | 10 (27,8) | 0 (0,0) | 7 (19,4) |
| Nível 4- HbF aumentada em 4 vezes ou mais | 8 (22,2) | 0 (0,0) | 7 (19,4) |

* Aumento que não atingiu a duplicação.

6.4 AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA ENTRE DOIS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DA HbF

Foi ainda realizada uma avaliação de duas metodologias para quantificação da HbF no âmbito de Controlo da Qualidade Laboratorial. Como já foi discutido, a técnica de HPLC é



uma das principais ferramentas de diagnóstico de hemoglobinopatias e, por assim ser, neste trabalho, a quantificação das Hbs variantes (neste estudo a HbS), da HbF e das cadeias de globina $G\gamma$ e $A\gamma$, foi realizada por métodos cromatográficos de troca iónica e fase reversa.

Para comparar os métodos de cromatografia de troca iónica e cromatografia de fase reversa na esfera da quantificação de HbF utilizou-se a análise de Bland-Altman. Esta avalia a concordância entre dois métodos distintos que analisam uma mesma variável dependente quantitativa, que neste estudo foi a HbF.

Um total de 197 amostras de sangue hemolisado, de crianças com ACF, foi utilizado para quantificar a HbF através dos métodos cromatográficos IEX-HPLC e RP-HPLC. A análise de Bland-Altman requer uma distribuição normal dos dados que, no presente trabalho, foi avaliada pelo teste de Shapiro Wilk, cujo resultado foi $p=0,05$, cumprindo o requisito. Em anexo, apresenta-se uma tabela com os dados pareados, a partir dos quais foi construído o gráfico e avaliada a concordância entre os métodos.

A figura 6.8 indica a linha de regressão entre os dois métodos. O coeficiente de correlação entre os dois métodos é $r=0,970$ e a equação de regressão é $y=0,946(0,923 \text{ a } 0,969)x - 0,008(-0,168 \text{ a } 0,152)$, o que poderia ser avaliado como correlacionável.

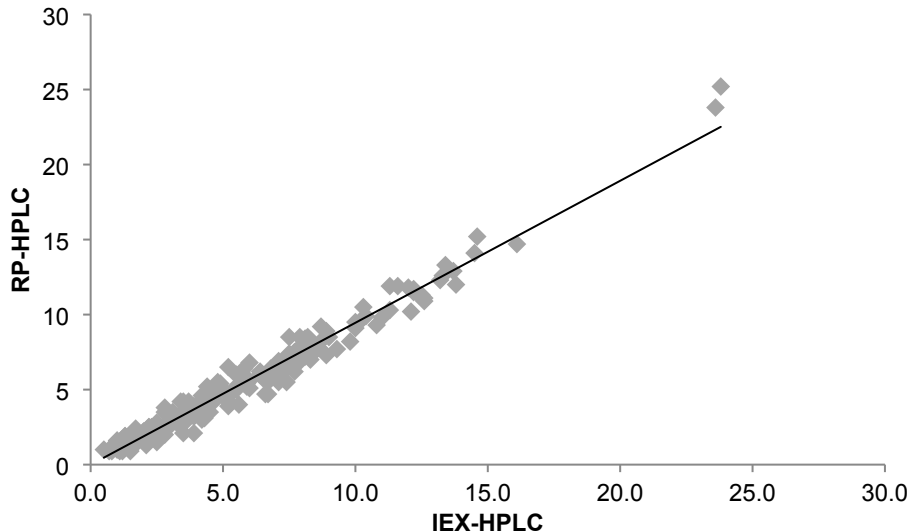


Figura 6.8 Linha de regressão entre as medidas do nível de HbF feitas pelos métodos cromatográficos IEX-HPLC e RP-HPLC. A equação de regressão é expressa como: $y = 0,946x - 0,008$. A linha de regressão tem uma inclinação de 1,06 (1,02 a 1,09) e uma intercepção de -0,008 (-0,168 a 0,152). O coeficiente de correlação entre os dois métodos é $r = 0,970$.

Pelo gráfico (figura 6.9) é possível avaliar um viés entre as diferenças médias e estimar um intervalo de concordância, dentro do qual caem 95% das diferenças do segundo método em relação ao primeiro. A média das diferenças é 0,3 unidades, o que significa que,



em média, os resultados da RP-HPLC são 0,3 unidades inferiores aos da IEX-HPLC. O exame visual do gráfico permite avaliar a concordância global entre as duas medições. Aproximadamente 95% das diferenças estão entre os limites de concordância.

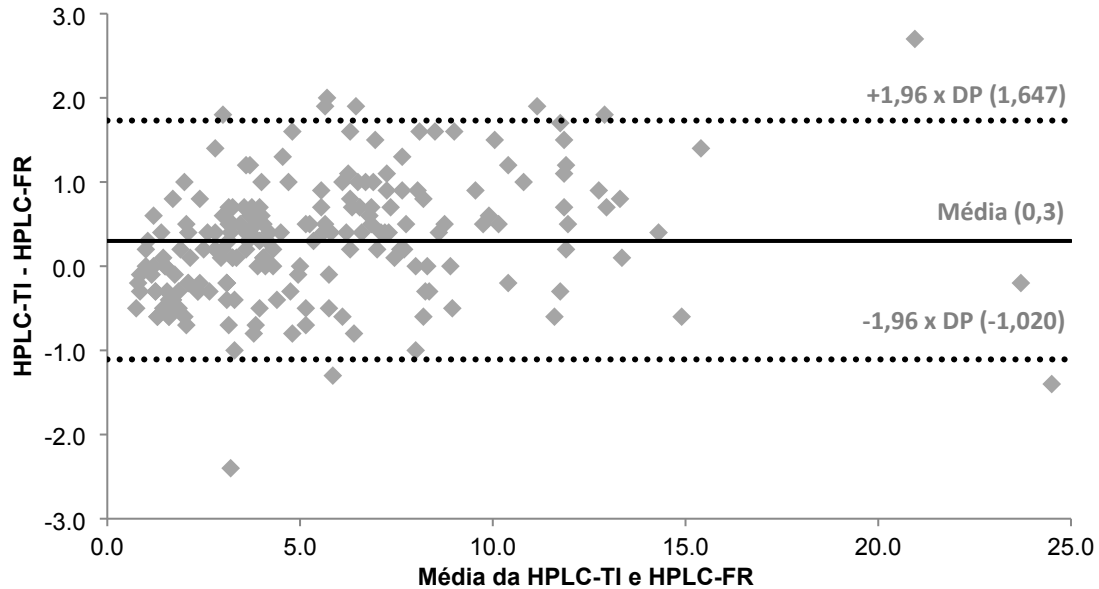


Figura 6.9 Gráfico de Bland-Altman para os dados obtidos através da quantificação da HbF, pelos métodos IEX-HPLC e RP-HPLC, com a representação dos limites de concordância (linha pontilhada), de $-1,96s$ a $+1,96s$. DP: desvio padrão.

O sistema de plotagem não informa se a concordância é suficiente ou adequada para usar um método ou outro indiferentemente, ele simplesmente quantifica o viés e uma faixa de concordância, dentro da qual 95% das diferenças entre uma medição e outra são incluídas. Pode-se dizer que o viés (0,3 unidades) não é significativo neste estudo, pois a linha de igualdade da diferença média está dentro do intervalo de confiança. Os limites aceitáveis devem ser definidos, *a priori*, com base na necessidade clínica, considerações biológicas ou outros objetivos. Como a média é próxima a zero e os valores se distribuem de maneira homogénea dentro do intervalo de confiança de 95%, presume-se que os métodos sejam concordantes. Isso demonstra que ambos os métodos usados para a quantificação da HbF são adequados para o fim pretendido.



7 CONCLUSÃO

A ACF é a anemia hemolítica hereditária mais comum em todo o mundo. Indivíduos com DF sofrem de dor intensa que pode começar na infância e aumentar de gravidade ao longo da vida, levando à hospitalização e agravamento da qualidade de vida. Uma característica patognomónica da DF são as crises vaso-oclusivas caracterizadas por episódios recorrentes e imprevisíveis de dor aguda. Além disso, os doentes com DF também relatam dor crónica. Neste estudo avaliámos a eficácia do tratamento com HU na elevação dos níveis de HbF, já que a HbF representa um dos moduladores mais importantes da gravidade da DF, tanto pela diminuição da concentração de HbS, quanto pela inibição da sua polimerização.

A HU é um fármaco utilizado há muitos anos na terapia antineoplásica e foi o primeiro medicamento aprovado pela FDA para o tratamento da ACF em adultos, por ter também um efeito indutor da síntese de cadeia γ -globina em células eritroides humanas. Neste estudo, os resultados revelaram que a HU é um fármaco eficaz na elevação dos níveis de HbF nas 36 crianças angolanas com ACF. Embora a resposta dos doentes ao tratamento com HU seja variável, para a maioria dos doentes deste estudo houve uma duplicação dos níveis de HbF após 6 meses de tratamento e, a partir desse período, observou-se uma estabilização ou ligeira diminuição nos níveis de HbF.

Houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de HbF antes e após o tratamento com HU. Foi observado um aumento estatisticamente significativo dos níveis de HbF após 6 meses de tratamento e uma diminuição estatisticamente significativa após 12 meses de tratamento, parecendo demonstrar que a indução de HbF pela HU foi mais significativa nos primeiros 6 meses de tratamento. Comparando os valores de HbF pré-tratamento e após 12 meses de tratamento notou-se que, de facto, houve um aumento estatisticamente significativo do nível de HbF em decorrência da intervenção da HU.

Além disso, as variáveis género e idade não demonstraram influenciar significativamente o aumento do nível percentual de HbF mediante o tratamento com HU. No entanto, deve-se considerar que as limitações da população dos grupos género e idade, relativas ao baixo número de casos avaliados, podem ter influenciado o poder estatístico do estudo. Todavia, a HU pode melhorar as manifestações clínicas da ACF pela sua capacidade de induzir a síntese de HbF, reduzindo a mortalidade e morbilidade da doença e melhorando a qualidade de vida destes doentes.

Os benefícios da HU na ACF têm sido confirmados por muitos estudos. YASARA, Nirmani *et al.*, acompanharam, durante 48 a 60 meses trezentos doentes com



hemoglobinopatias, incluindo a ACF, em terapia com HU e perceberam que os doentes tiveram uma resposta significativa à terapia e todos eles tornaram-se independentes de transfusão sanguínea durante este período ⁸. STEINBERG, Martin H. *et al.*, pretenderam determinar se a HU atenuava a mortalidade em doentes com DF e concluíram que houve uma redução da mortalidade após 9 anos de acompanhamento, sendo ela relacionada com os níveis de HbF e frequência de eventos vaso-oclusivos ⁶⁶. Na recente revisão Cochrane (SJ, Nevitt *et al.*), os autores avaliaram, independentemente, estudos de ensaios controlados randomizados e quase randomizados, de um mês ou mais, comparando HU com placebo, terapia padrão ou outras intervenções para doentes com DF. Sugeriram que a HU é eficaz na diminuição da frequência de episódios de dor e outras complicações agudas em adultos e crianças com ACF e na prevenção de eventos neurológicos com risco de vida em doentes com ACF em risco de AVC primário ⁶⁷.

CANNAS, Giovanna *et al.*, revisaram o uso da HU em crianças com ACF, e concluíram que o fármaco previne lesão de órgãos-alvo mas, também, traz riscos potenciais em termos de crescimento e desenvolvimento e permanece questionável o seu uso pelo risco de malignidade secundária após exposição ao medicamento por longos períodos ⁵¹. KEIKHAEI, Bijan *et al.*, avaliaram o efeito da HU na melhoria clínica e hematológica em doentes com ACF e os resultados revelaram que o fármaco diminuiu significativamente a taxa de transfusão, hospitalização, tamanho do baço e aumentou significativamente a Hb, índices de GVs e HbF, sem qualquer efeito adverso durante o seguimento de um ano ⁷¹. VINHAES, Caian L. *et al.*, investigaram o impacto potencial da terapia com HU no estado do estresse oxidativo num estudo caso-controlo no Brasil e os resultados demonstraram que a HU estava associada à diminuição do desequilíbrio oxidativo em pacientes com ACF, tendo ainda argumentado que este pode ser o principal mecanismo pelo qual o fármaco atenua o dano tecidual e pode contribuir para melhores resultados clínicos na ACF ⁷⁵.

NADER, Elie *et al.*, sugerem, no seu estudo, que a HU, por meio de seus efeitos na HbF e possivelmente na liberação de NO, modularia a via de sinalização de NO eritrocitário, reologia dos GVs e estresse oxidativo em doentes com ACF ⁶. LEMONNE, Nathalie *et al.*, testaram os efeitos de um ano de terapia com HU na reologia do sangue, na hematologia e no perfil clínico em adultos com ACF e observaram que a melhoria na deformabilidade dos GVs e a diminuição da robustez dos agregados de GVs em doentes tratados com HU, limitam as consequências do aumento da Hb na viscosidade do sangue destes doentes ⁷². OLIVEIRA, Emanuel Almeida Moreira De *et al.*, avaliaram o efeito da indução de danos ao DNA em



células mononucleares do sangue periférico de 22 doentes com DF, genótipos SS e SC, tratados com HU e concluíram que não houve evidência de indução de danos ao DNA ⁶⁴.

Partindo do princípio de que a avaliação dos níveis de HbF é um fator essencial para acompanhar o efeito da HU em doentes com ACF, utilizou-se no presente estudo a análise de Bland-Altman para comparar dois métodos cromatográficos (troca iónica e fase reversa), usados para quantificar frações de Hb, incluindo a HbF, aquando da confirmação do diagnóstico de hemoglobinopatias, em particular da ACF. Esta análise demonstrou que, como a média das diferenças entre os métodos é próxima de zero e os valores das diferenças e da razão entre os métodos se distribuem de maneira homogénea dentro de um intervalo de confiança de 95%, há concordância entre os métodos. Pode, assim, concluir-se que ambos os métodos usados para a quantificação da HbF são adequados para o fim pretendido neste trabalho, que consistiu na avaliação do aumento dos níveis de HbF mediante o tratamento com HU em crianças angolanas com ACF.



8 PERSPETIVAS FUTURAS

No futuro, pretende-se amplificar a amostragem do presente estudo, de modo a avaliar o efeito da HU num maior número de crianças e num maior período de tempo, para verificar a consistência dos resultados obtidos e, também, para se obter um maior poder estatístico. A variabilidade de resposta provocada pelo tratamento com HU pode ser explorada através de um estudo genético e a avaliação dos marcadores genéticos capazes de modular o efeito do tratamento com HU poderá esclarecer melhor a suscetibilidade individual de resposta ao fármaco. A avaliação de outros indicadores laboratoriais e clínicos durante o tratamento com HU também poderá constituir uma mais valia para um acompanhamento mais completo e consistente da condição clínica dos doentes.

Existem novas e potenciais terapias direcionadas para o processo patológico de vaso-oclusão da ACF. Essas novas terapias podem reduzir adesão e inflamação, levando à diminuição da incidência de crises vaso-oclusivas e prevenção de danos a órgãos. Investigações recentes centram-se em: agentes de afinidade para o oxigénio (voxelotor, AES-103); indutores da HbF (HQB-1001, decitabina e tetrahidouridina, panobinostat, pomalidomida, inibidor de LSD1, metformina); agentes anti-inflamatórios (regadenoson, NKTT120, sinvastatina, ácidos gordos ómega-3, mometasona, canacinumab, zileuton, montelukaste); agentes antiplaquetários (prasugrel, ticagrelor, eptifibatida, abciximab); agentes anticoagulantes (varfarina, heparina, rivaroxabano, apixabano, defibrotido); agentes antiaderentes (crizanlizumab, propranolol, rivipansel, imunoglobulina intravenosa); alguns agentes adicionais como a vitamina D; agentes anti-neutrófilos; agentes moduladores de cGMP (olinciguat, IMR-687); terapia de edição de genes (LentiGlobin BB305, CRISPR/Cas-9); hidratação de GVs falciformes (dipiridamol, senicapoc, magnésio intravenoso); outros agentes anti-falciformação (PEG-bHb-CO, SCD-101); agentes antioxidantes (L-glutamina, N-acetilcisteína); terapia da vasculopatia (NO tópico, arginina, citrulina, riociguat, estatinas) e antibiótico (rifaximina) ^{103; 104; 105; 106; 107; 108; 109}.

A terapia genética tem o potencial de se tornar o tratamento de escolha para doentes com ACF, na ausência de um dador compatível para o transplante alogénico de medula óssea. A edição de genoma mediada por lentivírus para aumentar a expressão de γ -globina endógena ou corrigir as mutações causadoras da doença é uma estratégia. A edição de genes mediada por lentivírus provou ser eficaz e segura no tratamento de várias doenças genéticas. Avanços em ferramentas de engenharia genética, particularmente CRISPR/Cas9, levantaram a possibilidade de correção genética em células estaminais pluripotentes induzidas, bem como



em células estaminais hematopoiéticas derivadas de doentes e em células progenitoras^{34, 110, 111, 112, 113}.

Foi realizado um estudo para identificar compostos capazes de induzir a expressão do gene γ -globina e a produção de HbF. Foi examinada uma biblioteca química, constituída por 150 compostos, utilizando o biossensor celular K562.GR com genes de proteína fluorescente sob o controlo dos promotores dos genes humanos γ e β -globina. Os compostos identificados foram analisados como indutores de HbF em culturas de células primárias, obtidas de doentes com talassemia, confirmando a sua atividade como indutores de HbF e sugerindo essas moléculas como potenciais estratégias terapêuticas para hemoglobinopatias¹¹⁴.

As terapias de suplementação têm assumido um novo interesse para a ACF. Alguns fitoterápicos como a rutina e o ácido gálico, que possuem efeito anti-falciformação, já foram estudados quanto ao seu potencial em auxiliar na eficácia e combater a toxicidade induzida pela HU, uma vez que a HU é o fármaco mais eficaz para tratar a ACF até ao momento¹¹⁵. Estudos indicam que eletroacupuntura sem anestesia e o suplemento dietético de curcumina podem contribuir para o tratamento da dor crónica em doentes com ACF¹¹⁶.

Como já foi referido, a HbF é um modulador importante na gravidade da DF, e a distribuição heterocelular da HbF é comum na ACF. Os métodos convencionais são limitados a uma deteção qualitativa de populações de células F (GVs que contém HbF). Para a inibição da polimerização de HbS, a hipótese de um “limiar de HbF por GV (HbF/GV)” requer a medição precisa de HbF em GVs individuais, que pode ser alcançada pela associação linear entre o conteúdo médio de HbF e a fluorescência média de GV por citometria de fluxo, usando um anticorpo anti-HbF humano. Este novo método permite a comparação de distribuições de HbF/GV e pode ser uma ferramenta útil para caracterizar a distribuição de HbF em doentes com ACF e a resposta terapêutica aos indutores de HbF¹¹⁷.

Até à data, a DF carece de programas nacionais de rastreio e de intervenção em África. Os altos custos do rastreamento, as limitações na infraestrutura do sistema de saúde e a ausência de opções de tratamento ideais e acessíveis, criam uma barreira que impede que a DF se torne um objetivo acionável na agenda global de saúde. O efeito da DF nas mortes por doenças infecciosas, pobreza e mortes maternas e infantis retarda o progresso em relação aos indicadores-chave de desenvolvimento para a África Subsaariana. Felizmente a inovação tecnológica e terapêutica tem tornado a DF mais detetável, tratável e curável¹¹⁸.



9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SANTOS, Brigida; ALVES, Inês; BRITO, Miguel - A doença das células falciformes. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO EM ANGOLA. **Centro de Investigação em Saúde de Angola (CISA)**. 2019).
2. GUALANDRO, Sandra F. M. - A associação anemia falciforme e hemoglobina fetal. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 2009) 403–404.
3. CHAND, Arati Rani *et al.* - Are There True Non-Responders to Hydroxyurea in Sickle Cell Disease? a Multiparameter Analysis. **Blood**. ISSN 0006-4971. 124:21 (2014) 4073. doi: 10.1182/blood.V124.21.4073.4073.
4. KOHNE, Elisabeth - Hemoglobinopathies: Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. **Deutsches Arzteblatt**. ISSN 00121207. 108:31–32 (2011) 532–540. doi: 10.3238/arztebl.2011.0532.
5. INUSA, Baba P. D. *et al.* - Sickle cell disease—genetics, pathophysiology, clinical presentation and treatment. **International Journal of Neonatal Screening**. ISSN 2409515X. 5:2 (2019). doi: 10.3390/ijns5020020.
6. NADER, Elie *et al.* - Hydroxyurea therapy modulates sickle cell anemia red blood cell physiology : Impact on RBC deformability , oxidative stress , nitrite levels and nitric oxide synthase signalling pathway To cite this version : HAL Id : hal-01968408 physiology : Impact on R. **Nitric Oxide**. ISSN 1089-8603. 81:2019) 28–35. doi: 10.1016/j.niox.2018.10.003.
7. AGRAWAL, Rohit Kumar *et al.* - Hydroxyurea in sickle cell disease: Drug review. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**. ISSN 09740449. 30:2 (2014) 91–96. doi: 10.1007/s12288-013-0261-4.
8. YASARA, Nirmani; PREMAWARDHENA, Anuja; METTANANDA, Sachith - A comprehensive review of hydroxyurea for β -haemoglobinopathies: the role revisited during COVID-19 pandemic. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. ISSN 17501172. 16:1 (2021) 1–12. doi: 10.1186/s13023-021-01757-w.
9. HIGGS, Douglas R.; WOOD, William G. - Genetic complexity in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 00278424. 105:33 (2008) 11595–11596. doi: 10.1073/pnas.0806633105.
10. RIBEIRO, Rita De Cassia Mousinho *et al.* - Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 91 (2008) 136–141.
11. HOFFMAN, Ronald *et al.* - **Hematology: Basic Principles and Practice**. 7. ed.



Philadelphia : Elsevier, 2017. ISBN 0323357628 / 978-0323357623.

12. BAIN, Barbara J. - **Células Sanguíneas: Um Guia Prático** . 5. ed. Porto Alegre : Artmed, 2016. ISBN 8582713304 / 978-8582713303.

13. LI, Xuejin *et al.* - Biomechanics and biorheology of red blood cells in sickle cell anemia. 50:2017) 34–41. doi: 10.1016/j.jbiomech.2016.11.022.

14. KEOHANE, Elaine M.; SMITH, Larry J.; WALENGA, Jeanine M. - **Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications** . 5. ed. St. Louis : Saunders, 2015. ISBN 0323239064 / 978-0323239066.

15. HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A. H. - **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7. ed. Porto Alegre : Artmed, 2017. ISBN 97811184086741 / 1118408675.

16. PAPASSOTIRIOU, I. *et al.* - Gamma Chain Heterogeneity: Determination of Hb F Composition by Perfusion Chromatography. **Hemoglobin**. 22:1998) 469–481. doi: 10.3109/03630269809071544.

17. TEIXEIRA, S. M.; CORTELLAZZI, L. C.; GROTTTO, H. Z. W. - Effect of hydroxyurea on G gamma chain fetal hemoglobin synthesis by sickle-cell disease patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. ISSN 0100879X. 36:10 (2003) 1289–1292. doi: 10.1590/S0100-879X2003001000002.

18. STEINBERG, Martin H. - Sickle Cell Anemia , the First Molecular Disease : Overview of Molecular Etiology , Pathophysiology , and Therapeutic Approaches. 2008) 1295–1324. doi: 10.1100/tsw.2008.157.

19. SERJEANT, Graham R. - The Natural History of Sickle Cell Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. 2013) 1–11. doi: 10.1101/cshperspect.a011783.

20. PIEL, Frédéric B. *et al.* - Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature Communications**. ISSN 20411723. 1:8 (2010). doi: 10.1038/ncomms1104.

21. PIEL, Frédéric B. - Distribution géographique de la drépanocytose en 2010. **Medecine/Sciences**. ISSN 19585381. 29:11 (2013) 965–967. doi: 10.1051/medsci/20132911012.

22. WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Sickle Cell Disease | WHO | Regional Office for Africa** [Em linha], atual. 2021. [Consult. 30 ago. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.afro.who.int/health-topics/sickle-cell-disease>.

23. PIEL, Frédéric B.; STEINBERG, Martin H.; REES, David C. - Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**. 2017) 1561–1573. doi: 10.1056/NEJMra1510865.



24. CANNAS, Giovanna; MERAZGA, Salima; VIROT, Emilie - Sick cell disease and infections in high- And low-income countries. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**. ISSN 20353006. 11:1 (2019) 1–9. doi: 10.4084/MJHID.2019.042.
25. REES, David C.; WILLIAMS, Thomas N.; GLADWIN, Mark T. - Sick cell disease. **The Lancet**. ISSN 0140-6736. 376:9757 (2018) 2018–2031. doi: 10.1016/S0140-6736(18)61029-X.
26. SUNDD, Prithu - Pathophysiology of Sick Cell Disease. **Physiology & behavior**. 176:3 (2019) 139–148. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838.Pathophysiology.
27. NADER, Elie; ROMANA, Marc; CONNES, Philippe - The Red Blood Cell—Inflammation Vicious Circle in Sick Cell Disease. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 11:March (2020) 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2020.00454.
28. PICCIN, Andrea *et al.* - Insight into the complex pathophysiology of sick cell anaemia and possible treatment. **European Journal of Haematology**. ISSN 16000609. 102:4 (2019) 319–330. doi: 10.1111/ejh.13212.
29. DAI, Hailang *et al.* - A possible pathogenetic factor of sick cell disease based on fluorescent analysis via an optofluidic resonator. February (2017) 1–6. doi: 10.1038/s41598-017-03634-8.
30. GBOTOSHO, Oluwabukola T. *et al.* - The Worst Things in Life are Free: The Role of Free Heme in Sick Cell Disease. **Frontiers in Immunology**. 11:2021) 1. doi: 10.3389/fimmu.2020.561917.
31. KATO, Gregory J. *et al.* - Sick cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**. ISSN 2056676X. 4:2018) 1–22. doi: 10.1038/nrdp.2018.10.
32. MENAA, Farid *et al.* - Sick cell retinopathy: Improving care with a multidisciplinary approach. **Journal of Multidisciplinary Healthcare**. ISSN 11782390. 10:2017) 335–346. doi: 10.2147/JMDH.S90630.
33. BACHMEIER, Isabel *et al.* - Maculopathy in sick cell disease. **Ophthalmology**. ISSN 14330423. September 2020 (2021). doi: 10.1007/s00347-020-01319-8.
34. VENKATESAN, Vigneshwaran *et al.* - Manipulation of Developmental Gamma-Globin Gene Expression: an Approach for Healing Hemoglobinopathies. **Molecular and Cellular Biology**. ISSN 0270-7306. 41:1 (2020) 1–18. doi: 10.1128/mcb.00253-20.
35. CHRISTENSEN, Thomas *et al.* - Sick cell disease and pregnancy. **Ugeskrift for læger**. ISSN 16036824. 182:43 (2020) 1–8.
36. KEHINDE, Tawakalitu Abosedé; OSUNDIJI, Mayowa Azeez - Sick cell trait and the



potential risk of severe coronavirus disease 2019—A mini-review. **European Journal of Haematology**. ISSN 16000609. 105:5 (2020) 519–523. doi: 10.1111/ejh.13478.

37. ABDULRAHMAN, Abdulkarim *et al.* - Is sickle cell disease a risk factor for severe COVID 19 outcomes in hospitalized patients? A multicenter national retrospective cohort study. **eJHaem**. ISSN 2688-6146. 2:2 (2021) 167–174. doi: 10.1002/jha2.170.

38. ALVES, Ana Margareth Gomes *et al.* - Doença Falciforme: Conhecer para Cuidar. **Ministério da Saúde**. 2015).

39. RODAK, Bernardette F.; CARR, Jacqueline H. - **Clinical Haematology Atlas**. 5. ed. [S.l.] : Elsevier, 2017. ISBN 9780323322492.

40. BAIN, Barbara J. - **Haemoglobinopathy Diagnosis**. 3. ed. [S.l.] : Wiley-Blackwell, 2020. ISBN 1119579953 / 978-1119579953.

41. LABORATORIES, Association Of Public Health - Hemoglobinopathies : Current Practices for Screening , Confirmation and Follow-up. **Association of Public Health Laboratories**. December (2015) 5–57.

42. KJELLANDER, Christian *et al.* - Sickcellanemi ger skiftande symtombild och hög morbiditet. **Läkartidningen**. 112:DCPM (2015) 1–5.

43. MANWANI, Deepa; FRENETTE, Paul S. - Vaso-Occlusion in sickle cell disease: Pathophysiology and novel targeted therapies. **Blood**. ISSN 00064971. 122:24 (2013) 3892–3898. doi: 10.1182/blood-2013-05-498311.

44. JESUS, Joice Aragão; ARAUJO, Paulo Ivo Cortez - **Doença Falciforme - Condutas básicas para tratamento**. 1. ed. [S.l.] : Ministério da saúde, 2013. ISBN 9788533419322.

45. LIEM, Robert I. - Balancing exercise risk and benefits: Lessons learned from sickle cell trait and sickle cell anemia. **Hematology (United States)**. ISSN 15204383. 2018:1 (2018) 418–425. doi: 10.1182/asheducation-2018.1.418.

46. BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMAN, Bjorn C. - **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. New York : McGraw-Hill Education / Medical, 2011. ISBN 0071624422 / 978-0071624428.

47. GOLAN, David E. *et al.* - **Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy**. 3. ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2011. ISBN 1608312704 / 978-1608312702.

48. **EU/3/03/154 | European Medicines Agency** - [Em linha] [Consult. 16 jul. 2021]. Disponível em WWW:<URL:<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu303154>>.



49. LEE, Eric S. *et al.* - Hydroxyurea for the Treatment of Psoriasis including in HIV-infected Individuals: A Review. **Psoriasis Forum**. 17:3 (2011) 180–187.
50. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - **PubChem Compound Summary for CID 3657, Hydroxyurea** [Em linha] [Consult. 3 mai. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3657>.
51. CANNAS, Giovanna; POUTREL, Solène; THOMAS, Xavier - Hydroxycarbamine: From an old drug used in malignant hemopathies to a current standard in sickle cell disease. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**. ISSN 20353006. 9:1 (2017) 1–12. doi: 10.4084/mjhid.2017.015.
52. PHARMACOLOGY, Clinical - (hydroxyurea capsules, USP). [s.d.].
53. QURESHI, Amrana *et al.* - Guidelines for the use of hydroxycarbamide in children and adults with sickle cell disease: A British Society for Haematology Guideline. **British Journal of Haematology**. ISSN 13652141. 181:4 (2018) 460–475. doi: 10.1111/bjh.15235.
54. RANG, H. P. *et al.* - **Rang & Dale's Pharmacology**. 8. ed. [S.l.] : Churchill Livingstone, 2015. ISBN 0702053627 / 978-0702053627.
55. SCHECHTER, Alan N. *et al.* - ASH 50th anniversary review Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**. 112:10 (2008) 3927–3938. doi: 10.1182/blood-BLOOD.
56. WARE, Russell E. - How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. **Blood**. 115:26 (2010) 5300–5311. doi: 10.1182/blood-2009-04-146852.
57. IANCU, Gabriela; OCNEANU, Anca; ROTARU, Maria - Hydroxyurea-induced superinfected ulcerations: Two case reports and review of the literature. **Experimental and Therapeutic Medicine**. ISSN 1792-0981. 20:6 (2020) 1–1. doi: 10.3892/etm.2020.9321.
58. KUMAR, B.; SARASWAT, A.; KAUR, I. - Mucocutaneous adverse effects of hydroxyurea: A prospective study of 30 psoriasis patients. **Clinical and Experimental Dermatology**. ISSN 03076938. 27:1 (2002) 8–13. doi: 10.1046/j.0307-6938.2001.00947.x.
59. O'BRANSKI, Erin E. *et al.* - Skin and nail changes in children with sickle cell anemia receiving hydroxyurea therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 44:5 (2001) 859–861. doi: 10.1067/mjd.2001.113471.
60. GRIGG, A. - Effect of hydroxyurea on sperm count, motility and morphology in adult men with sickle cell or myeloproliferative disease. **Internal Medicine Journal**. ISSN 14440903. 37:3 (2007) 190–192. doi: 10.1111/j.1445-5994.2006.01290.x.
61. BERTHAUT, Isabelle *et al.* - Adverse effect of hydroxyurea on spermatogenesis in



patients with sickle cell anemia after 6 months of treatment. **Blood**. ISSN 15280020. 130:21 (2017) 2354–2356. doi: 10.1182/blood-2017-03-771857.

62. PA, Poli *et al.* - Exposure to Hydroxyurea during Pregnancy : A Case Report of Congenital Malformation , Update on the Current Evidence and Management of Sickle Cell Disease during Pregnancy Abstract. **iMedPub Journals**. 6:5 (2020) 1–6. doi: 10.36648/2471-8165.6.5.108.

63. RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, Lucía; MARTÍ, Joaquín - An animal model for assessing the effects of hydroxyurea exposure suggests that the administration of this agent to pregnant women and young infants may not be as safe as we thought. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 19:12 (2018) 13. doi: 10.3390/ijms19123986.

64. OLIVEIRA, Emanuel Almeida Moreira De *et al.* - Evaluation of hydroxyurea genotoxicity in patients with sickle cell disease. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**. ISSN 23176385. 17:4 (2019) eAO4742. doi: 10.31744/einstein_journal/2019AO4742.

65. AZMET, Fauzia R. *et al.* - The role of hydroxyurea in decreasing the occurrence of vasso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease at King Saud Medical City in Riyadh, Saudi Arabia. **Saudi Medical Journal**. ISSN 16583175. 41:1 (2020) 46–52. doi: 10.15537/smj.2020.1.24698.

66. STEINBERG, Martin H. *et al.* - Effect of Hydroxyurea on Mortality and Morbidity in Adult Sickle Cell Anemia: Risks and Benefits Up to 9 Years of Treatment. **Journal of the American Medical Association**. ISSN 00987484. 289:13 (2003) 1645–1651. doi: 10.1001/jama.289.13.1645.

67. SJ, Nevitt *et al.* - Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. 2017). doi: 10.1002/14651858.CD002202.pub2.www.cochranelibrary.com.

68. LUCHTMAN-JONES, Lori *et al.* - Effects of hydroxyurea treatment for patients with hemoglobin SC disease Hydroxyurea Treatment for HbSC. 91:2 (2016). doi: 10.1002/ajh.24255.

69. BORDBAR, Mohammad Reza *et al.* - Hydroxyurea treatment in transfusion-dependent β -thalassemia patients. **Iranian Red Crescent Medical Journal**. ISSN 20741812. 16:6 (2014). doi: 10.5812/ircmj.18028.

70. BEGUIN, Yves - Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. **Clinica Chimica Acta**. ISSN 00098981. 329:1–2 (2003) 9–22. doi: 10.1016/S0009-8981(03)00005-6.



71. KEIKHAEI, Bijan; YOUSEFI, Homayon; BAHADORAM, Mohammad - Hydroxyurea: Clinical and Hematological Effects in Patients With Sickle Cell Anemia. **Global journal of health science**. ISSN 19169736. 8:3 (2015) 252–256. doi: 10.5539/gjhs.v8n3p252.
72. LEMONNE, Nathalie *et al.* - Hydroxyurea treatment does not increase blood viscosity and improves red blood cell rheology in sickle cell anemia. **Haematologica**. 100:2015) 383–386. doi: 10.3324/haematol.2015.130435.
73. GHATPANDE, Swati S. *et al.* - Pharmaco-proteomic study of hydroxyurea-induced modifications in the sickle red blood cell membrane proteome. **Experimental Biology and Medicine**. ISSN 15353702. 233:12 (2008) 1510–1517. doi: 10.3181/0805-S-149.
74. ROGERS, Stephen C. *et al.* - Sickle hemoglobin disturbs normal coupling among erythrocyte O₂ content, glycolysis, and antioxidant capacity. **Blood**. 121:9 (2013) 1651–1662. doi: 10.1182/blood-2012.
75. VINHAES, Caian L. *et al.* - Hydroxyurea treatment is associated with reduced degree of oxidative perturbation in children and adolescents with sickle cell anemia. **Scientific Reports**. ISSN 20452322. 10:1 (2020) 1–10. doi: 10.1038/s41598-020-76075-5.
76. HILLERY, Cheryl A. *et al.* - Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. **British Journal of Haematology**. 2000) 322–327. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02040.x>.
77. ODIÈVRE, Marie Hélène *et al.* - Modulation of erythroid adhesion receptor expression by hydroxyurea in children with sickle cell disease. **Haematologica**. ISSN 03906078. 93:4 (2008) 502–509. doi: 10.3324/haematol.12070.
78. VOSKARIDOU, Ersi *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**. ISSN 00064971. 115:12 (2010) 2354–2363. doi: 10.1182/blood-2009-05-221333.
79. MOREIRA, Juliane Almeida *et al.* - Pattern of hemolysis parameters and association with fetal hemoglobin in sickle cell anemia patients in steady state. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. ISSN 18060870. 37:3 (2015) 167–171. doi: 10.1016/j.bjhh.2015.01.008.
80. YUDITSKAYA, Susan; SUFFREDINI, Anthony F.; KATO, Gregory J. - The proteome of sickle cell disease: Insights from exploratory proteomic profiling. **Expert Review of Proteomics**. ISSN 14789450. 7:6 (2010) 833–848. doi: 10.1586/epr.10.88.
81. SHIH, Andrew W. Y.; MCFARLANE, Andrew; VERHOVSEK, Madeleine -



Haptoglobin testing in hemolysis: Measurement and interpretation. **American Journal of Hematology**. 89:4 (2014) 443–447. doi: 10.1002/ajh.23623.

82. RAGAB, Seham M.; SAFAN, Manal A.; BADR, Eman A. - Study of Serum Haptoglobin Level and its Relation to Erythropoietic Activity in Beta Thalassemia Children.

Open Journal System Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases Original Article Erythropoietic Activity in Beta Thalassemia Children. Mediterr J Hematol Infect Dis. 7:1 (2015) 2015019. doi: 10.4084/MJHID.2015.019.

83. DELANGHE, Joris R.; LANGLOIS, Michel R. - **Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:www.elsevier.com/locate/clinchim>.

84. NICKEL, Robert Sheppard *et al.* - Combination dose-escalated hydroxyurea and transfusion: an approach to conserve blood during the COVID-19 pandemic. **Blood**. 135:January (2020) 19–21. doi: 10.1182/blood.2020006582.

85. DEBAUN, Michael R. - Initiating adjunct low-dose hydroxyurea therapy for stroke prevention in children with SCA during the COVID-19 pandemic. **Blood**. ISSN 15280020. 135:22 (2020) 1997–1999. doi: 10.1182/blood.2020005992.

86. ITALIA, Khushnooma *et al.* - Comparison of in-vitro and in-vivo response to fetal hemoglobin production and γ -mRNA expression by hydroxyurea in Hemoglobinopathies. **Indian Journal of Human Genetics**. 19:2 (2013) 258. doi: 10.4103/0971-6866.116128.

87. POURFARZAD, Farzin *et al.* - Hydroxyurea responsiveness in β -thalassemic patients is determined by the stress response adaptation of erythroid progenitors and their differentiation propensity. **Haematologica**. 98:5 (2013). doi: 10.3324/haematol.2012.074492.

88. PULE, Gift D. *et al.* - A systematic review of known mechanisms of hydroxyurea-induced fetal hemoglobin for treatment of sickle cell disease. **Expert Review of Hematology**. ISSN 17474094. 8:5 (2015) 669–679. doi: 10.1586/17474086.2015.1078235.

89. SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. - **Principles of Instrumental Analysis** . 6. ed. Belmont : Cengage Learning, 2006. ISBN 0495012017 / 978-0495012016.

90. SKOOG, Douglas A. *et al.* - **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. [S.l.] : Thomson Learning, 2006. ISBN 8522104360 / 9788522104369.

91. FAY, Daniel Lenox - HPLC Past and Present. **Angewandte Chemie International Edition**, 6(11), 951–952. 2000) 412–420.

92. BIRD, I. M. - High performance liquid chromatography: Principles and clinical



- applications. **British Medical Journal**. ISSN 02670623. 299:6702 (1989) 783–787. doi: 10.1136/bmj.299.6702.783.
93. MEYER, Veronika R. - **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 5. ed. [S.l.] : Wiley, 2010. ISBN 0470682175 / 978-0470682173.
94. KAZAKEVICH, Y. V. - High-performance liquid chromatography retention mechanisms and their mathematical descriptions. **Journal of Chromatography A**. ISSN 00219673. 1126:1–2 (2006) 232–243. doi: 10.1016/j.chroma.2006.05.022.
95. **HAEMOGLOBIN PATTERN ANALYSIS - Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders - NCBI Bookshelf** - [Em linha] [Consult. 6 jul. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190579/>.
96. WADA, Yoshinao - **Advanced analytical methods for hemoglobin variants** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:www.elsevier.com/locate/chromb>.
97. ŽUVELA, Petar *et al.* - Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. **Chemical Reviews**. ISSN 15206890. 119:6 (2019) 3674–3729. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00246.
98. CHALUMEAU, Anne *et al.* - Reverse Phase-high-performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) Analysis of Globin Chains from Human Erythroid Cells. **Bio-Protocol**. ISSN 2331-8325. 11:2 (2021) 1–11. doi: 10.21769/bioprotoc.3899.
99. RIOU, J. *et al.* - Improvements in phenotype studies of hemoglobin disorders brought by advances in reversed-phase chromatography of globin chains. **International Journal of Laboratory Hematology**. ISSN 1751553X. 37:2 (2015) 279–286. doi: 10.1111/ijlh.12286.
100. PERGANDE, Melissa R. *et al.* - Isoelectric Point Separations of Peptides and Proteins. **Proteomes**. 2017). doi: 10.3390/proteomes5010004.
101. ARISHI, Wjdan A.; AL-HADRAMI, Hani A.; ZOUROB, Mohammed - Techniques for the detection of sickle cell disease: A review. **Micromachines**. ISSN 2072666X. 12:5 (2021) 1–22. doi: 10.3390/mi12050519.
102. ANTWI-BOASIAGO, C. *et al.* - Sickle Cell Disease: Reappraisal of the Role of Foetal Haemoglobin Levels in the Frequency of Vaso-Occlusive Crisis. **Ghana medical journal**. ISSN 00169560. 49:2 (2015) 102–106. doi: 10.4314/gmj.v49i2.7.
103. OSUNKWO, Ifeyinwa; MANWANI, Deepa; KANTER, Julie - Current and novel therapies for the prevention of vaso-occlusive crisis in sickle cell disease. **Therapeutic Advances in Hematology**. 11:2020) 259–261. doi: 10.1177/2040620720955000.
104. NEUMAYR, Lynne D.; HOPPE, Carolyn C.; BROWN, Clark - Sickle cell disease:



current treatment and emerging therapies. **The American Journal of Managed Care**. ISSN 19362692. 25:18 (2019) S335–S343.

105. CARDEN, Marcus A.; LITTLE, Jane - Emerging disease-modifying therapies for sickle cell disease. **Haematologica**. ISSN 15928721. 104:9 (2019) 1710–1719. doi: 10.3324/haematol.2018.207357.

106. QUINN, Charles T. - L-Glutamine for sickle cell anemia: More questions than answers. **Blood**. ISSN 15280020. 132:7 (2018) 689–693. doi: 10.1182/blood-2018-03-834440.

107. ATAGA, Kenneth I.; RAI, Parul - Drug Therapies for the Management of Sickle Cell Disease. **F1000Research**. ISSN 1759796X. 9:2020) 1–15. doi: 10.12688/f1000research.22433.1.

108. RES, Med *et al.* - Therapeutic advances in sickle cell disease in the last decade. May (2018) 517–520. doi: 10.4103/ijmr.IJMR.

109. TISDALE, John F.; THEIN, Swee Lay; EATON, William A. - Treating sickle cell anemia. **Science**. ISSN 0036-8075. 367:6483 (2020) 1198–1199. doi: 10.1126/science.aba3827.

110. CAVAZZANA, Marina; ANTONIANI, Chiara; MICCIO, Annarita - Gene Therapy for β -Hemoglobinopathies. **Molecular Therapy**. ISSN 15250024. 25:5 (2017) 1142–1154. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.024.

111. DEMIRCI, Selami; UCHIDA, Naoya; TISDALE, John F. - Gene therapy for sickle cell disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. ISSN 1469493X. 2016:11 (2016) 899–910. doi: 10.1002/14651858.CD007652.pub5.

112. FRATI, Giacomo; MICCIO, Annarita - Genome Editing for β -Hemoglobinopathies: Advances and Challenges. **Journal of Clinical Medicine**. ISSN 2077-0383. 10:3 (2021) 482. doi: 10.3390/jcm10030482.

113. PARK, So Hyun *et al.* - Highly efficient editing of the β -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. **Nucleic Acids Research**. ISSN 13624962. 47:15 (2019) 7955–7972. doi: 10.1093/nar/gkz475.

114. BREVEGLIERI, Giulia *et al.* - Discovery of novel fetal hemoglobin inducers through small chemical library screening. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 21:19 (2020) 1–12. doi: 10.3390/ijms21197426.

115. GOUR, Abhishek *et al.* - Effect of Concomitant Hydroxyurea Therapy with Rutin and Gallic Acid: Integration of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Approaches. **ACS**



Omega. ISSN 2470-1343. 2021). doi: 10.1021/acsomega.1c01518.

116. TRAN, Huy; GUPTA, Mihir; GUPTA, Kalpna - Targeting novel mechanisms of pain in sickle cell disease. 130:2017) 546–555.

117. HEBERT, Nicolas *et al.* - Individual red blood cell fetal hemoglobin quantification allows to determine protective thresholds in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**. ISSN 10968652. 95:11 (2020) 1235–1245. doi: 10.1002/ajh.25937.

118. SIMPSON, Shmona - Sickle cell disease: a new era. **The Lancet Haematology**. ISSN 23523026. 6:8 (2019) e393–e394. doi: 10.1016/S2352-3026(19)30111-5.



ANEXOS

BASE DE DADOS DA QUANTIFICAÇÃO DAS CADEIAS DE GLOBINA $G\gamma$ E $A\gamma$ PRÉ-TRATAMENTO PELA RP-HPLC E DA QUANTIFICAÇÃO DE HbF PRÉ E PÓS-TRATAMENTO COM HU PELA IEX-HPLC

| AMOSTRA | IDADE | GÉNERO | % Hb $G\gamma$ PRÉ-TRATAMENTO | % Hb $A\gamma$ PRÉ-TRATAMENTO | % HbF PRÉ-TRATAMENTO | % HbF APÓS 6 MESES COM HU | % HbF APÓS 12 MESES COM HU |
|---------|-------|--------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|
| 1 | 9 | F | 46 | 54 | 4,4 | 11,4 | 11,1 |
| 2 | 5 | F | 35 | 65 | 7,5 | 12,8 | 15,9 |
| 3 | 10 | M | 42 | 58 | 3,3 | 13,9 | 7,8 |
| 4 | 3 | M | 51 | 49 | 11,6 | 19,5 | 17,5 |
| 5 | 3 | F | 45 | 55 | 14,6 | 26,2 | 23,5 |
| 6 | 10 | M | 39 | 61 | 4,1 | 15,8 | 15,3 |
| 7 | 8 | F | 33 | 67 | 2,9 | 7,7 | 7,0 |
| 8 | 10 | F | 61 | 39 | 13,3 | 22,8 | 15,3 |
| 9 | 7 | F | 31 | 69 | 3,4 | 9,7 | 9,0 |
| 10 | 6 | M | 44 | 56 | 3,4 | 9,9 | 10,2 |
| 11 | 4 | M | 41 | 59 | 12,0 | 19,6 | 23,3 |
| 12 | 6 | M | 47 | 53 | 1,3 | 7,2 | 5,4 |
| 13 | 8 | F | 52 | 48 | 8,9 | 21,3 | 17,1 |
| 14 | 6 | F | 35 | 65 | 1,2 | 3,2 | 4,2 |
| 15 | 3 | M | 47 | 53 | 8,6 | 19,0 | 16,0 |
| 16 | 3 | F | 36 | 64 | 7,4 | 12,3 | 7,2 |
| 17 | 7 | F | 31 | 69 | 3,8 | 7,3 | 6,0 |
| 18 | 4 | M | 34 | 66 | 3,3 | 9,3 | 10,8 |
| 19 | 6 | M | 46 | 54 | 10,0 | 17,4 | 14 |
| 20 | 7 | M | 22 | 78 | 1,5 | 6,5 | 8,9 |
| 21 | 8 | F | 57 | 43 | 13,2 | 15,8 | 13,8 |
| 22 | 4 | M | 26 | 74 | 5,5 | 23,8 | 21,1 |
| 23 | 5 | M | 25 | 75 | 7,9 | 14,5 | 15,5 |
| 24 | 6 | M | 25 | 75 | 6,4 | 20,4 | 13,5 |
| 25 | 10 | F | 25 | 75 | 3,8 | 12,2 | 12,3 |
| 26 | 8 | M | 27 | 73 | 2,2 | 4,8 | 4,5 |
| 27 | 3 | M | 37 | 63 | 5,7 | 19,3 | 14,9 |
| 28 | 5 | F | 36 | 64 | 11,3 | 20,8 | 19,5 |
| 29 | 11 | M | 35 | 65 | 1,5 | 12,8 | 12,5 |
| 30 | 10 | F | 35 | 65 | 3,3 | 10,9 | 8,0 |
| 31 | 7 | F | 38 | 62 | 7,2 | 16,2 | 12,9 |
| 32 | 6 | F | 35 | 65 | 6,0 | 13,7 | 12,0 |
| 33 | 7 | F | 49 | 51 | 11,0 | 23,0 | 21,1 |
| 34 | 9 | F | 35 | 65 | 2,8 | 13,0 | 10,2 |
| 35 | 7 | M | 47 | 53 | 6,8 | 25,2 | 19,7 |
| 36 | 6 | F | 24 | 76 | 4,1 | 9,7 | 8,6 |



PERCENTAGEM DAS FRAÇÕES DE HEMOGLOBINA PRÉ E PÓS-TRATAMENTO COM HU QUANTIFICADAS PELA IEX-HPLC E RESPECTIVOS TEMPOS DE RETENÇÃO

| | AMOSTRA 1 – FEMININO, 9 ANOS | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------------------------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.12 | 2.34 | 3.39 | 4.34 | 1.14 | 2.24 | 3.28 | 4.33 | 1.13 | 2.05 | 3.68 | 4.34 |
| % Hb | 4,4 | 4,1 | 9,4 | 80,5 | 11,4 | 4,3 | 7,4 | 74,1 | 11,1 | 19,8 | 5,4 | 53,8 |

| | AMOSTRA 2 – FEMININO, 5 ANOS | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------------------------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.12 | 2.36 | 3.46 | 4.34 | 1.14 | 2.25 | 3.35 | 4.34 | 1.14 | 2.06 | 3.67 | 4.38 |
| % Hb | 7,5 | 2,0 | 5,4 | 82,5 | 12,8 | 2,7 | 2,9 | 79,9 | 15,9 | 2,8 | 7,7 | 71,5 |

| | AMOSTRA 3 – MASCULINO, 10 ANOS | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.12 | 2.34 | 3.38 | 4.32 | 1.14 | 2.24 | 3.30 | 4.33 | 1.14 | 2.07 | 3.78 | 4.36 |
| % Hb | 3,3 | 3,8 | 9,3 | 81,7 | 13,9 | 6,0 | 6,3 | 71,4 | 7,8 | 23,8 | 5,1 | 46,9 |

| | AMOSTRA 4 - MASCULINO, 3 ANOS | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-------------------------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.15 | 2.34 | 3.41 | 4.35 | 1.14 | 2.25 | 3.40 | 4.36 | 1.14 | 2.05 | 3.68 | 4.37 |
| % Hb | 11,6 | 3,2 | 8,3 | 75,5 | 19,5 | 3,4 | 3,3 | 71,8 | 17,5 | 6,6 | 12,2 | 59,2 |

| | AMOSTRA 5 – FEMININO, 3 ANOS | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------------------------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.15 | 2.35 | 3.41 | 4.33 | 1.16 | 2.26 | 3.41 | 4.38 | 1.16 | 2.05 | 3.67 | 4.38 |
| % Hb | 14,6 | 3,5 | 8,2 | 72,6 | 26,2 | 2,8 | 2,4 | 67,4 | 23,5 | 5,1 | 7,1 | 61,1 |

| | AMOSTRA 6 - MASCULINO, 10 ANOS | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.12 | 2.35 | 3.41 | 4.33 | 1.15 | 2.25 | 3.30 | 4.32 | 1.15 | 2.05 | 3.71 | 4.36 |
| % Hb | 4,1 | 4,4 | 8,5 | 81,3 | 15,8 | 5,5 | 4,0 | 73,3 | 15,3 | 4,8 | 8,1 | 68,2 |



| AMOSTRA 7 – FEMININO, 8 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.11 | 2.34 | 3.42 | 4.34 | 1.12 | 2.25 | 3.31 | 4.34 | 1.12 | 2.05 | 3.68 | 4.34 |
| % Hb | 2,9 | 3,3 | 5,7 | 86,4 | 7,7 | 4,4 | 6,1 | 79,8 | 7,0 | 17,9 | 5,4 | 59,3 |

| AMOSTRA 8 – FEMININO, 10 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.16 | 2.34 | 3.38 | 4.32 | 1.16 | 2.25 | 3.30 | 4.33 | 1.14 | 2.05 | 3.65 | 4.34 |
| % Hb | 13,3 | 3,4 | 8,1 | 73,8 | 22,8 | 4,2 | 5,1 | 66,9 | 15,3 | 5,6 | 2,8 | 71,9 |

| AMOSTRA 9 – FEMININO, 7 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.11 | 2.35 | 3.47 | 4.40 | 1.13 | 2.25 | 3.34 | 4.37 | 1.12 | 2.05 | 3.67 | 4.37 |
| % Hb | 3,4 | 1,8 | 14,7 | 78,4 | 9,7 | 4,0 | 6,8 | 78,1 | 9,0 | 6,1 | 12,5 | 69,0 |

| AMOSTRA 10 - MASCULINO, 6 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.11 | 2.31 | 3.43 | 4.42 | 1.14 | 2.25 | 3.29 | 4.33 | 1.13 | 2.45 | 3.67 | 4.38 |
| % Hb | 3,4 | 3,7 | 10,5 | 81,2 | 9,9 | 3,1 | 8,0 | 73,9 | 10,2 | 10,2 | 7,7 | 62,1 |

| AMOSTRA 11 - MASCULINO, 4 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.15 | 2.35 | 3.43 | 4.34 | 1.15 | 2.27 | 3.71 | 4.37 | 1.15 | 2.05 | 3.66 | 4.37 |
| % Hb | 12,0 | 3,3 | 4,3 | 78,3 | 19,6 | 2,8 | 2,7 | 72,6 | 23,3 | 4,4 | 9,3 | 60,1 |

| AMOSTRA 12 - MASCULINO, 6 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.10 | 2.32 | 3.28 | 4.31 | 1.14 | 2.25 | 3.31 | 4.33 | 1.12 | 2.05 | 3.71 | 4.33 |
| % Hb | 1,3 | 4,8 | 12,4 | 78,0 | 7,2 | 5,2 | 5,4 | 79,0 | 5,4 | 7,8 | 12,8 | 68,3 |



| AMOSTRA 13 – FEMININO, 8 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.14 | 2.38 | 3.49 | 4.41 | 1.17 | 2.26 | 3.32 | 4.33 | 1.16 | 2.09 | 3.48 | 4.37 |
| % Hb | 8,9 | 3,2 | 12,2 | 75,5 | 21,3 | 5,3 | 6,3 | 65,1 | 17,1 | 14,0 | 3,3 | 59,4 |

| AMOSTRA 14 – FEMININO, 6 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.11 | 2.37 | 3.49 | 4.40 | 1.12 | 2.27 | 3.72 | 4.36 | 1.11 | 2.05 | 3.68 | 4.34 |
| % Hb | 1,2 | 2,8 | 4,3 | 90,2 | 3,2 | 1,9 | 5,1 | 87,9 | 4,2 | 7,6 | 11,8 | 71,8 |

| AMOSTRA 15 - MASCULINO, 3 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.16 | 2.29 | 3.40 | 4.33 | 1.15 | 2.26 | 3.43 | 4.37 | 1.15 | 2.05 | 3.69 | 4.30 |
| % Hb | 8,6 | 4,0 | 13,4 | 72,7 | 19,0 | 4,1 | 3,2 | 71,6 | 16,0 | 5,2 | 3,1 | 69,2 |

| AMOSTRA 16 – FEMININO, 3 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.15 | 2.36 | 3.41 | 4.32 | 1.15 | 2.28 | 3.42 | 4.39 | 1.12 | 2.06 | 3.67 | 4.38 |
| % Hb | 7,4 | 3,3 | 8,0 | 79,2 | 12,3 | 5,0 | 11,3 | 70,4 | 7,2 | 2,4 | 7,1 | 82,0 |

| AMOSTRA 17 – FEMININO, 7 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.13 | 2.37 | 3.47 | 4.34 | 1.17 | 2.35 | 3.55 | 4.39 | 1.12 | 2.06 | 3.68 | 4.37 |
| % Hb | 3,8 | 1,6 | 3,0 | 88,3 | 7,3 | 3,5 | 4,2 | 83,0 | 6,0 | 3,7 | 7,1 | 80,5 |

| AMOSTRA 18 - MASCULINO, 4 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.13 | 2.38 | 3.49 | 4.36 | 1.18 | 2.34 | 3.52 | 4.38 | 1.13 | 2.05 | 3.68 | 4.37 |
| % Hb | 3,3 | 3,5 | 3,2 | 87,9 | 9,3 | 3,5 | 4,6 | 79,9 | 10,8 | 3,9 | 11,4 | 71,0 |



| AMOSTRA 19 - MASCULINO, 6 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.15 | 2.37 | 3.47 | 4.39 | 1.20 | 2.34 | 3.52 | 4.38 | 1.16 | 2.08 | 3.48 | 4.36 |
| % Hb | 10,0 | 4,6 | 6,2 | 77,2 | 17,4 | 5,2 | 6,6 | 69,0 | 14,0 | 12,4 | 3,6 | 55,4 |

| AMOSTRA 20 - MASCULINO, 7 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.12 | 2.29 | 3.39 | 4.33 | 1.17 | 2.34 | 3.52 | 4.37 | 1.12 | 2.06 | 3.68 | 4.37 |
| % Hb | 1,5 | 3,9 | 12,9 | 79,7 | 6,5 | 3,7 | 4,7 | 82,4 | 8,9 | 3,1 | 7,8 | 77,7 |

| AMOSTRA 21 - FEMININO, 8 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.17 | 2.36 | 3.45 | 4.36 | 1.20 | 2.39 | 3.82 | 4.42 | 1.14 | 2.05 | 3.38 | 4.33 |
| % Hb | 13,2 | 1,8 | 6,6 | 75,6 | 15,8 | 4,2 | 2,1 | 76,8 | 13,8 | 5,2 | 3,3 | 71,0 |

| AMOSTRA 22 - MASCULINO, 4 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.14 | 2.37 | 3.47 | 4.35 | 1.20 | 2.34 | 3.53 | 4.40 | 1.15 | 2.05 | 3.64 | 4.35 |
| % Hb | 5,5 | 1,8 | 1,8 | 87,5 | 23,8 | 4,7 | 5,7 | 65,0 | 21,1 | 6,2 | 10,3 | 59,7 |

| AMOSTRA 23 - MASCULINO, 5 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.15 | 2.38 | 3.68 | 4.36 | 1.20 | 2.34 | 3.51 | 4.37 | 1.14 | 2.06 | 3.66 | 4.37 |
| % Hb | 7,9 | 1,5 | 5,1 | 83,9 | 14,5 | 3,9 | 6,5 | 74,1 | 15,5 | 3,6 | 7,1 | 71,1 |

| AMOSTRA 24 - MASCULINO, 6 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.14 | 2.37 | 3.44 | 4.33 | 1.20 | 2.34 | 3.53 | 4.38 | 1.13 | 2.05 | 3.67 | 4.38 |
| % Hb | 6,4 | 2,4 | 3,9 | 82,9 | 20,4 | 5,1 | 3,7 | 68,3 | 13,5 | 5,4 | 8,5 | 69,2 |



| AMOSTRA 25 – FEMININO, 10 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.13 | 2.37 | 3.47 | 4.34 | 1.17 | 2.34 | 3.55 | 4.40 | 1.13 | 2.05 | 3.67 | 4.38 |
| % Hb | 3,8 | 1.8 | 4,7 | 86,9 | 12,2 | 4,0 | 2,4 | 79,6 | 12,3 | 5,1 | 6,3 | 74,9 |

| AMOSTRA 26 - MASCULINO, 8 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.14 | 2.36 | 3.43 | 4.34 | 1.15 | 2.34 | 3.54 | 4.41 | 1.11 | 2.46 | 3.67 | 4.33 |
| % Hb | 2,2 | 3,5 | 9,8 | 83,1 | 4,8 | 3,1 | 3,7 | 86,5 | 4,5 | 8,5 | 7,5 | 71,2 |

| AMOSTRA 27 - MASCULINO, 3 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.15 | 2.36 | 3.44 | 4.35 | 1.19 | 2.34 | 3.54 | 4.39 | 1.14 | 2.05 | 3.68 | 4.35 |
| % Hb | 5,7 | 3,4 | 12,8 | 76,8 | 19,3 | 3,3 | 3,5 | 72,8 | 14,9 | 15,1 | 15,5 | 49,9 |

| AMOSTRA 28 – FEMININO, 5 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.15 | 2.38 | 3.49 | 4.41 | 1.18 | 2.33 | 3.53 | 4.41 | 1.14 | 2.05 | 3.66 | 4.35 |
| % Hb | 11,3 | 3,4 | 16,0 | 68,8 | 20,8 | 4,9 | 8,1 | 64,9 | 19,5 | 6,4 | 8,3 | 61,8 |

| AMOSTRA 29 - MASCULINO, 11 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.14 | 2.37 | 3.46 | 4.35 | 1.19 | 2.33 | 3.50 | 4.37 | 1.14 | 2.06 | 3.67 | 4.33 |
| % Hb | 1,5 | 1,6 | 7,2 | 86,8 | 12,8 | 3,6 | 6,4 | 75,5 | 12,5 | 2,2 | 7,3 | 76,2 |

| AMOSTRA 30 – FEMININO, 10 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.14 | 2.38 | 3.45 | 4.35 | 1.17 | 2.34 | 3.79 | 4.40 | 1.12 | 2.05 | 3.67 | 4.37 |
| % Hb | 3,3 | 3,1 | 6,5 | 85,2 | 10,9 | 2,3 | 2,7 | 82,0 | 8,0 | 6,8 | 9,1 | 72,7 |



| AMOSTRA 31 – FEMININO, 7 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.16 | 2.38 | 3.47 | 4.36 | 1.18 | 2.34 | 3.54 | 4.40 | 1.13 | 2.05 | 3.65 | 4.36 |
| % Hb | 7,2 | 3,2 | 6,3 | 81,8 | 16,2 | 4,1 | 6,0 | 72,0 | 12,9 | 6,9 | 10,6 | 66,5 |

| AMOSTRA 32 – FEMININO, 6 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.15 | 2.38 | 3.45 | 4.34 | 1.19 | 2.33 | 3.51 | 4.38 | 1.13 | 2.05 | 3.69 | 4.36 |
| % Hb | 6,0 | 3,7 | 8,7 | 80,0 | 13,7 | 5,4 | 8,0 | 70,3 | 12,0 | 11,3 | 14,3 | 56,2 |

| AMOSTRA 33 – FEMININO, 7 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.16 | 2.39 | 3.50 | 4.38 | 1.20 | 2.34 | 3.54 | 4.40 | 1.15 | 2.05 | 3.66 | 4.37 |
| % Hb | 11,0 | 2,2 | 5,0 | 78,8 | 23,0 | 4,1 | 5,9 | 65,5 | 21,1 | 8,1 | 9,7 | 56,5 |

| AMOSTRA 34 – FEMININO, 9 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.14 | 2.38 | 3.47 | 4.41 | 1.18 | 2.34 | 3.54 | 4.40 | 1.13 | 2.05 | 3.66 | 4.34 |
| % Hb | 2,8 | 2,0 | 5,3 | 87,1 | 13,0 | 4,2 | 6,1 | 75,0 | 10,2 | 8,4 | 13,4 | 63,5 |

| AMOSTRA 35 - MASCULINO, 7 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.16 | 2.32 | 3.43 | 4.35 | 1.20 | 2.34 | 3.53 | 4.40 | 1.15 | 2.05 | 3.66 | 4.35 |
| % Hb | 6,8 | 3,6 | 12,8 | 75,1 | 25,2 | 3,6 | 7,8 | 62,2 | 19,7 | 3,9 | 6,6 | 67,7 |

| AMOSTRA 36 – FEMININO, 6 ANOS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|------------------|------------------|------|----------------------------|------------------|------------------|------|-----------------------------|------------------|------------------|------|
| | Pré-tratamento | | | | Após 6 meses de tratamento | | | | Após 12 meses de tratamento | | | |
| | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS | HbF | HbA ₀ | HbA ₂ | HbS |
| TR (min) | 1.12 | 2.36 | 3.35 | 4.29 | 1.17 | 2.34 | 3.78 | 4.37 | 1.13 | 2.04 | 3.71 | 4.33 |
| % Hb | 4,1 | 2,2 | 3,7 | 85,5 | 9,7 | 1,8 | 3,0 | 84,0 | 8,6 | 16,3 | 5,6 | 61,9 |



DADOS DA CONCORDÂNCIA ENTRE OS MÉTODOS IEX-HPLC E RP-HPLC PELA ANÁLISE DE BLAND-ALTMAN

| | %HbF | | MÉDIA (IEX-HPLC + RP-HPLC)/2 (UNIDADES) | (IEX-HPLC - RP-HPLC) (UNIDADES) |
|-------|----------|---------|---|---------------------------------|
| | IEX-HPLC | RP-HPLC | | |
| | 4,4 | 4,2 | 4,3 | 0,2 |
| | 3 | 3,2 | 3,1 | -0,2 |
| | 7,5 | 7,1 | 7,3 | 0,4 |
| | 3,3 | 3,2 | 3,25 | 0,1 |
| | 11,6 | 11,9 | 11,75 | -0,3 |
| | 2 | 2,2 | 2,1 | -0,2 |
| | 14,6 | 15,2 | 14,9 | -0,6 |
| | 7,7 | 7,5 | 7,6 | 0,2 |
| | 4,1 | 3,8 | 3,95 | 0,3 |
| | 4,1 | 4 | 4,05 | 0,1 |
| | 12,2 | 11,5 | 11,85 | 0,7 |
| | 6,7 | 5,9 | 6,3 | 0,8 |
| | 2,9 | 2,7 | 2,8 | 0,2 |
| | 13,3 | 12,6 | 12,95 | 0,7 |
| | 3,4 | 3,3 | 3,35 | 0,1 |
| | 3,4 | 4,2 | 3,8 | -0,8 |
| | 7 | 6 | 6,5 | 1 |
| | 12 | 11,8 | 11,9 | 0,2 |
| n=197 | 3,5 | 3 | 3,25 | 0,5 |
| | 1,3 | 1,9 | 1,6 | -0,6 |
| | 8,9 | 8,9 | 8,9 | 0 |
| | 1,2 | 0,9 | 1,05 | 0,3 |
| | 3,9 | 2,1 | 3 | 1,8 |
| | 8,6 | 7,8 | 8,2 | 0,8 |
| | 2,1 | 1,3 | 1,7 | 0,8 |
| | 5 | 5 | 5 | 0 |
| | 7,7 | 7 | 7,35 | 0,7 |
| | 5,5 | 6 | 5,75 | -0,5 |
| | 1,5 | 0,9 | 1,2 | 0,6 |
| | 7,4 | 6,4 | 6,9 | 1 |
| | 8,5 | 7,6 | 8,05 | 0,9 |
| | 7,8 | 6,7 | 7,25 | 1,1 |
| | 7,2 | 6,5 | 6,85 | 0,7 |
| | 6,6 | 5,6 | 6,1 | 1 |
| | 7,3 | 6,9 | 7,1 | 0,4 |
| | 3,8 | 3,4 | 3,6 | 0,4 |
| | 3,3 | 2,7 | 3 | 0,6 |
| | 0,7 | 0,9 | 0,8 | -0,2 |
| | 10 | 9,5 | 9,75 | 0,5 |



| %HbF | | MÉDIA (IEX-HPLC + RP-HPLC)/2 (UNIDADES) | (IEX-HPLC - RP-HPLC) (UNIDADES) |
|----------|---------|---|---------------------------------|
| IEX-HPLC | RP-HPLC | | |
| 8,9 | 7,3 | 8,1 | 1,6 |
| 1,5 | 2 | 1,75 | -0,5 |
| 2,9 | 3,3 | 3,1 | -0,4 |
| 13,2 | 12,3 | 12,75 | 0,9 |
| 5,5 | 5 | 5,25 | 0,5 |
| 7,9 | 8,5 | 8,2 | -0,6 |
| 1,7 | 1,8 | 1,75 | -0,1 |
| 1,4 | 1,7 | 1,55 | -0,3 |
| 6,4 | 6,2 | 6,3 | 0,2 |
| 3,5 | 2,1 | 2,8 | 1,4 |
| 7,7 | 6,2 | 6,95 | 1,5 |
| 3 | 2,9 | 2,95 | 0,1 |
| 2,5 | 1,5 | 2 | 1 |
| 3,8 | 3,4 | 3,6 | 0,4 |
| 4,3 | 3,7 | 4 | 0,6 |
| 3,7 | 3,2 | 3,45 | 0,5 |
| 3,8 | 3,5 | 3,65 | 0,3 |
| 13,4 | 13,3 | 13,35 | 0,1 |
| 4,5 | 3,5 | 4 | 1 |
| 8 | 7,5 | 7,75 | 0,5 |
| 2,8 | 3,5 | 3,15 | -0,7 |
| 7,1 | 6,5 | 6,8 | 0,6 |
| 4,1 | 4,1 | 4,1 | 0 |
| 7,8 | 7,6 | 7,7 | 0,2 |
| 6,4 | 6 | 6,2 | 0,4 |
| 5,8 | 5,4 | 5,6 | 0,4 |
| 16,1 | 14,7 | 15,4 | 1,4 |
| 2,8 | 2 | 2,4 | 0,8 |
| 2,2 | 2,1 | 2,15 | 0,1 |
| 7,4 | 5,5 | 6,45 | 1,9 |
| 4,3 | 3,6 | 3,95 | 0,7 |
| 23,8 | 25,2 | 24,5 | -1,4 |
| 1,1 | 1,4 | 1,25 | -0,3 |
| 8,7 | 9,2 | 8,95 | -0,5 |
| 9,3 | 7,7 | 8,5 | 1,6 |
| 3 | 3,2 | 3,1 | -0,2 |
| 7,4 | 7 | 7,2 | 0,4 |
| 1,2 | 1,7 | 1,45 | -0,5 |
| 3,3 | 3 | 3,15 | 0,3 |
| 2,2 | 2,5 | 2,35 | -0,3 |
| 0,5 | 1 | 0,75 | -0,5 |
| 5,7 | 5,8 | 5,75 | -0,1 |



| %HbF | | MÉDIA (IEX-HPLC + RP-HPLC)/2 (UNIDADES) | (IEX-HPLC - RP-HPLC) (UNIDADES) |
|----------|---------|---|---------------------------------|
| IEX-HPLC | RP-HPLC | | |
| 7,1 | 5,5 | 6,3 | 1,6 |
| 11,3 | 11,9 | 11,6 | -0,6 |
| 12,6 | 11,1 | 11,85 | 1,5 |
| 1,4 | 1,8 | 1,6 | -0,4 |
| 7,7 | 6,8 | 7,25 | 0,9 |
| 8,1 | 7,2 | 7,65 | 0,9 |
| 2,6 | 2,4 | 2,5 | 0,2 |
| 9,8 | 8,2 | 9 | 1,6 |
| 1,5 | 1,5 | 1,5 | 0 |
| 8,3 | 8,3 | 8,3 | 0 |
| 3,3 | 3,2 | 3,25 | 0,1 |
| 7,2 | 6,2 | 6,7 | 1 |
| 6 | 5,6 | 5,8 | 0,4 |
| 8,8 | 8,4 | 8,6 | 0,4 |
| 11 | 9,8 | 10,4 | 1,2 |
| 12,5 | 11,3 | 11,9 | 1,2 |
| 7,5 | 7,4 | 7,45 | 0,1 |
| 2,8 | 3,8 | 3,3 | -1 |
| 6,8 | 5,7 | 6,25 | 1,1 |
| 1,6 | 1,2 | 1,4 | 0,4 |
| 2 | 1,8 | 1,9 | 0,2 |
| 4 | 3,4 | 3,7 | 0,6 |
| 12,6 | 10,9 | 11,75 | 1,7 |
| 8,1 | 8,4 | 8,25 | -0,3 |
| 1,2 | 1,2 | 1,2 | 0 |
| 1,5 | 1,9 | 1,7 | -0,4 |
| 5,6 | 4 | 4,8 | 1,6 |
| 4,3 | 4 | 4,15 | 0,3 |
| 1,3 | 1,9 | 1,6 | -0,6 |
| 1,1 | 1,2 | 1,15 | -0,1 |
| 2,3 | 1,9 | 2,1 | 0,4 |
| 3 | 3,2 | 3,1 | -0,2 |
| 12,2 | 11,7 | 11,95 | 0,5 |
| 5,4 | 4,9 | 5,15 | 0,5 |
| 4,2 | 3 | 3,6 | 1,2 |
| 2,3 | 2,5 | 2,4 | -0,2 |
| 5,5 | 5,2 | 5,35 | 0,3 |
| 3,7 | 4,2 | 3,95 | -0,5 |
| 5,9 | 5,2 | 5,55 | 0,7 |
| 6 | 5,1 | 5,55 | 0,9 |
| 12,1 | 10,2 | 11,15 | 1,9 |
| 6,7 | 4,7 | 5,7 | 2 |



| %HbF | | MÉDIA (IEX-HPLC + RP-HPLC)/2 (UNIDADES) | (IEX-HPLC - RP-HPLC) (UNIDADES) |
|----------|---------|---|---------------------------------|
| IEX-HPLC | RP-HPLC | | |
| 1,1 | 0,9 | 1 | 0,2 |
| 1,1 | 1,4 | 1,25 | -0,3 |
| 10,3 | 10,5 | 10,4 | -0,2 |
| 7,1 | 6,9 | 7 | 0,2 |
| 3,1 | 3,5 | 3,3 | -0,4 |
| 10,2 | 9,6 | 9,9 | 0,6 |
| 7,1 | 6,6 | 6,85 | 0,5 |
| 3,4 | 2,9 | 3,15 | 0,5 |
| 2,3 | 1,8 | 2,05 | 0,5 |
| 3,9 | 3,2 | 3,55 | 0,7 |
| 4,2 | 4,6 | 4,4 | -0,4 |
| 1,5 | 1,9 | 1,7 | -0,4 |
| 10,4 | 9,9 | 10,15 | 0,5 |
| 6,7 | 6 | 6,35 | 0,7 |
| 5,8 | 6,4 | 6,1 | -0,6 |
| 13,7 | 12,9 | 13,3 | 0,8 |
| 4,7 | 4,3 | 4,5 | 0,4 |
| 5,2 | 4,2 | 4,7 | 1 |
| 4,1 | 3,4 | 3,75 | 0,7 |
| 4,1 | 4 | 4,05 | 0,1 |
| 1 | 1,6 | 1,3 | -0,6 |
| 5,2 | 3,9 | 4,55 | 1,3 |
| 3,4 | 3 | 3,2 | 0,4 |
| 10,8 | 9,3 | 10,05 | 1,5 |
| 4,1 | 3,6 | 3,85 | 0,5 |
| 3,7 | 3,5 | 3,6 | 0,2 |
| 6,6 | 4,7 | 5,65 | 1,9 |
| 13,8 | 12 | 12,9 | 1,8 |
| 0,7 | 1 | 0,85 | -0,3 |
| 6,8 | 6,4 | 6,6 | 0,4 |
| 1,7 | 2,3 | 2 | -0,6 |
| 4,4 | 4 | 4,2 | 0,4 |
| 3,1 | 2,9 | 3 | 0,2 |
| 1,7 | 2,4 | 2,05 | -0,7 |
| 1,5 | 1,5 | 1,5 | 0 |
| 4,3 | 4,3 | 4,3 | 0 |
| 8,2 | 8,5 | 8,35 | -0,3 |
| 4,9 | 5,4 | 5,15 | -0,5 |
| 11,3 | 10,3 | 10,8 | 1 |
| 1,5 | 1,4 | 1,45 | 0,1 |
| 4,3 | 3,8 | 4,05 | 0,5 |
| 4,4 | 5,2 | 4,8 | -0,8 |



| | %HbF | | MÉDIA (IEX-HPLC + RP-HPLC)/2 (UNIDADES) | (IEX-HPLC - RP-HPLC) (UNIDADES) |
|----------------------|----------|---------|---|---------------------------------|
| | IEX-HPLC | RP-HPLC | | |
| | 5,2 | 6,5 | 5,85 | -1,3 |
| | 3,9 | 3,5 | 3,7 | 0,4 |
| | 4,9 | 5 | 4,95 | -0,1 |
| | 6,9 | 6,2 | 6,55 | 0,7 |
| | 2,2 | 2,5 | 2,35 | -0,3 |
| | 3,5 | 4,2 | 3,85 | -0,7 |
| | 6 | 6,8 | 6,4 | -0,8 |
| | 1 | 1,6 | 1,3 | -0,6 |
| | 0,8 | 0,9 | 0,85 | -0,1 |
| | 1,7 | 2 | 1,85 | -0,3 |
| | 7,5 | 8,5 | 8 | -1 |
| | 10 | 9,1 | 9,55 | 0,9 |
| | 2 | 2,2 | 2,1 | -0,2 |
| | 3 | 2,6 | 2,8 | 0,4 |
| | 14,5 | 14,1 | 14,3 | 0,4 |
| | 2,5 | 2,8 | 2,65 | -0,3 |
| | 5,9 | 5,4 | 5,65 | 0,5 |
| | 12,4 | 11,3 | 11,85 | 1,1 |
| | 3,6 | 2,9 | 3,25 | 0,7 |
| | 9 | 8,5 | 8,75 | 0,5 |
| | 8 | 8 | 8 | 0 |
| | 2,8 | 2,4 | 2,6 | 0,4 |
| | 4,3 | 3,1 | 3,7 | 1,2 |
| | 3,9 | 3,9 | 3,9 | 0 |
| | 23,6 | 23,8 | 23,7 | -0,2 |
| | 1,6 | 2,1 | 1,85 | -0,5 |
| | 4,8 | 5,5 | 5,15 | -0,7 |
| | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | 8,3 | 7 | 7,65 | 1,3 |
| | 4,6 | 4,9 | 4,75 | -0,3 |
| | 3,5 | 2,8 | 3,15 | 0,7 |
| | 4,1 | 3,5 | 3,8 | 0,6 |
| Média | | | | 0,3 |
| Desvio padrão | | | | 0,680282 |