



THALES ALLYRIO ARAÚJO DE MEDEIROS FERNANDES

**FATORES ASSOCIADOS À VARIABILIDADE CLÍNICA DE PACIENTES
COM DOENÇAS FALCIFORMES PROVENIENTES DO ESTADO DO
RIO GRANDE DO NORTE**

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

THALES ALLYRIO ARAÚJO DE MEDEIROS FERNANDES

**FATORES ASSOCIADOS À VARIABILIDADE CLÍNICA DE PACIENTES
COM DOENÇAS FALCIFORMES PROVENIENTES DO ESTADO DO
RIO GRANDE DO NORTE**

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas, na área de concentração em Ciências Biomédicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELO ALUNO THALES ALLYRIO
ARAÚJO DE MEDEIROS FERNANDES E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA SONATI.

Profa Dra Maria de Fátima Sonati

Campinas

2014

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

F391f Fernandes, Thales Allyrio Araújo de Medeiros, 1980-
Fatores associados à variabilidade clínica de pacientes com doenças
falciformes provenientes do estado do Rio Grande do Norte / Thales Allyrio Araújo
de Medeiros Fernandes. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria de Fátima Sonati.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Anemia falciforme. 2. Gravidade do paciente. 3. Talassemia alfa. 4.
Haplótipos. 5. Haptoglobinas. I. Sonati, Maria de Fátima, 1958-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Factors associated with clinical variability of patients with sickle cell disease of Rio Grande do Norte state

Palavras-chave em inglês:

Anemia, Sickle cell

Patient acuity

Alpha-thalassemia

Haplotypes

Haptoglobin

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Maria de Fátima Sonati [Orientador]

Marcos André Cavalcanti Bezerra

Maria Stella Figueiredo

Erich Vinicius de Paula

Kleber Yotsumoto Fertrin

Data de defesa: 20-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

THALES ALLYRIO ARAÚJO DE MEDEIROS FERNANDES

Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARIA DE FATIMA SONATI

MEMBROS:

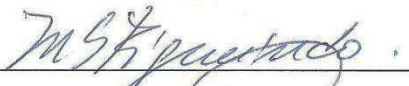
1. PROF(A). DR(A). MARIA DE FATIMA SONATI



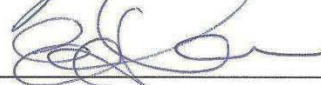
2. PROF(A). DR(A). MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI BEZERRA



3. PROF(A). DR(A). MARIA STELLA FIGUEIREDO



4. PROF(A). DR(A). ERICH VINICIUS DE PAULA



5. PROF(A). DR(A). KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 20 de agosto de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, Raimundo e Fátima, que dedicaram suas vidas aos filhos, ensinando-nos o verdadeiro significado da palavra amar;

À minha esposa, Christiane, e ao meu filho, Emmanuel (ainda no ventre da mãe), pelo amor, amizade, tolerância e apoio incondicional, e por me fazer sentir as graças e bênçãos de ser Pai;

À todos os pacientes e familiares analisados neste estudo, pelos seus exemplos de luta, coragem, determinação e vontade de viver.

“Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência; ainda que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tivesse a caridade, eu não seria nada” (1Cor 13, 2)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por todas os ensinamentos, graças, bênçãos, inspirações e milagres que tem feito durante toda a minha vida, especialmente durante este período de transição, desafios e mudanças pelo qual passei nos últimos quatro anos;

À minha esposa, Christiane, por toda a amizade, amor, paciência, tolerância, cumplicidade, apoio sentimental, técnico e científico. E, acima de tudo, por me conceder a grande graça de ser Pai até o final do ano;

Aos meus Pais, Raimundo e Fátima, que já se encontram na morada celestial, pelo amor incondicional, conforto, saúde, lazer, educação e formação moral, cidadã e cristã que proporcionaram a toda a nossa família - Muito obrigado, Painho e Mainha!

À Profa Tereza Maria Dantas de Medeiros, por todas as orientações, ensinamentos, apoio técnico, científico e logístico para a execução do trabalho e elaboração da tese;

À Profa Dra Maria de Fátima Sonati, pelas orientações e confiança depositada para a realização deste trabalho;

Aos meus irmãos, sobrinhos, avó, tios, primos, demais familiares e amigos, por todo apoio, amor, amizade e por terem suportado e tolerado todas as minhas ausências e estresses durante esta fase da minha vida;

À direção e equipe profissional do Hemocentro Dalton Cunha, em especial aos amigos do Laboratório de Análises Clínicas, por permitirem e facilitarem o acesso aos pacientes do estudo, além de todo o apoio técnico para a realização de algumas das análises laboratoriais do estudo;

À direção e equipe profissional do Hospital Infantil Varela Santiago, Centro de Oncologia e Hematologia de Mossoró e Casa de Apoio a Criança com Câncer de Mossoró e Região, por permitirem e facilitarem o acesso aos pacientes do estudo;

À farmacêutica Jayra Juliana e ao biomédico Arthur Noronha, por todo o apoio para a realização das análises laboratoriais do trabalho e pela amizade;

Aos farmacêuticos Diogo e Juliana Lopes, e toda a equipe do Laboratório Tércio Rosado, pelo apoio técnico na realização das análises bioquímicas dos pacientes do estudo;

Às professoras Tereza Dantas, Ivanise Rebecchi, Adriana Rezende, Vivian Silbiger, José Veríssimo Fernandes e Josélio Maria Galvão de Araújo, por “abrirem as portas” dos seus

laboratórios e fornecerem toda a estrutura necessária para a realização das análises laboratoriais da pesquisa;

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico Molecular em Hematologia, pelos momentos de descontração e discussões técnicas e científicas;

Às biologistas Elza Kimura e Denise Madureira, pelo apoio técnico na realização das análises laboratoriais;

Aos amigos Magnun, Daniela, Tânia e Susan, por toda a amizade e auxílio na execução das atividades previstas durante todo esse período do doutorado;

À Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, pelo auxílio financeiro e concessão da liberação integral das minhas obrigações docentes durante este tempo;

A todos os pacientes com doença falciforme e responsáveis pelos mesmos, por aceitarem participar do estudo e permitirem o acesso aos seus prontuários nas instituições aonde são acompanhados;

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e contribuíram para o meu crescimento pessoal, profissional, cidadão e cristão.

RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxv
1. INTRODUÇÃO	27
1.1. Hemoglobina – Estrutura, organização gênica e ontogenia	29
1.2. Hemoglobinopatias – Classificação e Epidemiologia	31
1.3. Doenças falciformes	32
1.3.1. Patogenia molecular	32
1.3.2. Fisiopatologia.....	35
1.3.3. Características clínicas	40
1.3.4. Heterogeneidade fenotípica das doenças falciformes	53
1.3.5. Moduladores genéticos da evolução clínica da doença falciforme.....	54
2. OBJETIVOS	61
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	65
4. RESULTADOS	81
5. DISCUSSÃO	115
6. CONCLUSÕES	133
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
8. ANEXO	159
9. APÊNDICES	163

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Diferentes genótipos das doenças falciformes e gravidade clínica correspondente .	37
Quadro 2 – Sequência dos iniciadores utilizados na PCR para a confirmação molecular do genótipo da doença falciforme	70
Quadro 3 – Sequência dos iniciadores utilizados na PCR para a investigação da talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3.7}$)	72
Quadro 4 – Sequência dos iniciadores utilizados na PCR para a investigação das sequências polimórficas no cluster β e determinação dos haplótipos β^S e β^{tal}	75
Quadro 5 – Composição das PCRs para a investigação das sequências polimórficas no cluster β e determinação dos haplótipos β^S e β^{tal}	76
Quadro 6 – Condições utilizadas na PCR para a investigação das sequências polimórficas no cluster β e determinação dos haplótipos β^S e β^{tal}	76
Quadro 7 – Composição das reações de digestão do produto de PCR para a investigação das sequências polimórficas no cluster β e determinação dos haplótipos β^S e β^{tal}	77
Quadro 8 – Tamanho dos produtos amplificados e dos fragmentos gerados após a clivagem com as enzimas de restrição apropriadas	77
Quadro 9 – Sequência e combinações dos iniciadores necessários para a genotipagem da haptoglobina por meio de PCR alelo-específica	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas dos pacientes com doenças falciformes analisados neste estudo	84
Tabela 2 - Características socioeconômicas dos pacientes com doenças falciformes analisados neste estudo	86
Tabela 3 - Principais dificuldades relatadas pelos pacientes para a realização do tratamento recomendado.....	88
Tabela 4 - Utilização de medidas preventivas contra complicações clínicas ao longo da vida, de acordo com a faixa etária	89
Tabela 5 - Frequência dos genótipos e alelos da talassemia alfa, de acordo com o genótipo da doença falciforme	91
Tabela 6 - Frequência dos genótipos e alelos da haptoglobina, de acordo com o genótipo da doença falciforme	91
Tabela 7 - Distribuição dos genótipos dos haplótipos β^S e β^{tal} (pacientes S-talassemia β) no grupo de indivíduos analisados	93
Tabela 8 - Principais complicações clínicas apresentadas ao longo da vida pelos pacientes com doenças falciformes analisados no estudo.....	94
Tabela 9 - Principais complicações clínicas apresentadas pelos pacientes com doenças falciformes, de acordo com a faixa etária	96
Tabela 10 - Principais complicações clínicas apresentadas pelos pacientes com doenças falciformes, de acordo com o genótipo da doença falciforme	98
Tabela 11 - Associação da talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3.7}$) com a ocorrência de complicações clínicas nos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo	101
Tabela 12 - Associação dos genótipos da haptoglobina com a ocorrência de complicações clínicas nos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo	104

Tabela 13 - Associação dos haplótipos β^S com a ocorrência de complicações clínicas nos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo	107
Tabela 14 – Distribuição dos genótipos da talassemia (deleção $-\alpha^{3.7}$), haptoglobina e haplótipos β^S de acordo com a faixa etária dos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo	110
Tabela 15 - Distribuição dos valores medianos dos parâmetros laboratoriais analisados, de acordo com o genótipo da doença falciforme.....	111
Tabela 16 - Distribuição dos valores medianos dos parâmetros laboratoriais analisados para os pacientes HbSS, de acordo com o genótipo da talassemia α (deleção $-\alpha^{3.7}$)	112
Tabela 17 - Distribuição dos valores medianos dos parâmetros laboratoriais analisados para os pacientes HbSS, de acordo com o haplótipo β^S	113
Tabela 18 - Distribuição dos valores medianos dos parâmetros laboratoriais analisados para os pacientes HbSS, de acordo com o genótipo da haptoglobina.....	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da molécula de Hb.....	29
Figura 2 - Variação temporal na produção das cadeias globínicas.....	31
Figura 3 - Patogenia molecular das doenças falciformes.....	33
Figura 4 – Fisiopatologia das doenças falciformes.....	41
Figura 5 - Estrutura polimérica da haptoglobina nos indivíduos com os diferentes genótipos Hp.....	58
Figura 6 - Representação esquemática do cluster da globina β mostrando os sítios polimórficos analisados para a determinação do haplótipo β^S	74
Figura 7 - Representação esquemática do cluster da globina β mostrando os sítios polimórficos analisados para a determinação do haplótipo β^{tal}	74
Figura 8 - Distribuição espacial dos pacientes com doença falciforme provenientes do estado do Rio Grande do Norte incluídos neste estudo	85
Figura 9 - Distribuição da idade de diagnóstico da doença falciforme, de acordo com a faixa etária.....	87
Figura 10 - Distribuição dos haplótipos β^S no grupo de pacientes analisados, de acordo com o genótipo para a doença falciforme.....	92
Figura 11 - Distribuição dos haplótipos β^{tal} no grupo de pacientes HbS-tal β analisados	92
Figura 12 – Variação na incidência das principais complicações clínicas apresentadas pelos pacientes com doenças falciforme entre as diferentes faixas etárias	97

LISTA DE ABREVIATURAS

AST – Aspartato transaminase
AVE – Acidente vascular encefálico
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média
DTC – Ultrasonografia Doppler Transcraniana
eNOS – Óxido nítrico sintetase endotelial
GH – Hormônio de crescimento
GMPc – Guanosina monofosfato cíclica
Hb – Hemoglobina
HCM – Hemoglobina corpuscular média
HDL – Lipoproteína de alta densidade
Hp – Haptoglobina
HbF – Hemoglobina fetal
ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular – 1
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL – 6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
ISC – Células falcizadas irreversivelmente
LDH – Lactado desidrogenase
NHLBI - Instituto Nacional do Sangue, Pulmão e Coração dos Estados Unidos
NO – Óxido nítrico
Kd – Kilodáltons
iNKT – Células T “Natural Killer” invariáveis
PAFr – Receptor do fator ativador de plaquetas
PDE5 – Fosfodiesterase 5
PHHF – Persistência hereditária da hemoglobina fetal
PIGF – Fator de crescimento placentário

PM – Peso molecular

PS - Fosfatidilserina

RDW – Índice de anisocitose

RN – Rio Grande do Norte

STA – Síndrome torácica aguda

Tal- α - Talassemia alfa

Tal- β - Talassemia beta

TF – Fator tissular

VCAM-1 – Molécula de adesão da célula vascular - 1

VCM – Volume corpuscular médio

As doenças falciformes apresentam uma heterogeneidade fenotípica substancial e vários fatores, tanto genéticos quanto ambientais, contribuem para esta variabilidade. A co-herança com a talassemia α e os haplótipos β^S são considerados importantes moduladores genéticos da doença, mas outros fatores hereditários podem também influenciar os perfis clínicos e laboratoriais dos pacientes. Estudos têm sugerido que os genótipos da haptoglobina (Hp) poderiam estar entre esses fatores. Assim, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da presença da talassemia α , dos haplótipos β^S e dos genótipos da haptoglobina na evolução clínica e nas características laboratoriais de pacientes com doença falciforme provenientes do estado do Rio Grande do Norte (RN). Foram analisados 155 indivíduos não aparentados (82 homens e 73 mulheres), com idades variando de 7 meses a 48 anos (mediana de 12 anos), atendidos nos centros de referência para o tratamento de doenças hematológicas para acompanhamento ambulatorial. Todos os pacientes, ou seus responsáveis, foram informados a respeito dos objetivos e procedimentos da pesquisa, e responderam a um questionário padronizado. Ao final, coletaram-se alíquotas de sangue periférico para a realização das análises hematológicas, bioquímicas e moleculares. Posteriormente, foram examinados os prontuários médicos arquivados nestes centros, de onde foram obtidas as informações relativas à evolução clínica. Predominaram os indivíduos com idades inferiores a 15 anos, que se autodeclararam mulatos, que moravam em pequenas cidades relativamente distantes dos centros de referência e que possuíam baixo nível educacional e socioeconômico. Os pacientes com idades inferiores a 10 anos foram diagnosticados com a doença mais precocemente. Quase 50% dos indivíduos analisados faziam uso de hidroxiureia, 91,4% relatou ter recebido vacinação pneumocócica/meningocócica e 76,1% já tinha feito uso profilático de penicilina alguma vez na vida. A co-herança com a talassemia alfa foi encontrada em 11,6% dos pacientes e não mostrou associação significativa com nenhuma das complicações clínicas avaliadas. No entanto, os pacientes α -talassêmicos apresentaram maiores níveis de hemácias ($p=0,001$) e hematócrito ($p=0,015$), e menores valores de hemoglobina corpuscular média (HCM) ($p=0,001$). O haplótipo β^S mais frequente foi o CAR (77,5%), seguido do Benin (11,9%) e Camarões (5,5%). A homozigose do haplótipo CAR esteve associada à maior incidência de retardo no crescimento ($p=0,037$), enquanto as demais combinações de haplótipos

apresentaram valores significativamente maiores de hemoglobina ($p=0,021$) e hemácias ($p=0,029$). A distribuição dos genótipos da haptoglobina estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos considerados e o tipo predominante foi o Hp2-1 (47,7%). As frequências dos alelos HP*1 (0,503) e HP*2 (0,497) foram muito semelhantes. A herança do alelo HP*2 se correlacionou significativamente com a necessidade de implementação da terapia transfusional crônica ao longo da vida ($p=0,033$) e a níveis mais elevados de ferritina ($p=0,018$). Já os homozigotos do alelo HP*1 (18 pacientes) apresentaram níveis mais elevados de LDH ($p=0,001$) e AST (0,016), que deixaram de ser significativos quando se incluiu na análise os indivíduos que faziam uso da hidroxiureia (10 pacientes). Nossos resultados sugerem que os fatores genéticos aqui avaliados influenciaram em algum grau a evolução clínica e/ou os perfis laboratoriais dos pacientes desta amostra populacional. A ausência de associação significativa com as demais complicações aqui investigadas reflete a natureza multifatorial da doença e a necessidade de ampliação do tamanho amostral em estudo.

ABSTRACT

Sickle cell disease presents a significant phenotypic heterogeneity, and both genetic and acquired factors contribute to this variability. Co-inheritance of alpha-thalassemia and β^S haplotypes are the major genetic modifiers of the disease, but others inherited features can influence the clinical and laboratorial profile of the patients. Reports have suggested that haptoglobin genotypes could be one. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of alpha thalassemia, β^S haplotypes and genotypes of haptoglobin in the clinical outcome and laboratorial characteristics of patients with sickle cell disease of Rio Grande do Norte State (RN). We analyzed 155 non-related individuals (82 men and 73 women) with sickle cell disease, ages ranging from 7 months to 48 years (median age 12 years), who went to referral centers for outpatient visits. All the patients, or their caregivers, were informed about the research procedures and objectives, and answered a standardized questionnaire. After this, we collected blood samples for hematological, biochemical, and molecular analyses. Additionally, clinical data were obtained from the patients' medical records archived in these referral centers. The patients were predominantly younger than 15 years old, self-declared as mulatto, lived in small cities relatively distant from the referral center, and had a low education and socio-economic level. Individuals who were 10 or younger were diagnosed at an earlier age. Almost 50% of the patients were taking hydroxyurea, 91.4% reported having received pneumococcal/meningococcal vaccination and 76.1% have ever done prophylactic use of penicillin. The co-inheritance of alpha thalassemia was found in 11.6% of patients and presented no significant association with any clinical complication of sickle cell disease. However, patients with this genetic feature had higher red blood cell (RBC) counts ($p=0.001$) and packet cell volume (PCV) ($p=0.015$), and lower values of mean corpuscular hemoglobin (MCH) ($p=0.001$). The β^S haplotype more frequent were CAR (77.5%), followed by Benin (11.9%) and Cameroon (5.5%). The homozygous CAR/CAR haplotype was associated with higher incidence of stunted growth ($p=0.037$), while the other haplotype presented higher hemoglobin ($p=0.021$) and RBC ($p=0.029$). The distribution of haptoglobin genotype were in Hardy-Weinberg equilibrium in all the groups, and the predominant type was Hp2-1 (47.7%). The frequencies of HP*1 (0.503) and HP*2 (0.497) alleles were similar. The inheritance of HP*2 allele was significantly correlated to the requirement of chronic transfusion therapy

(0.033) and higher levels of ferritin (0.018). On the other hand, the Hp1-1 patients (18 individuals) had higher levels of LDH (0.001) and AST (0.016), that were not significant when we included in the analysis the individuals who were using hydroxyurea (10 individuals). Our results suggest that the genetic characteristics evaluated in this study influenced in a certain extent the clinical outcome and/or laboratorial profile of patients with sickle cell disease from RN. The absence of significant association with the others clinical complications reflect the multifactorial nature of these events and the need to increase the analyzed sample size.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Hemoglobina – Estrutura, organização gênica e ontogenia

A hemoglobina (Hb) é a principal proteína intracelular das hemácias e a responsável direta pelo transporte eficiente de oxigênio no interior da célula (Kim-Shapiro, 2009; Thom et al., 2013). Apresenta uma estrutura globular tetramérica composta por duas subunidades polipeptídicas (ou cadeias globínicas) do tipo α (α ou ζ) e duas do tipo β (ϵ , γ , δ e β), que devem ser produzidas em quantidades semelhantes (Perutz, 2001; Forget e Bunn, 2013).

As globinas do tipo α se heterodimerizam com as do tipo β e esses dímeros se pareiam para formar a unidade tetramérica funcional da hemoglobina (Schechter, 2008) (Figura 1). Cada uma destas cadeias globínicas se apresenta ligada a um grupamento prostético heme, contendo um átomo de ferro central no seu estado reduzido (Fe^{2+}) que se liga de forma reversível à molécula de O_2 e permite o seu transporte dos pulmões aos tecidos (Perutz, 2001; Schechter, 2008).

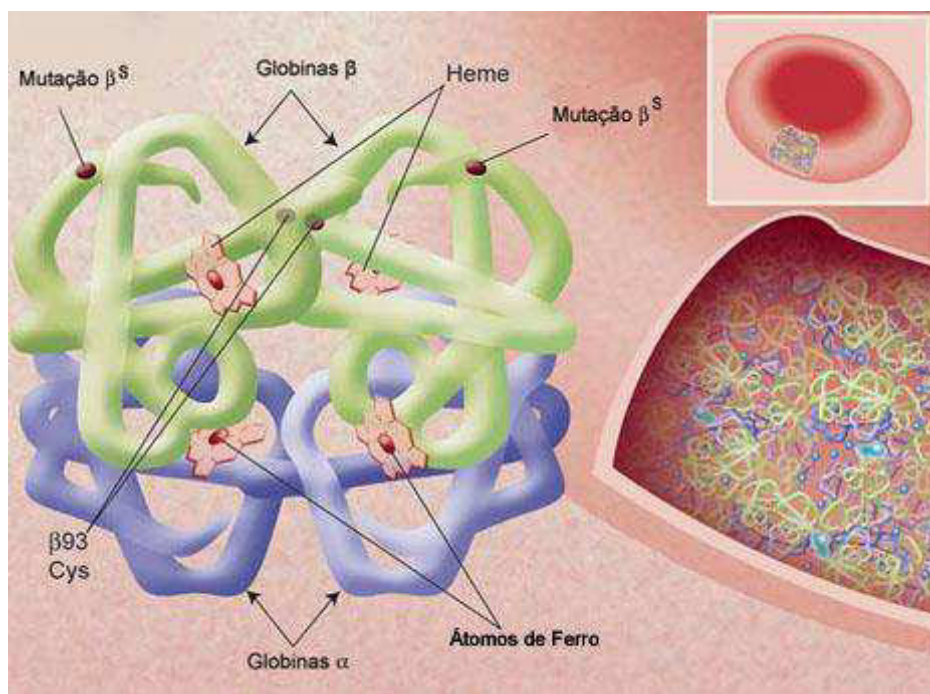


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da molécula de Hb.

(Fonte: Schechter, 2008)

Os resíduos de aminoácidos externos das cadeias globínicas são polares, conferindo solubilidade e prevenindo interações intermoleculares, ao passo que os internos são apolares, criando um ambiente no qual o O₂ pode ser ligado sem que a oxidação do heme ocorra. Os tetrâmeros individuais dentro de uma hemácia não interagem um com os outros, e as hemácias são capazes de sofrer deformação, o que permite que elas atravessem a circulação e carreguem o O₂ para todos os tecidos do corpo (Sonati e Costa, 2008).

Os genes que codificam as globinas do tipo α e do tipo β se encontram localizados em agrupamentos gênicos (“clusters”) distintos, presentes nos cromossomos 16 (16p13.3) e 11 (11p15.4), respectivamente (Forget e Hardison, 2009). Ao longo do desenvolvimento é observada uma mudança temporal da síntese das cadeias globínicas, acompanhada pela alteração no local principal da eritropoese (Weatherall, 2001; Nussbaum et al. 2008) (Figura 2).

Na fase inicial do período embrionário, esta síntese é restrita aos eritroblastos do saco vitelino e resultam na produção das hemoglobinas embrionária Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Após a sexta semana de gestação, o fígado fetal passa a ser o principal responsável pela síntese das hemoglobinas, produzindo, especialmente, a mais importante Hb da vida intra-uterina, a Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$), que predomina nos últimos dois trimestres da gestação (Schechter, 2008).

A partir da 30ª semana da gestação, ocorre um aumento gradativo da síntese da Hb A ($\alpha_2\beta_2$), que começa a substituir a Hb F. Ainda antes do nascimento, a medula óssea inicia a síntese da Hb A2 ($\alpha_2\delta_2$), a segunda mais importante Hb do indivíduo adulto normal. Ao nascimento, as Hb F e Hb A representam, respectivamente, cerca de 80 e 20% de toda a hemoglobina do eritrócito, e a partir dos seis meses de vida o indivíduo já possui as mesmas hemoglobinas da vida adulta, sendo Hb A em torno de 95%, Hb A2 até 3,5% e Hb F até 2% (Clarke e Higgins, 2000; Steinberg et al., 2005). Esses baixos níveis de HbF estão distribuídos de maneira heterogênea entre as hemácias, e no adulto estão restritas a algumas células, as chamadas células F (Steinberg e Nagel, 2009).

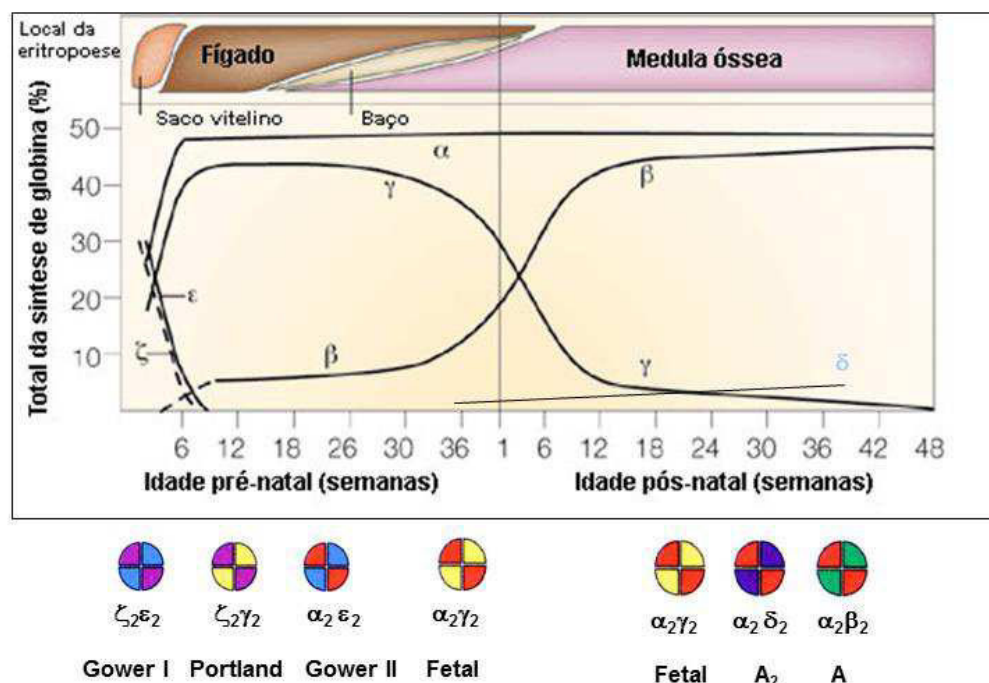


Figura 2 – Variação temporal na produção das cadeias globínicas

(Fonte: Weatherall et al., 2001, adaptado)

1.2 – Hemoglobinopatias – Classificação e Epidemiologia

As hemoglobinopatias consistem um grupo de doenças hereditárias autossômicas, na maioria das vezes recessivas, caracterizadas pela produção de hemoglobinas estruturalmente anormais (hemoglobinas variantes) ou pelo desequilíbrio no ritmo de síntese das cadeias globínicas que constituem a hemoglobina (talassemias); com menor frequência, ambos os fenótipos podem estar associados (presença concomitante de hemoglobina variante e talassemia) ou são observados problemas nas mudanças temporais de síntese destas cadeias (persistência hereditária da hemoglobina fetal) (Sonati e Costa, 2008; Forget e Bunn, 2013).

Constituem-se as doenças monogênicas mais frequentes em todo o mundo e representam um importante problema de saúde pública, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Weatherall, 2008; Williams e Weatherall, 2012). Estima-se que pelo menos 5,2% da população mundial sejam portadores de alelos para alguma hemoglobinopatia clinicamente importante, e que, anualmente, mais que 9 milhões

de mulheres com alelos para hemoglobinopatias se tornam grávidas, sendo registrados em torno de 332.000 concepções ou nascimentos de indivíduos afetados por desordens da hemoglobina. Estudos apontam ainda que essas patologias são responsáveis por cerca de 3,4% da mortalidade em crianças com idade até 5 anos, principalmente em países subdesenvolvidos (Modell e Darlison, 2008).

Do ponto de vista clínico e epidemiológico, as doenças falciformes representam os principais tipos de hemoglobinopatias. Estima-se o nascimento de 14.242.000 pessoas com anemia falciforme (genótipo mais comum entre as doenças falciformes) entre 2010 e 2050, com a grande maioria destes ocorrendo em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (Piel et al., 2013). Dados do Ministério da Saúde do Brasil estimam que o número de casos da doença no país seja entre 25.000 e 30.000 e que nasçam anualmente em torno de 3.500 crianças com anemia falciforme no Brasil (Cançado e Jesus, 2007).

Desde 2006 a Organização Mundial da Saúde reconheceu as doenças falciformes como um problema de saúde pública global (World Health Organization, 2006). Sem o estabelecimento do diagnóstico precoce e tratamento adequado, a maioria dos indivíduos afetados tende a morrer ainda nos primeiros anos de vida (Grosse et al., 2011). No entanto, as melhorias na infraestrutura, padrões nutricionais e políticas de saúde pública observadas durante os últimos anos nos países mais afetados pela doença, têm começado a promover reduções significativas na mortalidade infantil pela doença. Com isso, a demanda por serviços de diagnóstico e tratamentos médicos especializados, além da assistência psicossocial, começa a aumentar, elevando os custos para o sistema de saúde destas regiões, que geralmente apresentam recursos financeiros limitados para possibilitar a implantação efetivas destas medidas (Aygün e Odame, 2012; Piel et al., 2013).

1.3 – Doenças Falciformes

1.3.1 – Patogenia molecular

A alteração molecular responsável pelo desenvolvimento desta patologia é uma mutação de ponto no sexto códon do gene da β -globina (β^S - HBB; GAG>GTG; glu6val; rs334), que leva à substituição do ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia

polipeptídica, e a subsequente formação de uma hemoglobina anômala – a hemoglobina S (HbS - $\alpha_2\beta_2^S$) (Ingram, 1957; Steinberg, 2009b).

As moléculas de HbS apresentam uma maior propensão a se auto-oxidar e, quando desoxigenadas e em altas concentrações, são capazes de estabelecer interações intermoleculares hidrofóbicas que promovem a sua polimerização no interior da célula. Isto resulta em uma série de alterações morfológicas e funcionais dos eritrócitos, que encurtam a sobrevida destas células e levam à oclusão vascular (Sonati e Costa, 2008; Kim-Shapiro, 2009; Steinberg, 2009b) (Figura 3).

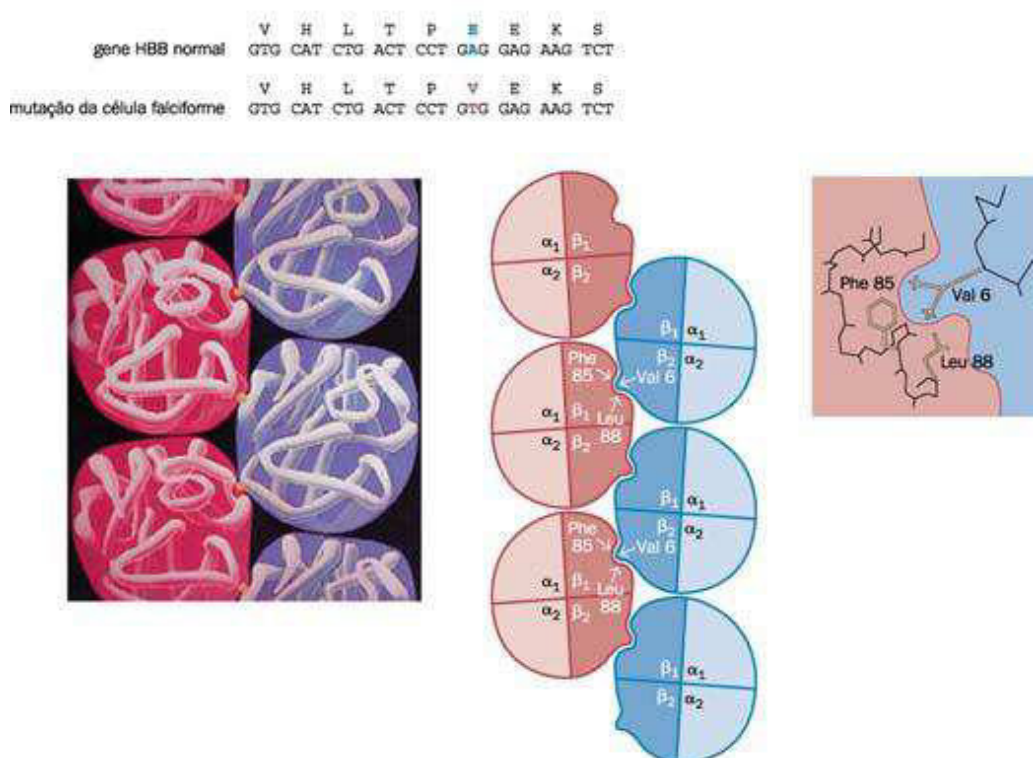


Figura 3 – Patogenia molecular das doenças falciformes

(Fonte: Strachan e Read, 2013)

No entanto, faz-se necessária a formação de núcleos críticos para que ocorra essa polimerização. Estes núcleos são compostos por aproximadamente 10 tetrâmeros, dependem da ocorrência de colisões entre os tetrâmeros de HbS e demoram um certo tempo

para se formar. A taxa e extensão da polimerização são proporcionais à concentração da proteína no interior da célula e ao tempo que ela permanece no seu estado desoxigenado, e pode ocorrer em muitos ou em poucos sítios de nucleação simultaneamente, conferindo às células afetadas os mais diversos formatos (Nagel e Platt, 2001; Rees et al., 2010).

Dentre as deformações que a hemácia pode sofrer, a mais conhecida é a que lhe confere uma forma alongada, rígida e com baixa deformabilidade, conhecida por “hemácia em foice” ou “falcizada”, característica que deu o nome à patologia (Herrick, 1910). Ela é reversível após as moléculas de HbS serem re-oxigenadas, de modo que os pacientes podem passar por ciclos repetidos de polimerização e despolimerização, que danificam a membrana da célula e dão origem às células irreversivelmente falcizadas (ISC) (Forget e Bunn, 2013).

A polimerização e menor estabilidade da HbS desempenham papéis centrais na fisiopatologia da doença. A maior tendência a auto-oxidação da HbS aumenta a produção de radicais livres, que sobrecarregam as defesas antioxidantes da hemácia e levam a danos nas proteínas e lipídios da membrana e do esqueleto submembranar da célula. Além disso, a HbS oxidada se precipita na face interna da membrana plasmática e altera dramaticamente a topologia e distribuição das suas proteínas, promovendo, por exemplo, a agregação da Band 3, que é reconhecida por anticorpos autólogos e estimula a remoção dos eritrócitos da corrente sanguínea (Kato e Gladwin, 2009).

A polimerização da HbS também altera arquitetura da membrana da hemácia. Além de modificar a morfologia da célula, a formação dos polímeros de HbS facilita o brotamento/liberação de vesículas celulares pobres em espectrina. Estas vesículas carregam consigo proteínas reguladoras do sistema complemento e, portanto, aumentam a susceptibilidade dos eritrócitos a hemólise intravascular mediada pelo complemento, e ao reconhecimento e remoção destas células por macrófagos (Gallagher e Joiner, 2009).

Somada a estas alterações na estrutura e disposição proteica, os danos oxidativos promovidos pela HbS e os seus ciclos repetidos de polimerização e despolimerização podem alterar a disposição dos fosfolipídios da membrana, com destaque para a maior exposição de fosfatidilserina (PS) na sua superfície externa da célula. Esta mudança na

topologia da PS facilita o reconhecimento da hemácia SS pelos macrófagos, além de ativar a via alternativa do complemento, aumentar a adesão dos eritócitos ao endotélio e amplificar o estado pró-coagulatório da doença falciforme (Gallagher e Joiner, 2009).

Observa-se ainda um aumento anormal na atividade do sistema de co-transporte do K-Cl e do canal de Gardos na membrana das hemácias. Estes canais iônicos são importantes para a manutenção da hidratação celular e vão atuar, primariamente, promovendo o efluxo de K^+ da célula, seguido pela água. A atividade anormalmente elevada destes sistemas resulta em desidratação celular, aumentando a concentração intracelular de HbS e favorecendo, assim, sua polimerização (Sonati e Costa, 2008; Joiner, 2008).

Portanto, as mudanças nas propriedades biofísicas da molécula de hemoglobina promovidas pela substituição de um único nucleotídeo no gene da globina β resultam em uma série de alterações morfológicas e funcionais dos eritrócitos, que encurtam a sobrevida destas células, levam à oclusão vascular e são responsáveis pela grande variedade de complicações clínicas que os pacientes com doenças falciformes podem apresentar.

1.3.2 – Fisiopatologia

O fenômeno da falcização depende primordialmente da presença da Hb S em uma concentração correspondente a no mínimo 50% de toda a hemoglobina da hemácia (Nagel e Platt, 2001). Assim, as doenças falciformes podem ser determinadas não apenas pela homozigose da mutação β^S (anemia falciforme – HbSS), mas também pela interação com outros alelos de hemoglobinas variantes ou da talassemia β (Steinberg et al., 2009). Já foram descritos mais de 15 genótipos diferentes causadores da doença falciforme, mas a anemia falciforme é a forma mais comum e grave da doença. Os outros principais tipos de doenças falciformes são a doença da hemoglobina SC (HbSC) e as várias formas de interação HbS-talassemia β ($S\beta^+$ ou $S\beta^0$) (Rees et al., 2010) (Quadro 1).

Além de promover alterações na morfologia, maior fragilidade e menor deformabilidade às hemácias, a polimerização da HbS e sua maior propensão a auto-oxidação conferem certas propriedades às células falcizadas que explicam, pelo menos

parcialmente, a grande variedade de complicações clínicas que os pacientes podem apresentar ao longo da vida (Nagel e Platt, 2001).

Entre as principais mudanças, destaca-se a maior propensão da hemácia a se aderir ao endotélio e a outras células sanguíneas (Kato et al., 2009). Inicialmente achava-se que a adesão preferencial de reticulócitos e hemácias SS de baixa densidade às vênulas pós-capilares levariam ao sequestro das ISC, mais densas e velhas, resultando na redução do fluxo sanguíneo. A obstrução pré-capilar pelas ISC também poderia contribuir para o processo vaso-oclusivo (Kaul et al., 2009). No entanto, estudos recentes mostraram que outros elementos sanguíneos também desempenham papéis importantes no processo vaso-oclusivo.

Tem sido mostrado que a interação das hemácias com as células endoteliais ativa a expressão de moléculas de adesão na superfície do endotélio, tais como E-selectina, P-selectinas, VCAM-1 e ICAM-1, que por sua vez recrutam e ativam neutrófilos e outros leucócitos circulantes, tais como monócitos e células iNKT (Manwani e Frenette, 2013). Estes leucócitos aderidos às células endoteliais também expressam uma maior quantidade de moléculas adesivas, que medeiam a captura de eritrócitos e levam a formação de agregados heterocelulares compostos de hemácias SS, leucócitos e possivelmente plaquetas. Todo esse processo promove um retardo no trânsito das células sanguíneas, diminuindo a tensão de oxigênio dos vasos e desencadeando a polimerização da HbS e o sequestro de mais células falcêmicas. Estabelece-se, então, um círculo vicioso repetitivo de ativação, adesão e sequestro celular que desempenha um papel fundamental na manutenção e propagação do processo vaso-oclusivo instalado (Conran et al., 2009; Hidalgo et al., 2009).

Observa-se, ainda, uma maior secreção de citocinas pró-inflamatórias e fator de crescimento placentário (PIGF) pelos leucócitos ativados e eritroblastos, que se encontram em maior quantidade em resposta ao quadro hemolítico crônico (Sonati e Costa, 2008; Lanaro et al., 2009). Somado a isso, as injúrias de isquemia-reperfusão, secundária às frequentes e contínuas oclusões microvasculares, levam a um quadro de estresse oxidativo que amplifica e retroalimenta o processo inflamatório, aumenta a ativação endotelial, adesão

de leucócitos e produção de citocinas, e cria um quadro inflamatório crônico que é exacerbado durante os episódios de crise (Rees et al., 2010).

Quadro 1 – Diferentes genótipos das doenças falciformes e gravidade clínica correspondente

Doença falciforme grave
HbS/S ($\beta^6\text{Glu}>\text{Val}/\beta^6\text{Glu}>\text{Val}$); Anemia falciforme
HbS/thalassemia β^0
HbS/thalassemia β^+ (presença de 1-5% HbA)
HbS/O Arab ($\beta^6\text{Glu}>\text{Val}/\beta^{121}\text{Glu}>\text{Lys}$)
HbS/D Punjab ($\beta^6\text{Glu}>\text{Val}/\beta^{121}\text{Glu}>\text{Gln}$)
HbS/C Harlem ($\beta^6\text{Glu}>\text{Val}/\beta^{73}\text{Asp}>\text{Asn}$)
HbC/S Antilhas ($\beta^6\text{Glu}>\text{Lys}/\beta^6\text{Glu}>\text{Val}$, $\beta^{23}\text{Val}>\text{Ile}$)
HbS/Quebec-CHORI ($\beta^6\text{Glu}>\text{Val}/\beta^{87}\text{Thr}>\text{Ile}$)
Doença falciforme moderada
HbS/C ($\beta^6\text{Glu}>\text{Val}/\beta^6\text{Glu}>\text{Lys}$)
HbS/thalassemia β^+ (presença de 6-15% HbA)
HbA/S Oman($\beta^A/\beta^6\text{Glu}>\text{Val}$, $\beta^{121}\text{Glu}>\text{Lys}$)
Doença falciforme leve
HbS/thalassemia β^{++} (presença de 16-30% HbA)
HbS/E ($\beta^6\text{Glu}>\text{Val}/\beta^{26}\text{Glu}>\text{Lys}$)
HbA/Jamaica Plain($\beta^A/\beta^6\text{Glu}>\text{Val}$, $\beta^{68}\text{Leu}>\text{Phe}$)
Doença falciforme muito leve
HbS/Persistência hereditária da hemoglobina fetal
HbS/ outras variantes de Hemoglobina

(Fonte: Rees et al., 2010, adaptado)

As lesões oxidativas e mecânicas na membrana e citoesqueleto das hemácias SS provocam, também, mudanças profundas na integridade e viabilidade das hemácias, levando a um quadro de hemólise crônica. Estima-se que a vida média das hemácias de um paciente com doença falciforme seja bem inferior a de um eritrócito normal (Franco et al., 2006; Quinn et al., 2013).

Aproximadamente 2/3 desta hemólise é extra-vascular, e ocorre através de mecanismos envolvendo a exposição de fosfatidilserina na superfície da célula e sequestro esplênico das hemácias. Além disso, a deposição da hemoglobina oxidada na membrana e a agregação proteica subsequente leva a exposição de um antígeno críptico da proteína band-3 na superfície da célula, que pode ser reconhecido por IgG autólogas específicas e desencadeia a fagocitose da hemácia por macrófagos do sistema retículo endotelial, uma consequência normal do envelhecimento das hemácias, e que é acelerada na doença falciforme (Villaescusa et al., 2013).

A hemólise intra-vascular, por sua vez, corresponde a 1/3 da hemólise na doença falciforme e está associada ao desenvolvimento das ISC e injúrias oxidativas nas proteínas e lipídios da membrana e citoesqueleto das hemácias. Estas células são rígidas e apresentam tendência de serem removidas da circulação por sequestro físico na microvasculatura, além de apresentarem fragilidade aumentada, o que as tornam mais sensíveis ao estresse mecânico e oxidativo da circulação sanguínea. A exposição aumentada de fosfatidilserina e outros lipídios aniônicos na superfície da hemácia induz, ainda, a ligação de proteínas do complemento e promove a destruição intravascular das células via sistema complemento (Kato e Gladwin, 2009).

Este processo hemolítico crônico lança no plasma hemoglobina livre, que promove uma diminuição significativa da concentração plasmática do óxido nítrico (NO) seja pela sua ligação direta a deoxi-hemoglobina ferrosa, seja pela deoxigenação da oxi-hemoglobina, gerando nitrato (NO_3^-) (Schaer DJ et al., 2013). A destruição das hemácias também libera a enzima arginase, que metaboliza a arginina em ornitina e reduz a quantidade do substrato requerido para a síntese do NO pelas células endoteliais (Kato e Taylor, 2010). Somado a isso, espécies reativas do oxigênio, geradas em altas taxas em

pacientes com anemia falciforme, também consomem o NO e contribuem para a redução da sua biodisponibilidade na doença falciforme (Steinberg et al., 2009).

O NO, além de promover vasodilatação e aumentar o fluxo sanguíneo regional, apresenta propriedades inibitórias da agregação plaquetária, além de reprimir a expressão e a atividade de moléculas de adesão endoteliais e leucocitárias. Portanto, a diminuição da sua biodisponibilidade contribui para o desenvolvimento de disfunção endotelial e processo vaso-oclusivo, e é responsável, pelo menos em parte, por uma série de complicações observadas nos pacientes falcêmicos (Kato et al., 2007).

Os pacientes com doenças falciformes ainda apresentam um aumento na ocorrência de eventos tromboembólicos e alterações no sistema hemostático, tanto em períodos sem crise, quanto durante os eventos agudos. As plaquetas destes indivíduos se encontram ativadas, em concentrações aumentadas e expressando maior quantidade de determinadas moléculas de adesão (Zago e Pinto, 2007). Desta forma, além de participar da formação de agregados heterocelulares, elas poderão levar a um estado de hipercoagulabilidade que desempenha um papel importante na obstrução vascular (Singer e Ataga, 2008).

Têm sido descritas, ainda, anormalidades (inibição) no sistema fibrinolítico, ativação contínua da cascata da coagulação e a redução dos níveis dos anticoagulantes fisiológicos, tais como das proteínas C e S e da anti-trombina III, denotando um estado constante de hipercoagulação na doença falciforme (Lim et al., 2013).

Dentre os fatores fisiopatológicos associados a estas alterações, destacam-se a exposição anormal de PS na membrana das hemácias, a produção de anticorpos anti-fosfolípidos contra a PS, a expressão aumentada de fator tissular (TF) nos monócitos e células endoteliais, e o aumento do número de micropartículas circulantes. A maioria destas micropartículas são originadas das hemácias e plaquetas, e também apresentam exposição anormal de PS e TF, sugerindo o seu papel no estado pro-trombótico destes indivíduos (Pakbaz e Wun, 2014).

A hemólise crônica também parece ter um papel crucial no desenvolvimento das alterações hemostáticas. Somado a seus efeitos na biodisponibilidade do NO, a hemoglobina livre pode induzir a expressão de fator tissular endotelial e inibir a proteólise do fator von Willebrand, levando ao acúmulo da sua forma ultra-grande na superfície do endotélio vascular (Pakbaz e Wun, 2014).

1.3.3 - Características Clínicas

Os pacientes com doenças falciformes podem apresentar uma série de manifestações clínicas e laboratoriais que, de modos gerais, são o resultado dos processos hemolíticos e vaso-oclusivos a que estão sendo constantemente expostos (Rees et al., 2010). Baseando-se nestas características, podemos distinguir dois subfenótipos da doença, embora haja uma íntima interrelação e cooperação entre os mecanismos fisiopatológicos que os originam: um fenótipo mais associado a hemólise e a disfunção endotelial, e outro caracterizado pela maior viscosidade do sangue e incidência de eventos vaso-oclusivos (Kato et al., 2007; Connes et al., 2014) (Figura 4).

Os indivíduos com o fenótipo hemolítico apresentam uma alta taxa de hemólise e maior incidência de determinadas complicações, tais como a hipertensão pulmonar, úlcera de perna, priapismo e doenças cerebrovasculares. O fenótipo vaso-oclusivo, por sua vez, apresenta menores índices de hemólise, um grau de anemia mais leve e maior propensão a eventos vaso-oclusivos, tais como crises agudas de dor, síndrome torácica aguda e osteonecrose (Kato, Gladwin e Steinberg, 2007).

Além destes eventos clínicos, os pacientes com doenças falciformes poderão apresentar uma série de outras complicações, tais como crises de sequestro esplênico e outras alterações no baço, infecções graves, retardo no desenvolvimento, alterações hepáticas, hepatobiliares, cardíacos, renais e oftalmológicos (Ballas et al., 2012b; Serjeant, 2013).

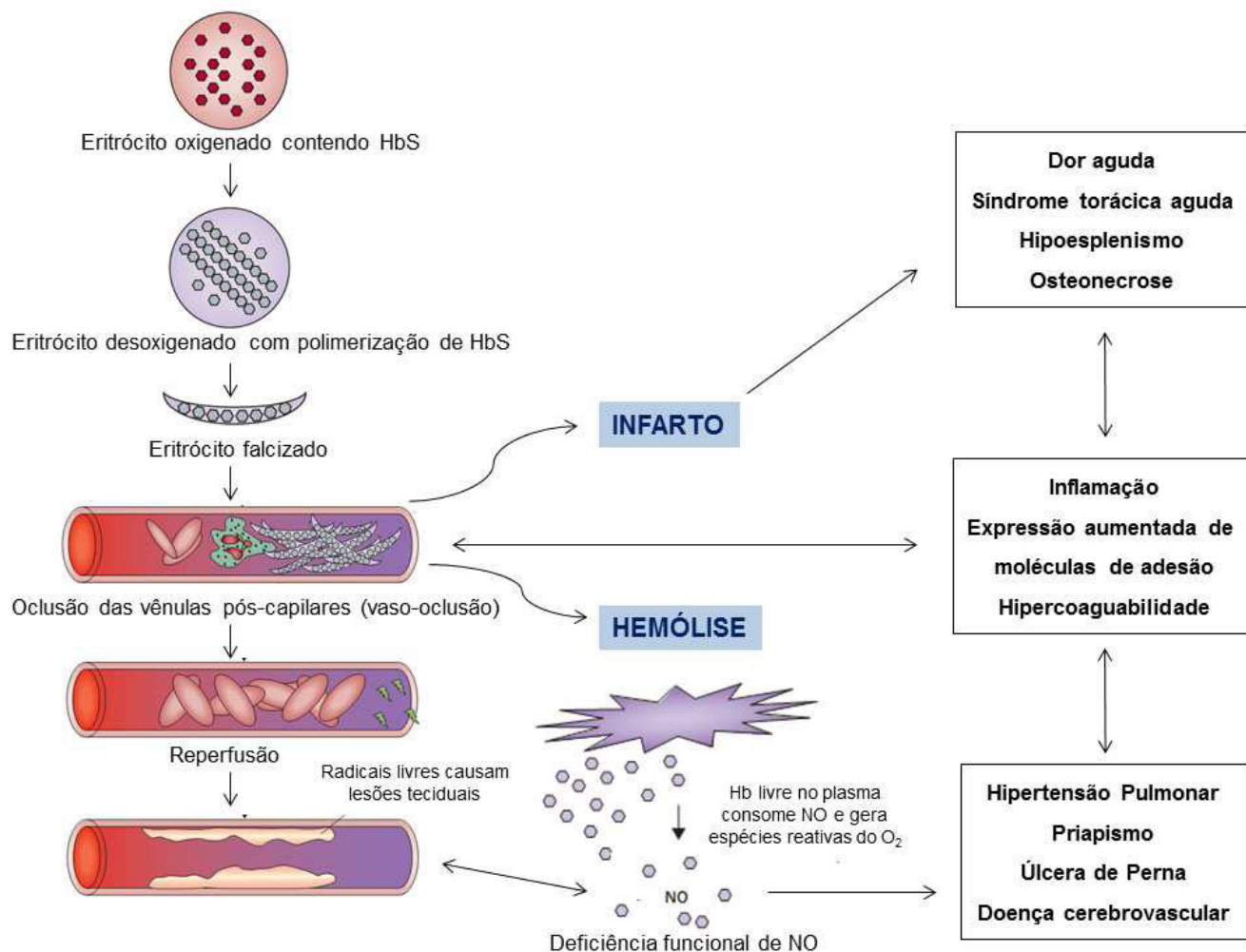


Figura 4 – Fisiopatologia das doenças falciformes

(Fonte: Rees et al., 2010, adaptado).

Durante os primeiros meses de vidas, as crianças com doença falciforme, independentemente dos seus genótipos, geralmente não manifestam crises vaso-oclusivas típicas. Isto se deve, provavelmente, a persistência de níveis altos de HbF. Estes eventos clínicos começam a aparecer a medida que a produção de cadeias globínicas γ vai sendo substituída pela de cadeias β , levando a níveis crescentes de HbS (Serjeant, 2013). No entanto, evidências laboratoriais da presença de doença hemolítica podem se fazer presentes desde cedo (Brown et al., 1994).

A manifestação clínica mais precoce da doença falciforme é a dactilite (síndrome Mão-Pé), que se caracteriza pelo inchaço doloroso das mãos e pés da criança. Sua causa principal é a inflamação do periósteo do metacarpo e metatarso, e já foi descrita em crianças com 10-12 semanas de idade. Normalmente os episódios são autolimitados, se resolvem rapidamente (5-7 dias) com analgesia simples, e se torna rara após os 5 anos de idade. A ocorrência de dactilite antes do primeiro ano de vida se encontra associada a uma evolução clínica mais grave (Casillas et al., 2013).

Crises de dor

As crises de dor se constituem a característica clínica mais marcante da doença falciforme, atingindo todas as faixas etárias, embora sejam mais espaçadas nos indivíduos mais jovens. Elas se caracterizam por variações nas suas intensidades e períodos de remissões e recaídas de um modo recorrente e imprevisível, impactando diretamente a qualidade de vida dos pacientes. Em termos epidemiológicos, representa a principal causa de hospitalização dos indivíduos com esta patologia e sua ocorrência está associada a complicações graves da doença, tais como síndrome torácica aguda, insuficiência múltipla de órgãos e morte súbita (Ballas e Lusardi, 2005).

Sua origem é o resultado dos eventos vaso-oclusivos, que levam a hipóxia, isquemia e lesão dos tecidos irrigados pelos vasos obstruídos, seguido de inflamação vascular crônica (Lobo et al., 2007). Os mediadores inflamatórios lançados das células injuriadas, macrófagos, mastócitos e plaquetas ativam os nociceptores dos nervos periféricos aferentes, desencadeando a percepção nociceptiva da dor. Sua intensidade pode variar de leve a grave, dependendo da extensão da lesão tissular e do balanço geral das moléculas que estimulam ou inibem o processo, tais como a serotonina, encefalina e β -endorfina. Além disso, fatores psicológicos, culturais, sociais e espirituais podem influenciar a percepção da dor (Ballas et al., 2012a).

A estimulação contínua e excessiva destes nociceptores promove mudanças estruturais e funcionais na medula espinhal e no cérebro que resultam no processo de sensibilização central. Clinicamente, os pacientes irão apresentar uma redução no limiar da dor, resultando em hiperalgesia (resposta exagerada a um estímulo doloroso normalmente

leve) e alodinia (sensação de dor, mesmo quando o estímulo não é doloroso). Observa-se ainda uma expansão das áreas receptoras dos estímulos, levando a ocorrência de hiperalgesia para além das locais originais de injúrias, e um prolongamento da sensação de dor, mesmo após a cessação do estímulo doloroso (Ballas et al., 2012a).

Além das crises agudas, os pacientes podem apresentar dores crônicas, que são causadas por outras complicações da doença, tais como o infarto ósseo, necrose avascular das articulações, úlcera de perna e osteomielite crônica (Ballas e Eckman, 2009).

Síndrome torácica aguda

A síndrome torácica aguda (STA) representa um dos eventos mais comuns durante a primeira década de vida dos indivíduos com doenças falciformes. Clinicamente, pode ser definida como um infiltrado pulmonar novo, confirmado através raio-x de tórax, acompanhado pela presença de dois ou mais dos seguintes sintomas: dor torácica aguda e intensa, febre, tosse, taquipnéia e/ou dispneia moderada a grave, podendo ocorrer hipoxemia ou hipercapnia (Meier e Miller, 2012).

Apresenta um alto grau de morbidade e mortalidade, constituindo-se na principal causa de morte e na segunda causa de internações hospitalares entre os pacientes com doenças falciformes. Sua incidência é três vezes maior em crianças do que em adultos, embora seja mais grave nas faixas etárias mais velhas, tenda a diminuir na presença de altos níveis de HbF e anemia grave, e a aumentar com a elevação do número de leucócitos (Ballas et al., 2012b).

Sua etiologia parece envolver infecção pulmonar, embolismo gorduroso decorrente da necrose da medula óssea, tromboembolismo pulmonar, vaso-oclusão pulmonar devido a falcização “*in situ*” e infarto ósseo nas costelas ou esterno (Ballas et al., 2012b). Os pulmões dos pacientes com doenças falciformes são particularmente vulneráveis a ocorrência de eventos vaso-oclusivos. As células falcizadas que escapam do sequestro na microcirculação periférica retornam ao órgão e, antes da sua reoxigenação e desfalcização, podem ser se aderir nas arteríolas pré-capilares do pulmão e provocar o fenômeno vaso-

oclusivo. Além da STA, estes micro-infartos sucessivos podem levar a disfunção pulmonar progressiva e crônica com o avanço da idade (Steinber et al., 2009).

Sequestro esplênico

O sequestro esplênico agudo constitui outra complicação clínica grave, potencialmente fatal e bastante comum na doença falciforme, podendo acometer até 30% dos pacientes com idade inferior a 6 anos. Caracteriza-se pela retenção súbita das hemácias nos sinusóides do baço, levando a uma redução brusca e progressiva (pelo menos 20% nos episódios graves) dos níveis de hemoglobina ou hematócrito, acompanhada por um aumento rápido no tamanho baço. Caso não seja tratada com urgência, pode levar ao colapso circulatório e morte. A maioria dos casos, porém, apresenta uma redução mais discreta dos níveis de Hb (com os valores absolutos permanecendo acima de 6g/dL) (Meier e Miller, 2012).

Sua ocorrência é mais comum após os 6 meses de vida, com 2/3 dos eventos ocorrendo antes dos 2 anos e sendo raro após os 6 anos de idade. A recorrência das crises é comum e a esplenectomia pode ser indicada, dependendo da frequência e gravidade dos episódios (Serjeant, 2013). No entanto, recomenda-se adiar o procedimento e manter os pacientes sob regime de transfusão crônica mensal até os 2-3 anos de idade para garantir que o esquema de imunização pneumocócica esteja completo antes da realização da cirurgia (McGann et al., 2013). A educação continuada dos pais e cuidadores para a identificação dos sinais e sintomas precoces de sequestro esplênico e procura imediata por serviços de emergência tem permitido uma redução significativa nos índices de mortalidade por esta complicação (Serjeant, 2013).

Em virtude das suas particularidades anatômicas, o baço dos indivíduos com doenças falciformes pode apresentar uma série de outras alterações. Inicialmente aumentado, os repetidos episódios de infartos esplênicos provocados pelas constantes vaso-oclusões vão levar a um lento processo de involução que em mais de 90% dos pacientes HbSS ou HbS- β^0 culmina em uma perda total de tecido esplênico funcional ainda durante a infância (Khatib et al., 2009).

No entanto, indivíduos HbSC, HbS- β^+ e os que apresentam altos níveis de HbF podem continuar a apresentar um baço funcional aumentado, tornando-os susceptíveis às complicações da esplenomegalia nas doenças falciformes. Inicialmente, essa esplenomegalia, cuja persistência está associada a sequestro aumentado dos elementos sanguíneos, leva a diminuição nos níveis e contagens de hemoglobina, leucócitos e plaquetas, além do próprio desconforto físico provocado pelo tamanho do baço (Steinberg et al., 2009).

Infecções graves

Essas disfunções esplênicas predis põem os indivíduos afetados a infecções invasivas graves por bactérias encapsuladas, tais como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, constituindo-se nas principais causas de morte em crianças menores de 5 anos com doenças falciformes. Outros fatores também parecem contribuir para essa maior susceptibilidade a infecções, tais como: deficiência na maturação dos linfócitos B e na produção de anticorpos IgG e IgM específicos para pneumococos; deficiência na atividade funcional da via alternativa do complemento, provocada pelas alterações celulares e processos hemolíticos característicos da doença; perfil de resposta imunológica tipicamente Th2, com diminuição da ativação dos fagócitos que combateriam as bactérias intracelulares; aumento da expressão do receptor do fator ativador de plaquetas (PAFr), facilitando a ligação e invasão das células pelos pneumococos; deficiências de micronutrientes importantes para o sistema imune (Battersby et al., 2010; Booth et al., 2010).

No entanto, a introdução da administração profilática de penicilina e da vacinação pneumocócica na rotina das crianças diagnosticadas com a doença tem possibilitado reduções drásticas na incidência e morbi-mortalidade por estas infecções (Gaston et al., 1986; Halasa et al., 2007). Além destas medidas, recomenda-se a imunização adicional contra outros agentes, tais como *Haemophilus influenzae* tipo B, *Neisseria meningitidis* e o vírus influenza (McGann et al., 2013).

Acidente Vascular Encefálico (AVE)

Dentre todas as complicações já descritas para a doença falciforme, o AVE é uma das mais graves que os indivíduos com esta patologia podem desenvolver, apresentando uma alta taxa de mortalidade e podendo resultar em disfunções físicas e neurocognitivas permanentes (Connes et al., 2013). Na ausência da triagem precoce através da Ultrassonografia Doppler Transcraniana (DTC), estima-se que aproximadamente 11% dos pacientes desenvolvam esta séria intercorrência até os 20 anos de idade, com o risco sendo maior em pacientes HbSS e menor nos indivíduos HbSC (Ohene-Frempong et al., 1998).

O diagnóstico corrente se baseia na análise das características clínicas do paciente, suplementado por técnicas de neuroimagem (Saenger e Christenson, 2010). A forma isquêmica é a mais comum em crianças e está relacionado à estenose e oclusão das grandes artérias cerebrais do círculo de Willis, com destaque para as artérias carótidas internas e a cerebral média e anterior (Switzer et al., 2006). Estas alterações parecem ser resultantes do espessamento da parede vascular, causada pela proliferação de fibroblastos e células musculares lisas, e da fragmentação da membrana elástica interna dos vasos, ou ainda do embolismo por trombos formados no local do dano vascular ou em áreas de fluxo sanguíneo turbulento (Connes et al., 2013).

Já as formas hemorrágicas são mais comuns na idade adulta, durante a terceira década de vida, e suas causas principais são rupturas dos aneurismas formados nos vasos do círculo de Willis ou dos pequenos vasos da circulação colateral desenvolvidas após doença moyamoya. Embora a forma isquêmica raramente seja fatal, a morte ocorre em cerca de 25% dos pacientes após a hemorragia (Switzer et al., 2006; Angulo, 2007).

Estudos feitos por Adams et al. (Adams et al., 1992) demonstraram que a avaliação da velocidade do fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais médias e carótida interna por DTC pode ser utilizada para identificar os pacientes sob maior risco de desenvolver AVE primário. E a instauração da terapia transfusional crônica resultou em um grande benefício para crianças HbSS ou HbS- β^0 cujos DTCs indicaram alto risco para AVE (Adams et al., 1998).

Baseado nestes achados, o Instituto Nacional do Sangue, Pulmão e Coração dos Estados Unidos (NHLBI) recomendou a triagem com DTC em todas as crianças com

doença falciforme, e a instauração da terapia transfusional naquelas identificadas como apresentando alto risco para AVE (NHLBI, 1997). Classicamente, as transfusões são administradas em intervalos de 4 semanas e objetivam manter as concentrações de HbS em torno de 30% (Aygün et al., 2012).

Retardo no desenvolvimento

Os pacientes com doenças falciformes podem apresentar um retardo na maturação sexual e no crescimento ósseo e ponderal durante a infância e adolescência. Embora tendam a ser minimizados durante a idade adulta, como o crescimento e a maturação sexual são temas de comparação constante entre os adolescentes, os pacientes que apresentam estes retardos podem passar por problemas emocionais e psicossociais graves (Steinberg et al., 2009).

Suas causas ainda não estão completamente esclarecidas e provavelmente são multifatoriais. Dentre os fatores associados, merece-se destacar a deficiência na secreção do hormônio de crescimento (GH) e na síntese de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), além de uma resistência parcial ao GH, provavelmente secundários a injúria hipóxico-vascular no eixo hipotalâmico pituitário após um ou mais episódios de eventos vaso-oclusivos. Somado a isso, estes pacientes geralmente se encontram em um estado de hipermetabolismo, influenciado pelos níveis de hemólise e pelo aumento no trabalho cardíaco, com seus requerimentos protéicos e energéticos se mostrando aumentados. No entanto, a captação dietética parece ser semelhante a dos controles, e os níveis de vitaminas, minerais e outros nutrientes se encontram diminuídos, possivelmente devidos as frequentes internações hospitalares, o que leva a um estado nutricional sub-ótimo (Verissimo, 2007).

Osteonecrose

A necrose óssea avascular, ou osteonecrose, é outro evento clínico comum nos pacientes com doenças falciformes, sendo bastante dolorosa, debilitante e requerendo intervenção cirúrgica nos seus estágios mais avançados. Estima-se que aproximadamente 50% destes indivíduos apresentem algum grau de comprometimento ósseo até os 35 anos de idade, sendo, deste modo, uma causa frequente de hospitalizações e de piora na qualidade de vida (Ballas et al., 2012b).

Esta complicação acomete, principalmente, os ossos da cintura e dos ombros, sendo vista mais frequentemente na cabeça do fêmur e do úmero. Nos indivíduos mais jovens, o infarto da epífise ainda imatura é passível de recuperação funcional, enquanto que o envolvimento de ossos maduros nas idades mais avançadas tipicamente resulta em danos irreversíveis, com limitações dolorosas do movimento e que podem requerer cirurgia reparadora (Ejindu et al., 2007; Serjeant, 2013). Embora não se tenha a compreensão completa da sua patogênese, as características da microcirculação dos ossos e da medula óssea favorece a ocorrência de eventos vaso-oclusivos, resultando em infartos nas cavidades medulares e trabéculas ósseas, levando a hipóxia e necrose tecidual (Ejindu et al., 2007; Steinberg et al., 2009; Silva Junior et al., 2012a). Somado a isso, a hiperplasia medular induzida pelo processo hemolítico crônico provoca alterações ósseas que podem facilitar a ocorrência de lesões nestes indivíduos (Silva Junior et al., 2012a).

Priapismo

O priapismo pode ser definido como uma ereção peniana dolorosa, persistente e não-associada a desejos sexuais, podendo durar de horas a dias. Constitui-se uma complicação clínica comum nos pacientes com doenças falciformes e pode resultar em impotência sexual parcial ou total nos casos mais graves. Sua ocorrência encontra-se associada a outras complicações da patologia, tais como úlcera de perna, AVE e hipertensão pulmonar (Ballas et al., 2012b; Kato, 2012).

Estudos recentes propõem que ele seja o resultado de alterações na homeostase vascular no pênis. O processo hemolítico crônico, juntamente com a produção abundante de radicais livres e a presença de inibidores da atividade de eNOS no plasma de pacientes

com doença falciforme, irão promover uma redução significativa na biodisponibilidade do NO nestes indivíduos. Esses níveis constantemente diminuídos promovem uma inibição compensatória da expressão e atividade da fosfodiesterase 5 (PDE5), enzima responsável pela degradação da guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Deste modo, a produção da molécula em resposta a estímulos não dependente de NO, tais como CO e a sinalização direcionada por voltagem, resulta no acúmulo de GMPc e, subsequentemente, em episódios descontrolados de vasodilatação do tecido erétil peniano. Somado a este mecanismo, a produção aumentada de adenosina, uma potente molécula vasodilatadora, e a diminuição na atividade da via vasoconstrictora RhoA/Rock também parecem desempenhar um papel importante na gênese do priapismo na doença falciforme (Bivalacqua et al., 2012; Kato, 2012).

Úlceras de perna

As úlceras de pernas também são complicações frequentes, apresentando maior incidência após os 20 anos e no sexo masculino. Seu aparecimento pode ser espontâneo, ou como consequência de pequenos traumas, e a recorrência é comum. Na maioria das vezes são pequenas, superficiais e curam espontaneamente com repouso e higiene local. Geralmente ocorrem em regiões com pouca gordura subcutânea, pele fina e fluxo sanguíneo diminuído, tais como os maléolos mediais e laterais, área tibial anterior, dorso dos pés e tendão de Aquiles (Minniti et al., 2010).

Ao longo do tempo, elas podem evoluir para formas mais graves, profundas, maiores, excessivamente dolorosas, debilitantes e difíceis de tratar, podendo perdurar por meses ou anos. Sua patogênese é complexa e está relacionada à deficiência da circulação do sangue na região afetada, como consequência dos fenômenos vaso-oclusivos, depleção dos níveis de NO, estase venosa e outras alterações vasculares, além de traumas mecânicos, infecções bacterianas, inflamações e diminuição da capacidade de transporte de O₂ aos tecidos pela anemia instalada (Paladino, 2007; Minniti et al., 2010; Minniti et al., 2014).

Nos últimos 30 anos, as melhorias e avanços no suporte, tratamento e medidas profiláticas das doenças falciformes, aliados aos avanços das ciências básicas e pesquisas clínicas, levaram a um aumento expressivo da sobrevida dos portadores destas patologias (Mcgann et al., 2013). No entanto, décadas de injúrias vasculares, muitas das quais subclínicas, associadas ao estado de anemia crônica e a sobrecarga de ferro, podem resultar em danos e falências orgânicas crônicas em vários órgãos, tais como coração, pulmão, fígado e rins (Gualandro et al., 2007).

Alterações Cardiovasculares

Os episódios recorrentes de oclusão microvascular e a anemia hemolítica crônica ocasionam uma diminuição na capacidade de transporte de oxigênio nestes indivíduos. Para compensar parcialmente esta deficiência, observam-se aumentos do volume plasmático e do débito cardíaco, com o subsequente aumento das câmaras cardíacas e da massa ventricular. Estas alterações se correlacionam bem com o grau de anemia, tendem a piorar com o avanço da idade e a progredir para disfunção ventricular sistólica e diastólica (Voskaridou et al., 2012).

A sobrecarga de ferro, embora mais comum nos pacientes com talassemia β major, também pode ser observada nos indivíduos com doenças falciformes, particularmente naqueles submetidos a terapia transfusional crônica. Seu desenvolvimento leva ao acúmulo progressivo deste mineral nas células cardíacas, tanto contráteis quanto condutoras, podendo ocasionar arritmias supraventriculares, bloqueios de primeiro grau e outras disfunções cardíacas. Mais raramente, os pacientes com doenças falciformes podem evoluir para isquemia miocárdica como resultado dos eventos vaso-oclusivos e demais alterações vasculares características da patologia (Voskaridou et al., 2012).

O processo hemolítico crônico se constitui um fator de risco importante, também, para o desenvolvimento da hipertensão pulmonar, uma doença vascular progressiva do pulmão. Estudos recentes tem reconhecido esta condição como uma das principais complicações clínicas e fator de risco importante e independente para morte súbita dos pacientes com doença falciforme (Gladwin e Sachdev, 2012; Klings et al., 2014).

Alterações renais

A medida que a sobrevida dos pacientes com doenças falciformes aumenta, seus rins tendem a apresentar anormalidades estruturais e funcionais ao longo de todo o néfron. O próprio microambiente da medula renal, caracterizado pela acidose, hipertonicidade e hipóxia promove a polimerização da HbS, fazendo esta área particularmente susceptível a oclusão microvascular, isquemia tecidual e outras vasculopatias (Ataga e Orringer, 2000). A diminuição das concentrações do NO e o lançamento do heme na circulação sanguínea, secundário a hemólise intravascular, amplificam estas alterações vasculares. Somado a isso, as moléculas de heme livre no plasma são citotóxicas e promovem injúrias nas células glomerulares, causando proteinúria e podendo levar a doença renal crônica (Nath e Katusic, 2012).

Dentre as alterações renais observadas, destacam-se a hematúria e anormalidades tubulares, tais como hipostenúria e deficiência na capacidade de acidificação e de secreção de potássio na urina. Apesar da hipoperfusão medular, o córtex renal é hiperperfundido devido à diminuição da resistência vascular renal. Esta hiperperfusão promove hiperfiltração e hipertrofia glomerular, que pode evoluir para glomeroesclerose mesangial e levar ao aparecimento de uma doença renal crônica. A deposição de ferro nas células renais pode potencializar a ocorrência destas lesões (Nath e Katusic, 2012).

Alterações hepáticas e hepatobiliares

O fígado também se encontra afetado na doença falciforme e vários processos patológicos podem contribuir para a doença hepática, tais como colestase intra e extra-hepática, hipóxia e infarto, sequestro intra-hepático de hemácias, hepatites virais e efeitos tóxicos dos fármacos e da sobrecarga de ferro. Geralmente é difícil identificar qual a causa específica da doença hepática e geralmente mais de uma se faz presente. Estima-se que a hepatomegalia se faça presente em aproximadamente 80-100% dos pacientes (Traina e Saad, 2007; Steinberg et al., 2009; Ebert et al., 2010).

A hiperbilirrubinemia crônica característica destes indivíduos os predispõe ao desenvolvimento de colelitíase (Traina e Saad, 2007). Estima-se que aproximadamente

30% dos pacientes apresentarão pedras na vesícula até os 18 anos, podendo se fazer presente já aos dois anos de idade. Sua prevalência e incidência variam de acordo com a população estudada, sendo maior nos indivíduos com quadro hemolítico mais acentuado e/ou com menor capacidade de conjugar a bilirrubina indireta em virtude da co-herança da síndrome de Gilbert. Os pacientes podem permanecer assintomáticos por um bom tempo e o tratamento cirúrgico deve ser reservado apenas para os casos sintomáticos (Fertrin et al., 2003; Steinberg et al., 2009; Ballas et al., 2012b).

Alterações oftalmológicas

O fenômeno de vaso-oclusão, que ocorre em todo o organismo, pode também ser observado na microvasculatura do olho. As manifestações oculares na doença falciforme são representadas por alterações orbitárias, conjuntivais, uveais, papilares e retinianas, além da elevação da pressão intraocular, sendo as lesões na retina as mais importantes (Lim, 2012).

O evento inicial na patogênese da retinopatia é a vaso-oclusão que ocorre geralmente na região periférica da retina, principalmente nas bifurcações arteriolares. Isto pode resultar em lesões não-proliferativas, tais como pequenas hemorragias intra-retinianas, possivelmente por necrose isquêmica da parede do vaso, e hemorragias mais profundas ou sub-retinianas, caracterizadas por lesões hiperpigmentada. A oclusão arteriolar definitiva, seguida de hipóxia retiniana, promove o aparecimento de lesões proliferativas, que se iniciam com surgimento de novos vasos sanguíneos, normalmente mais frágeis, imaturos e aderentes ao gel vítreo, podendo evoluir para hemorragia, ruptura e descolamento da retina, seguida por perda da visão (Vilela et al. 2007). Tem sido observado uma maior frequência de retinopatia proliferativa em indivíduos HbSC e HbS- β talassemia, o que sugere que a maior viscosidade sanguínea possa contribuir para a progressão desta complicação ocular na doença falciforme (Elagouz et al., 2010).

1.3.4. Heterogeneidade fenotípica das doenças falciformes

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

Alguns indivíduos podem desenvolver quase todas as complicações descritas para doença, enquanto outros praticamente não as apresentam, mas podem morrer em virtude de algum evento agudo súbito. Existem, também, indivíduos que evoluem clinicamente sem complicações em certas fases da vida, mas sofrem muito em outras (Steinberg et al., 2009; Rees e Gibson, 2012).

A mutação responsável pela formação da HbS deve-se fazer presente em cada paciente e é absolutamente necessária para produzir a doença. No entanto, inúmeros fatores genéticos e ambientais são importantes na determinação da sua gravidade (Fertrin e Costa, 2010; Serjeant, 2013).

Entre os fatores ambientais, o mais importante são as condições socioeconômicas dos pacientes (Chen et al., 2002; Hankins e Wang, 2009; Pereira et al., 2013). A elevada taxa de desemprego, o baixo nível de escolaridade, a renda familiar precária e o difícil acesso aos serviços de saúde, tão comum entre os indivíduos com esta doença, vão influenciar negativamente a vida destes pacientes, além de dificultar a adesão ao tratamento recomendado, podendo levar ao agravamento da saúde geral (Paiva e Silva et al., 1993; Pereira et al., 2013).

Portanto, o conhecimento do perfil demográfico e socioeconômico é essencial para a identificação das necessidades, criação, implementação e aprimoramento de políticas de saúde pública destinadas a estes indivíduos (Santos e Gomes Neto, 2013). Contudo, estudos destinados a avaliar estes aspectos da doença falciforme ainda são escassos na literatura.

1.3.5. Moduladores genéticos da evolução clínica da doença falciforme

Várias pesquisas têm se dedicado a análise de características genéticas que possam influenciar na evolução clínica da doença falciforme (Fertrin e Costa, 2010; Steinberg e Sebastiani, 2012). A identificação destes marcadores possibilita não só a determinação mais precoce do prognóstico da doença, como também orienta o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais específicas e efetivas para o seu controle (Lettre, 2012).

O genótipo responsável pelo desenvolvimento da doença se constitui um dos fatores mais importantes, visto que influencia diretamente na concentração de HbS e na tendência desta hemoglobina se polimerizar. Geralmente, a anemia falciforme (HbSS) e a interação HbS- β^0 são as formas mais graves, tanto clínica quanto laboratorialmente. No entanto, observa-se uma grande heterogeneidade clínica, mesmo dentro de um mesmo genótipo (Steinberg, 2009a).

Dentre os outros fatores determinados, a HbF tem sido reconhecida como o mais poderoso. Além de diminuir as concentrações intracelulares de HbS, níveis elevados de HbF no interior do eritrócito irão inibir o processo de polimerização, uma vez que nem a HbF nem o tetrâmero híbrido ($\alpha_2\beta^S\gamma$) podem ser incorporados na fase polimérica da HbS desoxigenada. Portanto, qualquer incremento na sua produção apresenta um efeito benéfico para os pacientes com doença falciforme (Steinberg et al., 2014).

Percentuais aumentados deste tipo de hemoglobina influenciam, principalmente, a ocorrência de úlceras de perna e complicações clínicas associadas aos eventos vaso-oclusivos, tais como a necrose óssea, crises dolorosas agudas e síndrome torácica aguda. Tem sido proposto que a menor influência da HbF no subfenótipo hemolítico ocorre pelo fato de a destruição intravascular dos eritrócitos que não contém HbF ser suficiente para desencadear as complicações clínicas relacionadas à hemólise (Akinsheye et al., 2011; Steinberg et al., 2014).

Tanto as concentrações de HbF quanto a sua distribuição entre os eritrócitos são herdáveis. Dentre os fatores genéticos que influenciam os níveis de HbF, os haplótipos do cluster β associados a mutação β^S estão entre os mais estudados (Kutlar, 2007). Estes haplótipos constituem a associação não aleatória de polimorfismos genéticos presentes

nesta região cromossômica, refletindo a origem geográfica da mutação e o conjunto de fatores cis e trans atuantes que afetam a expressão dos genes das globinas (Orkin et al, 1982). Cinco tipos principais foram descritos como associados à mutação β^S , sendo nomeados de acordo com a região geográfica ou grupo étnico aonde foram originalmente identificados: Senegal, Benin, Bantu (ou Região Central da África – CAR), Camarões e Árabe-Indiano. Além destes, existem ainda os haplótipos atípicos, originados por uma variedade de mecanismos genéticos, tais como conversão gênica e recombinação entre os haplótipos comuns da anemia falciforme e haplótipos raramente associados à mutação (Zago et al., 2000; Nagel e Steinberg, 2001)

A maioria dos sítios polimórficos analisados para se determinar o haplótipo não apresenta um papel conhecido na regulação dos genes globínicos. A exceção é o sítio de restrição polimórfico para a enzima Xmn-I (C-T, rs 7482144), localizado na região promotora do gene G_γ . A presença do alelo T, característico dos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano, está associada a uma maior expressão de cadeias globínicas G_γ e se correlaciona, embora imperfeitamente, com níveis aumentados de HbF. O haplótipo Camarões também apresenta uma razão $G_\gamma:A_\gamma$ aumentada, embora não tenha o alelo T para o polimorfismo da Xmn-I, o que sugere que outros elementos do haplótipo podem influenciar a expressão das globinas (Fertrin e Costa, 2010).

Pacientes com o haplótipo Bantu normalmente apresentam menores níveis de HbF e um quadro clínico mais grave da doença. Já os indivíduos com haplótipos Senegal ou Árabe-indiano apresentam níveis mais altos de HbF e quadro clínico mais leve. O haplótipo Benin, por sua vez, apresenta níveis medianos de HbF e clínica intermediária. No entanto, observa-se uma grande variação na concentração de HbF, mesmo entre indivíduos com um mesmo haplótipo (Powars et al., 1994; Akinsheye et al., 2011).

A co-herança da talassemia alfa (tal- α) também se apresenta como um modulador genético importante da gravidade clínica da doença falciforme. Ao reduzir a concentração intracelular de HbS, a tal- α diminui a tendência da HbS se polimerizar. Somado a isso, a deformabilidade das hemácias falciformes nestes indivíduos é maior e eles apresentam número reduzido de células densas e ISC. Todos estes fatores resultam em um menor grau

de hemólise e, consequentemente, em aumento nos níveis da hemoglobina e do hematócrito nestes pacientes (Belisário e Viana, 2010; Bartolucci et al., 2012).

Seus efeitos clínicos são variados, mas geralmente beneficiam os pacientes, que tendem a apresentar uma menor ocorrência de AVE, úlceras de perna, priapismo e hipertensão pulmonar. No entanto, o aumento da viscosidade sanguínea, conferido pelo aumento do hematócrito, faz com que as frequências de crises de dor, osteonecrose e síndrome torácica aguda não sejam alteradas, podendo, inclusive, se encontrar aumentadas (Rees et al.2010; Steinberg e Sebastiani, 2012).

Embora os níveis de HbF, os haplótipos β^S e a co-herança da talassemia α se destaquem como as características genéticas mais associadas a variabilidade clínica dos pacientes com doenças falciformes, eles não são suficientes para explicar a diversidade clínica e laboratorial das doenças falciformes. Portanto, modificadores genéticos não globínicos envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos da doença devem influenciar, também, o fenótipo das doenças falciformes (Fertrin e Costa, 2010; Lettre, 2012; Steinberg e Sebastiani, 2012).

Dentre estes, a haptoglobina (Hp) se apresenta como um gene-candidato importante . Esta molécula faz parte de um conjunto de proteínas, receptores celulares e enzimas que realizam a depuração e detoxificação da Hb livre e hemina presentes no plasma como resultado do processo hemolítico. Logo após a lise das hemácias, a Hb se liga a Hp, formando um complexo Hp-Hb que é removido da circulação pela interação com os receptores CD163 dos monócitos do sangue periférico e macrófagos teciduais, principalmente células de Kupfer no fígado, seguida da internalização de todo o conjunto. A Hp e a fração globínica serão degradadas pelos lisossomos e o heme será convertido em compostos menos tóxicos, que são reciclados pelo organismo para a produção de novas hemácias (Ratanasopa et al., 2013; Schaer DJ et al., 2013).

Quando ligada a Hp, a Hb permanece sequestrada dentro do ambiente intravascular, prevenindo a sua translocação para espaços extra-vasculares, incluindo os túbulos renais. A Hp também estabiliza o heme no interior da molécula de Hb, evitando a liberação da hemina e, subsequentemente, seus efeitos tóxicos para as membranas celulares, proteínas e

lipídios solúveis no plasma. Somado a isso, a ligação com a Hp estabiliza o potencial redox e reduz o dano oxidativo provocado pela Hb. Deste modo, o complexo Hp-Hb diminui a ocorrência de ações deletérias da hemina e Hb livre nos vasos sanguíneos e em outros tecidos, além de prevenir a perda de Fe por excreção renal (Banerjee et al., 2012; Schaer CA et al., 2013; Schaer DJ et al., 2013).

Diante disso, tem-se proposto a infusão de Hp como uma nova abordagem terapêutica para a prevenção de complicações clínicas em condições hemolíticas, tais como na doença falciforme (Podmore, 2008; Schaer DJ et al., 20013). Corroborando com estes trabalhos, estudo recente demonstrou que a infusão de haptoglobina humana inibiu a ocorrência de processos vaso-oclusivos induzidos por hemoglobina em modelos animais de doenças falciformes (Belcher et al., 2014).

A Hp é sintetizada, inicialmente, como uma única cadeia polipeptídica, que é clivada em cadeias α e β , ligadas entre si por ponte dissulfeto. A cadeia β contém o sítio de ligação a Hb, enquanto a cadeia α apresenta um domínio de multimerização, responsável por promover a ligação covalente entre dois monômeros de Hp. Deste modo, a proteína vai ser encontrada no plasma como um polímero composto por 2 a 10 unidades monoméricas (Levy et al., 2010).

Em humanos, existem duas classes de alelos de Hp, HP*1 e HP*2, que diferem entre si no tamanho e estrutura das cadeias α : $\alpha 1$ é composta por 83 e a $\alpha 2$ por 142 aminoácidos. As cadeias $\alpha 1$ podem apresentar diferenças na composição de aminoácidos nas posições 52 e 53, podendo ser classificadas como $\alpha 1S$ (slow) ou $\alpha 1F$ (fast), dependendo da sua mobilidade eletroforética. O alelo HP*2 parece ter sido originado a partir de eventos de crossing-over desigual entre dois alelos HP*1, resultando na duplicação dos éxons 3 e 4, que inclui o domínio de multimerização da cadeia α . Como consequência, a Hp poderá ser encontrada como dímeros, polímeros lineares (2-8 monômeros) e polímeros cíclicos (3-10 monômeros) nos indivíduos com genótipos Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2, respectivamente (Wobeto et al, 2008) (Figura 5). Este polimorfismo é bastante comum e a prevalência dos três genótipos da haptoglobina varia bastante entre populações de diferentes regiões geográficas e grupos étnicos (Carter e Worwood, 2007; Wobeto et al., 2008; Goldenstein et al., 2012).

Os fenótipos da Hp apresentam características bioquímicas, biofísicas e eficiências funcionais diferentes. O complexo Hp1-1-Hb, por exemplo, é endocitado mais rapidamente que o Hp2-2-Hb e o Hp2-1-Hb. Visto que a Hb continua apresentando atividade oxidativa e diminuindo a biodisponibilidade do NO, mesmo quando ligada a Hp, a endocitose mais retardada do complexo Hp2-2-Hb exacerba a atividade tóxica da Hb nos indivíduos com o este genótipo. Além disso, a depuração mais demorada permite que o complexo Hp-Hb se ligue a outras proteínas séricas, principalmente o HDL, e promova alterações estruturais e funcionais nesta molécula, podendo resultar em consequências danosas para o indivíduo. Foi demonstrado, ainda, que a interação do complexo Hp1-1-Hb com o receptor CD163 resulta em um aumento maior dos níveis dos mediadores anti-inflamatórios IL-10 e IL-6, quando comparado ao complexo Hp2-2-Hb. No entanto, o fenótipo Hp2-2 confere uma maior resistência contra agentes infecciosos e apresenta uma maior atividade angiogênica (Levy et al., 2010).

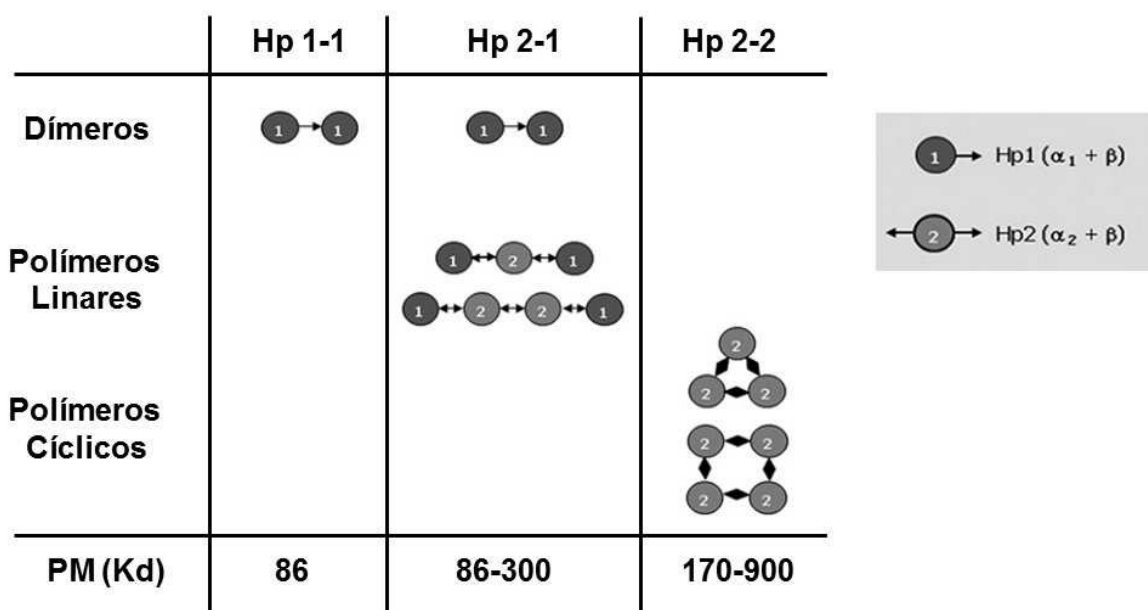


Figura 5 - Estrutura polimérica da haptoglobina nos indivíduos com os diferentes genótipos Hp.

(Fonte: Levy et al., 2010, adaptado)

Alguns estudos tem analisado a associação do genótipo da Hp com o desenvolvimento de uma série de patologias ou de complicações clínicas de doenças crônicas, incluindo as doenças falciformes (Carter e Worwood, 2007; Wobeto et al., 2008; Santos et al., 2011; Barbosa et al., 2014).

Visto que a hemólise crônica é uma característica marcante da doença falciforme e está intimamente associada ao desenvolvimento de uma série de complicações clínicas, sugere-se que os pacientes com o genótipo Hp2-2 possam apresentar um quadro clínico mais grave da doença (Hughes et al., 2005). No entanto, poucos trabalhos analisaram a influência do genótipo da Hp na evolução da doença falciforme, e os seus resultados obtidos não foram muito homogêneos (Adekile e Haider, 2010; Santos et al., 2011; Barbosa et al., 2014; Cox et al., 2014). Além disso, populações de diferentes regiões possuem diferentes “backgrounds” genéticos. Portanto, o conjunto de fatores mais intimamente associados ao desenvolvimento de certas complicações clínicas pode diferir de uma população para outra (Kutlar, 2007).

Diante disso, este estudo pretendeu determinar o perfil demográfico e sócio econômico dos pacientes com doenças falciformes provenientes do estado do Rio Grande do Norte, e analisar a possível influência da co-herança de talassemia α , dos genótipos da Hp e dos haplótipos β^S na evolução clínica e características laboratoriais destes pacientes.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação dos genótipos da Hp, haplótipos β^S e co-herança da talassemia α (deleção $-\alpha^{3.7}$) com a ocorrência de determinadas complicações clínicas e suas influências nas características laboratoriais de pacientes com doenças falciformes provenientes do estado do Rio Grande do Norte.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil demográfico e socioeconômico dos pacientes com doenças falciformes do estado do Rio Grande do Norte;
- Identificar as principais complicações clínicas apresentadas pelos pacientes com doenças falciformes do RN, de acordo com a faixa etária;
- Determinar a prevalência da talassemia α (deleção $-\alpha^{3.7}$), dos haplótipos β^S e dos genótipos da haptoglobina nos pacientes incluídos no estudo;
- Comparar a frequência de complicações clínicas, o número de internações hospitalares sofridas nos últimos 12 meses e as características laboratoriais dos pacientes com diferentes genótipos da doença falciforme, haplótipo β^S , genótipos da haptoglobina e status para talassemia α .

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 – Casuística

Foram arrolados 177 pacientes (87 mulheres e 90 homens) com doença falciforme que se dirigiram ao ambulatório de hematologia do Hemocentro Dalton Cunha (Natal-RN), Hospital Infantil Varela Santiago (Natal-RN) e Centro de Oncologia e Hematologia de Mossoró (Mossoró-RN) entre Março de 2011 a Outubro de 2013 para acompanhamento da sua condição clínica. Este número corresponde a um pouco mais de 46% (177/389) da população total de pacientes com doença falciforme cadastrados nestes centros de referência.

No entanto, observou-se que uma parcela destes (43 indivíduos) possuía algum parente de 1º ou 2º grau que também estava participando do estudo. Diante disso, eliminaram-se 22 indivíduos das análises dos nossos resultados, o que fez nossa amostragem diminuir para 155 (73 mulheres e 82 homens) pacientes não aparentados.

Dentre estes, 109 (70,3%) possuíam o genótipo HbSS, 23 (14,8%) mostraram a associação da HbS com a talassemia β , 21 (13,5%) tinham o genótipo HbSC e 2 (1,3%) apresentaram a associação da HbS com a persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF), confirmados através de métodos laboratoriais descritos a seguir. O diagnóstico dos casos de co-herança da HbS e PHHF foi comprovado através da realização de estudo familiar dos pacientes.

Cada paciente, ou seus responsáveis legais, foi previamente esclarecido quanto aos objetivos da pesquisa e procedimentos a serem adotados, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1). Aplicou-se um questionário padronizado (Apêndice 2), destinado à obtenção de dados sociodemográficos e histórico clínico, e ao final foram coletadas alíquotas de sangue periférico (aproximadamente 8 mL) para a realização das análises laboratoriais. A etnia dos pacientes foi definida baseando-se na sua auto-declaração, classificando-se como pardos os indivíduos que se declararam morenos, mulatos ou pardos. Posteriormente, foram analisados os seus prontuários arquivados nos centros aonde eram acompanhados clinicamente, de onde se obtiveram informações relativas à evolução clínica.

Considerou-se que o paciente desenvolveu determinada complicação quando o médico responsável registrava claramente a ocorrência do evento clínico. O número de internações hospitalares nos últimos 12 meses foi obtido através dos dados fornecidos pelo paciente no momento da aplicação do questionário. Já o número de transfusões sanguíneas foi determinado pela análise do prontuário e relato do paciente, visto que algumas vezes eles se submetiam a este procedimento em outra unidade hospitalar e este dado poderia não ter sido registrado pelo clínico no prontuário que examinamos.

3.2 – Aspectos éticos da pesquisa

O projeto desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEP-UFRN) em 22/07/2010, sob o registro nº 193/09, segundo as normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (Anexo).

3.3 – Análises Laboratoriais

3.3.1 – Hemograma e Contagem de reticulócitos

A determinação do número de hemácias, da concentração de hemoglobina, do hematócrito e dos índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM, bem como da contagem global de leucócitos e plaquetas, foram realizadas através de contador automático de células modelo Micros 60 (ABX Diagnostics), imediatamente após a coleta das amostras de sangue. A contagem de reticulócitos foi realizada no contador modelo Cell-Dyn® 3500 (Abbot Diagnósticos), utilizando kit comercial.

3.3.2 - Diagnóstico laboratorial das Doenças Falciformes

O diagnóstico laboratorial da doença falciforme foi realizada através da eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, conforme descrito por Wild e Bain (2006). A comprovação da presença da HbS foi feita por meio do teste de solubilidade, seguindo o método proposto por Magalhães e Arashiro (1977). A co-herança da hemoglobina C (HbC)

e da interação com talassemia β foi determinada através da quantificação de HbC e HbA₂, respectivamente.

Todos os pacientes foram submetidos à confirmação molecular do genótipo responsável pela doença falciforme, utilizando-se os métodos descritos mais adiante.

3.3.3 - Quantificação de HbA₂ e HbF

A quantificação da HbA₂ e HbF foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Bio-Rad VARIANT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. O perfil cromatográfico gerado nos permitiu, também, quantificar e confirmar a presença da HbC.

3.3.4 – Dosagem sérica da LDH, AST, Bilirrubinas e Ferritina

As dosagens séricas do LDH, AST e Bilirrubinas (total, direta e indireta) foram realizadas utilizando “kits” comerciais no equipamento automatizado CM-200 (Wiener Lab, Rosario, Argentina), seguindo as recomendações do fabricante. Já a ferritina foi quantificada por imunoensaio quimioluminescente em fase sólida, utilizando kit comercial (Immulate[®] Ferritin, Siemens, Los Angeles, CA, USA) em analisador automatizado (Immulate[®], Siemens, Los Angeles, CA, USA).

3.3.5 – Extração de DNA

A extração do DNA de sangue periférico foi realizada através do kit illustra Blood GenomicPrep Mini Spin (GE Healthcare, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante, e a suspensão de DNA obtida foi armazenada sob refrigeração a cerca de -20 °C.

A análise qualitativa da integridade e a estimativa da concentração do DNA foram feitas por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e espectrofotometria, respectivamente, conforme descrito em Sambrook & Russel, 2001.

3.3.6 – Confirmação molecular do genótipo da doença falciforme

A confirmação do genótipo da doença falciforme foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores P1 e P5 (Miranda et al., 1997) (Quadro 2), seguida da digestão dos fragmentos amplificados com a enzima de restrição Dde I (New England Biolabs, MA, USA).

Quadro 2 – Sequência dos iniciadores utilizados na PCR para a confirmação molecular do genótipo da doença falciforme.

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Direção*	Posição**
P1	TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG	→	61976
P5	TCATTCGTCTGTTTCCCATTC	←	62746

* →: sense; ← : anti-sense

** Localização do primeiro nucleotídeo da sequência no cluster da globina β (ID:U01317.1)

As reações de PCR possibilitaram a amplificação de um fragmento de 771pb, incluindo o códon 6 do gene da globina β , e foram realizadas em termociclador GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystem, Foster Cycler, CA, USA) em um volume final de 25 μ L, contendo: 1 U de Taq DNA polimerase, Tampão da enzima 1 X concentrado, $MgCl_2$ 2,5mM, dNTP 300 μ M, 200 nM de cada iniciador e aproximadamente 200 ng de DNA. Foram realizados 35 ciclos de 94°C/45seg, 56°C/1 min e 72°C/1min, precedidas por um passo de desnaturação inicial a 94°C/10min e seguidas de um passo de extensão final a 72°C/10 min. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% (Sambrook e Russel, 2001), corados com Gel-RED (Biotium, CA, USA) e visualizados após exposição a luz ultravioleta.

Após a confirmação da amplificação, 6,0 μ L do produto da PCR foram adicionados a 3 U da endonuclease Dde I em um volume final de 12 μ L, contendo o tampão que foi fornecido junto com a enzima na sua concentração de uso. A mistura foi incubada a 37°C por 12h e submetida a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, conforme descrito anteriormente.

A mutação da β^S abole um sítio de restrição da região amplificada. Dessa forma, foi visualizado um fragmento de 381 pb na presença de β^S , enquanto que nos cromossomos que não possuíam esta alteração (cromossomo normal ou portador de mutação β talassêmica ou β^C) esse sítio continuou existindo e, conseqüentemente, os amplicons gerados foram quebrados em dois fragmentos: um com 201pb e o outro 180 pb. Os outros sítios de restrição para a enzima permaneceram inalterados em ambos os casos. Após a reação de digestão, os indivíduos HbSS apresentaram fragmentos com 381, 128, 89/88 pb, enquanto que nos pacientes heterozigotos compostos foram visualizados amplicons com 381, 201, 180, 128, 89/88 pb.

3.3.7 – Investigação da talassemia α (deleção $-\alpha^{3.7}$)

A co-herança da talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3.7}$) foi investigada através de Gap-PCR, utilizando-se os iniciadores C2 e C10 (Quadro 3), conforme descrito em Dodé et al. 1993.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystem, Foster Cycler, CA, USA) em um volume final de 25 μ L, contendo: 1,25 U de Taq DNA polimerase, Tampão alfa¹ 1 X concentrado, dNTP 200 μ M, 400 nM de cada iniciador e aproximadamente 200 ng de DNA. Foram realizados 30 ciclos de 94°C/45seg, 56°C/1 min e 72°C/1min, precedidas por um passo de desnaturação inicial a 94°C/10min e seguidas de um passo de extensão final a 72°C/10 min. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose a 0,8% (Sambrook e Russel, 2001), corados com Gel-RED e visualizados após exposição a luz ultravioleta. A presença do alelo normal possibilitava a amplificação de um fragmento de 2.100 pb, enquanto o alelo com a deleção $-\alpha^{3.7}$ gerava um amplicon com 1.900 pb.

Quadro 3 – Sequência dos iniciadores utilizados na PCR para a investigação da talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3.7}$).

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Direção*	Posição**
C2	CCATGCTGGCACGTTTCTGA	←	11365
C10	GATGCACCCACTGGACTCCT	→	5641

* →: sense; ← : anti-sense

** Localização do primeiro nucleotídeo da sequência no cluster da globina α (ID:J00153.1)

¹ **Composição do tampão α 10 X concentrado** : 3,35 ml de Tris-HCl 2M (pH 8,6); 1,66 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M; 250 μl de MgCl_2 1M; 33,5 μl de Na_2EDTA 0,2M; 85 μl de BSA-20 mg/ml; 70 μl de β mercaptoetanol 14,3M e completar para 10 ml com dH_2O .

3.3.8 – Determinação dos haplótipos do cluster β associados às mutações β^S e β^{tal}

A determinação dos haplótipos do cluster da globina β associados às mutações β^S e β^{tal} foi realizada por meio de PCR seguidas da análise da presença de sítios de restrição, segundo metodologias propostas por Sutton et al. (1989) e Orkin et al. (1982), respectivamente.

Foram analisados 8 sítios polimórficos diferentes: 5' $\gamma\text{G-Xmn}$ I, $\gamma\text{G-Hind}$ III, $\gamma\text{A-Hind}$ III, $\psi\beta\text{-Hinc}$ II, 3' $\psi\beta\text{-Hinc}$ II, 5' $\beta\text{-Hinf}$ I, $\beta\text{-Ava}$ II e 3' Bam HI . Dentre estes, seis foram utilizados para a identificação do haplótipo β^S (Figura 6) e seis para a análise do haplótipo β^{tal} (Figura 7).

As sequências dos iniciadores utilizados para a amplificação das regiões polimórficas foram descritas por Sutton et al. (1989) e Miranda et al. (1997) e estão listadas no Quadro 4. As composições e condições das PCRs estão detalhadas nos Quadros 5 e 6, respectivamente. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, corados com Gel-RED e visualizados após exposição a luz ultravioleta.

Após a confirmação da amplificação, os produtos da PCR foram submetidos a digestão com as enzimas de restrição apropriadas para a análise de cada sítio polimórfico (Quadro 7). Todas essas reações foram incubadas a 37°C por 12h e submetidas a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, corados com Gel-RED e visualizados após exposição a luz ultravioleta. Como controles foram utilizadas amostras de indivíduos heterozigotos para cada sítio polimórfico.

Cada paciente foi marcado pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição e a análise conjunta destas regiões polimórficas permitiram a determinação dos haplótipos β^S (Figura 6) e β^{tal} (Figura 7) destes indivíduos. O tamanho dos amplicons e dos fragmentos gerados após a clivagem com as enzimas de restrição são descritos no Quadro 8.

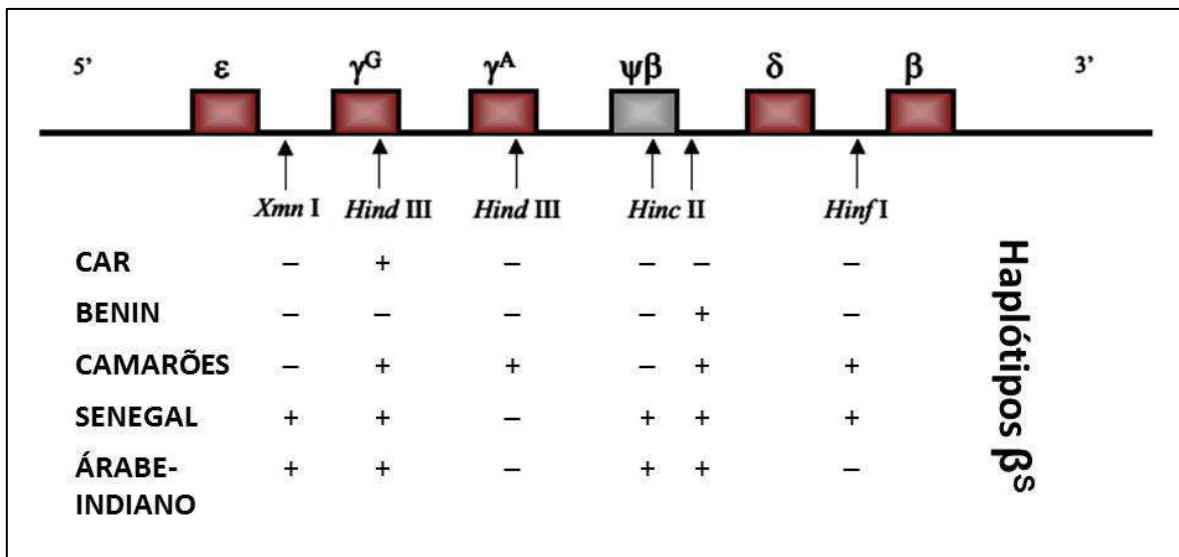


Figura 6 – Representação esquemática do cluster da globina β mostrando os sítios polimórficos analisados para a determinação do haplótipo β^S , segundo Sutton et al. (1989).

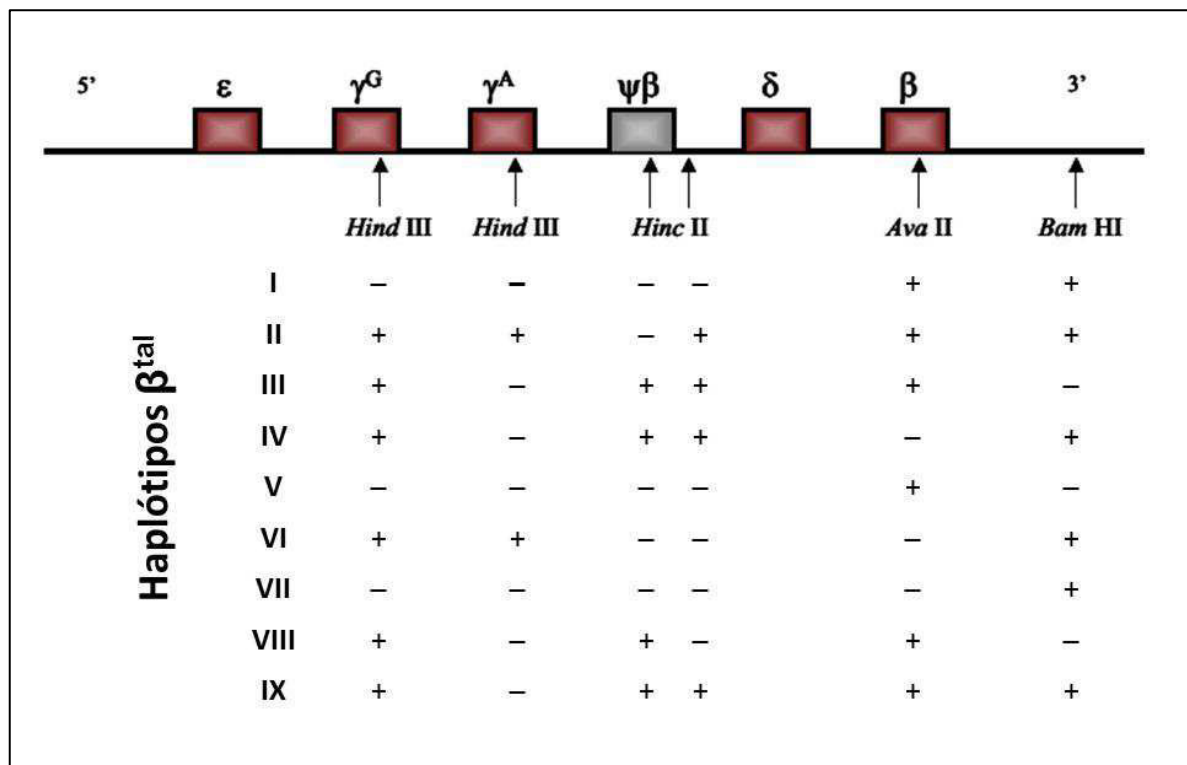


Figura 7 – Representação esquemática do cluster da globina β mostrando os sítios polimórficos analisados para a determinação do haplótipo β^{tal} , segundo Orkin et al. (1989).

Quadro 4 – Sequência dos iniciadores utilizados na PCR para a investigação das sequências polimórficas no cluster β e determinação dos haplótipos β^S e β^{tal} .

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Direção*	Posição**	Sítio Analisado
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	→	33862	5' γ^G
H1	AGGAGCTTATTGATAACCTCAG	←	34518	
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	←	36203	γ^G
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	35422	
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	40358	γ^A
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	←	41119	
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	→	46426	$\psi\beta$
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	←	47126	
H7	TCTGCATTGACTCTGTTAGC	→	49476	3' $\psi\beta$
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	←	50089	
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	→	60906	5' β
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	←	61291	
P1	TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG	→	61976	β
P5	TCATTCGTCTGTTTCCCATT	←	62746	
SF1	GCTCTACGGATGTGTGAGAT	→	71728	3' β
SF2	GCCCACATCACCAAGGCAAT	←	73248	

* →: sense; ← : anti-sense

** Localização do primeiro nucleotídeo da sequência no cluster da globina β (ID:U01317.1)

Quadro 5 – Composição das PCRs para a investigação das sequências polimórficas no cluster β e determinação dos haplótipos β^S e β^{tal} .

Componentes da PCR	Concentração Final					
	Xmn I	Hind III	Hinc II	Hinf I	Ava II	BamH I
	5' γ^G	γ^G e γ^A	$\psi\beta$ e 3' $\psi\beta$	5' β	β	3' β
Tampão da Enzima	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X
MgCl ₂ (mM)	2,5	2,0	2,0	2,5	2,0	2,0
dNTPs (μ M)	200	300	300	200	200	200
Primer sense (nM)	250	200	200	200	200	200
Primer anti-sense (nM)	250	200	200	200	200	200
Taq DNA Polimerase (U)	1,25	2,5	2,5	1,25	1,5	1,5
DNA (ng)	200	200	200	200	200	200
Volume da reação (μL)	50	50	50	50	50	50

Quadro 6 – Condições utilizadas na PCR para a investigação das sequências polimórficas no cluster β e determinação dos haplótipos β^S e β^{tal} .

Região Polimórfica	Desnaturação		35 ciclos						Extensão	
	Inicial		Desnaturação		Hibridização		Extensão		Final	
	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo
Xmn I - 5' γ^G	94	5'	94	45''	60	45''	72	1'30''	72	7'
Hind III - γ^G	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
Hind III - γ^A	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
Hinc II - $\psi\beta$	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
Hinc II - 3' $\psi\beta$	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
Hinf I - 5' β	94	5'	94	45''	57	45''	72	1'30''	72	7'
Ava II - β	94	2'	94	30''	58	1'	72	1'	72	7'
Bam HI - 3' β	94	2'	94	30''	58	1'	72	1'	72	7'

Quadro 7 – Composição das reações de digestão do produto de PCR para a investigação das sequências polimórficas no cluster β e determinação dos haplótipos β^S e β^{tal} .

Componentes da Reação	Concentração Final					
	Xmn I 5' γ^G	Hind III γ^G e γ^A	Hinc II $\psi\beta$ e 3' $\psi\beta$	Hinf I 5' β	Ava II β	BamH I 3' β
Tampão da Enzima	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X
BSA ($\mu\text{g/mL}$)	1	-	1	-	-	1
Enzima de Restrição (U)	3	4	2	2	2	4
Produto da PCR (μL)	10	10	10	10	10	10
Volume da reação (μL)	15	15	15	15	15	15

Quadro 8 – Tamanho dos produtos amplificados e dos fragmentos gerados após a clivagem com as enzimas de restrição apropriadas.

Sítio Polimórfico	Enzima de restrição	Tamanho do Amplicon (pb)	Tamanho dos Fragmentos após a clivagem (pb)
5' γ^G	Xmn I	650	450 + 200
γ^G	Hind III	780	430 + 340 + 10
γ^A	Hind III	760	400 + 360
$\Psi\beta$	Hinc II	701	360 + 340 + 1
3' $\psi\beta$	Hinc II	590	470 + 120
5' β	Hinf I	380	240 + 140
B	Ava II	763	446 + 214 + 103
3' β	Bam HI	1520	1228 + 292

3.3.9 – Determinação dos genótipos da haptoglobina

Os genótipos da haptoglobina foram determinados através de PCR alelo-específica, de acordo a metodologia descrita por Yano et al. (1998). As sequências dos iniciadores utilizados e as combinações necessárias para as amplificações seletivas dos alelos HP*1F, HP*1S e HP*2 se encontram detalhadas no Quadro 9.

Quadro 9 – Sequência e combinações dos iniciadores necessários para a genotipagem da haptoglobina por meio de PCR alelo-específica.

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Direção*	Alelo Amplificado	Tamanho do Amplicon
F3	CAGGAGTATACACCTTAAATG	→	HP*1F	1.400 pb
C72	AATTTAAAATTGGCATTTCGCC	←		
C51	GCAATGATGTCACGGATATC	→	HP*1S	1.200 pb
S2	TTATCCACTGCTTCTCATTG	←		
F3	CAGGAGTATACACCTTAAATG	→	HP*2	935 pb
C42	TTACACTGGTAGCGAACCGA	←		

* →: sense; ← : anti-sense

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo: 1,5 U de Taq DNA polimerase, Tampão da enzima 1 X concentrado, MgCl₂ 2,5mM, dNTP 300 µM, 300 nM de cada iniciador e aproximadamente 200 ng de DNA. Foram realizados 35 ciclos de 94°C/45seg, 58°C/1 min e 72°C/1min, precedidas por um passo de desnaturação inicial a 94°C/10min e seguidas de um passo de extensão final a 72°C/10 min. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% (Sambrook e Russel, 2001), corados com Gel-RED e visualizados após exposição a luz ultravioleta.

3.4 – Análises Estatísticas

As análises descritivas da população estudada foram realizadas através da apresentação de tabelas e gráficos de frequências para as variáveis categóricas. As variáveis numéricas não apresentaram distribuição normal (avaliada através do teste de Kolmogorov-Smirnov) na maioria dos grupos considerados e foram expressas na forma de medidas de tendência central.

A comparação das idades do diagnóstico da doença falciforme e dos parâmetros laboratoriais avaliados entre dois ou três grupos foi feita por meio dos testes de Mann-Whitney e ANOVA de Kruskal-Wallis, respectivamente. Quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05 na ANOVA de Kruskal-Wallis, a comparação grupo a grupo foi realizada através do Teste de Comparações Múltiplas.

As frequências das complicações clínicas e da utilização de medidas preventivas entre as diferentes faixas etárias foram comparadas através do Teste Exato de Fisher, enquanto a incidência destes eventos entre os diferentes genótipos da doença falciforme foi avaliada pelo Teste de Comparação de Proporções.

A associação das características genéticas com a ocorrência de complicações clínicas foi avaliada através do cálculo das razões de chance (e seus respectivos intervalos de confiança no nível de 95%) e do teste do χ^2 de Pearson ou Exato de Fisher, quando apropriado. Objetivando-se diminuir a interferência da idade nos resultados obtidos, repetiram-se estas análises fazendo-se o ajuste pela idade através da regressão logística binária.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares “PEPI” (Gahlingher e Abramson, 1995), “SPSS for Windows”- versão 10.0 (SPSS Inc., 1999), e “Statistica” - versão 7.0 (StatSoft, 2004). Foram considerados como significantes p valores $\leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Características demográficas e socioeconômicas dos pacientes com doenças falciformes analisados

As idades dos pacientes variaram de 7 meses a 48 anos, mediana de 12 anos, sendo observada uma maior frequência de indivíduos na faixa etária ≤ 5 anos (29,0%), seguido pela faixa de 11 a 15 anos (18,7%). A maioria dos pacientes se autodeclarou como pardo (65,8%) e não sabia informar a origem étnica dos seus ascendentes (83,9%). No entanto, a ancestralidade indígena foi a predominante (12,3%) entre aqueles que forneceram informações a este respeito. Um alto percentual (43,9%) morava em pequenas cidades do interior do estado, distantes pelo menos 60 km de algum centro de referência para o tratamento de doenças hematológicas (Tabela 1; Figura 8).

A maioria dos pacientes com idade superior a 18 anos não chegou a concluir o ensino médio (51,9%) e se encontrava desempregada (50,0%). Entre os responsáveis legais pelos pacientes menores de idade, predominou o nível de instrução até o ensino fundamental (52,4%) e a maioria (55,3%) estava trabalhando em um emprego fixo. A renda familiar total preponderante foi a de até um salário mínimo (52,7%) e aproximadamente um terço (34,2%) relatou não receber qualquer auxílio financeiro do governo federal. Dentre os que receberam benefícios sociais, o Benefício de Prestação Continuada Assistencial (BPC-LOAS) foi o mais frequentemente citado (37,4%) (Tabela 2).

As idades medianas de diagnóstico da doença falciforme foram de 8 meses (mín.: 1 mês, máx.: 8 anos), 2 anos (mín.: 1 mês, máx.: 14 anos), e 5 anos (mín.: 1 mês, máx.: 47 anos) para os indivíduos das faixas etárias de até 10, 11-20 e ≥ 21 anos, respectivamente, sendo observadas distribuição estatisticamente diferente entre os grupos ($p=0,0001$) (Figura 9).

Tabela 1 – Características demográficas dos pacientes com doenças falciformes analisados neste estudo.

Característica Demográfica	Número de Pacientes (%)
Faixa Etária (anos)	
≤ 5	45 (29,0)
6-10	22 (14,2)
11-15	28 (18,7)
16-20	23 (14,2)
21-30	23 (14,8)
≥ 31	14 (9,0)
Gênero	
Masculino	82 (52,9)
Feminino	73 (47,1)
Etnia autodeclarada	
Branca	46 (29,7)
Parda	102 (65,8)
Negra	7 (4,5)
Ascendência*	
Africana	10/155 (6,5)
Indígena	19/155 (12,3)
Europeia	4/155 (2,6)
Não sabe	130/155 (83,9)
Residência	
Natal	44 (28,4)
Região metropolitana de Natal	27 (17,4)
Mossoró	16 (10,3)
Outras cidades do interior do estado	68 (43,9)

* Quatro pacientes relataram apresentar ascendência indígena e africana, três relataram ascendência indígena e europeia e um relatou ascendência africana e europeia.

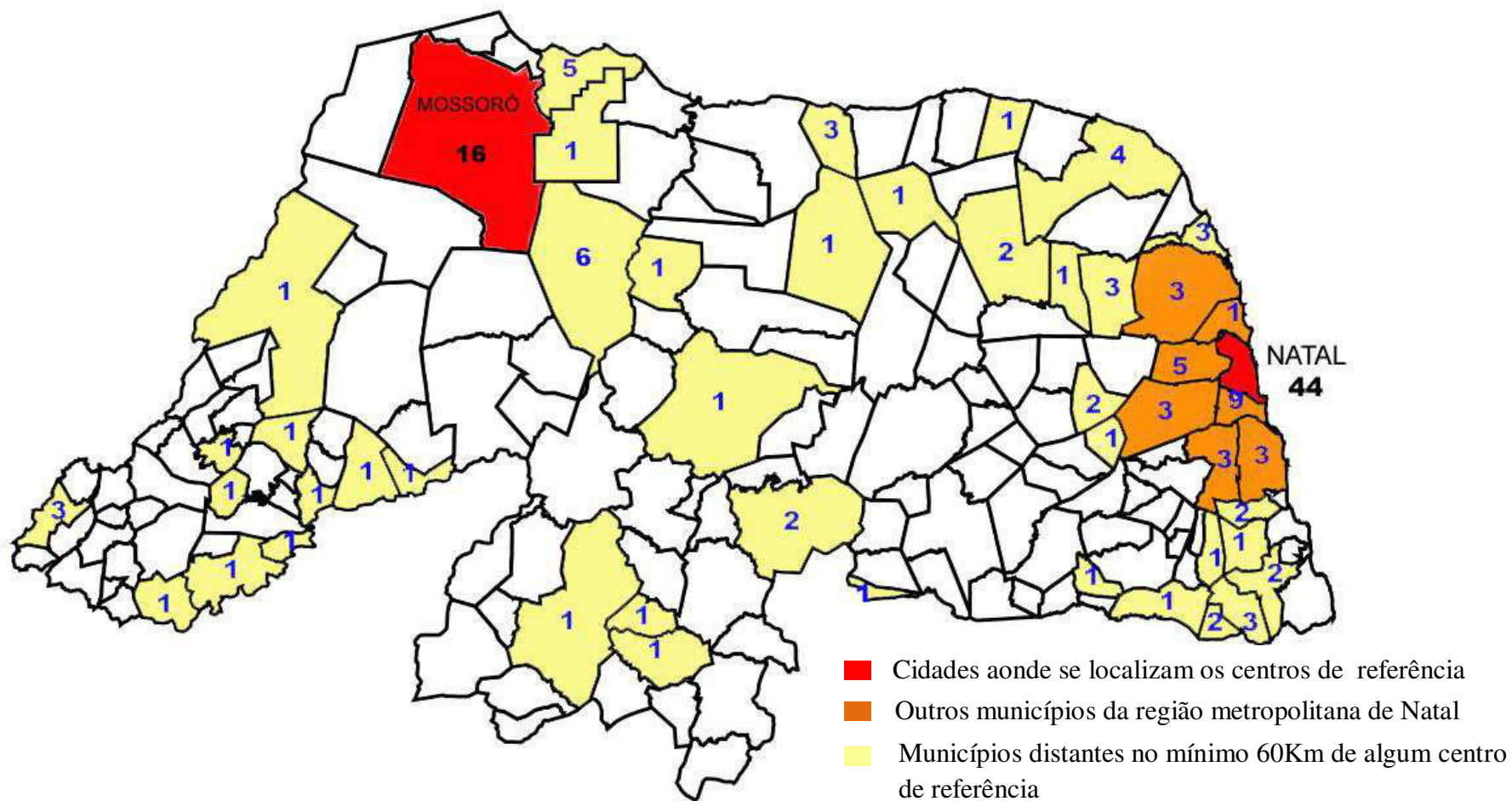


Figura 8 – Distribuição espacial dos pacientes com doença falciforme provenientes do estado do Rio Grande do Norte incluídos neste estudo.

Tabela 2 – Características socioeconômicas dos pacientes com doenças falciformes analisados neste estudo.

Característica socioeconômica	Número de Pacientes (%)		
Escolaridade	<18 years**	> 18 years	Total
Nunca estudou	5 (4,8)	3 (5,8)	8 (5,2)
Ensino fundamental incompleto	35 (34,0)	15 (28,8)	50 (32,3)
Ensino fundamental completo	14 (13,6)	1 (1,9)	15 (9,7)
Ensino médio incompleto	12 (11,6)	8 (15,4)	20 (12,9)
Ensino médio completo	28 (27,2)	18 (34,6)	46 (29,7)
Ensino superior incompleto	3 (2,9)	6 (11,5)	9 (5,8)
Ensino superior completo	3 (2,9)	1 (1,9)	4 (2,6)
Não respondeu	3 (2,9)	-	3 (1,9)
Situação empregatícia	< 18 anos**	> 18 anos	Total
Empregado	57 (55,3)	14 (26,9)	71 (45,8)
Desempregado	22 (21,4)	26 (50,0)	48 (31,0)
Agricultor	16 (15,5)	1 (1,9)	17 (11,0)
Aposentado/Licença Médica	6 (5,8)	10 (19,2)	16 (10,3)
Não respondeu	2 (1,9)	1 (1,9)	3 (1,9)
Renda familiar (salário mínimo)			
Até 1		81 (52,3)	
1 a 2		13 (8,4)	
2 a 3		53 (34,2)	
Maior que 3		8 (5,2)	
Benefícios sociais do governo federal			
BPC-LOAS		43 (27,7)	
Bolsa família		36 (23,2)	
BPC-LOAS + Bolsa família		15 (9,7)	
Outros		8 (5,2)	
Não recebe benefício social		53 (34,2)	

** Para os pacientes com idade inferior a 18 anos, considerou-se o grau de instrução e a situação trabalhista dos responsáveis legais.

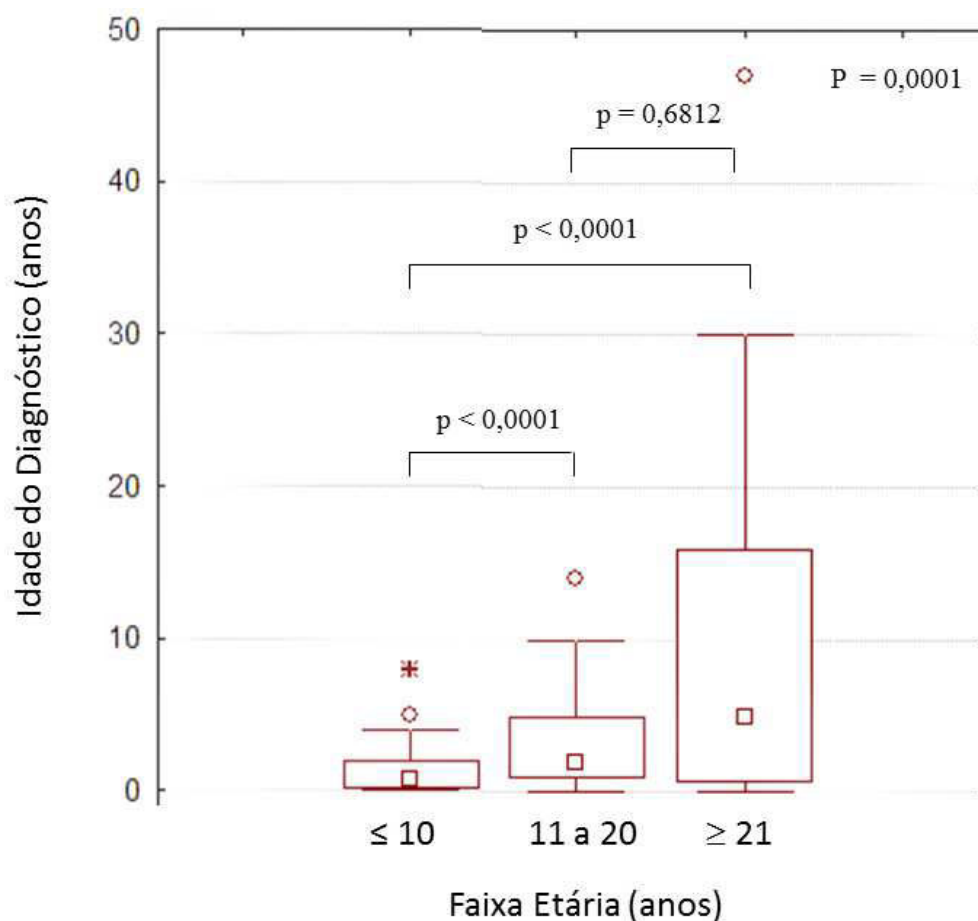


Figura 9 – Distribuição da idade de diagnóstico da doença falciforme, de acordo com a faixa etária. P: p valor calculado pelo Teste de Kruskal-Wallis; p: p valor calculado pelo teste de comparações múltiplas.

Adesão dos pacientes ao tratamento médico recomendado e principais dificuldades para sua implementação

A maior parte (50,3%) dos indivíduos relatou dificuldades para seguir o tratamento médico recomendado, dentre as quais se destacaram o difícil acesso às medicações prescritas, principalmente a hidroxiureia, e o deslocamento para os serviços de saúde especializados, quando necessário (Tabela 3).

Tabela 3 – Principais dificuldades relatadas pelos pacientes para a realização do tratamento recomendado.

Dificuldades para realização do tratamento recomendado	Número de Pacientes (%)
Conseguir a medicação prescrita	49 (31,6)
Deslocamento para os centros de referência	27 (17,4)
Outros	13 (8,4)
Não apresenta dificuldades	77 (49,7)

Obs.: Seis pacientes relataram dificuldades tanto para conseguir a medicação como para se deslocar aos centros de referência; Duas pacientes relataram dificuldades para conseguir a medicação e outros motivos; Três relataram dificuldades para se deslocar aos centros de referência e outros motivos.

No que se refere à adesão a medidas preventivas de complicações clínicas, observou-se que a hidroxiureia era utilizada por 43,2% dos pacientes, sendo este percentual significativamente menor na faixa etária mais jovem. Constatou-se, também, que a grande maioria dos indivíduos tinha recebido a vacinação anti-pneumocócica/meningocócica (91,4%) e fazia ou já tinha feito uso profilático e contínuo de penicilina alguma vez na vida (76,1%). No entanto, estes percentuais foram bem inferiores nos pacientes com maior faixa etária e não foi possível verificar se o esquema de vacinação estava completo ou incompleto para todos os pacientes (Tabela 4).

Tabela 4 – Utilização de medidas preventivas contra complicações clínicas ao longo da vida, de acordo com a faixa etária.

Medida Preventiva		Faixa Etária (anos)						Total	P
		≤ 5	6 – 10	11 – 15	16 -20	21-30	≥31		
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)		
Uso de Hidroxiureia									
Sim	5 (11,1)	13 (59,1)	16 (57,1)	9 (39,1)	15 (65,2)	9 (64,2)	67 (43,2)	<0,001*	
Não	40 (88,9)	9 (40,9)	12 (42,9)	14 (60,9)	8 (34,8)	5 (35,7)	88 (56,8)		
Vacinação anti-pneumocócica**									
Sim	42 (93,3)	22 (100,0)	28 (100,0)	20 (95,2)	18 (78,3)	8 (66,7)	138 (91,4)	0,002*	
Não	3 (6,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,8)	5 (21,7)	4 (33,3)	13 (8,6)		
Uso profilático e contínuo de Penicilina									
Sim	43 (95,6)	21 (95,5)	20 (71,4)	15 (65,2)	15 (65,2)	4 (28,5)	118 (76,1)	<0,001*	
Não	2 (4,4)	1 (4,5)	8 (28,6)	8 (34,8)	8 (34,8)	10 (71,4)	37 (23,9)		

P: P valor calculado pelo teste exato de Fisher * Estatisticamente significativo ** 4 Pessoas não lembraram se tinham sido vacinadas

Características genéticas da população de pacientes falcêmicos estudada

A talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3,7}$) foi encontrada em 11,6% dos pacientes analisados, todos na forma heterozigota (Tabela 5). Para a haptoglobina, o genótipo predominante foi o Hp2-1, com os alelos HP*2 e HP*1 apresentando frequências muito semelhantes (Tabela 6). A distribuição dos genótipos da talassemia α e da haptoglobina estava de acordo com o esperado segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos analisados, não sendo observadas diferenças significativas nas suas frequências entre os genótipos da doença falciforme (Tabelas 5 e 6).

A análise dos haplótipos β^S revelou uma maior frequência do haplótipo CAR (77%), seguido dos haplótipos Benin (12%) e Camarões (5%). Os haplótipos Senegal e Árabe-Indiano não foram encontrados na população estudada (Figura 10). Para os pacientes HbS-talassemia β , o haplótipo β^{tal} mais prevalente foi o V (61%), seguido do I (22%) e do II (13%) (Figura 11)

Os genótipos de haplótipos do cluster β mais comuns foram CAR–CAR, CAR–Benin e CAR–Camarões nos pacientes HbSS, e CAR–V, CAR–I e CAR–II nos indivíduos HbS-tal β (Tabela 7).

Tabela 5 – Frequência dos genótipos e alelos da talassemia alfa, de acordo com o genótipo da doença falciforme.

Genótipo da Doença falciforme	Genótipo da Tal α		Alelo da Tal α		H-W	P
	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$	$\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.7}$		
HbSS (n=109)	98 (89,9%)	11 (10,1%)	0,950	0,050	0,836	0,322
HbS- tal β (n=23)	20 (87,0%)	3 (13,0%)	0,935	0,065	1,000	
HbSC (n=21)	18 (85,7%)	3 (14,3%)	0,929	0,071	1,000	
HbS-PHMF (n=2)	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0,750	0,250	1,000	
Total	137 (88,4%)	18 (11,6%)	0,942	0,058	0,858	

H-W: p valor para a comparação da distribuição das frequências genotípicas encontradas com as esperadas segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg - Calculado pelo Teste do χ^2 ou Exato de Fisher.

P: p valor para a análise da distribuição dos genótipos da talassemia alfa entre os diferentes genótipos da doença falciforme - Calculado pelo Teste Exato de Fisher

Tabela 6 – Frequência dos genótipos e alelos da haptoglobina, de acordo com o genótipo da doença falciforme.

Genótipo da Doença falciforme	Genótipo da Hp			Alelo da Hp		H-W	P
	Hp1-1 (%)	Hp2-1(%)	Hp2-2 (%)	HP*1	HP*2		
SS (n=109)	28 (25,7)	54 (49,5)	27 (24,8)	0,505	0,495	1,000	0,898
S- β (n=23)	6 (26,1)	9 (39,1)	8 (34,8)	0,457	0,543	0,836	
SC (n=21)	6 (28,6)	10 (47,6)	5 (23,8)	0,524	0,476	1,000	
S-PHMF (n=2)	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	0,750	0,250	1,000	
Total	41 (26,5)	74 (47,7)	40 (25,8)	0,503	0,497	0,924	

H-W: p valor para a comparação da distribuição das frequências genotípicas encontradas com as esperadas segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg - Calculado pelo Teste do χ^2 ou Exato de Fisher.

P: p valor para a análise da distribuição dos genótipos da haptoglobina entre os diferentes genótipos da doença falciforme - Calculado pelo Teste do χ^2

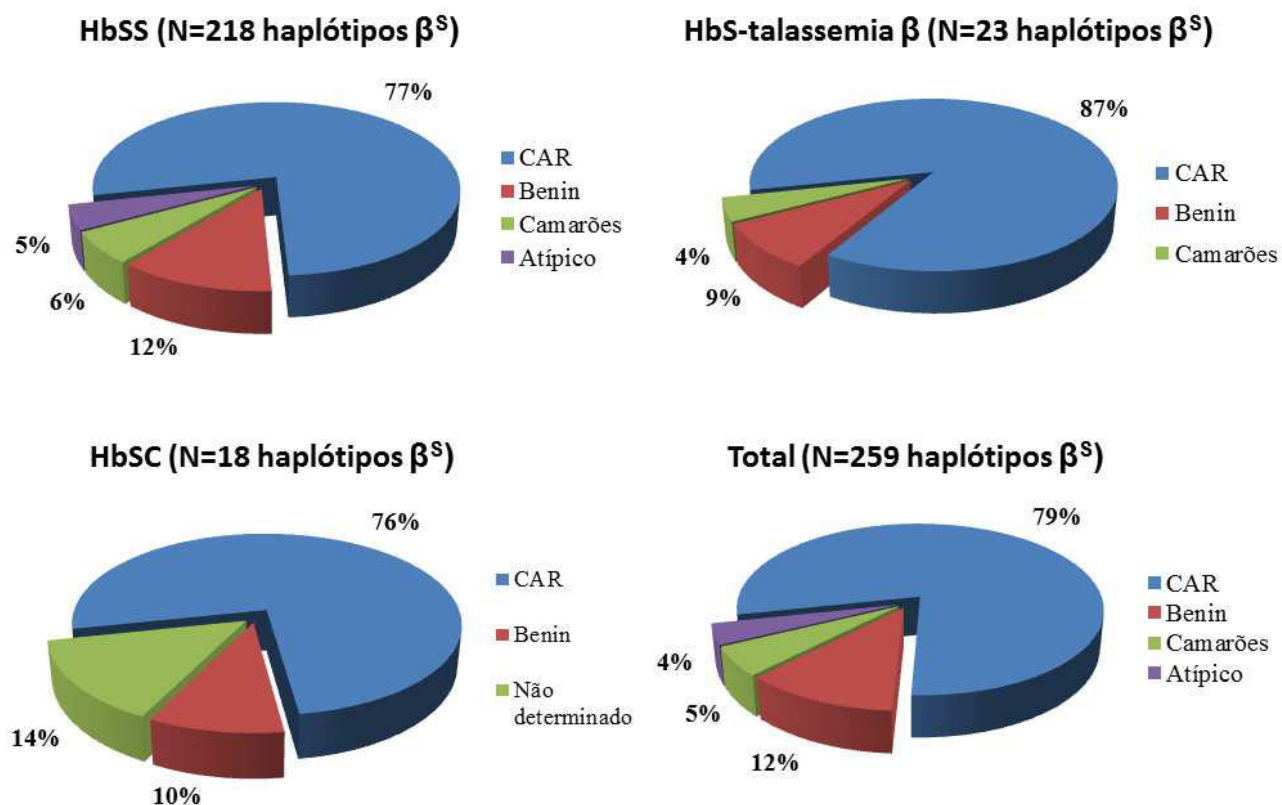


Figura 10 – Distribuição dos haplótipos β^S no grupo de pacientes analisados, de acordo com o genótipo para a doença falciforme.

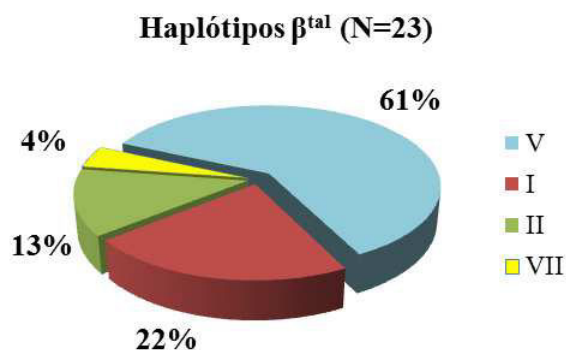


Figura 11 – Distribuição dos haplótipos β^{tal} no grupo de pacientes HbS-tal β analisados

Tabela 7 – Distribuição dos genótipos dos haplótipos β^S e β^{tal} (pacientes S-talassemia β) no grupo de indivíduos analisados.

Genótipo para Haplótipo do Cluster β	Número de Pacientes (%)
Pacientes SS (N = 109)	
CAR – CAR	67 (61,5)
CAR – Benin	19 (17,4)
CAR – Camarões	8 (7,3)
CAR – Atípico	8 (7,3)
Benin – Benin	3 (2,8)
Benin – Camarões	1 (0,9)
Camarões – Camarões	2 (1,8)
Atípico – Atípico	1 (0,9)
Pacientes S-talassemia β (N = 23)	
CAR – I	4 (17,4)
CAR – II	3 (13,0)
CAR – V	12 (52,2)
CAR – VII	1 (4,3)
Benin – I	1 (4,3)
Benin – V	1 (4,3)
Camarões – V	1 (4,3)
Pacientes SC (N = 21)	
CAR – C	16 (76,2)
Benin – C	2 (9,5)
Não determinado	3 (14,3)

Principais complicações clínicas apresentadas pelos pacientes

A análise dos prontuários arquivados nos centros de referência aonde os pacientes eram acompanhados revelou que as complicações clínicas mais frequentemente apresentadas pelos pacientes foram: infecções bacterianas graves, síndrome torácica aguda, colelitíase, alterações cardiovasculares, sequestro esplênico, retardo no crescimento, priapismo, alterações cerebrovasculares, desnutrição/déficit ponderal, úlcera de perna, alterações renais, necrose óssea, alterações oftalmológicas e dactilite (Tabela 8).

Tabela 8 – Principais complicações clínicas apresentadas ao longo da vida pelos pacientes com doenças falciformes analisados no estudo.

Complicação Clínica – Durante a vida	Nº de Pacientes (%)
Infecção bacteriana grave	88 (56,8)
Síndrome torácica aguda	42 (27,1)
Colelitíase	42 (27,1)
Alterações cardiovasculares	29 (18,7)
Sequestro esplênico	24 (15,4)
Retardo no crescimento	22 (14,2)
Priapismo	11/82 (13,4)
Alterações cerebrovasculares (AVE + DTC Alterado)	19 (12,3)
Só AVE	15 (9,7)
Desnutrição/Déficit Ponderal	18 (11,6)
Úlcera de perna	17 (11,0)
Alterações renais	13 (8,4)
Necrose óssea	10 (6,5)
Alterações oftalmológicas	10 (6,5)
Dactilite	9 (5,8)
Transfusão crônica	35 (22,6)

As principais alterações cardiovasculares encontradas foram a cardiomegalia, disfunções sistólicas e diastólicas, insuficiência cardíaca, valvopatias e arritmias. Entre as manifestações renais, destacaram-se a litíase renal e uretral, parênquima renal heterogêneo, cistos renais, aumento do volume renal, hidronefrose e nefrocalcinose. Consideraram-se como infecções bacterianas graves a pneumonia, a septicemia e a osteomielite, e como alterações cerebrovasculares a ocorrência de AVE ou resultados anormais no DTC.

A incidência da maioria destes eventos variou significativamente entre as diferentes faixas etárias (Tabela 9). Durante a primeira infância os mais frequentes foram as infecções bacterianas graves, a síndrome torácica aguda e o sequestro esplênico. Após os 5 anos, a colelitíase apareceu como uma das complicações mais comuns em todas as demais faixas etárias. As outras que se destacaram dos 6 aos 15 anos foram o retardo no crescimento e o déficit ponderal, além das infecções bacterianas, que permanece como uma morbidade importante até os 30 anos. A partir dos 11 anos, as alterações cardiovasculares e o priapismo despontam como eventos clínicos comuns, principalmente nas faixas etárias mais avançadas. A úlcera de perna começa a ganhar maior importância no grupo dos 16 aos 20 anos e se constitui na complicação clínica mais frequente após os 30 anos de idade. Por sua vez, as alterações renais e a necrose óssea só aparecem entre os eventos mais comuns a partir dos 31 anos (Figura 12).

A distribuição das complicações clínicas de acordo com o genótipo da doença falciforme revelou não haver diferenças significativas para a maior parte destes eventos entre os pacientes. Apenas a ocorrência de infecções bacterianas graves, a síndrome torácica aguda e a necessidade de instauração de terapia transfusional crônica apresentaram frequências que diferiram estatisticamente entre os genótipos, embora tenha sido observada certa tendência de os pacientes HbSS e HbS-talassemia β apresentarem maiores incidências de alterações cardiovasculares, alterações cerebrovasculares e desnutrição/déficit ponderal (Tabela 10).

Tabela 9 – Principais complicações clínicas apresentadas pelos pacientes com doenças falciformes, de acordo com a faixa etária.

Complicação Clínica	≤ 5 (n=95)	6-10 (n=79)	11-15 (n=67)	16-20 (n=50)	21-30 (n=31)	≥31 (n=15)	P
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
Infecção bacteriana grave	41 (43,2)	36 (45,6)	12 (17,9)	11 (22,0)	10 (32,3)	2 (13,3)	<0,001*
Síndrome torácica aguda	16 (17,0)	11 (13,9)	7 (10,4)	5 (10,0)	7 (22,6)	4 (26,7)	0,339
Colelitíase	1 (1,1)	14 (17,7)	16 (23,9)	12 (24,0)	9 (29,0)	3 (20,0)	<0,001*
Alterações cardiovasculares	4 (4,3)	3 (3,8)	10 (14,9)	6 (12,0)	8 (25,8)	5 (33,3)	<0,001*
Sequestro esplênico	16 (16,0)	6 (7,6)	1 (3,0)	0 (0,0)	1 (3,2)	0 (0,0)	0,001*
Retardo no crescimento	3 (3,2)	6 (7,6)	13 (19,4)	4 (8,0)	1 (3,2)	0 (0,0)	0,011*
Priapismo**	1/50 (2,0)	2/42 (4,8)	4/38 (10,5)	2/25 (8,0)	1/14 (7,1)	4/10 (40,0)	0,012*
Alterações cerebrovasculares	5 (5,3)	6 (7,6)	6 (9,0)	1 (2,0)	2 (6,5)	0 (0,0)	0,638
Só AVE	2 (2,1)	4 (5,1)	6 (9,0)	1 (2,0)	2 (6,5)	0 (0,0)	0,336
Desnutrição/Déficit ponderal	8 (8,5)	8 (10,1)	6 (9,0)	1 (2,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,216
Úlcera de perna	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (10,4)	4 (8,0)	5 (16,1)	7 (46,7)	<0,001*
Alterações renais	2 (2,1)	0 (0,0)	3 (4,5)	2 (4,0)	2 (6,5)	3 (20,0)	0,009*
Necrose óssea	0 (0,0)	3 (3,8)	4 (6,0)	2 (4,0)	1 (3,2)	3 (20,0)	0,009*
Alterações oftalmológicas	2 (2,1)	2 (2,5)	2 (3,0)	3 (6,0)	2 (6,5)	1 (6,7)	0,519
Dactilite	9 (9,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,001*
Transfusão crônica	15 (16,0)	10 (12,7)	10 (14,9)	7 (14,0)	4 (12,9)	4 (26,7)	0,818

P: P valor calculado pelo Teste Exato de Fisher

* Estatisticamente significativo

**Analisaram-se apenas os indivíduos do sexo masculino

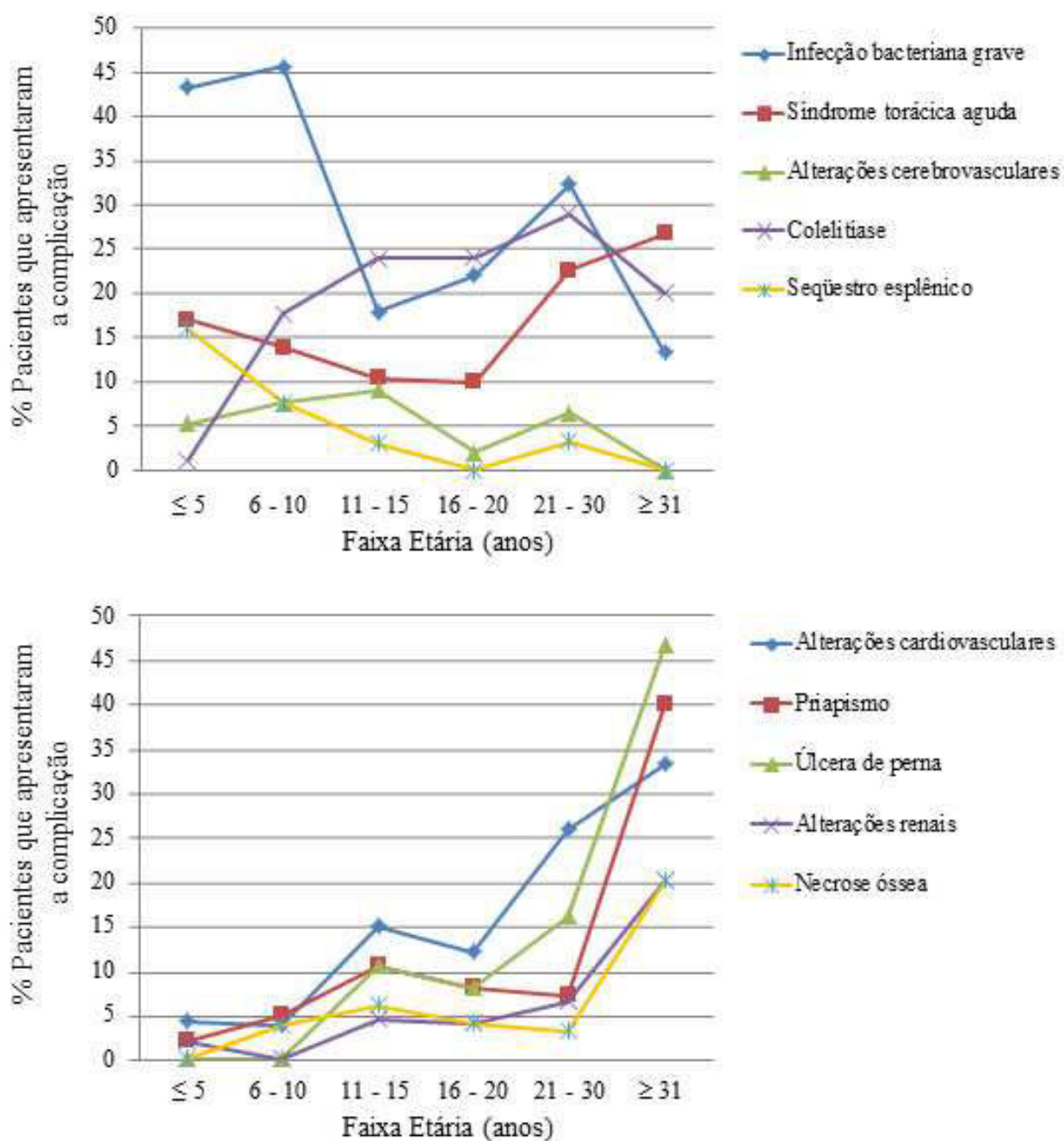


Figura 12 – Variação na incidência das principais complicações clínicas apresentadas pelos pacientes com doenças falciformes entre as diferentes faixas etárias.

Tabela 10 – Principais complicações clínicas apresentadas pelos pacientes com doenças falciformes, de acordo com o genótipo da doença falciforme.

Principais complicações clínicas	Genótipo da Doença Falciforme						P		
	SS (109)		S-β (23)		SC (21)		SS x Sβ	SS x SC	Sβ x SC
	N	%	N	%	N	%			
Infecção bacteriana grave	70	(64,2)	14	(60,9)	4	(19,0)	0,786	<0,001*	0,007*
Síndrome torácica aguda	30	(27,5)	10	(43,5)	2	(9,5)	0,132	0,082	0,015*
Colelitíase	33	(30,3)	6	(26,1)	3	(14,3)	0,702	0,135	0,338
Alterações cardiovasculares	23	(21,1)	5	(21,7)	1	(4,8)	0,915	0,086	0,110
Sequestro esplênico	18	(16,5)	4	(17,4)	2	(9,5)	0,906	0,411	0,450
Retardo no crescimento	18	(16,5)	3	(13,0)	1	(4,8)	0,718	0,189	0,350
Priapismo**	10/56	(17,9)	1/13	(7,7)	0/11	(0,0)	0,380	0,132	0,357
Alterações cerebrovasculares	17	(15,6)	2	(8,7)	0	(0,0)	0,392	0,054	0,174
Só AVE	13	(11,9)	2	(8,7)	0	(0,0)	0,682	0,098	0,174
Desnutrição/Déficit Ponderal	14	(12,8)	4	(17,4)	0	(0,0)	0,613	0,082	0,051
Úlcera de Perna	13	(11,9)	1	(4,3)	3	(14,3)	0,260	0,799	0,255
Alterações renais	8	(7,3)	3	(13,0)	2	(9,5)	0,338	0,748	0,716
Necrose óssea	7	(6,4)	3	(13,0)	0	(0,0)	0,241	0,252	0,094
Alterações oftalmológicas	6	(5,5)	1	(4,3)	3	(14,3)	0,706	0,199	0,248
Dactilite	9	(8,3)	0	(0,0)	0	(0,0)	0,163	0,182	1,000
Transfusão crônica	32	(29,4)	2	(8,7)	1	(4,8)	0,041*	0,022*	0,611

N = Número de indivíduos que desenvolveram a complicação clínica P = p valor calculado pelo Teste de Comparações de Proporções

* Estatisticamente significativo

** Analisado apenas nos indivíduos do gênero masculino

Objetivando-se minimizar a interferência dos genótipos da doença falciforme na análise dos resultados, a avaliação da associação da talassemia alfa, genótipos da haptoglobina e haplótipos β^S com a ocorrência de complicações clínicas foi feita levando-se em consideração apenas os pacientes com anemia falciforme (HbSS).

A talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3.7}$) não mostrou associação significativa com nenhuma das complicações clínicas apresentadas pelos pacientes, nem com o número de internações hospitalares ou com a necessidade de instauração de terapia transfusional crônica ao longo da vida (Tabela 11). A combinação de haplótipos CAR/CAR, por sua vez, esteve relacionada a maiores chances de apresentar retardo no crescimento, além de tendência a desenvolver mais alterações cardiovasculares e menos alterações oftalmológicas, quando comparado aos outros haplótipos β^S (Tabela 12).

Já a análise dos genótipos da haptoglobina revelou que a herança do alelo HP*2 (genótipo Hp2-1 ou Hp2-2) estava associada com a necessidade de instauração de terapia transfusional crônica, além de apresentar certa tendência de desenvolver mais alterações cerebrovasculares e retardo no crescimento (Tabela 13).

A distribuição dos genótipos da talassemia alfa, haplótipos β^S e haptoglobina de acordo com a faixa etária não revelou diferenças significativas entre os grupos considerados (Tabela 14).

Características laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo

As análises hematológicas e bioquímicas realizadas mostraram que os pacientes com diferentes genótipos da doença falciforme possuíam valores estatisticamente divergentes entre si para todos os parâmetros avaliados. Os pacientes HbSC foram os que apresentaram características laboratoriais que mais se aproximavam da normalidade, enquanto os indivíduos HbSS possuíam um quadro de doença hemolítica mais grave, com menores níveis de hemoglobina, hemácias e hematócrito, e valores aumentados de reticulócitos, bilirrubinas, LDH, AST e ferritina (Tabela 15).

Em virtude disto, a comparação das características laboratoriais entre os diferentes genótipos da talassemia α , haplótipo β^S e genótipo da haptoglobina foi realizada apenas entre os pacientes HbSS. Somado a isso, realizou-se outra análise excluindo-se os indivíduos que faziam uso regular de hidroxiureia há pelo menos três meses, visando minimizar a influência do medicamento nas características laboratoriais dos pacientes.

Foram observados maior número de hemácias e hematócrito, além de menores níveis de HCM nos pacientes que co-herdaram a talassemia α . Os valores de VCM, CHCM, reticulócitos e leucócitos também foram menores nestes indivíduos, mas apenas quando não foram excluídos os que faziam de hidroxiureia. Notou-se, ainda, uma tendência destes pacientes apresentarem maiores níveis de Hb (Tabela 16).

A análise de acordo com o haplótipo β^S revelou que os pacientes CAR/CAR apresentaram menores valores de hemoglobina e hemácias, além de uma tendência a menores percentuais de hematócrito. No entanto, estes resultados não se repetiram quando se eliminou os indivíduos tratados regularmente com a hidroxiureia (Tabela 17).

Entre os pacientes com os genótipos Hp2-2 ou Hp2-1 foram observados maiores níveis de ferritina. Quando foram excluídos os indivíduos que usavam a hidroxiureia, notaram-se, também, menores valores de LDH e AST, e uma tendência a maiores percentuais de hematócrito. Além disso, foi verificado que os indivíduos com estes genótipos apresentavam maiores contagens de plaquetas e menores valores de RDW quando se desconsiderava o critério de exclusão adotado (Tabela 18).

Tabela 11 – Associação da talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3.7}$) com a ocorrência de complicações clínicas nos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo. (Continua)

Complicação clínica	Talassemia α		RC	IC 95%	P	RC ^{Id}	IC ^{Id}	P ^{Id}
	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$						
Infecção bacteriana grave								
Sim	61	9	0,37	0,04-1,92	0,172	0,36	0,07-1,76	0,207
Não	37	2	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Síndrome Torácica Aguda								
Sim	26	4	0,63	0,15-3,20	0,354	0,66	0,18-2,46	0,537
Não	72	7	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Colelitíase								
Sim	31	2	2,08	0,39-20,81	0,293	3,18	0,56-17,90	0,189
Não	67	9	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Alterações cardiovasculares								
Sim	20	3	0,68	0,15-4,38	0,421	0,80	0,18-3,47	0,761
Não	78	8	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Sequestro esplênico								
Sim	17	1	2,10	0,26-96,36	0,425	1,79	0,19-16,63	0,610
Não	81	10	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Retardo no crescimento								
Sim	18	0	∞	0,51 - ∞	0,123	2340,7	0,00-7,6 ²⁸	0,796
Não	80	11	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-

RC: Razão de Chance

IC 95%: Intervalo de confiança no nível 95%

P: P valor

*Estatisticamente significativo

RC^{Id}, IC 95%^{Id}, P^{Id}: Razão de chance, Intervalo de Confiança e P valor calculados fazendo-se o ajuste pela idade, através de regressão logística binária

(Continuação) **Tabela 11** – Associação da talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3.7}$) com a ocorrência de complicações clínicas nos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo.

Complicação clínica	Talassemia α		RC	IC 95%	P	RC ^{Id}	IC ^{Id}	P ^{Id}	
	αα/αα	αα/-α ^{3,7}							
Priapismo									
Sim	9	1	0,41	0,02-26,79	0,452	0,45	0,02-4,49	0,608	
Não	44	2	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Alterações cerebrovasculares									
Sim	16	1	1,95	0,24-89, 90	0,460	1,95	0,23-16,42	0,538	
Não	82	10	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Só AVE									
Sim	12	1	1,40	0,17-65,54	0,612	1,52	0,18-13,11	0,705	
Não	86	10	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Desnutrição/Déficit Ponderal									
Sim	13	1	1,53	0,19-71,41	0,572	1,40	0,16-12,06	0,758	
Não	85	10	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Úlcera de Perna									
Sim	12	1	1,40	0,17-65,54	0,612	2,33	0,22-24,71	0,483	
Não	86	10	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Alterações renais									
Sim	6	2	0,29	0,04-3,44	0,185	0,33	0,05-2,07	0,235	
Não	92	9	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	

RC: Razão de Chance

IC 95%: Intervalo de confiança no nível 95%

P: P valor

*Estatisticamente significativo

RC^{Id}, IC 95%^{Id}, P^{Id}: Razão de chance, Intervalo de Confiança e P valor calculados fazendo-se o ajuste pela idade, através de regressão logística binária

(Conclusão) **Tabela 11** – Associação da talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3.7}$) com a ocorrência de complicações clínicas nos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo.

Complicação clínica	Talassemia α		RC	IC 95%	P	RC ^{Id}	IC ^{Id}	P ^{Id}
	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$						
Necrose Óssea								
Sim	6	1	0,65	0,07-32,96	0,536	0,78	0,08-7,70	0,832
Não	92	10	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Alterações oftalmológicas								
Sim	5	1	0,54	0,05-27,94	0,480	0,63	0,06-6,36	0,696
Não	93	10	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Dactilite								
Sim	9	0	∞	0,21 - ∞	0,369	750,6	0,00-1,9 ²⁶	0,810
Não	89	11	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Transfusão crônica								
Sim	29	3	1,12	0,25-7,01	0,589	1,11	0,27-4,49	0,888
Não	69	8	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Número de Internações nos últimos 12 meses								
0	41	7	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
1-2	41	3	2,33	0,49-14,82	0,196	2,30	0,55-9,70	0,255
3-4	10	1	1,71	0,18-84,54	0,535	1,30	0,13-12,52	0,823
≥ 5	6	0	∞	0,16 - ∞	0,416	1306,3	0,00-9,7 ³⁴	0,848

RC: Razão de Chance

IC 95%: Intervalo de confiança no nível 95%

P: P valor

*Estatisticamente significativo

RC^{Id}, IC 95%^{Id}, P^{Id}: Razão de chance, Intervalo de Confiança e P valor calculados fazendo-se o ajuste pela idade, através de regressão logística binária

Tabela 12 – Associação dos haplótipos β^S com a ocorrência de complicações clínicas nos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo.
(Continua)

Complicação clínica	Haplótipo β^S		RC	IC 95%	P	RC ^{Id}	IC 95% ^{Id}	P ^{Id}
	CAR/CAR	Outros						
Infecção bacteriana grave								
Sim	47	23	1,94	0,81-4,69	0,103	1,94	0,87-4,32	0,107
Não	20	19	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Síndrome Torácica Aguda								
Sim	18	12	0,92	0,36-2,37	0,846	0,94	0,40-2,24	0,891
Não	49	30	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Colelitíase								
Sim	17	16	0,55	0,22-1,37	0,159	0,57	0,23-1,40	0,217
Não	50	26	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Alterações cardiovasculares								
Sim	18	5	2,72	0,84-9,28	0,062	3,56	1,10-11,58	0,035*
Não	49	37	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Sequestro esplênico								
Sim	10	8	0,75	0,24-2,33	0,573	0,73	0,25-2,18	0,577
Não	57	34	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Retardo no crescimento								
Sim	15	3	3,75	0,92-17,61	0,037*	3,89	1,04-14,54	0,043*
Não	52	39	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-

RC: Razão de Chance

IC 95%: Intervalo de confiança no nível 95%

P: P valor

*Estatisticamente significativo

RC^{Id}, IC 95%^{Id}, P^{Id}: Razão de chance, Intervalo de Confiança e P valor calculados fazendo-se o ajuste pela idade, através de regressão logística binária

(Continuação) **Tabela 12** – Associação dos haplótipos β^S com a ocorrência de complicações clínicas nos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo.

Complicação clínica	Haplótipo β^S		RC	IC 95%	P	RC ^{Id}	IC ^{Id}	P ^{Id}	
	CAR/CAR	Outros							
Priapismo									
Sim	8	2	3,36	0,57-35,17	0,126	4,70	0,67-33,22	0,121	
Não	25	21	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Alterações cerebrovasculares									
Sim	10	7	0,88	0,27-2,85	0,807	0,88	0,30-2,52	0,805	
Não	57	35	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Só AVE									
Sim	8	5	1,00	0,27-3,86	0,996	1,06	0,32-3,53	0,926	
Não	59	37	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Desnutrição/Déficit Ponderal									
Sim	11	3	2,55	0,60-12,42	0,159	2,53	0,66-9,72	0,177	
Não	56	39	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Úlcera de Perna									
Sim	8	5	1,00	0,27-3,86	0,996	1,73	0,39-7,66	0,470	
Não	59	37	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Alterações renais									
Sim	5	3	1,05	0,19-7,12	0,631	1,54	0,29-8,03	0,610	
Não	62	39	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	

RC: Razão de Chance

IC 95%: Intervalo de confiança no nível 95%

P: P valor

*Estatisticamente significativo

RC^{Id}, IC 95%^{Id}, P^{Id}: Razão de chance, Intervalo de Confiança e P valor calculados fazendo-se o ajuste pela idade, através de regressão logística binária

(Conclusão) **Tabela 12** – Associação dos haplótipos β^S com a ocorrência de complicações clínicas nos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo.

Complicação clínica	Haplótipo β^S		RC	IC 95%	P	RC ^{Id}	IC ^{Id}	P ^{Id}
	CAR/CAR	Outros						
Necrose Óssea								
Sim	3	4	0,45	0,06-2,81	0,256	0,56	0,11-2,86	0,483
Não	64	38	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Alterações oftalmológicas								
Sim	1	5	0,11	0,00-1,08	0,031*	0,13	0,01-1,18	0,070
Não	66	37	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Dactilite								
Sim	6	3	1,28	0,25-8,34	0,519	1,37	0,30-6,14	0,683
Não	61	39	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Transfusão crônica								
Sim	22	10	1,56	0,60-4,12	0,314	1,56	0,65-3,74	0,322
Não	45	32	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
Número de Internações nos últimos 12 meses								
0	16	32	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-
1-2	18	26	1,38	0,54-3,54	0,452	0,66	0,27-1,57	0,345
3-4	6	5	2,40	0,51-11,45	0,167	1,19	0,21-6,63	0,851
≥ 5	2	4	1,00	0,08-7,87	0,662	1,00	0,16-6,14	1,000

RC: Razão de Chance

IC 95%: Intervalo de confiança no nível 95%

P: P valor

*Estatisticamente significativo

RC^{Id}, IC 95%^{Id}, P^{Id}: Razão de chance, Intervalo de Confiança e P valor calculados fazendo-se o ajuste pela idade, através de regressão logística binária

Tabela 13 – Associação dos genótipos da haptoglobina com a ocorrência de complicações clínicas nos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo. (Continua)

Complicação clínica	Haptoglobina		RC	IC 95%	P	RC ^{Id}	IC ^{Id}	P ^{Id}	
	Hp2-2/Hp2-1	Hp1-1							
Infecção bacteriana grave									
Sim	53	17	1,22	0,46 - 3,24	0,653	1,22	0,50-2,97	0,653	
Não	28	11	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Síndrome Torácica Aguda									
Sim	25	5	2,05	0,64-6,99	0,184	2,07	0,70-6,09	0,187	
Não	56	23	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Colelitíase									
Sim	23	10	0,71	0,26-1,96	0,467	0,68	0,25-1,85	0,452	
Não	58	18	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Alterações cardiovasculares									
Sim	18	5	1,31	0,40-4,59	0,626	1,38	0,44-4,38	0,579	
Não	63	23	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Sequestro esplênico									
Sim	14	4	1,25	0,35-5,73	0,484	1,49	0,41-5,44	0,544	
Não	67	24	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Retardo no crescimento									
Sim	17	1	7,17	1,01-310,64	0,024*	7,22	0,91-57,08	0,061	
Não	64	27	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	

RC: Razão de Chance

IC 95%: Intervalo de confiança no nível 95%

P: P valor

*Estatisticamente significativo

RC^{Id}, IC 95%^{Id}, P^{Id}: Razão de chance, Intervalo de Confiança e P valor calculados fazendo-se o ajuste pela idade, através de regressão logística binária

(Continuação) **Tabela 13** – Associação dos genótipos da haptoglobina com a ocorrência de complicações clínicas nos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo.

Complicação clínica	Haptoglobina		RC	IC 95%	P	RC ^{Id}	IC ^{Id}	P ^{Id}	
	Hp2-2/Hp2-1	Hp1-1							
Priapismo									
Sim	7	3	0,82	0,16-5,74	0,539	0,99	0,19-5,12	0,994	
Não	34	12	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Alterações cerebrovasculares									
Sim	16	1	6,65	0,93-288,86	0,033*	6,65	0,84-52,65	0,073	
Não	65	27	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Só AVE									
Sim	12	1	4,70	0,63-208,04	0,101	4,82	0,59-39,26	0,142	
Não	69	27	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Desnutrição/Déficit Ponderal									
Sim	11	3	1,31	0,31-7,88	0,491	1,34	0,34-5,24	0,676	
Não	70	25	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Úlcera de Perna									
Sim	11	2	2,04	0,40-20,09	0,297	3,52	0,49-25,04	0,210	
Não	70	26	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Alterações renais									
Sim	7	1	2,55	0,30-119,31	0,341	3,33	0,34-32,96	0,304	
Não	74	27	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	

RC: Razão de Chance

IC 95%: Intervalo de confiança no nível 95%

P: P valor

*Estatisticamente significativo

RC^{Id}, IC 95%^{Id}, P^{Id}: Razão de chance, Intervalo de Confiança e P valor calculados fazendo-se o ajuste pela idade, através de regressão logística binária

(Conclusão) **Tabela 13** – Associação dos genótipos da haptoglobina com a ocorrência de complicações clínicas nos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo.

Complicação clínica	Haptoglobina		RC	IC 95%	P	RC ^{Id}	IC ^{Id}	P ^{Id}	
	Hp2-2/Hp2-1	Hp1-1							
Necrose Óssea									
Sim	3	4	0,23	0,03-1,49	0,070	0,22	0,04-1,15	0,072	
Não	78	24	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Alterações oftalmológicas									
Sim	5	1	1,78	0,19-42,04	0,603	2,09	0,21-20,69	0,527	
Não	76	27	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Dactilite									
Sim	6	3	0,67	0,13-4,44	0,419	0,76	0,16-3,53	0,730	
Não	75	25	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Transfusão crônica									
Sim	28	4	3,17	0,94-13,69	0,033*	3,17	1,00-10,05	0,050*	
Não	53	24	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
Número de Internações nos últimos 12 meses									
0	37	11	1,00	Referência	-	1,00	Referência	-	
1-2	31	13	0,71	0,25-1,99	0,313	0,69	0,27-1,79	0,448	
3-4	9	2	1,34	0,22-14,47	0,544	1,19	0,21-6,63	0,841	
≥ 5	4	2	0,59	0,07-7,48	0,449	0,51	0,08-3,29	0,478	

RC: Razão de Chance

IC 95%: Intervalo de confiança no nível 95%

P: P valor

*Estatisticamente significativo

RC^{Id}, IC 95%^{Id}, P^{Id}: Razão de chance, Intervalo de Confiança e P valor calculados fazendo-se o ajuste pela idade, através de regressão logística binária

Tabela 14 – Distribuição dos genótipos da talassemia α , haptoglobina e dos haplótipos β^S de acordo com a faixa etária dos 109 pacientes HbSS incluídos no estudo

Faixa Etária Genótipo	≤ 5 (n=28)	6-10 (n=18)	11-15 (n=20)	16-20 (n=19)	21-30 (n=15)	≥31 (n=9)	P
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
Talassemia α							
αα/αα	26 (92,9)	15 (83,3)	20 (100,0)	18 (94,7)	11 (73,3)	8 (88,9)	0,114
αα/-α ^{3,7}	2 (7,1)	3 (16,7)	0 (0,0)	1 (5,3)	4 (26,7)	1 (11,1)	
Haptoglobina							
Hp1-1	8 (28,6)	5 (27,8)	2 (10,0)	7 (36,8)	3 (20,0)	3 (33,3)	0,799
Hp1-2/Hp2-2	20 (71,4)	13 (72,2)	18 (90,0)	12 (63,2)	12 (80,0)	6 (66,7)	
Haplótipo β ^S							
CAR/CAR	16 (57,1)	12 (66,7)	14 (70,0)	11 (57,9)	10 (66,7)	4 (44,4)	0,444
Outros	12 (42,9)	6 (33,3)	6 (30,0)	8 (42,1)	5 (33,3)	5 (55,6)	

P: P valor calculado pelo teste exato de Fisher

Tabela 15 – Distribuição dos valores medianos dos parâmetros laboratoriais analisados, de acordo com o genótipo da doença falciforme.

Parâmetro Laboratorial	Geral (n=155)	HbSS (n=109)	HbS-β tal (n=23)	HbSC (n=21)	P-KW	P		
	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana		SSxS-β tal	SSxSC	S-βtalxSC
Hemoglobina (g/dL)	8,5	8,3	8,7	11,4	<0,001*	1,000	<0,001*	<0,001*
Hemácias (x10 ¹² /L)	3,0	2,7	3,9	4,3	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,790
Hematócrito (%)	26,6	25,5	28,7	34,4	<0,001*	0,062	<0,001*	<0,001*
VCM (fL)	90,7	94,2	70,8	80,8	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,167
HCM (pg)	29,0	30,5	21,4	27,2	<0,001*	<0,001*	0,002*	0,013*
CHCM (g/dL)	31,8	31,9	29,5	32,2	<0,001*	<0,001*	0,549	<0,001*
RDW (%)	18,1	17,9	21,0	17,2	0,003*	0,018*	0,417	0,003*
Reticulócitos (%)	7,3	8,8	5,3	2,7	<0,001*	0,002*	<0,001*	0,023*
Plaquetas (/mm ³)	468000	496000	469000	287000	0,002*	1,000	0,001*	0,025*
Leucócitos (/mm ³)	11000	11500	10250	8500	0,008*	1,000	0,006*	0,291
Hb F (%)	8,1	9,4	8,3	1,9	<0,001*	1,000	<0,001*	<0,001*
Bil. Total (mg/dL)	2,1	2,5	1,5	1,2	<0,001*	<0,001*	<0,001*	1,000
Bil. Direta (mg/dL)	0,6	0,7	0,5	0,5	<0,001*	0,010*	0,002*	1,000
Bil. Indireta (mg/dL)	1,3	1,7	1,1	0,7	<0,001*	<0,001*	<0,001*	1,000
LDH (U/L)	1007	1143	773	542	<0,001*	0,003*	<0,001*	0,018*
AST (U/L)	42	44	41	18	<0,001*	1,000	<0,001*	<0,001*
Ferritina (ng/mL)	409	523	488	127	<0,001*	1,000	<0,001*	0,005*

P-KW: p valor calculado pelo Teste de Kruskal-Wallis

* Estatisticamente significativo

P: p valor calculado pelo teste de comparações múltiplas entre os genótipos da doença falciforme

Tabela 16 – Distribuição dos valores medianos dos parâmetros laboratoriais analisados para os pacientes HbSS, de acordo com o genótipo da talassemia α (deleção $-\alpha^{3.7}$)

Parâmetro Laboratorial	Talassemia α		P	Talassemia α (sem uso de hidroxiureia)		P
	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$		$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$	
	(n=98)	(n=11)		(n=56)	(n=6)	
Hemoglobina (g/dL)	8,2	8,8	0,081	8,1	8,8	0,075
Hemácias ($\times 10^{12}/L$)	2,6	3,1	0,001*	2,7	3,6	0,014*
Hematócrito (%)	25,2	28,9	0,015*	24,8	28,6	0,034*
VCM (fL)	94,8	87,0	0,023*	91,0	84,1	0,083
HCM (pg)	30,6	28,1	0,001*	29,5	26,8	0,032*
CHCM (g/dL)	31,9	30,9	0,050*	32,0	30,9	0,184
RDW (%)	18,1	15,7	0,111	18,4	17,2	0,343
Reticulócitos (%)	9,9	6,7	0,016*	9,1	6,6	0,109
Plaquetas (/mm ³)	490000	532000	0,988	470000	540000	0,470
Leucócitos (/mm ³)	11700	7900	0,009*	12400	10350	0,079
Hb F (%)	9,7	8,0	0,659	9,7	8,6	0,628
Bil. Total (mg/dL)	2,7	2,1	0,240	2,3	1,8	0,434
Bil. Direta (mg/dL)	0,7	0,8	0,826	0,7	0,5	0,756
Bil. Indireta (mg/dL)	1,7	1,4	0,223	1,7	1,3	0,585
LDH (U/L)	1168	980	0,122	1282	1035	0,248
AST (U/L)	44	41	0,292	45	43	0,856
Ferritina (ng/mL)	531	492	0,807	427	503	0,667

P: p valor calculado pelo Teste de Mann-Whitney

* Estatisticamente significativo

Tabela 17 – Distribuição dos valores medianos dos parâmetros laboratoriais analisados para os pacientes HbSS, de acordo com o haplótipo β^S

Parâmetro Laboratorial	Haplótipo β^S		P	Haplótipo β^S (sem uso de hidroxiureia)		P
	CAR/CAR	Outros		CAR/CAR	Outros	
	(n=67)	(n=42)		(n=36)	(n=26)	
Hemoglobina (g/dL)	8,0	8,5	0,021*	8,1	8,2	0,517
Hemácias ($\times 10^{12}/L$)	2,6	2,9	0,029*	2,7	2,7	0,453
Hematócrito (%)	25,2	26,6	0,051	25,1	24,9	0,902
VCM (fL)	94,8	92,0	0,442	91,2	88,3	0,264
HCM (pg)	30,4	30,5	0,821	29,2	29,1	0,517
CHCM (g/dL)	31,7	32,0	0,924	31,7	32,9	0,452
RDW (%)	18,1	17,9	0,501	18,5	18,1	0,708
Reticulócitos (%)	8,6	9,7	0,164	8,0	9,1	0,822
Plaquetas (/mm ³)	504.000	443.000	0,156	505000	442000	0,378
Leucócitos (/mm ³)	11.100	11.800	0,297	12000	12400	0,879
Hb F (%)	9,3	10,4	0,710	9,4	10,6	0,615
Bil. Total (mg/dL)	2,7	2,3	0,306	2,7	2,1	0,257
Bil. Direta (mg/dL)	0,7	0,7	0,597	0,7	0,7	0,503
Bil. Indireta (mg/dL)	1,8	1,6	0,339	1,8	1,3	0,396
LDH (U/L)	1.163	1.055	0,671	1230	1049	0,512
AST (U/L)	44,5	43,5	0,592	45	43	0,976
Ferritina (ng/mL)	477	542,5	0,824	394	528	0,408

P: p valor calculado pelo Teste de Mann-Whitney

* Estatisticamente significativo

Tabela 18 – Distribuição dos valores medianos dos parâmetros laboratoriais analisados para os pacientes HbSS, de acordo com o genótipo da haptoglobina

Parâmetro Laboratorial	Haptoglobina		P	Haptoglobina (sem uso de hidroxiureia)		P
	Hp2-1 / Hp2-2	Hp1-1		Hp2-1 / Hp2-2	Hp1-1	
	(n=81)	(n=28)		(n=44)	(n=18)	
Hemoglobina (g/dL)	8,4	8,1	0,217	8,2	8,0	0,205
Hemácias ($\times 10^{12}/L$)	2,7	2,7	0,735	2,7	2,6	0,466
Hematócrito (%)	26,0	24,4	0,080	25,9	24,2	0,065
VCM (fL)	94,9	91,6	0,171	91,0	88,8	0,475
HCM (pg)	30,5	30,4	0,351	29,1	29,1	0,796
CHCM (g/dL)	31,7	32,9	0,259	31,7	32,9	0,194
RDW (%)	17,4	19,6	0,026*	18,1	21,3	0,066
Reticulócitos (%)	8,2	10,9	0,380	7,8	10,8	0,546
Plaquetas (/mm ³)	509000	432000	0,040*	512000	437500	0,112
Leucócitos (/mm ³)	11600	11400	0,981	12200	12450	0,969
Hb F (%)	9,2	11,3	0,653	9,3	12,1	0,869
Bil. Total (mg/dL)	2,5	2,5	0,689	2,2	2,8	0,614
Bil. Direta (mg/dL)	0,7	0,7	0,442	0,7	0,6	0,272
Bil. Indireta (mg/dL)	1,7	1,6	0,684	1,5	2,0	0,466
LDH (U/L)	1120	1222	0,154	1130	1780,5	0,001*
AST (U/L)	43	57	0,092	43	58,5	0,016*
Ferritina (ng/mL)	566	353	0,018*	566	305	0,003*

P: p valor calculado pelo Teste de Mann-Whitney

* Estatisticamente significativo

5. DISCUSSÃO

A doença falciforme é uma doença crônica, degenerativa e auto-incapacitante, afetando o paciente e sua família de um modo intenso e permanente (Pereira et al., 2013). Suas complicações clínicas são numerosas e podem afetar cada órgão do corpo (Ballas et al., 2012b). No entanto, as manifestações fenotípicas da doença variam consideravelmente entre diferentes pacientes e no mesmo paciente ao longo do tempo, tanto em frequência quanto em gravidade (Ballas et al., 2010).

A população de pacientes estudada se caracterizou pelo predomínio de indivíduos nas faixas etárias mais jovens, que se autodeclararam pardos, apresentavam baixo nível socioeconômico e residiam em municípios razoavelmente distantes dos centros de referência para tratamento de sua condição clínica.

Este perfil etário se mostrou semelhante ao encontrado por Máximo (2009) no estado do Rio de Janeiro, e Martins et al. (2010) em Minas Gerais. Embora os indivíduos com idades mais avançadas pudessem estar subrepresentados no nosso estudo, a predominância de crianças e jovens parece demonstrar a gravidade da doença, com os pacientes apresentando baixa expectativa de vida, apesar dos importantes avanços que surgiram nas últimas décadas para o tratamento e prevenção das complicações da doença. O predomínio de pardos segue o padrão étnico encontrado no Rio Grande do Norte (IBGE, 2010) e parece ser reflexo das particularidades da formação da nossa população, aonde a influência do negro não foi tão marcante como em outros estados do Brasil (Cascudo, 1955). A predominância da ascendência indígena entre aqueles que relataram terem informações sobre a origem dos seus antepassados corrobora esta hipótese. No entanto, estudos realizados no Brasil demonstraram que as doenças falciformes são mais frequentes em negros e afro-descendentes (Cançado e Jesus, 2007; Santos e Gomes Neto, 2013). É possível, então, que a distribuição por etnia autodeclarada encontrada neste estudo possa ter sido influenciada, também, por algum grau de preconceito dos indivíduos analisados, que muitas vezes preferem se declarar pardos ao invés de negros.

O baixo nível de escolaridade encontrado (36,5% dos pacientes com idade superior a 18 anos apresentava no máximo o ensino fundamental) se assemelha ao descrito pelo IBGE (2013) para a população do Rio Grande do Norte e provavelmente se deve tanto ao próprio meio social no qual o paciente vive, quanto ao absenteísmo escolar decorrente das constantes crises

dolorosas e hospitalizações. Achados semelhantes foram observados em estudos recentes realizados em Minas Gerais (Felix et al., 2010; Pereira et al., 2013), Rio de Janeiro (Loureiro et al., 2008) e na Bahia (Santos e Gomes Neto, 2013). Embora representem um avanço, quando comparados ao estudo realizado por Paiva e Silva et al. (1993) no início da década de 90 em pacientes do estado de São Paulo, estes resultados se mostraram aquém do desejado para permitir a inclusão social e inserção dos pacientes no mercado de trabalho. Além do impacto socioeconômico, a pouca instrução dos pacientes e seus responsáveis pode comprometer a adesão ao tratamento recomendado pela equipe de saúde (Reiners et al., 2008; Eckrich et al., 2013).

A renda familiar relatada pela maioria dos indivíduos analisados os enquadram no extrato social dos 20% mais pobres da região nordeste e do Brasil (IBGE, 2013). Esta baixa renda, associada à escolaridade precária e à alta taxa de desemprego encontrada na população estudada, gera uma condição de vulnerabilidade social que compromete a qualidade de vida dos pacientes e os tornam dependentes de programas governamentais de distribuição de renda e assistência à saúde. Resultados similares foram relatados em outros estudos realizados no Brasil (Paiva e Silva et al., 1993; Felix et al., 2010; Gomes et al., 2011; Santos e Gomes Neto, 2013; Pereira et al., 2013). Pesquisa cubana do início dos anos 90 mostrou que o estabelecimento de programas de orientação vocacional, com colocação profissional destes indivíduos em atividades compatíveis com a doença pode ajudar a mudar esta realidade (Svarc et al., 1991).

Apesar deste baixo padrão socioeconômico, 34,2% destes indivíduos não recebiam nenhum dos benefícios sociais a que teriam direito, tanto pela sua condição social quanto pelas características da doença, o que compromete ainda mais sua qualidade de vida.

No entanto, os avanços alcançados nas últimas décadas têm melhorado sobremaneira o prognóstico dos pacientes com doenças falciformes. Dentre estes, destacam-se: diagnóstico precoce da doença através dos programas de triagem neonatal e instituição da administração profilática de penicilina e imunizações para a prevenção de infecções graves na infância; educação dos pais e pacientes a respeito das formas de prevenção e reconhecimento precoce das complicações clínicas; triagem para o risco de desenvolvimento de AVE usando a ultrassonografia Doppler transcraniana; tratamento dos eventos vaso-oclusivos agudos com

hidratação, analgésicos, antibióticos e transfusões; intervenções terapêuticas, principalmente com transfusões e hidroxiureia (McGann et al., 2013).

A inclusão da detecção das hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) em 2001 e a criação da Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias em 2005 representaram não só o reconhecimento da doença como um importante problema de saúde pública no Brasil, como também marcaram o início da mudança da história natural da doença em nosso país (Cançado e Jesus, 2007).

Embora o Rio Grande do Norte tenha entrado oficialmente na fase II do PNTN apenas em 2013 (Brasil, 2013), a triagem neonatal para as hemoglobinopatias começou a ser realizada no estado desde os últimos anos da década passada. Essa iniciativa nos permitiu observar que as idades de diagnóstico da doença falciforme foram significativamente menores nos indivíduos da faixa etária ≤ 10 anos, demonstrando que a implantação destas políticas de saúde tem impactado positivamente na vida dos pacientes. A instauração do diagnóstico precoce e do tratamento dos recém-nascidos tem sido associada a uma melhoria na qualidade de vida e diminuição da mortalidade de crianças brasileiras com doença falciforme (Lobo et al., 2014)

A hidroxiureia é atualmente o principal agente farmacológico capaz de prevenir a ocorrência de complicações das doenças falciformes, melhorando a qualidade de vida e reduzindo tanto a morbidade quanto a mortalidade da doença. Ela tem sido associada a uma diminuição significativa no número de crises vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda, hospitalização e transfusões sanguíneas (Charache et al., 1996; Steinberg et al., 2010; Voskaridou et al., 2010; Thornburg et al., 2012).

Seu uso para o tratamento da doença falciforme foi aprovado no Brasil desde 2002, e as diretrizes terapêuticas nacionais recomendam a sua utilização em pacientes com condições de comparecer às consultas e realizar exames laboratoriais periódicos, e que preencham pelo menos um dos seguintes critérios nos últimos 12 meses: três ou mais episódios de crises de dor com necessidade de atendimento médico hospitalar; dois ou mais eventos leves ou moderados (ou um evento grave) de STA; episódios recorrentes de priapismo; hipoxemia crônica (saturação de O_2 persistentemente menor que 94%); concentração de Hb persistentemente menor que 7g/dL;

concentração de HbF < 8% após os 2 anos de idade; contagem de leucócitos $\geq 20.000 /\text{mm}^3$ na ausência de infecção; valores de LDH maior que duas a três vezes o valor superior da normalidade para crianças e adolescentes, respectivamente (Cançado et al., 2009).

A despeito dos seus benefícios, ela permanece significativamente subutilizada (Cançado et al., 2009; Kanter e Kruse-Jarres, 2013). Neste estudo foi constatado que aproximadamente metade dos pacientes (43,2%) fazia uso regular da hidroxiureia. Este percentual foi bem superior ao encontrado por Félix et al. (2010) em Minas Gerais e por Silva Júnior et al. (Silva Junior et al., 2012b) no Ceará, demonstrando uma boa adesão dos pacientes analisados ao medicamento e a confiança da equipe de saúde quanto a sua eficácia.

No entanto, apenas 11% das crianças com idades inferiores a 5 anos estavam sob uso da hidroxiureia, o que parece refletir as preocupações a respeito da sua toxicidade, principalmente em crianças muito jovens. Porém, os resultados do estudo “Pediatrics Hydroxyurea Phase 3 Clinical Trial (Baby HUG)” demonstraram tanto a segurança quanto os efeitos benéficos da hidroxiureia em crianças assintomáticas ou sintomáticas com anemia falciforme e sugeriram que a terapia com este fármaco deveria ser instituída em todas as crianças, e não apenas nas mais gravemente afetadas (Thornburg et al., 2012).

Os elevados índices de vacinação e de utilização profilática de penicilina também refletem a boa adesão dos pacientes e da equipe de saúde às recomendações gerais para o tratamento da doença falciforme. Nossos resultados se assemelham aos obtidos por Frauches et al. (Frauches et al., 2010), no que se refere a cobertura vacinal dos pacientes com doenças falciformes do estado do Espírito Santo. O percentual de utilização de penicilina profilática foi próximo ao encontrado por Gomes et al. (2011) em pacientes de Minas Gerais. No entanto, como não foi possível avaliar diretamente o cartão vacinal de todos os pacientes, nem se verificar a adesão à penicilina por métodos mais precisos, é possível que os índices encontrados estejam superestimados. Os menores percentuais encontrados nas faixas etárias mais elevadas podem ser explicados pelo fato de estas recomendações terem sido estabelecidas nas décadas de 80 e 90.

Apesar destes bons índices de adesão ao tratamento e medidas preventivas, um percentual significativo (31,6%) dos pacientes relatou dificuldades para conseguir as medicações prescritas, principalmente a hidroxiureia. Os elevados custos destas medicações e a baixa condição

socioeconômica destes indivíduos os tornam dependentes dos programas estatais de distribuição de medicamentos. A ocorrência de entraves financeiros e administrativos nestes programas, tão frequentes no Rio Grande do Norte, pode fazer com que eventualmente eles não tenham acesso à terapia recomendada.

A distância aos centros de referência também se constitui uma barreira para a implementação da política de atenção integral aos pacientes com doenças falciformes, uma vez que restringe o seu deslocamento aos serviços de saúde (Wolfson et al., 2012). Somado a isso, a necessidade de viajar para realizar o tratamento coloca a vida do paciente em risco. Estudo realizado por Fernandes (Fernandes, 2007) indicou que a dificuldade de deslocamento para os serviços de saúde representou um fator de risco importante para a morte prematura destes indivíduos. Em nosso estudo, quase metade (43,9%) dos pacientes morava em municípios razoavelmente distantes dos centros de referência e 17,4% relataram dificuldades para se deslocar a estes locais para a realização do acompanhamento médico e tratamento recomendado.

Portanto, faz-se necessário aprimorar as políticas públicas destinadas aos pacientes com doenças falciformes, levando-se em consideração o baixo nível socioeconômico, as características demográficas e as dificuldades enfrentadas para a realização do tratamento recomendado. Para serem efetivas, estas medidas precisam proporcionar, além do acesso ao tratamento médico, a orientação psicossocial necessária ao desenvolvimento do seu potencial de integração à sociedade, de modo a modificar favoravelmente a realidade vivida pelos indivíduos com esta doença.

A incidência das complicações clínicas variou de forma significativa entre as diferentes faixas etárias consideradas e seguiu o padrão geral descrito na literatura (Steinberg et al., 2009; Meier e Miller, 2012; Serjeant, 2013). Nas crianças com menor idade predominaram as infecções bacterianas graves, a síndrome torácica aguda e o sequestro esplênico, semelhante ao encontrado por Lobo et al. (2014) em pacientes do Rio de Janeiro nesta faixa etária.

As infecções bacterianas e a síndrome torácica aguda, ao contrário do sequestro esplênico agudo, continuaram sendo eventos clínicos muito comuns nas demais faixas etárias consideradas. Esta alta incidência de infecções foi semelhante à encontrada por Loureiro et al. (2008) em pacientes do Rio de Janeiro e demonstra a susceptibilidade aumentada destes indivíduos a

infecções invasivas. Falhas no esquema vacinal e/ou na administração regular da penicilina, deficiências nutricionais importantes e seleção de sorotipos bacterianos não cobertos pela vacina ou resistentes a penicilina também podem contribuir para estes percentuais permaneçam elevados, apesar dos bons níveis registrados de vacinação e de administração profilática de penicilina (Mccavit et al., 2011). A frequência observada de STA foi similar a descrita por Araújo et al (Araújo et al., 2011) em pacientes de Sergipe e superior a relatada por Loureiro et al (2008) no Rio de Janeiro e representou uma importante causa de morbidade na nossa população.

A partir dos 6 anos de idade a colelitíase surgiu como uma complicação frequente nos pacientes analisados, com um aumento da sua incidência nas faixas etárias subsequentes. Estudos realizados por Gumiero et al (2008) e Almeida et al. (2009) em pacientes de Campinas e Salvador, respectivamente, apresentaram resultados semelhantes. Estes achados parecem ser o resultado do processo hemolítico crônico, característico da doença.

Outras complicações comuns durante a infância tardia e a adolescência foram o retardo no crescimento e no ganho de peso. Cipolotti et al. (2000), Silva e Viana (2002) e Zago et al. (1992) relataram estes atrasos no desenvolvimento em crianças e adolescentes com doenças falciformes, mas com percentuais superiores ao encontrado em nosso estudo.

O AVE ocorreu com uma frequência considerável (9,7%) nos pacientes analisados, com uma maior incidência na faixa dos 11-15 anos, embora não tenha sido notadas diferenças significativas com as demais faixas etárias. Este percentual foi superior ao relatado por Adorno et al. (2008) na Bahia e semelhante ao relatado por Domingos et al. (2014) em pacientes de Pernambuco. A incidência elevada desta séria complicação clínica pode ser explicada tanto pelas características genéticas e socioeconômicas da nossa população, quanto pelo fato de a triagem com DTC ter se iniciado no Rio Grande do Norte apenas em 2011. Estudos posteriores serão necessários para se confirmar o impacto do DTC na incidência dessa complicação grave nos pacientes do estado.

O priapismo despontou como um evento clínico razoavelmente comum a partir da adolescência e se constituiu na segunda complicação mais frequente após os 30 anos de idade. Esta incidência em crianças e adolescentes se mostrou semelhante a descrita por Furtado et al (2012) em indivíduos de Salvador na mesma faixa etária. Já a alta frequência nos pacientes mais velhos foi similar a encontrada por Emond et al. (1980) em pacientes jamaicanos adultos, embora o número de indivíduos analisados no nosso estudo tenha sido bem inferior.

De modo semelhante, as alterações cardiovasculares começaram a figurar entre os eventos clínicos mais comuns desde a faixa dos 11-15 anos, com sua incidência aumentando consideravelmente nas idades mais avançadas. Estudo realizado em Sergipe por Cipolotti et al. (2001) também apresentou uma correlação significativa entre a idade dos pacientes com doença falciforme e as alterações cardiovasculares. Vicari et al. (2005) reportou uma alta incidência de alterações cardiovasculares em pacientes brasileiros, com a grande maioria (88%) dos indivíduos do seu estudo apresentando aumento da massa ventricular esquerda, embora a incidência de outras complicações tenha sido bem inferior.

As alterações renais e a necrose óssea só apareceram entre as complicações mais comuns na faixa etária mais avançada, não obstante tenham sido diagnosticados também em crianças, adolescentes e adultos jovens. Estudo realizado por Silva Júnior et al. (2012b) em pacientes com doença falciforme do estado do Ceará mostrou que a idade estava associada a ocorrência de anormalidades renais importantes, embora tenham sido notadas alterações renais iniciais, principalmente hiperfiltração glomerular, em pacientes mais jovens. Milner et al. (1991) e também observaram uma associação e maior incidência de osteonecrose nas idades mais avançadas, com percentuais que não diferiram significativamente dos nossos nas faixas etárias correspondentes.

A ocorrência de úlceras de perna foi descrita já a partir dos 12 anos, sendo o evento clínico mais frequentemente relatado nos indivíduos com idades superiores a 30 anos. Koshy et al. (1989) também relatou incidência significativamente maior desta complicação nas faixas etárias mais avançadas. No entanto, os percentuais encontrados no nosso estudo foram bem inferiores aos relatados por Figueiredo et al. (1996) em pacientes de Campinas-SP (40,0%), e por Madu et al. (2013) em pacientes nigerianos (27,5%). Este achado pode ser explicado pela menor idade dos nossos pacientes, somado ao fato de a frequência de úlcera de perna variar significativamente entre diferentes populações (Minniti et al., 2010; Ballas et al., 2012b).

As transfusões sanguíneas são um componente muito importante para o tratamento dos indivíduos com doenças falciformes, constituindo-se em um dos principais responsáveis pela diminuição da morbimortalidade da doença nas últimas décadas. De modos gerais, elas podem ser administradas de formas intermitentes ou de modo crônico. A modalidade crônica se caracteriza pela administração de concentrado de hemácias a cada 3-6 semanas, objetivando manter as concentrações de HbS menor que 30% (Josephson et al., 2007).

A instauração da terapia transfusional crônica é indicada, principalmente, para a prevenção da recorrência de AVE e do desenvolvimento de AVE primário em crianças e adolescentes sob alto risco para esta complicação, identificados através da triagem com DTC (McGann et al., 2013). Recomenda-se, ainda, o seu estabelecimento em crianças com menos de 2 anos que sofreram sequestros esplênicos recorrentes, até que elas atinjam idade segura (2-3 anos) para a realização da esplenectomia, e em pacientes com problemas renais crônicos e em casos de gravidez complicada (Josephson et al., 2007; Meier e Miller, 2012). Em alguns centros, a transfusão crônica tem sido implantada, também, em pacientes que apresentam hipertensão pulmonar e frequências elevada de crises graves de dor, síndrome torácica aguda e priapismo (Josephson et al., 2007).

Diante disso, consideramos a necessidade de implantação da terapia transfusional crônica como um marcador de gravidade da doença falciforme. Sua análise permite a avaliação simultânea de um número maior de eventos clínicos. Soma-se, ainda, o fato da verificação do seu estabelecimento ser menos sujeita a subjetividades de diagnóstico e a problemas de anotação das características clínicas dos pacientes pela equipe médica.

No nosso estudo não foram observadas diferenças significativas no percentual de pacientes que necessitaram da terapia transfusional entre as faixas etárias consideradas, e em alguns deles ela foi implementada para o tratamento de úlceras de perna refratárias às demais opções terapêuticas disponíveis.

Apesar de ter sido descrito como um dos principais fatores que influenciam a gravidade da doença (Steinberg e Sebastiani, 2012; Serjeant, 2013), os genótipos responsáveis pelo desenvolvimento da doença falciforme não apresentaram diferenças significativas na incidência da maioria das complicações clínicas analisadas, provavelmente em virtude do pequeno número de indivíduos HbS-talassemia β e HbSC incluídos no estudo. No entanto, pode-se notar que os pacientes HbSC apresentaram características laboratoriais mais próximas da normalidade e uma tendência de desenvolver menos eventos clínicos, enquanto os indivíduos HbSS possuíam um perfil hematológico e bioquímico de uma doença hemolítica mais acentuada, e um quadro clínico mais grave. O maior percentual de pacientes HbSS que se submeteram a terapia transfusional crônica em algum momento das suas vidas corroboram estes achados. Os pacientes HbS-

talassemia β , por sua vez, mostraram frequências de eventos clínicos semelhantes ao dos indivíduos HbSS, mas características laboratoriais de doença hemolítica menos acentuadas.

A frequência de talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3.7}$) encontrada neste estudo foi inferior às relatadas para pacientes com doença falciforme de outros estados do Brasil (Figueiredo et al., 1996; Lima et al., 2006; Bezerra et al., 2007; Adorno et al., 2008; Belisário et al., 2010b; Lemos Cardoso e Guerreiro, 2010; Silva Filho et al., 2010). Alcoforado et al. (2012) relatou um percentual de talassemia alfa muito semelhante ao nosso em um estudo populacional realizado em indivíduos adultos do Rio Grande do Norte. Portanto, esta baixa frequência encontrada parece refletir as características genéticas gerais da nossa população, não tendo sido notadas maiores prevalências nesta subpopulação de indivíduos com doenças falciformes.

Vários estudos têm analisado a influência da co-herança da talassemia alfa na sobrevida e nas características clínicas e laboratoriais dos pacientes com doença falciforme, obtendo resultados conflitantes entre si (Belisário e Viana, 2010; Cox et al., 2014; Domingos et al., 2014; Figueiredo et al., 1996; Flanagan et al., 2011). A análise das características laboratoriais dos nossos pacientes revelou que os indivíduos que coerdaram a talassemia alfa apresentaram maiores níveis de hemácias e hematócrito, e menores valores de HCM, além de uma tendência a ter maiores concentrações de Hb e menores valores de VCM e leucócitos, mesmo quando se eliminaram das análises os pacientes que faziam uso regular de hidroxiiureia. Estes resultados foram semelhantes ao relatado por Figueiredo et al. (1996), Adorno et al. (2008) e Belisário et al. (2010b) em estudos realizados com pacientes da São Paulo, Bahia e de Minas Gerais, respectivamente, e parece refletir os efeitos da talassemia alfa na diminuição das concentrações intracelulares de HbS e no grau de hemólise destes pacientes, bem como no estado inflamatório característico da doença.

No entanto, não foram observadas associações significativas da ocorrência de talassemia alfa com nenhum dos eventos clínicos avaliados, similarmente aos achados reportados por Silva Filho et al. (2011), Adorno et al. (2008) e Figueiredo et al. (1996), embora tenha sido notada uma frequência aumentada de algumas complicações (colelitíase, sequestro esplênico, retardo no crescimento e no ganho de peso, úlcera de perna e alterações cerebrovasculares) entre os indivíduos que não herdaram a talassemia α . Outros estudos realizados no Brasil e que analisaram um número bem maior de pacientes conseguiram demonstrar o efeito protetor da

talassemia α contra o desenvolvimento de alterações cerebrovasculares (Belisário et al., 2010b; Domingos et al., 2014). É provável que a menor frequência da talassemia alfa e o número de pacientes avaliados neste estudo possam explicar os nossos resultados.

Além de serem descritos como importantes moduladores genéticos da gravidade da doença falciformes, o estudo dos haplótipos β^S apresenta grande significado do ponto de vista histórico e antropológico (Romero et al., 1998). A frequência destes haplótipos varia significativamente entre as diferentes regiões Africanas aonde a mutação β^S se originou. Uma vez que esta alteração genética não foi detectada na população nativa do continente Americano, a sua introdução nas Américas se deu basicamente pela imigração forçada de seres humanos durante o tráfico de escravos nos séculos 16, 17, 18 e 19. Portanto, a proporção relativa destes haplótipos β^S reflete a origem e quantidade de escravos que chegaram durante o período colonial, além do fluxo migratório interno destes escravos e os níveis de miscigenação da população (Lemos Cardoso e Guerreiro, 2006; Belisário et al., 2010a).

Os principais portos de entrada de escravos no Brasil eram Salvador, Recife e Rio de Janeiro. Ao estado da Bahia chegavam escravos trazidos, principalmente, da Nigéria, Benin e Costa do Marfim, regiões com predomínio do haplótipo Benin. Já os Bantus, capturados no Congo, Angola e Moçambique eram enviados para Pernambuco, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Vincentino e Dorigo, 2002). No Rio Grande do Norte (RN), como as atividades econômicas principais durante o período colonial (criação de gado e pequenas lavouras) não requeriam muita força de trabalho escrava, a influência africana na formação étnica da sua população não foi tão marcante como em outros estados. Apenas poucos escravos, vindos principalmente de Pernambuco, foram enviados ao estado e trabalhavam basicamente como vaqueiros ou empregados domésticos (Cascudo, 1955; Mariz e Suassuna, 2002).

O perfil de haplótipos β^S encontrados no nosso estudo confirma estes dados históricos. A alta frequência do haplótipo CAR (77,5%), seguida do haplótipo Benin (11,9%) nos pacientes HbSS analisados foi bastante semelhante a encontrada por Bezerra et al. (2007) e Santos et al. (2011) em Pernambuco, de onde vinham a maioria dos escravos enviados ao RN. O predomínio do haplótipo CAR também foi observado em outros estados do país, mas com um percentual inferior ao nosso (Figueiredo et al., 1996; Lemos Cardoso e Guerreiro, 2006; Silva et al., 2009; Belisário et al., 2010a; Okumura et al., 2013). Diferentemente desses achados, a Bahia

apresentou maior proporção do haplótipo Benin, conforme esperado pela origem dos escravos que eram destinados para a região (Adorno et al., 2008).

A frequência do haplótipo Benin em nosso estudo foi significativamente inferior ao relatado para os demais estados do Brasil, com exceção de Pernambuco. Além disso, o percentual observado do haplótipo Camarões foi bem superior ao encontrado nos demais estados, tendo sido encontrado, inclusive, um paciente homozigoto para este haplótipo, algo não descrito previamente no Brasil. Estudo anterior realizado no Rio Grande do Norte por Cabral et al. (2011) já tinha observado esta frequência aumentada do haplótipo Camarões, mesmo analisando um número menor de pacientes, o que sugere as particularidades da formação étnica da nossa população.

Alencastro (2000) relatou a ocorrência do embarque de escravos africanos provenientes das regiões de Andra, Benin, Warri, Calabar e Camarões para Pernambuco durante a ocupação holandesa no nordeste, confirmando a entrada de indivíduos naturais de áreas com alta frequência do haplótipo Camarões na região. É possível que, dentre os poucos escravos que vieram para o Rio Grande do Norte, a proporção de indivíduos com o haplótipo Camarões fosse superior à encontrada nas populações de escravos que foram enviados para os demais estados do país. Portanto, o percentual de indivíduos com estas características genéticas, provavelmente, se manteve superior ao encontrado nas demais regiões do país a medida que a população do RN foi crescendo.

A distribuição dos haplótipos β^{tal} encontrados nos indivíduos que possuíam a interação HbS-talassemia β se mostrou significativamente diferente da observada por Bezerra (2007) em pacientes do estado de Pernambuco, e pode ser o reflexo das diferenças nos tipos de mutações responsáveis pelo fenótipo talassêmico nestas populações. A maior prevalência do haplótipo V em nosso estudo provavelmente se deve ao predomínio da mutação IVS-I-1 (G→A) na nossa população e reflete as características genéticas peculiares dos pacientes analisados. No entanto, o pequeno número (23) de indivíduos analisados pode ter influenciado os nossos resultados.

A avaliação das características laboratoriais entre os pacientes que não faziam uso de hidroxiureia revelou não haver diferenças significativas para os parâmetros analisados entre os indivíduos CAR/CAR e os que possuíam outra combinação de haplótipos. Resultados semelhantes foram encontrados por Belisário et al. (2010b), estudando crianças com doenças falciformes provenientes de Minas Gerais. Figueiredo et al. (1996), e Luporini et al. (2001)

observaram associação dos haplótipos apenas com os níveis de HbF ao analisarem pacientes de São Paulo.

A maioria dos trabalhos que reportaram diferenças nas características hematológicas entre pacientes com diferentes haplótipos β^S foram realizados em populações aonde os tipos Senegal e Árabe-Indiano apresentavam uma frequência razoável (Nagel et al., 1991; Adekile e Huisman, 1993; Green et al., 1993). Os resultados não significativos observados em nosso estudo podem ser devido à ausência de indivíduos com estes haplótipos, ou ao pequeno número de pacientes que possuía o tipo Benin. De modo inesperado, a mediana dos valores de HbF encontrada nos pacientes CAR/CAR foi elevada (9,4%), mesmo entre aqueles que não faziam uso hidroxiureia. Portanto, outros fatores genéticos que não foram avaliadas neste estudo, tais como polimorfismos nos loci BCL11A e HBS1L-MYB, além da predominância de indivíduos nas faixas etárias mais jovens, podem estar influenciando significativamente na determinação do fenótipo dos pacientes (Lettre et al., 2008; Fertrin e Costa, 2010).

Quando os indivíduos que faziam uso da hidroxiureia foram incluídos nas análises, os pacientes com outras combinações de haplótipos apresentavam valores significativamente maiores de Hb e hemácias que os CAR/CAR. Estudos realizados por Steinberg et al. (1997) mostraram que a ausência de haplótipo CAR estava associada a uma melhor resposta terapêutica a hidroxiureia. Nossos resultados parecem sugerir algo semelhante, embora o desenho do estudo e o número de pacientes analisados não nos permitam afirmar isso com segurança.

Desde a primeira demonstração que os haplótipos β^S poderiam ser um dos responsáveis pela variabilidade clínica das doenças falciformes (Powars et al., 1990), vários trabalhos tentaram analisar esta correlação, obtendo resultados controversos. No Brasil, estudos realizados por Belisário et al. (2010a), Figueiredo et al. (1996) e Adorno et al. (2008) não relataram associações entre a combinação de haplótipos CAR/CAR e a maior incidência das complicações clínicas analisadas. Domingos et al. (2014), por sua vez, observaram que os pacientes de Pernambuco com esta característica genética apresentavam risco significativamente aumentado de desenvolverem AVE.

Nossos resultados mostraram associação significativa do genótipo CAR/CAR apenas com o retardo no crescimento e uma tendência de associação com a ocorrência de alterações cardiovasculares e menor incidência de alterações oftalmológicas, eventos clínicos pouco

avaliados na maioria dos estudos que analisaram a correlação destas características genéticas com o fenótipo dos indivíduos com doenças falciformes.

Luporini et al. (2001) observaram uma maior redução na velocidade de crescimento e menores níveis de fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I) em pacientes com haplótipos CAR/CAR, quando comparados aos Benin/Benin. Alterações neuroendócrinas semelhantes, taxas metabólicas mais elevadas, bem como deficiências nutricionais mais acentuadas entre os indivíduos CAR/CAR do nosso estudo, causadas provavelmente por uma maior frequência de internações hospitalares ao longo da vida, podem ser as razões desta maior incidência de retardo no crescimento nestes pacientes, embora não tenham sido observadas diferenças significativas no número de internações nos últimos 12 meses.

Não foram encontrados nas bases de dados pesquisadas trabalhos que tentaram correlacionar a ocorrência de alterações cardiovasculares com os haplótipos β^S , mas imagina-se que os menores níveis de Hb encontrados nos indivíduos CAR/CAR promovam um aumento maior do volume plasmático e do débito cardíaco, com o subsequente aumento das câmaras cardíacas, massa ventricular e outras manifestações cardiovasculares.

Em virtude do modo como a ocorrência de alterações oftalmológicas foi avaliada e do pequeno número de casos encontrados em nosso estudo, a menor incidência deste evento clínico em indivíduos CAR/CAR provavelmente foi efeito do acaso. Lima et al (2006) não encontrou associação significativa entre a ocorrência de alterações oftalmológicas e os haplótipos β^S em pacientes de São Paulo. No entanto, os nossos achados podem ser reflexo dos maiores níveis de hemoglobina encontrados nos pacientes com as outras combinações de haplótipos que aumentaria a probabilidade de ocorrência de eventos vaso-oclusivos na retina.

A associação dos genótipos da haptoglobina com o desenvolvimento de complicações micro e macro-vasculares em doenças crônicas tem sido bastante estudada (Wobeto et al., 2008; Levy et al., 2010; Goldenstein et al., 2012; Vardi et al. 2012). No entanto poucos trabalhos têm analisado a sua correlação com a evolução clínica da doença falciforme, apesar dos pacientes com esta patologia apresentarem alterações importantes a nível vascular.

Em nosso estudo, a distribuição dos genótipos da haptoglobina foi semelhante à encontrada por Santos et al. (2011) em pacientes de Pernambuco, reforçando os dados obtidos com a análise dos haplótipos do cluster β a respeito do fluxo do gene β^S para o Rio Grande do Norte.

Hughes et al. (2005) analisaram a frequência destes genótipos em pacientes pediátricos e adultos com doença falciforme e constataram que o alelo HP*2 era significativamente menos prevalente nos adultos. Diante disso, foi sugerido que o alelo HP*1 poderia estar associado a alguma vantagem de sobrevivência nos pacientes com esta doença.

Nossos resultados não revelaram diferenças significativas na distribuição dos genótipos da haptoglobina entre as diferentes faixas etárias, similarmente ao observado por Santos et al. (2011). No entanto, a herança do alelo HP*2 esteve significativamente associada à necessidade de instauração da terapia transfusional crônica e apresentou tendência a uma maior frequência de alterações cerebrovasculares e retardo no crescimento, sugerindo uma predisposição destes indivíduos ao desenvolvimento de eventos clínicos graves da doença falciforme. Os níveis mais elevados de ferritina nos pacientes com estas características genéticas corroboraram com estes achados.

Estudos realizados por Barbosa et al. (2014) em pacientes de Brasília também mostraram correlações significativas dos genótipos da haptoglobina com os níveis de ferritina, número de transfusões sanguíneas ao longo da vida e com a ocorrência de AVE. Em uma meta-análise realizada por Vardi et al. (2012) foi constatado que o genótipo Hp2-2 se encontrava associado com o desenvolvimento de AVE em pacientes diabéticos. No entanto, Cox et al. (2014) não observaram associação semelhante ao tentar correlacionar estes genótipos com a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral em pacientes da Tanzânia.

Nossos dados sugerem que a depuração mais rápida do complexo Hp1-1-Hb possivelmente diminui os efeitos tóxicos da Hb na corrente sanguínea e na biologia vascular, contribuindo para o estabelecimento de um quadro clínico menos grave da doença falciforme. No entanto, os valores de LDH e AST foram menores entre os portadores do alelo HP*2, indicando um quadro hemolítico menos acentuado nestes indivíduos. Esta diferença deixou de existir quando foram incluídos na análise os pacientes que usavam hidroxiureia.

Diante destes achados, podemos concluir que as características genéticas avaliadas neste estudo influenciaram de forma mais ou menos intensa a evolução clínica dos pacientes com doença falciforme do estado do Rio Grande do Norte. A ausência de associação significativa com a maioria das complicações que estes indivíduos desenvolveram reflete a natureza multifatorial destes eventos. É possível que outros fatores genéticos, socioeconômicos e

ambientais da população estudada possam determinar a ocorrência destas complicações de maneira mais direta e intensa.

O pequeno número de pacientes que desenvolveram determinados eventos clínicos pode ter influenciado os nossos resultados e, também, pode não ser suficientemente representativo da população de indivíduos com doenças falciformes no estado do Rio Grande do Norte. Outra provável fonte de viés foi a próprio desenho experimental do trabalho: Como se tratou de um estudo transversal retrospectivo, definiu-se que os pacientes apresentariam uma determinada característica baseando-se na análise dos seus prontuários, que foram gerados para fins clínicos e não para a pesquisa. Portanto, é provável que alguns profissionais possam não ter registrado todas as informações que consideramos relevantes, o que pode ter diminuído a capacidade de detectar alguma associação que deveria existir.

6. CONCLUSÕES

- A população de pacientes com doenças falciformes do estado do Rio Grande do Norte analisada se caracterizou pelo predomínio de indivíduos nas faixas etárias mais jovens, que se autodeclararam pardos, com baixo nível socioeconômico e que residiam em municípios razoavelmente distantes dos centros de referência para tratamento de doenças hematológicas;
- As idades de diagnóstico da doença falciforme foram significativamente menores nos indivíduos mais jovens, comprovando a importância da triagem neonatal no diagnóstico precoce da doença;
- Alto percentual dos pacientes apresenta dificuldades para a realização do tratamento recomendado pela equipe de saúde, destacando-se o acesso às medicações prescritas e o deslocamento para os serviços de saúde para a realização do acompanhamento clínico;
- A maioria dos pacientes estava em uso ou já tinha se submetido a terapias preventivas de complicações clínicas das doenças falciformes. No entanto, a frequência de utilização da hidroxiuréia em crianças ainda era muito baixa.
- As complicações clínicas mais frequentemente apresentadas pelos pacientes foram as infecções bacterianas graves, síndrome torácica aguda, colelitíase e alterações cardiovasculares, notando-se variações significativas nas incidências dos eventos clínicos entre as diferentes faixas etárias.
- A co-herança da talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3.7}$) não mostrou associação significativa com nenhuma das complicações clínicas avaliadas. No entanto, os pacientes com este perfil genético apresentaram características laboratoriais sugestivas de um quadro hemolítico menos acentuado.
- O perfil de haplótipos β^S se mostrou semelhante ao encontrado em pacientes do estado de Pernambuco, confirmando os dados históricos sobre a origem dos escravos africanos que vieram para o Rio Grande do Norte, e a homozigose do haplótipo CAR esteve associada a uma maior incidência de retardo no crescimento, além de apresentar uma tendência a desenvolver mais alterações cardiovasculares e menos alterações oftalmológicas.
- A herança do alelo HP*2 esteve significativamente associada à necessidade de instauração da terapia transfusional crônica ao longo da vida e a níveis mais elevados de ferritina, além de uma tendência a maiores chances de desenvolvimento de alterações cerebrovasculares e retardo no crescimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams R, McKie V, Nichols F, Carl E, Zhang DL, McKie K, et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1992;326(9):605-10.
- Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Beatrice F, Vichinsky E, Pegelow C, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med*. 1998;339(1):5-11.
- Adekile AD, Haider MZ. Haptoglobin gene polymorphisms in sickle cell disease patients with different β -globin gene haplotypes. *Med Princ Pract*. 2010;19(6):447-50.
- Adekile AD, Huisman TH. Level of fetal hemoglobin in children with sickle cell anemia: influence of gender, haplotype and alpha-thalassemia-2 trait. *Acta Haematol*. 1993;90(1):34-8.
- Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Seixas MO, Reis MG, Gonçalves MS. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. *Genet Mol Biol*. 2008;31(3):621-5.
- Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*. 2011;118(1):19-27.
- Alcoforado GHM, Bezerra CM, Lemos TMAM, Oliveira DMd, Kimura EM, Costa FF, et al. Prevalence of α -thalassemia 3.7 kb deletion in the adult population of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genet Mol Biol*. 2012;35(3):594-8.
- Alencastro LF. O tratado dos viventes – A formação do Brasil no atlântico sul. São Paulo: Editora Companhia das Letras; 2000. 554p.
- Almeida RP, Ferreira CD, Conceição J, Franca R, Lyra I, Silva LR. Hepatobiliary abnormalities in pediatric patients with sickle cell disease. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2009;39(2):112-7.
- Angulo IL. Acidente vascular cerebral e outras complicações do sistema nervoso central nas doenças falciformes. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(3):262-7.
- Araújo JG, Araújo-Melo CA, Menezes-Neto OA, Silveira DF, Correia JB, Cipolotti R. Risk factors for acute chest syndrome in patients from low socioeconomic background: a cohort study from Sergipe, Brazil. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2011;33(7):484-6.

Ataga KI, Orringer EP. Renal abnormalities in sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2000;63(4):205-11.

Aygun B, Odame I. A global perspective on sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;59(2):386-90.

Aygun B, Wruck LM, Schultz WH, Mueller BU, Brown C, Luchtman-Jones L, et al. Chronic transfusion practices for prevention of primary stroke in children with sickle cell anemia and abnormal TCD velocities. *Am J Hematol.* 2012;87(4):428-30.

Ballas SK, Eckman JR. Sickle cell pain: biology, etiology and treatment. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ (editors). *Disorders of hemoglobin – Genetics, pathophysiology, and clinical management.* Second Edition ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009. p. 497-524.

Ballas SK, Gupta K, Adams-Graves P. Sickle cell pain: a critical reappraisal. *Blood.* 2012a;120(18):3647-56.

Ballas SK, Kesen MR, Goldberg MF, Luty GA, Dampier C, Osunkwo I, et al. Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. *ScientificWorldJournal.* 2012b;2012:949535.

Ballas SK, Lieff S, Benjamin L, Dampier C, Heeney M, Hoppe C, et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2010;85(1):6-13.

Ballas SK, Lusardi M. Hospital readmission for adult acute sickle cell painful episodes: frequency, etiology, and prognostic significance. *Am J Hematol.* 2005;79(1):17-25.

Banerjee S, Jia Y, Siburt CJ, Abraham B, Wood F, Bonaventura C, et al. Haptoglobin alters oxygenation and oxidation of hemoglobin and decreases propagation of peroxide-induced oxidative reactions. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(6):1317-26.

Barbosa LCP, Miranda-Vilela AL, Hiragi CDO, Ribeiro IF, Daldegan MB, Grisolia CK, et al. Haptoglobin and myeloperoxidase (-G463A) gene polymorphisms in Brazilian sickle cell patients with and without secondary iron overload. *Blood Cells Mol Dis.* 2014;52(2-3):95-107.

- Bartolucci P, Brugnara C, Teixeira-Pinto A, Pissard S, Moradkhani K, Jouault H, et al. Erythrocyte density in sickle cell syndromes is associated with specific clinical manifestations and hemolysis. *Blood*. 2012;120(15):3136-41.
- Battersby AJ, Knox-Macaulay HH, Carrol ED. Susceptibility to invasive bacterial infections in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55(3):401-6.
- Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, et al. Heme triggers TLR4 signaling to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*. 2014;123(3):377-90.
- Belisário AR, Martins ML, Brito AMS, Rodrigues CV, Silva CM, Viana MB. β -Globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or $S\beta^0$ -thalassemia and their association with clinical and hematological features. *Acta Haematol*. 2010;124(3):162-70.
- Belisário AR, Rodrigues CV, Martins ML, Silva CM, Viana MB. Coinheritance of α -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin*. 2010;34(6):516-29.
- Belisário AR, Viana MB. Efeitos da talassemia alfa nas manifestações clínicas e hematológicas da anemia falciforme - uma revisão sistemática. *Rev Med Minas Gerais*; 2010; 20(1):312-21.
- Bezerra MAC. Aspectos clínicos, bioquímicos e moleculares das síndromes talassêmicas em população do estado de Pernambuco [Dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas (SP); 2007.
- Bezerra MA, Santos MN, Araújo AS, Gomes YM, Abath FG, Bandeira FM. Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the State of Pernambuco, Brazil. *Hemoglobin*. 2007;31(1):83-8.
- Bivalacqua TJ, Musicki B, Kutlu O, Burnett AL. New insights into the pathophysiology of sickle cell disease-associated priapism. *J Sex Med*. 2012;9(1):79-87.
- Booth C, Inusa B, Obaro SK. Infection in sickle cell disease: A review. *Int J Infect Dis*. 2010; 14(1):e2-e12.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria nº 502, de 6 de Maio de 2013.

Brown AK, Sleeper LA, Miller ST, Pegelow CH, Gill FM, Waclawiw MA. Reference values and hematologic changes from birth to 5 years in patients with sickle cell disease - Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Arch Pediatr Adolesc Med. 1994;148(8): 796-804.

Cabral CH, Serafim ES, Medeiros WR, Fernandes TAAM, Kimura EM, Costa FF, et al. Determination of β haplotypes in patients with sickle-cell anemia in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. Genet Mol Biol. 2011;34(3):421-4.

Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. Rev Bras Hematol Hemoter. 2007;29(3):204-6.

Cançado RD, Lobo C, Ângulo IL, Araújo PIC, Jesus JA. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. Rev Bras Hematol Hemoter. 2009;31(5):361-6.

Carter K, Worwood M. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. Int J Lab Hematol. 2007;29(2):92-110.

Cascudo LC. História do Rio Grande do Norte. Rio de Janeiro: Departamento de Imprensa Nacional; 1955. 524p.

Casillas FJ, Fernández IZ, Alonso JCT. Dactylitis. Semin Fund Esp Reumatol. 2013; 14(4):129-34.

Charache S, Barton FB, Moore RD, Terrin ML, Steinberg MS, Dover GJ, et al. Hydroxyurea and sickle cell anemia – Clinical utility of a myelosuppressive “switching” agent – the multicenter study of hydroxyurea in sickle cell anemia. Medicine (Baltimore). 1996;75(6):300-26.

Chen E, Matthews KA, Boyce WT. Socioeconomic differences in children's health: how and why do these relationships change with age? Psychol Bull. 2002;128(2):295-329.

Cipolotti R, Caskey MF, Franco RP, Mello EV, Dal Fabbro AL, Gurgel RQ, et al. Childhood and adolescent growth of patients with sickle cell disease in Aracaju, Sergipe, north-east Brazil. *Ann Trop Paediatr*. 2000;20(2):109-13.

Cipolotti R, Costa GB, Lima WH, Franco RP, Mello EV, Dal Fabbro AL, et al. Echocardiographic characteristics of patients with sickle cell anaemia in Sergipe, Brazil. *J Trop Pediatr*. 2001;47(2):73-6.

Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin.Chem*. 2000;46(8):1284-90.

Connes P, Lamarre Y, Waltz X, Ballas SK, Lemonne N, Etienne-Julan M, et al. Haemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2014; 165(4):564-72.

Connes P, Verlhac S, Bernaudin F. Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2013;161(4):484-98.

Conran N, Franco-Penteado C, Costa F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*. 2009;33(1):1-16.

Cox SE, Makani J, Soka D, L'esperence VS, Kija E, Dominguez-Salas P, et al. Haptoglobin, alpha-thalassaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase polymorphisms and risk of abnormal transcranial Doppler among patients with sickle cell anaemia in Tanzania. *Br J Haematol*. 2014;165(5):699-706.

Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochete J. Rapid analysis of α -3.7 thalassemia and alpha alpha alpha anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol* 1993; 83(1):105-11.

Domingos IF, Falcão DA, Hatzlhofer BL, Cunha AF, Santos MN, Albuquerque DM, et al. Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Ann Hematol*. 2014 (4 de Fev).

Ebert EC, Nagar M, Hagspiel KD. Gastrointestinal and hepatic complications of sickle cell disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(6):483-9.

Eckrich MJ, Wang WC, Yang E, Arbogast PG, Morrow A, Dudley JA, et al. Adherence to transcranial Doppler screening guidelines among children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(2):270-4.

Ejindu VC, Hine AL, Mashayekhi M, Shorvon PJ, Misra RR. Musculoskeletal manifestations of sickle cell disease. *Radiographics*. 2007;27(4):1005-21.

Elagouz M, Jyothi S, Gupta B, Sivaprasad S. Sickle cell disease and the eye: old and new concepts. *Surv Ophthalmol*. 2010;55(4):359-77.

Emond AM, Holman R, Hayes RJ, Serjeant GR. Priapism and impotence in homozygous sickle cell disease. *Arch Intern Med*. 1980;140(11):1434-7.

Felix AA, Souza HM, Ribeiro SBF. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*; 2010; 32(3):203-8.

Fernandes APPC. Caracterização e circunstâncias da ocorrência de óbitos em crianças com doença falciforme triadas pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais, no período de março de 1998 a fevereiro de 2005 [Dissertação]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

Fertrin KY, Costa FF. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. *Expert Rev Hematol*. 2010;3(4):443-58.

Fertrin KY, Melo MB, Assis AM, Saad ST, Costa FF. UDP-glucuronosyltransferase 1 gene promoter polymorphism is associated with increased serum bilirubin levels and cholecystectomy in patients with sickle cell anemia. *Clin Genet*. 2003;64(2):160-2.

Figueiredo MS, Kerbaui J, Gonçalves MS, Arruda VR, Saad ST, Sonati MF, et al. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *Am J Hematol*. 1996;53(2):72-6.

Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, Nagasubramanian R, et al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2011;117(24):6681-4.

Forget BG, Bunn HF. Classification of the disorders of hemoglobin. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(2):a011684.

Forget BG, Hardison RC. The normal structure and regulation of human globin gene cluster. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ (editors). Disorders of hemoglobin – Genetics, pathophysiology, and clinical management. Second Edition ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009. p. 46-61.

Franco RS, Yasin Z, Palascak MB, Ciraolo P, Joiner CH, Rucknagel DL. The effect of fetal hemoglobin on the survival characteristics of sickle cells. Blood. 2006;108(3): 1073-6.

Frauches DO, Matos PASBA, Vatanabe JH, Oliveira JF, Lima APNB, Moreira-Silva SF. Vacinação contra pneumococo em crianças com doença falciforme no Espírito Santo, entre 2004 e 2007. Epidemiol Serv Saude. 2010;19(2):165-72.

Furtado PS, Costa MP, Ribeiro do Prado Valladares F, Oliveira da Silva L, Lordêlo M, Lyra I, et al. The prevalence of priapism in children and adolescents with sickle cell disease in Brazil. Int J Hematol. 2012;95(6):648-51.

Gahlinger PM, Abramson JH. Computer programs for epidemiologic analysis: Stone Mountain: USD; 1995.

Gallagher PG, Joiner CH. The erythrocyte membrane. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ (editors). Disorders of hemoglobin – Genetics, pathophysiology, and clinical management. Second Edition ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009. p. 158-84.

Gaston MH, Verter JI, Woods G, Pegelow C, Kelleher J, Presbury G, et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia - A randomized trial. N Engl J Med. 1986;314(25):1593-9.

Gladwin MT, Sachdev V. Cardiovascular Abnormalities in Sickle Cell Disease. J Am Coll Cardiol. 2012;59(13):1123-33.

Goldenstein H, Levy NS, Levy AP. Haptoglobin genotype and its role in determining heme-iron mediated vascular disease. Pharmacol Res. 2012;66(1):1-6.

- Gomes LMX, Reis TC, Vieira MM, Andrade-Barbosa TL, Caldeira AP. Quality of assistance provided to children with sickle cell disease by primary healthcare services. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011;33(4):277-82.
- Green NS, Fabry ME, Kaptue-Noche L, Nagel RL. Senegal haplotype is associated with higher HbF than Benin and Cameroon haplotypes in African children with sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 1993;44(2):145-6.
- Grosse SD, Odame I, Atrash HK, Amendah DD, Piel FB, Williams TN. Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. *Am J Prev Med.* 2011;41(6 Suppl 4):s398-s405.
- Gualandro SFM, Fonseca GHH, Gualandro DM. Complicações cardiopulmonares nas doenças falciformes. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007; 29(3):291-8.
- Gumiero APDS, Bellomo-Brandão MA, Costa-Pinto EAL. Gallstones in children with sickle cell disease followed up at a Brazilian Hematology Center. *Arq Gastroenterol.* 2008;45(4):313-8.
- Halasa NB, Shankar SM, Talbot TR, Arbogast PG, Mitchel EF, Wang WC, et al. Incidence of invasive pneumococcal disease among individuals with sickle cell disease before and after the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis.* 2007;44(11):1428-33.
- Hankins J, Wang W. The painful face of poverty. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;52(2):157-8.
- Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia - 1910. *Yale J Biol Med.* 2001;74(3):179-84.
- Hidalgo A, Chang J, Jang JE, Peired AJ, Chiang EY, Frenette PS. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nat Med.* 2009;15(4):384-91.
- Hughes HY, Kutlar F, Clair B, Elam D, McKie KM, Kutlar A. Haptoglobin Genotypes among pediatric and adult sickle cell patients: an emerging genetic modifier? In: 47th ASH Annual Meeting; 2005, Blood Suppl; v. 106, Abstracts 3805.

Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* 1957; 180(4581):326-8.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Síntese dos indicadores sociais – Uma análise das condições de vida da população brasileira; 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/sinteseindicsociais2010/>. Acesso em: 09 Jun 2014.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Síntese dos indicadores sociais 2013 – Uma análise das condições de vida da população brasileira; 2013. Disponível em: Http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/sinteseindicsociais2013/default_tab_pdf.shtm. Acesso em: 09 Set 2014.

Joiner CH. Gardos pathway to sickle cell therapies? *Blood*. 2008;111(8):3918-9.

Josephson CD, Su LL, Hillyer KL, Hillyer CD. Transfusion in the patient with sickle cell disease: a critical review of the literature and transfusion guidelines. *Transfus Med Rev*. 2007; 21(2):118-33.

Kanter J, Kruse-Jarres R. Management of sickle cell disease from childhood through adulthood. *Blood Rev*. 2013;27(6):279-87.

Kato GJ. Priapism in sickle-cell disease: a hematologist's perspective. *J Sex Med*. 2012;9(1):70-8.

Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. 2007;21(1):37-47.

Kato GJ, Gladwin MT. Mechanisms and clinical complications of hemolysis in sickle cell disease and thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ (editors). *Disorders of hemoglobin – Genetics, pathophysiology, and clinical management*. Second ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009. p. 201-24.

Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J Hematol*. 2009;84(9):618-25.

- Kato GJ, Taylor JG. Pleiotropic effects of intravascular haemolysis on vascular homeostasis. *Br J Haematol*. 2010;148(5):690-701.
- Kaul DK, Finnegan E, Barabino GA. Sick cell-endothelium interactions. *Microcirculation*. 2009;16(1):97-111.
- Khatib R, Rabah R, Sarnaik SA. The spleen in the sickling disorders: an update. *Pediatr Radiol*. 2009;39(1):17-22.
- Kim-Shapiro DB. Structure and function of hemoglobin and its dysfunction in sickle cell disease. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ (editors). *Disorders of hemoglobin – Genetics, pathophysiology, and clinical management*. Second ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009. p. 101-18.
- Klings ES, Machado RF, Barst RJ, Morris CR, Mubarak KK, Gordeuk VR, et al. An official american thoracic society clinical practice guideline: diagnosis, risk stratification, and management of pulmonary hypertension of sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(6):727-40.
- Koshy M, Entsuah R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, et al. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood*. 1989;74(4):1403-8.
- Kutlar A. Sick cell disease: a multigenic perspective of a single gene disorder. *Hemoglobin*. 2007;31(2):209-24.
- Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol*. 2009;85(2):235-42.
- Lemos Cardoso G, Guerreiro JF. African gene flow to north Brazil as revealed by HBB*S gene haplotype analysis. *Am J Hum Biol*. 2006;18(1):93-8.
- Lemos Cardoso G, Guerreiro JF. Molecular characterization of sickle cell anemia in the Northern Brazilian state of Pará. *Am J Hum Biol*. 2010;22(5):573-7.

Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araújo AS, Uda M, Sanna S, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(33):11869-74.

Lettre G. The search for genetic modifiers of disease severity in the beta-hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(10):a015032.

Levy AP, Asleh R, Blum S, Levy NS, Miller-Lotan R, Kalet-Litman S, et al. Haptoglobin: Basic and clinical aspects. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(2):293-304.

Lim JJ. Ophthalmic manifestations of sickle cell disease: update of the latest findings. *Curr Opin Ophthalmol*. 2012;23(6):533-6.

Lim MY, Ataga KI, Key NS. Hemostatic abnormalities in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*. 2013;20(5):472-7.

Lima CS, Rocha EM, Silva NM, Sonatti MF, Costa FF, Saad ST. Risk factors for conjunctival and retinal vessel alterations in sickle cell disease. *Acta Ophthalmol Scand*. 2006;84(2):234-41.

Lobo C, Marra VN, Silva RMG. Crises dolorosas na doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemot* 2007;29(3):247-58.

Lobo CL, Ballas SK, Domingos AC, Moura PG, Nascimento EM, Cardoso GP, et al. Newborn screening program for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(1):34-9.

Loureiro MM, Rozenfeld S, Portugal RD. Acute clinical events in patients with sickle cell disease: epidemiology and treatment. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(2):95-100.

Luporini SM, Bendit I, Manhani R, Bracco OL, Manzella L, Giannella-Neto D. Growth hormone and insulin-like growth factor I axis and growth of children with different sickle cell anemia haplotypes. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001;23(6):357-63.

Madu AJ, Ubesie A, Madu KA, Okwor B, Anigbo C. Evaluation of clinical and laboratory correlates of sickle leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2013;21(6):808-12.

Magalhães E, Arashiro DN. Um método simples para visualização da hemoglobina S em testes de solubilidade. *Rev Bras Patol Clin.* 1977; 13(13):133-4.

Manwani D, Frenette PS. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. *Blood.* 2013;122(24):3892-8.

Mariz MS, Suassuna LEB. História do Rio Grande do Norte. Natal: Editora Sebo Vermelho; 2002. 418p.

Martins PRJ, Moraes-Souza H, Silveira TB. Morbimortalidade em doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(5):378-83.

Maximo C. A política de atenção integral à pessoa com doença falciforme no estado do Rio de Janeiro e os desafios da descentralização [Dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saude Publica; 2009.

McCavit TL, Quinn CT, Techasaensiri C, Rogers ZR. Increase in invasive streptococcus pneumoniae infections in children with sickle cell disease since pneumococcal conjugate vaccine licensure. *J Pediatr.* 2011;158(3):505-7.

McGann PT, Nero AC, Ware RE. Current management of sickle cell anemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(8):a011817.

Meier ER, Miller JL. Sickle cell disease in children. *Drugs.* 2012;72(7):895-906.

Milner PF, Kraus AP, Sebes JI, Sleeper LA, Dukes KA, Embury SH, et al. Sickle cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. *N Engl J Med.* 1991;325(21):1476-81.

Minniti CP, Delaney KM, Gorbach AM, Xu D, Lee CC, Malik N, et al. Vasculopathy, inflammation, and blood flow in leg ulcers of patients with sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2014;89(1):1-6.

Minniti CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MH, Ballas SK. Leg ulcers in sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2010;85(10):831-3.

Miranda SRP, Fonseca SF, Figueiredo MS, Grotto HZW, Kimura EM, Saad STO, et al. Hb Köln [α 2 β 298(FG5) Val→Met] identified by DNA analysis in a Brazilian family. *Braz J Genetics*. 1997;20:745-8.

Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ*. 2008;86(6):480-7.

Nagel RL, Erlingsson S, Fabry ME, Croizat H, Susuka SM, Lachman H, et al. The Senegal DNA haplotype is associated with the amelioration of anemia in African-American sickle cell anemia patients. *Blood*. 1991;77(6):1371-5.

Nagel RL, Platt OS. General pathophysiology of sickle cell anemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL (editors). *Disorders of hemoglobin - Genetics, pathophysiology, and clinical management*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001. p. 494-526.

Nagel RL, Steinberg MH. Genetics of the β^S gene - origins, genetic epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In: *Disorders of hemoglobin - Genetics, pathophysiology, and clinical management*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001. p.711-55.

Nath KA, Katusic ZS. Vasculature and kidney complications in sickle cell disease. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(5):781-4.

National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI). Clinical Alert: Periodic Transfusions Lower Stroke Risk in Children with Sickle Cell Anemia. Vol. 2013; 1997.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson - *Genética Médica*. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda.; 2008. 525p.

Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: Rates and risk factors. *Blood*. 1998;91(1):288-94.

Okumura JV, Lobo CL, Bonini-Domingos CR. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35(1):71-2.

Orkin SH, Kazazian HH, Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, et al. Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. *Nature*. 1982;296(5858):627-31.

Paiva e Silva RB, Ramalho AS, Cassorla RM. A anemia falciforme como problema de saúde pública no Brasil. *Rev Saude Publica*. 1993;27(1):54-8.

Pakbaz Z, Wun T. Role of the hemostatic system on sickle cell disease pathophysiology and potential therapeutics. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014;28(2):355-74.

Paladino SF. Úlcera de membros inferiores na anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(3):288-90.

Pereira SA, Brener S, Cardoso CS, Proietti AB. Sickle Cell Disease: quality of life in patients with hemoglobin SS and SC disorders. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013; 35(5):325-31.

Perutz MF. Molecular anatomy and physiology of hemoglobin. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL (editors). *Disorders of hemoglobin – Genetics, pathophysiology, and clinical management*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001. p. 174-96.

Piel FB, Hay SI, Gupta S, Weatherall DJ, Williams TN. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010-2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. *PLoS Med*. 2013;10(7):e1001484.

Podmore AHB. Haptoglobin for the treatment of sickle cell disease. *Bioscience Hypothesis*. 2008;1:59-63.

Powars D, Chan LS, Schroeder WA. The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. *Semin Hematol*. 1990;27(4):360-76.

Powars DR, Meiselman HJ, Fisher TC, Hiti A, Johnson C. Beta-S gene cluster haplotypes modulate hematologic and hemorheologic expression in sickle cell anemia. Use in predicting clinical severity. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1994;16(1):55-61.

Quinn CT, Khera PK, Lindsell CJ, Joiner CH, Cohen RM, Franco RS. Measurement of erythrocyte survival in vivo using a stable isotope label in sickle cell anemia. In: 55th ASH Annual Meeting; 2013, Blood Suppl; v. 122(21): 2223.

Ratanasopa K, Chakane S, Ilyas M, Nantasenamat C, Bulow L. Trapping of human hemoglobin by haptoglobin: Molecular mechanisms and clinical applications. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18(17):2364-74.

Rees DC, Gibson JS. Biomarkers in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2012;156(4): 433-45.

Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2010;376(9757): 2018-31.

Reiners AA, Azevedo RC, Vieira MA, de Arruda AL. Produção bibliográfica sobre adesão/não-adesão de pessoas ao tratamento de saúde. *Cien Saude Colet*. 2008;13(Suppl 2): 2299-306.

Romero WER, Renauld GFS, Villalobos MAC. Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica. *Rev Panam Salud Pública*. 1998;3(1):1-8.

Saenger AK, Christenson RH. Stroke biomarkers: progress and challenges for diagnosis, prognosis, differentiation, and treatment. *Clin Chem*. 2010;56(1):21-33.

Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. pp. 5.4 - 5.16, 6.11.

Santos MN, Bezerra MA, Domingues BL, Zaccariotto TR, Oliveira DM, Costa FF, et al. Haptoglobin genotypes in sickle-cell disease. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011; 15(10):709-13.

Santos JP, Gomes Neto M. Sociodemographic aspects and quality of life of patients with sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35(4):242-5.

Schaer CA, Deuel JW, Bittermann AG, Rubio IG, Schoedon G, Spahn DR, et al. Mechanisms of haptoglobin protection against hemoglobin peroxidation triggered endothelial damage. *Cell Death Differ*. 2013;20(11):1569-79.

Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*. 2013;121(8):1276-84.

Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*. 2008; 112(10):3927-38.

Serjeant GR. The natural history of sickle cell disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3(10):a011783.

Silva CM, Viana MB. Growth deficits in children with sickle cell disease. *Arch Med Res*. 2002; 33(3):308-12.

Silva Filho IL, Leite ACCB, Moura PG, Ribeiro GS, Cavalcante AC, Azevedo FCM, et al. Genetic polymorphisms and cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia from Rio de Janeiro, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011;69(3):431-5.

Silva Filho IL, Ribeiro GS, Pimenta-Bueno LM, Serpa MJA. The frequency of β -globin gene haplotypes, α -thalassemia and genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase, factor V Leiden and prothrombin genes in children with sickle cell disease in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(1):76-8.

Silva Junior GB, Daher EF, Rocha FA. Osteoarticular involvement in sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012a;34(2):156-64.

Silva Junior GB, Libório AB, Vieira AP, Bem AX, Lopes Filho AS, Figueiredo Filho AC, et al. Evaluation of renal function in sickle cell disease patients in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2012b; 45(7):652-5.

Silva LB, Gonçalves RP, Rabenhorst SHB. Análise dos haplótipos da anemia falciforme em Fortaleza revela as origens étnicas da população cearense. *J Bras Patol Med Lab*. 2009;45(2): 115-8.

Singer ST, Ataga KI. Hypercoagulability in sickle cell disease and beta-thalassemia. *Curr Mol Med*. 2008;8(7):639-45.

Sonati MF, Costa FF. Genética das doenças hematológicas – As hemoglobinopatias hereditárias. J Pediatr. 2008;84(4 SUPPL):s40-s51.

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) [computer program]. Version 10.0. Chicago (IL): SPSS Inc; 1999.

STATISTICA (data analysis software system) [computer program]. Version 7. Tulsa (OK): StatSoft, Inc; 2004.

Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. ScientificWorldJournal. 2009a;9:46-67.

Steinberg M. Sickle cell disease. In: Steinberg M, Forget B, Higgs D, Weatherall D (editors). Disorders of hemoglobin - Genetics, pathophysiology and clinical management. Second ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009b. p. 435-6.

Steinberg MH, Chui DH, Dover GJ, Sebastiani P, Alsultan A. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? Blood. 2014;123(4):481-5.

Steinberg MH, Lu ZH, Barton FB, Terrin ML, Charache S, Dover GJ. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. Multicenter Study of Hydroxyurea. Blood. 1997;89(3):1078-88.

Steinberg MH, McCarthy WF, Castro O, Ballas SK, Armstrong FD, Smith W, et al. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia – a 17.5 year follow-up. Am J Hematol. 2010;85(6):403-8

Steinberg MH, Nagel RL. Hemoglobins of the embryo, fetus, and adult. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ (editors). Disorders of hemoglobin - Genetics, pathophysiology, and clinical management. Second ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009. p. 119-35.

Steinberg MH, Ohene-Frempong K, Heeney MM. Clinical and pathophysiological aspects of sickle cell anemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ (editors). Disorders

of Hemoglobin - Genetics, pathophysiology, and clinical management. Cambridge: Cambridge University Press; 2009. p. 437-96.

Steinberg MH, Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. Am J Hematol. 2012;87(8):795-803.

Steinberg MH, Benz EJ. Jr HAA; Ebert A. Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. In: Hoffman R, Jr EJB, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein L et al. Hematology: Basic Principles and Practice. 4th. ed. Livingstone: Elsevier Churchill; 2005. p. 442-54.

Strachan T, Read A. Genética Molecular Humana. 4a ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda; 2013. 780p.

Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. Am J Hematol. 1989;32(1):66-9.

Svarc E, Espinosa E, Hernandez P, Martinez G, Balllester J. Resultados de los estudios realizados in Cuba sobre la hemoglobinopatía S. Sangre (Barc). 1991; 36(1):37-42.

Switzer JA, Hess DC, Nichols FT, Adams RJ. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. Lancet Neurol. 2006;5(6):501-12.

Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(3):a011858.

Thornburg CD, Files BA, Luo Z, Miller ST, Kalpatthi R, Iyer R, et al. Impact of hydroxyurea on clinical events in the BABY HUG trial. Blood. 2012;120(22):4304-10.

Traina F, Saad ST. Complicações hepáticas na doença falciforme. Rev Bras Hematol Hemoter. 2007;29(3):299-303.

Vardi M, Blum S, Levy AP. Haptoglobin genotype and cardiovascular outcomes in diabetes mellitus - natural history of the disease and the effect of vitamin E treatment. Meta-analysis of the medical literature. Eur J Intern Med. 2012;23(7):628-32.

Verissimo M. Growth and development in sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):271-4.

Vicari P, de Cassia Rosario Cavaleiro R, de Gouveia A, Filho Campos O, Figueiredo MS. Echocardiographic abnormalities in Brazilian sickle cell patients. *Am J Hematol.* 2005;78(2):160-1.

Vilela RQ, Bandeira DM, Silva MAE. Occular complications in sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):285-7.

Villaescusa R, Arce AA, Lalanne-Mistrih ML, Lamarre Y, Hierso R, Hernández C, et al. Natural antiband 3 antibodies in patients with sickle cell disease. *C R Biol.* 2013; 336(3):173-6.

Vincentino C, Dorigo G. História Geral e do Brasil. São Paulo: Editora Scipione; 2002. 736p.

Voskaridou E, Christoulas D, Bilalis A, Plata E, Varvagiannis K, Stamatopoulos G, 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.* 2010; 115(12):2354-63.

Voskaridou E, Christoulas D, Terpos E. Sickle-cell disease and the heart: review of the current literature. *Br J Haematol.* 2012;157(6):664-73.

Weatherall DJ. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. *Curr Mol Med.* 2008;8(7): 592-9.

Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet.* 2001;2(4):245-55.

Wild BJ, Bain BJ. Investigação de hemoglobinas anormais e talassemias. In: Lewis M, Bain BJ, Bates I (editors). *Hematologia Prática de Dacie e Lewis*. 9a ed. Porto Alegre: ARTMED Editora S.A.; 2006. p. 217-50.

Williams TN, Weatherall DJ. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(9):a011692.

Wobeto VPA, Zaccariotto TR, Sonati MF. Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance. *Genet Mol Biol*. 2008;31(3):602-20.

Wolfson JA, Schrager SM, Khanna R, Coates TD, Kipke MD. Sickle cell disease in California: sociodemographic predictors of emergency department utilization. *Pediatr Blood Cancer*. 2012; 58(1):66-73.

World Health Organization. Fifty-ninth World Health Assembly: resolutions and decisions, annexes. Geneva: WHO; 2006. 120p.

Yano A, Yamamoto Y, Miyaishi S, Ishizu H. Haptoglobin genotyping by allele-specific polymerase chain reaction amplification. *Acta Med Okayama*. 1998;52(4):173-81.

Zago MA, Kerbaux J, Souza HM, Figueiredo MS, Costa FF, Cruz SM, et al. Growth and sexual maturation of Brazilian patients with sickle cell diseases. *Trop Geogr Med*. 1992;44(4):317-21.

Zago MA, Pinto ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes - da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007;29(3):207-14.

Zago MA, Silva WA, Dalle B, Gualandro S, Hutz MH, Lapoumeroulie C, et al. Atypical beta(s) haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *Am J Hematol*. 2000;63(2):79-84.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

PARECER Nº 187/2010

Prot. nº	193/09 CEP/UFRN
CAAE	0209.0.051.000-09
Projeto de Pesquisa	Fatores associados a variabilidade clínica de pacientes com doenças falciformes provenientes do Estado do Rio Grande do Norte
Área de Conhecimento	4 - CIÊNCIAS DA SAÚDE 4.01 - Medicina
Pesquisador Responsável	Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes
Instituição Onde Será Realizado	Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Instituição Sediadora	Hemocentro Dalton Barbosa Cunha - HEMONORTE
Nível de abrangência do Projeto	Tese de Doutorado
Período de realização	Arrolamento: Início - ago/2010 - Término - dez/2012
Revisão ética em	22 de julho de 2010

RELATO

1. BREVE HISTÓRICO

O protocolo ora analisado foi cadastrado no CEP/UFRN em **15 de dezembro de 2009**.

O CEP/UFRN entende que o Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP, instituição onde será realizada a pesquisa, visto que o projeto de pesquisa em questão irá subsidiar a tese de Doutorado de aluno do Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, deve revisar eticamente o protocolo e delibera na reunião de **30 de dezembro de 2009** nesse sentido.

O CEP/UFRN entende ainda que ele poderá ser revisado eticamente também pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte – CEP/UERN, instituição a qual o pesquisador responsável é vinculado.

A secretária executiva da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, por e-mails, solicita ao CEP/UERN que faça a análise do protocolo citando como base a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde - CNS, item VII. 2. No entanto, a seguir manda o pesquisador entrar em contato com o CEP/UFRN para apreciação do protocolo.

O pesquisador solicita então ao CEP/UFRN em **22 de março de 2010** a análise do seu protocolo.

2. RESUMO

O protocolo é parte do Projeto de doutorado do Prof. Thales Fernandes. O projeto tem como hipótese que os genótipos de haptoglobina, os tipos de haplótipos do cluster beta e a presença de talassemia alfa influenciam a evolução clínica e laboratorial de pacientes com anemia falciforme. Os objetivos específicos incluem a análise dos dados clínicos e laboratoriais apresentados pelos pacientes com anemia falciforme oriundos do RN. Os pacientes serão analisados por faixa etária. Os parâmetros clínicos e laboratoriais observados serão associados com os haplótipos dos genes da hemoglobina. Será considerado também se os pacientes apresentam concomitância de talassemia alfa.

3. ENTENDIMENTOS E PARECER

Considerando que as pendências expostas por este Comitê foram adequadamente cumpridas, o Protocolo de Pesquisa em pauta enquadra-se na categoria de APROVADO.

4. ORIENTAÇÕES AO PESQUISADOR

Em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do Manual Operacional para Comitês de Ética em pesquisa (Brasília, 2002) e Res. 196/96 – CNS o pesquisador deve:

1. entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na íntegra, por ele assinada (Res. 196/96 CNS – item IV.2d);
2. desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após a análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UFRN (Res. 196/96 – CNS item III.3z);
3. apresentar ao CEP/UFRN eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p. 41);
4. apresentar ao CEP/UFRN relatório final após conclusão da pesquisa (Manual Operacional para Comitês de ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.65).

Os formulários para os Relatórios Parciais e Final estão disponíveis na página do CEP/UFRN (www.etica.ufrn.br).

Natal, 22 de julho de 2010.


Dulce Almeida

Coordenadora do CEP-UFRN

9. APÊNDICES

APÊNDICE I



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS – FCM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esclarecimentos

Este é um convite para você participar da pesquisa “Fatores associados à variabilidade clínica de pacientes com doenças falciformes provenientes do estado do Rio Grande do Norte”, que é coordenada pelo prof Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes.

As doenças falciformes se caracterizam por apresentarem uma grande variação na sua gravidade. No entanto, ainda não se sabe completamente quais fatores podem afetar a severidade da doença. Diante disso, essa pesquisa procura avaliar características dos portadores das doenças falciformes que possam estar associadas a um quadro mais leve ou mais grave da doença, em pacientes provenientes aqui do Rio Grande do Norte.

Caso decida aceitar o convite, você será submetido aos seguintes procedimentos: coleta de uma amostra de seu sangue (quantidade equivalente a uma colher de sopa), e responder a um questionário. Durante o preenchimento deste questionário, você pode se negar a responder qualquer uma das perguntas, caso lhe cause algum constrangimento. Além disso, para avaliar a evolução da sua doença ao longo dos anos, solicitamos sua autorização para manusear seu prontuário médico aqui no HEMONORTE.

Nesta sua amostra de sangue serão realizados alguns exames de laboratório [hemograma, perfil hemoglobínico, dosagem de bilirrubina, de lactato desidrogenase (LDH) e de aspartato aminotransferase (AST)] e testes no seu DNA. O DNA faz parte das células do nosso corpo e contém a informação de tudo que herdamos dos nossos pais. Estudos têm mostrado que certas variações no DNA podem estar associadas a uma doença falciforme mais grave, e nós estudaremos algumas destas variações no seu DNA. Cientificamente, as variações que estudaremos são chamadas de haplótipo para o cluster-beta, genótipo para o gene da haptoglobina e detecção da alteração genética causadora da talassemia alfa. Caso seja de seu interesse e você solicite, nós lhe entregaremos os resultados desses exames.

Seu DNA será armazenado em nosso laboratório, caso você autorize, e poderá ser usado em futuros estudos. No entanto, antes que isso aconteça, o projeto do estudo será avaliado por um comitê de ética em pesquisa, e o senhor(a) será contatado para conceder ou não autorização para o uso do seu DNA.

Os riscos envolvidos e desconfortos que podem surgir com sua participação nesta pesquisa são os mesmos relacionados a qualquer procedimento de coleta de sangue, ou seja, surgimento de sangramentos ou manchas arroxeadas no local da coleta de sangue, ou ainda desmaios. No entanto, estes riscos são mínimos, visto que seu sangue será coletado por profissionais experientes e treinados, e serão utilizados materiais estéreis.

Ao participar da pesquisa, você terá os seguintes benefícios: serão analisadas características suas que podem auxiliar o médico no acompanhamento da doença e na determinação do melhor tratamento para o seu caso.

A sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento e seus dados armazenados, sem que isso lhes traga nenhum prejuízo ou penalidade. Todas as informações obtidas serão sigilosas e o seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro, de acesso exclusivo aos membros executores da pesquisa, e a divulgação dos resultados será feita de forma a não lhe identificar. De forma alguma os seus dados ficarão acessíveis a outras pessoas (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.).

Se você tiver algum gasto que seja devido a sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, caso você venha sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, seja antes, durante ou após a realização da pesquisa, poderá perguntar diretamente para o **Prof Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes** (e-mail: thalesallyrio@uern.br), na Faculdade de Farmácia da UFRN (Rua Gal. Cordeiro de Farias s/n - 1º andar – Petrópolis – CEP.59010-180 - Natal, RN) ou pelo telefone 84-3342-9823.

Projeto: Fatores associados à variabilidade clínica de pacientes com doenças falciformes provenientes do estado do Rio Grande do Norte

Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN (e-mail: cep@ufrn.br), no endereço: Praça do Campus Universitário, Lagoa Nova, Caixa Postal 1666, CEP 59072-970, Natal/RN, ou pelo telefone: (84) 3215-3135.

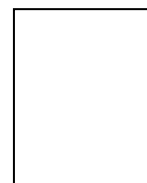
Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa “Fatores associados à variabilidade clínica de pacientes com doenças falciformes provenientes do estado do Rio Grande do Norte”. Também autorizo o pesquisador responsável a manusear o meu prontuário médico e armazenar o DNA extraído do meu sangue.

Participante da pesquisa:

Nome

Assinatura



Compromisso do Pesquisador

Declaro que expliquei ao participante todos os procedimentos necessários para a realização do referido estudo. Comprometo-me a cumprir o que foi acordado com o mesmo sobre os riscos e benefícios da pesquisa, de acordo com as normas estabelecidas nas Resoluções 196/96-CNS e 340/04-CNS, procurando manter a integridade e o bem estar dos indivíduos participantes da pesquisa.

Nome do Pesquisador Responsável

Assinatura do pesquisador responsável

Endereço Profissional: Laboratório de Hematologia – Faculdade de Farmácia - UFRN

Rua Gal. Cordeiro de Farias s/n - 1º andar – Petrópolis

CEP.: 59010-180 – Natal-RN - Fone: 84-3342-9826

e-mail para contato: thalesallyrio@uern.br / thalesallyrio@yahoo.com.br

Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN: Praça do Campus Universitário, Lagoa Nova.

Caixa Postal 1666, CEP 59072-970, Natal/RN

Telefone/Fax (84)3215-3135.

Projeto: Fatores associados à variabilidade clínica de pacientes com doenças falciformes provenientes do estado do Rio Grande do Norte

APÊNDICE II



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS – FCM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

PROTOCOLO DE PESQUISA

PROJETO DE PESQUISA: Fatores associados à variabilidade clínica de pacientes com doenças falciformes provenientes do estado do Rio Grande do Norte

RESPONSÁVEL: Prof. Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes

- Ficha de Pesquisa Nº _____

- Data da Coleta: ____ / ____ / ____

DADOS PESSOAIS:

- Nome: _____

- Nº Prontuário/Registro no HEMONORTE: _____ - Sexo: ☐ Masc ☐ Fem

- Data de nascimento: ____ / ____ / ____ Idade: _____

- Filiação: Pai: _____

Mãe: _____

- Naturalidade: _____ Estado Civil: _____

- Endereço: _____

_____ - Fone: _____

- Etnia: ☐ Branca ☐ Parda ☐ Negra ☐ Outra. Qual? _____

- Ascendência (pais, avós ou bisavós) africana, européia, asiática ou indígena:

☐ Sim ☐ Não Qual:? _____ Qual o grau de parentesco? _____

SITUAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA:

- Grau de instrução: _____ - Grau de instrução dos pais: _____

- Profissão: _____

- Condições sanitárias: Fossa () Rede de esgoto () Outros () _____

- Condições Higiênicas: Água: Filtrada () Fervida () Sem tratamento () Outro (): _____

Lixo: Recolhido () Queimado () Enterrado () Outro (): _____

- Renda familiar mensal (salários mínimos): ☐ Até 1 ☐ 2 a 3 ☐ 4 a 5 ☐ > 5

- Recebe benefício do Governo Federal: Não () Sim (). Qual? _____

- Recebe apoio assistencial da Prefeitura ou do estado: Não () Sim ().

Qual? _____

HISTÓRICO CLÍNICO:

- Data/Idade em que foi diagnosticado como portador da doença falciforme: _____
- Idade em que começou a ser tratado: _____
- Tem algum outro parente com doença falciforme? ☐ Sim ☐ Não Quem: _____
- Apresenta alguma dificuldade em seguir o tratamento para a doença:
☐ Sim ☐ Não. Caso positivo, qual? _____
- Faz uso de Hydrea? ☐ Sim ☐ Não A quanto tempo ? _____
- Faz uso freqüente de algum outro medicamento? ☐ Sim ☐ Não Quais? _____ A
quanto tempo ? _____
- Tem fácil acesso às medicações? ☐ Sim ☐ Não Por que?

- Já fez transfusão sanguínea? ☐ Sim ☐ Não. Caso positivo, quando foi realizada a primeira? _____ E a mais recente? _____ Faz transfusão cronicamente? ☐ Sim ☐ Não. Quantas transfusões recebeu nos últimos 12 meses? _____
- Já ficou internado por causa da doença falciforme? ☐ Sim ☐ Não. Caso positivo, quando foi a primeira internação? _____ Quantas vezes ficou internado nos últimos 12 meses? _____
- Foi vacinado contra o Pneumococo e Haemophilus influenzae:
☐ Sim ☐ Não. Com qual idade? _____
- Faz ou fez uso regular de penicilina? ☐ Sim ☐ Não. Com qual idade começou a usar? _____ Por quanto tempo usou? _____
- Caso seja mulher, já teve gestação? ☐ Sim ☐ Não. Teve alguma complicação? ☐ Sim ☐ Não Qual? _____

Já teve alguma das complicações abaixo?

Crises dolorosas: ☐ Sim ☐ Não

Primeira crise: _____ Crise mais recente: _____

Número de crises no último ano: _____

Local principal: _____

Obs.: _____

Acidente vascular encefálico: ☐ Sim ☐ Não

Que tipo? ☐ Isquêmico ☐ Hemorrágico

Quantas vezes? _____

Primeira crise: _____ Crise mais recente: _____

Obs.: _____

Crise de seqüestro esplênico: ☐ Sim ☐ Não

Quantas vezes? _____

Primeira crise: _____ Crise mais recente: _____

Obs.: _____

Síndrome torácica aguda: ☐ Sim ☐ Não

Quantas vezes? _____

Primeira crise: _____ Crise mais recente: _____

Obs.: _____

Priapismo: ☐ Sim ☐ Não

Quantas vezes? _____

Primeira crise: _____ Crise mais recente: _____

Número de crises no último ano: _____

Obs.: _____

Infecção: ☐ Sim ☐ Não

Primeira infecção: _____ Local da Infecção: _____

Infecção mais recente: _____ Local da Infecção: _____

Número de infecções nos últimos 12 meses: _____

Local das infecções (Urina, pele): _____

Obs.: _____

Hepatoesplenomegalia: ☐ Sim ☐ Não

Quantas vezes? _____

Data do primeiro diagnóstico: _____

Data do último diagnóstico: _____

Obs.: _____

Colelitíase: ☐ Sim ☐ Não

Quantas vezes? _____

Data do primeiro diagnóstico: _____

Data do último diagnóstico: _____

Obs.: _____

Cardiomiopatia: ☐ Sim ☐ Não

Quantas vezes? _____

Data do primeiro diagnóstico: _____

Data do último diagnóstico: _____

Obs.: _____

Necrose óssea: ☐ Sim ☐ Não Quantas vezes? _____

Local da necrose: _____

Obs.: _____

Osteoporose: ☐ Sim ☐ Não Data do diagnóstico: _____

Obs.: _____

Úlceras de Pele: ☐ Sim ☐ Não

Quantas vezes? _____ Local da úlcera: _____

Demorou a cicatrizar: ☐ Sim ☐ Não Quanto tempo: _____

Evolução: _____

Outras doenças de pele: _____

Outras complicações ou motivos que levaram o paciente ao clínico:

EXAMES LABORATORIAIS:

Eritrograma

Hemoglobina: _____

Hemácias: _____

Hematócrito: _____

VCM: _____

HCM: _____

CHCM: _____

Leucócitos totais: _____

Neutrófilos _____

Linfócitos _____

Eosinófilos _____

Basófilos _____

Monócitos _____

Plaquetas totais: _____

Reticulócitos: _____

Eletroforese de Hemoglobina em pH alcalino: _____

Teste de solubilidade: ☐ Positivo ☐ Negativo

HbA2: _____ HbF: _____

Genótipo da Doença Falciforme: _____

Confirmação Molecular do genótipo da Doença Falciforme: _____

Bilirrubina Total: _____ LDH: _____

Bilirrubina Direta: _____ AST: _____

Bilirrubina Indireta: _____ Ferritina: _____

CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS:

Haplótipo cluster-beta: _____

Talassemia α (deleção $-\alpha^{3,7}$): _____

Genótipo Haptoglobina: _____

Natal, ____/____/____

Pesquisador Responsável