



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA**



**MODULADORES CLÍNICOS EM PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA
FALCIFORME NO AMAZONAS**

JANAINA SANTANA CARNEIRO

MANAUS

2015

JANAINA SANTANA CARNEIRO

**MODULADORES CLÍNICOS EM PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA
FALCIFORME NO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas, em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

Orientador: Prof. Doutor José Pereira de Moura Neto

MANAUS

2015

FOLHA DE JULGAMENTO**MODULADORES CLÍNICOS EM PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA
FALCIFORME NO AMAZONAS****JANAINA SANTANA CARNEIRO**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências aplicadas à Hematologia, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas”.

Banca Examinadora:

Prof. Doutor José Pereira de Moura Neto
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
(Presidente)

Prof. Doutor Sérgio Roberto Lopes Albuquerque
Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM)
(Membro)

Prof. Doutor Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
(Membro)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Edna Maria Santana Carneiro e Alexandre José Gomes Carneiro, pelo apoio e incentivo incondicionais em todas as minhas escolhas e por jamais duvidarem da minha capacidade de realização pessoal. A vitória desta conquista eu ofereço a vocês, meus heróis e exemplos de vida e luta.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por todas as bençãos concedidas a mim e por jamais abandonar-me.

À minha família, principalmente a meus pais, Alexandre José Gomes Carneiro e Edna Maria Santana Carneiro que sempre depositaram confiança em mim dando-me forças e amparo frente às dificuldades. Tudo o que sou devo a vocês cujo empenho e trabalho ao educar-me estão sendo recompensados. Obrigada pai e mãe.

Ao meu namorado Gustavo Henrique Turner pela paciência e compreensão, por suportar a minha ausência e as mudanças repentinas de humor, e por estar sempre ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Professor Doutor José Pereira de Moura Neto que acima de tudo acreditou em mim como pesquisadora, pois sem esse voto de confiança eu não teria conseguido chegar até aqui tampouco ter aprendido tudo o que o ele se propôs a me ensinar. Agradeço a dedicação, as horas incansáveis dispensadas a me ajudar e até mesmo os “puxões de orelha” necessários. Tornei-me uma pessoa com visão de futuro diferente e isso devo a ele. Meu camarada, Obrigada.

Aos professores do Mestrado em Ciências Aplicadas à Hematologia e corpo administrativo.

Aos pacientes com Doença Falciforme atendidos no ambulatório da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM) que compartilharam conosco não apenas seu material genético, mas também suas experiências de vida.

À médica hematologista Dra. Rejane Nina que gentilmente acolheu-me em seu consultório para que pudesse me aproximar dos pacientes e conhecê-los.

À todos aqueles que se dispuseram a ajudar-me nos setores de Serviço de Arquivo médico e estatístico (SAME) e nos Laboratórios de Hematologia e de Biologia Molecular da Fundação HEMOAM.

Aos colegas de mestrado que compartilharam comigo conhecimentos, experiências e momentos de entusiasmo.

Aos que fizeram parte do meu grupo de pesquisa, em especial aos amigos Marco Aurélio, Thiago Bacha e Mikaela Pontes, que me acompanharam nos momentos intermináveis de estudos e análises. Sentirei saudades.

À FHEMOAM e Universidade do Estado do Amazonas (UFAM) por ter-me proporcionado este aperfeiçoamento de excelência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro a nossa pesquisa.

À Faculdade de Ciências farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, local onde foram realizadas as análises.

À Universidade Federal da Bahia pela parceria.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) apoiou este projeto de pesquisa, por meio da concessão de bolsa de estudo, durante os 24 meses de sua execução.

O projeto de pesquisa faz parte de um estudo intitulado “**Estudo das hemoglobinopatias estruturais e de síntese na região metropolitana de Manaus-Amazonas**” que foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), após submissão e aprovação por meio da chamada FAPEAM/SUSAM-SES-AM/MS/CNPq 001/2013 – PPSUS.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

A doença falciforme é considerada uma das mais graves e comuns desordens genéticas existentes no mundo. A concentração de hemoglobina fetal, os haplótipos ligados aos genes da globina β^{SC} (HAPLO) e a talassemia alfa (TA) influenciam as características hematológicas e as manifestações clínicas fisiopatológicas da doença. O presente estudo teve como objetivo descrever os moduladores clínicos em pacientes com perfis SS e SC atendidos na HEMOAM. Os dados clínicos foram obtidos nos prontuários médicos e parâmetros hematológicos e bioquímicos em analisadores automáticos BC5800 e A25, respectivamente. As análises moleculares para os HAPLO pela técnica de PCR-RFLP, enquanto a TA pela PCR. As análises estatísticas foram realizadas nos programas SPSS 22.0 e GraphPad Prism 5.0. Foram analisados 222 pacientes com doença falciforme, sendo 202 SS e 20 SC, com 42,3% para o gênero masculino. Quando comparados os dados hematológicos e bioquímicos entre os perfis de hemoglobina, os SC apresentaram valores hematológicos melhores que os SS, sendo todos estatisticamente significativos. As frequências dos principais eventos clínicos nos pacientes SS foram: 47% eventos vaso-oclusivos e 58,9% receberam pelo menos uma transfusão de sangue nos últimos 2 anos. Episódios álgicos foram observados na região lombar em 34,7%, 29,7% abdominal, 32,2% em membros inferiores e 24,8% nas articulações. A pneumonia foi a infecção mais comum (29,2%). A análise dos eventos clínicos por gênero demonstrou o feminino com maiores frequências para CVO (54,7%), pneumonia (54,2%), AVC (66,7%), retinopatia (60%). A TA foi encontrada somente nos pacientes SS, com 13,7% heterozigotos e 2,8% homozigotos. A presença da TA melhorou os parâmetros hematológicos nos pacientes SS, com valores significativos para hemácias ($p=0,001$), hemoglobina ($p=0,026$), hematócrito ($p=0,012$), VCM ($p=0,012$) e HCM ($p=0,011$). Já os marcadores dos perfis lipídico, hepático e renal não apresentaram valores significativos entre os genótipos da TA. A distribuição genotípica dos haplótipos foram para o genótipo SS de 52,5% CAR/CAR, 23,7% CAR/Ben, 18,1% Ben/Ben, 2,8% CAR/Sen, 1,7% Ben/Sen e 1,1% CAR/Cam, enquanto para os SC de 35,3% CAR-I, 17,6% CAR-II, 5,9% CAR-III, 29,4% Ben-I e 11,8% Ben-II. As alterações ósseas foram mais frequentes nos haplótipos CAR e Ben, acometendo mais o gênero feminino ($P=0,017$). Acidente vascular cerebral foi presente apenas CAR/CAR ($p<0,001$). As crises vaso - oclusivas ocorreram em mais de 60% dos pacientes CAR e Ben, e menos de 20% nos outros haplótipos ($P<0,001$). Portadores dos haplótipos Senegal e Camarões apresentaram clínica menos grave do que CAR e o Ben. Concentrações de hemoglobina fetal estiveram associadas à diminuição de eventos clínicos. Nosso estudo demonstra a grande diversidade clínica apresentada entre os perfis SS e SC no estado do Amazonas. As frequências de TA e dos HAPLO foram semelhantes a outros estudos realizados em alguns estados do Brasil. Tendo como base os nossos resultados, concluímos que a realização do presente estudo e principalmente com a casuística composta por um N amostral elevado, contribuiria para confirmar a importância do estabelecimento de fatores de prognóstico na AF, além de contribuir para o estabelecimento de subfenótipos da doença.

Palavras-chave: Anemia falciforme; Talassemia Alfa; Haplótipos; Hemoglobina fetal.

ABSTRACT

Sickle cell disease is considered one of the gravest and existing common genetic disorders in the world. The concentration of fetal hemoglobin, the haplotypes linked to globin gene β SC (HAPLO) and alpha thalassemia (TA) influence the hematological characteristics and pathophysiological clinical manifestations of the disease. This study aimed to describe the clinical modulators in patients with SS and SC profiles treated at HEMOAM. Clinical data were obtained from medical records and haematological and biochemical parameters in automatic analyzers BC5800 and A25, respectively. Molecular analyzes for HAPLO by PCR-RFLP technique, while the RT PCR. Statistical analyzes were performed in SPSS 22.0 and GraphPad Prism 5.0 programs. 222 patients were analyzed with sickle cell disease, and 202 SS and SC 20, with 42.3% for males. Compared hematological and biochemical data between hemoglobin profiles, the SC had better haematological values than the SS, with all statistically significant. The frequency of major clinical events in patients SS were; 47% vaso-occlusive events and 58.9% received at least one blood transfusion in the last 2 years. Nociceptive episodes were observed in the lumbar region at 34.7%, 29.7% abdominal, 32.2% in the lower limbs and 24.8% in the joints. Pneumonia was the most common infection (29.2%). The analysis of clinical events by gender demonstrated the female with higher frequencies to CVO (54.7%), pneumonia (54.2%), stroke (66.7%), retinopathy (60%). The TA was found only in SS patients, with 13.7% heterozygous and 2.8% homozygous. The presence of RT has improved hematological parameters in SS patients with significant values for red blood cells ($p = 0.001$) and hemoglobin ($p = 0.026$), hematocrit ($p = 0.012$), MCV ($p = 0.012$) and MCH ($p = 0.011$). The markers of lipid, hepatic and renal profiles showed no significant values between genotypes of TA. The genotype distribution of haplotypes were for the SS genotype 52.5% CAR / CAR, 23.7% CAR / Ben, 18.1% Ben / Ben, 2.8% CAR / Sen, 1.7% Ben / Sen and 1.1% CAR / Cam, while for SC 35.3% CAR-SC-I, 17.6% CAR-II, 5.9% CAR-III, 29.4% Ben-I and 11.8% Ben-II. The bone changes were more frequent in CAR haplotypes and Ben, are more affected than females ($P = 0.017$). Stroke was present only CAR / CAR ($p < 0.001$). The vessel seizures - occlusive occurred in over 60% of patients and Ben CAR, and less than 20% in other haplotypes ($P < 0.001$). Carriers of haplotypes Senegal and Cameroon had less severe clinical than CAR and Ben. Fetal hemoglobin concentrations were associated with decrease in clinical events. Our study demonstrates the great clinical diversity displayed between the SS and SC profiles in the Amazon state. The frequency of TA and HAPLO were similar to other studies in some states of Brazil. Based on our results, we conclude that the realization of this study and especially with the series made up a high sample N, contribute to confirm the importance of establishing prognostic factors in AF, as well as contribute to the subphenotypes of disease onset.

Key-words: Sickle cell anemia; Alpha Thalassemia; Haplotypes; Fetal Hemoglobin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da molécula de hemoglobina, presente nos adultos (HbA1), composta por quatro cadeias (duas cadeias α e duas cadeias β).....	19
Figura 2 - Distribuição das hemoglobinopatias no mundo.....	22
Figura 3 - Proporção de nascidos vivos com diagnóstico de Doença Falciforme em algumas regiões do País segundo o PNTN	24
Figura 5 - Desoxigenação das hemácias formando polímeros de HbS e afoçamento das células que causam oclusão vascular	26
Figura 6 - Presença de cristais de hemoglobina C, semelhantes a células em alvo, em diversos eritrócitos.....	29
Figura 7 - Principais haplótipos do gene β^S definidos pela ação de 13 enzimas de restrição.....	33
Figura 8 - Descrição do prognóstico clínico associado aos pacientes com anemia falciforme na presença e ausência de talassemia α e dos diferentes haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S	37
Figura 9 - Fluxograma do desenho de estudo	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de nascimentos por ano que são afetados pelas diferentes doenças da hemoglobina.	21
Tabela 2 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos dos pacientes portadores das hemoglobinas SS e SC atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.....	50
Tabela 3 - Características hematológicas e bioquímicas entre homens e mulheres com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.....	52
Tabela 4 - Características hematológicas e bioquímicas entre homens e mulheres com doença SC atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.	53
Tabela 5 - Eventos clínicos em pacientes com doença falciforme, portadores das hemoglobinas SS e SC, atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.....	56
Tabela 6 - Eventos clínicos entre homens e mulheres com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.....	57
Tabela 7 - Eventos clínicos entre homens e mulheres com doença SC atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.	58
Tabela 8 - Análise dos dados hematológicos, perfil de hemoglobinas e presença ou ausência da talassemia alfa 2 ^{3.7kb} em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.	59
Tabela 9 - Análise da talassemia alfa 2 ^{3.7kb} com os marcadores dos perfis lipídico, hepático e renal em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.	61
Tabela 10 - Distribuição dos haplótipos ligados aos genes da globina β^S e dados hematológicos entre pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.	63
Tabela 11 - Distribuição dos haplótipos ligados aos genes da globina β^S e dados bioquímicos entre pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação	

Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.	65
Tabela 12 - Análises de dados hematológicos e bioquímicos em internações hospitalares dos pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.....	67
Tabela 13 - Análises de dados hematológicos e bioquímicos nos episódios álgicos e crises de vaso-oclusão em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.	68
Tabela 14 - Análises de dados hematológicos e bioquímicos dos eventos clínicos em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.....	69
Tabela 15 - Análises de dados hematológicos e bioquímicos nos casos de transfusões em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.....	70
Tabela 16 – Análises de dados hematológicos e bioquímicos dos eventos clínicos em pacientes com doença SC atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.....	71
Tabela 17 – Análises entre biomarcadores clássicos e dados clínicos em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.....	73
Tabela 18 - Análises entre biomarcadores clássicos e dados clínicos em pacientes com doença SC atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Incidência de nascidos vivos diagnosticados com traço falciforme em alguns Estados que realizam a Triagem Neonatal	23
Quadro 2 - Manifestações clínicas e complicações apresentadas por pacientes com anemia falciforme evidenciando a apresentação multissistêmica da doença.....	28
Quadro 3 - Resultados da investigação de haplótipos do gene β^S em várias regiões no Brasil	34
Quadro 4 - Padrão de Polimorfismos para cada Haplótipo	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS

%	Porcentagem
AF	Anemia Falciforme
ANOVA	Análise de variância
Arab	Árabe-Indiano
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BD	Bilirrubina Direta
Bem	Benin
BI	Bilirrubina Indireta
Cam	Camarões
CAR	República Centro Africana
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CVO	Crise de Vaso-oclusão
Datp	Deoxi-adenina trifosfato
Dctp	Deoxi-citosina trifosfato
DF	Doença Falciforme
Dgtp	Deoxi-guanina trifosfato
DHL	Desidrogenase Láctica
dNTPs	Desoxinucleosídeos trifosfatados
dTTP	Deoxi-timina trifosfato
EDTA	Ácido etileno de aminotetracético dissódico
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FHEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
fL	Onça líquida
g/dl	Gramas por decilitro
GGT	Gama Glutamil Transferase
Hb	Hemoglobina
HbAS	Traço Falciforme
HbC	Hemoglobina variante C
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina variante S
HbSS	Homozigose da hemoglobina S
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Hm	Hemácias
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Performance
Ht	Hematócrito
HU	Hidroxiuréia
LAEBM	Laboratório de Análises Especializadas em Hematologia e Biologia Molecular
mcg/dL	Micrograma por decilitro
mg/dL	Miligramas por decilitro
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio

mM	Milimolar
ng/mL	Nanograma por mililitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
Pg	Picograma
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
RDW	Amplitude de distribuição dos eritrócitos
RFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
Sem	Senegal
STA	Síndrome Torácica Aguda
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMO	Transplante de Medula Óssea
U/L	Unidades por litro
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UV	Ultravioleta
VCM	Volume Corpuscular Médio
α	Alfa
α –Tal	Talassemia Alfa
β	Beta
β^S	Beta S
γ	Gama
γ^A	Gama A
γ^G	Gama G
δ	Delta
μl	Microlitros
Ψ	Pseudo
Ψ^β	Pseudo Beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.2 Hemoglobinopatias	20
1.2.1 Hemoglobinas variantes S (HbS) e C (HbC)	20
1.2.2 Epidemiologia.....	21
1.3 Anemia Falciforme	24
1.3.1 Manifestações clínicas	26
1.4 Doença SC	28
1.5 Diagnóstico Laboratorial.....	30
1.6 Tratamento	31
1.7 Marcadores de prognóstico na Doença Falciforme	31
1.7.1 Hemoglobina Fetal.....	32
1.7.2 Haplótipos ligados aos genes da globina β^S	32
1.7.3 Talassemia Alfa.....	35
2. OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Modelo e Local de Realização do Estudo	40
3.2 Universo do Estudo.....	40
3.3 Critérios de Elegibilidade.....	40
3.4 Tamanho Amostral.....	40
3.5 Considerações Éticas	41
3.6 Procedimentos de Inclusão dos Pacientes no Estudo	41
3.7 Coletas das Amostras	42
3.8 Análises Hematológicas	44
3.9 Análises Bioquímicas.....	44
3.10 Extração do DNA genômico.....	44
3.11 Análises Moleculares.....	44
3.11.1 Talassemia Alfa.....	45

3.11.2 Determinação dos Haplótipos dos Genes da Globina β^{SC}	45
3.12 Análises Estatísticas.....	47
3.12.1 Distribuição das Variáveis.....	47
3.12.2 Análise de Variáveis Qualitativas ou Categóricas	48
4. RESULTADOS.....	49
4.1 Principais características laboratoriais apresentadas pelos pacientes com Doença Falciforme	49
4.2 Principais características clínicas apresentadas pelos pacientes com Doença Falciforme	54
4.3 Associação entre os dados laboratoriais e os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S e talassemia alfa	59
4.4 Associação entre as principais características clínicas e os dados hematológicos e bioquímicos em pacientes com Doença Falciforme.....	66
4.5 Análises entre biomarcadores clássicos da Doença Falciforme e os eventos clínicos.....	72
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÕES	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
APÊNDICES.....	90
APÊNDICE 1.....	91
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	91
APÊNDICE 2.....	92
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	92
APÊNDICE 3.....	94
FICHA CLÍNICA DO PACIENTE.....	94
APÊNDICE 4.....	95
PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA - TÉCNICA DE FENOL CLOROFÓRMIO (BRAZOL)	95
APÊNDICE 5.....	96
PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA - HIYIELD GENOMIC DNA MINI KIT	96

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hemoglobina

A molécula de hemoglobina (Hb) é uma proteína presente no interior das hemácias cuja principal função é transportar oxigênio aos tecidos. A sua estrutura é formada por um polipeptídeo de tetrâmero globular composto por duas cadeias polipeptídicas alfa (α) e duas não alfa (1,2) as quais, cada uma, possui um grupo prostético de protoporfirina contendo ferro, denominado heme (figura 1) (3).

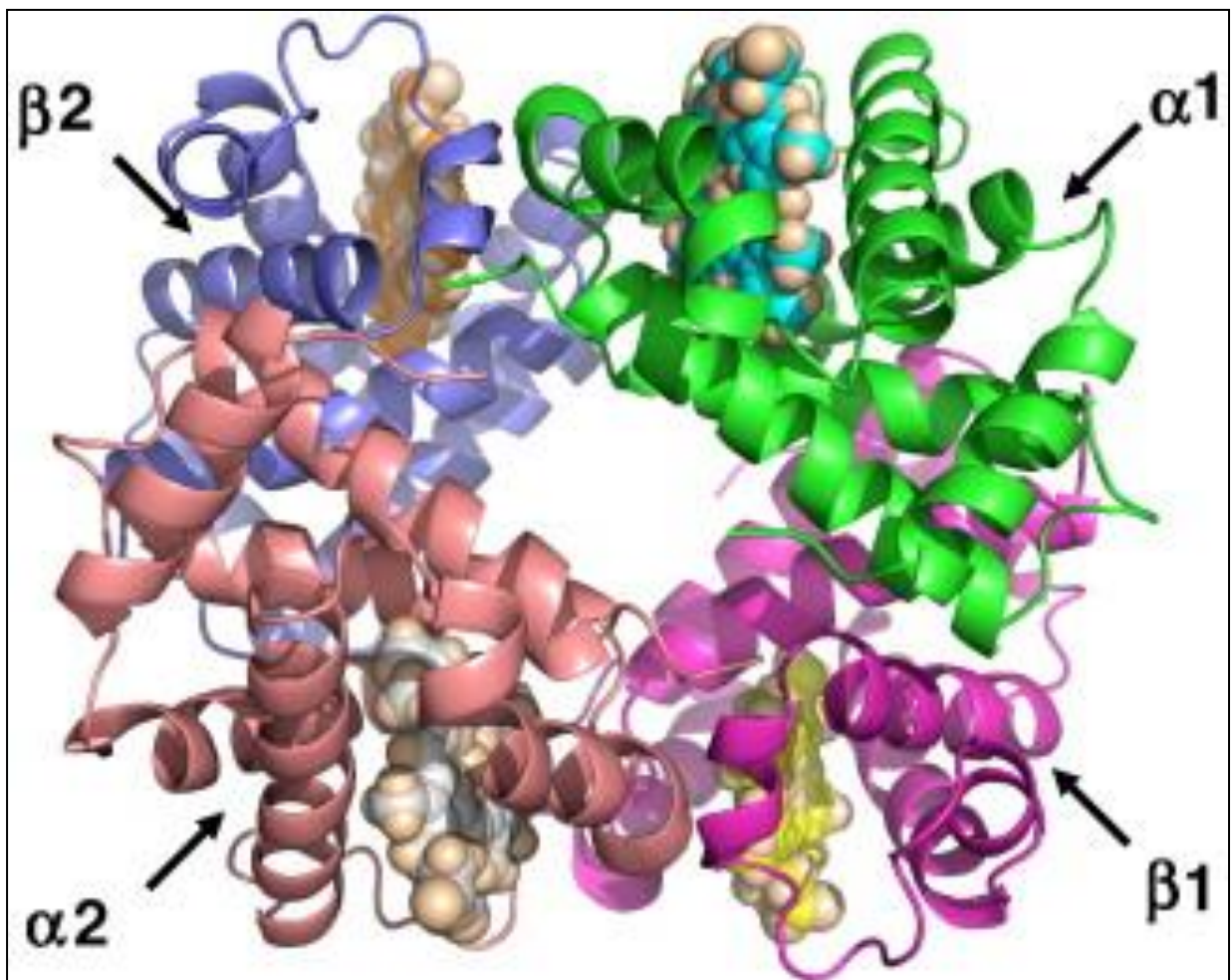


Figura 1 - Estrutura da molécula de hemoglobina, presente nos adultos (HbA1), composta por quatro cadeias (duas cadeias α e duas cadeias β) (4).

Há três principais tipos de hemoglobinas no organismo humano: HbA₁, formada por duas cadeias alfas (α) e duas beta (β); HbA₂, formada por duas cadeias α e duas delta (δ) e a hemoglobina fetal (HbF), presente durante a vida intrauterina, composta por duas cadeias α e duas gama (γ) (3,5).

Durante a vida fetal e no nascimento, a HbF apresenta concentração de 50% a 85% do total de hemoglobinas dos recém-nascidos e, após o nascimento, ocorre queda gradativa mantendo níveis de aproximadamente 1,5% nos adultos (6). No entanto, nos indivíduos com anemia falciforme estes níveis podem oscilar entre 1% a 30%, com média de 8% (7).

1.2 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias humanas referem-se a um grupo de desordens genéticas autossômicas recessivas provocadas por alterações na molécula de hemoglobina decorrentes de mutações nos genes que codificam as cadeias globínicas α , β , γ ou δ (8,9).

As desordens são classificadas em dois principais grupos: as hemoglobinopatias estruturais, onde há mudança na estrutura da molécula de hemoglobina por substituição, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos, como também a fusão de duas cadeias polipeptídicas diferentes (10,11); e as hemoglobinopatias de síntese, causadas por modificações na síntese da hemoglobina a exemplo do que acontece nas talassemias α e β onde há redução ou inibição na síntese (12) através de deleções parciais ou totais dos genes que codificam as cadeias α ou β . (13).

1.2.1 Hemoglobinas variantes S (HbS) e C (HbC)

Dentre as hemoglobinopatias, as variantes S (HbS) e C (HbC) destacam-se neste grupo por serem mais prevalentes na população, conforme demonstrado na tabela 1, atingindo altas frequências em populações como as da África, Índia, Grécia e Estados Unidos (EUA) (14–16).

Tabela 1 – Número de nascimentos por ano que são afetados pelas diferentes doenças da hemoglobina (5,17).

Hemoglobinopatias:	Número anual de nascimentos:
β talassemia maior	22.989
HbE β talassemia	19.128
Doença da HbH	9.568
Hb de Bart (Hidropsia fetal)	5.183
Homozigose da HbS (Anemia falciforme)	217.331
S β talassemia	11.074
Doença SC	54.736

Hb – hemoglobina

A homozigose da hemoglobina S (HbSS) resulta na doença conhecida como anemia falciforme e quando em dupla heterozigose com a hemoglobina C (HbSC) resulta na doença SC (15) que, juntamente com outras hemoglobinopatias como as talassemias, as doenças SD e SE (duplos heterozigotos) e outras mais raras, compõem o grupo das anemias hemolíticas hereditárias denominadas de doença falciforme (DF) (18).

1.2.2 Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as desordens da hemoglobina atingem aproximadamente 7% da população mundial (15), estão presentes em 71% dos 229 países e estima-se que 270 milhões de pessoas sejam portadoras dessas doenças (5). Além disso, estima-se que mais de 300.000 crianças nasçam a cada ano com formas graves de hemoglobinopatias (15,19). Dessas, 3,4% morrem antes de atingir cinco anos de idade e esse percentual aumenta para 6,4% na África (5).

A figura 2 demonstra a prevalência das hemoglobinopatias no mundo que atinge principalmente pessoas oriundas da África do Sul, América Central, ilhas do Caribe, países mediterrâneos (como a Turquia, Grécia e Itália), Índia e Arábia Saudita (20).

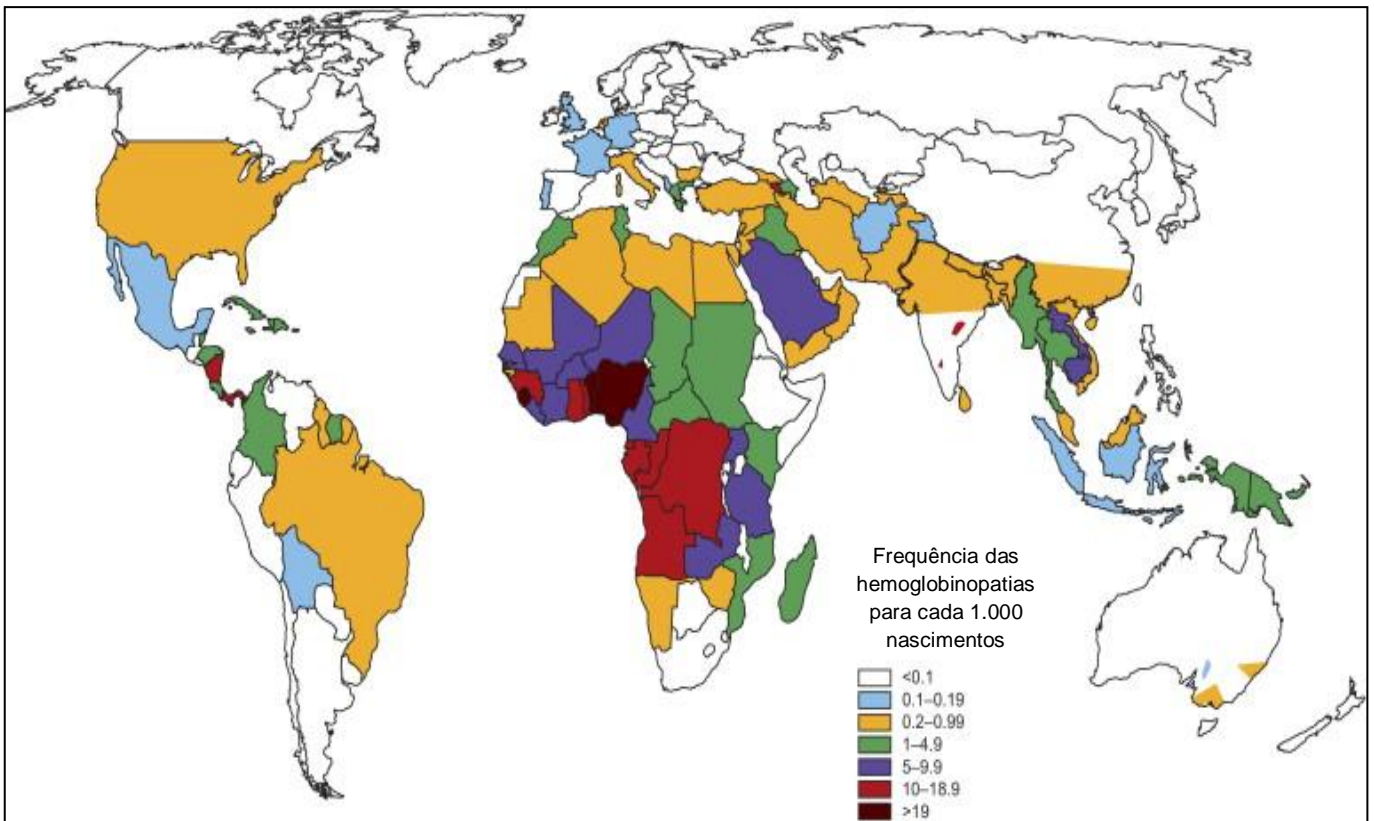


Figura 2 - Distribuição das hemoglobinopatias no mundo (21).

No Brasil, aproximadamente 10 milhões de pessoas são portadoras de hemoglobinas variantes (22). Segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), do Ministério da Saúde, cerca de 3.500 crianças nascem por ano com doença falciforme e 200.000 com traço falciforme, estimando-se que 7.200.000 pessoas sejam portadoras do traço (HbAS) e entre 25.000 a 30.000 da DF (18,23,24). O quadro 1 demonstra a proporção de nascidos vivos com traço falciforme em algumas regiões do Brasil segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN).

Quadro 1 - Incidência de nascidos vivos diagnosticados com traço falciforme em alguns Estados que realizam a Triagem Neonatal (18).

ESTADOS	INCIDÊNCIA
Bahia	1:17
Rio de Janeiro	1:20
Pernambuco e Maranhão	1:23
Goiás	1:25
Espírito Santo	1:28
Minas Gerais	1:30
São Paulo	1:40
Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina	1:65

Silva e colaboradores (2006) observaram na triagem neonatal, realizada pela Associação de Pais e Amigos de Excepcionais (APAE), uma criança com DF a cada 650 nascimentos, sendo a Bahia o Estado que apresenta a maior incidência brasileira (25). Nos Estados de Minas Gerais, Pernambuco, Maranhão e Goiás o índice é de 1/1.400 nascidos vivos enquanto que nos Estados de Santa Catarina e Paraná é de 1/13.500 (figura 3) (18). Cerca de 80% dos óbitos em portadores do perfil SS e SC ocorrem até os 29 anos de idade e 7% em crianças menores de 5 anos de idade (26).

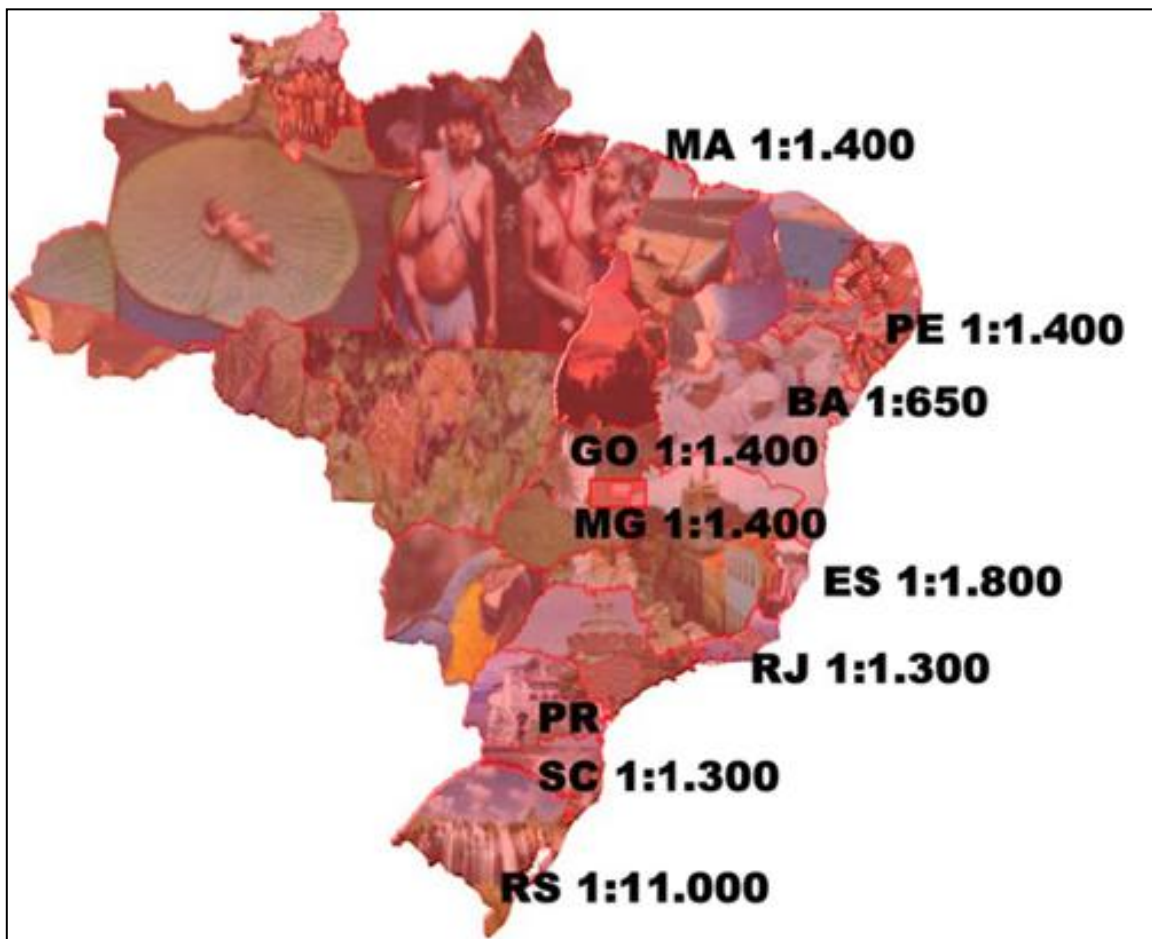


Figura 3 - Proporção de nascidos vivos com diagnóstico de Doença Falciforme em algumas regiões do País segundo o PNTN (18).

Reconhecendo a relevância das hemoglobinopatias na saúde pública do Brasil, o Ministério da Saúde por meio da Portaria n. 822/01, em 2001, incluiu a pesquisa de hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal (23).

1.3 Anemia Falciforme

A anemia falciforme (AF), caracterizada pela homozigose da hemoglobina S (HbSS), é resultado da mutação pontual (GAG>GTG) na sexta posição do gene da globina beta que resulta na substituição do ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia polipeptídica beta (27–29). A doença foi descrita pela primeira vez em 1910 por James Herrick que, ao analisar o esfregaço de sangue de um jovem com manifestações clínicas de intensa dor e grave anemia, observou glóbulos vermelhos em forma de foice (figura 4) (30).

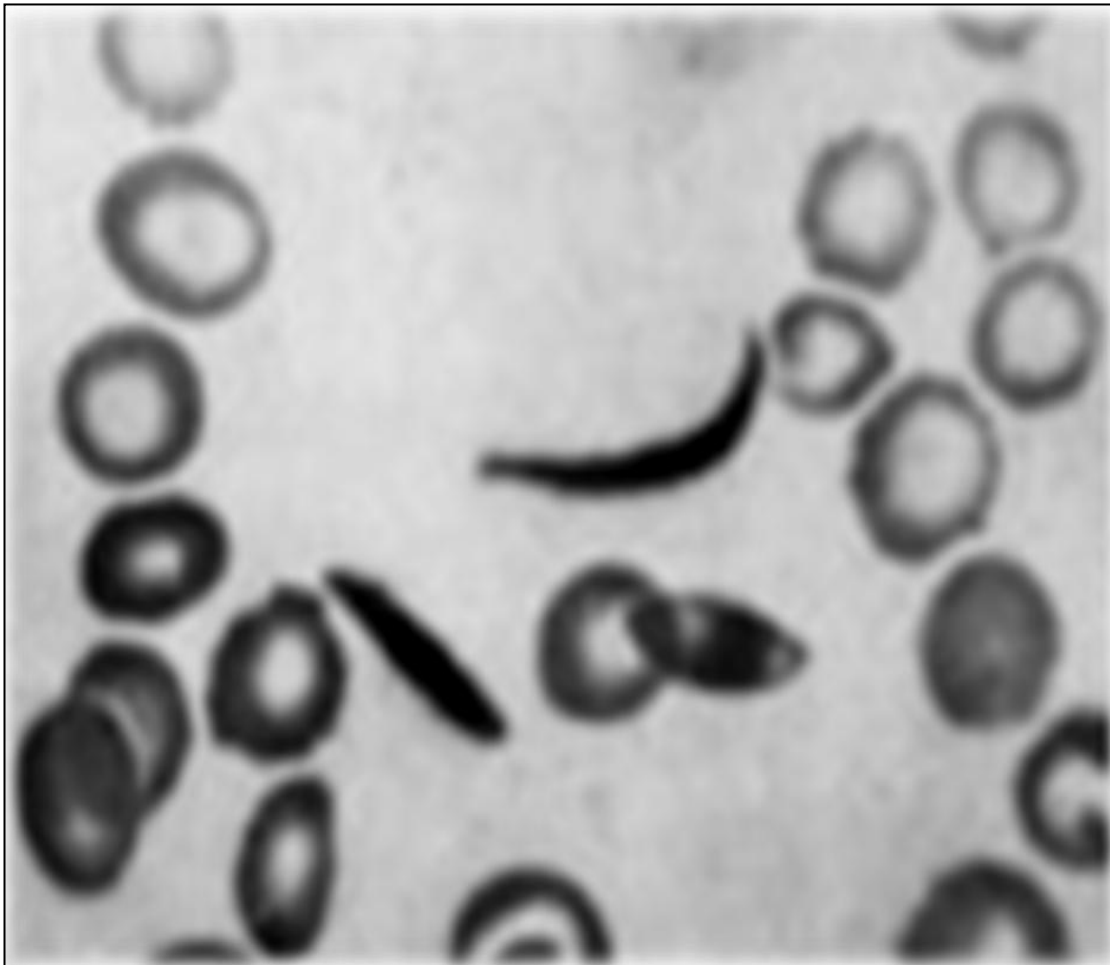


Figura 4 - Primeira evidência de células afoiçadas em sangue periférico descrita por James Herrick (30).

Segundo estudo realizado por Piel e colaboradores (2013), corroborando com estudo realizado por Weatherall (2010), aproximadamente 312.000 crianças nasceram no mundo com anemia falciforme no ano de 2010 e dessas, 75,5% nasceram na África sub-saariana sendo 85.186 na Nigéria e 38.217 na República Democrática do Congo (17,31). Na Índia, nasceram 42.016 crianças com anemia falciforme correspondendo a 88% dos casos na Ásia (31).

No Brasil, Adorno e colaboradores (2005), ao estudarem recém-nascidos de uma maternidade pública da cidade de Salvador-BA, demonstraram incidência de 0,2% portadores de AF (16). Em outras cidades como Natal, no Rio Grande do Norte, a incidência de recém-nascidos com AF foi de 0,05% (32).

1.3.1 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da AF são decorrentes da anormalidade molecular representada pela presença da hemoglobina S (HbS) (33) que, uma vez desoxigenada, sofre interações hidrofóbicas precipitando-se na forma de tetrâmeros tactóides o que compromete a solubilidade, acarreta a polimerização no interior das hemácias e consequentemente dano celular irreversível (34,35).

As hemácias polimerizadas assumem forma de foice e não circulam adequadamente na microcirculação causando obstrução do fluxo sanguíneo, hemólise e crises de vaso-occlusão (CVO) (36) que são responsáveis pelas principais manifestações clínicas, expressiva morbidade e redução da expectativa de vida nesses pacientes (37). A figura 5 demonstra, de forma esquematizada, a fisiopatologia da AF.

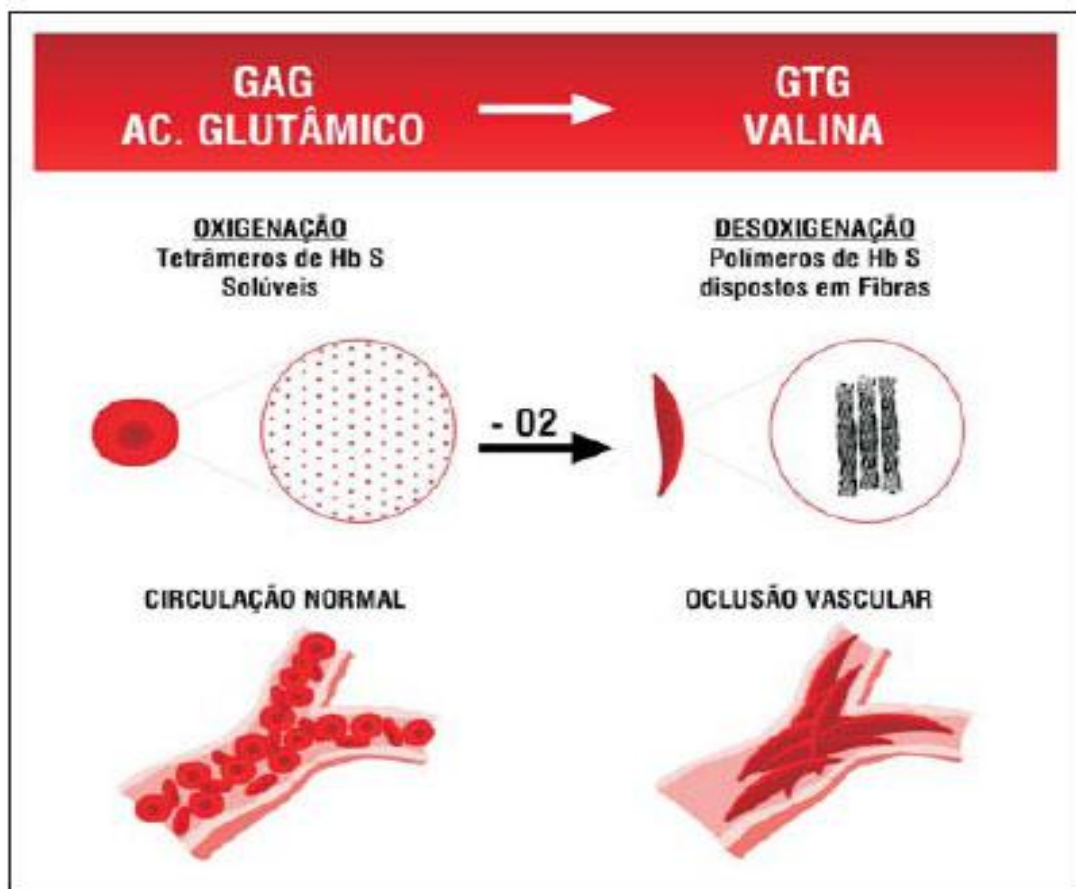


Figura 5 - Desoxigenação das hemácias formando polímeros de HbS e afoijamento das células que causam oclusão vascular (34).

Os portadores da AF apresentam clínica bastante heterogênea, no entanto, as crises dolorosas (principalmente dores abdominais e osteoarticulares) e as infecções são as complicações mais frequentemente encontradas e muitas vezes as primeiras manifestações da doença (18). Vale ressaltar que, geralmente as manifestações clínicas surgem após os 6 meses de idade pois, até esse período, as crianças são assintomáticas devido aos altos níveis de hemoglobina fetal (37).

A dor, resultado da isquemia tecidual causada pela vaso-oclusão, caracteriza o quadro mais dramático e incapacitante da doença, pois as crises dolorosas ocorrem de maneira inesperada e influenciam diretamente na qualidade de vida dos pacientes (34). Frequentemente, as dores acontecem em membros inferiores e superiores e em casos mais graves, como na síndrome torácica aguda (STA) na qual a dor é na região torácica, é acompanhada de febre, dispnéia e hipoxemia (33).

As infecções na maioria dos portadores de AF resultam da asplenia funcional, condição na qual há fibrose e destruição do baço por meio de repetidos infartos ocasionados pela vaso-oclusão e intensa hemólise que levam a perda da função do órgão, e estão entre as principais causas de morte em crianças falcêmicas (33). Em estudo realizado em Minas Gerais, Fernandes e colaboradores (2010) demonstraram 78 óbitos registrados pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal (PETN-MG) e observaram a infecção (incluindo pneumonia e septicemia) como sendo a principal causa de morte registrada seguida pelo sequestro esplênico agudo (38). Outro estudo, realizado por Filho e colaboradores (2012) em crianças de 0 a 80 meses acompanhadas no Hemocentro do Rio de Janeiro, demonstrou ser a infecção o evento mais frequente acometendo 88,5% do total de crianças (39).

Nos adultos, as úlceras de membros inferiores são complicações frequentes em pacientes homocigotos (HbSS), acometendo entre 8% a 10%, e mais raras em pacientes portadores da dupla heterozigose SC (40). Atingem áreas com menor tecido subcutâneo e pele fina, como a região maleolar interna ou externa, são dolorosas e suas lesões são, em sua maioria, de origem traumática, existindo variação do período de cicatrização (41).

Outras complicações incluem anemia hemolítica crônica, acidentes vasculares cerebrais (AVC) - ataques isquêmicos transitórios, derrames isquêmicos e AVC hemorrágico, por vezes associados com convulsões (42) -, priapismo, retinopatia, hipertensão pulmonar e danos cumulativos em múltiplos órgãos (37,43) (quadro 2).

Quadro 2 - Manifestações clínicas e complicações apresentadas por pacientes com anemia falciforme evidenciando a apresentação multissistêmica da doença (33).

<p>Sistema Linfo-hematopoiético: Anemia Asplenia Esplenomegalia crônica Episódios de sequestro esplênico agudo</p> <p>Pele: Palidez Icterícia Úlcera de perna</p> <p>Osteoarticular: Síndrome mão-pé Dores osteoarticulares Osteomielite Necrose asséptica de cabeça de fêmur Compressão vertebral Gnatopatia</p> <p>Olhos: Retinopatia proliferativa Glaucoma Hemorragia retiniana</p>	<p>Sistema Nervoso Central: Acidente Isquêmico Transitório Infarto Hemorragia cerebral</p> <p>Cardiopulmonar: Cardiomegalia Insuficiência cardíaca Infarto pulmonar Pneumonia</p> <p>Urogenital: Priapismo Insuficiência renal crônica</p> <p>Gastrointestinal e abdominal: Crises de dor abdominal Cálculos biliares Icterícia obstrutiva Hepatopatia</p> <p>Geral: Hipodesenvolvimento somático Retardo da maturação sexual Maior susceptibilidade a infecções</p>
---	---

1.4 Doença SC

A hemoglobina C (HbC) foi descoberta em 1950 por Itano e Neel que, ao estudarem duas famílias, observaram quadro hematológico semelhante ao da anemia falciforme, mas com menor gravidade (44). Em 1954, Diggs e colaboradores observaram nos eritrócitos de um menino branco, cuja hemoglobina era do tipo C, cristais de hemoglobina que pareciam células em alvo (45) (figura 6).

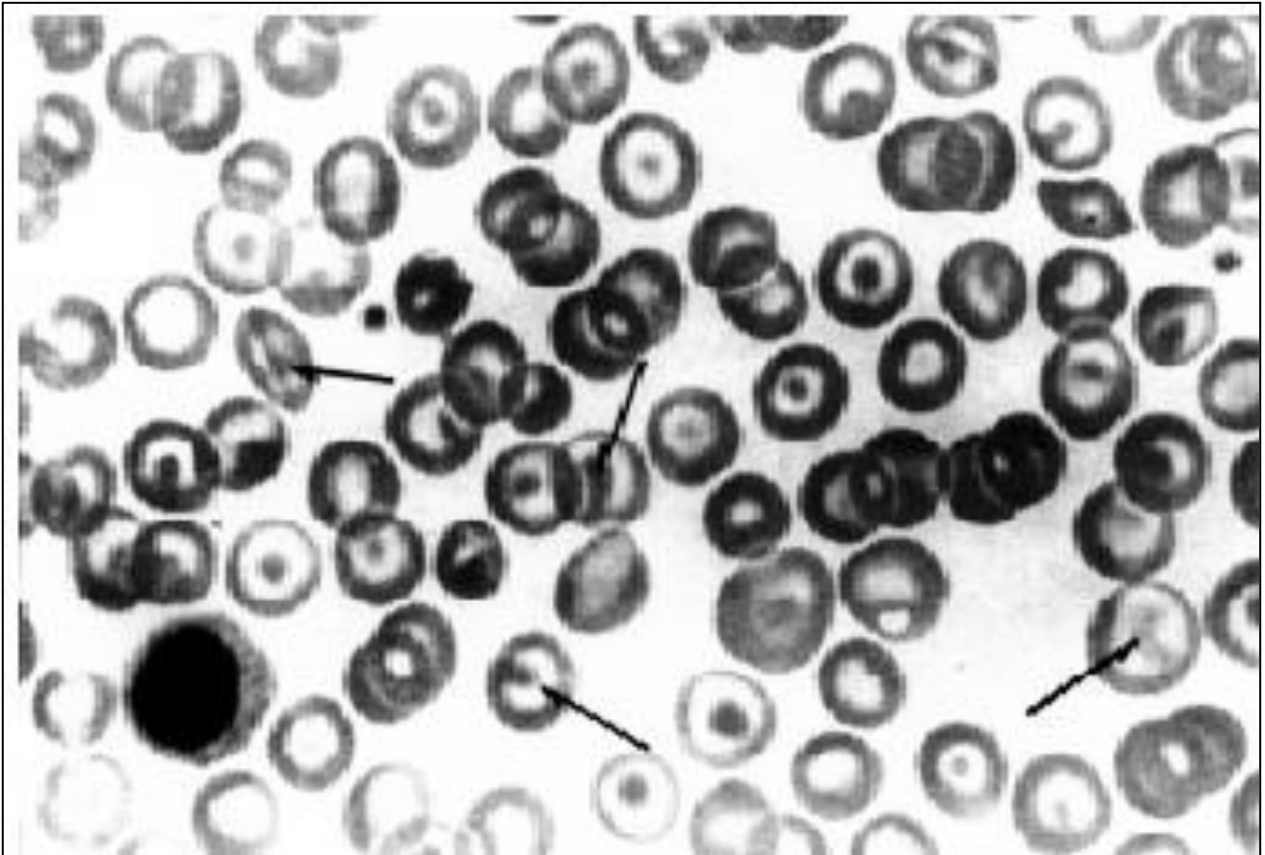


Figura 6 - Presença de cristais de hemoglobina C, semelhantes a células em alvo, em diversos eritrócitos (46).

A alteração da forma das hemácias que adquire aspecto de células em alvo, observadas nos esfregaços sanguíneos, surge porque a hemoglobina C possui a propriedade de alterar a troca iônica pela membrana da hemácia (47). Assim, a hemoglobina anormal ativa a perda de potássio e água pelas células vermelhas causando desidratação do eritrócito e aumento da concentração intracelular da hemoglobina o que reduz a sua vida média que, apesar disso, é bem maior do que a dos eritrócitos com hemoglobina S (46,48).

A doença SC é resultado da mutação pontual que ocorre na sexta posição do gene da globina beta onde há a substituição do ácido glutâmico pela lisina na sexta posição da cadeia polipeptídica beta (46,47,49). É a segunda hemoglobinopatia mais frequente após a anemia falciforme e estima-se que 54.736 bebês nasçam com a doença SC a cada ano no mundo (17). Em algumas regiões do Oeste Africano como a norte de Gana, Burkina Faso e Nigéria Ocidental, aproximadamente um quarto da

população possui a doença SC (48). No Brasil, a frequência é de 1/3.450 nascimentos (50).

Os indivíduos homocigotos (HbCC) apresentam sintomatologia caracterizada por anemia hemolítica leve a moderada e os portadores da heterocigose HbAC não apresentam anemia sendo assintomáticos (47,48). Já os portadores da doença HbSC, que são heterocigotos duplos por herdar um gene da globina β^S de um progenitor e um gene da globina β^C do outro, possuem anemia hemolítica de moderada a grave e apresentam episódios de vaso-oclusão, danos a órgãos e outras complicações encontradas em portadores da anemia falciforme, porém com menor frequência (48,49).

Em estudo realizado na cidade de São Paulo, Cabañas-Pedro e colaboradores (2013) observaram as manifestações clínicas de 29 pacientes adultos com doença SC e concluíram uma alta frequência de comprometimento renal (9 de 29, 31%), crises de vaso-oclusão (8 de 29, 27,6%) e retinopatias (6 de 29, 20,8%), e frequências menores de úlceras de membros inferiores (3 de 29, 10,3%), priapismo (3 de 29, 10,3%) e osteonecrose (4 de 29, 13,8%) (51).

1.5 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico das hemoglobinopatias estruturais é comumente realizado por meio das técnicas eletroforéticas em acetato de celulose e agarose devido à rapidez das análises e baixo custo. Todavia, os diagnósticos feitos por essas técnicas são trabalhosos e pouco precisos quando comparados à técnica da Cromatografia Líquida de Alto Performance (HPLC) (1).

Atualmente, a maior parte dos programas de triagem neonatal, que permitem o diagnóstico pré-natal da doença falciforme a partir da 10^a semana de gravidez (37), substituiu os métodos convencionais de eletroforese em acetato de celulose e agarose pela HPLC, caracterizada por ser uma técnica mais sensível e específica capaz de detectar um maior número de hemoglobinas anormais (52).

1.6 Tratamento

Os objetivos da terapia para a DF incluem atendimento ambulatorial otimizado com acompanhamento clínico e a realização de exames de rotina periodicamente, controle da dor com analgésicos (dores graves opióides), profilaxia medicamentosa, transfusões de sangue, hidratação e repouso, além da adequada orientação aos pacientes e a seus familiares acerca da doença (53,54).

Atualmente, o transplante de medula óssea (TMO) e o uso de hidroxiuréia (HU) são as opções terapêuticas mais eficazes disponíveis para tratamento da DF (55). No entanto, apesar de o TMO ser considerado como medida curativa e mesmo quando há um doador disponível, é considerado de alto risco por apresentar altos índices de morbimortalidade (56). Além disso, apesar de o TMO ter sido realizado com sucesso em alguns pacientes com DF, estudos ainda estão sendo desenvolvidos para concretizar a eficácia da terapêutica (54).

A hidroxiuréia (HU) é a droga de escolha para prevenção de complicações da DF uma vez que apresenta vários efeitos diretos e indiretos nos mecanismos fisiopatológicos como o aumento da síntese de HbF e a diminuição no número dos neutrófilos e das moléculas de adesão nos eritrócitos (18,57).

Os efeitos da HU são observados nas primeiras semanas com o aumento da hemoglobina, redução da hemólise, diminuição da aderência dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas no endotélio vascular, diminuição da viscosidade sanguínea e vasodilatação, contribuindo para a diminuição dos fenômenos inflamatórios e vaso-oclusivos (57). Conseqüentemente, há diminuição nas hospitalizações e necessidade de transfusões sanguíneas e menor incidência de síndrome torácica aguda tendo impacto importante na diminuição da mortalidade por DF (18,54).

1.7 Marcadores de prognóstico na Doença Falciforme

Vários fatores contribuem para a diversidade fenotípica da DF, como os níveis de hemoglobina fetal (HbF) (58), os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S (59), a talassemia alfa (α -Tal) (60), os fatores nutricionais (concentrações séricas

de ácido fólico e vitamina B12) e ambientais (variações na temperatura atmosférica). Esses fatores influenciam as características hematológicas e a gravidade das manifestações clínicas da doença falciforme afetando o evento primário do processo fisiopatológico da doença (61).

1.7.1 Hemoglobina Fetal

A HbF é considerada um forte modulador das características clínicas e hematológicas da anemia falciforme (62) uma vez que altos níveis de HbF, em geral, reduzem a gravidade da doença (28). Por possuir afinidade aumentada pelo oxigênio, a HbF também influencia a evolução clínica de outras hemoglobinopatias (63).

Os efeitos benéficos da HbF estão baseados na inibição do fenômeno de polimerização da HbS com formação de um híbrido assimétrico composto por cadeias polipeptídicas das duas hemoglobinas, $\alpha_2\beta\gamma$, sendo que o híbrido resultante interage com os sítios envolvidos na estabilização dos polímeros formados pela HbS desoxigenada (64).

Estudos epidemiológicos publicados sugerem que as complicações da DF ligadas a vaso-oclusão e a viscosidade sanguínea estão relacionadas com a concentração de HbF. Assim, níveis elevados de HbF foram associados a uma redução de episódios de dor aguda, úlceras de membros inferiores, osteonecrose, síndrome torácica aguda, hospitalizações, transfusões e consequentemente, redução na morbimortalidade (62).

1.7.2 Haplótipos ligados aos genes da globina β^S

Os haplótipos ligados aos genes da globina β^S , presente no cromossomo 11 de indivíduos portadores do gene β^S , são definidos por polimorfismos reconhecidos por endonucleases de restrição que são capazes de clivar sequências-alvo na fita de DNA, dando origem a fragmentos de diferentes tamanhos (figura 7) (65,66).

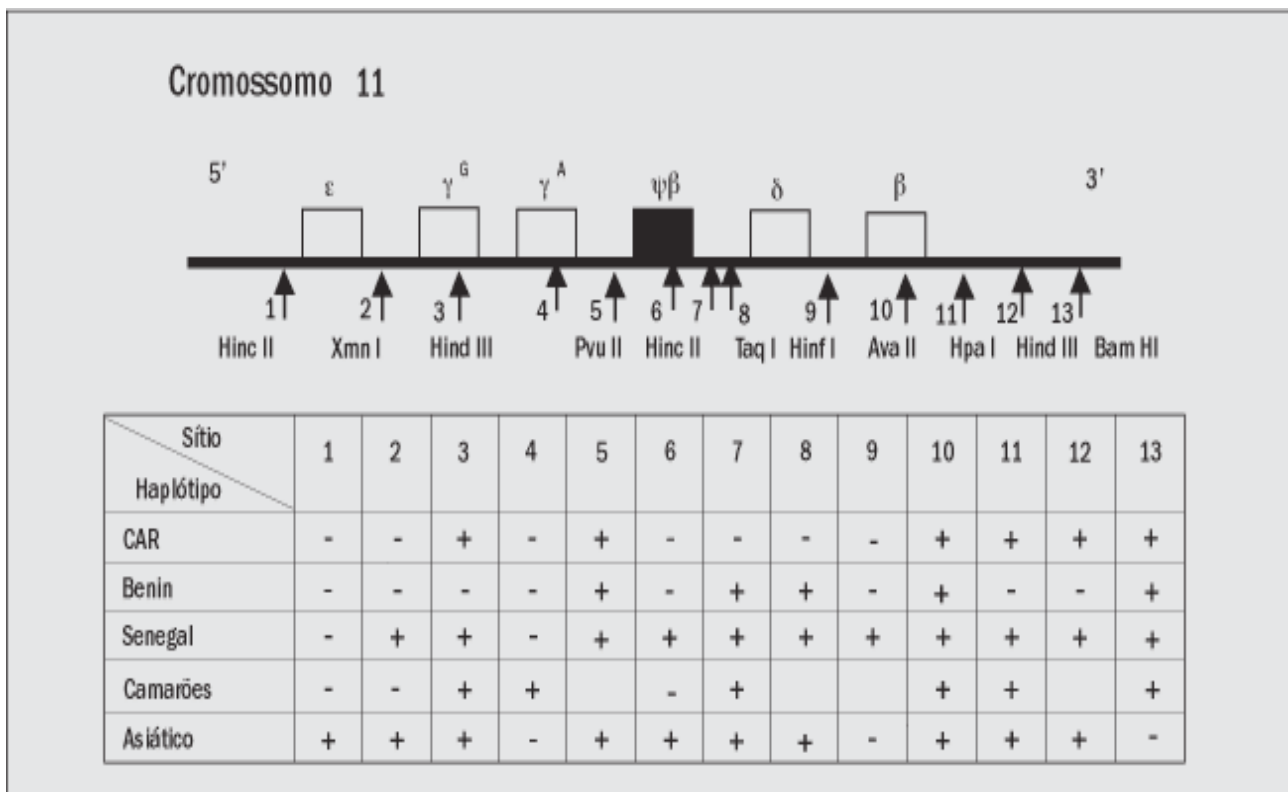


Figura 7 - Principais haplótipos do gene β^S definidos pela ação de 13 enzimas de restrição (65,67).

Os principais haplótipos dos genes da globina β^S regularmente encontrados entre os portadores de anemia falciforme em todo o mundo são: Senegal (Sen), Benin (Ben), Bantu ou República Centro Africana (CAR), camarões (Cam) e Árabe-Indiano (Arab), nomeados de acordo com a região geográfica ou grupo étnico no qual eles foram originalmente identificados (68–70). Haplótipos menos comuns são denominados de haplótipos atípicos e são gerados, provavelmente, por uma variedade de mecanismos genéticos como mutações pontuais nos sítios polimórficos de restrição (71).

Os haplótipos CAR e Ben são os principais haplótipos do gene da globina β^S encontrados no Brasil, seguidos dos haplótipos Sen e Cam que apresentam diferentes frequências dependendo da região. Cabral e colaboradores (2011) reuniram estudos sobre a frequência dos haplótipos do gene da globina β^S realizados por diversos autores em várias regiões do país conforme demonstra o quadro 3 (72).

De acordo com a origem histórica da população afrodescendente o haplótipo CAR tem maiores frequências nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Pará. Já em Salvador, os haplótipos encontrados com maiores frequências são o Ben e o CAR, consequência do tráfico de escravos domésticos e posterior migração interna de outras regiões do Brasil (69), enquanto no Rio de Janeiro prevalece o haplótipo CAR (73).

Os haplótipos dos genes da globina β^S têm um papel importante na determinação da gravidade da AF (33), pois entre os diferentes tipos de haplótipos há variações nas concentrações de HbF (72). Desta forma, os haplótipos do gene β^S podem fornecer dados preditivos acerca da evolução da doença e de seu nível de gravidade (74).

Quadro 3 - Resultados da investigação de haplótipos do gene β^S em várias regiões no Brasil (72).

AUTOR/ANO	POPULAÇÃO	Nº DE PACIENTES	CAR Nº (%)	Ben Nº (%)	Cam Nº (%)	Sen Nº (%)	Arab Nº (%)	Atp Nº (%)
Costa <i>et al.</i> (1984)	São Paulo (SP)	37	61.0	38.0	-	-	-	1.0
Costa <i>et al.</i> (1984)	Salvador (BA)	36	49.0	51.0	-	-	-	-
Zago <i>et al.</i> (1992)	São Paulo (SP)	37	62.2	23.0	-	1.3	-	9.5
Gonçalves <i>et al.</i> (1994)	São Paulo (SP)	74	62.2	33.8	-	-	-	4.0
Pante de Sousa <i>et al.</i> (1998)	Belém (PA)	30	67.0	30.0	-	3.0	-	-
Conçalves <i>et al.</i> (2003)	Salvador (BA)	80	48.1	45.6	-	0.7	-	5.6
Adorno <i>et al.</i> (2004)	Salvador (BA)	80	46.2	48.8	1.9	0.6	-	0,6
Galiza Neto <i>et al.</i> (2005)	Fortaleza (CE)	22	31.8	43.2	-	2.3	-	-
Cardoso e Guerreiro (2006)	Belém (PA)	130	66.0	21.8	1.3	10.9	-	-
Bezerra <i>et al.</i> (2007)	Recife (PE)	74	81.1	14.2	0.8	-	-	3.9
Fleury (2007)	Rio de Janeiro (RJ)	74	54.0	44.6	-	1.4	-	-
Adorno <i>et al.</i> (2008)	Salvador (BA)	125	41.6	55.2	1.2	0.4	0.4	1.2
Silva <i>et al.</i> (2009)	Fortaleza (CE)	34	66.2	22.0	-	-	-	11.8
Cabral <i>et al.</i> (2011)	Natal (RN)	47	75.5	12.8	6.4	-	-	5.3

O haplótipo Sen está associado a altos níveis de HbF (> 15%) e uma clínica menos grave da doença, ao passo que para o haplótipo Ben, níveis médios de HbF são menores (5-15%), e a doença tem um curso clínico intermediário. O haplótipo CAR apresenta redução acentuada nos níveis de HbF (< 5%) e uma evolução clínica mais grave, e o haplótipo Arab está associado com altos níveis de HbF e heterogeneidade no que diz respeito ao curso clínico (68,75,76). Neste contexto, muitos estudos têm sido realizados para analisar os determinantes genéticos no aglomerado de genes da região β que possam afetar a expressão do gene globina e, assim, relacionar-se com a diversidade clínica da anemia falciforme (75).

1.7.3 Talassemia Alfa

A talassemia alfa constitui um grupo heterogêneo de alterações hereditárias da síntese de hemoglobina causadas por mutações que afetam os genes reguladores alfa e promove desequilíbrio no conteúdo quantitativo das globinas (9,77,78). Caracteriza-se por ausência total ou parcial na produção dos genes que codificam as cadeias polipeptídicas da alfa globina resultando no desenvolvimento de anemia microcítica e hipocrômica (79).

Os portadores de α -Tal são caracterizados segundo o número de genes afetados: apenas um gene afetado - portador silencioso, assintomático e sem anormalidades hematológicas; dois genes alfa afetados - talassemia alfa heterozigota, portador também assintomático, no entanto apresenta microcitose e hipocromia; três genes alfa afetados - Doença de hemoglobina H na qual o portador apresenta anemia moderada a grave e intensa microcitos e hipocromia; e quando os quatro genes alfa são afetados caracteriza a Hidropsia Fetal, condição incompatível com a vida (13).

A talassemia alfa atinge aproximadamente 5% da população mundial (80) e possui incidência elevada entre os povos da Índia, Sudeste Asiático, Oceania, Oriente Médio e Mediterrâneo, bem como em todo o continente africano (77). No Brasil, a frequência de α -Tal é bastante heterogênea com variações na população em geral de 0,05% a 12,5%, frequências essas encontradas em estudos realizados nas cidades de Natal (32) e São José do Rio Preto (81), respectivamente.

Na população portadora de anemia falciforme, a frequência de talassemia alfa atinge, aproximadamente, 20% dos pacientes (82). Lyra e colaboradores (2005) realizaram estudo com 71 pacientes portadores de anemia falciforme de duas cidades brasileiras, São Paulo e Salvador, e observaram frequências de talassemia alfa de 22,5 e 28,2%, respectivamente (83).

A presença de talassemia alfa nos indivíduos portadores da anemia falciforme diminui o potencial de polimerização da HbS (79), conduz à presença de um número menor de células densas e pouco deformáveis e em geral, aumenta o hematócrito do paciente reduzindo os eventos vaso-oclusivos, tais como acidentes vasculares cerebrais, úlceras maleolares, glomerulopatia (macroalbuminúria) e priapismo, além de preservar a função do baço (28). Assim como na anemia falciforme, quando há a coexistência de talassemia alfa com a doença SC, células menos densas estão presentes o que contribui para a diminuição das crises dolorosas (48,84).

A Figura 8 demonstra a representação esquemática da talassemia alfa e dos diferentes haplótipos da globina beta e suas associações com a diversidade fenotípica presente na anemia falciforme.

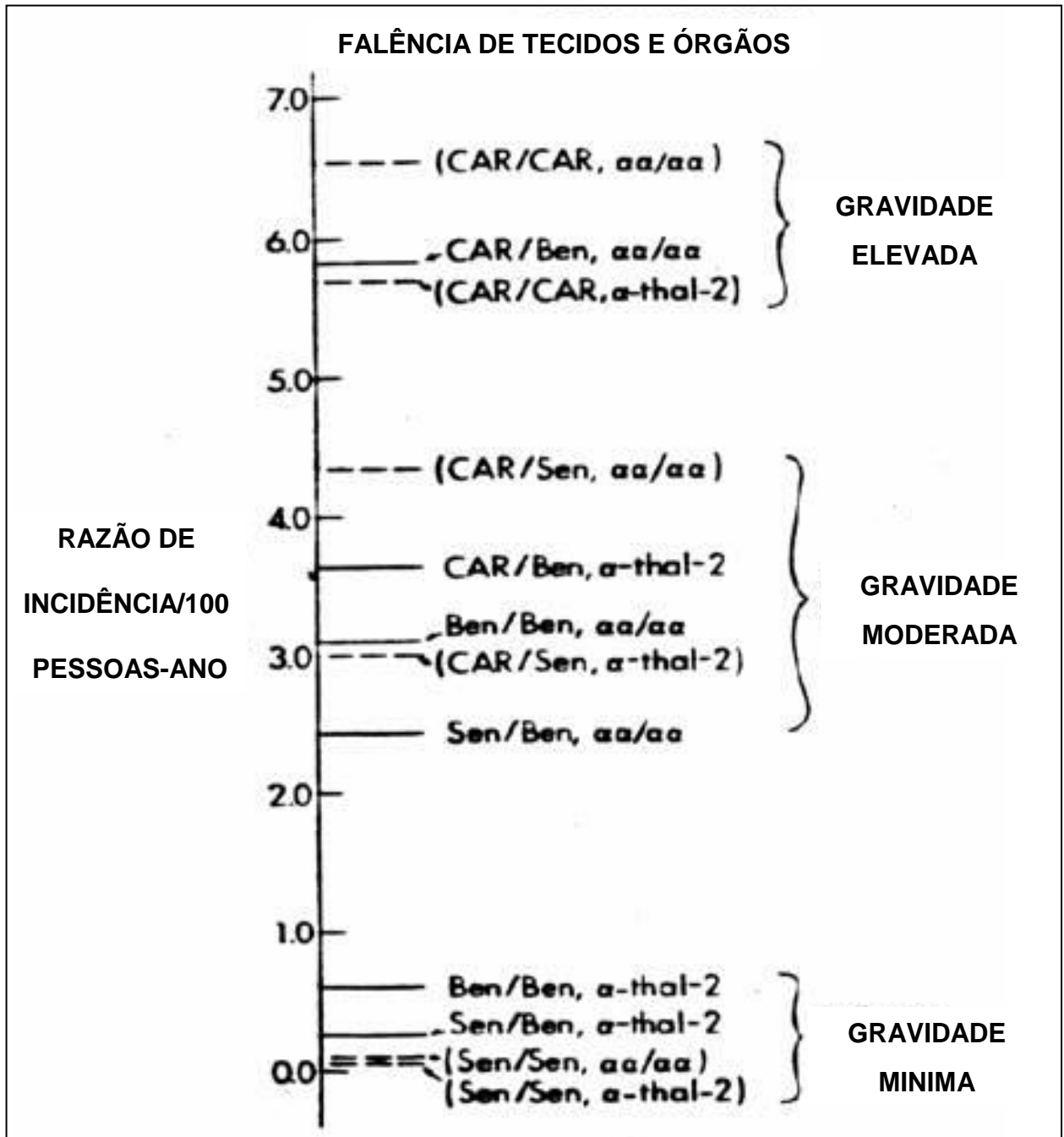


Figura 8 - Descrição do prognóstico clínico associado aos pacientes com anemia falciforme na presença e ausência de talassemia α e dos diferentes haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β S (76).

Considerando a importância da hemoglobina fetal, dos haplótipos ligados aos genes da globina β^S e da talassemia alfa na modulação da doença falciforme associados à ausência de estudos genético-epidemiológicos caracterizando fenotipicamente os pacientes no Estado do Amazonas, acreditamos que os resultados advindos do nosso estudo irá colaborar para ampliar o conhecimento acerca desses moduladores na nossa população além de contribuir, futuramente, para o manejo terapêutico, prevenção da gravidade clínica e para o desenvolvimento de mais pesquisas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Descrever os moduladores clínicos nos pacientes portadores dos perfis SS e SC atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM).

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar o perfil demográfico, os eventos clínicos e os parâmetros hematológicos e bioquímicos apresentados pelos pacientes com doença falciforme, portadores dos perfis SS e SC;
- Identificar o genótipo da talassemia alfa deleção 2^{3.7kb} e associá-los aos eventos clínicos e parâmetros hematológicos e bioquímicos nos pacientes com doença falciforme, portadores dos perfis SS e SC;
- Mensurar a concentração de hemoglobina fetal nos pacientes com doença falciforme, portadores dos perfis SS e SC;
- Caracterizar os haplótipos ligados aos genes da globina beta β^S e associá-los aos eventos clínicos e parâmetros hematológicos e bioquímicos nos pacientes com doença falciforme, portadores dos perfis SS e SC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo e Local de Realização do Estudo

Estudo descritivo do tipo transversal realizado em pacientes diagnosticados com doença falciforme acompanhados na FHEMOAM, centro de referência para o diagnóstico e atendimento dessa patologia no Estado do Amazonas, e que atenderam aos critérios de inclusão.

3.2 Universo do Estudo

Pacientes diagnosticados com doença falciforme, portadores dos perfis de hemoglobinas SS e SC, atendidos na FHEMOAM.

3.3 Critérios de Elegibilidade

- Pacientes com Doença Falciforme - portadores dos perfis SS e SC - de ambos os sexos, independentes de idade, raça, ancestralidade, doenças pré-existentes, profilaxia medicamentosa, uso de HU e transfusões sanguíneas;
- Aceitação em participar da pesquisa por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- Para a realização das análises moleculares, hematológicas e bioquímicas as amostras tiveram que ser suficientes, estar bem conservadas e ausentes de contaminação e coagulação.

3.4 Tamanho Amostral

O tamanho amostral da pesquisa foi realizado por conveniência, uma vez que não há estudos epidemiológicos publicados em nossa região caracterizando a população de interesse.

3.5 Considerações Éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) tendo como número CAAE: 37941514.4.0000.5020 (Apêndice 1).

Todos os participantes foram informados quanto aos objetivos da realização deste estudo, procedimentos necessários, duração esperada, relevância e, sobretudo a possibilidade de deixar de participar a qualquer tempo sem prejuízo no atendimento médico ou qualquer outra espécie de penalidade. Posteriormente, cada participante assinou o TCLE (Apêndice 2), de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº466/2012. O consentimento dos pais ou responsáveis foi solicitado para os menores de 18 anos.

Os experimentos seguiram as normas de Biossegurança de acordo com a Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005, regulamentada pelo decreto no. 5.591 de 22 de novembro de 2005, e as normas técnicas do Manual de Biossegurança de Procedimentos da Comissão Técnica de Biossegurança da FIOCRUZ (2005).

3.6 Procedimentos de Inclusão dos Pacientes no Estudo

Os pacientes foram convidados e incluídos no estudo durante atendimento ambulatorial o qual é realizado periodicamente na FHMOAM, conforme Diretrizes da Política Nacional de Atenção Integral às pessoas com Doença Falciforme implementadas pelo Ministério da Saúde, no período de janeiro a dezembro do ano de 2014. Após a inclusão do participante, observados os critérios de elegibilidade, foi gerada uma ficha clínica individual (Apêndice 3), preenchida pela própria pesquisadora, composta por informações pessoais (identificação, idade, gênero, histórico familiar) e informações médicas (genótipo de hemoglobina, internações, transfusões, manifestações clínicas, cirurgias) segundo informações colhidas pelos pacientes e prontuário médico. Os nomes dos pacientes foram mantidos em sigilo e tiveram acesso às fichas individuais somente os profissionais da pesquisa.

3.7 Coletas das Amostras

Para as extrações de DNA e determinações hematológicas foram coletados 5 ml de sangue venoso em anticoagulante (Ácido etileno de aminotetracético dissódico - EDTA), na concentração de 1,5 mg/mL (85). Também foram coletados 5 ml de sangue venoso sem aditivos para a obtenção do soro destinado às análises bioquímicas. Todos os resultados foram computados em uma ficha geral de registro e acompanhados para composição do banco de dados do estudo e análises estatísticas.

As amostras de sangue foram coletadas no Laboratório de Hematologia da FHEMOAM e encaminhadas ao Laboratório de Análises Especializadas em Hematologia e Biologia Molecular (LAEBM), localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da UFAM, para a realização das extrações de DNA, análises moleculares (talassemia alfa), hematológicas e bioquímicas. As análises moleculares dos haplótipos dos genes da globina β^S foram realizadas na Universidade Federal da Bahia (UFBA) (figura 9).

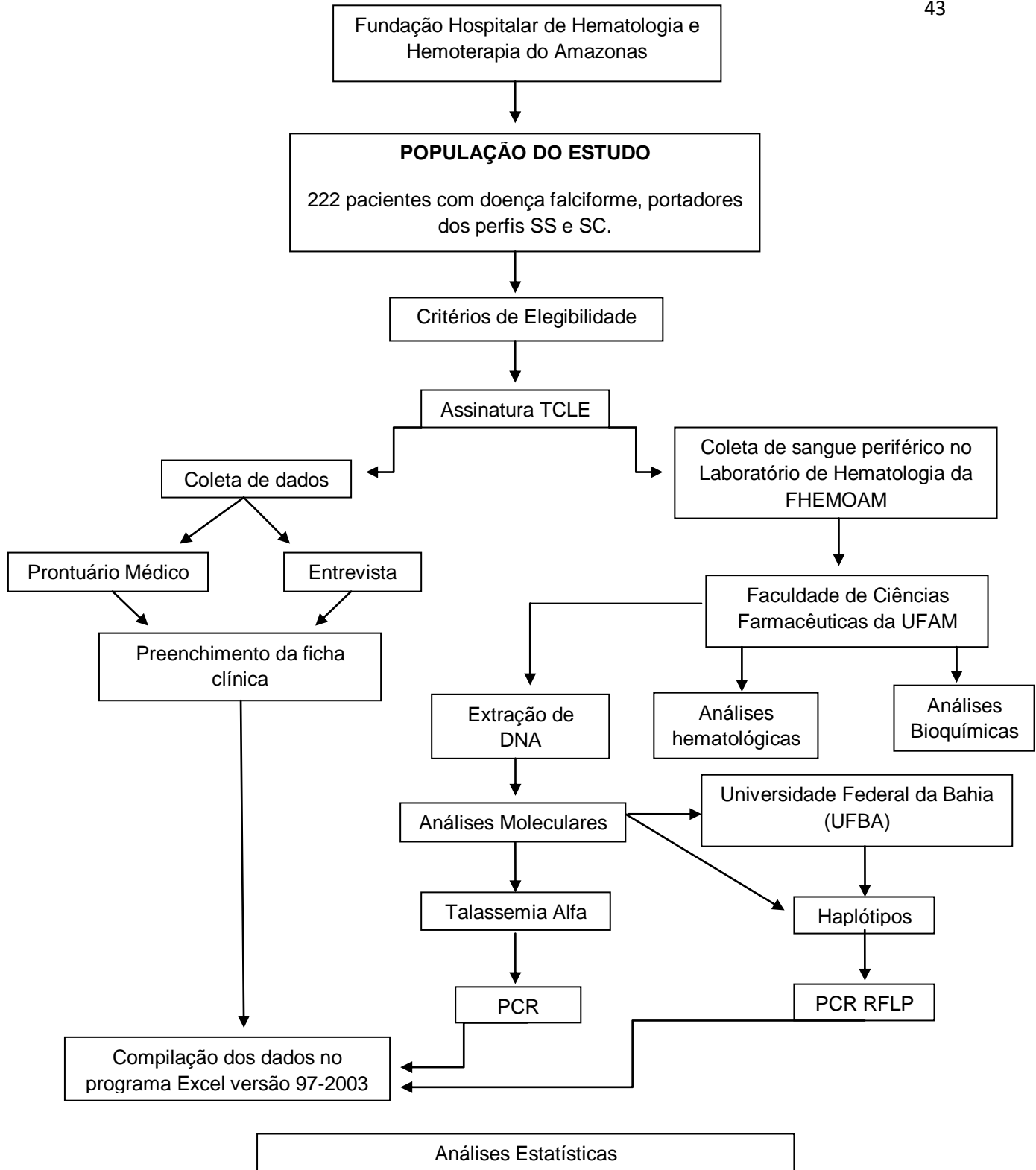


Figura 9 - Fluxograma do desenho de estudo.

3.8 Análises Hematológicas

Os parâmetros hematológicos foram realizados em analisador automático de hematologia BC - 5800 (Mindray, Shenzhen, China) e incluíram a contagem global de hemácias (Hm), concentração de hemoglobina (Hb) e o hematócrito (Ht); os índices do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), além da amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW), contagem de global e diferencial dos leucócitos e contagem de plaquetas.

3.9 Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas pelo método automatizado utilizando o equipamento A25 (BioSystems SA, Barcelona, Espanha) e incluíram a determinação do perfil lipídico (HDL colesterol e triglicerídeos), dosagem de proteínas totais e frações, bilirrubinas direta (BD) e indireta (BI), desidrogenase láctica (DHL), uréia, creatinina, gama glutamil transferase (GGT), ferro e ferritina.

3.10 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi isolado de leucócitos do sangue periférico utilizando-se as técnicas de fenol-clorofórmio (Brazol) e, quando disponível, por meio do kit HiYield Genomic DNA Mini Kit (BioAmerica Inc., EUA) (Apêndices 4 e 5). O DNA extraído foi armazenado a - 20°C no LAEBM da UFAM. Para a avaliação da concentração do DNA utilizou-se o NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA).

3.11 Análises Moleculares

As análises moleculares para talassemia alfa $2^{3.7\text{kb}}$ foram realizadas pela técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e os haplótipos ligados aos genes da globina β^{SC} pela PCR-RFLP utilizando-se as sequências de oligonucleotídeos sintéticos (primers) específicos para os genes estudados.

3.11.1 Talassemia Alfa

A caracterização molecular da talassemia alfa deleção $-\alpha^{3.7}$, foi investigada por meio da técnica da PCR de acordo com Baysal & Huisman (1994) utilizando-se primers contendo as sequências dos genes normal (A + C) e mutante (A + B) (86).

A reação foi realizada em tampão contendo 15mM de solução de cloreto de magnésio ($MgCl_2$); 25mM de $MgCl_2$; 200mM de dCTP + dGTP e 100mM de dATP + dTTP de mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs); 5x Q-solution; 10x CoralLoad concentrado; 0,25 μ l de cada primer; 5U da enzima Taq DNA polimerase (Platinum Taq, Life Technologies, Gaithersburg, MD) e 2,5 μ l de DNA, em volume final de 25 μ L.

A amplificação foi realizada utilizando o termociclador T100 (Bio-Rad, EUA) e, de acordo com Foglietta e colaboradores (1996), a reação compreendeu uma etapa inicial de desnaturação do DNA à 98°C por 3 minutos, 5 ciclos a 98°C por 30 segundos, 66°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 3 minutos. Após, foi realizado mais 30 ciclos a 96°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos com etapa final de 72°C por 15 minutos (87). Os produtos da PCR foram submetidos à corrida eletroforética (Bio-Rad, EUA) em gel de agarose a 1%, durante 1 hora e após, visualizados em câmara ultravioleta (UV).

As reações realizadas com os primers A + B e A + C amplificaram fragmentos de 1.700 pb (1,7 kb) para a identificação das deleções e genes normais, respectivamente.

3.11.2 Determinação dos Haplótipos dos Genes da Globina β^{SC}

Os haplótipos (CAR, Ben, Sen, Cam, Arab – I,II e III) ligados ao grupo de genes da globina β^S e β^C , respectivamente, foram investigados por meio da técnica PCR-RFLP que utiliza enzimas de restrição para a detecção de mutações e polimorfismos genéticos. Essas enzimas reconhecem e clivam sítios específicos na sequência do DNA amplificado dando origem a fragmentos de diversos tamanhos

que são separados, analisados por meio da corrida eletroforética e posteriormente visualizados em câmara UV (2).

De acordo com Sutton e colaboradores (1989), sete regiões foram seletivamente amplificadas e digeridas pelas enzimas de restrição que identificaram os seguintes sítios polimórficos: Xmn I, posição 5' y^G; Hind III, posição y^G; Hind III, posição y^A; Hinc II, posição 3' dentro do pseudogene beta ($\psi\beta$); Hinc II, posição $\psi\beta$; Hinf I e Hpa I nas regiões 5' e 3' do gene β , respectivamente (88).

A reação de amplificação foi realizada no termociclador T100 (Bio-Rad, EUA) e compreendeu uma fase inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 57°C por 30 segundos (exceto para 3' $\psi\beta$: 60°C por 30 segundos), e 72°C por 45 segundos com etapa final de 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram digeridos com as enzimas adequadas à temperatura de 37°C. Após a digestão, as enzimas foram inativadas aumentando-se a temperatura para 65°C durante 20 minutos.

Os resultados da amplificação foram verificados pela corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% sob corrente constante de 80 volts por 15 minutos e visualizados em câmara UV. Os resultados da digestão enzimática foram observados pela corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% sob corrente constante de 80 volts por 30 minutos, visualizados em câmara UV e analisados de acordo com o padrão de polimorfismos para cada haplótipo que está representado no Quadro 4.

Quadro 4 - Padrão de Polimorfismos para cada Haplótipo (88).

Sítio	y ^A	5' y ^G	y ^G	3'ψβ	5'β	3'β	ψβ
Haplótipo	Hind III	Xmn I	Hind III	Hinc II	Hinf I	Hpa I	Hic II
CAR	-	-	+	-	-	+	-
BEM	-	-	-	+	-	-	-
SEM	-	+	+	+	+	+	+
CAM	+	-	+	+	+	+	-
ARAB	-	+	+	+	-	+	+

As combinações que não seguiram as descritas no quadro foram classificadas como haplótipos atípicos e a genotipagem foi repetida em todas as amostras que possuíam essa classificação, a fim de confirmar os resultados.

3.12 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas nos programas EPI INFO versão 6.04, SPSS versão 22.0 e o GraphPad Prism versão 5.0. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.12.1 Distribuição das Variáveis

A análise de normalidade da distribuição das variáveis foi realizada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. A partir desta informação foram utilizados os testes paramétricos ANOVA ou não-paramétrico de Kruskal-Wallis. O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para a análise da distribuição de médias de variáveis quantitativas ou numéricas, com distribuição normal dentro de categorias. Além disso, verificando se é provável haver uma diferença entre as médias dos valores, buscou-se dentre as médias apresentadas diferenças significativas conduzidas de múltiplas comparações de médias através do teste de Bonferroni (ou post-hoc). O teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para as distribuições fora do normal.

3.12.2 Análise de Variáveis Qualitativas ou Categóricas

O teste não paramétrico Qui-quadrado foi utilizado para a análise de variáveis qualitativas e categóricas de três ou mais grupos e após, corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. O teste exato de Fisher foi utilizado nas análises inferiores a 4. Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis.

4. RESULTADOS

A Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas é o centro de referência para o atendimento das hemoglobinopatias no Estado do Amazonas. Durante o período do estudo foram identificados 252 pacientes com hemoglobinopatias em acompanhamento na Fundação. Destes, 222 foram diagnosticados como portadores da doença falciforme por possuírem a HbS como, pelo menos, uma das hemoglobinas mutantes.

Os pacientes apresentaram distribuição de 42,3% (94) para o gênero masculino e 57,7% (128) para o feminino. Duzentos e dois (91%) apresentaram perfil de hemoglobina SS e 20 (9%) o perfil SC. A média de idade da população portadora do perfil SS foi de 19,10 (\pm 13,20) anos e de 25,85 (\pm 15,18) anos para os portadores do perfil SC. A idade do primeiro diagnóstico variou entre 4 dias e 57 anos para os SS com média de 6,5 (\pm 11,23) anos e de 2 meses a 27 anos para os SC com média de 10 (\pm 12,52) anos. A média da hemoglobina fetal foi de 11,27% para SS e 7,86% para SC.

4.1 Principais características laboratoriais apresentadas pelos pacientes com Doença Falciforme

Os dados hematológicos foram obtidos dos 212 indivíduos com doença falciforme enquanto que os bioquímicos de 145 pacientes. Quando comparados os dados hematológicos e bioquímicos entre os perfis SS e SC valores significativos foram observados para concentração de HbF ($p=0,001$), hemácias ($p=<0,0001$), hemoglobina ($p=<0,0001$), hematócrito ($p=<0,0001$), VCM ($p=<0,0001$), HCM ($p=0,0016$), CHCM ($p=0,0002$), RDW ($p=<0,0001$), leucócitos ($p=0,0036$), plaquetas ($p=0,0010$), creatinina ($p=<0,0001$), BI ($p=0,0125$), HDL colesterol ($p=0,0002$) e DHL ($p=0,0003$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos dos pacientes portadores das hemoglobinas SS e SC atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	Hb SS DP	HB SC DP	p-value
HbF (%)	9,92 ± 6,39	3,42 ± 2,74	<0,001
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	2,90 ± 0,69	4,13 ± 0,62	<0,001
Hemoglobina (g/dl)	8,52 ± 1,49	11,01 ± 1,93	<0,001
Hematócrito (%)	25,62 ± 4,58	31,27 ± 4,83	<0,001
VCM (fL)	89,59 ± 11,46	73,94 ± 11,43	<0,001
HCM (pg)	29,97 ± 4,30	26,60 ± 4,06	0,002
CHCM (g/dl)	33,36 ± 1,94	35,15 ± 1,55	<0,001
Reticulócitos (%)	3,26 ± 2,69	3,02 ± 1,90	0,892
RDW (%)	19,82 ± 2,55	17,20 ± 1,97	<0,001
Contagem de leucócitos (x10 ⁹ /L)	11964,99 ± 4318,96	8997,77 ± 2562,61	0,005
Contagem de plaquetas (x10 ⁹ /L)	454,56 ± 179,14	322,00 ± 126,46	0,002
Uréia (mg/dL)	20,55 ± 9,05	22,92 ± 7,28	0,366
Creatinina (mg/dL)	0,61 ± 0,17	0,80 ± 0,17	<0,001
GGT (U/L)	31,75 ± 18,83	31,22 ± 18,43	0,937
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,90 ± 0,44	0,74 ± 0,26	0,238
Bilirrubina indireta (mg/dL)	2,27 ± 1,57	1,17 ± 0,84	0,030
Glicose (mg/dl)	84,47 ± 10,02	83,92 ± 7,05	0,835
Triglicerídeos (mg/dL)	88,30 ± 42,25	68,87 ± 23,77	0,226
HDL colesterol (mg/dL)	41,20 ± 13,00	52,85 ± 10,44	0,038
DHL (U/L)	521,17 ± 205,79	289,55 ± 129,18	0,001
Ferro (mcg/dL)	97,65 ± 49,70	69,55 ± 19,99	0,098
Ferritina (ng/mL)	925,13 ± 1415,76	241,95 ± 227,56	0,098

HbF – Hemoglobina Fetal; VCM – Volume corpuscular médio; HCM – Hemoglobina corpuscular média; CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW – Amplitude de distribuição dos eritrócitos; GGT – Gama glutamil transferase; DHL – Desidrogenase láctica.

Os dados hematológicos e bioquímicos entre o gênero masculino e feminino demonstraram diferenças estatísticas para HbF ($p=0,019$), CHCM ($p=0,029$), RDW ($p=0,006$), BI ($p=0,029$) e ferritina ($p=0,028$) em pacientes com anemia falciforme. Não foram encontrados valores significativos entre os gêneros em pacientes com a doença SC (tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Características hematológicas e bioquímicas entre homens e mulheres com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	Masculino DP	Feminino DP	p-value
HbA ₂ (%)	3,69 ± 0,72	3,66 ± 0,82	0,843
HbF (%)	8,50 ± 5,57	11,11 ± 6,81	0,019
HbS (%)	76,78 ± 7,26	72,04 ± 18,53	0,152
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	2,94 ± 0,66	2,86 ± 0,72	0,430
Hemoglobina (g/dl)	8,59 ± 1,46	8,47 ± 1,52	0,603
Hematócrito (%)	25,60 ± 4,63	25,65 ± 4,57	0,941
VCM (fL)	88,39 ± 11,96	90,57 ± 11,00	0,192
HCM (pg)	29,77 ± 4,37	30,13 ± 4,26	0,565
CHCM (g/dl)	33,70 ± 1,81	33,09 ± 2,00	0,029
Reticulócitos (%)	3,12 ± 4,18	3,37 ± 5,33	0,831
RDW (%)	20,38 ± 2,56	19,37 ± 2,46	0,006
Contagem de leucócitos (x10 ⁹ /L)	12036,60 ± 3268,59	11906,21 ± 5034,96	0,835
Contagem de plaquetas (x10 ⁹ /L)	459,40 ± 164,48	450,52 ± 191,03	0,733
Uréia (mg/dL)	21,14 ± 7,41	20,13 ± 10,09	0,560
Creatinina (mg/dL)	0,64 ± 0,17	0,58 ± 0,17	0,100
GGT (U/L)	31,48 ± 18,17	32,00 ± 19,70	0,918
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,86 ± 0,38	0,95 ± 0,49	0,232
Bilirrubina indireta (mg/dL)	2,58 ± 1,67	1,99 ± 1,43	0,029
Glicose (mg/dl)	84,79 ± 10,23	84,21 ± 9,92	0,769
Triglicerídeos (mg/dL)	80,30 ± 45,99	93,31 ± 40,46	0,456
HDL colesterol (mg/dL)	42,72 ± 16,36	40,00 ± 10,13	0,613
DHL (U/L)	556,24 ± 208,77	489,23 ± 199,24	0,066
Ferro (mcg/dL)	86,62 ± 42,01	106,52 ± 53,94	0,070
Ferritina (ng/mL)	643,40 ± 707,46	1152,55 ± 1732,08	0,028

HbA₂ – Hemoglobina A₂; HbF – Hemoglobina Fetal; HbS – Hemoglobina S; VCM – Volume corpuscular médio; HCM – Hemoglobina corpuscular média; CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW – Amplitude de distribuição dos eritrócitos; GGT – Gama glutamil transferase; DHL – Desidrogenase láctica.

Tabela 4 - Características hematológicas e bioquímicas entre homens e mulheres com doença SC atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	Masculino DP	Feminino DP	p-value
HbA ₂ (%)	3,07± 1,35	4,10 ± 1,40	0,286
HbF (%)	2,86 ± 1,95	3,63 ± 3,07	0,700
HbS (%)	39,50 ± 14,85	51,04 ± 11,59	0,183
HbC (%)	32,30 ± 20,18	36,06 ± 19,92	0,787
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	4,11 ± 0,90	4,14 ± 0,59	0,933
Hemoglobina (g/dl)	12,33 ± 1,65	10,75 ± 1,93	0,207
Hematócrito (%)	34,20 ± 3,81	30,69 ± 4,90	0,264
VCM (fL)	84,83 ± 11,35	71,76 ± 10,48	0,069
HCM (pg)	30,46 ± 3,60	25,82 ± 3,79	0,069
CHCM (g/dl)	36,00 ± 0,85	34,98 ± 1,62	0,316
RDW (%)	17,40 ± 2,02	17,16 ± 2,03	0,854
Contagem de leucócitos (x10 ⁹ /L)	9743,33 ± 2467,43	8848,66 ± 2638,47	0,596
Contagem de plaquetas (x10 ⁹ /L)	397,00 ± 41,56	307,00 ± 133,14	0,273
Uréia (mg/dL)	22,50 ± 9,19	23,00 ± 7,42	0,933
Creatinina (mg/dL)	0,77 ± 0,16	0,81 ± 0,18	0,743
GGT (U/L)	28,00 ± 11,31	32,14 ± 20,67	0,800
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,65 ± 0,21	0,76 ± 0,28	0,618
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,50 ± 0,14	1,33 ± 0,87	0,232
Glicose (mg/dl)	82,00 ± 4,24	84,25 ± 7,50	0,693
DHL (U/L)	302,00 ± 122,15	283,33 ± 143,50	0,853
Ferritina (ng/mL)	241,36 ± 45,29	242,15 ± 265,87	0,996

HbA₂ – Hemoglobina A₂; HbF – Hemoglobina Fetal; HbS – Hemoglobina S; HbC – Hemoglobina C; VCM – Volume corpuscular médio; HCM – Hemoglobina corpuscular média; CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW – Amplitude de distribuição dos eritrócitos; GGT – Gama glutamil transferase; DHL – Desidrogenase láctica.

4.2 Principais características clínicas apresentadas pelos pacientes com Doença Falciforme

De acordo com a consulta retrospectiva aos prontuários médicos de 202 pacientes com anemia falciforme, 95 (47%) apresentaram pelo menos um evento vaso-oclusivo, 81 (41,1%) pelo menos uma internação e 119 (58,9%) receberam pelo menos uma transfusão de sangue nos últimos 2 anos. Episódios álgicos foram observados na região lombar (34,7%), abdominal (29,7%), torácica (19,3%), muscular (15,3%), membros inferiores (32,2%), membros superiores (9,4%) e articulações (24,8%). A pneumonia foi a infecção mais comum encontrada nesta população com 59 (29,2%) casos. Quinze (7,4%) pacientes foram acometidos por pelo menos um episódio de AVC, 19 (9,4%) evoluíram com alguma alteração óssea, 33 (16,3%) apresentaram colelitíase, 21 (10,4%) sequestro hepático e 14 (6,9%) úlceras maleolares. Casos registrados de STA e retinopatia foram apenas 5 (2,5%) (tabela 5). Quando foram analisados os eventos clínicos por gênero observamos que as mulheres possuíam maior freqüência na maioria deles como nas CVO (54,7%), pneumonia (54,2%), AVC (66,7%) retinopatia (60%) e STA (60%). Além disso, as mulheres foram as que mais receberam transfusões de sangue (53,8%) nos últimos 2 anos (tabela 6).

Foram analisados 20 prontuários médicos de pacientes com doença SC e destes, 6 (30%) apresentaram pelo menos um evento vaso-oclusivo, 5 (25%) pelo menos uma internação e 4 (20%) receberam pelo menos uma transfusão de sangue nos últimos 2 anos. Episódios álgicos foram comuns e 8 (40%) pacientes evoluíram com dores nas articulações, 6 (30%) com dores lombares e abdominais, 5 (25%) com dores em membros superiores e inferiores e 4 (20%) com dores torácica e muscular. Além disso, 4 (20%) pacientes apresentaram esplenomegalia (tabela 5). Nas análises entre os eventos clínicos e os gêneros observamos que as mulheres são predominantes em todas as apresentações clínicas (tabela 7).

Diferenças estatísticas foram observadas entre pacientes com anemia falciforme e doença SC nos casos de dor em membros superiores ($p=0,032$) e transfusões de sangue ($p=0,001$). Dores em membros superiores foram mais comuns em pacientes SC (25%) do que em pacientes SS (9,4%). Em contrapartida,

as transfusões de sangue foram mais comuns nos SS (58,9%) do que nos SC (20%) (tabela 5). Não observamos significâncias estatísticas entre os gêneros masculino e feminino e os eventos clínicos nos portadores dos perfis SS e SC (tabelas 6 e 7).

Tabela 5 - Eventos clínicos em pacientes com doença falciforme, portadores das hemoglobinas SS e SC, atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

Eventos Clínicos	Pacientes Totais		HbSS		HbSC		Valor P
	N		N		N		
	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	
Pneumonia	161 (72,5%)	61 (27,5%)	143	59	18	2	0,066
Sequestro Esplênico	196 (88,3%)	26 (11,7%)	180	22	16	4	0,227
Acidente Vascular Cerebral	206 (92,8%)	16 (7,2%)	187	15	19	1	0,689
Esplenectomia	204 (91,9%)	18 (8,1%)	186	16	18	2	0,745
Artralgia	164 (73,9%)	58 (26,1%)	152	50	12	8	0,139
Dor Abdominal	156 (70,3%)	66 (29,7%)	142	60	14	6	0,978
Hospitalizações	136 (61,3%)	86 (38,7%)	121	81	15	5	0,186
Dor em membros superiores	198 (89,2%)	24 (10,8%)	183	19	15	5	0,032
Dor em membros inferiores	152 (68,5%)	70 (31,5%)	137	65	15	5	0,510
Mialgia	187 (84,2%)	35 (15,8%)	171	31	16	4	0,586
Dor torácica	179 (80,6%)	43 (19,4%)	163	39	16	4	0,940
Lombalgia	146 (65,8%)	76 (34,2%)	132	70	14	6	0,676
Crises de vaso-oclusão	121 (54,5%)	101 (45,5%)	107	95	14	6	0,145
Retinopatia	216 (97,3%)	6 (2,7%)	197	5	19	1	0,507
Úlcera maleolar	207 (93,2%)	15 (6,8%)	188	14	19	1	0,743
Síndrome Torácica Aguda	216 (97,3%)	6 (2,7%)	197	5	19	1	0,507
Alterações Ósseas	200 (90,1%)	22 (9,9%)	183	19	17	3	0,424
Insuficiência renal	219 (98,6%)	3 (1,4%)	200	2	19	1	0,138
Insuficiência cardíaca	213 (95,9%)	9 (4,1%)	194	8	19	1	0,822
Sequestro Hepático	199 (89,6%)	23 (10,4%)	181	21	18	2	0,956
Colelitíase	186 (83,8%)	36 (16,2%)	169	33	17	3	0,877
Transfusão nos 2 últimos anos	99 (44,6%)	123 (55,4%)	83	119	16	4	0,001

Tabela 6 - Eventos clínicos entre homens e mulheres com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

Eventos Clínicos	Pacientes Totais		Masculino		Feminino		Valor P
	N		N		N		
	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	
Pneumonia	143 (70,8%)	59 (29,2%)	63	27	80	32	0,824
Sequestro Esplênico	180 (89,1%)	22 (10,9%)	83	7	97	15	0,203
Acidente Vascular Cerebral	187 (92,6%)	15 (7,4%)	84	6	103	9	0,712
Esplenectomia	186 (92,1%)	16 (7,9%)	81	9	105	7	0,327
Artralgia	152 (75,2%)	50 (24,8%)	65	25	87	25	0,372
Odinofagia	171 (84,7%)	31 (15,3%)	75	15	96	16	0,641
Dor Abdominal	142 (70,3%)	60 (29,7%)	63	27	79	33	0,934
Hospitalizações	121 (59,9%)	81 (40,1%)	49	41	72	40	0,156
Dor em membros superiores	183 (90,6%)	19 (9,4%)	82	8	101	11	0,821
Dor em membros inferiores	137 (67,8%)	65 (32,2%)	59	31	78	34	0,537
Mialgia	171 (84,7%)	31 (15,3%)	77	13	94	18	0,750
Dor torácica	163 (80,7%)	39 (19,3%)	71	19	92	20	0,560
Lombalgia	132 (65,3%)	70 (34,7%)	60	30	72	40	0,724
Crises de vaso-occlusão	107 (53%)	95 (47%)	47	43	60	52	0,849
Retinopatia	197 (97,5%)	5 (2,5%)	88	2	109	3	0,836
Úlcera maleolar	188 (93,1%)	14 (6,9%)	83	7	105	7	0,671
Síndrome Torácica Aguda	197 (97,5%)	5 (2,5%)	88	2	109	3	0,836
Alterações Ósseas	183 (90,6%)	19 (9,4%)	78	12	105	7	0,087
Insuficiência renal	200 (99%)	2 (1%)	90	0	110	2	0,203
Insuficiência cardíaca	194 (96%)	8 (4%)	86	4	108	4	0,752
Sequestro Hepático	181 (89,6%)	21 (10,4%)	82	8	99	13	0,529
Colelitíase	169 (83,7%)	33 (16,3%)	76	14	93	19	0,788
Transfusão nos 2 últimos anos	83 (41,1%)	119 (58,9%)	35	55	48	64	0,569

Tabela 7 - Eventos clínicos entre homens e mulheres com doença SC atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

Eventos Clínicos	Pacientes Totais		Masculino		Feminino		Valor P
	N		N		N		
	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	
Pneumonia	18 (90%)	2 (10%)	4	0	14	2	0,456
Sequestro Esplênico	16 (80%)	4 (20%)	3	1	13	3	0,780
Acidente Vascular Cerebral	19 (95%)	1 (5%)	4	0	15	1	0,608
Esplenectomia	18 (90%)	2 (10%)	4	0	14	2	0,456
Artralgia	12 (60%)	8 (40%)	3	1	9	7	0,494
Dor Abdominal	14 (70%)	6 (30%)	3	1	11	5	0,807
Hospitalizações	15 (75%)	5 (25%)	2	2	13	3	0,197
Dor em membros superiores	15 (75%)	5 (25%)	3	1	12	4	0,998
Dor em membros inferiores	15 (75%)	5 (25%)	4	0	11	5	0,197
Mialgia	16 (80%)	4 (20%)	4	0	12	4	0,264
Dor torácica	16 (80%)	4 (20%)	4	0	12	4	0,264
Lombalgia	14 (70%)	6 (30%)	4	0	10	6	0,143
Crises de vaso-oclusão	14 (70%)	6 (30%)	4	0	10	6	0,143
Retinopatia	19 (95%)	1 (5%)	4	0	15	1	0,608
Úlcera maleolar	19 (95%)	1 (5%)	4	0	15	1	0,608
Síndrome Torácica Aguda	19 (95%)	1 (5%)	4	0	15	1	0,608
Alterações Ósseas	17 (85%)	3 (15%)	4	0	13	3	0,348
Insuficiência renal	19 (95%)	1 (5%)	4	0	15	1	0,608
Insuficiência cardíaca	19 (95%)	1 (5%)	4	0	15	1	0,608
Sequestro Hepático	18 (90%)	2 (10%)	4	0	14	2	0,456
Colelitíase	17 (85%)	3 (15%)	4	0	13	3	0,348
Transfusão nos 2 últimos anos	16 (80%)	4 (20%)	3	1	13	3	0,780

4.3 Associação entre os dados laboratoriais e os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S e talassemia alfa

Dentre os 222 pacientes diagnosticados com doença falciforme, 150 foram genotipados para talassemia alfa e destes, 139 são portadores do perfil SS e 11 do perfil SC. Todos os pacientes portadores do perfil SC foram selvagens. Já entre os 139 pacientes portadores do perfil SS, 19 (13,7%) foram heterozigotos e 4 (2,8%) homozigotos. As comparações entre talassemia alfa e os dados hematológicos e bioquímicos estão descritas nas tabela 8 e 9.

A média de valores das hemácias ($p=0,001$), hemoglobina ($p=0,026$), hematócrito ($p=0,012$), VCM ($p=0,012$) e HCM ($p=0,011$) demonstraram-se significantes estatisticamente entre os grupos analisados compostos por indivíduos selvagens e portadores das deleções em heterozigose e homozigose (tabela 8). Já os marcadores dos perfis lipídico, hepático e renal não apresentaram valores significativos na associação com portadores de talassemia alfa (tabela 9).

Tabela 8 - Análise dos dados hematológicos, perfil de hemoglobinas e presença ou ausência da talassemia alfa 2 3.7kb em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

	TALASSEMIA ALFA ^{3,7kb}		
	Média ± DP		Valor P
	SELVAGEM N= 116	PORTADOR N = 23	
Hemácias x 10⁶/mm³	2,77 ± 0,67	3,31 ± 0,61	0,001
Hemoglobina g/dl	8,37 ± 1,50	9,16 ± 1,51	0,026
Hematócrito (%)	25,18 ± 4,52	27,90 ± 4,92	0,012
Volume Corpuscular Médio (fL)	90,56 ± 10,42	84,83 ± 13,99	0,012
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	30,61 ± 4,18	28,07 ± 4,38	0,011
Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (g/dl)	33,34 ± 2,15	32,99 ± 1,91	0,481
Reticulócito (%)	3,40 ± 5,44	4,95 ± 4,70	0,387
Leucócitos x 10 ⁹ /L	12098,59±4575,25	10967,72 ± 3435,04	0,274
Plaquetas x 10 ⁹ /L	474,66 ± 185,41	454,31 ± 201,29	0,643
	HEMOGLOBINAS		
Hemoglobina S (%)	74,27 ± 17,76	76,31 ± 20,06	0,701
Hemoglobina A2 (%)	3,60 ± 0,80	3,93 ± 0,88	0,196
Hemoglobina Fetal (%)	10,46 ± 6,77	9,39 ± 5,02	0,574

Tabela 9 - Análise da talassemia alfa 2 3.7kb com os marcadores dos perfis lipídico, hepático e renal em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

DADOS BIOQUÍMICOS	N	TALASSEMIA ALFA ^{3,7kb}		Valor P
		SELVAGEM	PORTADOR	
		N= 116	N = 23	
Média ± DP				
HDL Colesterol, mg/dL	96	40,88 ± 10,21	36,40 ± 5,02	0,380
Triglicerídeos, mg/dL	18	72,70 ± 28,41	89,00 ± 42,88	0,391
Bilirrubina Direta, mg/dL	99	0,91 ± 0,50	0,85 ± 0,45	0,592
Bilirrubina Indireta, mg/dL	100	2,30 ± 1,57	1,61 ± 0,97	0,078
Ferro Sérico, mcg/ dL	57	104,02 ± 50,88	69,75 ± 23,08	0,069
Ferritina, ng/MI	111	1100,31 ± 1645,67	398,08 ± 554,79	0,086
Desidrogenase láctica, U/L	96	524,51 ± 209,22	481,75 ± 209,18	0,512
Uréia, mg/dL	81	20,93 ± 10,65	17,83 ± 4,80	0,328
Creatinina, mg/dL	87	0,59 ± 0,18	0,68 ± 0,13	0,082

Os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S foram investigados em 177 pares de cromossomos de pacientes com anemia falciforme (SS) e 17 com doença falciforme (SC). As frequências genotípicas para esses haplótipos nos SS foram 93 (52,5%) CAR/CAR, seguido pelo CAR/Ben com 42 (23,7%), 32 (18,1%) Ben/Ben, 05 (2,8%) CAR/Sen, 03 (1,7%) Ben/Sen e 02 (1,1%) CAR/Cam. Já os pacientes SC apresentaram 6 (35,3%) CAR-I, 3 (17,6%) CAR-II, 1 (5,9%) CAR-III, 5 (29,4%) Ben-I e 2 (11,8%) Ben-II.

Quando analisamos os dados hematológicos e a distribuição com todos os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S foram encontradas diferenças estatísticas nos valores de hemácias, hematócrito, leucócitos e plaquetas, além da concentração de HbF (Tabela 10). Quando analisamos os dados hematológicos e a distribuição dos mais frequentes haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S foram encontradas diferenças estatísticas nos valores de hemácias ($p=0,043$) e leucócitos ($p=0,002$) e nos índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio – $p=0,045$) e HCM (hemoglobina corpuscular média – $p=0,042$).

Tabela 10 - Distribuição dos haplótipos ligados aos genes da globina βS e dados hematológicos entre pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

DADOS HEMATOLÓGICOS	CAR/CAR	CAR/Ben	CAR/Sen	CAR/Cam	Ben/Ben	Ben/Sen	p- value
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	2,76±0,52	2,71±0,63	3,47±0,75	3,12±0,13	3,04±0,78	2,88±0,28	0,027
Hemoglobina (g/dl)	8,18±1,23	8,37±1,38	9,52±1,43	9,20±1,31	8,60±0,99	8,65±2,19	0,127
Hematócrito (%)	24,56±3,73	25,16±4,47	28,84±3,65	27,26±3,81	26,10±4,02	29,70±3,56	0,046
VCM (fL)	90,0±8,88	94,0±13,45	85,4±15,94	87,10±9,90	87,80±12,56	84,4±20,36	0,196
HCM (pg)	30,07±3,27	31,57±5,10	28,06±5,38	29,43±4,82	29,20±4,82	28,70±9,19	0,166
Reticulócitos (%)	3,37±4,41	3,76±7,09	2,86±3,62	1,3±2,90	3,52±4,09	---	0,845
RDW (%)	20,12±2,21	20,03±2,64	20,70±2,78	16,43±2,10	19,83±2,38	19,25±1,76	0,171
Leucócitos ($\times 10^9/\text{L}$)	12,01±3,35	13,69±5,08	7,37±5,97	12,65±6,01	10,35±3,56	10,79±3,68	0,002
HbF (%)	5,92±3,05	11,14±3,92	19,44±9,63	17,23±2,87	20,97±2,75	17,80±1,83	<0,001
Plaquetas ($\times 10^9/\text{L}$)	496±176	455±148	315±256	420±112	397±194	470±260	0,048

VCM – Volume corpuscular médio; HCM – Hemoglobina corpuscular média; RDW – Amplitude de distribuição dos eritrócitos.

Mesma associação foi realizada com alguns dados bioquímicos entre a distribuição com todos os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S (tabela 11). A associação dos dados bioquímicos e a distribuição dos mais frequentes haplótipos também apresentou significância estatística somente para bilirrubina direta ($p=0,011$).

Tabela 11 - Distribuição dos haplótipos ligados aos genes da globina β^S e dados bioquímicos entre pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

DADOS BIOQUÍMICOS	CAR/CAR	CAR/Ben	CAR/Sen	CAR/Cam	Ben/Ben	Ben/Sen	p-value
Uréia (mg/dL)	21,77±11,3	19,38±6,65	25,5±13,43	15,6±5,65	19,45±5,67	17,5±4,94	0,713
Creatinina (mg/dL)	0,63±0,20	0,58±0,15	0,62±0,09	0,56±0,21	0,29±0,16	0,58±0,15	0,733
Gama Glutamil Transferase (U/L)	32,92±21,2	25,14±12,11	35,5±9,19	19,58±13,6	40,5±13,52	29,65±14, 5	0,353
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,88±0,35	0,82±0,38	0,70±0,21	0,45±0,07	1,17±0,68	0,78±0,59	0,029
Bilirrubina indireta (mg/dL)	2,21±1,56	2,5±1,69	1,72±2,18	3,6±2,4	2,1±1,38	2,8±1,87	0,744
Glicose (mg/dl)	85,68±10,9	82,5±10,7	79,5±13,45	81,2±7,21	83,78±7,8	85,5±3,53	0,788
Triglicerídeos (mg/dL)	101,2±54,1	84,22±33,27	66,54±24,5	57,6±26,9	83,6±40,5	98,6±34,1	0,859
Desidrogenase lática (U/L)	537±224	516±196	462±289	421±253	481±186	386±285	0,874
Ferro Sérico (mcg/ dL)	94,75±44,9	96,94±37,9	145,6±59,1	100,1±17,6	99,8±70,91	105,1±56, 8	0,674
Ferritina (ng/mL)	1169±1698	728±725	305±153	292±212	773±1470	961±586	0,470

Alguns eventos clínicos apresentados pelos pacientes com anemia falciforme não foram contemplados pela nossa busca aos prontuários médicos devido a um número pouco significativo de informações. Dentre eles, os mais estudados são as complicações vasculares, pois conduzem a danos em órgãos múltiplos como cérebro, coração, rins, fígado, olhos, pele, ossos e pulmões (76,89).

Correlações entre os dados relativos a história clínica e aos genótipos da globina β^S em indivíduos com anemia falciforme demonstraram alterações ósseas frequentes apenas em pacientes com os genótipos CAR e Ben sendo o gênero feminino mais frequente ($P=0,017$). Acidente vascular cerebral foi presente apenas no haplótipo CAR/CAR ($p<0,001$). As crises vaso - oclusivas ocorreram em mais de 60% dos pacientes com haplótipos CAR e Ben, e menos de 20% nos outros haplótipos ($P<0,001$).

4.4 Associação entre as principais características clínicas e os dados hematológicos e bioquímicos em pacientes com Doença Falciforme

A associação entre os dados hematológicos e bioquímicos em pacientes com anemia falciforme e os eventos clínicos demonstraram inúmeras diferenças estatísticas. Foram observadas associações entre o perfil de hemoglobinas fetal e S e antecedentes de mialgia, AVC, lombalgia e transfusões; entre marcadores de hemólise e antecedentes de internações hospitalares, mialgia, CVO, esplenomegalia, dor em membros superiores e transfusões; entre contagem de leucócitos e antecedentes de mialgia, artralgia e dor torácica; entre marcadores de hemólise hepática e antecedentes de internações hospitalares, CVO, esplenomegalia, AVC, lombalgia, insuficiência cardíaca, sequestro hepático e colelitíase; e entre marcadores renais e antecedentes de mialgia, CVO, dor em membros superiores, dor torácica, sequestro hepático e colelitíase. Já em pacientes com doença SC foram observadas associações entre o perfil de hemoglobinas e antecedentes de alterações ósseas e CVO; entre marcadores de hemólise e antecedentes de alterações ósseas; entre contagem de leucócitos e antecedentes de artralgia; entre contagem de plaquetas e antecedentes de CVO; e entre marcadores de hemólise hepática e antecedentes de lombalgia. Os dados significativos estão enumerados nas tabelas 12 a 16.

Tabela 12 - Análises de dados hematológicos e bioquímicos em internações hospitalares dos pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

DADOS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	INTERNAÇÕES HOSPITALARES				Valor P
	EVENTO CLÍNICO	N	MÉDIA	± DP	
Hemácias x 10 ⁶ /mm ³	Não	115	2,98	0,80	0,034
	Sim	78	2,77	0,47	
Volume Corpuscular Médio (fL)	Não	115	87,83	11,29	0,009
	Sim	77	92,23	11,28	
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	Não	116	29,44	4,41	0,036
	Sim	78	30,76	4,39	
Gama Glutamil Transferase (U/L)	Não	29	26,03	14,41	0,018
	Sim	28	37,67	21,17	
Bilirrubina Direta (mg/dL)	Não	78	0,81	0,26	0,004
	Sim	56	1,03	0,59	

Tabela 13 - Análises de dados hematológicos e bioquímicos nos episódios álgicos e crises de vaso-oclusão em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

DADOS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	MIALGIA				Valor P
	EVENTO CLÍNICO	N	MÉDIA	± DP	
Hemoglobina Fetal (%)	Não	107	10,56	6,59	0,015
	Sim	24	7,07	4,49	
Hemácias x 10 ⁶ /mm ³	Não	164	2,94	0,70	0,034
	Sim	29	2,64	0,58	
Leucócitos x 10 ⁹ /L	Não	164	12239,84	4415,73	0,035
	Sim	29	10410,68	3384,40	
Creatinina (mg/dL)	Não	93	0,59	0,15	0,011
	Sim	22	0,69	0,22	
ARTRALGIA					
Leucócitos x 10 ⁹ /L	Não	146	12335,65	4464,71	0,035
	Sim	47	10813,57	3637,68	
DOR TORÁCICA					
Leucócitos x 10 ⁹ /L	Não	156	12344,76	4387,12	0,012
	Sim	37	10363,78	3654,66	
Creatinina (mg/dL)	Não	94	0,59	0,14	0,021
	Sim	21	0,69	0,26	
LOMBALGIA					
Hemoglobina Fetal (%)	Não	88	10,62	6,75	0,074
	Sim	43	8,49	5,35	
Gama Glutamil Transferase (U/L)	Não	37	26,56	15,64	0,004
	Sim	20	41,35	20,78	
DOR EM MEMBROS SUPERIORES					
Volume Corpuscular Médio (fL)	Não	175	90,11	11,23	0,046
	Sim	17	84,30	12,79	
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	Não	177	30,18	4,21	0,022
	Sim	17	27,70	4,66	
Uréia (mg/dL)	Não	102	21,25	9,23	0,012
	Sim	11	14,09	2,38	
CRISES DE VASO-OCCLUSÃO					
RDW (%)	Não	101	19,48	2,59	0,048
	Sim	92	20,20	2,46	
Gama Glutamil Transferase (U/L)	Não	25	25,36	14,89	0,022
	Sim	32	36,75	20,25	
Creatinina (mg/dL)	Não	60	0,57	0,15	0,024
	Sim	55	0,65	0,19	

Tabela 14 - Análises de dados hematológicos e bioquímicos dos eventos clínicos em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

DADOS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	ESPLENOMEGALIA				Valor P
	EVENTO CLÍNICO	N	MÉDIA	± DP	
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	Não	174	30,18	4,26	0,045
	Sim	20	28,15	4,31	
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (g/dl)	Não	174	33,53	1,67	<0,001
	Sim	20	31,88	3,16	
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	Não	120	2,37	1,62	0,038
	Sim	15	1,48	0,72	
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL					
Hemoglobina S (%)	Não	111	75,47	16,93	0,006
	Sim	11	59,79	23,65	
Ferritina (ng/mL)	Não	138	813,20	1295,66	0,001
	Sim	12	2212,36	2068,22	
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA					
Bilirrubina Direta (mg/dL)	Não	129	0,88	0,42	0,008
	Sim	5	1,42	0,68	
Glicose (mg/dl)	Não	106	84,05	9,26	0,001
	Sim	2	106,50	27,57	
Desidrogenase láctica (U/L)	Não	123	511,86	198,33	0,011
	Sim	5	750,20	276,89	
SEQUESTRO HEPÁTICO					
Gama Glutamil Transferase (U/L)	Não	58	29,32	16,06	0,005
	Sim	8	48,75	27,27	
Creatinina (mg/dL)	Não	114	0,61	0,16	0,010
	Sim	15	0,74	0,28	
COLELITÍASE					
Creatinina (mg/dL)	Não	94	0,59	0,18	0,009
	Sim	21	0,70	0,12	
Ferro Sérico (mcg/dL)	Não	75	93,89	43,99	0,034
	Sim	8	132,87	76,09	

Tabela 15 - Análises de dados hematológicos e bioquímicos nos casos de transfusões em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

DADOS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	TRANSFUSÕES				Valor P
	EVENTO CLÍNICO	N	MÉDIA	± DP	
Hemoglobina Fetal (%)	Não	56	11,44	6,49	0,024
	Sim	78	8,89	6,14	
Hemácias x 10 ⁶ /mm ³	Não	78	3,17	0,83	<0,001
	Sim	115	2,71	0,51	
Hemoglobina (g/dl)	Não	79	9,04	1,76	<0,001
	Sim	115	8,17	1,15	
Hematócrito (%)	Não	79	27,15	5,39	<0,001
	Sim	115	24,58	3,60	
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	Não	79	29,12	4,73	0,022
	Sim	115	30,55	3,89	
Volume Corpuscular Médio (fL)	Não	77	86,68	12,69	0,004
	Sim	115	91,54	10,15	

Tabela 16 – Análises de dados hematológicos e bioquímicos dos eventos clínicos em pacientes com doença SC atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

DADOS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	ALTERAÇÕES ÓSSEAS				Valor P
	EVENTO CLÍNICO	N	MÉDIA	± DP	
Hemoglobina A ₂ (%)	Não	7	3,55	0,45	0,039
	Sim	2	5,40	2,12	
Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (g/dl)	Não	16	35,40	1,29	0,049
	Sim	2	33,15	2,61	
LOMBALGIA					
Ferritina (ng/mL)	Não	9	155,42	81,19	0,013
	Sim	2	501,56	351,63	
ARTRALGIA					
Leucócitos x 10 ⁹ /L	Não	11	7800,90	2162,73	0,008
	Sim	7	10878,57	2014,35	
CRISES DE VASO-OCCLUSÃO					
Hemoglobina S (%)	Não	8	46,16	4,43	0,023
	Sim	2	63,45	18,59	
Plaquetas x 10 ⁹ /L	Não	13	365,38	120,28	0,014
	Sim	15	209,20	50,45	

4.5 Análises entre biomarcadores clássicos da Doença Falciforme e os eventos clínicos

Os biomarcadores clássicos da doença falciforme foram classificados em dois grupos: HbF \leq e $>$ 3.0%, hemoglobina \leq e $>$ 7g/dL, leucócitos \leq e $>$ $10,0 \times 10^9/L$, plaquetas \leq e $>$ $250,0 \times 10^9/L$ e ferritina \leq e $>$ 300,0 ng/mL. Estes valores foram estabelecidos após realização da Curva ROC a fim de evitar desvios de erros no percentual entre os grupos graves e menos graves. Além disso, também utilizamos valores médios dos quartis encontrados através de análise descritiva desta variável. Com isso verificamos o valor percentual mais frequente dentro dos valores medianos encontrados em até 50% de nossa amostragem e chegamos aos valores estabelecidos. Estão enumerados nas tabelas 17 e 18 as análises entre os biomarcadores clássicos e os eventos clínicos em pacientes portadores da anemia falciforme e doença SC.

Tabela 17 – Análises entre biomarcadores clássicos e dados clínicos em pacientes com anemia falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

EVENTO CLÍNICO		Total	Hemoglobina Fetal	Hemoglobina Fetal	Valor P
			≤ 3,0 %	> 3,0 %	
Retinopatia	Não	135	15	117	0,004
	Sim		2	1	
Transfusões	Não	135	2	54	0,008
	Sim		15	64	
			Hemoglobina	Hemoglobina	
			≤ 7,0 g/dL	> 7,0 g/dL	
Sequestro hepático	Não	194	165	10	0,014
	Sim		15	4	
			Leucócitos ≤	Leucócitos >	
			10,0 x10⁹/L	10,0 x10⁹/L	
Dor torácica	Não	193	42	114	0,001
	Sim		20	17	
			Ferritina	Ferritina	
			≤ 300,0 ng/mL	> 300,0 ng/mL	
Esplenectomia	Não	151	55	84	0,032
	Sim		1	11	

Tabela 18 - Análises entre biomarcadores clássicos e dados clínicos em pacientes com doença SC atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil.

EVENTO CLÍNICO		Total	Hemoglobina Fetal ≤ 3,0 %	Hemoglobina Fetal > 3,0 %	Valor P
Infecções	Não	12	3	5	0,038
	Sim		4	0	
Lombalgia	Não	12	7	2	0,018
	Sim		0	3	
			Plaquetas ≤ 250,0 x 10⁹/L	Plaquetas > 250,0 x 10⁹/L	
CVO	Não	19	1	12	0,007
	Sim		4	2	
Infecções	Não	19	5	7	0,047
	Sim		0	7	

CVO – Crise de vaso-oclusão

5. DISCUSSÃO

As formas de apresentação clínica dos pacientes com doença falciforme estão presentes em diferentes regiões do mundo e são bastante heterogêneas variando desde condições assintomáticas a formas incapacitantes com elevadas taxas de mortalidade. Essa heterogeneidade clínica conduz estudos acerca de diversos moduladores clínicos nesses pacientes, tais como os níveis de HbF (90,91), os haplótipos do gene da globina β^S (89,92) e a associação com talassemia alfa (93,94). Dentre eles, a HbF tem sido o principal alvo de pesquisas de modulação genética na doença falciforme, inclusive com o objetivo de se identificar e estimular mecanismos responsáveis pela sua expressão (93,95). Neste estudo, descrevemos pela primeira vez os moduladores clínicos da doença falciforme e suas correlações com perfil de hemoglobinas, dados hematológicos, bioquímicos e clínicos na população amazônica.

Correlações hematológicas entre os pacientes SS e SC demonstraram um perfil clássico de achados laboratoriais associados a anemia falciforme, caracterizada por anemia acentuada do tipo normocítica e normocrômica associada à reticulocitose e leucocitose. A plaquetose é outro parâmetro hematológico observado nos pacientes SS e no presente estudo foi significativa, pois estava mais elevada que nos pacientes SC. Apesar disso, manteve-se dentro dos limites de normalidade (443,36 mil/ μ L). Outros parâmetros como VCM, HCM e RDW estavam mais elevados em pacientes SS. A média encontrada para os níveis de hemoglobina de 8,9 g/dL é compatível com a fase estável da doença.

A leucocitose é comum durante a fase estável, sem necessariamente constituir uma associação com processo infeccioso. Abboud e colaboradores (2009) demonstraram que uma contagem de leucócitos constantemente elevada está associada a um risco maior para óbito precoce (96). A importância dessas células na fisiopatologia da anemia falciforme está relacionada com seu papel essencial nos eventos vaso-oclusivos. A participação dos leucócitos na vaso-oclusão começa a partir do processo de rolamento e da expressão de integrinas que promovem o aumento da adesão ao endotélio vascular. Após a adesão leucócitos-endotélio, o fluxo sanguíneo é reduzido, facilitando a ligação de mais hemácias falciformes, e,

consequentemente a obstrução vascular (97,98). Além disso, os leucócitos são estimulados a liberar proteínas pró-inflamatórias, substâncias vaso-ativas, citocinas e quimiocinas que irão promover a atração de mais leucócitos para esses sítios.

Os resultados dos dados bioquímicos como a creatinina e HDL colesterol foram menores nos pacientes SS. De fato, pacientes SS podem evoluir com significativa deterioração da função renal quando em comparação com os SC devido à anemia e crises de vaso-oclusão na medula renal mais intensas. Essas condições causam hiperfluxo renal e maior secreção da creatinina pelos túbulos proximais que são interpretados por meio de valores mais elevados de creatinina diferentes daqueles encontrados nos nossos pacientes (99). Já a diminuição de HDL colesterol corrobora com a literatura, pois o estado hiperproliferativo da medula óssea provocado por hiperplasia medular consequente de hemólise acentuada apresentada pelos pacientes SS, reduzem o colesterol plasmático para atender a síntese de novas membranas (100).

Os resultados hematológicos e bioquímicos observados no nosso estudo foram semelhantes aos vistos no estudo de Colella e colaboradores (2015) realizado em pacientes com doença falciforme atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade de Campinas (São Paulo, Brasil) (101) e no estudo de Seixas e colaboradores (2010) realizado em 152 crianças da cidade de Salvador-BA (102).

As principais manifestações clínicas identificadas pelo presente estudo nos pacientes SS e SC foram as crises de vaso-oclusão, infecções, alterações ósseas, sequestro hepático, sequestro esplênico e colelitíase. Estes dados denotam a heterogeneidade clínica da doença, bem descrita em trabalhos publicados (35,83,103).

Os dados hematológicos e bioquímicos quando comparados ao gênero nos portadores SS demonstraram diferenças estatísticas com valores maiores de CHCM, RDW e bilirrubina indireta nos homens sugerindo que neste gênero a intensidade da hemólise é maior o que contribui para o aumento da susceptibilidade de desenvolver colelitíase, úlceras maleolares, insuficiência cardíaca e episódios de vaso-oclusão.

Apesar disso, os eventos clínicos entre homens e mulheres ocorreram de forma similar. Não observamos diferenças estatísticas de dados hematológicos, bioquímicos e clínicos na comparação de gênero em portadores do perfil SC. Porém, Gualandro e colaboradores (2015) em estudo realizado em pacientes com doença falciforme - portadores do perfil SC - atendidos no Hospital das Clínicas de São Paulo, demonstraram fator de risco para colelitíase e transtornos da audição entre jovens do gênero masculino e níveis maiores de hemoglobina no gênero feminino (104).

A talassemia alfa $2^{3.7 \text{ Kb}}$ foi descrita na frequência de 16,5% no grupo de indivíduos com anemia falciforme corroborando com estudos realizados em outras regiões (82,83). Destes, 13,7% foram heterozigotos e 2,8% homozigotos concordando com os resultados descritos por Camilo-Araújo e colaboradores (2014), Cardoso e colaboradores (2012) e Adorno e colaboradores (2005) que descreveram, respectivamente, frequências de 11,97%, 17,2% e 19,7% para heterozigotos e de 1,71%, 0,9% e 2,3% para homozigotos em recém nascidos, crianças e adultos com anemia falciforme de São Paulo – SP (105), comunidade de Saracura em Santarém – PA (106) e Salvador – BA (16).

A coexistência da talassemia alfa $2^{3.7 \text{ Kb}}$ com a anemia falciforme promove aumento da relação membrana/citoplasma eritrocitário com diminuição da perda de eletrólitos e desidratação celular, diminuição da hemólise, aumento na concentração de hemoglobina e do hematócrito, diminuição dos índices hematimétricos (VCM e HCM), da contagem de reticulócitos e redução de úlceras em membros inferiores como demonstrados por nossos pacientes (103,107). Os nossos resultados corroboram com estudos realizados por Rumaney e colaboradores (2014) em pacientes com anemia falciforme os quais observaram aumento nos valores de hemácias e hemoglobina e redução nos valores de VCM (108). Já Pandey e colaboradores (2011) demonstraram aumento em todos os parâmetros (hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM e HCM) nos portadores de talassemia alfa (109). Apesar da significância dos dados hematológicos, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os eventos clínicos e a presença da talassemia alfa $2^{3.7\text{kb}}$ sugerindo que na população estudada não houve interferência das alterações desses dados na história clínica dos pacientes.

Vale ressaltar que alguns estudos encontraram associação da talassemia alfa com a redução da gravidade clínica dos pacientes com anemia falciforme como o realizado por Martin Steinberg (2005) que demonstrou proteção em alguns eventos clínicos como colelitíase, úlceras maleolares, função esplênica e albuminúria provavelmente devidos a redução na densidade dos eritrócitos falciformes que melhora a sobrevivência das hemácias (103). No entanto, a heterogeneidade entre as populações de pacientes falciformes bem como o número de participantes de cada estudo por vezes limita a consolidação de resultados conclusivos a respeito do papel protetor da talassemia alfa.

Com relação aos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S , nossos resultados confirmam a frequência elevada do genótipo CAR/CAR, seguida pelo CAR/Ben e Ben/Ben com número reduzido dos haplótipos Cam e Sen. Esses resultados estão de acordo com os estudos realizados em outras regiões brasileiras. Zago e colaboradores (2000) estudaram 37 indivíduos negróides portadores do gene da globina β^S da região de São Paulo descrevendo predominância do haplótipo CAR (66,2%) em relação ao Ben (23,0%) (71); o mesmo foi observado por Gonçalves e colaboradores (2003) quando estudaram pacientes com anemia falciforme de Salvador-BA (70) e por Lyra e colaboradores (2005) que descreveram o predomínio do haplótipo Ben em Salvador e do haplótipo CAR em São Paulo em um estudo comparativo entre os portadores de anemia falciforme das duas regiões (83). Na região Amazônica, norte do país, em um estudo desenvolvido em comunidades de descendentes de africanos portadores do gene β^S , foram descritas as frequências de 60% para o haplótipo CAR; 30% para o Sen e 10% para o Ben; em Belém foi descrita a frequência de 86% para o haplótipo CAR; 9% para o Ben e 4% para o Sen entre pacientes portadores da anemia falciforme (110,111).

O haplótipo Ben em homozigose ou em heterozigose com o CAR tem sido associado a níveis intermediários de HbF (70,76,90). No nosso estudo, os níveis de HbF demonstrou maior valor nos haplótipos com o genótipo Ben/Sen e CAR/Sen e níveis bem diminuídos no CAR/CAR).

As análises que envolveram as principais características clínicas e os dados hematológicos e bioquímicos de pacientes com anemia falciforme demonstraram

diversas associações. Diferenças estatísticas foram observadas entre os episódios de internações hospitalares e valores menores de hemácias e maiores de VCM, HCM, GGT e BD sugerindo que os principais motivos das internações envolveram anemia e hemólise severas, além de icterícia.

Fatores moduladores dos aspectos clínicos na anemia falciforme têm sido descritos, ora contribuindo para a melhoria da sintomatologia clínica do paciente ora contribuindo negativamente para este quadro. Os níveis de hemoglobina fetal, por exemplo, são descritos como um dos fatores biológicos associados com a diminuição da morbidade. O presente estudo demonstrou que a ocorrência de crise vaso-oclusiva, AVC, alterações ósseas e necessidade de transfusões foi menor entre aqueles que apresentaram níveis de HbF $\geq 10\%$. Contudo esses achados não foram estatisticamente significativos. A ocorrência de sequestro esplênico foi maior entre aqueles com HbF até 7%. Estudo realizado por Antwi-Boasiako e colaboradores (2015) em pacientes adultos SS e SC atendidos em um Hospital de Gana demonstraram, por meio de gráfico, a relação inversamente proporcional das concentrações de HbF com as crises de vaso-oclusão em pacientes SS, ou seja, quanto maior a concentração de HbF menor as crises de vaso-oclusão (112). Essas inconsistências com relação ao efeito da HbF nos eventos clínicos pode ser decorrente da heterogeneidade na distribuição celular da HbF, ou, ainda, ao efeito de genes epistáticos que interferem no fisiopatologia da anemia falciforme (103).

Os resultados entre os biomarcadores clássicos e os eventos clínicos corroboram com a literatura. Concentrações mais baixas de HbF implica evolução mais grave dos eventos clínicos como retinopatia e infecções. Almeida Sobrinho e colaboradores (2011) em estudo realizado em 50 pacientes com anemia falciforme acompanhados pelo Hemocentro do Pará observaram alterações retinianas em 9 dos 12 pacientes que apresentaram HbF $\leq 9.0\%$ (113). As transfusões de sangue são necessárias uma vez que níveis mais baixos de HbF dificultam o transporte de oxigênio aos tecidos contribuindo para o agravando dos efeitos vasculares decorrentes da falcização. Estudo realizado por Silva e colaboradores (2009) em 47 pacientes com anemia falciforme atendidos em um serviço de hematologia na cidade de Fortaleza-CE observaram que 93,75% dos que receberam transfusões de sangue, 50% dos que apresentaram infecção urinária e 56,25% dos que evoluíram

com pneumonia estavam com HbF $\leq 5.0\%$ (114). A maioria dos pacientes SS (80,9%) que evoluíram com sequestro hepático (80,9%) e foram submetidos a esplenectomia (68,7%) haviam recebido transfusões recentemente o que justifica níveis de hemoglobina $>7,0$ g/dL e ferritina $>300,0$ ng/mL, respectivamente.

Considerando os nossos resultados e sabendo que o fenótipo dos pacientes com doença falciforme é heterogêneo e dependente de diversos fatores, acreditamos que o nosso estudo tenha contribuído para ampliar o conhecimento sobre o perfil da população falciforme em uma região com características próprias. A conexão entre a avaliação dos eventos clínicos e os marcadores hematológicos, bioquímicos e moleculares poderia ser adotado para definir de forma integral a gravidade clínica e contribuir para a conduta adequada do tratamento. As opções terapêuticas como uso de drogas analgésicas, hidroxiuréia e transfusões de sangue seriam realizadas de acordo com o perfil molecular dos pacientes e aqueles com quadros mais graves, acompanhados de forma diferenciada. Assim, a escolha adequada da terapêutica reduziria a prescrição de medicações desnecessárias evitando os seus efeitos adversos e aumentaria a eficácia da resposta ao tratamento.

De fato, alguns fatores limitantes do nosso estudo devem ser levados em consideração. As manifestações clínicas foram retiradas dos prontuários médicos que muitas vezes apresentavam-se em forma de folhas dispersas com letras ilegíveis ou mal preenchidos o que dificultou a identificação real de todos os eventos apresentados pelos pacientes. Não foi possível aumentar o número de participantes no estudo uma vez que durante a busca ativa percebeu-se incompatibilidade de informações pessoais de alguns pacientes. Além disso, tivemos dificuldades em encontrar pacientes em estado estável da doença.

6. CONCLUSÕES

Considerando os objetivos propostos neste estudo bem como as metodologias empregadas para a investigação dos moduladores clínicos em pacientes com doença falciforme do Estado do Amazonas, concluímos que:

1. Pacientes portadores do perfil SS apresentaram clínica mais grave quando comparados aos pacientes SC;
2. Os homens com anemia falciforme apresentaram aumento de alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos em comparação ao gênero feminino;
3. Concentrações de hemoglobina fetal mais elevadas foram observadas no gênero feminino;
4. O gênero feminino evoluiu com maior frequência em eventos clínicos graves como acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e sequestro hepático;
5. Pacientes do gênero feminino portadores do perfil SC apresentaram frequências mais elevadas em todos os eventos clínicos observados (pneumonia, sequestro esplênico, AVC, esplenectomia, hospitalizações, artralgia, dor abdominal, dor em membros superiores, dor em membros inferiores, dor torácica, mialgia, lombalgia e crises de vaso-oclusão);
6. A frequência da talassemia alfa $2^{3,7kb}$ foi de 16,5%, sendo 13,7% heterozigotos e 2,8% homozigotos;
7. Todos os portadores da doença SC foram selvagens para talassemia alfa $2^{3,7kb}$;

8. A talassemia alfa $2^{3,7kb}$ esteve associada a aumento no número de hemácias, hemoglobina e hematócrito, e diminuição nos valores de volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média;
9. A talassemia alfa $2^{3,7kb}$ não demonstrou associação com os eventos clínicos estudados;
10. Os haplótipos CAR e Benin foram os mais frequentes encontrados no nosso estudo;
11. Não foram encontrados haplótipos Árabe-Indiano e atípicos em nossos pacientes;
12. Portadores dos haplótipos Senegal e Camarões apresentaram clinica menos grave do que o CAR e o Benin;
13. CAR/CAR foram os que apresentaram concentrações de hemoglobina fetal mais baixas e Benin/Benin as mais elevadas;
14. Pacientes SS com concentração de hemoglobina fetal $\leq 3\%$ apresentaram maior frequência para retinopatia e transfusões enquanto que os pacientes SC apresentaram maior frequência para infecções;
15. Pacientes SS com hemoglobina $\geq 7,0$ g/dL apresentaram maior frequência para sequestro esplênico;
16. Pacientes SS com contagem global de leucócitos $\leq 10,0 \times 10^9/L$ apresentaram maior frequência para dor torácica;
17. Pacientes SC com contagem de plaquetas $\geq 250,0 \times 10^9/L$ apresentaram maior frequência para infecções ao passo que aqueles com plaquetas $\leq 250,0 \times 10^9/L$ evoluíram com crises de vaso-oclusão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update. *Clin Chem*. 2000;46(8 II):1284–90.
2. Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin Lab Haematol*. 2004;26(3):159–76.
3. Bain B. *Haemoglobinopathy Diagnosis*. 2006. 165 p.
4. Kovalevsky AY, Chatake T, Shibayama N, Park SY, Ishikawa T, Mustyakimov M, et al. Direct determination of protonation states of histidine residues in a 2 Å neutron structure of deoxy-human normal adult hemoglobin and implications for the bohr effect. *J Mol Biol [Internet]*. Elsevier B.V.; 2010;398(2):276–91.
5. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ*. 2008;86(6):480–7.
6. Mosca A, Paleari R, Leone D, Ivaldi G. The relevance of hemoglobin F measurement in the diagnosis of thalassemias and related hemoglobinopathies. *Clin Biochem [Internet]*. The Canadian Society of Clinical Chemists; 2009;42(18):1797–801.
7. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management*. 2009. 846 p.
8. Sommer CK, Goldbeck AS, Wagner SC, Castro SM. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul , Brasil Neonatal screening for hemoglobinopathies: a one-year experience in the public health system in Rio Grande do Sul State , Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2006;22(8):1709–14.
9. Howard J, Davies SC. Haemoglobinopathies. *Pediatr Child Heal*. 2007;17(8):311–6.
10. Franklin Bunn H. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 1997;337(11):762–9.
11. Bertholo LC, Moreira HW. Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre elas e talassemias beta. *J Bras Patol e Med Lab*. 2006;42(4):245–51.
12. Leung WC, Leung KY, Lau ET, Tang MHY, Chan V. Alpha-thalassaemia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2008;13(4):215–22.
13. Taher A, Vichinsky E, Musallam K, Cappellini MD, Viprakasit V. Guidelines for the Management of Non Transfusion Dependent Thalassemia (Ntdt) [Internet]. 2013. 1-107 p.
14. Silveira Z, Silva E, Torreao N, Bezerra I, Medeiros T. Variantes estruturais da hemoglobina: estudo sobre prevalência em militares; Structural variants of hemoglobin: study about prevalence in military. *Rev bras anal*. 2008;40(2):155–7.
15. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem. *Bull World Health Organ*. 2001;79(8):704–12.
16. Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JP, Menezes JF, Rêgo M, Reis MG, et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador , Bahia , Northeast Brazil Hemoglobinopatias em recém-nascidos de Salvador , Bahia , Nordeste do Brasil. *Cad Saude Publica*. 2005;21(1):292–8.
17. Weatherall J. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood*. 2010;115(22):4331–7.
18. Brasília M da S. *Doença Falciforme: Condutas básicas para tratamento*. 2013.

19. Payen E, Leboulch P. Advances in stem cell transplantation and gene therapy in the β -hemoglobinopathies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:276–83.
20. Brawley OW, Cornelius LJ, Edwards LR, Gamble VN, Green BL, Inturrisi C, et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Hydroxyurea Treatment for Sickle Cell Disease. *Ann Intern Med.* 2008;148(12):932–40.
21. Ebrahim SH, Khoja TAM, Elachola H, Atrash HK, Memish Z, Johnson A. Children Who Come and Go. The State of Sickle Cell Disease in Resource-Poor Countries. *Am J Prev Med [Internet]. Elsevier Inc.;* 2010;38(4):S568–70.
22. Garanito MP. Hemoglobinopatias: Interpretação do teste de triagem neonatal. *J Pediatr (Rio J).* 2008;30(3):172–6.
23. Cançado RD, Jesus J a. A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):204–6.
24. Felix AA, Souza HM, Ribeiro SBF. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(3):203–8.
25. Silva W dos S, Lastra A, Oliveira, Silviene Fabiana Klautau-Guimarães N, Grisolia CK. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. *Cad Saude Publica.* 2006;22(12):2561–6.
26. Moraes KCM, Galioti JB. A doença falciforme: um estudo genético-populacional a partir de doadores de sangue em São José dos Campos, São Paulo, Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(4):286–90.
27. Naoum PC. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2000;22(1):5–22.
28. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *Sci WorldJ ournal.* 2009;9:46–67.
29. Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal.* 2008;8:1295–324.
30. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med.* 1910;6(5):517–21.
31. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri O a., Gething PW, Dewi M, et al. Global epidemiology of Sickle haemoglobin in neonates: A contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet. Elsevier Ltd;* 2013;381(9861):142–51.
32. Araújo MCP, Serafim ÊSS, Castro Júnior WAP, Medeiros TMD. Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal , Rio Grande do Norte , Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2004;20(1):123–8.
33. 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.
34. Lobo C, Marra VN, Silva RMG. Crises dolorosas na doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):247–58.
35. Ballas SK, Mohandas N. Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1996;10(6):1221–39.
36. Miller AC, Gladwin MT. Pulmonary complications of sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(11):1154–65.
37. Di Nuzzo DVP, Fonseca SF. Anemia falciforme e infecções. *J Pediatr (Rio J).* 2004;80:347–54.

38. Fernandes APPC, Januário JN, Cangussu CB, Macedo DL De, Viana MB. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. *J Pediatr (Rio J)*. 2010;0(0):279–84.
39. Filho IL da S, Ribeiro GS, Moura PG, Vechi ML, Cavalcante AC, Andrada-Serpa MJ. Manifestações clínicas agudas na primeira e segunda infâncias e características moleculares da doença falciforme em um grupo de crianças do Rio de Janeiro. 2012;34(3):196–201.
40. Paladino S. Úlcera De Membros Inferiores Na Anemia Falciforme. *Rev bras hematol hemoter*. 2007;29(3):288–90.
41. Serjeant GR, Serjeant BE, Mohan JS, Clare A. Leg Ulceration in Sickle Cell Disease: Medieval Medicine in a Modern World. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2005;19(5):943–56.
42. Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS. Sickle Hemoglobin (HbS) Allele and Sickle Cell Disease: A HuGe Review. *Am J Epidemiol*. 2000;151(9):839–45.
43. Sonati MDF, Costa FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(4):40–51.
44. Itano HA, Neel J V. A new inherited abnormality of human hemoglobin. *Pathology*. 1950;36:613–7.
45. Diggs LW, Kraus AP, Morrison DB, Rudnicki RPT. Intraerythrocytic Crystals in a White Patient with Hemoglobin C in the Absence of Other Types of Hemoglobin. *Blood*. 1954;9:1172–84.
46. Araújo JT., Batissoco AC, Bodemeier L. “ In vivo ” and “ in vitro ” demonstration of hemoglobin C crystals in non-splenectomized patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1999;41(4):235–8.
47. Angulo IL, Picado SBR. Hemoglobina C em homozigose e interação com talassemia beta. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(6):408–12.
48. Nagel RL, Fabry ME, Steinberg MH. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Rev*. 2003;17(3):167–78.
49. Bunn HF, Noguchi CT, Hofrichter J, Schechter GP, Schechter AN, Eaton WA. Molecular and cellular pathogenesis of hemoglobin SC disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(23):7527–31.
50. Serjeant GR. Screening for sickle-cell disease in Brazil. *Lancet*. 2000;356:168–9.
51. Cabañas-Pedro AC, Braga J a P, Camilo-Araújo RF, Silva AIM, Vicari P, Figueiredo M. Hemoglobin sickle cell disease in Brazil. *Haematologica*. 2013;98(1):2013.
52. Murao M, Ferraz MHC. Traço falciforme – heterozigose para hemoglobina S. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(3):223–5.
53. Braga J a. . Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(3):233–8.
54. Thompson LM, Ceja ME, Yang SP. Stem cell transplantation for treatment of sickle cell disease□: Bone marrow versus cord blood transplants. *Am J Heal Pharm*. 2012;69:1295–302.
55. Silva MC. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme Effectiveness and toxicity of hydroxyurea in children with sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2006;28(2):144–8.
56. Schnog J. Sickle cell disease. A general overview. *J Med*. 2004;62(10):364–74.
57. Cançado RD, Lobo C, Angulo IL, Araújo PIC, Jesus J a. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(5):361–6.

58. Adekile AD, Huisman THJ. Hb F in sickle cell anemia. *Acta Haematol.* 1993;49(1):16–27.
59. Cuellar-Ambrosi F, Mondragon MC, Figueroa M, Prehu C, Galacteros F, Ruiz-Linhares A. Sickle cell anemia and beta-globin gene cluster haplotypes in Colombia. *Hemoglobin.* 2000;24:221–5.
60. Nadkarni A, Phanasgaonkar S, Colah R, Mohanty D, Ghosh K. Prevalence and molecular characterization of alpha thalassemia syndromes among Indians. *Genet Test.* 2008;12(2):177–80.
61. Tarer V, Etienne-Julan M, Diara JP, Belloy MS, Mukizi-Mukaza M, Elion J, et al. Sickle cell anemia in Guadeloupean children: Pattern and prevalence of acute clinical events. *Eur J Haematol.* 2006;76(3):193–9.
62. 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.
63. Mousinho-Ribeiro R de C, Cardoso G de L, Sousa ÍEL, Martins PKC. Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008;30(2):136–41.
64. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet.* 2004;364:1343–60.
65. Antonarakis SE, Kazazian HH, Orkin SH. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet.* 1985;1–14.
66. Steinberg MH, Lu ZH, Nagel RL, Venkataramani S, Milner PP, Huey L, et al. Hematological effects of atypical and cameroon beta-globin gene haplotypes in adult sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 1998;59(2):121–6.
67. Galiza Neto GC De, Pitombeira MDS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *J Bras Patol e Med Lab.* 2003;39(1).
68. Nagel RL. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. *Einstein Q J Biol Med.* 1984;2(1):53–62.
69. Loggetto SR. Sickle cell anemia: clinical diversity and beta S-globin haplotypes. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013;31:155–7.
70. Gonçalves MS, Bomfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A, et al. β S -Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador , Bahia , Northeastern Brazil. *Brazilian J Med Biol Res.* 2003;36:1283–8.
71. 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.
72. Cabral CHK, Serafim ÉSS, Medeiros WRDB De, Fernandes TAADM, Kimura EM, Costa FF, et al. Determination of beta S haplotypes in patients with sickle-cell anemia in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genet Mol Biol.* 2011;34(3):421–4.
73. Okumura JV, Lobo CLDC, 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.
74. Galiza Neto GC De, Pitombeira MDS, Vieira HF, Vieira MLC, Farias DAB. Análise dos haplótipos do gene da betaS-globina no Ceará. *J Bras Patol e Med Lab.* 2005;41(5):315–21.
75. Bhagat S, Patra PK, Thakur AS. Fetal haemoglobin and beta-globin gene cluster haplotypes among sickle cell patients in Chhattisgarh. *J Clin Diagnostic Res.* 2013;7(2):269–72.
76. Powars D., Chan L, Schroeder W. Beta S-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia: clinical implications. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1990;12(3):367–74.
77. Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:13.

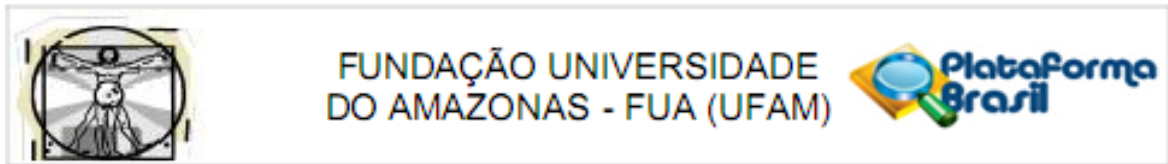
78. Aydinok Y. Thalassemia. *Hematology*. 2012;17:28–31.
79. Tomé-Alves R, Marchi-Salvador DP, Orlando GM, Palharini L a., Imperial RE, Naoum PC, et al. Hemoglobinas AS/Alfa talassemia - importância diagnóstica. *Rev Bras H*. 2000;22(3):388–94.
80. Vichinsky E. Complexity of alpha thalassemia: Growing health problem with new approaches to screening, diagnosis, and therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1202:180–7.
81. Orlando GM, Naoum PC, Bonini-domingos CR. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2000;22(2):111–21.
82. Figueiredo MS, Kerbaury J, Gonçalves MS, Arruda VR, Saad STO, Sonati MF, et al. Effect of alfa Thalassemia and beta Globin Gene Cluster Haplotypes on the Hematological and Clinical Features of Sickle-Cell Anemia in Brazil. *Am J Hematol*. 1996;76:72–6.
83. Lyra IM, Gonçalves MS, Braga JAP, Gesteira M de F, Carvalho MH, Terezinha S, et al. Clinical , hematological , and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2005;21(4):1287–90.
84. Fabry ME, Mears JG, Patel P, Rego KS, Carmichael LD, Martinez G, et al. Dense Cells in Sickle Cell Anemia: The Effects of Gene Interation. *Blood*. 1984;64(5):1042–6.
85. Dacie J V. *Practical Haematology*. 1995. 1277-1287 p.
86. Baysal E, Huisman THJ. Detection of common deletional α -thalassemia-2 determinants by PCR. *Am J Hematol*. 1994;46(3):208–13.
87. Foglietta E, Deidda G, Graziani B, Modiano G, Bianco I. Detection of α -globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica*. 1996;81(5):387–96.
88. Sutton M, Bouhassi EE, Nagel RL. Polymerase Chain Reaction Amplification Applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol*. 1989;32(1):66–9.
89. Powars D., Hiti A. Sickle cell anemia. Beta S gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *Am J Dis Child*. 1993;147:1197–202.
90. Steinberg MH. Genetic modulation of cickle cell anemia. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995;209:1–13.
91. Ofori-Acquah SF, Lalloz MR, Serjeant G, Layton DM. Dominant influence of gamma-globin promoter polymorphisms on fetal haemoglobin expression in sickle cell disease. *Cell Mol Biol*. 2004;50:35–42.
92. Adekile AD, Kitundu MN, Gu LH, Lanclos KD, Adeodu OO, Huisman TH. Haplotypes in SS patients from Nigeria; characterization of one atypical beta S haplotype no. 19 (Benin) associated with elevated HB F and high G gamma levels. *Ann Hematol*. 1992;65:41–5.
93. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med*. 1991;325:11–6.
94. Sebastiani P, Nolan VG, Baldwin CT, Abad-Grau MM, Wang L, Adewoye AH, et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood*. 2007;110(7):2727–35.
95. Adams RJ, Kutlar A, Mckie V, Carl E, Nichols FT, Liu JC, et al. Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 1994;45:279–82.

96. Abboud MR, Musallam KM. Sick cell disease at the dawn of the molecular era. *Hemoglobin*. 2009;33(1):93–106.
97. Okpala I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*. 2006;13(1):40–4.
98. Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad ST, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica*. 2008;
99. Traina F, Saad STO. Complicações hepáticas na doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(3):299–303.
100. Naum FA. Alterations of the lipid profile in anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2005;27(3):223–6.
101. Colella MP, Paula EV De, Machado-neto JA, Conran N, Annichino-bizzacchi JM, Costa FF, et al. Elevated hypercoagulability markers in hemoglobin SC disease. *Haematologica*. 2015;100(4):466–71.
102. Seixas MO, Rocha LC, Carvalho MB, Menezes JF, Lyra IM, Nascimento VML, et al. Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. *Lipids Health Dis*. 2010;9(91):1–9.
103. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2005;129:465–81.
104. Gualandro SFM, Fonseca HH, Yokomizo IK, Gualandro DM, Liliانا M. Cohort study of adult patients with haemoglobin SC disease: clinical characteristics and predictors of mortality. *Br J Haematol*. 2015;1–7.
105. Camilo-araújo RF, Amancio OMS, Figueiredo MS, Cabanãs-pedro AC, Braga JAP. Molecular analysis and association with clinical and laboratory manifestations in children with sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2014;36(5):334–9.
106. Cardoso GL, Yukiko S, Takanashi L, Guerreiro JF. Inherited hemoglobin disorders in an Afro-Amazonian community: Saracura. *Genet Mol Biol*. 2012;35(3):553–6.
107. Nagel RL, Steinberg MH. Genetics of the β S gene: origins, genetic epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. *Disord hemoglobin – genetics, pathophysiology, Clin Manag*. 2001;711–55.
108. Rumaney MB, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, Ramesar R, Kengne AP, Ngogang J, et al. The co-inheritance of alpha-thalassemia and sickle cell anemia is associated with better hematological indices and lower consultations rate in Cameroonian patients and could improve their survival. *PLoS One*. 2014;9(6):1–10.
109. Pandey S, Pandey S, Mishra RM, Sharma M, Saxena R. Genotypic influence of α -deletions on the phenotype of Indian sickle cell anemia patients. *Korean J Hematol*. 2011;46(3):192–5.
110. Pante-de-Sousa G, Mousinho-Ribeiro R de C, Guerreiro JF. Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. *Genet Mol Biol*. 1998;21(4).
111. Pante-de-Sousa G, Mousinho-Ribeiro R de C, Santos EJM, Guerreiro JF. β -globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon Region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. *Ann Hum Biol*. 1999;26(4):365–73.
112. Antwi-Boasiako C, Frimpong E, Ababio GK, Dzudzor B, Ekem I, Antwi DA. Sick Cell Disease: Reappraisal of the role of foetal Haemoglobin levels in the frequency of Vaso-Occlusive Crisis. *Ghana Med J*. 2015;49(2):102–6.

113. Sobrinho EF de A, Saraiva JC de P, Silva JN, Silva APS, Lima RC. Retinal Sings in patients with sickle cell disease. *Rev Bras Oftalmol.* 2011;70(5):284–9.
114. Silva LB, Gonçalves RP, Martins MF. Estudo da associação entre os níveis de hemoglobina fetal e o prognóstico dos pacientes com anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;31(6):417–20.

APÊNDICES

**APÊNDICE 1
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DAS HEMOGLOBINOPATIAS ESTRUTURAIS E DE SÍNTESE EM MÃES E RECÉM-NASCIDOS DA CIDADE DE MANAUS-AMAZONAS

Pesquisador: José Pereira de Moura neto

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 37941514.4.0000.5020

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmaceuticas

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 897.779

Data da Relatoria: 25/11/2014

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Projeto em tela é um estudo aprovado pelo PPSUS e contém todos os elementos inerentes a um trabalho científico com: Introdução, Objetivos; Metodologia; Cronograma de execução e Orçamento Financeiro;

TCLE - Contemplado

Termo de Assentimento para os menores - Contemplado

Folha de Rosto - Contemplado

Curricula disponível dos Pesquisadores- Contemplado

Termo de Anuência do Hospital D.Lindu - Contemplado.

Recomendações:

não se Aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto somos de Parecer pela Aprovação.SMJ

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

APÊNDICE 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Eu, _____, com 18 anos de idade ou mais, (se menor, nome do pai ou responsável) detentor de integral competência dou consentimento para participar como voluntário do estudo denominado “MODULADORES CLÍNICOS EM PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA FALCIFORME NO AMAZONAS”, sob a coordenação do Dr. José Pereira de Moura Neto. As implicações de sua participação voluntária, incluindo a natureza, duração e objetivo do estudo, os métodos e meios através dos quais deve ser conduzido e as inconveniências e riscos que podem ser naturalmente esperados foram explicados por _____ (nome do investigador no(a) _____ (endereço e telefone).

Entendo também que eu tenho permissão para a qualquer momento revogar o meu consentimento e retirar o paciente do estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de direitos. Entretanto, o paciente poderá ser solicitado realizar exames, caso o médico que o assiste, julgue-os necessários para sua saúde e bem estar. Minha recusa em permitir que meu filho ou tutelado participe do estudo não resultará em punições ou perdas de benefícios a que ele/ela tenha direito.

Nome do responsável (letra de forma) _____

Assinatura do responsável _____ Data ___/___/___

Endereço _____

Número de identidade _____

Número no estudo _____

Eu presenciei a explicação acima descrita, confirmando a oportunidade concedida ao responsável de formular perguntas e testemunho a assinatura do pai ou responsável pelo menor neste documento.

Nome da testemunha (letra de forma) _____

Assinatura da testemunha _____ Data ___/___/___

Assinatura do investigador _____ Data ___/___/___

Nome do investigador (letra de forma) _____

EXPLICAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO

TÍTULO DO ESTUDO

“MODULADORES CLÍNICOS EM PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA FALCIFORME NO
AMAZONAS”

Investigador (a): Janaina Santana Carneiro

Titulação: Mestrado em Ciências Aplicadas à Hematologia

Informações sobre a sua participação.

Segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), do Ministério da Saúde, nascem no Brasil 3.500 crianças por ano com doença falciforme (DF) e 200.000 com traço falciforme, e estima-se que 7.200.000 pessoas sejam portadoras do traço falcêmico (HbAS) e entre 25.000 a 30.000 com DF. Trata-se de uma doença grave e os indivíduos transmissores da herança representam 7% da nossa população. Por isso, é importante realizar estudos que possam ajudar a compreender melhor essa doença e também colaborar para o surgimento de um novo tipo de tratamento.

Por esses motivos, você está sendo convidado a participar de uma pesquisa médica, que envolverá informações sobre essa doença. É de grande importância que você entenda os princípios gerais que se seguem e que serão aplicados a todos os participantes do nosso estudo: a) sua participação é totalmente voluntária; b) você poderá interromper sua participação antes ou em qualquer momento do estudo. Sua recusa em participar não envolverá punições ou perda de seus direitos constituídos; c) depois de lidas as explicações, você pode fazer qualquer pergunta necessária ao seu entendimento.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo é descrever os moduladores clínicos nos pacientes portadores do perfil SS e SC atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM). Caso você concorde em participar, deve permitir a coleta de 10 mL de sangue retirados da veia, procedimento que será realizado pela equipe responsável na Fundação Hospitalar de Hematologia e

Hemoterapia do Amazonas/ FHMOAM, destinados à realização das análises hematológicas e bioquímicas.

Duração da sua participação

O tempo previsto para a realização do nosso estudo será de aproximadamente 02 anos.

Riscos, danos e desconfortos

O sangue será coletado através da utilização de materiais novos, estéreis e descartáveis, por pessoal habilitado e especializado.

Benefícios

A participação neste projeto proporcionará benefícios aos indivíduos portadores de doença falciforme, uma vez que os resultados obtidos possibilitarão um maior entendimento da evolução clínica da doença e possível manejo adequado e diferenciado, e conseqüentemente, melhor qualidade de vida e aumento da sobrevivência dos pacientes acometidos por essa doença.

Compromisso com a confidencialidade da identidade do voluntário

Os registros da participação do paciente no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos participantes do projeto e do médico que o acompanha.

Novos achados significativos

Qualquer informação importante que surgir durante a sua participação no estudo e que possa contribuir para o melhor desenvolvimento clínico da doença em estudo será levada imediatamente ao seu conhecimento e do seu médico.

Cuidados médicos

As amostras de sangue serão coletadas no ambulatório de hematologia da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas e encaminhadas ao Laboratório de Análises Especializadas em hematologia e Biologia Molecular (LAEBM) localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) para as análises laboratoriais.

Pessoas e locais a serem contatadas para a obtenção de respostas, e formulação de perguntas e maiores informações:

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos.

Dr. José Pereira de Moura Neto – Farmacêutico Bioquímico orientador do projeto “Moduladores clínicos em pacientes portadores da doença falciforme no Amazonas”.

Janaina Santana Carneiro – Mestranda em ciências aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Tel: 99213-2926.

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Atesto o recebimento da cópia deste acordo, que é constituído pelos termos de explicação e de consentimento.

Assinatura do paciente _____ Data ____/____/____

Nome do paciente (letra de forma) _____

Assinatura do pai/responsável _____ Data ____/____/____

Nome do pai/responsável (letra de forma) _____

APÊNDICE 3 FICHA CLÍNICA DO PACIENTE

FICHA CLÍNICA	
Nome: _____ Sigla: _____ N° prontuário HEMOAM: _____ Tel: _____	
Endereço: _____	
Diagnóstico: _____ Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____	
Gênero: () Masc.{1} () Fem.{2}	
1. Família com DF: () SIM {1} () NÃO {2}	16. Lombalgia: () SIM {1} () NÃO {2}
2. Diagnóstico: () anos () meses () dias	17. Otagia: () SIM {1} () NÃO {2}
3. Eletroforese de Hb: () SS {1} () SC {2} () CC {3} () βtal {4} () AS {5} () outros {6}	18. CVO: () SIM {1} () NÃO {2}
4. Gravidez: () SIM {1} () NÃO {2}	19. Retinopatia: () SIM {1} () NÃO {2}
5. Menstruação regular: () SIM {1} () NÃO {2}	20. Infecções: () SIM {1} () NÃO {2}
6. Internação: () SIM {1} () NÃO {2}	21. Priapismo: () SIM {1} () NÃO {2}
7. Pneumonia: () SIM {1} () NÃO {2}	22. Úlcera maleolar: () SIM {1} () NÃO {2}
8. Esplenomegalia: () SIM {1} () NÃO {2}	23. Alteração óssea: () SIM {1} () NÃO {2}
9. AVC: () SIM {1} () NÃO {2}	24. Síndrome Torácica: () SIM {1} () NÃO {2}
10. Esplenectomia: () SIM {1} () NÃO {2}	25. Sequestro Hepático: () SIM {1} () NÃO {2}
11. Artralgia: () SIM {1} () NÃO {2}	26. Insuficiência renal: () SIM {1} () NÃO {2}
12. Odinofagia: () SIM {1} () NÃO {2}	27. Insuficiência cardíaca: () SIM {1} () NÃO {2}
12. Dor abdominal: () SIM {1} () NÃO {2}	28. Litíase biliar: () SIM {1} () NÃO {2}
13. Dor em membros superiores: () SIM {1} () NÃO {2}	29. Dor torácica: () SIM {1} () NÃO {2}
14. Dor em membros inferiores: () SIM {1} () NÃO {2}	30. Transfusão: () SIM {1} () NÃO {2}
15. Mialgia: () SIM {1} () NÃO {2}	31. Haplótipo: () Sen {1} () Car {2} () Ben {3} () Cam {4} () Arab.Saud. {5} () Atp {6}
	32. Talassemia Alfa: () Neg. () hetero 3.7kb () homo 3.7kb

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

1. A ₁ :	7. Hgb:	13. Leuc.:	19. BD.:	25. Ferro:
2. A ₂ :	8. Htc:	14. Plaq.:	20. BI:	26. Ferritina:
3. F:	9. VCM:	15. Ret.:	21. Glic:	
4. S:	10. HCM:	16. Uréia:	22. Trig.:	
5. C:	11. CHCM:	17. Creat.:	23. HDL:	
6. Hem.:	12. RDW	18. GGT:	24. DHL:	

APÊNDICE 4 PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA - TÉCNICA DE FENOL CLOROFÓRMIO (BRAZOL)

1) Fase pré-extração DNA:

- a) Certificar se o Banho Maria está na temperatura ideal de 56°C.
- b) Verificar a disponibilidade de microtubos de 1,5 e 2 mL.
- c) Verificar se existe quantidade suficiente de etanol 100% e clorofórmio.

2) Fase extração DNA:

- a) Pipetar 200µL (microlitros) da amostra de sangue em um microtubo de 2mL, devidamente identificado. A amostra de sangue deve ser homogeneizada antes de pipetar. Em algumas situações é possível pipetar o *buffy coat*.
- b) Adicionar 400µL de Brazol gelado (4°C) e agitar no vortex até a amostra adquirir aspecto homogêneo.
- c) Adicionar 100µL de clorofórmio geledo (4°C) e misturar no vortex até a amostra adquirir uma coloração “cor de chocolate”.
- d) Centrifugar por 12 minutos a 10.000 rpm.
- e) Após a centrifugação, retirar o microtubo cuidadosamente da centrífuga e verificar se a solução esta dividida em 2 parte.
- f) Pipetar cuidadosamente a fase superior (Sobrenadante) e transferir para tubos de 1,5mL identificados corretamente.

3) Fase precipitação do DNA genômico:

- a) Adicionar 500µL de etanol 100% gelado (armazenado 4°C), homogeneizar no vortex e observar a formação de um precipitado. O precipitado é usualmente visualizado em 30 a 60 segundos.
- b) Centrifugar por 15 minutos a 10.000 rpm.
- c) Decantar o sobrenadante e adicionar novamente 500µL de etanol 100% gelado (armazenado a 4°C).
- d) Centrifugar por 12 minutos a 10.000 rpm.
- e) Decantar o sobrenadante.
- f) Remover o etanol residual com pipeta e colocar no Banho Seco 56°C por 10 minutos.
- g) Adicionar 200µL de água destilada estéril em cada tubo.

Importante verificar se não há resíduo de etanol antes de adicionar água destilada estéril para diluir o DNA (resíduos de etanol pode inibir o DNA).

- h) Quantificar o DNA genômico utilizando o equipamento NanoDrop 1000.
- i) Armazenar o DNA purificado a 4°C ou -20°C.

APÊNDICE 5

PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA - HIYIELD GENOMIC DNA MINI KIT

Separar os tubos eppendorf e o sangue que será utilizado;

Adicionar 200µl de sangue ao tubo eppendorf;

Adicionar 600 µl de RBC Lysis Buffer;

ATENÇÃO: Não dar vortex;

Deixar a temperatura ambiente por 10 minutos;

Centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos e após, descartar o sobrenadante;

Adicionar 100 µl de RBC Lysis Buffer;

Adicionar 200 µl de GB Buffer ao tubo de eppendorf e dar vortex;

Incubar a mistura em temperatura ambiente por 10 minutos até a amostra lisada estar clara. Durante a incubação, inverter o tubo a cada 3 minutos;

Pré-aquecer o tampão de eluição (200 µl por amostra) a 70°C em banho maria (para eluição do DNA);

Adicionar 150 µl de etanol a 96% ou 100% na amostra lisada e imediatamente dar o vortex por 10 segundos. Se o precipitado aparecer, quebrá-lo por pipetagem;

Colocar uma coluna GB em um tubo de coleção de 2 ml;

Aplicar a mistura total no tubo do kit (incluindo qualquer precipitado) do passo anterior da coluna GB;

Fechar os tubos e centrifugar a velocidade total de 13.000 rpm por 5 minutos;

Descartar o tubo de 2 ml contendo o filtrado (o resto) e colocar a coluna em um novo tubo de 2 ml;

Adicionar 400 µl do tampão W1 na coluna GB;

Centrifugar a 13.000 rpm por 30 segundos;

Descartar o filtrado e colocar a coluna de volta no tubo de 2 ml;

Adicionar 600 µl do tampão de lavagem (Wash Buffer) na coluna GB;

Centrifugar a 13.000 rpm por 30 segundos;

Descartar o filtrado e colocar a coluna de volta no tubo de 2 ml;

Centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos para secar a coluna matriz;

Transferir a coluna GB seca para o tubo eppendorf de 1,5 ml limpo;

Adicionar 200 µl do Buffer de eluição pré-aquecido no centro da coluna matriz;

Deixar a temperatura ambiente por 3 a 5 minutos até o Buffer de eluição ser absorvido pela matriz;

Centrifugar a 13.000 rpm por 30 segundos para eluir o DNA purificado.