André Rolim Belisário

GENÓTIPOS DA TALASSEMIA ALFA E HAPLÓTIPOS DO AGRUPAMENTO DE GENES DA GLOBINA BETA COMO MODULADORES DA GRAVIDADE NA DOENÇA FALCIFORME EM CRIANÇAS DO PROGRAMA ESTADUAL DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS MATRICULADAS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Belo Horizonte
2010

André Rolim Belisário

GENÓTIPOS DA TALASSEMIA ALFA E HAPLÓTIPOS DO AGRUPAMENTO DE GENES DA GLOBINA BETA COMO MODULADORES DA GRAVIDADE NA DOENÇA FALCIFORME EM CRIANÇAS DO PROGRAMA ESTADUAL DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS MATRICULADAS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Marcos Borato Viana

Coorientadoras: Cibele Velloso Rodrigues

Marina Lobato Martins

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Belo Horizonte
2010

Belisário, André Rolim.
B432g Genótipos da talassemia alfa e haplótipos do agrupamento de genes da globina beta como moduladores da gravidade na doença falciforme em crianças do Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais... [manuscrito]. / André Rolim Belisário. - - Belo Horizonte: 2010.
177f.: il.
Orientador: Marcos Borato Vianna.
Co-Orientador: Cibele Velloso Rodrigues, Marina Lobato Martins.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Anemia Falciforme. 2. Talassemia alfa. 3. Globinas beta. 4. Haplótipos. 5. Prognóstico. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Viana, Marcos Borato. II. Rodrigues, Cibele Velloso. III. Martins, Marina Lobato. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.
NLM: WS 300

FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br

UFMG

DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Marcos Borato Viana, Marina Lobato Martins, Cibele Velloso Rodrigues, Marilda Souza Gonçalves e Benigna Maria de Oliveira, aprovou a defesa da dissertação intitulada **"GENÓTIPOS DA ALFA-TALASSEMIA E HAPLÓTIPOS DO AGRUPAMENTO DE GENES DA BETA-GLOBINA COMO MODULADORES DA GRAVIDADE NA ANEMIA FALCIFORME EM CRIANÇAS DO PROGRAMA ESTADUAL DE TRIAGEM NEONATAL DE MG E MATRICULADOS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE"** apresentada pelo mestrando **ANDRÉ ROLIM BELISÁRIO,** para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 22 de março de 2010.

Prof. Marcos Borato Viana
Orientador

Profa. Marina Lobato Martins
Coorientadora

Profa. Cibele Velloso Rodrigues
Coorientadora

Profa. Marilda Souza Gonçalves

Profa. Benigna Maria de Oliveira

FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br

UFMG

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **ANDRÉ ROLIM BELISÁRIO,** nº de registro 2008657226. Às quatorze horas, do dia **vinte e dois de março de dois mil e dez**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"GENÓTIPOS DA ALFA-TALASSEMIA E HAPLÓTIPOS DO AGRUPAMENTO DE GENES DA BETA-GLOBINA COMO MODULADORES DA GRAVIDADE NA ANEMIA FALCIFORME EM CRIANÇAS DO PROGRAMA ESTADUAL DE TRIAGEM NEONATAL DE MG E MATRICULADOS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE"**, requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Marcos Borato Viana, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Marcos Borato Viana/ Orientador	Instit: UFMG	Indicação: Aprovado
Profa. Marina Lobato Martins/ Coorientadora	Instit: Fund. Hemominas	Indicação: Aprovado
Profa. Cibele Velloso Rodrigues/ Coorientadora	Instit: Fund. Hemominas	Indicação: Aprovado
Profa. Marilda Souza Gonçalves	Instit: UFBA	Indicação: Aprovado
Profa. Benigna Maria de Oliveira	Instit: UFMG	Indicação: Aprovado

Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de março de 2010.

Prof. Marcos Borato Viana/ Orientador _____

Profa. Marina Lobato Martins/ Coorientadora _____

Profa. Cibele Velloso Rodrigues/ Coorientadora _____

Profa. Marilda Souza Gonçalves _____

Profa. Benigna Maria de Oliveira _____

Prof. Joel Alves Lamounier/Coordenador _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Pós-graduação em Ciências da Saúde
Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente

Reitor: Prof. Ronaldo Tadêu Pena
Vice-Reitora: Profa. Heloisa Maria Murgel Starling
Pró-reitor de Pós-graduação: Profa. Elizabeth Ribeiro da Silva
Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

Faculdade de Medicina
Diretor: Prof. Francisco José Penna
Vice-diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Carlos Faria Santos Amaral

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: João Lúcio dos Santos Jr.

Chefe do Departamento de Pediatria: Profa. Maria Aparecida Martins

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente: Prof. Joel Alves Lamounier

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente: Profa. Ana Cristina Simões e Silva

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente:

Coordenador - Prof. Joel Alves Lamounier
Subcoordenador - Profa. Ana Cristina Simões e Silva

Profa. Ivani Novato Silva
Prof. Jorge Andrade Pinto
Profa. Lúcia Maria Horta Figueiredo Goulart
Profa. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana
Prof. Marco Antônio Duarte
Profa.Regina Lunardi Rocha
Gustavo Sena Sousa (Repr. Discente)

´´Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil, e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos``.

Albert Einstein

À minha família, principalmente, à Maria Eduarda, que são tudo de mais importante que tenho na vida!

Agradecimentos

Agradeço, inicialmente, a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento e concretização deste trabalho.

Especialmente às mães, pais ou responsáveis e às crianças, sujeitos desta pesquisa, pela colaboração e confiança, tornando possível a realização deste trabalho.

Ao maior tesouro que tenho nessa vida, Maria Eduarda Ferreira Belisário, que mesmo estando longe, continua sendo a maior fonte de inspiração e vontade de crescimento profissional e, principalmente, pessoal.

Ao Professor Marcos Borato Viana, inicialmente, pela excelente orientação e pelos inúmeros ensinamentos. Pelo exemplo e sua admirável e singular dedicação no desenvolvimento de pesquisas científicas. Pela confiança depositada em mim, pela oportunidade, pelo incentivo e por acreditar no meu trabalho.

À minha coorientadora Cibele Velloso Rodrigues, pela sua amizade, confiança e incentivo que já perduram desde o período da graduação. Pelas essenciais contribuições no desenvolvimento do trabalho e na redação da dissertação. Pela primeira oportunidade dada a mim para trabalhar com pesquisa científica e pelos infinitos ensinamentos ao longo dessa jornada. Pelo exemplo de dedicação e dignidade na vida profissional.

À minha coorientadora Marina Lobato Martins, pela confiança e oportunidade de desenvolver sua brilhante idéia. Pelo seu apoio incondicional, sempre disponível para me receber com carinho e atenção nos momentos de dúvidas e incertezas, e pelas contribuições essenciais no desenvolvimento do trabalho e redação da dissertação.

Aos meus pais, Carlos Henrique Torres Belisário e Maria Cristina Rolim Belisário, pela integral presença na minha vida fazendo com que eu escolhesse caminhos certos, mesmo em momentos de desespero. Pelo amor incondicional e os ensinamentos, valorizando sempre coisas não palpáveis, como o a honestidade, respeito e humildade. E principalmente pela educação que me proporcionaram.

À minha irmã, Gabriela Rolim Belisário, pela amizade, companheirismo e cumplicidade em cada momento de nossas vidas.

A todos os meus amigos e familiares, pelo apoio, paciência e, principalmente, por acreditarem em mim.

Aos acadêmicos de Medicina Antônio Osvaldo de Freitas, Aline Pimentel Amaro, Camila Blanco Cangussu, Daniela Guimarães Silva, Daniela Lino Macedo, Marcela S. Braga e, principalmente, à Poliana Giovani, pela essencial contribuição na construção do banco de dados e/ou auxílio na coleta dos termos de consentimento.

Ao Farmacêutico Felipe Carlos Brito Souza, pelo apoio na realização dos procedimentos laboratoriais, na construção do banco de dados e na coleta dos termos de consentimento.

À acadêmica de Farmácia Ana Mercy Siebra Brito, pela importante contribuição na realização dos procedimentos laboratoriais.

À acadêmica de Ciências Biológicas Marina Alves, pela contribuição na coleta das amostras dos sujeitos junto ao serviço de hematologia.

À acadêmica de Ciências Biológicas Cristina Sábato, pelo apoio na coleta dos termos de consentimento e na realização de alguns procedimentos laboratoriais.

À funcionária do NUPAD Ivanir, pelo seu importantíssimo, indispensável e generoso apoio na coleta dos termos de consentimento.

Às colegas de pós-graduação, Fernanda Silva Pimentel e Marcilene Rezende Silva, pela parceria e pelos favores trocados.

À Dr. Célia Maria Silva, pela parceria com o banco de dados e na coleta dos termos de consentimento e, principalmente, por ceder informações relativas ao Doppler transcraniano, indispensável fonte de dados para este trabalho.

Ao pessoal do Serviço de Hematologia e Coagulação da Fundação HEMOMINAS, pela paciência e pelo apoio na coleta das amostras dos sujeitos da pesquisa.

Ao pessoal do Serviço de Pesquisa da Fundação HEMOMINAS, pela convivência, favores e pelos ensinamentos.

Ao pessoal do cadastro e da recepção dos pacientes da Fundação HEMOMINAS, pela paciência e colaboração.

Ao NUPAD, pelo apoio logístico da Central de Projetos e, principalmente, a Maria Piedade, pelo apoio na revisão de literatura.

À Fundação HEMOMINAS, por ceder o espaço logístico e pelo financiamento.

À FAPEMIG, por financiar as bolsas de iniciação científica dos estudantes que contribuíram com a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo financiamento da bolsa de mestrado.

A Deus, pela vida MARAVILHOSA que me concedeu!

Muito obrigado de coração!!!

Resumo

Objetivo: verificar associações entre os genótipos de α-Tal e os haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina com características clínicas e hematológicas em uma população de crianças triadas pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG) e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte (HBH) da Fundação HEMOMINAS. **Métodos:** coorte retrospectiva, com amostra aleatorizada, na qual foram incluídas crianças triadas pelo PETN-MG e encaminhadas ao HBH, com perfil eletroforético compatível com anemia falciforme (SS ou $S\beta^0$-talassemia), nascidas no período entre 01/01/1999 e 31/12/2006. Os dados foram coletados nos prontuários médicos do HBH. Os pacientes foram acompanhados por, no mínimo, dois anos e meio, até 30/06/2009. A genotipagem de α-Tal foi realizada por PCR multiplex (alelos: $-\alpha^{3.7}$; $-\alpha^{4.2}$; $--^{SEA}$; $--^{FIL}$; $--^{MED}$; $-(\alpha)^{20.5}$ e $--^{THAI}$). Os haplótipos β^S foram determinados por PCR-RFLP. **Resultados:** Foram analisadas 221 crianças, sendo 119 (53,8%) do sexo feminino e 102 (46,2%), do masculino. A idade variou entre 2,5 e 10,4 anos. Duzentos e oito (94,1%) eram homozigotos para o alelo β^S e 13 (5,9%) possuíam o genótipo $S\beta^0$-tal. Dos 208 sujeitos SS, 58 (27,9%) eram heterozigotos ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) e três (1,4%) homozigotos para α-Tal ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$). Dos 13 sujeitos $S\beta^0$-tal, cinco (38,5%) eram heterozigotos ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$). Entre os 208 sujeitos SS, havia 82 (39,43%) com o genótipo CAR/CAR, 69 (33,17%) Ben/CAR, 49 (23,56%) Ben/Ben, dois (0,96%) CAR/Atp, dois (0,96%) Ben/Atp, dois (0,96%) Árabe-Indiano/Ben e dois (0,96%) não puderam ser caracterizados. Dos 412 cromossomos β^S genotipados nos sujeitos homozigotos (Hb SS), 57% eram do tipo CAR, 41,5% eram Ben, 0,5% eram Árabe-Indiano e 1% eram atípicos. Nos sujeitos homozigotos, a presença de α-Tal associou-se significativamente com a diminuição dos níveis de VCM, HCM, leucócitos e reticulócitos, e não influenciou os níveis de Hb total, Hb F e plaquetas. Não houve associação significativa entre haplótipos β^S e os níveis médios de Hb total, Hb F, VCM, HCM, leucócitos e reticulócitos. O nível de plaquetas foi significativamente maior no grupo com o genótipo Ben/CAR quando comparado com o Ben/Ben e CAR/CAR. Não houve associação significativa entre a presença de α-Tal e a frequência de episódios de síndrome torácica aguda, transfusões sanguíneas e sequestro esplênico agudo. A presença de α-Tal foi fortemente associada com a diminuição do risco de doença cerebrovascular (Doppler transcraniano alterado ou AVC clínico; P=0,007). Não

houve associação significativa entre os haplótipos β^S e a frequência de episódios de síndrome torácica aguda, transfusões sanguíneas, sequestro esplênico agudo e doença cerebrovascular. **Conclusões:** A associação significativa mais importante encontrada foi a da α-Tal com diminuição do risco de doença cerebrovascular. A presença ou não de α-Tal bem como o haplótipo β^S não permitem prever as características clínicas da doença. Outros fatores moduladores devem ser estudados para definir subfenótipos da doença e, assim, serem utilizados em conjunto como ferramenta clínica no acompanhamento dos pacientes. Ressalte-se que a amostra de crianças proveio de uma única fonte, foi aleatorizada e o acompanhamento seguiu o mesmo protocolo de tratamento num único hemocentro, o que reforça as conclusões do estudo.

Abstract

Objectives: To examine associations between the alpha-thalassemia (α-Thal) genotypes and the β^S gene cluster haplotypes (β^S haplotypes) with clinical and hematological features in a population of children derived from the Newborn Screening Program of Minas Gerais (NSP-MG) and followed-up at the Blood Center of Belo Horizonte (HBH) of HEMOMINAS Foundation. **Methods:** children with electrophoretic profile compatible with sickle cell anemia (SS or $S\beta^0$-thalassemia) screened by NSP-MG between 01/01/1999 to 12/31/2006 and followed-up at HBH were included in a randomized retrospective cohort study. Data were collected from patients' medical records at HBH. All patients were followed-up for a minimum of two years and a half, up to 6/30/2009. Genotyping of α-Thal was performed by multiplex PCR (alleles: $-\alpha^{3.7}$; $-\alpha^{4.2}$; $--^{SEA}$; $--^{FIL}$; $--^{MED}$; $-(\alpha)^{20.5}$ e $--^{THAI}$). β^S haplotypes were determined by PCR-RFLP. **Results:** 221 children were analyzed, 119 (53.8%) females and 102 (46.2%) males. The age ranged from 2.5 to 10.4 years. Two hundred and eight (94.1%) were homozygous for the β^S allele and 13 (5,9%) were $S\beta^0$-thal. Of the 208 SS subjects, 58 (27.9%) were heterozygous ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) and three (1.4%) homozygous for α-Thal ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$). Of the 13 $S\beta^0$-thal subjects, five (38.5%) were heterozygous ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$). Among the 208 SS subjects, 82 (39.43%) were CAR/CAR, 69 (33.17%) Ben/CAR, 49 (23.56%) Ben/Ben, two (0.96%) CAR/Atp, two (0.96%) Ben/Atp, two (0.96%) Arab-Indian/Ben and two (0.96%) could not be genotyped. Of 412 β^S chromosomes genotyped in homozygous subjects for S hemoglobin (SS), 57% were CAR type, 41.5% were Ben, 0.5% were Arab-Indian e 1% were atypical. In homozygous subjects for S hemoglobin, the presence of α-Thal was significantly associated with decreased levels of MCV, MCH, WBC and reticulocytes, and not with the levels of total Hb, Hb F and platelets. There was no significant association between β^S haplotypes and total Hb, Hb F, MCV, MCH, WBC and reticulocyte levels. Platelet count was significantly higher in the group with Ben/CAR genotype when compared with the Ben/Ben and CAR/CAR. There was no significant association between the presence of α-Thal and the frequency of episodes of acute chest syndrome, blood transfusions and acute splenic sequestration. The presence of α-Thal was strongly associated with decreased risk of cerebrovascular disease (abnormal transcranial Doppler or clinical stroke; P=0.007). There was no significant association between β^S haplotypes and the frequency of episodes of acute

chest syndrome, blood transfusions, acute splenic sequestration and cerebrovascular disease. **Conclusions:** The most important significant association found was between co-inheritance of α-Thal and decreased risk of cerebrovascular disease. Neither the presence/absence of α-Thal nor β^S haplotypes can alone predict the clinical course of the disease. Other modulating factors should be investigated to subphenotype the disease and thus be used together as a clinical tool in monitoring patients. It should be noted that the sample of children has come from a single source and was randomized; follow-up was uniform and done in a single blood center, what reinforces the conclusions of the study.

Sumário

Resumo **xi**

Abstract **xiii**

Lista de abreviaturas e siglas **xviii**

Lista de tabelas **xxii**

Lista de figuras **xxiv**

1. APRESENTAÇÃO.....26

2. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....27

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....29

3.1 Hemoglobinopatias.....29

3.2 Doença Falciforme: aspectos conceituais e moleculares.....31

3.3 A Anemia Falciforme no Brasil.....33

3.4 Princípios moleculares dos processos de falcização, vaso-oclusão e inflamação na Anemia Falciforme.....37

3.5 Manifestações clínicas e laboratoriais.....40

3.51 Eventos clínicos agudos mais relevantes na infância.....42

3.511 Crises vaso-oclusivas ou crises de dor.....42

3.512 Síndrome Torácica Aguda.....42

3.513 Sequestro Esplênico Agudo.....43

3.514 Acidente Vascular Cerebral.....45

3.515 Crise Aplástica.....47

3.516 Infecções.....48

3.6 Mortalidade, expectativa de vida e medidas de redução da morbidade e mortalidade.....49

3.7 Interferentes genéticos na diversidade fenotípica da Anemia Falciforme.....51

3.71 Haplótipos do agrupamento de genes da beta-globina.....53

3.711 Origem, distribuição geográfica e caracterização dos haplótipos β^S 53

3.712 Relação entre os haplótipos β^S e a diversidade fenotípica da anemia falciforme.....57

3.713 Os haplótipos β^S no Brasil.....59

3.714 Haplótipos β^S no restante do mundo.....66

3.72 A Talassemia Alfa.....82

3.721 A co-herança de Talassemia Alfa na Anemia Falciforme.....86

3.722 A Talassemia Alfa associada à Anemia Falciforme no Brasil.....93

4. OBJETIVOS.....96

4.1 Objetivo Geral.....96

4.2 Objetivos Específicos.....96

5. MATERIAIS E MÉTODOS.....97

5.1 Desenho e local de realização do estudo.....97

5.2 Caracterização da população estudada e metodologia de seleção.....97

5.3 Extração e quantificação do DNA genômico.....100

5.4 Genotipagem do alelo β^S.....101

5.5 Diagnóstico Molecular da Talassemia Alfa.....103

5.6 Genotipagem dos haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina.....106

5.7 Doppler transcraniano.....110

5.8 Variáveis hematológicas.....111

5.9 Variáveis clínica.....113

5.10 Análise estatística.....114

5.11 Aspectos éticos.....116

5.12 Financiamento.....116

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....114

7. ARTIGO 1.....129

8. ARTIGO 2.....147

9. CONCLUSÕES.....165

10. ANEXOS.....166

11. APÊNDICES.....169

Lista de abreviaturas e siglas

α – alfa

α-Tal – talassemia alfa

β – beta

γ – gama

δ – delta

ε – épsilon

ζ – zeta

μl – microlitros

μM – micromolar

^{o}C – Graus Celsius

A – Adenina

ACI - Artéria Carótida Interna

ACM – Artéria Cerebral Média

AVC - Acidente Vascular Cerebral

Ben – Benin

BH - Belo Horizonte

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

C - Citosina

Ca^{++} - Íons de cálcio

Cam – Camarões

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAR - *Central African Republic* - República Central Africana

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

cm/s – centímetros por segundo

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

DCV - Doença cerebrovascular

DNA - *Desoxirribonucleic acid* - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - *deoxynucleotide triphosphate* - desorribonuleotídeo trifosfatado

DRS - Diretoria regional de saúde

DTC – Doppler transcraniano cerebral

EDTA - *EthyleneDiamineTetrAcetic acid* - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA - Estados Unidos da América

FCP - *F-cell production* – Produção de células F

fL – fentolitros

FS - Padrão eletroforético com hemoglobinas fetal e S

FSA - Padrão eletroforético com hemoglobinas fetal, S e A

FSC - Padrão eletroforético com hemoglobinas fetal, S e C

G – Guanina

g - gramas

g/dL - gramas por decilitro

Glu – Ácido glutâmico

Haplótipos β^S - Haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina

Hb - Hemoglobina

Hb A – Hemoglobina A

Hb AA - Genótipo homozigoto para hemoglobina A

Hb A_2 - Hemoglobina A_2

Hb AS - Traço falcêmico ou traço falciforme

Hb C - Hemoglobina C

Hb D - Hemoglobina D

Hb F - Hemoglobina Fetal

Hb H – Hemoglobina H

Hb S - Hemoglobina S

Hb SS – Genótipo homozigoto para hemoglobina S

HBH - Hemocentro de Belo Horizonte

HCl – Ácido Clorídrico

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HEMOBA – Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia

HEMOMINAS - Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais

HEMOPE - Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco

HEMORIO - Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* -
Cromatografia Líquida de Alta Resolução
HU - Hidroxiureia
IGF- *Insulin-like Growth Factor*
IGFBP - *Insulin-like Growth Factor Binding Protein*
IC - Intervalo de confiança
IEF - *Isoelectric focusing* - Eletroforese por Focalização Isoelétrica
IVS - *intervening sequence* – íntron
K^+ - Íons de potássio
kb – kilobase
KCl - Cloreto de potássio
Km – Quilômetro
LDH - *Lactate dehydrogenase* - desidrogenase lática
LEU - leucometria total
LCR - *Locus control region* – Região controladora do locus
MCH – *mean corpuscular hemoglobin*
MCV – *mean corpuscular volume*
MG - Minas Gerais
$MgCl_2$ – Cloreto de Magnésio
mL – mililitros
mM – milimolar
n - número de amostras
NaCl – Cloreto de Sódio
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
NO – *Nitric Oxide* - Óxido nítrico
NUPAD - Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico
da Faculdade de Medicina da UFMG
OMS - Organização Mundial de Saúde
pb – pares de bases
PCR – *Polymerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da polimerase
pmol - *picomols*
PETN - Programa Estadual de Triagem Neonatal
pg – picogramas
PLAQ – Plaquetometria

Pu – *Purines* - Purinas

Py – *Pyrimidines* - Pirimidinas

Retic – Contagem de reticulócitos

RFLP - *restriction fragment length polymorphism* - polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição

RR – Risco relativo

Sβ^+-talassemia - Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobina S e β^+-talassemia

Sβ^0- talassemia - Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobina S e Sβ^0- talassemia

SC – Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobinas S e C

SD – Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobinas S e D

SDS – *Sodium Dodecylsulphate* – Dodecil Sulfato de Sódio

SEA - Sequestro Esplênico Agudo

Sen – Senegal

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de Base Única

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

STA – Síndrome Torácica Aguda

STOP - *Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia*

T – Timina

TAE - *Tris-acetate-EDTA*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TMO - Transplante de medula óssea

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

U – Unidade

UFC - Universidade Federal do Ceará

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

Val – Valina

VCAM-1 - Moléculas celulares de adesão vascular

VCM - Volume corpuscular médio

VMM - Velocidade média máxima

vs – versus

WBC – *White blood cell*

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Frequência gênica aproximada de algumas hemoglobinopatias, classificadas por regiões da OMS.....31

Tabela 2 - Incidência dos fenótipos da doença falciforme, segundo o Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG), em um milhão de crianças triadas no período de 1998 a 2002.....35

Tabela 3 - Principais alterações moleculares das hemácias em consequência do fenômeno de falcização.....39

Tabela 4 - Características laboratoriais da anemia falciforme.....41

Tabela 5 - Manifestações clínicas da doença falciforme de acordo com o principal componente fisiopatológico.....41

Tabela 6 - Características gerais encontradas nos haplótipos clássicos da anemia falciforme.58

Tabela 7- Sinopse dos principais estudos envolvendo os haplótipos β^S abordados na revisão de literatura.....80

Tabela 8 – Genótipos de α-Tal: nomenclatura, números de genes alfa e proporção de produção de cadeias alfa.....85

Tabela 9 - Efeito da α-Tal em alguns índices hematológicos da anemia falciforme.....88

Tabela 10 - Efeitos da α-Tal em propriedades reológicas das hemácias.....89

Tabela 11 - Efeito da α-Tal nos eventos clínicos agudos da anemia falciforme.....91

Tabela 12 - Efeito da α-Tal em outros eventos clínicos da anemia falciforme.....92

Tabela 13 - Sequência dos oligonucleotídeos sintéticos para cada tipo de deleção da α-Tal, respectivas concentrações utilizadas nas reações de PCR e tamanho esperado dos produtos da amplificação.....105

Tabela 14 - Direção, posição e sequência dos iniciadores para determinação dos haplótipos do gene da β^S-globina.....106

Tabela 15 - Características dos RFLPs para genotipagem dos haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina.....109

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da mutação gênica responsável pela Hb S.....32

Figura 2 - Incidência da anemia falciforme (Hb SS)(*) em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde. Programa Estadual de Triagem Neonatal - Minas Gerais - 1998/2001...36

Figura 3 - Incidência do traço falciforme (Hb AS) em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde. Programa Estadual de Triagem Neonatal - Minas Gerais - 1998/2001...36

Figura 4 - Incidência da doença falciforme(*) em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde – DRS. Programa Estadual de Triagem Neonatal - Minas Gerais - 1998/2001.....37

Figura 5 - Curva de probabilidade de ocorrência do primeiro episódio de SEA, conforme tempo de exposição de cada criança em uma população de crianças triadas pelo PETN-MG e acompanhadas no HBH (Método de Kaplan-Meier).....44

Figura 6 - Curvas de sobrevida, por tipo de hemoglobinopatia, das 1396 crianças com doença falciforme, diagnosticadas pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais entre março de 1998 e fevereiro de 2005 (método de Kaplan-Meier).....50

Figura 7 - Representação esquemática da influência dos haplótipos β^S e dos genótipos de α-Tal na gravidade clínica da anemia falciforme.....53

Figura 8 - Região de origem e abrangência dos três principais haplótipos β^S africanos e um asiático.....55

Figura 9 - *Crossing-over* desigual entre os dois cromossomos 16 dando origem a α^+-talassemia.....83

Figura 10 - Subfenótipos da anemia falciforme.....93

Figura 11 - Fluxograma da seleção amostral na população estudada.....99

Figura 12 - Ilustração do agrupamento de genes da globina alfa, extensão das deleções e posição dos oligonucleotídeos sintéticos.....104

Figura 13 - Principais haplótipos do agrupamento de genes da globina beta definidos pelo padrão de atividade das enzimas de restrição Xmn I, Hind III, Hinc II e Hinf I nos seis fragmentos amplificados localizados em 5'$^{G}\gamma$, $^{G}\gamma$,$^{A}\gamma$, ψβ, 3'ψβ e 5'β.....108

1. APRESENTAÇÃO

Esta dissertação representa o produto final de um trabalho desenvolvido pelo programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, da faculdade de medicina da UFMG e com a parceria da Fundação HEMOMINAS. Inicialmente, será apresentada uma introdução e as justificativas da execução do projeto, seguida de uma revisão de literatura completa que incluiu trabalhos publicados em diversas regiões do mundo. A seção seguinte descreve detalhadamente a metodologia utilizada no desenvolvimento do estudo. Posteriormente, foram apresentados dois artigos científicos que contêm os resultados obtidos no trabalho, sendo que o primeiro foi publicado no volume 124 do periódico *Acta Haematologica* e o segundo no volume 34 do periódico *Hemoglobin*. Finalizando, uma conclusão breve, sintetizando os principais achados do estudo.

2. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Serviço de Pesquisa da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (HEMOMINAS) propõe-se a realizar pesquisas que possam aprimorar a qualidade do atendimento aos pacientes e doadores da Fundação, visando à aplicação de seus resultados na abordagem de doenças genéticas ou na segurança transfusional.

Os ambulatórios da Fundação HEMOMINAS são referência no estado quanto ao atendimento dos pacientes nas áreas das coagulopatias (hemofilias, doença de von Willebrand, dentre outras) e hemoglobinopatias (doenças falciformes, talassemias, dentre outras). Estão cadastrados nos ambulatórios aproximadamente 6.000 pacientes com hemoglobinopatias cujo atendimento por médicos, enfermeiros, psicólogos, assistentes sociais, dentistas, dentre outros, garante uma abordagem multidisciplinar a pacientes portadores de uma enfermidade complexa.

O presente trabalho reflete o compromisso das atividades de pesquisa da Fundação HEMOMINAS em contribuir diretamente com a melhoria da qualidade de atenção à saúde, levando a uma resolubilidade maior, satisfação do usuário e legitimação da política de saúde no estado.

Ao mesmo tempo, Minas Gerais (MG) é um estado modelo no Brasil em relação ao diagnóstico precoce das doenças falciformes, com a introdução do Programa de Triagem Neonatal do Estado de Minas Gerais (PETN-MG) em março de 1998. Este programa é coordenado pelo Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD, Faculdade de Medicina da UFMG) que encaminha os recém-nascidos diagnosticados com doença falciforme para acompanhamento multidisciplinar na Fundação HEMOMINAS. Ao final de 2009, aproximadamente 3.500 crianças com doença falciforme que foram triadas pelo PETN-MG estão cadastradas nos ambulatórios da rede HEMOMINAS.

A anemia falciforme, uma doença hereditária causada por uma única mutação no gene da β-globina, produz uma diversidade de expressões fenotípicas nos pacientes acometidos (Serjeant, 1992).

As cadeias de alterações que ligam o defeito molecular às manifestações clínicas nos pacientes com anemia falciforme devem ser consideradas em três níveis: moléculas e células; tecidos e órgãos; e o organismo completo. Cada um desses níveis implica em vias preferenciais e numerosos fatores condicionantes que podem intensificar ou diminuir os efeitos, gerando essa impressionante variabilidade clínica observada. Os principais fatores que podem influenciar o fenótipo da anemia falciforme são:

1. fatores genéticos que podem influenciar no processo de polimerização da hemoglobina S (Hb S), no fenômeno da falcização e na hemólise;
2. outros fatores genéticos que podem alterar a resposta individual à doença, a suas complicações ou ao tratamento;
3. fatores ambientais como o local onde vive o paciente, prevalência de doenças infectocontagiosas, condições socioeconômicas e acesso e qualidade da assistência médica (Zago e Pinto, 2007).

A maior parte das diferenças clínicas e hematológicas entre os pacientes com anemia falciforme deve-se a variabilidade genética relacionada a genes (que podem estar ligados, ou não, ao gene da β-globina) que são capazes de modificar a expressão da doença. Entre os fatores genéticos que explicam a variabilidade da expressão clínica da anemia falciforme estão a co-herança de α-Talassemia (α-Tal) e os haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina (Haplótipos β^S) (Nagel, 2005; Steinberg, 2005; Steinberg, 2009). Estes dois fatores serão analisados no presente estudo.

A relação entre a interação de α-Tal e os aspectos clínicos e hematológicos de pacientes portadores da anemia falciforme é uma área ainda inexplorada no estado de MG e pouco documentada no Brasil.

Alguns estudos populacionais sobre os haplótipos β^S em pacientes com anemia falciforme foram realizados no Brasil nos últimos anos. Cada região geográfica estudada apresenta características próprias quanto à frequência dos diferentes haplótipos, refletindo a origem do fluxo de escravos africanos recebidos na época do Brasil colônia. A relação entre os haplótipos β^S e os aspectos clínicos e hematológicos

de pacientes com anemia falciforme é uma área ainda inexplorada em MG. Alguns estudos relacionaram esses haplótipos com o quadro clínico da doença, existindo muitas controvérsias entre eles. A maioria desses estudos foi desenvolvida na Jamaica e nos Estados Unidos, onde o haplótipo Benin é muito mais frequente do que o haplótipo CAR, tornando inadequadas comparações entre eles. Estudos realizados em São Paulo (Zago et al., 1992; Goncalves et al., 1994; Figueiredo et al., 1996; Lyra et al., 2005) e no Rio de Janeiro (Fleury, 2007) mostraram uma grande prevalência de indivíduos homozigotos para o haplótipo CAR e Benin no sudeste brasileiro, o que propicia uma análise mais adequada e faz de MG um potencial candidato para realização de estudos dessa natureza.

O estudo dos haplótipos β^S e a investigação dos genótipos de α-Tal poderão ser utilizados como marcadores prognósticos da doença em associação com outras características clínicas e hematológicas. Adicionalmente, o presente estudo pretende constituir-se em fonte pioneira de dados referentes à frequência dos haplótipos β^S e prevalência de α-Tal em pacientes com anemia falciforme em MG, podendo ser úteis no estudo de populações, origem e evolução humana.

A identificação de determinantes da gravidade do quadro clínico da anemia falciforme pode contribuir, ainda, para um manejo adequado e diferenciado da doença, e consequentemente, para melhor qualidade de vida e aumento da sobrevida dos pacientes acometidos por essa doença.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Hemoglobinopatias

A hemoglobina humana é uma molécula tetramérica, tendo como átomo central um íon ferro num complexo denominado heme, e dois pares de subunidades polipeptídicas idênticas, cada par codificado por um gene diferente. O agrupamento de genes da globina alfa (ζ, α_1 e α_2) está localizado no cromossomo 16, e o agrupamento de genes da globina beta (ε, $^{G}\gamma$, $^{A}\gamma$, δ e β) está localizado no cromossomo 11. Curiosamente, os genes estão presentes, em ambos os cromossomos, na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento humano. Durante a vida fetal, o tipo predominante de hemoglobina é a hemoglobina Fetal (Hb F-$\alpha_2\gamma_2$). Durante o período pós-natal, a Hb F é gradualmente substituída pela hemoglobina A (HbA-$\alpha_2\beta_2$). A hemoglobina A_2 ($\alpha_2\delta_2$) é um tipo minoritário de hemoglobina adulta, que representa menos de 2,5% da hemoglobina circulante em indivíduos normais (Frenette e Atweh, 2007).

Os distúrbios das hemoglobinas humanas, ou hemoglobinopatias, são um grupo heterogêneo de doenças geneticamente determinadas, de ampla distribuição e que apresentam morbidade significativa em todo o mundo (Weatherall e Clegg, 1999). Estima-se que aproximadamente 7% da população mundial são portadores de doenças desse tipo e que 500.000 bebês com formas mais graves destas doenças nascem a cada ano. Apesar desses distúrbios ocorrerem em maior frequência nas regiões tropicais, devido às migrações eles são encontradas na maioria dos países (Weatherall e Clegg, 2001; Weatherall, 2008). A Tabela 1 mostra a frequência gênica aproximada de algumas hemoglobinopatias, classificadas por regiões da Organização Mundial de Saúde (OMS). As informações nela contida devem ser interpretadas com reserva, pois grande parte dos dados foi obtida a partir de estudos pontuais que foram extrapolados para grandes populações (Weatherall, 2008).

As hemoglobinopatias podem ser divididas, fundamentalmente, em dois grandes grupos: 1) hemoglobinopatias estruturais, em que a alteração na estrutura da hemoglobina se dá pela substituição, inserção ou deleção de um ou mais aminoácidos em uma ou em ambas as cadeias polipeptídicas; e 2) as hemoglobinopatias por deficiências de síntese ou talassemias, em que ocorre o desequilíbrio na quantidade de cadeias produzidas, principalmente α ou β (Wenning et al., 2000; Weatherall e Clegg, 2001). As hemoglobinopatias são responsáveis pela maioria das doenças genéticas letais (Modell e Bulyzhenkov, 1988).

Tabela 1 - Frequência gênica aproximada de algumas hemoglobinopatias, classificadas por regiões da OMS

Regiões de OMS	Hb S	Hb C	Hb E	β-Tal	α^0-Tal	α^+-Tal
África Subsaariana	1-38	0-21	0	0-12	0	10-50
Américas	1-20	0-10	0-20	0-3	0-5	0-40
Mediterrâneo Oriental	0-60	0-3	0-2	2-18	0-2	1-60
Europa	0-30	0-5	0-20	0-19	1-2	0-12
Sudeste Asiático	0-40	0	0-70	0-11	1-30	3-40
Pacífico Ocidental	0	0	0	0-13	0	2-60

Fonte: Weatherall, 2008

3.2 Doença Falciforme: aspectos conceituais e moleculares

As doenças falciformes constituem um conjunto de desordens genéticas autossômicas recessivas, caracterizadas pela presença de, pelo menos, um alelo mutante β^S e o fenótipo com a concentração de Hb S superior a 50% (Ashley-Koch et al., 2000; Naoum, 2000; Stuart e Nagel, 2004). Os genótipos da doença falciforme mais comuns em nosso meio são: Hb SS, Hb SC, Hb $S\beta^+$-tal, Hb $S\beta^0$-tal e Hb SD_{Punjab} (Januario, 2002).

Nesse grupo destaca-se a anemia falciforme, geneticamente determinada pela homozigose do gene da hemoglobina S (Hb SS). Este genótipo apresenta maior gravidade clínica e hematológica, e maior morbidade e mortalidade (Naoum, 2000; Frenette e Atweh, 2007). A causa dessa doença é uma mutação de ponto no gene da β-globina, com padrão de herança autossômico recessivo, determinando uma hemoglobina anormal, denominada Hb S, ao invés da hemoglobina normal, a Hb A. Essa mutação causa a modificação de um nucleotídeo no sexto códon do gene da β-globina e assim, a substituição do aminoácido ácido glutâmico por uma valina (Figura 1) (Guasch et al., 1999; Adorno et al., 2005; Silva et al., 2006; Frenette e Atweh, 2007). Os indivíduos portadores do traço falciforme (heterozigotos AS) apresentam em um cromossomo o alelo β normal e no outro o alelo mutante β^S, produzindo, fundamentalmente, uma

mistura de Hb A e Hb S (Hb AS). Esses indivíduos são assintomáticos, não sendo classificado como doença (Ashley-Koch et al., 2000).

Cromossomo 11 normal

6^0 códon gene globina beta → GAG → Ác. Glu → Proteína (Hb A)

Cromossomo 11 mutante

6^0 códon gene globina beta → GTG → Val → Proteína (Hb S)

Figura 1 – Representação esquemática da mutação gênica responsável pela Hb S

Quando um alelo β^S coexiste com um alelo causador de β-Talassemia (β-Tal – diversos alelos mutantes do gene da β-globina que resultam na não transcrição de mRNA para produção de cadeias beta ou na transcrição de níveis significativamente diminuídos), a gravidade da doença falciforme depende do tipo de mutação que causa a β-Tal (Steinberg, 2008). Quando o alelo β-talassêmico coexistente causa a completa inativação do gene β, a doença falciforme resultante é conhecida como $S\beta^0$-Talassemia ($S\beta^0$-Tal) e a gravidade clínica tente a ser semelhante à da anemia falciforme (Hb SS) (Serjeant et al., 1979). Entretanto, quando o alelo β-talassêmico coexistente causa a diminuição da transcrição do gene β, a doença falciforme resultante é conhecida como $S\beta^+$-Talassemia ($S\beta^+$-Tal), caracterizada por um amplo espectro de gravidade clínica que depende do nível de comprometimento da produção de cadeias beta (Serjeant et al., 1973).

O ácido glutâmico é um aminoácido que tem sua cadeia lateral carregada negativamente, com ponto isoelétrico de 2,77. A valina tem o ponto isoelétrico de 5,97, sendo assim classificada como um aminoácido neutro. Essa troca de aminoácidos envolvendo a saída de um aminoácido com carga negativa e a entrada de outro neutro resulta na perda de cargas negativas da Hb S em relação à Hb A, fato que modifica uma série de propriedades físico-químicas da hemoglobina, levando a todas as alterações presentes na doença, inclusive a mobilidade eletroforética mais lenta da Hb S, facilitando o diagnóstico (Naoum, 2000).

Estudos genéticos e arqueológicos indicam que o alelo β^S mutante é evolutivamente recente, com estimativas de que a mutação ocorreu pela primeira vez entre 3.000 a 10.000 anos atrás (Flint et al., 1993; Currat et al., 2002). Sabe-se que o alelo β^S confere uma vantagem seletiva aos portadores do traço falciforme, protegendo-os contra a malária. Esta pressão seletiva levou à persistência do alelo β^S em regiões endêmicas para a malária (Aidoo et al., 2002; Feng et al., 2004) e o aumento rápido da sua frequência ao longo de várias gerações (Hanchard et al., 2007). Esta proteção faz do agrupamento de genes da β-globina uma área apropriada para se estudarem as assinaturas genéticas da seleção natural e a origem e dispersão de populações humanas (Crawford et al., 2002).

3.3 A Anemia Falciforme no Brasil

O alelo β^S nunca foi encontrado em populações ameríndias, embora mais de 3.000 indivíduos tenham sido testados. A presença deste alelo no continente americano é o resultado do fluxo gênico originário da África durante 400 anos de tráfico de escravos (Rogers et al., 1989). Com isso, as frequências do alelo β^S são proporcionais à intensidade relativa do fluxo migratório africano e ao grau de miscigenação das populações africanas com outras populações. Essa distribuição é desigual nas Américas do Norte, Sul e Central e nas ilhas caribenhas. O tráfico de escravos para o Brasil durou cerca de três séculos e teve como principal motivação a necessidade de mão de obra gratuita para a lavoura, mineração e afazeres domésticos. A contribuição do alelo β^S trazido diretamente por imigrantes europeus (portugueses e italianos do sul) é insignificante (Zago et al., 1992).

A anemia falciforme é a doença hereditária monogênica mais comum do Brasil, ocorrendo, predominantemente, mas não exclusivamente, em afro-descendentes (Di Nuzzo e Fonseca, 2004; Cançado e Jesus, 2007). O Ministério da Saúde estima a prevalência de 25.000 a 30.000 indivíduos com anemia falciforme no país e a incidência de 3.500 novos casos a cada ano (o nascimento de uma criança com anemia falciforme

para cada 1.000 recém-nascidos vivos). Com relação ao traço falciforme, estima-se a prevalência de 7.200.000 casos, sendo 4% (2% a 8%) na população geral e 6% a 10% entre afro-descendentes. Estima-se a incidência de 200.000 novos portadores do traço a cada ano (Cançado e Jesus, 2007).

A distribuição do alelo β^S no Brasil é bastante heterogênea. A prevalência de heterozigotos (Hb AS) é maior nas regiões norte e nordeste (6% a 10%), enquanto nas regiões sul e sudeste a prevalência é menor (2% a 3%) (Silva e Shimauti, 2006; Cançado e Jesus, 2007).

Estudos pontuais em diversas regiões do Brasil têm demonstrado essa distribuição heterogênea. No estado da Bahia, em populações do Recôncavo Baiano, a prevalência de portadores do traço falciforme (Hb AS) foi de 10,5% e de homozigotos (Hb SS) 1,24% (Silva et al., 2006), sendo que na cidade de Salvador a prevalência estimada do traço falciforme foi 9,8%, enquanto da anemia falciforme foi 0,2% (Adorno et al., 2005). No Distrito Federal, a prevalência do traço falciforme em recém-nascidos foi de 3,23% e da anemia falciforme 0,09% (Diniz et al., 2009). Na cidade de Natal, Rio Grande do Norte, a prevalência do traço falciforme em recém-nascidos foi de 1,5% e da anemia falciforme 0,05% (Araújo et al., 2004). Na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, em um estudo piloto para triagem neonatal de hemoglobinopatias, foi encontrado a frequência de 1,2% para portadores do gene β^S, entre heterozigotos e homozigotos (Daudt et al., 2002). Em outro estudo, envolvendo o estado do Rio Grande do Sul como um todo, a prevalência do traço falciforme foi 1,14% (Sommer et al., 2006). No estado do Paraná, a prevalência do traço falciforme em recém-nascidos foi de 1,52%, enquanto para anemia falciforme e $S\beta^0$-tal foi de 2,2 e 2,7 a cada 100 mil nascidos vivos, respectivamente (Watanabe et al., 2008). No estado de São Paulo, na cidade de Campinas, o programa de triagem neonatal encontrou a frequência de 1,98% de portadores do traço falciforme e 0,01% para anemia falciforme (Brandelise et al., 2004). As diferentes prevalências desta hemoglobinopatia, nas diferentes regiões, reflete a diversidade de origens raciais e os variados graus de miscigenação presentes no Brasil (Sommer et al., 2006).

A Tabela 2 mostra a incidência da anemia falciforme, bem como de outros fenótipos da doença falciforme, no estado de MG. Estima-se o nascimento de uma

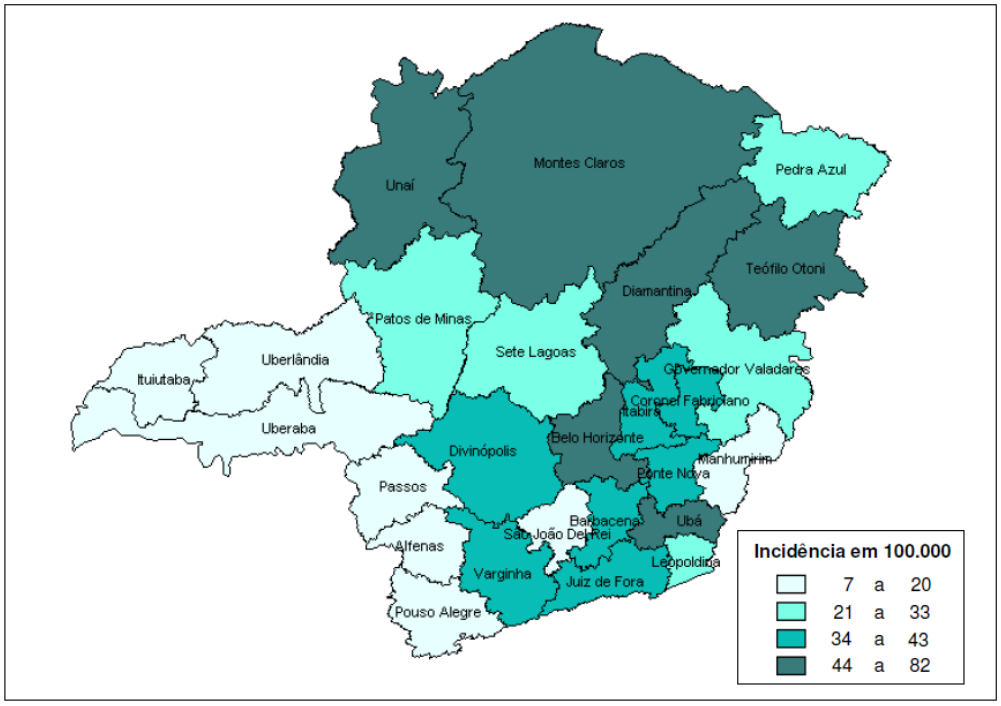
criança com anemia falciforme para cada 2.500 recém-nascidos vivos no estado de MG (Januario, 2002).

As figuras 2, 3 e 4 ilustram a incidência da anemia falciforme, traço falciforme e doença falciforme, respectivamente, em nascidos vivos no estado de MG no período de 1998 até 2001, de acordo com as diretorias regionais de saúde (DRS). Notar que a DRS de Belo Horizonte está inserida no grupo que possui os níveis de maior incidência da doença falciforme em MG.

Tabela 2 - Incidência dos fenótipos da doença falciforme, segundo o Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG), em um milhão de crianças triadas no período de 1998 a 2002

Fenótipos (IEF)	Interpretação	Número de nascidos vivos	Ocorrências			Observações
			%	Proporção	Em 100 mil	
FS	Anemia Falciforme	411	0,039	1:2.581	39	Inclui S/ß^{o}tal
FSC	Doença da Hb SC	316	0,030	1:3.357	30	
FSD_{Punjab}	Doença Hb SD_{Punjab}	2	-	-	-	Confirmado por PCR
FSA	Interação S/ß$^{+}$tal	35	0,003	1:30.307	3	Inclui SFA, SAF
FS + FSC + FSD_P + FSA	Doença Falciforme	(764)	0,072	1:1.383	72	
Total de crianças triadas		1.060.757				

IEF: Focalização Isoelétrica (*Isoelectrofocusing*)
FS: homozigotos SS
FSC: duplo heterozigoto SC
FSA: heterozigoto AS
Fonte: Januario, 2002



(*) Inclui S/β⁰ talassemia

Figura 2 - Incidência da anemia falciforme (Hb SS)(*) em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde. Programa Estadual de Triagem Neonatal - Minas Gerais - 1998/2001

Fonte: Januario, 2002

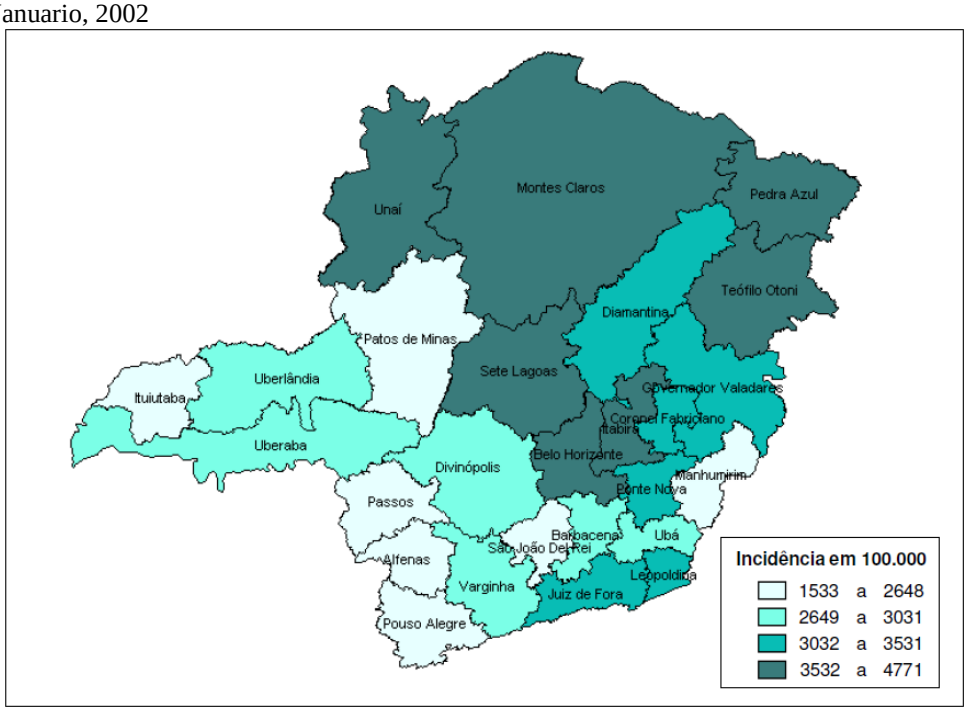
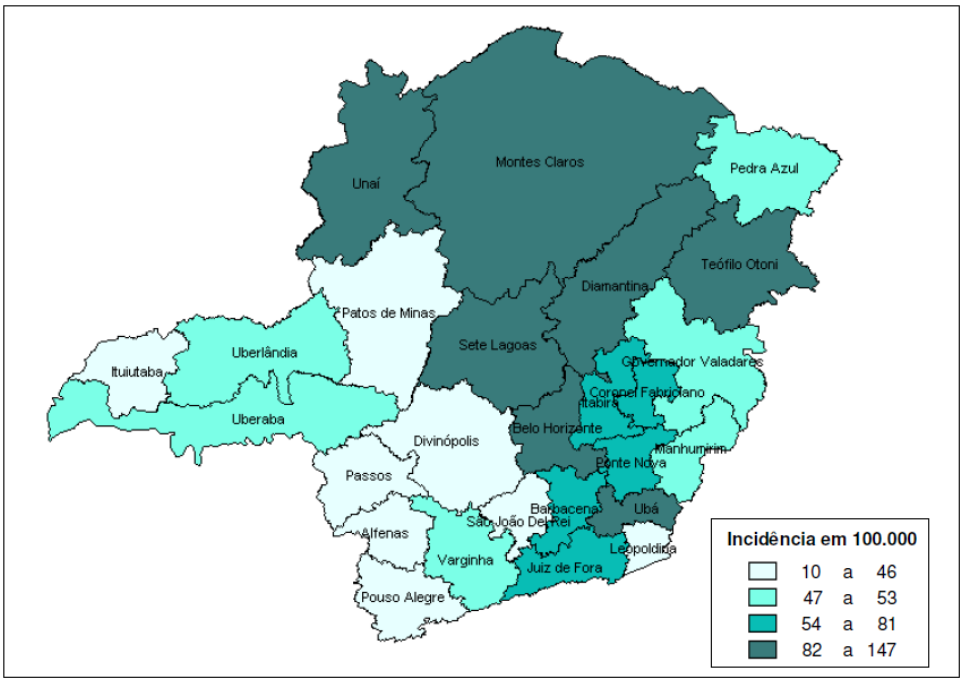


Figura 3 - Incidência do traço falciforme (Hb AS) em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde. Programa Estadual de Triagem Neonatal - Minas Gerais - 1998/2001

Fonte: Januario, 2002



(*) Inclui fenótipos: Hb SS, Hb SC, Hb S/β^0 tal, Hb S/β^+ tal, Hb S/D_{Punjab}

Figura 4 - Incidência da doença falciforme(*) em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde. Programa Estadual de Triagem Neonatal - Minas Gerais - 1998/2001

Fonte: Januario, 2002

3.4 Princípios moleculares dos processos de falcização, vaso-oclusão e inflamação na Anemia Falciforme

Em determinadas situações como hipóxia, desidratação e acidose, as moléculas de Hb S formam polímeros alongados que modificam o citoesqueleto das hemácias, dando origem à forma característica de foice (falcização) (Stuart e Nagel, 2004; Silva e Shimauti, 2006; Frenette e Atweh, 2007). A Hb S desoxigenada promove a formação de pontes de hidrogênio entre os aminoácidos valina da posição número 1 da globina β^S, que é normalmente sintetizada para esta posição, e a valina mutante que substituiu o ácido glutâmico na posição 6 da mesma globina. A formação dessas pontes de hidrogênio modifica a estrutura espacial da molécula de Hb S e promove contatos

intermoleculares com outros aminoácidos da globina β^S que participam da formação do tetrâmero. Os principais aminoácidos envolvidos são a fenilalanina da posição 85 e a leucina da posição 88. Como consequência, formam-se agregados desses filamentos que se polimerizam e alteram a estrutura globular das moléculas de Hb S, modificando também a morfologia discóide da hemácia para diversos formatos, dos quais o mais conhecida é o de foice (Naoum, 2000).

A polimerização da Hb S desoxigenada é o evento primário, indispensável para a patogênese molecular da doença falciforme. Esse evento depende da concentração intraeritrocitária de Hb S, do grau de desoxigenação da célula, do pH e da concentração intracelular de Hb F (Stuart e Nagel, 2004). É necessário que as hemácias sofram um retardo na circulação, criando as condições que facilitem a falcização, como comumente ocorre no baço. A oclusão de vasos esplênicos leva a repetidos infartos que resultam em fibrose e destruição do órgão na maioria dos pacientes (Zago e Pinto, 2007).

A formação de polímeros de Hb S no citoplasma tem como consequência múltiplas alterações na hemácia (Tabela 3) (Zago e Pinto, 2007).

As modificações na membrana plasmática: a) aumentam a adesão das hemácias ao endotélio, desencadeando fenômenos inflamatórios; b) enrijecem a membrana e toda a hemácia, encurtando sua sobrevida em circulação; c) provocam lesões microvasculares; d) causam depleção de óxido nítrico (NO), o que contribui para vasocontrição e ativação da inflamação; e) ativam a coagulação. Essas modificações têm consequências que as amplificam, levando às manifestações clínicas (Zago e Pinto, 2007).

A Anemia Falciforme caracteriza-se por manifestações inflamatórias crônicas, sendo que a gênese da maioria das manifestações clínicas liga-se a três mecanismos inter-relacionados: 1) adesão celular ao endotélio vascular; 2) fenômenos inflamatórios crônicos, acentuados por episódios agudos; 3) produção de intermediários inflamatórios, como citocinas e alterações do metabolismo de NO (Zago e Pinto, 2007).

O evento primário crucial para que ocorra a vaso-oclusão é a adesão de hemácias (reticulócitos e poucas células densas deformáveis) ao endotélio vascular e, provavelmente, é o mecanismo primário pelo qual as alterações moleculares que ocorrem nas hemácias são transmitidas aos tecidos, como por exemplo, a obstrução do vaso, com agravamento da falcização e o desencadeamento de fenômenos inflamatórios (Stuart e Nagel, 2004; Zago e Pinto, 2007).

Tabela 3 - Principais alterações moleculares das hemácias em consequência do fenômeno de falcização

Aumento do Ca^{++} intracelular e de membrana
Perda de íons monovalentes, especialmente K^{+}
Perda de água (desidratação celular)
Aumento da densidade dos eritrócitos
Redução da deformabilidade, fragilidade e vesiculação dos eritrócitos
Oxidação da Hb: formação de metemoglobina e superóxidos
Desnaturação da Hb: formação de hemicromos, heme livre e ferro livre
Anormalidades das proteínas de membrana: anquirina, banda 3, espectrina
Exposição de fosfatidil-serina na membrana celular
Aumento da adesão ao endotélio mediada por moléculas plasmáticas, da membrana e do endotélio

Fonte: Zago e Pinto, 2007

As hemácias falcizadas induzem a expressão de mediadores inflamatórios e de coagulação, levando à ativação do endotélio vascular, e podem, também, estimular as células do endotélio diretamente pela adesão. Essa adesão pode causar obstrução e hipóxia local, com agravamento da falcização, desencadeando, ao mesmo tempo, fenômenos inflamatórios. A aderência de leucócitos a células endoteliais com formação de agregados heterocelulares (leucócitos e células falciformes irreversíveis) também contribui para a obstrução, resultando em hipóxia local, aumento da formação de polímeros de Hb S e propagação da oclusão para vascularização adjacente (Stuart e Nagel, 2004). Concomitantemente, ocorrem alterações de coagulação, além da mobilização de células inflamatórias agudas (granulócitos) e crônicas (monócitos). Ativados, os neutrófilos aderem a hemácias discóides e falcizadas da circulação, levando a episódios transitórios de oclusões vasculares (Frenette e Atweh, 2007; Zago e Pinto, 2007).

A presença de leucócitos aderente em pequenas vênulas pós-capilares é um fator que contribui para a vaso-oclusão. Os leucócitos são células grandes, relativamente

rígidas, e que não são facilmente deformados. Essas propriedades físicas fazem com que os leucócitos tenham, em relação às hemácias, falcizadas ou não, um potencial maior para promover a obstrução vascular e redução do fluxo sanguíneo. Estudos recentes sugerem que a maioria das interações entre hemácias e leucócitos *in vivo* é mediada por neutrófilos aderentes (Stuart e Nagel, 2004). Como a adesão de leucócitos desempenha um papel chave na vaso-oclusão, eles se tornam um alvo terapêutico para esta doença. Estudos demonstraram que contagem elevada de leucócitos apresenta alta correlação com a mortalidade (Platt et al., 1994), síndrome torácica aguda (Castro et al., 1994) e acidente vascular cerebral (Ohene-Frempong et al., 1998).

3.5 Manifestações clínicas e laboratoriais

As manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme variam desde morte precoce na infância a ausência de sintomas com expectativa de vida quase normal (Serjeant, 1992). Por ser uma anomalia da globina beta, os sintomas comumente só surgem após o sexto mês de vida quando a produção da cadeia β variante já é claramente predominante em relação à cadeia γ da Hb F (Naoum, 2000; Thein e Menzel, 2009). A fisiopatologia da anemia falciforme faz com que os pacientes possuam características laboratoriais alteradas e peculiares (Tabela 4).

Os fenômenos vaso-oclusivos e a hemólise crônica são os principais determinantes das manifestações clínicas da anemia falciforme (Tabela 5). Apesar da alteração principal estar restrita às hemácias, trata-se de doença sistêmica cujos efeitos podem incidir sobre qualquer órgão (Reed e Vichinsky, 1998).

As manifestações clínicas mais comuns em crianças são as crises álgicas e a síndrome torácica aguda (STA, incluindo as pneumonias), seguidas da anemia aguda (sequestro esplênico agudo e anemia aplástica aguda), meningite-septicemia e osteomielite (Tarer et al., 2006).

Tabela 4 – Características laboratoriais da anemia falciforme

Hb S = 80 a 100%
Hb Fetal = 0 a 20%
Anemia normocítica e normocrônica (Hb = 5 a 10 g/dl)
Morfologia eritrocitária: -
Células falcizadas – anisocitose
Poiquilocitose – eritroblastos
Células em alvo – esferocitos
Corpos de Howell Jolly
Reticulócitos: aumentados (5 a 30%)
Leucócitos: aumentados durante as crises. Pode ocorrer desvio à esquerda
Plaquetas: aumentadas com formas anormais
Fragilidade osmótica: diminuída
Fragilidade térmica e mecânica: aumentada
Bilirrubina indireta: elevada (≥ 6 mg/dl)
Urobilinogênio urinário: elevado
Urobilinogênio fecal: elevado
Hematuria: frequënte
Ácido úrico sérico: pode estar elevado
Fosfatase alcalina sérica: elevada nas crises
Medula óssea: hiperplasia das células eritróides

Fonte: Naoum, 2000

Tabela 5 - Manifestações clínicas da doença falciforme de acordo com o principal componente fisiopatológico

Complicações da doença falciforme
Hemólise crônica:
Anemia
Litíase biliar
Crise aplástica (parvovírus)
Icterícia
Atraso no crescimento
Vaso-oclusão:
Crises de dor (crise álgica)
Síndrome torácica aguda
Acidente vascular cerebral
Priapismo
Retinopatia
Necrose óssea avascular
Sequestro esplênico
Asplenia funcional
Úlceras nas pernas
Hipostenúria e enurese
Nefropatia crônica

Fonte: Reed e Vichinsky, 1998

3.51 Eventos clínicos agudos mais relevantes na infância

3.511 Crises vaso-oclusivas ou crises de dor

As crises vaso-oclusivas ou crises de dor são caracterizadas por episódios de oclusão microvascular em um ou vários locais, causando dor e inaptidão, acompanhada por uma inflamação local (Stuart e Nagel, 2004). Os episódios são recorrentes, com duração de horas ou dias, podendo chegar a semanas, embora mais comumente tenham de cinco a sete dias de duração (Serjeant, 1992).

A oclusão microvascular origina-se, predominantemente, em áreas localizadas da medula óssea, levando à necrose. Os mediadores inflamatórios ativam fibras nervosas aferentes nociceptivas, evocando a resposta de dor. As áreas afetadas são ossos longos, costelas, esterno, coluna vertebral e pelve, muitas vezes com envolvimento de vários locais simultaneamente (Stuart e Nagel, 2004).

A síndrome mão-pé (dactilite) é caracterizada por um edema doloroso das mãos, pés ou ambos, que afeta crianças menores de três anos. Corresponde a um processo inflamatório complexo, iniciado por necrose da medula óssea nas porções distais dos membros. Por isso, a dor é acompanhada de sinais inflamatórios evidentes, como edema e calor (Zago e Pinto, 2007).

A maioria dos episódios de crise de dor pode ser tratados em casa, com uma combinação de agentes anti-inflamatórios, hidratação oral e analgésicos opióides e não-opióides (Stuart e Nagel, 2004; Brasil, 2006).

3.512 Síndrome Torácica Aguda

A síndrome torácica aguda (STA) é uma causa frequente de hospitalizações e a principal causa de morte em jovens adultos com doença falciforme (Platt et al., 1994).

Trata-se de complicação comum, caracterizada por dor peitoral pleurítica, febre, estertores na ausculta pulmonar e infiltrado pulmonar na radiografia de tórax (Castro et al., 1994).

Em um estudo multicêntrico realizado nos EUA, do qual 30 centros participaram, as causas específicas dos episódios de STA foram identificados em 38% dos pacientes. As infecções foram a principal causa (29%), seguidas da embolia gordurosa (9%) (Vichinsky et al., 2000). As causas das infecções são igualmente distribuídas entre bacteriana, micoplasma, vírus e infecções por clamídia (Stuart e Nagel, 2004). A infecção pelo parvovírus B19 causa necrose na medula e uma forma grave de STA (Lowenthal et al., 1996).

Episódios repetidos de STA podem predispor à doença pulmonar crônica, incluindo a hipertensão pulmonar (Vichinsky et al., 2000). Os fatores de risco incluem o genótipo homozigoto (Hb SS), baixas concentrações de Hb F e níveis basais altos de hemoglobina e leucócitos (Castro et al., 1994).

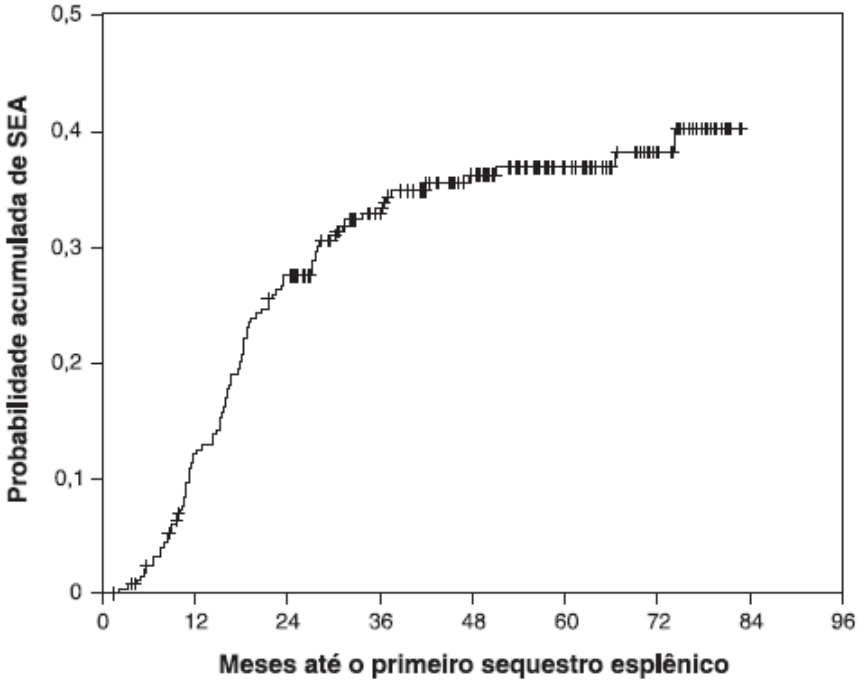
O tratamento da STA consiste na identificação da causa, quando possível, e o uso de antibióticos, mesmo nos casos em que a causa infecciosa não tenha sido identificada. Eritrocitaférese em casos graves e transfusão simples nos casos moderados podem salvar vidas. O tratamento com antibiótico macrolídeo é uma importante ferramenta. Em casos de necrose óssea (além da embolia gordurosa pulmonar), a gordura pode atravessar a microvasculatura pulmonar, ganhando acesso à circulação sistêmica, com disseminação de embolias a vários locais, incluindo o sistema nervoso central. Esta síndrome de falência de múltiplos órgãos é muitas vezes letal e exige eritrocitaférese imediata (Stuart e Nagel, 2004).

3.513 Sequestro Esplênico Agudo

O sequestro esplênico agudo (SEA), classicamente definido como aumento súbito do volume esplênico, associado à queda de pelo menos 2 g/dL na concentração de hemoglobina e reticulocitose (Stuart e Nagel, 2004; Rezende et al., 2009), é resultado do aprisionamento de sangue no baço, em consequência da falcização das hemácias e obstrução do fluxo vascular.

O espectro de gravidade é amplo, com casos raros de aumento agudo do baço acompanhado por colapso circulatório e morte por anemia e choque hipovolêmico (Stuart e Nagel, 2004). As crises de SEA não têm etiologia definida.

Em um estudo de coorte retrospectiva realizado com uma casuística oriunda do mesmo centro de referência dos sujeitos da pesquisa do presente trabalho (HBH), a incidência de SEA foi de 10,2 primeiros episódios por 100 pacientes/ano, com recorrência de 57,3%. Em relação aos fatores clínicos associados, 52,6% dos episódios de SEA apresentaram algum outro diagnóstico clínico associado, sendo 89,6% relacionado a doenças infecciosas. Destacou-se a palpação do baço abaixo do rebordo costal esquerdo durante algum momento da evolução clínica como fator de risco (duas vezes maior que para as crianças sem esplenomegalia). Como fatores de proteção, destacou-se os níveis mais elevados de Hb F e leucometria basal mais baixa.



SEA = sequestro esplênico agudo.

Figura 5 - Curva de probabilidade de ocorrência do primeiro episódio de SEA, conforme o tempo de exposição individual em uma população de crianças triadas pelo PETN-MG e acompanhadas no HBH da Fundação HEMOMINAS (Método de Kaplan-Meier)

Fonte: Rezende et al., 2009

A curva de probabilidade de ocorrência do primeiro episódio de SEA indica a estimativa de que 27,1, 33 e 37% das crianças já teriam sofrido o primeiro episódio

quando atingida a idade de 2, 3 e 5 anos, respectivamente (Figura 5). A letalidade geral dos episódios de SEA foi de 2,9% (Rezende et al., 2009).

O tratamento imediato inclui a correção da hipovolêmica com transfusão (Stuart e Nagel, 2004; Brasil, 2006). Como a taxa de reincidência é alta (cerca de 50%), o acompanhamento clínico é crucial. Para crianças com mais de 2-3 anos, a esplenectomia é recomendada logo após o episódio agudo (Stuart e Nagel, 2004). Todas as mães devem ser educadas para fazer a palpação do baço de seus filhos, bem como reconhecer os sintomas deste evento potencialmente ameaçador à vida. Tais medidas têm reduzido o número de mortes (Stuart e Nagel, 2004; Cançado e Jesus, 2007).

3.514 Acidente Vascular Cerebral

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das complicações mais graves da anemia falciforme, acometendo 11% dos pacientes até 18 anos de idade (Quinn et al., 2004).

Os dois principais mecanismos responsáveis pelo AVC em indivíduos com doença falciforme são: 1) arteriopatia oclusiva em que existe proliferação da camada íntima e aumento dos fibroblastos e das células musculares lisas na parede das artérias, e como consequência, estreitamento segmentar progressivo da porção distal da artéria carótida interna e ramos proximais das principais artérias intracranianas (polígono de Willis); 2) agregação das células falciformes e, consequentemente, oclusão do lúmen de pequenos vasos (Hillery e Panepinto, 2004).

O AVC isquêmico é mais comum nas crianças; nos adultos predomina a hemorragia intracraniana. Também ocorrem ataques isquêmicos transitórios, definidos como eventos isquêmicos cujos sintomas se resolvem em menos de 24 horas de evolução sem sequelas motoras.

O primeiro AVC ocorre mais comumente na primeira fase da infância (1,02 por 100 pacientes/anos em crianças de 2 a 5 anos). Há diminuição da incidência em pacientes de 6 a 9 anos (0,79 por 100 pacientes/ano) (Ohene-Frempong al., 1998). Dados do *Dallas Pediatric Sickle Cell Program* mostram que a taxa global de AVC entre os indivíduos SS e $S\beta^0$-tal (n=448) foi de 0,85/100 paciente-ano em indivíduos acompanhados até 18 anos de idade. O mesmo estudo mostra que as probabilidades

estimadas de sobrevida livre do primeiro AVC com 2, 6 e 10 anos são de 99,5 (IC95% 98,8-100), 94,3 (IC95% 91,8-96,8) e 91,6 (IC95% 88,4-94,5) em crianças SS e $S\beta^0$-tal (Quinn et al., 2004).

O risco de recorrência é grande, principalmente nos primeiros anos após o primeiro evento. Quando o tratamento não é realizado após o primeiro AVC isquêmico, o risco de recorrência observado em estudos de coorte variou entre 46% e 67% (Powars et al., 1978; Balkaran et al., 1992).

Os fatores de risco para a ocorrência de AVC em indivíduos com doença falciforme são o genótipo homozigoto (Hb SS), histórico de ataque isquêmico transitório, nível basal baixo de Hb basal, contagem alta de leucócitos, aumento da pressão arterial sistólica e histórico de síndrome torácica aguda (Ohene-Frempong et al., 1998).

Na fase aguda do AVC isquêmico é necessária a transfusão sanguínea imediata para reduzir a Hb S para níveis menores que 30%, com um acompanhamento transfusional para manter a concentração de Hb S em menos de 30%. Essa terapia, com acompanhamento de três anos, reduziu a taxa de reincidência de 50% para cerca de 10% (Stuart e Nagel, 2004). Em um estudo de coorte onde participaram pacientes de 14 centros de referência dos EUA, a frequência de recorrência em pacientes que receberam transfusão por no mínimo cinco anos foi 22% (2,2 por 100 pacientes/ano) (Scothorn et al., 2002). Em um estudo realizado nos Estados Unidos, nenhum dos 15 pacientes submetidos a esta terapia tiveram recorrência do evento durante 1.023 pacientes/meses de terapia (Cohen et al., 1992).

A terapia transfusional traz riscos para os pacientes como reações transfusionais, infecções, aloimunização e sobrecarga de ferro. Como a retirada do tratamento de transfusão pode acarretar na recorrência de AVC, a terapia com hidroxiureia (HU) foi sugerida para prevenir a recorrência, sendo o uso iniciado antes do fim do período de transfusões (Ware et al., 1999).

O Doppler transcraniano cerebral (DTC), ao medir as velocidades de fluxo sanguíneo nos vasos cerebrais, é uma importante ferramenta que ajuda na detecção precoce de doentes em risco de sofrer AVC. Essa ferramenta permite incluir os pacientes em risco em regime de transfusão para evitar a ocorrência do primeiro episódio de AVC. Em um estudo randomizado realizado com crianças com anemia falciforme e risco de AVC (velocidade na artéria carótida interna ou cerebral média ≥

200 cm por segundo), houve uma diferença de 92% no risco do primeiro AVC, comparando o grupo tratado com transfusões em relação ao grupo submetido ao tratamento observacional (Adams et al., 1998). A realização, no mínimo anual, do DTC é recomendada para crianças de dois a 16 anos com o genótipo homozigoto (Hb SS) (Stuart e Nagel, 2004).

No HBH da Fundação HEMOMINAS, foi analisada uma coorte de 262 crianças triadas pelo PETN-MG, com perfil hemoglobínico FS, nascidas entre março de 1998 e dezembro de 2005 e acompanhadas até maio de 2009. As crianças com velocidade média máxima (VMM) do fluxo sanguíneo cerebral <170 cm/s nas artérias cerebral média, carótida interna distal e cerebral anterior de ambos os lados foram classificadas como de risco baixo; se VMM entre 170-184 cm/s, risco intermediário baixo; se VMM de 185-199 cm/s, risco intermediário alto e se ≥200 cm/s, risco alto. Foram classificadas como de baixo risco 189 crianças (74,7%); 19 risco intermediário baixo (7,6%); 7 risco intermediário alto (2,8%); e 8 risco alto (3,2%); 29 (11,6%) dos exames foram inadequados. Treze crianças (5%) haviam sofrido AVC isquêmico antes da realização do DTC. A probabilidade acumulada de ter AVC até 10 anos de idade foi de 8,3%; a de AVC ou DTC alterado (risco alto) de 15,6% (Silva, 2009).

3.515 Crise Aplástica

Em anemias hemolíticas crônicas, a cessação temporária das eritropoiese leva à anemia grave, conhecida como crise aplástica. Este evento foi definido como uma queda do nível de hemoglobina (>3,0 g/dl) com ausência de reticulócitos no sangue periférico, ou, se presentes, com aumento diário de acordo com a fase de recuperação (Serjeant et al., 1993).

Embora a maioria das pessoas se recupere espontaneamente em poucos dias, a anemia pode ser tão grave que causa descompensação cardíaca e morte, se a anemia e a reticulocitopenia não são reconhecidas e tratadas (Stuart e Nagel, 2004).

Em um estudo de coorte realizado com 308 crianças com anemia falciforme, a infecção pelo Parvovírus B19 foi a causa da maioria, se não todas as crises aplásticas (Serjeant et al., 1993).

3.516 Infecções

Os pacientes com doença falciforme têm várias anormalidades do sistema imunológico. A perda precoce das funções esplênicas remove um sistema projetado para trazer antígenos circulantes para um estreito contato com o tecido reticuloendotelial. Há também alterações no complemento, nas imunoglobulinas, na função dos leucócitos e na imunidade celular. Além disso, a necrose da medula óssea ou outros tecidos pode facilitar a instalação de bactérias e a ocorrência de infecções crônicas. O resultado dessas anormalidades é o aumento do risco de infecções pneumocócicas e osteomielite por salmonela e, possivelmente, um aumento de *Haemophilus influenzae* e septicemias por *Escherichia coli* (Serjeant, 1992).

Os agentes etiológicos associados a episódios de infecção bacteriana invasiva em um estudo incluindo 3.820 indivíduos com anemia falciforme, em ordem decrescente de frequência, foram: *Streptococos pneumoniae*, Salmonella spp, *Haemophilus influenzae* (tipo B), *Escherichia coli* e Klebsiella spp. A incidência cumulativa mostrou que o *Streptococos pneumoniae* e o *Haemophilus influenzae* ocorreram predominantemente antes dos cinco anos de idade e raramente após os cinco anos. Salmonella spp aumentou quase linearmente com a idade; Klebsiella spp e *Escherichia coli* predominaram nos pacientes com mais de 10 anos de idade. *Escherichia coli* foi encontrada em crianças mais velhas, quase exclusivamente em meninas (Magnus et al., 1999). É extremamente importante lembrar que qualquer infecção bacteriana no indivíduo com anemia falciforme tem grande potencial de evoluir para septicemia, muitas vezes com êxito letal, se não for identificada e tratada precocemente (Di Nuzzo e Fonseca, 2004). O risco de septicemia em indivíduos com anemia falciforme é permanente, principalmente devido à ausência ou redução da função esplênica, sobretudo nos primeiros seis anos de vida (Castro, 1999).

A profilaxia medicamentosa e imunizações reduzem a incidência e mortalidade causadas por infecções em pacientes com anemia falciforme (Di Nuzzo e Fonseca, 2004).

3.6 Mortalidade, expectativa de vida e medidas de redução da morbidade e mortalidade

A doença falciforme continua a causar morbidade e mortalidade significativas, apesar do aumento da expectativa de vida (Hagar e Vichinsky, 2008). A letalidade pode atingir até 25% das crianças nos primeiros cinco anos de idade, sendo as principais causas de óbito a infecção causada por germes capsulados e a crise de sequestro esplênico (Watanabe et al., 2008). Entretanto, em locais onde já se estabeleceu a triagem neonatal e o acompanhamento das crianças é rígido, a mortalidade pela doença falciforme está diminuindo, a idade média de morte está aumentando e uma menor proporção de mortes é causada por infecções (Quinn et al., 2004).

Um estudo realizado em MG descreveu as circunstâncias de óbito em 78 crianças com doença falciforme, entre as 1.396 que foram diagnosticadas e acompanhadas pelo PETN-MG no período de março de 1998 a fevereiro de 2005 (total de crianças triadas: 1.833.030). A mortalidade geral no período foi de 5,6%. A anemia falciforme, estado homozigoto para Hb S, apresentou a maior prevalência de óbito (80,8%). A mediana da idade ao óbito foi 13,7 meses, sendo que 72% dos óbitos ocorreram em crianças de até dois anos de idade. As infecções (incluindo pneumonia e septicemia) foram a principal causa dos óbitos nesse grupo (38,5%), seguida pelo sequestro esplênico (16,6%). As probabilidades estimadas de sobrevida para as crianças com os genótipos SS, SC e $S\beta^+$tal aos cinco anos foram de 89,4%, 97,7% e 94,7%, respectivamente (Figura 6) (Fernandes, 2007).

A redução na morbidade e mortalidade na doença falciforme tem ocorrido devido à implementação de quatro princípios: (1) o diagnóstico precoce, (2) acompanhamento preventivo (acompanhamento clínico e profilaxias), (3) rápido tratamento das complicações que envolvem risco de vida e (4) desenvolvimento e implementação de novas modalidades de tratamentos (Vichinsky, 1991).

O diagnóstico neonatal, a pronta instituição do tratamento (imunizações e penicilina profilática) e a orientação do reconhecimento precoce do sequestro esplênico pelas mães ou cuidadoras contribuíram para a redução da mortalidade das crianças nos primeiros cinco anos (Cançado e Jesus, 2007).

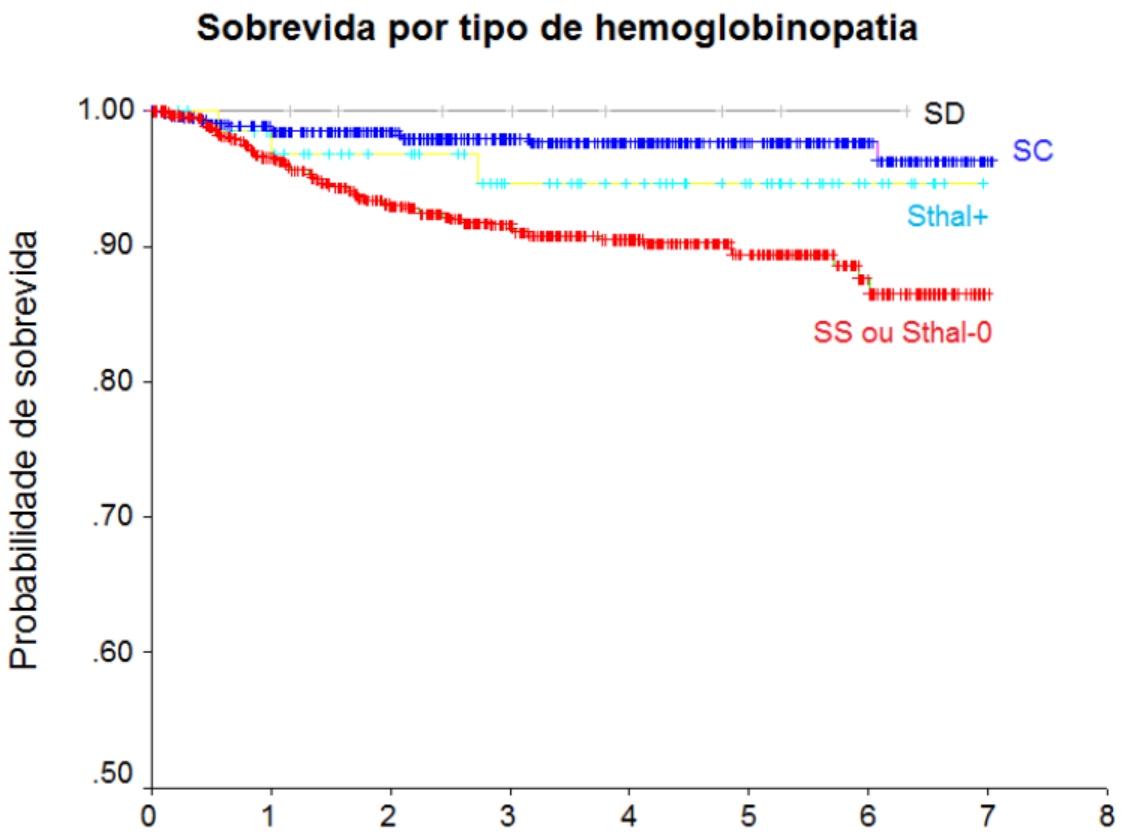


Figura 6 - Curvas de sobrevida, por tipo de hemoglobinopatia, das 1396 crianças com doença falciforme, diagnosticadas pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais entre março de 1998 e fevereiro de 2005 (método de Kaplan-Meier)

Fonte: Fernandes, 2007

Opções eficazes de tratamento atualmente relativamente disponíveis para o tratamento da anemia falciforme são o transplante de medula óssea (TMO) e a hidroxiureia (HU).

O TMO, apesar de ser a medida curativa, quando dispõe de um doador compatível, é considerado de alto risco por apresentar grande índice de complicações e mortalidade (Silva e Shimauti, 2006; Frenette e Atweh, 2007). O TMO ainda não foi muito utilizado em pacientes com doenças falciformes, sendo relatados aproximadamente 500 casos no mundo e apenas 14 no Brasil.

A HU é um fármaco inibidor da redutase ribonucleotídeo que tem sido usado no tratamento de doenças mieloproliferativas. É uma droga oral disponível que é relativamente bem tolerada e simples de usar. Após a demonstração de sua capacidade de induzir a produção de Hb F em babuínos, o uso da HU foi testada em ensaios clínicos em adultos com doença falciforme (Platt et al., 1984; Rodgers et al., 1990; Charache et al., 1992). Um grande estudo mostrou o decréscimo na frequência de crises álgicas, STA, redução na necessidade de transfusões e de hospitalizações em adultos com doença falciforme tratados com HU (Charache et al., 1995). Após nove anos de acompanhamento, pacientes com doença falciforme tratados com HU apresentaram maior sobrevida (Steinberg et al., 2003).

A HU tem outros efeitos que podem beneficiar os pacientes com doença falciforme, como por exemplo, diminuir a adesão de células falcizadas ao endotélio vascular e diminuir o nível de expressão da molécula VCAM-1 solúvel (Bridges et al., 1996; Saleh et al., 1999). Devido à sua atividade mielossupressora, a HU reduz a contagem de leucócitos circulantes e provavelmente o número de leucócitos aderentes à parede de vênulas de pequeno porte (Frenette e Atweh, 2007). Além disso, a HU pode causar efeito citoredutivo em neutrófilos, aumento do teor de água nas hemácias, aumento da deformabilidade e capacidade de navegação microvascular de hemácias falciformes e alterar a capacidade de adesão das hemácias ao endotélio (Aliyu et al., 2006).

3.7 Interferentes genéticos na diversidade fenotípica da Anemia Falciforme

A anemia falciforme é causada pela substituição de um único nucleotídeo, mas o fenótipo da doença é o produto de muitos genes (Nagel e Steinberg, 2001). A redução do nível da Hb S e/ou o aumento do nível da Hb F podem influenciar no processo de falcização e modificar o fenótipo da doença. Além disso, vários processos na

vasculatura e órgãos influenciam no fenômeno de vaso-oclusão e também levam à diversidade de gravidade da doença (Rund e Fucharoen, 2008).

Sabe-se que as manifestações clínicas dos pacientes portadores da anemia falciforme são influenciadas por três tipos de genes: 1) gene que abriga a mutação primária, ou seja, alelo da β^S globina; 2) genes pleiotrópicos, que estão envolvidos na fisiopatologia secundária, sendo indispensável a presença da primeira mutação, cada um com o potencial de modificar a extensão e a característica das manifestações clínicas do paciente (ex: hemólise, hiperplasia eritróide na medula óssea, necrose óssea e outros); e 3) genes epistáticos (polimorfismos nos genes pleiotrópicos) que modulam significativamente a fisiopatologia da doença em um paciente em particular. Esses eventos secundários contribuem de forma significativa para o fenótipo e explicam parcialmente as diferenças interindividuais marcantes na gravidade da doença (Nagel, 2005).

Sabe-se que os haplótipos β^S parecem ter um papel importante na determinação da gravidade da doença, em parte pelo menos por influenciarem o nível de Hb F (Naoum, 2000). A coexistência de α-Tal causa a redução da Hb S no interior das hemácias e a diminuição da polimerização, o que produz consequências clínicas e hematológicas que diferem esses pacientes daqueles sem a interação (Steinberg, 2009).

Powars (1991), utilizando taxas de incidência ajustada por idade de falência dos principais órgãos, propôs um “termômetro” da gravidade da anemia falciforme baseado na influência dos haplótipos β^S e dos genótipos de α-Tal (Figura 7).

Outros genes, não ligados ao agrupamento de genes da β-globina, participam de eventos patológicos relevantes. Por exemplo, a rápida destruição das células falciformes, a formação de células densas e a adesão ao endotélio são controladas por genes pleiotrópicos. Experimentos com *microarrays* estão sendo usados para identificar genes mais ou menos envolvidos em vários processos patológicos que ocorrem em órgãos afetados pela doença em seres humanos e camundongos transgênicos. Depois que os genes pleiotrópicos são localizados, os polimorfismos podem ser pesquisados para identificar genes epistáticos que vão ajudar a definir o risco individual, o que, eventualmente, permitiria intervenções futuras antes do aparecimento de lesões de órgãos (Stuart e Nagel, 2004).

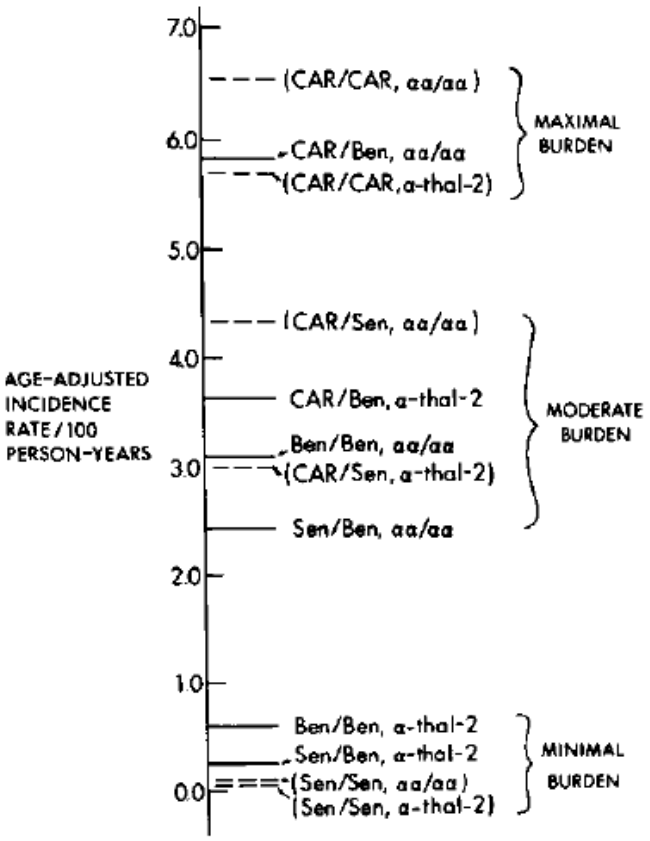


Figura 7 - Representação esquemática da influência dos haplótipos β^S e dos genótipos de α-Tal na gravidade clínica da anemia falciforme

Fonte: Powars, 1991

3.71 Haplótipos do agrupamento de genes da beta-globina

<u>3.711 Origem, distribuição geográfica e caracterização dos haplótipos β^S</u>

Haplótipos, definidos como padrões de vários polimorfismos no DNA ao longo de uma região de um cromossomo, são utilizados para inúmeras finalidades, por exemplo, como marcadores para migração de populações em estudos antropológicos e para detectar "distâncias" genéticas entre os principais grupos étnicos em estudos sobre a origem das raças humanas. Haplótipos específicos são encontrados nos cromossomos portadores do alelo β^S (Nagel e Ranney, 1990).

A mutação β^S está em desequilíbrio de ligação com múltiplos sítios polimórficos ao longo do agrupamento de genes da β-globina (Hanchard et al., 2007; Liu et al., 2009). Os haplótipos β^S são definidos pela variação de sequências de DNA no agrupamento de genes da β-globina - cerca de 60 kb no cromossomo 11 (Pagnier et al., 1984) - que alteram o sítio de reconhecimento de endonucleases de restrição (Stuart e Nagel, 2004). Eles podem ser usados de várias formas: para a determinação da origem unicêntrica ou multicêntrica de evento mutacional responsável pelo alelo β^S; na discriminação entre os diversos eventos epistáticos ligados ao alelo β^S que podem modular a expressão fenotípica da mutação estrutural; no monitoramento do fluxo do alelo β^S em populações humanas; no estudo de origem e evolução da raça humana (Nagel e Ranney, 1990; Lapoumeroulie et al., 1992); e para a compreensão das forças seletivas que moldam a distribuição da variação genética dentro e entre populações humanas (Crawford et al., 2002).

Esses haplótipos são nomeados de acordo com a região geográfica em que predominam e são usados na definição da provável região onde teve origem a mutação. Eles são classificados em cinco diferentes tipos: 1) o Bantu ou República Central Africana (CAR – *Central African Republic*), associado às regiões centro-sul e leste do continente africano; 2) o Benin (Ben), associado à região centro-oeste africana; 3) o Senegal (Sen), associado ao oeste atlântico africano; 4) o Camarões (Cam), associado às regiões ao longo da costa oeste da África (Pagnier et al., 1984) e 5) o tipo Árabe-Indiano, predominante na Arábia Saudita, Bahrein, Kuwait, Omã e Índia (Figura 8) (Stuart e Nagel, 2004).

Dessa forma, acredita-se que a mutação que originou a Hb S ocorreu pelo menos cinco vezes durante a evolução humana (quatro na África e uma na Ásia). Uma hipótese alternativa, com base na seleção e conversão gênicas, não explica a homogeneidade rigorosa dos haplótipos ligados ao alelo β^S em áreas geograficamente distintas. Essa hipótese também não explicaria a ausência da coexistência do haplótipo original com o haplótipo "convertido" nas áreas geográficas distintas. Além disso, como todos os principais haplótipos β^S têm frequência cromossômica alta nas diferentes regiões geográficas, todos eles são capazes de ser selecionados pela malária (Nagel e Ranney, 1990).

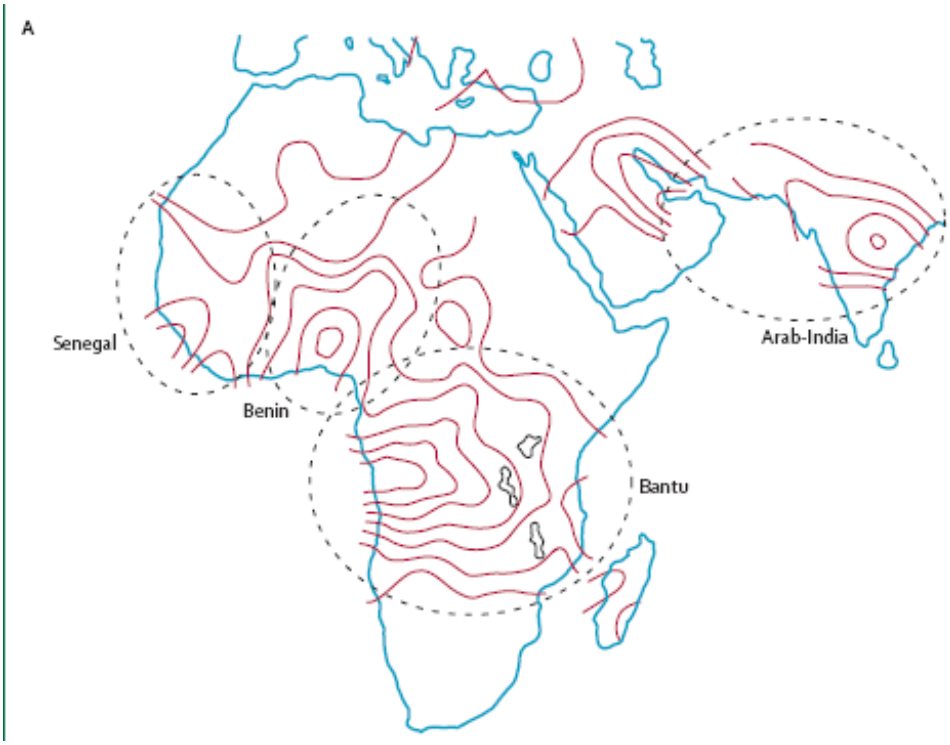


Figura 8 - Região de origem e abrangência dos três principais haplótipos β^S africanos e um asiático

Fonte: Stuart e Nagel, 2004

Pagnier *et al.* (1984) definiram 11 sítios de restrição no agrupamento de genes da β-globina de indivíduos com anemia falciforme de regiões africanas separadas (Benin, República Central Africana, Senegal e Argélia) e observaram que em todos os pacientes de Benin e da Argélia os cromossomos portadores do alelo β^S possuíam o

mesmo haplótipo. Na República Central Africana e no Senegal a grande maioria dos cromossomos β^S foi associada com um haplótipo específico para cada região. Dos 124 cromossomos analisados naquele estudo, 110 haplótipos eram geograficamente específicos e 120 poderiam ser classificados em três grupos: Benin, Senegal e CAR (populações de dialeto Bantu). Como os três haplótipos diferem entre si em pelo menos três sítios a 5´ e a 3´ de um "ponto quente" (*hot spot*) de recombinação no agrupamento de genes da β-globina, os autores sugeriram que o alelo β^S provavelmente surgiu pelo menos três vezes em haplótipos pré-existentes.

O haplótipo Cam, que difere dos outros três haplótipos africanos em regiões 5´ e 3´ da mutação β^S, é encontrado no grupo étnico Eton. Este haplótipo está associado ao gene ${}^{A}\gamma^{T}$ e é idêntico ao haplótipo II, encontrado algumas vezes associado à β-talassemia no Mediterrâneo. A quarta mutação β^S na África (haplótipo Cam) provavelmente expandiu-se também pela presença da malária (Nagel e Ranney, 1990).

Um desequilíbrio de ligação entre o alelo β^S e o haplótipo Árabe-Indiano foi descrito, independentemente, por Bakioglu *et al.* (1985), Wainscoat *et al.* (1985) e Miller *et al.* (1987) em pacientes com anemia falciforme na parte oriental da Arábia Saudita. Esse haplótipo também é encontrado na Índia, representando mais de 90% dos haplótipos neste país (Nagel e Ranney, 1990).

Labie *et al.* (1989), estudando três tribos isoladas do subcontinente indiano, separadas por mais de 3.200 Km e que não possuem nenhum tipo de comunicação atual e nem por um longo tempo atrás, encontraram o mesmo haplótipo (Árabe-Indiano) ligado ao alelo β^S. Provavelmente este alelo β^S teve origem unicêntrica; as tribos isoladas teriam uma origem comum. Existe uma hipótese de que a localização geográfica deste ancestral comum poderia ter sido da civilização Harappa, residente numa área endêmica para malária, fator indispensável para seleção e dispersão do alelo β^S (Nagel e Ranney, 1990).

A maioria dos cromossomos portadores do alelo β^S possui o padrão genético de um dos cinco haplótipos clássicos, porém em todo grande grupo de pacientes com doença falciforme existe uma minoria de cromossomos (5 a 10%) associados à haplótipos menos comuns, geralmente referidos como haplótipos "atípicos" (Atp). Diversos mecanismos genéticos, incluindo as recombinações, substituições pontuais e

conversões de genes, estão envolvidos na geração destes haplótipos atípicos (Zago et al., 2000).

3.712 Relação entre os haplótipos β^S e a diversidade fenotípica da anemia falciforme

Os genes da γ-globina, responsáveis pela síntese da cadeia homônima constituinte da Hb F, estão estreitamente ligados ao gene da β-globina. O nível de expressão destes genes pode modificar alguns aspectos do quadro clínico da anemia falciforme (Nagel e Ranney, 1990).

A cadeia γ da Hb F humana é geneticamente determinada por um *locus* duplicado, HBG1 ($^A\gamma$) e HBG2 ($^G\gamma$). A cadeia $^G\gamma$ tem uma glicina na posição 136 e a cadeia $^A\gamma$ uma alanina na mesma posição. Ao nascimento, a relação da produção das cadeias $^G\gamma$ e $^A\gamma$ em indivíduos com anemia falciforme é aproximadamente 3 para 2, respectivamente. Durante os quatro primeiros meses de vida a cadeia $^A\gamma$ torna-se o componente predominante, invertendo-se a relação para 2:3 (Huisman et al., 1981). O haplótipo Senegal, em homozigose ou heterozigose, é associado com níveis mais elevados de expressão da cadeia $^G\gamma$ e mantém a relação de igualdade de produção entre as cadeias $^G\gamma$ e $^A\gamma$ nos recém-nascidos. O haplótipo Árabe-Indiano também é associado com níveis mais elevados de produção da cadeia $^G\gamma$. Os haplótipos Ben, Cam e CAR são caracterizados por níveis normais de cadeia $^G\gamma$ em adultos (menos de 50%) (Nagel e Ranney, 1990).

Dessa forma, acredita-se que a diversidade clínica da anemia falciforme poderia estar relacionada com os haplótipos β^S. Portadores dos haplótipos Sen ou Árabe-Indiano habitualmente têm maiores níveis de Hb F e apresentam um curso clínico menos grave. Indivíduos portadores do haplótipo CAR apresentam o menor nível de Hb F e o curso clínico mais grave. Portadores do haplótipo Benin e Cam apresentariam características

intermediárias (Tabela 6) (Powars, 1991; Powars e Hiti, 1993; Ashley-Koch et al., 2000; Adekile, 2005; Steinberg, 2005; Rund e Fucharoen, 2008; Steinberg, 2009).

Tabela 6 – Características gerais encontradas nos haplótipos clássicos da anemia falciforme

	Caracteristicas clínicas e laboratoriais*		
Haplótipo	Hematócrito	Hb F	Evolução clínica
Sen/Árabe-Indiano	mais elevado	mais elevada	melhor
Ben	intermediário	intermediário	intermediária
CAR	mais baixo	mais baixa	pior

* Tratam-se de generalizações, criadas a partir dos dados de muitos pacientes; um indivíduo pode não seguir o padrão do grupo como um todo.

Fonte: Steinberg, 2009

A única e concreta evidência de relação entre os haplótipos β^S e a expressão da cadeia γ é a ligação entre a posição -158 a 5´ do gene $^G\gamma$ e o nível de expressão da cadeia $^G\gamma$ (Nagel e Ranney, 1990). O polimorfismo C→T nesta posição nos portadores dos haplótipos Sen e Árabe-Indiano está fortemente associado com maior expressão do gene $^G\gamma$ e com níveis elevados de Hb F (Labie et al., 1985; Nagel et al., 1985; Nagel, 1991). Em contraste, os haplótipos CAR, Cam e Ben são caracterizados por níveis normais de cadeias $^G\gamma$ (Nagel, 1991). Os pacientes portadores do haplótipo Árabe-Indiano, além dos níveis altos de expressão da cadeia $^G\gamma$ e de Hb F, possuem alta prevalência de co-herança de α-Tal (Nagel e Ranney, 1990). Essa interação é associada a um fenótipo menos grave da doença (el-Hazmi, 1992; Thomas et al., 1997).

Entre os vários polimorfismos do agrupamento de genes da β-globina, com exceção do citado no parágrafo anterior e da presença de cadeia $^A\gamma^T$ no haplótipo Camarões, não se sabe precisamente quais e como os haplótipos β^S interfeririam nas expressões fenotípicas da anemia falciforme (Powars et al., 1990). Mutações de ponto em regiões promotoras dos genes da γ-globina foram associadas com o decréscimo na

expressão do gene, mas trata-se de eventos raros, que não são causa comum da variação dos níveis de Hb F (Bank, 2006).

3.713 Os haplótipos β^S no Brasil

Durante o período transatlântico de tráfico de escravos (1514-1866), aproximadamente 4,9 milhões africanos vieram para o Brasil e foram distribuídas em quase todas as regiões do país (Estimates Database, 2010). Cerca de 2.876.800 indivíduos foram trazidos entre 1701 a 1810 e 1817 a 1843, dos quais 73% eram da África equatorial (regiões de dialeto Bantu), leste e sul do continente (Angola, Congo e Moçambique), 26% eram do centro-oeste africano (golfo de Benin e baía de Biafra) e um pequeno grupo do ocidente atlântico africano (Senegâmbia, Guiné-Bissau e Cabo Verde). As diferenças regionais foram marcantes em relação à quantidade e a origem dos escravos que foram recebidos por cada região do país (Curtin, 1969; Estimates Database, 2010). Esses dados são concordantes com o perfil da frequência dos haplótipos β^S encontrados no Brasil, sendo a grande maioria composta pelos haplótipos CAR e Ben, e uma minoria pelos haplótipos Sen, Cam e Árabe-Indiano, com diferenças regionais marcantes demonstrando a heterogeneidade do comércio de escravos Africanos trazidos para o país durante o período colonial.

Alguns estudos foram realizados no País, com objetivo de determinar a frequência dos haplótipos β^S em diferentes regiões, e outros testando a associação desses haplótipos com manifestações clínicas e laboratoriais da anemia falciforme.

O primeiro estudo que determinou os haplótipos β^S no Brasil foi realizado em 37 pacientes com anemia falciforme da raça negra, regularmente acompanhados na Clínica de Hemoglobinopatias do Hospital Universitário de São Paulo. Dos 74 cromossomos genotipados 49 eram do tipo CAR, 17 do tipo Ben, apenas um cromossomo do tipo Sen e sete cromossomos eram atípicos, sendo que os genótipos mais comuns foram CAR/CAR (19 indivíduos) e Ben/CAR (9 indivíduos). O nível de cadeia $^G\gamma$ da Hb F foi

determinado, sendo similar em todos haplótipos (média 39,4±6,2%) com exceção do único paciente portador do haplótipo Sen (genótipo CAR/Sen) que apresentou um nível superior (61,1%). Nenhum paciente apresentou predomínio da cadeia $^{A}\gamma^{T}$ (Zago et al., 1992).

Em novo estudo realizado no estado de São Paulo, Gonçalves *et al.* (1994) determinaram os haplótipos β^{S} de 74 pacientes com anemia falciforme (33 da clínica da UNICAMP e 41 da clínica da Escola Paulista de Medicina). Dos 148 cromossomos estudados 62,2% eram do tipo CAR, 33,8% do tipo Ben e 4% atípicos. Com relação aos genótipos, 43,2% eram duplo heterozigotos Ben/CAR, 36,5% eram CAR/CAR, 12,2% Ben/Ben e 8,1% CAR/Atp. A média dos níveis de Hb F foram 9,83%, 8,75% e 4,61% para os genótipos Ben/Ben, Ben/CAR e CAR/CAR, respectivamente. Os autores não referem se as diferenças foram estatisticamente significativas.

Novamente no estado de São Paulo, Figueiredo *et al.* (1996) estudaram os efeitos dos haplótipos β^{S} e da α-Tal nas características clínicas e hematológicas de 85 pacientes com anemia falciforme provenientes do Hospital Universitário da UNICAMP e do Hospital Universitário da Escola Paulista de Medicina. Dos 170 cromossomos estudados, 61,76% eram do tipo CAR, 34,71% do tipo Ben e 3,53% eram atípicos. As frequências dos genótipos encontrados neste estudo foram: 36,5% do tipo CAR/CAR, 44,7% Ben/CAR, 11,7% Ben/Ben, 5,8% CAR/Atp e 1,2% Ben/Atp. Houve diferença significativa nos níveis de Hb F entre os haplótipos CAR e Ben, sendo que os níveis menores foram associados ao haplótipo CAR. Não houve diferença entre os haplótipos β^{S} com relação aos eventos clínicos analisados (AVC, cálculos biliares, necrose asséptica e úlcera nas pernas).

Analisando 30 pacientes com anemia falciforme oriundos do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará, Pante-de-Sousa *et al.* (1998) encontraram a seguinte distribuição dos haplótipos nos 60 cromossomos: 67% do tipo CAR, 30% Ben e 3% Sen. A combinação dos haplótipos encontrada nos 30 pacientes foi: 47% Ben/CAR, 43% CAR/CAR, 7% Ben/Ben e 3% Sen/Sen. Não ouve diferença significativa na frequência dos haplótipos encontrados neste estudo em relação aos outros estudos acima citados.

Os haplótipos do agrupamento de genes da β-globina foram analisados em cromossomos β^{A}, β^{S} e β^{C} de negros de três comunidades amazônicas descendentes de

escravos africanos. Entre os 20 cromossomos estudados portadores do alelo β^S, 60% eram do tipo CAR, 10% eram Ben e 30% do tipo Sen. Este estudo chamou atenção para o fato de que, apesar da maioria dos escravos trazidos para o norte do Brasil ser oriunda de regiões africanas onde o haplótipo CAR predomina, há evidências da presença de escravos vindos do oeste da África, particularmente do oeste atlântico, onde o haplótipo Sen prevalece (Pante-De-Sousa et al., 1999).

Objetivando estudar o grau de comprometimento do crescimento e desenvolvimento de crianças com anemia falciforme e a sua relação com os diferentes haplótipos β^S, Luporini *et al.* (2001) analisaram 41 crianças com anemia falciforme pareadas por sexo e idade com crianças saudáveis. Os genótipos encontrados na ordem decrescente de frequência foram: CAR/CAR (17/41), Ben/CAR (13/41), Ben/Ben (6/41), Ben/Sen (2/41), CAR/CAR minor (1/41), CAR/Atp (1/41), CAR minor/Ben (1/41). A comparação dos dados laboratoriais mostrou aumento estatisticamente significativo nas médias de Hb F (transformada em logaritmo) entre pacientes com os genótipos CAR/CAR e CAR/Ben (3,08%±2,26 e 8,92%±5,4, respectivamente - $p<0,05$) e entre CAR/CAR e Ben/Ben (3,08%±2,26 e 7,73%±4,7, respectivamente - $p<0,05$). O número de hospitalizações por ano devido a crises álgicas foi estatisticamente superior nos pacientes com o genótipo CAR/CAR, quando comparados com os pacientes Ben/Ben ($p<0,05$). A análise também mostrou que a velocidade de crescimento foi estatisticamente menor nos pacientes com o genótipo CAR/CAR quando com parados com os Ben/Ben ($p<0,05$).

Goncalves *et al.* (2003), analisaram 80 pacientes com anemia falciforme provenientes do Hospital Universitário da Universidade Federal da Bahia e da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA). As frequências dos genótipos encontrados neste estudo foram: 21,25% do tipo CAR/CAR, 46,25% Ben/CAR, 21,25% Ben/Ben, 7,5% CAR/Atp, 1,25% Ben/Atp, 1,25% Ben/Sen e 1,25% Atp/Atp. A frequência encontrada dos genótipos CAR/CAR e Ben/Ben foi exatamente a mesma, provavelmente devido ao intenso tráfico de escravos vindo do golfo de Benin e da Baía de Biafra para região nordeste do Brasil, principalmente para o estado da Bahia (Adorno et al., 2004).

Em um novo estudo envolvendo 80 pacientes com anemia falciforme do estado da Bahia (Hemocentro da Bahia), Adorno *et al.* (2004) encontraram a seguinte

frequência nos 160 cromossomos analisados: 48,8% do tipo Ben, 46,2% do tipo CAR, 1,9% do tipo Cam, 0,6% (um cromossomo) do tipo Árabe-Indiano, 0,6% (um cromossomo) do tipo Sen e 1,9% de haplótipos atípicos. Os genótipos mais frequentes foram o Ben/CAR (55%), seguido do Ben/Ben (20%) e do CAR/CAR (16,2%).

Com objetivo de estudar aspectos hematológicos, clínicos e moleculares de crianças com anemia falciforme de duas cidades brasileiras, Lyra *et al.* (2005), analisaram 31 pacientes de São Paulo e 40 de Salvador. Dos 70 cromossomos examinados da cidade de Salvador, 48% eram do tipo CAR, 48% do tipo Ben e 3% atípicos, enquanto dos 56 cromossomos da cidade de São Paulo, 55% eram do tipo CAR, 34% do tipo Ben e 8,5% atípicos. O genótipo predominante nas duas cidades foi o Ben/CAR (40% em São Paulo e 54% em Salvador). A distribuição dos haplótipos β^S nas duas cidades mostrou um padrão diferente, com uma maior frequência do haplótipos Ben em Salvador comparado com o CAR em São Paulo. Os pacientes com os genótipos Ben/CAR e CAR/CAR apresentaram um número maior de admissões devido a crises vaso-oclusivas nas duas cidades. Infecções foram associadas com o genótipo Ben/CAR e Ben/Ben em Salvador e com os genótipos Ben/CAR e CAR/CAR em São Paulo. O AVC foi mais frequente nos pacientes com o genótipo Ben/CAR em Salvador e com o CAR/CAR em São Paulo. A coliletíase foi associada com os haplótipos atípicos em Salvador e com o CAR/CAR em São Paulo. Entretanto, não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Neto *et al.* (2005), estudando 22 pacientes com anemia falciforme atendidos no ambulatório do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Ceará (UFC), com seus antepassados até a segunda ascendência (pais e avós) igualmente naturais desse estado, encontraram os seguintes genótipos: Ben/Ben (27,27%), Ben/CAR (27,27%), CAR/CAR (18,18%) e Ben/Sen (4,45%) e 22,72% atípicos. Dos 44 cromossomos analisados 19 (43,2%) eram do tipo Ben, 14 (31,8%) do tipo CAR, um (2,3%) do tipo Sen e 10 (22,7%) atípicos.

Em um estudo realizado em 2005, Vicari *et al.* (2005) avaliaram o tratamento com HU em 22 pacientes falcêmicos (Hb SS) com características clínica de moderada a grave (pelo menos três episódios de dor por ano, histórico de STA e crises recorrentes). Os pacientes foram tratados com HU como sugerido pelo estudo multicêntrico de hidroxiureia (*The multicenter study of Hydroxyurea*) e foram acompanhados por 12 a 60

meses (média de 30,45 meses). Nove pacientes eram homozigotos para o haplótipo CAR, quatro eram homozigotos para o haplótipo Ben, sete eram duplo heterozigotos Ben/CAR, um era CAR/Atp e um era Ben/Atp. O nível de Hb F basal foi maior nos pacientes com o haplótipo Ben do que nos pacientes CAR, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. Foi observado um aumento significativo nos níveis de Hb total, quando comparado o nível anterior com o posterior ao tratamento, quando considerados todos os pacientes (P=0,037). Níveis de Hb F após tratamento com HU também foram aumentados, mas na análise estratificada somente o haplótipo CAR mostrou significância estatística entre os níveis de Hb F antes e depois tratamento (p=0,003). Não foi encontrada qualquer correlação entre a idade e sexo e resposta à HU.

Em um novo estudo realizado com pacientes do estado do Pará, Lemos e Farias (2006) determinaram os haplótipos β^S de 130 pacientes provenientes do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará. Dos 260 cromossomos avaliados 66% eram do tipo CAR, 21,8% do tipo Ben, 10,9% do tipo Sen e 1,3% do tipo Cam. A distribuição da frequência dos genótipos encontrados foi: 50,8% CAR/CAR, 16,1% Ben/CAR, CAR/Sen 11,5%, Ben/Ben 10%, Ben/Sen 8,6% e CAR/Cam 3%. A frequência do haplótipo Sen observada neste estudo foi três vezes maior que o relatado anteriormente neste estado e significantemente maior do que nas outras regiões brasileiras. A frequência do haplótipo Sen encontrada está de acordo com os dados históricos sobre o tráfico de escravos do oeste atlântico africano para o norte do Brasil. Neste estudo, o haplótipo Cam foi identificado pela primeira vez em um estudo envolvendo populações brasileiras. Esse haplótipo foi trazido para o norte do Brasil principalmente por: tráfico doméstico de escravos, particularmente os vindos do nordeste (Bahia, Pernambuco e Maranhão), região que recebeu maior número de escravos do oeste central da África, onde o haplótipo Cam é encontrado; por migrações internacionais; e escravos fugitivos e traficados vindo da Guiana Francesa e do Suriname.

Para esclarecer se características clínicas, hematológicas e genéticas da doença falciforme influenciariam na ocorrência de alterações nos vasos sanguíneos da retina e conjuntiva, Lima *et al.* (2006), estudaram 71 pacientes com anemia falciforme, 19 duplos heterozigotos SC e 12 pacientes Sβ-tal, todos acompanhados no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas. Dos 71 pacientes com anemia falciforme, 33 possuíam o genótipo Ben/CAR, 20 eram CAR/CAR, 15

Ben/Ben, um Atp/Atp e dois pacientes não foram genotipados. Foram encontradas frequências similares de alterações nos vasos da retina e da conjuntiva nos pacientes com os diferentes haplótipos β^S, sugerindo que estes não interferem na ocorrência dessas complicações.

Silva (2006) analisou 75 pacientes com anemia falciforme atendidos no Centro de Atenção Global a Pacientes Portadores de Hemoglobinopatias do Hospital das Clínicas de Porto Alegre, com objetivo de avaliar se existiria correlação entre os haplótipos β^S e a gravidade da doença. Dos 150 cromossomos analisados, 66% eram do tipo CAR, 27% eram Ben e 7% eram atípicos. A frequência dos genótipos encontrados foi: 46,7% CAR/CAR, 29,3% Ben/CAR, 9,3% Ben/Ben, 8% CAR/Atp e 6,7% Ben/Atp. Não houve associação estatisticamente significativa entre os haplótipos β^S e a frequência de dor, complicações cardíacas, sexo, idade e níveis de Hb F.

Em 2006 foi realizado um estudo descritivo com 18 crianças ou adolescentes com anemia falciforme e homozigotos para o haplótipo CAR, com objetivo de esclarecer a diversidade clínica e laboratorial dos indivíduos portadores desse haplótipo. A faixa etária de um a 11 anos apresentou maior número de infecções que a faixa etária de 12 a 19 (p=0,04), além de níveis mais altos de Hb F (p=0,01). Os valores de hematócrito foram mais elevados no sexo feminino (p=0,03). Os pacientes com nível de Hb F maior que a média do grupo possuíam valores de hematócrito mais elevados (p=0,01), enquanto que os que possuem níveis de Hb F menores que a média possuíam maior número de crises álgicas por ano (p=0,01). Níveis mais elevados de Hb A_2 foram correlacionados com maior número de infecções, enquanto níveis mais elevados de Hb F foram relacionados com níveis mais altos de hematócrito (r=0,61) e menor número de crises álgicas por ano de acompanhamento. O número de transfusões/ano apresentou correlação positiva com o número de crises álgicas (r=0,84), de infecções (r=0,6) e de internamentos (r=0,61). Desta forma, os autores sugerem que existe uma diversidade clínica e laboratorial dentro do haplótipo CAR, que possivelmente está relacionada com sexo, idade e níveis de Hb A_2 (Costa et al., 2006).

No Rio de Janeiro, Fleury (2007) estudou 74 pacientes com anemia falciforme matriculados no Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO). Dos 148 cromossomos genotipados, 80 (54%) eram do tipo CAR, 66 (44,6%) do tipo Ben e dois (1,4%) do tipo Sen. Os genótipos encontrados nesses

pacientes foram: 63,6% Ben/CAR, 21,6% CAR/CAR, 12,2% Ben/Ben, 1,3% Ben/Sen e 1,3% CAR/Sen. A concentração de Hb F foi mais alta no grupo Ben/CAR e Ben/Ben em relação ao CAR/CAR.

Para investigar a frequência dos haplótipos β^S em pacientes pediátricos triados pelo programa de triagem neonatal do estado de Pernambuco e acompanhados no hospital do HEMOPE, Bezerra *et al.* (2007) avaliaram 74 indivíduos com doença falciforme. Dentre os 53 pacientes estudados com anemia falciforme, 64,1% possuíam o genótipo CAR/CAR, 24,5% Ben/CAR, 3,8% CAR/Atp, 1,9% Ben/Ben, 1,9% Ben/Atp, 1,9% CAR/Cam e 1,9% Atp/Atp. Dos 106 cromossomos avaliados de indivíduos com a forma homozigota (Hb SS), 84 (79,2%) eram do tipo CAR, 16 (15,1%) do tipo Ben, um (1%) Cam e cinco (4,7%) atípicos. Neste estudo, o haplótipo Cam foi novamente observado no Brasil (apenas um cromossomo do total de 127 investigados).

Adorno *et al.* (2008) realizaram um estudo transversal em 125 pacientes com anemia falciforme atendidos na HEMOBA com objetivo de identificar as principais características moleculares e clínicas da doença no estado da Bahia. Os genótipos e as médias de Hb F encontrados nestes pacientes foram: 64 Ben/CAR (Hb F 9,2±5,7%), 36 Ben/Ben (Hb F 12,4±6,5%), 18 CAR/CAR (Hb F 7,5±4%), 2 CAR/Atp (Hb F 8,4±1,8%), 2 Ben/CAM (Hb F 22,2±7,3%), 1 CAR/Cam (Hb F 5%), CAR/Árabe-Indiano (Hb F 26,4%) e Sen/Atp (Hb F 0,8%). Pelo menos um haplótipo CAR estava presente em todos os pacientes com histórico de AVC (1 CAR/Cam, 2 CAR/CAR e 3 Ben/CAR). A frequência de crise de dor foi menor nos pacientes com os genótipos Ben/CAR e três genes alfa quando comparado com pacientes com outros genótipos e também três genes alfa.

A mesma casuística do estudo citado anteriormente foi usada em um trabalho visando avaliar a importância de variações na sequências dos genes $^A\gamma$ e $^G\gamma$ e da região controladora do locus HS2 na diversidade dos níveis de Hb F. Dos pacientes estudados, quatro com o genótipo CAR/CAR tinham níveis de Hb F $\geq$ 10%, três com o genótipo Ben/Ben apresentaram Hb F $\leq$ 5,0%, 11 com o genótipo Ben/CAR tinham HbF $\geq$ 15,0%, 18 com o genótipo Ben/CAR tinham Hb F $\leq$ 5,0% e dois com o genótipo Cam/Ben tinham HbF $\geq$ 15,0%. Deste grupo, dez pacientes que apresentavam uma disparidade entre o nível de Hb F e o haplótipo β^S foram selecionados para o sequenciamento das regiões estudadas (dois Cam/Ben, dois Ben/Ben, três Ben/CAR,

dois CAR/CAR e um CAR/Atp). A análise da região controladora do locus HS2 demonstrou uma substituição de nucleotídeo G→A na posição -10.677 em pacientes com o haplótipo Ben e níveis de Hb F elevados. Portadores dos genótipos Ben/CAR e Ben/Ben e níveis baixos de Hb F não possuíam essa sequência variante. A sequência promotora de $^{G}\gamma$ mostrou uma substituição T→C na posição -157 em todos os pacientes, sugerindo que este polimorfismo, situado nas proximidades de outro polimorfismo (-158 C→T), está associado com expressão alta do gene γ. Os pacientes portadores do genótipo Ben/Cam apresentaram a deleção -222_-225del na região promotora do gene $^{A}\gamma$ relacionada ao haplótipo Cam, que pode ser parte de um elemento em *cis* que aumenta a expressão da globina γ. Este estudo confirmou a relação entre a heterogeneidade genotípica e os níveis de Hb F em pacientes brasileiros com anemia falciforme (Adorno et al., 2008).

3.714 Haplótipos β^{S} no restante do mundo

Diversos estudos têm sido realizados, em diferentes regiões do mundo, para verificar a associação entre os haplótipos β^{S} e características clínicas e hematológicas da anemia falciforme.

Labie *et al.* (1985) estudaram 34 pacientes com anemia falciforme de Benin ou Senegal para determinar a relação entre os haplótipos β^{S}, níveis de Hb F e as taxas de cadeias $^{G}\gamma$ e $^{A}\gamma$. Os portadores do haplótipo Sen apresentaram maior expressão de cadeias $^{G}\gamma$ e níveis mais elevados de Hb F. Os pacientes portadores do haplótipo Ben exibiram menor concentração de cadeias $^{G}\gamma$ e de Hb F.

Nagel *et al.* (1985), estudando pacientes africanos falcêmicos (Hb SS), encontraram relação entre o haplótipo Sen e níveis mais elevados de Hb F, predomínio das cadeias $^{G}\gamma$ nas Hb F, menor proporção de hemácias muito densas e uma menor percentagem de células falciformes irreversíveis quando comparados com pacientes portadores do haplótipo Ben. Os autores ainda sugeriram que a composição das cadeias

γ e os níveis de Hb F são relacionados aos haplótipos β^S e que a diminuição na porcentagem de células densas e de células falciformes irreversíveis são eventos secundários à elevação da Hb F.

Wainscoat *et al.* (1985) avaliaram dez pacientes com anemia falciforme de uma família jamaicana que apresentavam níveis elevados de Hb F, não usuais para aquela população. Todos eles apresentavam um padrão de arranjo de polimorfismos (haplótipo) no cromossomo 11 raríssimo na população jamaicana. A análise genética desta família sugeriu que existiria um fator determinante ligado ao agrupamento de genes da β-globina, característico neste haplótipo, que seria responsável pela maior produção de Hb F em resposta à anemia. Curiosamente este haplótipo parecia ser muito comum em pacientes homozigotos SS no leste da Arábia Saudita, que apresentavam fenótipo com níveis elevados de Hb F. Os autores sugeriram que este haplótipo atua como um marcador genético para níveis elevados de Hb F em doentes falciformes. Este padrão polimórfico seria posteriormente reconhecido como o Árabe-Indiano.

Vinte e nove pacientes africanos com anemia falciforme foram avaliados para testar a hipótese de que o polimorfismo C→T na posição -158 a 5´ do gene $^G\gamma$ estaria relacionado com a expressão da cadeia $^G\gamma$. Este polimorfismo foi fortemente associado ao haplótipo Sen. Os autores concluíram que, apesar da alta correlação, o polimorfismo não prediz perfeitamente a presença de altos níveis da cadeia $^G\gamma$. Os resultados também excluíam a possibilidade deste polimorfismo estar exclusivamente envolvido na determinação da alta expressão do gene $^G\gamma$ e sugeria que outros polimorfismos na região 5´ deste gene poderiam ter o mesmo efeito, ou ainda, que o polimorfismo e sua região não estariam envolvidos na expressão do gene $^G\gamma$, estando apenas em desequilíbrio de ligação com uma possível sequência controladora (Labie et al., 1985).

Novamente para testar que o polimorfismo C→T na posição -158 a 5´ do gene $^G\gamma$ contribuiria com a variação dos níveis da cadeia $^G\gamma$ em indivíduos com anemia falciforme, Gilman e Huisman (1985) avaliaram 41 pacientes (Hb SS) e membros de algumas famílias, todos vivendo no estado da Georgia, no Estados Unidos. Nos indivíduos homozigotos para o nucleotídeo T na posição -158 a 5´ do gene $^G\gamma$, o nível médio de cadeias $^G\gamma$ foi 69,7± 4,6%. Nos indivíduos heterozigotos para este polimorfismo o nível médio de cadeias $^G\gamma$ foi 60,6±5,7%. A ausência do nucleotídeo T na posição -158 a 5´ do gene $^G\gamma$ foi associado a níveis baixos de cadeias $^G\gamma$ (média de

39,6% ± 4,0%). Os dados foram consistentes com a hipótese de que a presença do polimorfismo C→T na posição -158 a 5´ do gene $^{G}\gamma$ causa no fenótipo elevados níveis de cadeias $^{G}\gamma$.

Estudando 66 sujeitos com anemia falciforme da República Central Africana, Nagel *et al.* (1987) encontraram 90,6% dos cromossomos do tipo CAR e o remanescente atípicos. Os resultados desse estudo foram comparados com os resultados de outro estudo, onde Nagel *et al.* (1985) haviam relatado informações sobre indivíduos portadores dos haplótipos Ben e Sen. Os portadores dos haplótipos CAR e Sen mostraram níveis altos de Hb F e baixos de células densas F4, mesmo quando a frequência elevada de α-Tal nos portadores do haplótipo CAR (62%) foi desprezada, comparando os portadores do haplótipo CAR sem α-Tal com o portadores do haplótipo Sen, que possuem menor prevalência de α-Tal. Esses dois haplótipos foram diferentes em relação à expressão de cadeias $^{G}\gamma$, com alta porcentagem nos portadores do haplótipo Sen e baixa porcentagem para os portadores do haplótipo CAR. Entretanto, ambos os haplótipos mostraram ser muito diferentes do haplótipo Ben, que foi caracterizado por baixos níveis de Hb F e porcentagens elevadas de células densas F4. Curiosamente, entre os portadores do haplótipo CAR houve uma forte correlação entre os níveis de Hb F e expressão da cadeia $^{G}\gamma$, que não foi visto com os outros haplótipos.

Kulozik *et al.* (1987) determinaram os haplótipos β^{S} em 303 indivíduos do estado de Orissa, Índia (126 Hb SS, 141 Hb AS, 17 Sβ^{0}-tal, 7 Aβ^{0}-tal e 12 Hb AA). O haplótipo Árabe-Indiano foi quase exclusivamente encontrado nos cromossomos portadores do alelo β^{S}. A média de Hb F em indivíduos com anemia falciforme homozigotos para o haplótipo Árabe-Indiano foi 16,4% (n=107; média de idade 16,6 anos). Estudos familiares mostraram que há um fator genético ligado a elevação da Hb F, principalmente nos homozigotos SS, e que esse fator parece estar relacionado ao haplótipo Árabe-Indiano. Houve também elevada prevalência de um tipo suíço de persistência hereditária de hemoglobina fetal em pacientes portadores do traço falcêmico e em doentes falciformes.

Em um estudo envolvendo 283 indivíduos com doença falciforme na Califórnia, sendo 221 com anemia falciforme, comparações da concentração de Hb F (%), Hb F absoluta e cadeia $^{G}\gamma$ absoluta entre os haplótipos β^{S}, sem levar em consideração deleções nos genes alfa, mostraram que os níveis de Hb F (%), Hb F absoluta, cadeia $^{G}\gamma$

absoluta foram significativamente maiores no grupo com genótipo Sen/Ben. O grupo com genótipo Ben/CAR apresentou níveis significativamente menores e os portadores do genótipo Ben/Ben apresentou valores intermediários. A média de Hb F absoluta diminuiu de 0,75 g/dL no grupo Ben/Ben para 0,57 g/dL no grupo Ben/CAR e de 1,11 g/dL no grupo Sen/Ben para 0,73 g/dL no grupo CAR/Sen. Também foi encontrada uma alta correlação entre os níveis de Hb F absoluta e os níveis absolutos de cadeia $^{G}\gamma$ (Schroeder et al., 1989).

Tendo em vista que polimorfismos na região flaqueadora a 5´ do gene da γ globina podem resultar em níveis de expressão diferente de Hb F entre os haplótipos β^{S}, Month *et al.* (1990) avaliaram a região desde -350 até +10 pb dos genes $^{G}\gamma$ e $^{A}\gamma$ nos haplótipos CAR, Ben e Sen. O haplótipo Sen foi associado a um nucleotídeo T na posição -158 a 5´do gene $^{G}\gamma$, o haplótipo Ben a uma modificação A→G na posição -309 a 5´ do gene $^{G}\gamma$ e o haplótipo CAR a uma modificação C→T na posição -271 a 5´ do gene $^{A}\gamma$. A modificação A→G na posição -309 a 5´ do gene $^{G}\gamma$ também foi encontrada em cromossomos β selvagens, sugerindo que esta modificação ocorreu antes da mutação β^{S} no haplótipo Ben.

Em um estudo envolvendo 221 pacientes com anemia falciforme, foi encontrada uma forte correlação entre os níveis de Hb F absoluta e os níveis absolutos de cadeia $^{G}\gamma$ nos haplótipo β^{S}, com coeficiente de correlação r=0,97, 0,98 e 0,99 nos grupos Ben/Ben, Ben/CAR e Sen/Ben respectivamente. Também foi encontrado que os pacientes que possuíam níveis de Hb F absoluta acima de 1,2 g/dL ou níveis absolutos de cadeia $^{G}\gamma$ acima de 0,6 g/dL tiveram morbidade clínica significativamente menor. Uma proporção significativamente maior de pacientes com o cromossomo β^{S} do tipo Sen ultrapassaram os níveis “críticos” citados (p=0,0009) (Powars et al., 1990).

O mesmo estudo comparou a incidência de eventos clínicos por 100 pessoas/ano ajustada pela idade, em pacientes com anemia falciforme e pelo menos um cromossomo β^{S} do tipo Sen com pacientes sem este haplótipo. Os pacientes com pelo menos um cromossomo Sen tiveram incidência menor de todos os eventos clínicos estudados (hospitalizações, todas as crises falciformes, crises falciformes com maior complicação médica, STA, infarto ósseo, crise aplástica, meningites/septicemia, fratura, priapismo e necrose renal papilar). Com relação aos eventos agudos, foi encontrado um alto grau de significância estatística (p<0,0001). As crises falciformes e STA atingiram estes

pacientes com muito menos frequência. Houve menor risco de SEA, menos hospitalizações por infecções do trato respiratório superior, diminuição da pielonefrite, redução na doença do fígado e menos cirurgias. Da mesma forma, pelo menos um cromossomo Sen protegeu contra infarto ósseo ($p<0,00001$; RR=0,63). A incidência de infarto ósseo por 100 pessoas/ano ajustada pela idade, incluído a síndrome mão-pé, foi notavelmente menor no grupo Sen/Ben (3,32 por 100 pessoas/ano) quando comparada com o grupo Ben/CAR (9,5 por 100 pessoas/ano) e o grupo Ben/Ben (12,21 por 100 pessoas/ano). As principais falências de órgãos (cérebro, rins, pulmões, ossos e úlceras nas pernas) ocorreram em 72 dos 221 pacientes com anemia falciforme. A análise estatística mostrou um efeito prejudicial do haplótipo CAR e um efeito benéfico do haplótipo Sen, sendo que o haplótipo Ben mostrou características intermediárias. O haplótipo CAR foi associado com aumento do risco de vasculopatias obstrutivas nos tecidos moles, incluindo cérebro (RR=2,01), rins (RR=5), pulmões (RR=1,27) e úlcera nas pernas (RR=1,72), com níveis altamente significativos (valor global de P=0,001). Os danos irreversíveis nos tecidos moles foram duas vezes maiores no grupo com o genótipo Ben/CAR quando comparados com o grupo Ben/Ben e três vezes maiores do que o grupo Sen/Ben. Os grupos de pacientes Ben/Ben e Sen/Ben possuíram o mesmo risco até os 20 anos, sendo que após os 20 anos o efeito protetor do cromossomo Sen diminuiu o risco de falência de órgão de tecidos moles e morte. Resumindo, os achados do trabalho convergem para idéia de que, em comparação com pacientes com haplótipo Ben, o haplótipo Sen diminui a gravidade das manifestações clínica, enquanto o haplótipo CAR aumenta esta gravidade (Powars et al., 1990).

Em um estudo realizado com objetivo de verificar se os haplótipos β^S estão relacionados com características hematológicas e clínicas da anemia falciforme, 113 pacientes negros adultos foram avaliados. Setenta e cinco por cento dos pacientes eram homozigotos ou heterozigotos para os haplótipos Ben ou CAR, 13,3% eram homozigotos ou heterozigotos para o Sen, enquanto 11,5% tiveram outros genótipos. Não foi encontrado nenhum efeito dos haplótipos β^S nos níveis de Hb F. O nível médio de cadeias $^G\gamma$ foi 60,5±17,0% nos indivíduos heterozigotos ou homozigotos para o haplótipo Sen e 46,9±11,6% nos indivíduos com outros genótipos. Indivíduos com o sítio de restrição XmnI a 5' do gene $^G\gamma$ (polimorfismo C→T) tiveram o nível de cadeia $^G\gamma$ de 59,5±16,7%, enquanto aqueles que não possuem esse sítio tiveram uma média de 47,2±12,1%. Não houve diferença significativa entre esses grupos na concentração de

Hb total, hematócrito, VCM ou indicadores clínicos de gravidade vaso-oclusivas incluindo, crises, hospitalizações por ano, necrose óssea asséptica, STA ou úlceras de perna. Embora a presença do haplótipo Sen e do sítio de restrição XmnI a 5' do gene $^{G}\gamma$ estivesse associada com maior produção de cadeias $^{G}\gamma$, não foi detectado nenhum efeito dos haplótipos β^{S} na concentração da Hb F ou de outras características hematológicas e clínicas (Rieder et al., 1991).

Em 66 adultos com anemia falciforme em Nova York, a presença de pelo menos um cromossomo com o haplótipo Sen foi associado a níveis mais elevados de hemoglobina (1,2 g/dL mais elevados) quando comparados com pacientes sem o haplótipo Sen (p<0,004). Os reticulócitos, os níveis de LDH e os níveis séricos de bilirrubina foram significativamente menores naquele grupo. Além disso, esses dois grupos diferiram na concentração de Hb F absoluta (0,93 VS 0,62; p <0,03) e no nível de cadeias $^{G}\gamma$ (60,3% *vs* 46,5%, uma diferença altamente significativa). Os pacientes sem o haplótipo Sen tiveram aproximadamente o dobro do número médio de células densas (p<0,03). Os autores sugeriram que o haplótipo Sen está associado a uma melhora da anemia hemolítica que caracteriza a doença falciforme (Nagel et al., 1991).

Ballas *et al.* (1991) determinaram os haplótipos β^{S}, testaram a presença do polimorfismo C→T na posição -158 a 5´ do gene $^{G}\gamma$ e mediram a expressão de Hb F e da cadeia $^{G}\gamma$ em 143 pacientes negros americanos com anemia falciforme. O nucleotídeo T estava presente em todos os cromossomos com o haplótipo Sen, sendo que dos 255 cromossomos restante que possuíam outros haplótipos, apenas dois possuíam o nucleotídeo mutado nessa posição. Houve correlação significativa, dose-dependente, entre a presença deste polimorfismo e o aumento da razão de cadeias $^{G}\gamma/^{A}\gamma$. Entretanto, não houve diferença significativa entre os níveis de Hb F e a presença do polimorfismo, sugerindo que a presença do polimorfismo mantém a razão $^{G}\gamma/^{A}\gamma$ como na vida fetal, mas não causa necessariamente a elevação da Hb F.

Padmos *et al.* (1991) comparam as características de indivíduos com anemia falciforme de duas províncias da Arábia Saudita. Todos os pacientes da província oriental possuíam o haplótipo Árabe-Indiano, enquanto os pacientes da província ocidental possuíam predominantemente o haplótipo Ben. Os pacientes da província oriental tinham, adicionalmente, maior frequência de α-Tal (frequência gênica: 0,375 *vs* 0,196; p=0,033), maior média de Hb total (10,27±1,46g/dl *vs* 8,89±1,3g/dl; p<0,001), de

Hb fetal (13,34±4,4% *vs* 6,28±3,58%; p<0,001) e menor média de Hb A_2 (2,18±0,74% *vs* 2,91±0,91%; p<0,001), VCM (82,4±13,6fl *vs* 90,8±8,2fl; p=0,007), reticulócitos (5,9±3,5% *vs* 9,4±3,2; p<0,001) e plaquetas (400±194x10^9/l *vs* 495±136x10^9/l; p=0,044). Os pacientes da província oriental tiveram maior persistência de esplenomegalia (53% *vs* 30%; p=0,024), desenvolvimento corporal mais próximo do normal e maior espessura da prega subescapular. Os pacientes da província ocidental apresentaram mais episódios de dactilite (10/18 *vs* 0/18; p<0,001), icterícia (79% *vs* 50%; p=0,025), STA (2,4 *vs* 0,7 por 100 pacientes/ano; p=0,011) e transfusões (90% *vs* 59%; p=0,006). As crises dolorosas e a necrose avascular da cabeça femoral foram comuns e ocorreram igualmente em ambos os grupos. As características da doença na província oriental foram mais suaves, compatíveis com os níveis mais elevados de Hb F e alta prevalência de α-Tal, porém as patologias ósseas (crises de dor, necrose avascular da cabeça femoral e osteomielite) foram comuns em ambos os grupos. A doença na província ocidental foi mais grave, compatível com o haplótipo Ben, sugerindo uma origem africana da mutação β^S.

Com objetivo de encontrar variações no DNA específicas para os haplótipo β^S clássicos, Dimovski *et al.* (1991) avaliaram 100 adultos e 57 recém-nascidos negros com anemia falciforme, todos do sudeste dos Estados Unidos. Todos os 134 cromossomos portadores do haplótipo Ben foram positivos para substituição G→T na posição -657 a 5´ do gene $^A\gamma$, enquanto 132 desses mesmos cromossomos foram positivos para substituição C→G na posição -369 a 5´ do gene $^G\gamma$. Nenhum outro cromossomo portador de um dos haplótipos β^S clássicos foi positivo para essas substituições. Todos os 54 cromossomos portadores do haplótipo CAR apresentaram três mutações exclusivas deste haplótipo: 1) uma substituição C→T na posição -271 a 5´ do gene $^A\gamma$; as substituições CG→TT nas posições -1105 e -1106 a 5´ do gene $^G\gamma$; e uma deleção de 6 pb entre as posições -403 e -390 a 5´ do gene $^G\gamma$. Como já descrito anteriormente, a substituição C→T na posição -158 a 5´do gene $^G\gamma$ estava presente apenas nos cromossomos do tipo Sen e Árabe-Indiano.

Em um estudo realizado com 40 pacientes com anemia falciforme originários de diferentes regiões de Camarões e tratados no hospital central da capital Yaoundé, Lapoumeroulie *et al.* (1992) descreveram uma nova mutação β^S africana com origem diferente das demais, chamada de "Camarões". Dos 80 cromossomos avaliados, 13

possuíam o novo padrão. O haplótipo Cam difere de todos os outros em ambas as regiões 5´ e 3´ de um ´´sítio quente`` (*hot spot*) de recombinação do agrupamento de genes da β-globina (Chakravarti et al., 1984). A principal diferença na região 5´ é a presença do sítio de restrição para a enzima HindIII na região IVS2 do gene $^{A}\gamma$. Na região 3´, a principal diferença é a ausência do sítio de restrição para enzima BamHI observado a 8 kb *downstream* em todos os outros haplótipos β^{S} africanos. Este sítio também não é observado no haplótipo Árabe-Indiano. Como no haplótipo Árabe-Indiano, a ausência deste sítio é intrinsecamente ligada à ausência do sítio para a enzima HinfI próximo ao final do gene β na região 3´. A autenticidade da nova mutação β^{S} é fundamentada nas seguintes evidências: este gene está em desequilíbrio de ligação com um novo haplótipo do agrupamento de genes da β-globina, chamado de "Camarões"; este gene está presente em homozigose nesta parte da África; e todos os indivíduos homozigotos pertencem a um único grupo étnico (Eton), que vive em uma área restrita do vale do rio Sanaga, ao norte da capital Yaoundé. Outra evidência molecular da singularidade deste haplótipo é a configuração distinta da região polimórfica localizada entre -1100 e -400 a 5´ do gene da β^{S}-globina, pela presença da sequência específica $(AT)_8T_5$, diferente das observadas nos outros haplótipos β^{S}. Essas observações sustentam fortemente a hipótese da presença de outra mutação β^{S} de origem independente no continente africano.

Em um estudo realizado com crianças com idade abaixo de cinco anos, Green *et al.* (1993) correlacionaram parâmetros hematológicos com diferentes haplótipos β^{S} em pacientes falcêmicos africanos. Os pacientes que possuíam pelo menos um cromossomo com o haplótipo Sen (Sen/Sen e Ben/Sen) foram comparados com um grupo de pacientes com os haplótipos Cam e Ben (Cam/Cam, Ben/Cam e Ben/Ben). Os pacientes que possuíam um ou dois cromossomos com o haplótipo Sen tiveram concentração mais elevada de Hb F do que os que não possuíam (1,48 *vs* 1,16; $p<0,001$). Este grupo também apresentou relação de globinas $^{G}\gamma/^{A}\gamma$ mais alta (2,03 *vs* 0,85; $p<0,001$), refletindo o atraso na mudança da globina $^{G}\gamma$ para a globina $^{A}\gamma$ adulta. Os níveis de Hb total também foram maiores neste grupo (8,3 g/dL *vs* 7,5 g/dL; $p=0,02$). O grupo de pacientes com o genótipo Cam/Cam apresentou níveis de globina $^{A}\gamma^{T}$ significativamente mais elevado que o grupo Ben/Ben.

De Montalembert *et al.* (1993) estudaram os efeitos dos haplótipos em 120 pacientes franceses com anemia falciforme e homozigotos para diferentes haplótipos β^{S}.

Trinta e sete eram homozigotos para o haplótipo CAR, 57 eram homozigotos para o haplótipo Ben e 26 homozigotos para o haplótipo Sen. Os níveis de Hb F foram maiores nos pacientes Sen/Sen (12,4%±6,5%) quando comparados com os pacientes CAR/CAR (6,5%±5,3%; p=0,0001) e os pacientes Ben/Ben (7,2%±5,6%; p=0,0001). Não houve diferença na prevalência das complicações estudadas de acordo com os haplótipos β^S (osteomielite, meningite, septicemia, pneumopatias incluindo STA, ocorrência de três ou mais crises álgicas por ano, AVC, necrose da cabeça do fêmur, priapismo e SEA). A comparação foi novamente realizada estratificando-se os grupos de acordo o número de genes alfa e, novamente, não houve diferenças significativas.

Em um estudo realizado com 51 crianças com anemia falciforme, Adekile e Huisman (1993) encontraram a seguinte relação entre os haplótipos β^S e os níveis de Hb F: os maiores níveis de Hb F foram encontrados nos pacientes com o genótipo Sen/Sen e os menores nos pacientes CAR/CAR; os dados dos pacientes com os genótipos Ben/Sen foram intermediários entre aqueles encontrados para os genótipos Sen/Sen e Ben/Ben, sendo que os observados para os pacientes com o genótipo CAR/Sen foram similar àqueles apresentados para os grupos com os genótipos Ben/Ben e CAR/CAR. Os níveis de Hb total, hematócrito e hemácias foram menores nos pacientes com os genótipos CAR/CAR e maiores nos Sen/Sen ou Ben/Sen. Pacientes acima de 10 anos com o genótipo Ben/Ben possuíam Hb total entre 6 e 10 g/dl, sendo que os pacientes com o genótipo CAR/CAR, depois dos 3-4 anos, mostraram nível de Hb total menor que 7 g/dL. O oposto foi observado para os pacientes com os genótipos Sen/Sen e Ben/Sen, nos quais o nível de Hb total manteve-se entre 7 e 9 g/dL.

Chan e Powars (1994) relataram que a incidência ajustada pela idade de todos os tipos de crises falciformes foi de 50,4 por 100 pacientes/ano no grupo Sen/Ben, 53,2 no Ben/Ben e 47,8 no CAR/Ben. Considerando apenas os principais eventos que causam hospitalização, tais com STA ou infarto ósseo, as incidências foram de 12,4 para o grupo Sen/Ben, 21,1 para Ben/Ben e 21,5 no grupo Ben/CAR (P<0,001).

Steinberg *et al.* (1995), estudando 384 adultos com anemia falciforme, demonstraram que a concentração de Hb F foi maior em mulheres do que em homens (8,2% *vs* 6,5%). Em 35 homens que eram homozigotos para o haplótipo Sen ou heterozigotos Ben/Sen a média de Hb F (8%) foi equivalente ao nível de Hb F em mulheres com os haplótipos Ben e CAR. Homens e mulheres homozigotos para o

haplótipo Sen ou heterozigotos Ben/Sen apresentavam concentração maior de Hb F quando comparados com os outros grupos. Em 44 mulheres com os genótipos Sen/Sen ou Ben/Sen a média de Hb F foi 10,9%, o maior valor observado dentre todos os grupos analisados. As mulheres com haplótipo Sen e níveis altos de Hb F apresentaram menos hemólise e maior valor de hematócrito. Os autores sugerem que o gênero e os haplótipos interagem significantemente na modulação dos níveis de Hb F em adultos com anemia falciforme.

Martinez *et al.* (1996), estudando 91 pacientes cubanos com anemia falciforme, encontraram diferenças nas frequências dos haplótipos β^S entre crianças e adultos, sugerindo diferenças na sobrevida dos pacientes com os diferentes tipos de haplótipos. Foi constatada uma diminuição do haplótipo CAR e um aumento dos haplótipos Sen e Ben nos adultos. Entretanto, outros estudos não encontraram diferença nas frequências dos haplótipos entre crianças e adultos (Keclard et al., 1997; Arends et al., 2000; Cuellar-Ambrosi et al., 2000).

Em um estudo realizado com 257 falcêmicos (Hb SS) jamaicanos de um coorte, Chang *et al.* (1995) determinaram a importância relativa do *locus* FCP (*F-cell production*), que estaria localizado no cromossomo Xp22.2, dos haplótipos CAR e Sen, do número de genes alfa, da idade e do gênero na variação dos níveis de Hb F. A análise de regressão linear mostrou que cada variável, quando analisada isoladamente, apresentava associação significativa com os níveis de Hb F ($p<0,05$). A análise de regressão múltipla, incluindo todas as variáveis, mostrou que o *locus* FCP seria o mais forte preditor, "explicando" 40% da variação dos níveis de Hb F. Os haplótipos, os genes alfa e a idade "explicavam" menos de 10% da variação dos níveis de Hb F. A associação dos haplótipos com os níveis de Hb F tornou-se aparente quando a influência do *locus* FCP era removida, estratificando-se a análise pelo fenótipo de FCP. O efeito dos haplótipos era principalmente causado pelo tipo Sen, que possuía uma associação positiva com os níveis de Hb F. A influência negativa do haplótipo CAR contribuía pouco para a variação dos níveis de Hb F (Chang et al., 1995). Um estudo semelhante foi realizado com 112 pacientes franceses, para verificar a validade dos achados em uma população diferente. A principal modificação metodológica foi incluir apenas pacientes homozigotos para os três principais haplótipos africanos (Ben, CAR e Sen). Na análise de regressão linear apenas o *locus* FCP, os haplótipos β^S e a idade foram associados com os níveis de Hb F. A média dos níveis de Hb F nos haplótipos Ben, CAR e Sen foi

6,7±5%, 5,1±3,7% e 11,6±7,3%, respectivamente. Os haplótipos "explicariam" 12% da variação dos níveis de Hb F na análise univariada. A análise de regressão múltipla mostrou que em pacientes do sexo feminino apenas o *locus* FCP e os haplótipos tiveram associação significativa, representando 41% e 14% da variação dos níveis de Hb F, respectivamente. Nos homens, apenas o locus FCP foi significativo, "explicando" 36% da variação dos níveis de Hb F. Quando a influência do *locus* FCP foi removida, os haplótipos foram significativos explicando 9% da variação dos níveis de Hb F (Chang et al., 1997). Posteriormente, novos estudos não comprovaram a existência do *locus* FCP no cromossomo X. Atualmente, sabe-se que 20% a 50% da variação dos níveis de Hb F em pacientes com anemia falciforme são atribuídos a três principais *loci*: o SNP C→T na posição -158 a 5´ do gene $^{G}\gamma$, a região intergênica HBS1L-MYB no cromossomo 6q e o gene BCL11A no cromossomo 2p15 (Thein e Menzel, 2009).

O estudo multicêntrico da hidroxiureia (*The multicenter study of Hydroxyurea*) foi um estudo duplo-cego, controlado por placebo, com objetivo de analisar a eficácia do tratamento com HU para pacientes com anemia falciforme. Este estudo começou em 1992 com 299 pacientes, sendo 152 randomizados para o tratamento com HU e 147 com placebo. O estudo terminou quatro meses antes do previsto por causa da evidência da eficácia da HU em comparação com o placebo na redução da frequência das crises vaso-oclusivas (Charache et al., 1995). Com objetivo de examinar um grupo de sequências no agrupamento de genes da β-globina que modulariam a expressão do gene γ em pacientes com anemia falciforme, Lu e Steinberg (1996) estudaram 60 dos 299 participantes do estudo multicêntrico da hidroxiureia, sendo 34 com os níveis mais elevados de Hb F (média de 12,2±2,4%), 19 com os níveis mais baixos (média de 0,7±0,2%) e sete com níveis de Hb F atípicos para os respectivos haplótipos β^{S}. Foram examinadas as seguintes regiões: LCR (*locus control region*) a 5´ do gene da ε-globina (sítios hipersensitivos 2 e 3), repetições $(AT)_X(T)_Y$ a 5´ do gene da β-globina, deleção de quatro pb na posição -222 a -225, a 5´ do gene $^{A}\gamma^{T}$, elementos promotores proximais dos genes $^{G}\gamma$ e $^{A}\gamma$, estrutura 5´ pré- $^{G}\gamma$ e IVS-II do gene $^{A}\gamma$. Destas regiões estudadas, todos os polimorfismos encontrados estavam sempre ligados a um haplótipo e nenhuma mutação adicional estava presente. Isso sugeria que variações nessas regiões são mecanismos incomuns da modulação de Hb F em pacientes com anemia falciforme.

El-Hazmi *et al.* (1999) avaliaram um grupo de pacientes com anemia falciforme para comparar características dos indivíduos em regiões onde formas leves e graves da

doença são encontradas. O grupo foi formado por 126 indivíduos, sendo 14 egípcios, nove sírios, 10 jordanianos e 93 sauditas. Os sauditas eram de três áreas diferentes da Arábia Saudita, sendo 22 do oriente, 67 do sudoeste e quatro do noroeste. Com base nas apresentações clínicas, os pacientes foram agrupados como tendo a doença leve ou grave. O haplótipo Ben, em homozigose ou heterozigose com outro haplótipo, foi encontrado nos pacientes com a doença categorizada com grave. A maioria dos sírios e jordanianos possuíam o haplótipo Ben e apresentavam a doença grave. Todos os pacientes sauditas do sudoeste e noroeste, onde a doença é geralmente grave, tiveram o haplótipo Ben, em homozigose ou heterozigose. Nos pacientes sauditas do oriente, onde a forma leve da doença prevalece, a maioria (91%) tinha o haplótipo Árabe-indiano, em homozigose ou heterozigose. Concluindo, o haplótipo Ben foi o mais frequente em todas as regiões com a forma grave da doença e o haplótipo Árabe-indiano foi predominante onde a doença foi classificada como leve.

Em uma coorte envolvendo 299 pacientes com anemia falciforme de quatro centros especializados de Paris, na França, a frequência de meningites encontrada foi menor em pacientes homozigotos ou heterozigotos para o haplótipo Sen ($p<0,04$). De forma similar, a frequência de osteomielite foi menor em pacientes homozigotos ou heterozigotos para o haplótipo CAR ($p<0,02$). O número de pacientes portadores do haplótipo Sen, em homozigose ou heterozigose, foi menor no grupo assintomático do que no grupo sintomático ($p<0,04$). O VCM dos pacientes homozigotos para o haplótipo CAR foi significantemente inferior quando comparado com os pacientes homozigotos para os haplótipos Ben e Sen ($p<0,0001$), no entanto não houve associação entre os haplótipos β^S e os níveis de Hb total e Hb F. Não houve correlação entre os haplótipos β^S e a ocorrência de STA, AVC, crises álgicas e anemia aguda (crise aplástica, SEA ou anemia aguda devido a outras causas, principalmente por infecções) (Neonato et al., 2000).

Sarnaik e Ballas (2001) avaliaram a influência dos haplótipos β^S em 41 pacientes com anemia falciforme que se apresentaram ao hospital pediátrico de Michigan com sintomas e sinais clínicos de AVC. A maioria dos pacientes (31%) era duplo heterozigota para o Ben/CAR, seguido por Ben/Ben, Ben/Sen, e CAR/CAR. Todos os pacientes com o genótipo CAR/CAR eram do sexo masculino e possuíam quatro genes alfa. Três pacientes eram heterozigotos para o haplótipo Cam. O haplótipo Cam e os

haplótipos atípicos foram mais prevalentes nesta população do que na população com anemia falciforme em geral. Crianças com quatro ou mais genes alfa, com os genótipos Ben/CAR, atípicos ou CAR/CAR parecem estar em maior risco para o AVC do que outros pacientes, de acordo com os resultados deste trabalho.

Para estudar o efeito epistático dos haplótipos β^S em manifestações clínicas e laboratoriais de 50 pacientes libaneses com anemia falciforme, Inati *et al.* (2003) dividiram os pacientes da seguinte forma: grupo 1 consistiu de pacientes homozigotos para o haplótipo Ben; grupo 2 consistiu de pacientes com pelo menos um haplótipo CAR; e o grupo 3 consistiu de pacientes portadores dos haplótipos Árabe-Indiano/n ou Sen/n, onde n significa qualquer haplótipo exceto o CAR. O nível de Hb total nos grupos 1 e 2 foram significantemente menores do que aqueles do grupo 3. Não houve diferença nos grupos analisados com relação aos níveis de Hb F, Hb A_2 e contagem de leucócitos. Não houve diferença significativa nos grupos analisados com relação a manifestações clínicas da doença.

Em um estudo prospectivo envolvendo 153 crianças com anemia falciforme acompanhadas em Guadalupe, não foi encontrado diferença na ocorrência de eventos clínicos agudos (infecções, SEA, crise aplástica, crise álgica, STA e AVC) nos grupos portadores de diferentes haplótipos β^S. Também não houve diferença na frequência dos haplótipos β^S nos grupos classificados como sintomático ou assintomático. Entretanto, a predominância do haplótipo Ben (82,5%) provavelmente dificultou a detecção de eventual associação entre os haplótipos β^S e os eventos agudos (Tarer et al., 2006).

Rahimi *et al.* (2006) estudaram 52 indivíduos com anemia falciforme de diferentes províncias do sul do Irã com o objetivo de investigar a influência dos haplótipos β^S e da α-Tal em características hematológicas da anemia falciforme. Na análise estratificada considerando-se apenas os pacientes com três genes alfa ativos, a presença do haplótipo Árabe-Indiano em homozigose resultou em um menor nível de Hb S (63,7%) e maior nível de Hb total (10,8 g/dL) quando comparados com pacientes heterozigotos para o haplótipo Árabe-Indiano (68,2%; 10,5 g/dL) e pacientes homozigotos para o haplótipo Ben (79,3%, 10 g/dL).

Taylor *et al.* (2008) analisaram uma coorte de 282 pacientes adultos com doença falciforme, com o objetivo de determinar o papel de mutações e polimorfismos dos genes das cadeias globina no risco de desenvolver hipertensão pulmonar. Associações

significativas foram encontradas entre quatro marcadores genéticos presentes no *locus* da β-globina e a ocorrência de hipertensão pulmonar. Entretanto os haplótipos β^S não parecem ter um forte efeito sobre a prevalência de hipertensão pulmonar.

A Tabela 7 resume os achados dos principais trabalhos envolvendo os haplótipos β^S que foram abordados acima.

Os estudos relatados acima comprovam que ainda existem muitas controvérsias quando se tenta estabelecer associação dos haplótipos com as manifestações clínicas e hematológicas da anemia falciforme, confirmando a necessidade de estudos complementares, bem como a elaboração de novas abordagens.

Adicionalmente, a maioria desses estudos tem sido realizada em regiões onde o alelo β^S foi introduzido por fluxo migratório e depois de muitos anos de mistura genética, o que geralmente leva a uma grande proporção de heterozigotos compostos para dois haplótipos diferentes. Essas e outras misturas genéticas complicam a interpretação da associação dos haplótipos β^S com o fenótipo.

Os relatos sobre os efeitos dos haplótipos β^S nas características clínicas e hematológicas da anemia falciforme devem ser vistos com cuidado, pois muitas vezes os estudos foram realizados com poucos pacientes, a idade dos pacientes difere entre os estudos, os eventos clínicos podem não ter sido seguramente definidos e as distinções entre homozigotos e heterozigotos não são sempre bem delineados (Steinberg, 2009). É preciso enfatizar, também, que os indivíduos estão sujeitos a grandes variações ambientais, tais como alimentação, qualidade da assistência médica, padrão socioeconômico e susceptibilidade a infecções.

Tabela 7 - Sinopse dos principais estudos envolvendo os haplótipos β^S abordados na revisão de literatura

Referência	Origem da casuística	Nº amostral	Achado(s) relevante(s) do estudo
(Labie *et al.*, 1985)	Benin e Senegal	34	Portadores do haplótipo Ben exibiram menor concentração de cadeias $^G\gamma$ e de Hb F quando comparados com os portadores do haplótipo Sen.
(Nagel et al., 1985)	Benin e Senegal		Houve relação entre o haplótipo Sen e níveis mais elevados de Hb F, predomínio das cadeias $^G\gamma$ nas Hb F, menor proporção de hemácias densas e menor percentagem de células falciformes irreversíveis quando comparados com portadores do haplótipo Ben.
(Gilman e Huisman, 1985)	Geórgia, Estados Unidos	41	A presença do polimorfismo C→T na posição -158 a 5´ do gene $^G\gamma$ associou-se com níveis elevados de cadeias $^G\gamma$.
(Schroeder et al., 1989)	Califórnia, Estados Unidos	283	Níveis de Hb F (%), Hb F absoluta, cadeia $^G\gamma$ absoluta foram significativamente maiores no grupo com genótipo Sen/Ben seguido dos Ben/Ben e dos Ben/CAR.
(Powars et al., 1990)	Los Angeles, Geórgia e Nova York, Estados Unidos	221	Indivíduos com pelo menos um cromossomo Sen tiveram incidência menor de todos os eventos clínicos estudados. O haplótipo CAR foi associado com aumento do risco de vasculopatias obstrutivas nos tecidos moles, incluindo cérebro, rins, pulmões e úlcera nas pernas.
(Nagel et al., 1991)	Nova York, Estados Unidos	66	Presença de pelo menos um cromossomo do tipo Sen foi associado a níveis mais elevados de hemoglobina, Hb F absoluta, cadeias $^G\gamma$ e a níveis significativamente menores de reticulócitos, células densas, LDH e bilirrubina quando comparados com indivíduos sem o haplótipo Sen.
(Ballas *et al.*, 1991)	Pensilvânia, Estados Unidos	143	Correlação significativa, dose-dependente, entre a presença do polimorfismo C→T na posição -158 a 5´ do gene $^G\gamma$ e o aumento da razão de cadeias $^G\gamma/\,^A\gamma$.
(Montalembert et al., 1993)	França	120	Os níveis de Hb F foram significativamente maiores nos pacientes Sen/Sen quando comparados com os pacientes CAR/CAR e os Ben/Ben.

(Chan e Powars, 1994)	Califórnia, Estados Unidos		Incidência ajustada pela idade de todos os tipos de crises falciformes foi de 50,4 por 100 pacientes/ano no grupo Sen/Ben, 53,2 no Ben/Ben e 47,8 no CAR/Ben.
(Martinez *et al.*, 1996)	Cuba	91	Foi constatada uma diminuição do haplótipo CAR e um aumento dos haplótipos Sen e Ben nos adultos, sugerindo diferenças na sobrevida dos pacientes com os diferentes tipos de haplótipos.
(Figueiredo *et al.*, 1996)	Campinas e São Paulo, Brasil	85	Nível médio de Hb F estatisticamente inferior nos indivíduos com o haplótipo CAR quando comparados com os Ben.
(El-Hazmi et al., 1999)	Arábia	126	O haplótipo Ben foi o mais frequente em todas as regiões com a forma grave da doença e o haplótipo Árabe-indiano foi predominante onde a doença foi classificada como leve.
(Neonato et al., 2000)	Paris, França	299	Frequência de meningites foi menor em homozigotos ou heterozigotos para o haplótipo Sen. Frequência de osteomielite menor em homozigotos ou heterozigotos para o haplótipo CAR. Número de portadores do haplótipo Sen, em homozigose ou heterozigose, foi menor no grupo assintomático do que no grupo sintomático. O VCM dos homozigotos para o haplótipo CAR foi significantemente inferior quando comparado com os homozigotos Ben/Ben e Sen/Sen.
(Luporini et al., 2001)	São Paulo, Brasil	41	Velocidade de crescimento estatisticamente menor em crianças com o genótipo CAR/CAR quando com parados com as Ben/Ben.
(Adorno et al., 2008)	Bahia, Brasil	125	Pelo menos um haplótipo CAR estava presente em todos os pacientes com histórico de AVC.

3.72 A Talassemia Alfa

O agrupamento de genes da α-globina está localizado no braço curto do cromossomo 16. Nos seres humanos, os genes α são duplicados e, dessa forma, um indivíduo normal possui quatro genes alfa ativos, dois em cada cromossomo 16 (αα/αα) (Higgs et al., 1989). Os éxons dos genes α1 e α2 são homólogos e codificam proteínas idênticas. Apesar dessa homologia, o gene α2 apresenta uma expressão de duas a três vezes maior que o gene α1 (Liebhaber et al., 1986). Os genes da α-globina são divididos em três éxons (I, II e III) e dois íntrons (IVS-1 e IVS-2) (Higgs et al., 1989).

A α-Tal constitui um grupo de doenças hereditárias, de distribuição mundial, causada pela deficiência da síntese de cadeias alfa da globina (Cançado, 2006).

As formas de α-Tal são resultantes da deficiência de um, dois, três ou dos quatro genes α. Seus portadores são caracterizados segundo o número de genes afetados: portador silencioso, no qual um gene α é afetado; traço α-talassêmico, no qual dois genes α são afetados; doença da hemoglobina H, na qual três genes α são afetados; e síndrome da hidropsia fetal por hemoglobina Bart, onde todos os quatro genes α são afetados (Naoum, 1997). A deleção de um gene α por cromossomo é classificada como α^{+}-talassemia ou α-talassemia 2, e a deleção de ambos os genes por cromossomo é classificada como α^{0}-talassemia ou α-talassemia 1.

A causa mais comum de α-Tal são deleções no cromossomo 16p13.3, envolvendo o agrupamento de genes α; uma porcentagem mínima é causada por mutações de ponto.

As sete deleções mais comum que causam a α-Tal são: $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ que atingem apenas um gene da α-globina, e as deleções que atingem os dois genes da α-globina em *cis*, como os alelos $--^{SEA}$, $--^{FIL}$, e $--^{THAI}$, muito comuns no sudeste da Ásia, e os alelos $--^{MED}$ e $-(\alpha)^{20.5}$ que ocorrem com mais frequência no Mediterrâneo (Tan et al., 2001).

Essas mutações provavelmente tiveram origem num *crossing over* desigual entre os genes α1 e α2 (Higgs et al., 1989). A deleção $-\alpha^{3.7}$ é originada por um *crossing-over* desigual entre regiões homólogas do cromossomo 16, deletando 3.7 kb de DNA, e

deixando um gene α_2 simples ou, mais comumente, um gene α_2/α_1 híbrido em uma das fitas do cromossomo meiótico que sofre o *crossing-over* e três genes α na fita complementar, que mais comumente tende a se perder nas divisões celulares subsequentes (Higgs et al., 1984). A deleção $-\alpha^{3.7}$ é heterogênea e possui três subtipos diferentes (I, II ou III) dependendo da localização exata do ponto de quebra (*breakpoint*) da mutação no gene. O tipo I é prevalente nos africanos e americanos enquanto o tipo III é prevalente em asiáticos (Ballas, 2001). A figura 9 representa um *crossing-over* desigual entre dois genes α, resultando em α^+-talassemia em um dos cromossomos e outro cromossomo com três genes α.

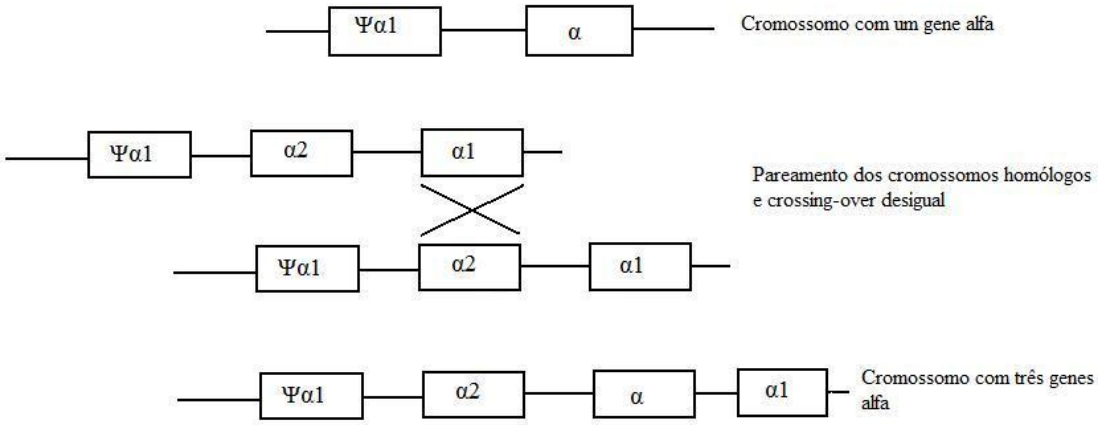


Figura 9 - *Crossing-over* desigual entre os dois cromossomos 16 dando origem a α^+-talassemia

A diminuição ou ausência da síntese da cadeia alfa causa o acúmulo de cadeias beta cuja síntese não foi afetada. O "excesso" de cadeias beta livre se junta para formar tetrâmeros de globinas β_4, resultando na produção de uma hemoglobina anormal denominada hemoglobina H (Hb H). A concentração de Hb H é inversamente proporcional à quantidade de síntese da cadeia alfa. Nos recém-nascidos, a diminuição da síntese de cadeias alfa afeta sua relação com a globina gama normalmente

sintetizada, formando assim tetrâmeros de γ_4, resultando na hemoglobina de Bart (Naoum, 1997).

O portador silencioso (-α/αα) é o tipo mais comum entre as α-Tal. Resulta numa forma da doença praticamente assintomática e com alterações laboratoriais mínimas ou ausentes, o que dificulta o seu diagnóstico por técnicas laboratoriais convencionais. O portador desse tipo de α-Tal apresenta o VCM discretamente reduzido (VCM < 80), a morfologia eritrocitária é quase sempre normal, com microcitose em algumas células (Naoum, 1997; Cançado, 2006).

Os portadores do traço α-talassêmico, correspondentes à perda de dois genes alfa (-α/-α ou --/αα), têm anemia leve (Hb geralmente entre 11,0 e 13,0 g/dL), hemácias hipocrômicas e microcíticas (VCM entre 75 e 80 fl), anisopoiquilocitose discreta e presença de hemoglobina Bart (5% a 10%) ao nascimento. A hemoglobina H formada na vida adulta é rapidamente destruída pela própria hemácia, o que dificulta a sua detecção (Cançado, 2006). Os pacientes, apesar de serem normais sob o ponto de vista clínico, podem queixar-se de fraqueza, cansaço, dores nas pernas e palidez (Naoum, 1997).

A doença da hemoglobina H é causada pela deleção de três genes α (--/-α). Os portadores dessa forma apresentam 25% a 50% de hemoglobina Bart ao nascimento e 5% a 30% de hemoglobina H na vida adulta. O quadro clínico e laboratorial se expressa de uma forma mais grave, caracterizado por anemia (Hb entre 8,0 e 11,0 g/dl), microcitose (VCM entre 55 e 65 fl), hipocromia e poiquilocitose, presença de hemácias policromatófilas e de hemácias em alvo, icterícia, esplenomegalia e Hb H atingindo concentrações de até 30%. A Hb H apresenta alta afinidade pelo oxigênio (dez vezes maior que a Hb A), tornando sua liberação para as células e tecidos muito lenta e difícil (Naoum, 1997; Cançado, 2006).

A hidropsia fetal é a forma mais grave de α-Tal, pois causa a morte fetal intra-uterina ou logo após o nascimento. As crianças recém-nascidas afetadas pela deleção dos quatro genes α (--/--) apresentam anemia muito grave, com Hb inferior a 7 g/dl, hipocromia, microcitose, anisopoiquilocitose, concentração de hemoglobina Bart entre 80 e 100% e da Hb H entre 10 e 20%, além do aumento significativo da porcentagem de eritroblastos (Naoum, 1997; Cançado, 2006).

A Tabela 8 correlaciona os genótipos de α-Tal com o seu respectivo número de genes α funcional e a proporção da quantidade de produção de cadeias alfa.

Tabela 8 – Genótipos de α-Tal: nomenclatura, números de genes α e proporção de produção de cadeias alfa

Tipo de α-Talassemia	**Número de genes alfa funcional**	**Genótipo**	**Produção da cadeia alfa**
Normal (ausência de α-Tal)	4	αα/αα	100%
Portador silencioso	3	-α/αα	75%
Traço alfa-talassêmico	2	-α/-α ou --/αα	50%
Doença da hemoglobina H	1	α-/--	25%
Hidropsia fetal	0	--/--	0%

Fonte: Heidenreich, 2005

A α-Tal, dentre os defeitos genéticos das hemoglobinas, é a mais prevalente em quase todos os continentes. A frequência de α^{+}-talassemia é elevada em populações da Ásia e da Oceania (China, Tailândia, Indonésia entre outros países) e da região do mediterrâneo (principalmente Itália e Grécia) podendo chegar até a 80%. Em países do Oriente Médio (Arábia Saudita, Irã e Turquia) essa frequência pode atingir 60%. No continente africano e em alguns países da América (Canadá, Estados Unidos, México, Caribe, Jamaica, Venezuela, Argentina), a frequência de α^{+}-talassemia pode chegar a 40%. Quanto à α^{0}-talassemia, sua ocorrência significativa limita-se às regiões do Mediterrâneo e do sudeste Asiático (Weatherall, 2004).

No Brasil, a prevalência de α-Tal se relaciona diretamente com as diferentes etnias estrangeiras que formaram e compõem a população de determinada região. O tipo de deleção que levam à α-Tal é quase que exclusivamente a do tipo 3.7 (Cançado, 2006).

Estima-se que na população brasileira, a prevalência do portador silencioso seja de 10% a 20% e 1% a 3% do traço alfa-talassêmico. Entretanto, se considerarmos os

indivíduos afro-descendentes, essa frequência pode alcançar 20% a 25% (Cançado, 2006).

Em um estudo realizado com 47 doadores de sangue negro do estado de São Paulo, estimou-se a prevalência de 21,3% de portadores silenciosos ($\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$) e 2,1% de portadores do traço α-talassêmico (Sonati et al., 1991).

A α-Tal é uma das hemoglobinopatias de diagnóstico mais difícil. O diagnóstico molecular é a única forma de confirmar o genótipo e diferenciar os tipos de deleção que a causam.

3.721 A Co-herança de Talassemia Alfa na Anemia Falciforme

A possibilidade da interação de α-Tal interferir no curso clínico da anemia falciforme vem sendo investigada exaustivamente devido à melhoria do quadro clínico do portador da interação em comparação com a anemia falciforme isoladamente (el-Hazmi, 1992; Thomas et al., 1997).

A α-Tal exerce três principais impactos na anemia falciforme: 1) modifica os parâmetros hematológicos e modifica a heterogeneidade da densidade das hemácias; 2) afeta a sobrevida geral dos pacientes; e 3) afeta diferencialmente a frequência individual de complicações clínicas (Nagel, 1991).

De acordo com a literatura disponível os índices hematológicos de pacientes com anemia falciforme são modificados pela coexistência de α-Tal. Apesar de algumas divergências, a maioria dos estudos mostram um aumento do número de hemácias, dos níveis de Hb total e hematócrito, e a diminuição dos níveis de VCM, HCM, CHCM, reticulócitos, contagem de leucócitos e da taxa de hemólise. A coexistência de α-Tal parece não interferir nos níveis de Hb F e plaquetas, e o real efeito sobre os níveis de bilirrubina e de Hb A_2 permanece controverso. A Tabela 9 resume os efeitos de α-Tal em índices hematológicos da anemia falciforme.

A deformabilidade de hemácias falciformes de indivíduos que possuem a coexistência de α-Tal é maior do que a dos pacientes sem a α-Tal (Serjeant et al., 1983; Ballas et al., 1988). Além disso, indivíduos com a coexistência têm menor número de células densas e de células falcêmicas irreversíveis. Esses achados sugerem que as hemácias em indivíduos com α-Tal são menos desidratadas, uma vez que tanto as células densas e as células falcêmicas irreversíveis são populações de células conhecidas por serem altamente desidratadas (Embury et al., 1984; Fabry et al., 1984; Noguchi et al., 1985). As hemácias falcêmicas densas são mais suscetíveis a danos mecânicos, provavelmente devido à diminuição da estabilidade da membrana (Messmann et al., 1990). Como os indivíduos com a coexistência de α-Tal possuem número reduzido de células densas, é provável que suas hemácias possuam menor fragilidade mecanicamente. Isto, provavelmente, pode ser um fator que contribui para a diminuição da taxa hemolítica observada nestes indivíduos (de Ceulaer et al., 1983; Felice et al., 1987; Chaar et al., 2006; Bernaudin et al., 2008).

Tabela 9 – Efeito da α-Tal em alguns índices hematológicos da anemia falciforme*

Índices Hematológicos	Efeito de α-Tal	Referências	
Número de Hemácias	**Aumenta**	(Higgs et al., 1982; Stevens et al., 1986; Felice et al., 1987; Mukherjee et al., 1997; Mukherjee et al., 1998; el-Hazmi e Warsy 1999; Mouele et al., 1999; Mouele et al., 2000; Quadri et al., 2000)	
Hb total	**Aumenta**	(Embury et al., 1982; Higgs et al., 1982; Noguchi et al., 1985; Felice et al., 1987; Schroeder et al., 1989; Steinberg et al., 1995; Braden et al., 1996; Figueiredo et al., 1996; Serjeant et al., 1996; Mukherjee et al., 1997; Mukherjee et al., 1998; Mouele et al., 1999; Mouele et al., 2000; Hsu et al., 2003; Chaar et al., 2006; Tarer et al., 2006; Adorno et al., 2008; Bernaudin et al., 2008)	
VCM	**Reduz**	(Higgs et al., 1982; Stevens et al., 1986; Felice et al., 1987; Costa et al., 1989; Schroeder et al., 1989; Adekile e Haider 1996; Figueiredo et al., 1996; Mukherjee et al., 1997; Mukherjee et al., 1998; el-Hazmi e Warsy 1999; Guasch et al., 1999; Mouele et al., 1999; Mouele et al., 2000; Neonato et al., 2000; Quadri et al., 2000; Wali et al., 2002; Hsu et al., 2003; Adorno et al., 2004; Tarer et al., 2006; Adorno et al., 2008; Bernaudin et al., 2008)	
HCM	**Reduz**	(Higgs et al., 1982; Adekile e Haider 1996; Mukherjee et al., 1997; Mukherjee et al., 1998; el-Hazmi e Warsy 1999; Mouele et al., 2000; Quadri et al., 2000; Wali et al., 2002; Adorno et al., 2004; Rahimi et al., 2006; Adorno et al., 2008)	
Hematócrito	**Aumenta**	(Embury et al., 1982; Serjeant et al., 1983; Schroeder et al., 1989; Platt et al., 1991; Braden et al., 1996; Mukherjee et al., 1998; Mouele et al., 1999; Mouele et al., 2000; Adorno et al., 2004; Adorno et al., 2008; Bernaudin et al., 2008)	
CHCM	**Reduz**	(Higgs et al., 1982; Milner et al., 1986; Guasch et al., 1999)	
Hb F	**Provavelmente sem relação**	**Reduz:** (Higgs et al., 1982; Gupta et al., 1991;Chang et al., 1995)	**Sem relação:** (Aluoch et al., 1986; Stevens et al., 1986; Felice et al., 1987; Ojwang et al., 1987; Schroeder et al., 1989; Adekile e Huisman 1993; Green et al., 1993; Steinberg et al., 1995; Braden et al., 1996; Chang et al., 1997; Mukherjee et al., 1997; Mukherjee et al., 1998; el-Hazmi e Warsy 1999; Mouele et al., 2000; Neonato et al., 2000; Quadri et al., 2000; Rahimi et al., 2006; Adorno et al., 2008)
Hb A2	**Controverso**	**Aumenta:** (Higgs et al., 1982; Stevens et al., 1986; Schroeder et al., 1989; Mukherjee et al., 1998; Mouele et al., 1999; Mouele et al., 2000)	**Sem relação:** (Falusi et al., 1987; Ojwang et al., 1987; el-Hazmi e Warsy 1999; Rahimi et al., 2006)
Plaqueteometria	**Sem influência**	(Stevens et al., 1986; Guasch et al., 1999; Mouele et al., 1999)	
Reticulócitos	**Reduz**	(Embury et al., 1982; Higgs et al., 1982; Stevens et al., 1986; Steinberg et al., 1995; Tarer et al., 2006; Bernaudin et al., 2008)	
Células falcêmicas irreversiveis	**Reduz**	(Higgs et al., 1982; Embury et al., 1984)	
Níveis séricos de bilirrubina	**Controverso**	**Aumenta:** (Higgs et al., 1982; Chaar et al., 2006; Vasavda et al., 2007)	**Sem relação:** (Adekile et al., 2005; Martins et al., 2008)
Leucóciotos	**Reduz**	(Mouele et al., 1999; Mouele et al., 2000; Bernaudin et al., 2008)	
Células densas	**Reduz**	(Fabry et al., 1984; Billett et al., 1986)	
Taxa de hemólise	**Reduz**	(de Ceulaer et al., 1983; Felice et al., 1987; Chaar et al., 2006; Bernaudin et al., 2008)	

* Os efeitos foram os descritos pelos artigos; possíveis erros metodológicos dos trabalhos não foram levados em consideração.

Os Efeitos benéficos da α-Tal em propriedades reológicas das hemácias de indivíduos com anemia falciforme, mostradas na Tabela 10, são compensadas pelo aumento da viscosidade sanguínea devido aos níveis mais elevados de hematócrito conferido pela presença da α-Tal (Embury et al., 1982; Serjeant et al., 1983; Schroeder et al., 1989; Platt et al., 1991; Braden et al., 1996; Mukherjee et al., 1998; Mouele et al., 1999; Mouele et al., 2000; Adorno et al., 2004; Bernaudin et al., 2008). Entretanto, a adesão de hemácias falciformes ao endotélio in vivo, poderia, teoricamente, ser afetada pela presença de α-Tal, reduzindo a capacidade adesão destas ao endotélio (Joneckis et al., 1993; Swerlick et al., 1993). O maior nível de hematócrito e aumento da viscosidade sanguínea, por outro lado, poderia aumentar a adesão célula-célula na vasculatura. Dessa forma, os efeitos da α-Tal na fisiopatologia da anemia falciforme ainda não são inteiramente entendidos e poderiam ser danosos em algumas situações (Ballas, 2001).

Tabela 10 - Efeitos da α-Tal em propriedades reológicas das hemácias
Maior deformabilidade da hemácias
Menor desidratação celular
Menor nº de células falciformes irreversíveis
Menor nº de células densas
Menor fragilidade mecânica celular
Aumento da viscosidade do sangue
Menor adesão às células endoteliais

Fonte: Ballas, 2001

Devido à variabilidade amostral e inadequação metodológica em vários estudos, há controvérsias, contudo, sobre os efeitos da α-Tal nas complicações clínicas da anemia falciforme. Alguns estudos foram capazes de identificar diferenças nas manifestações clínicas entre grupos de indivíduos com anemia falciforme, com e sem a co-herança da α-Tal. A maioria dos estudos aponta para diminuição de eventos como AVC e ulcerações nas pernas, função esplênica preservada e provavelmente aumento na sobrevida. Por outro lado, haveria susceptibilidade maior a manifestações clínicas como crises de dor, osteonecrose e esplenomegalia. A Tabela 11 resume os efeitos da α-Tal nos eventos clínicos agudos da anemia falciforme de acordo com estudos disponíveis na literatura.

A Tabela 12 resume os efeitos de α-Tal nos em outros eventos da anemia falciforme de acordo com estudos disponíveis na literatura.

Aparentemente, os efeitos da α-Tal sobre os eventos clínicos e dados hematológicos da anemia falciforme podem variar de acordo com a população de pacientes estudados.

Kato (2007) propôs subfenótipos para pacientes com anemia falciforme, onde a co-herança da α-Tal influenciaria na ocorrência das complicações (Figura 10). No lado direito da figura são mostradas informações relativas ao primeiro subfenótipo, que é caracterizado pela ausência da co-herança de α-Tal, hemólise intensa e consequentemente menor biodisponibilidade de NO, nível alto de bilirrubina e contagem alta de reticulócitos. Indivíduos que se enquadram neste subfenótipo seriam mais propensos a apresentarem complicações clínicas como hipertensão pulmonar, úlcera de perna, priapismo e AVC. Do outro lado da figura são mostradas informações relativas ao outro subfenótipo, que é caracterizado pela presença de α-Tal, baixo índice hemolítico e aumento da viscosidade do sangue, e consequentemente maior nível de Hb, maior biodisponibilidade de NO e maior susceptibilidade a complicações como osteonecrose, STA e crises de dor.

Tabela 11 – Efeito da α-Tal nos eventos clínicos agudos da anemia falciforme

Manifestações Clínicas	Efeito da α-Tal/Referências		
Episódios de dor	**Maior susceptibilidade*:** (Fabry et al., 1984; Bailey et al., 1991; Billett et al., 1995; Gill et al., 1995; Thomas et al., 1997; Mukherjee et al., 1998; Neonato et al., 2000; Luporini et al., 2001)	**Sem relação:** (Steinberg et al., 1984; Platt et al., 1991; Tarer et al., 2006; Adorno et al., 2008)	**Protetor†:** (Mukherjee et al., 1997)
AVC	**Protetor:** (Powars, 1991; Adams et al., 1994; Gill et al., 1995; Ohene-Frempong et al., 1998; Neonato et al., 2000; Sarnaik e Ballas 2001)	**Sem relação:** (Miller et al., 1988; Balkaran et al., 1992; Figueiredo et al., 1996; Tarer et al., 2006; Adorno et al., 2008)	
Doppler alterado	**Protetor:** (Hsu et al., 2003; Bernaudin et al., 2008)		
Síndrome Torácica Aguda	**Protetor:** (Higgs et al., 1982; Gill et al., 1995)	**Sem relação:** (Castro et al., 1994; Thomas et al., 1997; Mukherjee et al., 1998; Neonato et al., 2000; Tarer et al., 2006)	
Sequestro Esplênico Agudo	**Maior susceptibilidade:** (De Ceulaer e Serjeant 1991; Adorno et al., 2004)	**Sem relação:** (Gill et al., 1995; Thomas et al., 1997; Tarer et al., 2006; Adorno et al., 2008)	
Anemia aplástica ou episódios hiperhemolíticos	**Protetor:** (Gill et al., 1995)	**Sem relação:** (Neonato et al., 2000)	
Priapismo	**Protetor:** (Nolan et al., 2005)		
Dactalite	**Maior susceptibilidade:** (Thomas et al., 1997)		
Bacteremia	**Protetor:** (Adekile e Haider 1996)	**Sem relação:** (Gill et al., 1995)	
Infecções	**Sem Relação:** (Mukherjee et al., 1998; Neonato et al., 2000; Tarer et al., 2006)		

Os efeitos foram os descritos pelos artigos; possíveis erros metodológicos dos trabalhos não foram levados em consideração. A heterogeneidade entre as populações de pacientes com anemia falciforme, a idade dos pacientes estudados e o número de pacientes em cada estudo pode tornar controversa a interpretação dos resultados.

* Maior susceptibilidade significa aumento na incidência ou prevalência do evento no fenótipo quando α-Tal está presente.

† Protetor significa diminuição na incidência ou prevalência do evento no fenótipo quando α-Tal está presente.

Tabela 12 – Efeito da α-Tal em outros eventos clínicos da anemia falciforme

Manifestações Clínicas	Efeito da α-Tal/Referências	
Sobrevida	**Protetor*:** (Higgs et al., 1982; Mears et al., 1983; Fabry et al., 1984; Powars et al., 1990; el-Hazmi et al., 1992; Martinez et al., 1996; Thomas et al., 1997; Miller et al., 2000)	**Sem relação:** (Platt et al., 1994; Keclard et al., 1996; Keclard et al., 1997; Mouele et al., 1999; Arends et al., 2000; Mouele et al., 2000)
Osteonecrose	**Maior susceptibilidade**:** (Steinberg et al., 1984; Ballas et al., 1989; Powars et al., 1990; Milner et al., 1991; Powars, 1991; Milner et al., 1993; Thomas et al., 1997; Kutlar et al., 2001)	**Sem relação:** (Figueiredo et al., 1996; Adekile et al., 2001)
Retinopatia proliferativa	**Protetor***:** (Condon et al., 1983)	**Sem relação:** (Fox et al., 1990; Fox et al., 1993)
Alterações nos vasos da retina e da conjuntiva	**Sem relação:** (Roy et al., 1985; Lima et al., 2006)	
Colelitíase	**Protetor:** (Adekile e Haider 1996; Haider et al., 1998; Vasavda et al., 2007)	**Sem relação: (**Figueiredo et al., 1996;Chaar et al., 2006; Martins et al., 2008)
Ulcerações nas pernas	**Protetor: (**Higgs et al., 1982;Embury et al., 1988;Koshy et al., 1989;Powars, 1991)	**Sem relação:** (Steinberg et al., 1984; Figueiredo et al., 1996; Thomas et al., 1997; Adorno et al., 2008)
Função esplênica	**Protetor:** (Adekile et al., 1996; Wali et al., 2002)	
Esplenomegalia	**Maior susceptibilidade:** (Higgs et al., 1982; Serjeant et al., 1996; Mukherjee et al., 1997; Mukherjee et al., 1998; Mouele et al., 1999)	**Sem relação:** (Adekile et al., 1993; Adekile e Haider 1996)
Coração	**Protetor:** (Braden et al., 1996)	
Menarca	**Sem relação:** (Serjeant et al., 2001)	
Crescimento e desenvolvimento	**Sem relação:** (Singhal et al., 1996; Luporini et al., 2001)	
Hepatomegalia	**Sem relação:** (Adekile e Haider 1996)	
Hipertensão pulmonar	**Sem relação:** (Taylor et al., 2008)	
Albuminúria (glomerulopatia)	**Protetor:** (Guasch et al., 1999)	
Glumerulosclerose	**Protetor:** (Powars, 1991)	
Transfusões	**Protetor:** (Gill et al., 1995;Mukherjee et al., 1998)	**Sem relação:** (Adorno et al., 2008)
Hospitalizações	**Protetor:** (Mukherjee et al., 1998)	**Sem relação:** (Adorno et al., 2008)

Os efeitos foram os descritos pelos artigos; possíveis erros metodológicos dos trabalhos não foram levados em consideração. A heterogeneidade entre as populações de pacientes com anemia falciforme, a idade dos pacientes estudados e o número de pacientes em cada estudo pode tornar controversa a interpretação dos resultados.

* Efeito protetor com relação à sobrevida significa maior prevalência de α-Tal em indivíduos adultos quando comparados com crianças, ou evolução menos grave dos pacientes com co-herança de α-Tal em relação aos que não a possuem.

** Maior susceptibilidade significa aumento na incidência ou prevalência do evento no fenótipo quando α-Tal está presente.

*** Protetor significa diminuição na incidência ou prevalência do evento no fenótipo quando α-Tal está presente.

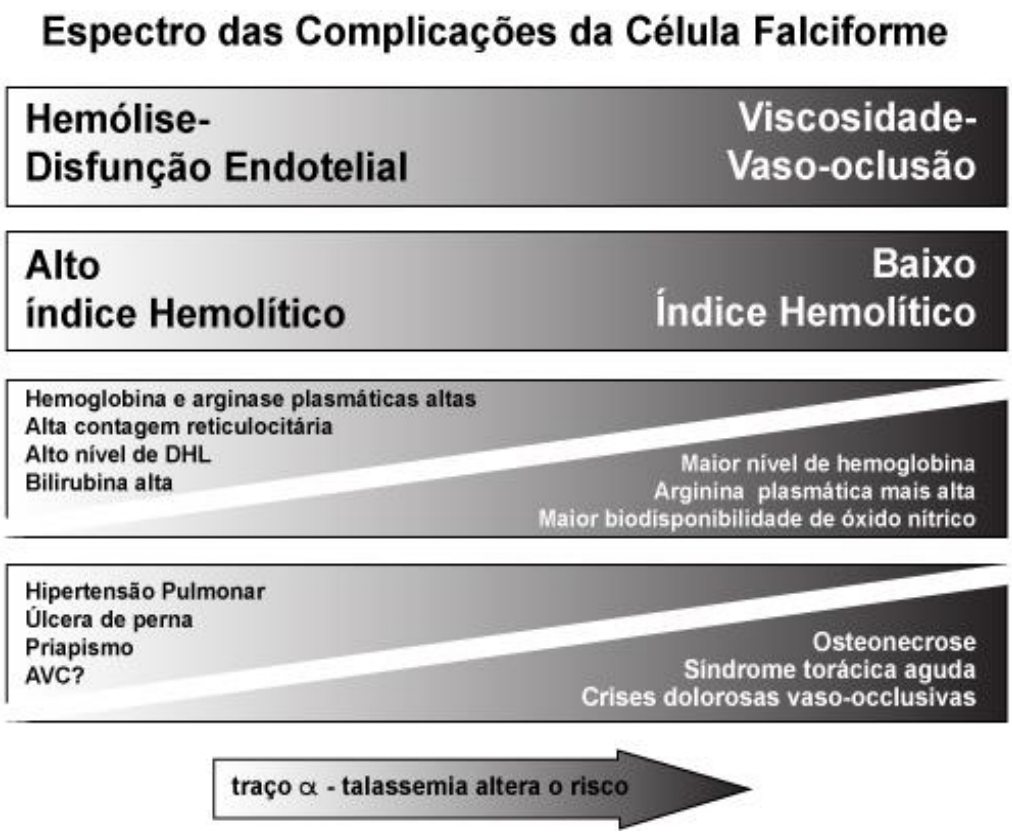


Figura 10 - Subfenótipos da anemia falciforme

Fonte: Kato, 2007

3.722 A Talassemia Alfa associada à Anemia Falciforme no Brasil

No Brasil, poucos estudos estimaram a prevalência de α-Tal em indivíduos com anemia falciforme e menos estudos ainda avaliaram os efeitos advindos da interação da mesma sobre dados clínicos e hematológicos. A seguir são relatados os estudos disponíveis na literatura que tratam deste assunto.

Costa *et al.* (1989) avaliaram 41 pacientes com anemia falciforme para estimar a coexistência da α-Tal e avaliar o efeito dessa interação em alguns dados hematológicos. O genótipo -α/αα foi encontrado em nove dos 41 pacientes (22%), indicando a

frequência gênica de 0,126. O VCM dos pacientes com a interação foi significativamente menor do que nos pacientes sem α-Tal. Não houve diferença nos valores de Hb total, Hb F e Hb A_2.

Figueiredo *et al.* (1996) estudaram os efeitos da α-Tal nas características clínicas e hematológicas de 85 pacientes com anemia falciforme provenientes do Hospital Universitário da UNICAMP e do Hospital Universitário da Escola Paulista de Medicina. O genótipo -α/αα estava presente em 17,6% e o genótipo -α/-α em 1,2%, totalizando 18,8% de pacientes com a co-herança de α-Tal. Os indivíduos com a interação apresentaram níveis menores de VCM e maiores de Hb total ($p<0,05$). Não houve diferença significativa relacionando os genótipos de α-Tal com os eventos clínicos analisados (AVC, cálculos biliares, necrose asséptica e úlcera nas pernas).

Luporini *et al.* (2001) analisaram 41 crianças com anemia falciforme pareadas por sexo e idade com crianças saudáveis para estudar o grau de comprometimento do crescimento e desenvolvimento. Dez (24,4%) dos pacientes estudados possuíam apenas três genes alfa ativos (-α/αα). A maioria dos pacientes com crises álgicas que necessitaram de hospitalização tinha a coexistência de α-Tal (com α-Tal 40%; sem α-Tal 9,7%; $p<0,05$). Não houve diferença nos níveis de Hb total nos grupos com e sem α-Tal. Houve redução plasmática significativa das concentrações de IGF-I e IGFBP-3 em pacientes com α-Tal, quando comparados com os sem α-Tal. Esses achados não foram correlacionados com nenhuma variável de crescimento (peso, idade óssea e velocidade de crescimento), a não ser a redução do escore z peso em relação à altura, significando que esse grupo era desnutrido.

Adorno *et al.* (2004) analisaram 80 pacientes com anemia falciforme no estado da Bahia (HEMOBA) e encontraram relação significativa entre presença de α-Tal e os níveis de hematócrito ($p=0,044$), VCM ($p=0,0007$), HCM ($p=0,012$) e SEA ($p=0,032$). Os autores não citam a frequência da coexistência de α-Tal nos indivíduos com anemia falciforme.

Lyra *et al.* (2005) analisaram 31 pacientes de São Paulo e 40 de Salvador, com objetivo de estudar aspectos hematológicos, clínicos e moleculares de crianças com anemia falciforme dessas duas cidades brasileiras. A prevalência de α-Tal (-α/αα) foi de 22,5% em São Paulo e de 28,2% em Salvador. Não houve diferença significativa nos

grupos com ou sem a coexistência de α-Tal com relação à hospitalização devido a crises vaso-oclusivas, hospitalizações devido a infecções, AVC ou litíase biliar.

Lima *et al.* (2006) estudaram 102 pacientes com doença falciforme acompanhados no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas, com objetivo de esclarecer se características clínicas, hematológicas e genéticas da doença falciforme influenciariam na ocorrência de alterações nos vasos sanguíneos da retina e conjuntiva. Dos 102 pacientes estudados, quatro não foram genotipados, 23 (23,7%) apresentavam a coexistência de α-Tal e 74 (76,3%) não possuíam deleções nos genes alfa. Não houve diferença na frequência de alterações nos vasos da conjuntiva e da retina nos pacientes com ou sem α-Tal, sugerindo que esta não interfere na ocorrência dessas complicações.

Em um estudo realizado com 74 crianças com doença falciforme triadas pelo programa de triagem neonatal do estado de Pernambuco e acompanhados no hospital do HEMOPE, o genótipo -α/αα estava presente em 14 (18,9%) pacientes e o genótipo -α/-α em cinco (6,7%) (Bezerra et al., 2007).

Em um estudo realizado na Bahia, para identificar os principais fatores moleculares e clínicos associados à anemia falciforme no estado, Adorno *et al.* (2008) avaliaram 125 pacientes. Dois pacientes (1,8%) possuíam o genótipo -α/-α e 30 (27,3%) possuíam o genótipo -α/αα. Os pacientes com a coexistência de α-Tal apresentaram menores níveis de VCM e HCM e maiores níveis de Hb total e hematócrito quando comparados com os sem α-Tal. Não houve diferença nos níveis de Hb F entre esses grupos.

A deleção causadora de α-Tal em todos os estudos realizados no Brasil foi a do tipo $-\alpha^{3.7}$. A deleção gênica do tipo 3.7 kb tem prevalência elevada na população africana, sendo importante lembrar que este é praticamente o único tipo de α-Tal nessa população (Steinberg e Embury, 1986).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Verificar a relação entre dos haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina ou dos genótipos de α-Tal com características clínicas e hematológicos em uma população de crianças com doença falciforme triadas pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de MG (PETN-MG) e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte (HBH) da Fundação HEMOMINAS.

4.2 Objetivos específicos

- Genotipar o alelo da β^S-globina na casuística analisada;
- Genotipar e determinar a frequência dos haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina e dos genótipos de α-Tal (deleções $-\alpha^{3.7}$; $-\alpha^{4.2}$; $--^{SEA}$; $--^{FIL}$; $--^{MED}$; $-(\alpha)^{20.5}$ e $--^{THAI}$) na casuística analisada;
- Verificar se há associação dos haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina ou dos genótipos de α-Tal com os seguintes parâmetros hematológicos: concentração de hemoglobina total; níveis de Hb F; leucometria; plaquetometria; contagem reticulocitária no sangue periférico; volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média;
- Verificar se há associação entre a ocorrência de sequestro esplênico agudo (SEA) com os haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina ou os genótipos de α-Tal;
- Verificar se há associação entre a ocorrência de doença cerebrovascular (DCV) com os haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina ou os genótipos de α-Tal;

- Verificar se há associação entre a ocorrência de síndrome torácica aguda (STA) com os haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina ou os genótipos de α-Tal;
- Verificar se há associação entre a utilização de transfusões sanguíneas com os haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina ou os genótipos de α-Tal;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho e local de realização do estudo

Tratou-se de um estudo do tipo coorte retrospectiva, fechada, realizado com crianças com doença falciforme, diagnosticadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN), nascidas entre 1999 e 2006 e acompanhadas no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação HEMOMINAS (HBH).

5.2 Caracterização da população estudada e metodologia de seleção

A amostragem das crianças sujeitos da pesquisa foi retirada do período compreendido entre 01 de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2006, quando 864 crianças com doença falciforme foram triadas pelo PETN-MG e encaminhadas para tratamento inicial no ambulatório do HBH. Inicialmente, foram excluídas 46 crianças

que já haviam falecido quando o presente estudo se iniciou (março de 2008). Vinte e duas crianças que haviam sido transferidas para tratamento em outro hemocentro de MG, duas crianças que abandonaram o acompanhamento e quatro crianças que obtiveram alta do acompanhamento clínico também foram excluídas. Os motivos das exclusões foram a indisponibilidade para coleta da amostra biológica e a falta de informações relativas ao acompanhamento clínico-laboratorial. Das 790 crianças restantes, os critérios de exclusão basearam-se em resultados de exames laboratoriais. Desta forma, foram excluídas 33 crianças que tinham a fração de Hb A na corrida eletroforética, revelando tratar-se de $S\beta^{+}$-tal. Do remanescente de 757 crianças, 400 possuíam o perfil hemoglobínico neonatal compatível com anemia falciforme (FS, SF e SS), podendo representar crianças com homozigose (Hb SS) ou com $S\beta^{0}$-tal, e 357 com perfil hemoglobínico FSC. Também foram excluídas as 357 crianças com perfil hemoglobínico FSC, tornando a população mais homogênea para as análises das correlações clínicas e para discussão dos resultados com a literatura disponível.

Foi realizada uma aleatorização estratificada (programa estatístico SPSS) por ano de nascimento com as 400 crianças restantes e incluídas 35 crianças/ano, totalizando 280 crianças. Um cálculo amostral formal não foi feito porque os dados sobre a associação entre os haplótipos β^{S} e genótipos de α-Tal com variáveis clínicas e hematológicas em indivíduos com anemia falciforme são controversos em relatos anteriores. Estabeleceu-se 70% do total da população como uma amostra de conveniência compatível com o orçamento e os prazos do projeto. A figura 11 representa, graficamente, o procedimento de seleção adotado.

Dessa forma, os critérios de inclusão utilizados nessa pesquisa foram:

- crianças triadas pelo PETN-MG, com perfil hemoglobínico compatível com doença falciforme (padrão neonatal FS, SF ou SS determinado por HPLC e eletroforese com focalização isoelétrica) e acompanhadas no HBH, nascidas entre 01 de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2006;
- crianças incluídas pela aleatorização estratificada, realizada após as eliminações referentes aos critérios de exclusão utilizados.

Os critérios de exclusão utilizados nessa pesquisa foram:

- crianças com perfil hemoglobínico compatível com outros subtipos de doença falciforme, ou seja, FSC e FSA ($S\beta^+$-talassemia);
- crianças que foram a óbito por qualquer razão, antes do início do estudo;
- crianças encaminhadas ao HBH, que compareceram à primeira consulta e não deram seguimento ao acompanhamento clínico por qualquer razão;
- crianças que obtiveram alta do programa de acompanhamento clínico por qualquer razão;
- crianças transferidas para acompanhamento em outro hemocentro;
- crianças excluídas pela aleatorização estratificada, realizada após as eliminações referentes aos critérios de exclusão citados acima.

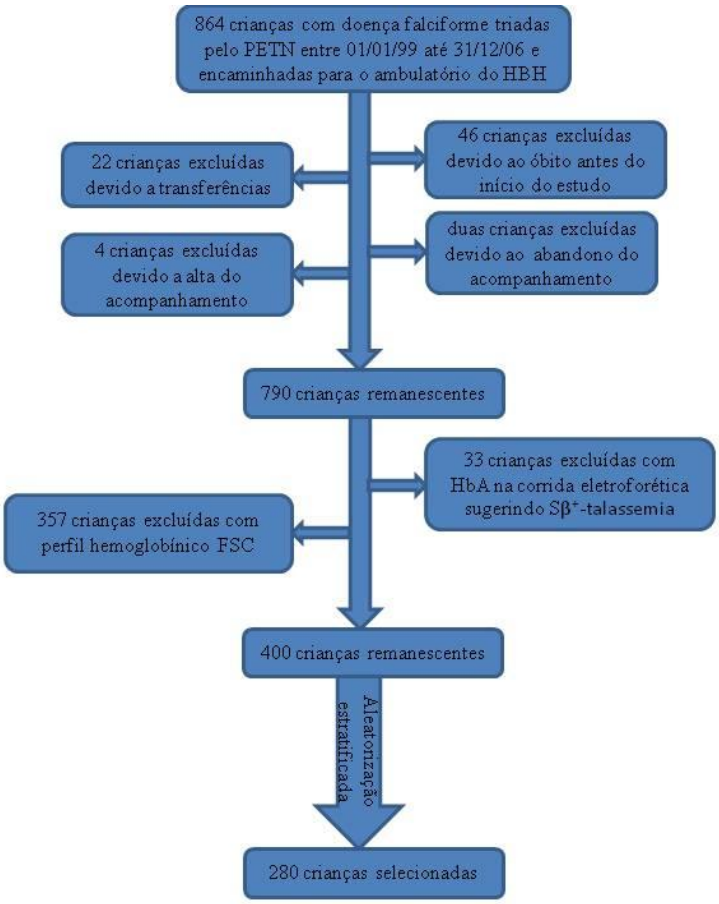


Figura 11 - Fluxograma da seleção amostral na população estudada

As informações utilizadas na seleção da população de estudo foram retiradas do banco de dados do PETN-MG.

Foram utilizadas informações referentes ao acompanhamento clínico da população de estudo no período compreendido entre 01 de janeiro de 1999 (início do acompanhamento da coorte) e 30 de junho de 2009 (término do acompanhamento da coorte), de modo que todas as crianças foram acompanhadas, por no mínimo, dois anos e meio. Todas essas informações foram retiradas dos prontuários médicos arquivados no ambulatório do HBH e lançadas no programa Access da Microsoft, em arquivo específico elaborado com a finalidade deste e de outros estudos em execução no HBH (anexo 1).

As amostras de sangue para utilização no estudo foram derivadas de coleta para exames de rotina do acompanhamento clínico das crianças selecionadas, não sendo necessária a retirada de amostras de sangue exclusivamente para a pesquisa. Dessa forma, o volume de sangue coletado foi variável, dependendo da quantidade utilizada para realização dos exames de rotina. Aproximadamente 1-3 ml de sangue foram obtidos de cada paciente através de punção venosa e preservados em tubo contendo EDTA.

5.3 Extração e quantificação do DNA genômico

A extração do DNA genômico das amostras de sangue foi realizada com o uso do kit comercial (QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAGEN) de acordo com instruções do fabricante.

Inicialmente, foi obtida a camada leucocitária por centrifugação do sangue total e depositada em microtubo de 1,5 ml.

O DNA foi obtido adicionando-se em um microtubo de 1,5 ml 20 μl de protease, 200 μl da camada leucocitária à temperatura ambiente e 200 μl do tampão AL

homogeneizado previamente. O microtubo foi agitado em vórtex (QL-901 Vortex, Vertex) por 15 segundos. O tubo foi incubado a 56°C durante 30 minutos em *dry bath* (DB-Heat & Cool, Loccus Biotecnologia) e centrifugado brevemente em microcentrífuga (Micromax RF, IEC) para remover as gotas na tampa. Adicionaram-se 200 µl de etanol (96-100%) e o microtubo foi agitado durante 15 segundos e centrifugado brevemente para remover as gotas na tampa. O conteúdo foi transferido para a coluna de centrifugação e essa colocada em um tubo coletor de 2 ml. Centrifugou-se a 11.269 x g por 5 minutos e, em seguida, o tubo coletor foi descartado. A coluna de centrifugação foi colocada em um novo tubo coletor de 2 ml e adicionaram-se 500 µl do tampão AW1 à coluna. Centrifugou-se a 11.269 x g por 5 minutos e, em seguida, o tubo coletor foi descartado. A coluna de centrifugação foi colocada em um novo tubo coletor de 2 ml e adicionaram-se 500 µl do tampão AW2 à coluna. Centrifugou-se a 15.339 x g por 3 minutos e, em seguida, o tubo coletor foi descartado. A coluna de centrifugação foi colocada em um microtubo de 1,5 ml e adicionaram-se 200 µl de Tampão AE. Incubou-se à temperatura ambiente (15-25ºC) por 5 minutos e centrifugou-se a 7826 x g por 1 minuto.

Para leitura da concentração e do grau de pureza do DNA, a amostra foi submetida à temperatura de 56°C durante cinco minutos em *dry bath* e homogeneizado posteriormente para garantir que o DNA estivesse solúvel. Quatro µl da amostra de DNA foram transferidos para uma cubeta de quartzo contendo 76 µl de água deionizada. A cubeta foi colocada no espectrofotômetro (GeneQuant pro, Pharmacia Biotech), calibrado anteriormente com água deionizada, e a leitura realizada. A concentração do DNA em ng/µl e a relação do grau de pureza (absorvância em 260 nm dividido pela absorvância em 280 nm) foram documentados para posterior diluição.

O DNA foi estocado a -20^{0}C até o momento do uso.

5.4 Genotipagem do alelo β^S

A determinação da presença do alelo β^S foi realizada por meio de PCR-RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição - ´´*restriction fragments length polymorphisms*``).

A amplificação do fragmento do gene da β-globina foi feita utilizando 100 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 20 µl contendo 200 µM Tris-HCl (pH 8,4), 500 µM KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTPs, 0,1% de Trinton X-100, 2 pmol de cada oligonucleotídeo sintético (direto: TGATGGTATGGGGCCAAGA; reverso: GGGTGGGAAAATAGACCAATA) e 0,8 U de Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA). A reação de amplificação foi feita em termociclador (PTC-100 MJ Research ou Thermal Cycler - Biocycler) com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na análise do polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP), o produto da amplificação da PCR (488 pares de base - pb) foi digerido com uma enzima de restrição (DdeI, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37ºC durante 3 horas, numa reação de volume final de 20 µL (10 µl do produto da amplificação, 1,8 µl de 1 X NEBuffer 3 e 0,2 µl da enzima DdeI-2U e 8 µl de água deionizada e autoclavada).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 µl do produto adicionado de 1 µl do tampão de corrida xileno cianol 5X (Tris 50mm pH 7,6; EDTA 5M; SDS 5%; xileno cianol 0,1%; sacarose 28%) foram aplicados em gel de agarose 3% (UltraPure ^{TM} Agarose, Invitrogen) contendo brometo de etídio (10µg/mL). A eletroforese foi feita a 80 volts, durante 90 minutos em tampão TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético; 1 mM EDTA - pH 8,0). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos. Homozigotos e heterozigotos para presença ou ausência dos sítios de restrição foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen).

A enzima DdeI reconhece e cliva o sítio de restrição C/TNAG (GenBank gbEF450778.1). Desta forma, o cromossomo portador do alelo selvagem foi clivado nas posições 27, 40, 62, 107 e 287 da sequência amplificada; o cromossomo portador do

alelo mutante (β^S) não possui o sítio na posição 287 devido à substituição A→T na posição 290. O indivíduo homozigoto para o alelo β^S apresentaram fragmentos de 13 pb, 22 pb, 27 pb, 45 pb e 381 pb. Os indivíduos heterozigotos apresentaram fragmentos de 13 pb, 22 pb, 27 pb, 45 pb, 180 pb, 201 pb e 381 pb, sugerindo o genótipo $S\beta^0$-tal. Com a utilização desta técnica, indivíduos homozigotos para o alelo β^A apresentariam fragmentos de 13 pb, 22 pb, 27 pb, 45 pb, 180 pb e 201 pb.

5.5 Diagnóstico Molecular da Talassemia Alfa

Para as reações de PCR múltipla foram desenhados oligonucleotídeos sintéticos específicos para cada uma das sete principais mutações de deleção dos genes de globina α causadoras de α-Tal segundo Tan *et al.* (2001). A identidade de cada deleção foi obtida pela determinação do tamanho do fragmento amplificado em cada reação. Visto que qualquer uma das sete deleções remove parte ou todo o gene α2 globina, sua amplificação, juntamente com a amplificação de um alelo de deleção, indica que a mutação encontra-se em heterozigose. Como controle positivo para o sucesso da amplificação do DNA, foi utilizado um segmento de 2.350 pb, referente à região 3` não transcrita do gene LIS 1 (fator plaquetário), localizado no cromossomo 17p13.3.

As sequências dos iniciadores foram conferidas com as informações disponíveis no NCBI utilizando a ferramenta BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

A Figura 12 representa esquematicamente o agrupamento de genes da α-globina, indicando-se a extensão representativa de cada deleção e a posição relativa de cada oligonucleotídeo sintético.

A reação da PCR múltipla foi padronizada para permitir a detecção das sete deleções em uma reação de tubo único. A padronização ocorreu inicialmente com o gene LIS, gene α2 e a deleção $-\alpha^{3.7}$, seguido da padronização com todos os oligonucleotídeos sintéticos. A especificidade da técnica de PCR múltipla para o

diagnóstico das deleções mais comuns causadoras de α-Tal foi confirmada utilizando-se controles positivos para as sete deleções testadas, cedidos gentilmente pelo Dr. Samuel S. Chong (Universidade de Cingapura).

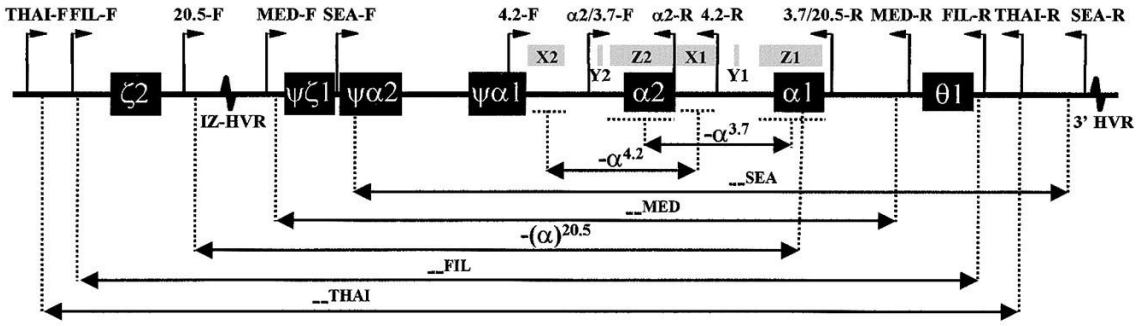


Figura 12 - Ilustração do agrupamento de genes da globina alfa, extensão das deleções e posição dos oligonucleotídeos sintéticos

Fonte: Tan et al., 2001

As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit comercial para PCR múltipla (QIAGEN® Multiplex PCR kit, QIAGEN). Os primeiros ensaios para padronizar a técnica foram realizados com 100 μM de cada dNTP, 0,75 μM $MgCl_2$ e 1,25 U HotStarTaq DNA polimerase (*Qiagen master mix*), oligonucleotídeos sintéticos em concentrações distintas (Tabela 13), e 200 ng de DNA genômico, num volume final de 25 μl.

Nos ensaios seguintes e que levaram à padronização do teste molecular de diagnóstico de α-Tal as condições para a amplificação da reação da PCR múltipla foram: volume final de 25 μl contendo 100 μM de cada dNTP, 0,75 μM $MgCl_2$ e 1,25 U HotStarTaq DNA polimerase (*Qiagen master mix*), oligonucleotídeos sintéticos em concentrações distintas, 1X solução Q e 200 ng de DNA genômico.

Com relação aos ciclos da PCR, estabeleceu-se nos primeiros ensaios: ativação da enzima *hot start* e desnaturação do DNA a 96°C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos de 98°C por 45 segundos para desnaturação do DNA, 60°C durante 90 segundos para anelamento dos iniciadores, 72°C por 135 segundos para ação da DNA polimerase, seguido por uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Posteriormente, a temperatura de

anelamento dos oligonucleotídeos sintéticos foi elevada para 62°C visando, com isso, excluir bandas inespecíficas e melhorar as amplificações.

Tabela 13 - Sequência dos oligonucleotídeos sintéticos para cada tipo de deleção da α-Tal, respectivas concentrações utilizadas nas reações de PCR e tamanho esperado dos produtos da amplificação

Gene ou tipo de deleção	**Sequência 5`-3`**	**Concentração**	**Tamanho do fragmento esperado**
LIS1-F	ATACCATGGTTACCCCATTGAGC	0.5 μM	
LIS1-R	AGGGCTCATTACATGTGGACCC	0.5 μM	2350 pb
α2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	0.2 μM	2022/2029 pb
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	0.2 μM	
α2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	0.2 μM	1800 pb
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	0.5 μM	
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC	0.5 μM	1628 pb
SEA-F	CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	0.2 μM	
SEA-R	AGCCCACGTTGTGTTCATGGC	0.2 μM	1349 pb
THAI-F	GACCATTCCTCAGCGTGGGTG	0.3 μM	
THAI-R	CAAGTGGGCTGAGCCCTTGAG	0.3 μM	1153 pb
20.5-F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	0.2 μM	1007 pb
MED-F	TACCCTTTGCAAGCACACGTAC	0.2 μM	
MED-R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	0.2 μM	807 pb
FIL-F	TTTAAATGGGCAAAACAGGCCAGG	1.0 μM	
FIL-R	ATAACCTTTATCTGCCACATGTAGC	1.0 μM	546 pb

Fonte: Tan et al., 2001

Para resolução dos produtos da PCR, 10 μl do amplicon, adicionado de 1 μl do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (10μg/mL). A corrida de eletroforese foi condicionada a 90 volts durante 2 horas em cuba (HU13, Max Fill) contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no transiluminador de luz ultravioleta (Imagemaster VDS, Amersham Pharmacia Biotech) para análise dos fragmentos amplificados. A determinação do genótipo do sujeito da pesquisa foi realizada de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados, quando comparados com o padrão de peso molecular 500 pb (500 bp DNA Ladder, Invitrogem).

5.6 Genotipagem dos haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina

A determinação dos haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina foi realizada através de PCR-RFLP conforme SUTTON *et al.* (1989), com modificações. Estes pesquisadores analisaram a amplificação de sete fragmentos do agrupamento de genes da β^S-globina, enquanto neste estudo foram analisados seis desses fragmentos para a determinação dos haplótipos (Tabela 14). Excluiu-se a análise do fragmento 3´β, que está localizado dentro de uma sequência repetitiva e, segundo Wang *et al.* (1992), não pode ser determinado por PCR. Este fragmento apresenta o mesmo padrão de restrição do fragmento $^G\gamma$ e, portanto, não traz informação adicional quando se analisam os seis fragmentos. Esta exclusão também foi feita em estudos publicados anteriormente (Figueiredo et al., 1996; Pante-de-Sousa et al., 1998; Guasch et al., 1999).

Tabela 14 - Direção, posição e sequência dos iniciadores para determinação dos haplótipos do gene da β^S-globina

Sequência do oligonucleotídeo	Direção	Posição	Localização
AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	Direto	33880	
AGGAGCTTATTGATAACCTCAGA	Reverso	34535	5'Gγ
AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	Direto	36221	Gγ
TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	Reverso	35440 Gγ /40371 Aγ	
TAAATGAGGAGCATGCACACAC	Direto	41137	Aγ
GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	Direto	46458	
ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	Reverso	47159	ψβ
TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	Direto	49529	
GGACCCTAACTGATATAACTA	Reverso	50121	3'ψβ
CTACGCTGACCTCATAAATG	Direto	60958	
CTAATCTGCAAGAGTGTCT	Reverso	61341	5'β

Fonte: Sutton et al., 1989

A amplificação dos fragmentos utilizados para determinação dos haplótipos foi feita utilizando 100 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 20 μl, contendo 200 μM Tris-HCl (pH 8,4), 500 μM KCl, $MgCl_2$ em concentrações

distintas (Tabela 15), 200 μM de cada dNTPs, 2 pmol de cada oligonucleotídeo sintético e 0,8 U de Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA). A reação de amplificação foi feita em termociclador (PTC-100 MJ Research ou Thermal Cycler - Biocycler) com uma fase inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 57°C por 30 segundos (exceto para 3´Ψβ: 60ºC por 30 segundos), e 72°C por 45 segundos, mais uma fase de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Na análise de RFLP, os produtos da amplificação da PCR (10 μl) foram digeridos com as enzimas adequadas à temperatura de 37ºC numa reação de volume final de 20 μL: XmnI na extremidade 5´ do gene $^{G}\gamma$; HindIII na região IVS2 do gene $^{G}\gamma$ e na região IVS2 do gene $^{A}\gamma$; Hinc II em Ψβ e na extremidade 3´ de β; e HinfI na extremidade 5´ de β. Após a digestão, a enzima foi inativada com aumento da temperatura para 65ºC durante 20 minutos (Tabela 15).

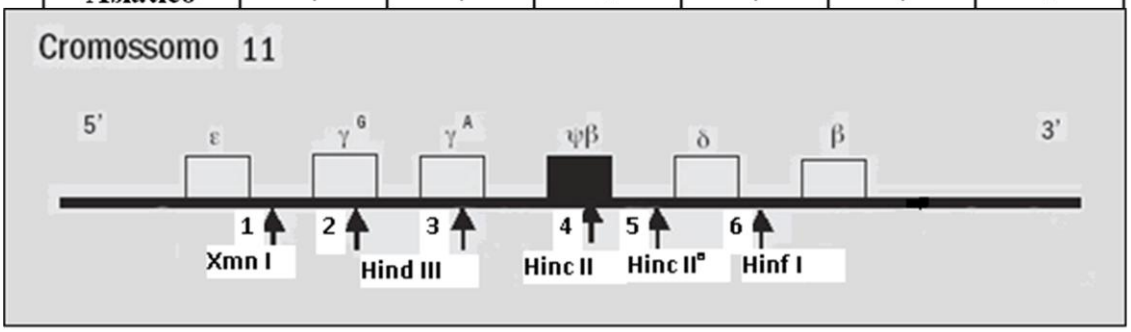
Para visualização dos produtos da restrição, 20 μl do produto foram aplicados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (10μg/mL). A eletroforese foi feita a 80 volts, durante 90 minutos em tampão TAE 1X. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos. Homozigotos e heterozigotos para presença ou ausência dos sítios de restrição foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen).

Utilizando-se esses seis polimorfismos, os cromossomos foram agrupados em cinco haplótipos clássicos, de acordo com o padrão de restrição: CAR ou Bantu (-+----), Benin (----+-), Senegal (++-+++), Camarões (-++-+-) e Asiático (++-++-), sendo que "+" representa a presença e "-" representa a ausência do sitio polimórfico. Quaisquer outras combinações encontradas foram classificadas como haplótipos atípicos (Figura 13). Quando se verificava a heterozigose para dois haplótipos, pressumia-se, com base na maior prevalência de haplótipos comuns em indivíduos com anemia falciforme, que um haplótipo comum estava presente, juntamente com um haplótipo atípico, em vez de dois haplótipos atípicos. Todas as amostras em que foram indentificados haplótipos atípicos, a genotipagem foi realizada novamente para confirmação do resultado.

A classificação dos haplótipos β^{S} dos sujeitos da pesquisa foi antecedida pela aplicação da mesma metodologia em amostras de DNA com haplótipos previamente

conhecidos, cedidos gentilmente pela Dra. Marilda de Souza Gonçalves, da Fiocruz – Salvador, BA.

Sítios / haplótipos*	5'$^{G}\gamma$ Xmn I	$^{G}\gamma$ Hind III	$^{A}\gamma$ Hind III	ψβ Hinc II	3'ψβ Hinc II	5'β Hinf I
CAR	-	+	-	-	-	-
Benin	-	-	-	-	+	-
Senegal	+	+	-	+	+	+
Camarões	-	+	+	-	+	-
Asiático	+	+	-	+	+	-



*Padrão atípico: qualquer outra combinação.
Fonte: Sutton et al., 1989, com modificações

Figura 13 - Principais haplótipos do agrupamento de genes da globina beta definidos pelo padrão de atividade das enzimas de restrição Xmn I, Hind III, Hinc II e Hinf I nos seis fragmentos amplificados localizados em 5'$^{G}\gamma$, $^{G}\gamma$,$^{A}\gamma$, ψβ, 3'ψβ e 5'β

Tabela 15 - Características dos RFLPs para genotipagem dos haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina

Localização	Produto da amplificação	Concentração de $MgCl_2$ na reação de PCR	Sítio polimorfico	Fragmentos de restrição	Mix da RFLP*	Incubação/ Inativação	Sítio de restrição
5'$^G\gamma$	655 pb	1,75mM	Xmn I 34330	450 + 205 pb	2µl 10X FastDigest® buffer + 1 FDU FastDigest® Xmn I	Digestão a 37ºC por 10 min. Inativação a 65ºC por 10min.	5´...GAANN↓NNTTC...3´ 3´...CTTNN↑NNAAG...5´
$^G\gamma$	781 pb	1,5mM	Hind III 35785	436 + 245 pb	2 µl 10X Buffer Tango + 10U enzima Hind III	Digestão a 37ºC por 5 h. Inativação a 65ºC por 20 min.	5´...A↓AGCTT...3´ 3´...TTCGA↑A...5´
$^A\gamma$	766 pb	1,5mM	Hind III 40731	406 + 360 pb	2 µl 10X Buffer Tango + 10U enzima Hind III	Digestão a 37ºC por 5 h. Inativação a 65ºC por 20 min.	
Ψβ	701 pb	1,5mM	Hinc II 46819	361 + 340 pb	2µl 10X FastDigest® buffer + 1 FDU FastDigest® Hinc II	Digestão a37ºC por 10 min. Inativação a 65ºC por 10 min.	5´...GTPy↓PuAC...3´ 3´...CAPu↑PyTG...5´
3'ψβ	592 pb	1,75mM	Hinc II[a] 49826	Variável[a]	2µl 10X FastDigest® buffer + 1 FDU FastDigest® Hinc II	Digestão a 37ºC por 10 min. Inativação a 65ºC por 10 min.	
5'β	383 pb	2mM	Hinf I 61199	241 + 142 pb	2 µl 10X Buffer Tango + 10U enzima Hinf I	Digestão a 37ºC Inativação a 65ºC por 20 min.	5´...G↓ANTC...3´ 3´...CTNA↑G...5´

[a] A posição do sítio de restrição não é conhecida precisamente e não pode ser deduzida da sequência do DNA. * Fabricante das endonucleases: Fermentas Life Sciences

5.7 Doppler transcraniano

O Doppler transcraniano cerebral (DTC) foi realizado para avaliação do risco de AVC isquêmico. Os exames foram realizados e interpretados por um único pesquisador (Dra. Célia Maria Silva), após treinamento no *Medical College of Geórgia*, EUA. Os exames foram feitos a partir de dezembro de 2006 e foram utilizados pela Dra. Célia Maria Silva na sua tese de doutorado, defendida em dezembro de 2009, "Rastreamento de crianças com doença falciforme pelo Doppler transcraniano em uma coorte de pacientes triados pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal do Estado de Minas Gerais (PETN-MG) e acompanhados no Hemocentro de Belo Horizonte - MG - Brasil" (Silva, 2009).

A determinação da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral nas grandes artérias do Polígono de Willis foi executada por meio da ultrassonografia transcraniana, com a utilização do Doppler pulsado de 2 MHz, com sonda acústica infantil. Foi usado protocolo baseado nos critérios sugeridos pelos pesquisadores do estudo "*Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia*" (STOP) (Adams et al., 1998).

O rastreamento pelo Doppler transcraniano tem sido oferecido a todas as crianças em acompanhamento no HBH, a partir dos dois anos de idade, com a criança estando sem evento clínico, na ausência de febre e em vigília.

Os resultados dos testes do DTC foram estratificados de acordo com a classificação proposta pelo estudo STOP, acrescentando-se a recomendação de se incluir a velocidade máxima média (VMM) em uma das artérias cerebrais anteriores ≥ 170 cm/s como também representando risco elevado de desenvolvimento de AVC isquêmico (Kwiatkowski et al., 2004):

a. **Teste Doppler Normal = baixo risco**: todas as velocidades médias máximas de fluxo sanguíneo cerebral menor que 170 cm/s, sendo necessário a insonação das artérias cerebrais médias, artérias carótidas internas e artérias cerebrais anteriores.

b. **Teste Doppler Condicional ou Intermediário Baixo = certo aumento de risco:** velocidade média máxima entre 170-184 cm/s em uma das cerebrais médias ou em uma das carótidas internas.

c. **Teste Doppler Condicional Alto = aumento significativo de risco**: velocidade média máxima entre 185-199 cm/s em uma das cerebrais médias ou em uma das carótidas internas.

d. **Teste Doppler Anormal = risco alto**: velocidade máxima média maior ou igual a 200 cm/s em uma das cerebrais médias ou em uma das carótidas internas; velocidade máxima média em uma das artérias cerebrais anteriores ≥ 170 cm/s.

e. **Teste Doppler Inadequado = risco indefinido**: ausência de insonação de uma das artérias cerebrais médias de um dos lados, estando o lado contralateral normal. Se a velocidade máxima média de uma dessas artérias foi ≥ 200 cm/s, o exame foi considerado anormal (risco alto). Velocidade do fluxo sanguíneo cerebral nas artérias cerebrais médias <70 cm/s também foi considerada como exame inadequado.

O teste anormal (risco alto) foi confirmado por dois outros exames com intervalo de uma a quatro semanas. Se a criança fosse então confirmada como de alto risco para desenvolvimento de AVC isquêmico, ela era encaminhada para tratamento preventivo primário do evento, com regime de transfusões sanguíneas regulares (manutenção da HbS ≤ 30%).

5.8 Variáveis hematológicas

As informações contidas nos prontuários dos sujeitos da pesquisa foram informatizadas em um banco de dados construído, inicialmente, para ser utilizado pela Dra. Célia Maria Silva em sua tese de doutorado. Todas as informações dos prontuários dos participantes foram digitadas no banco de dados elaborado na plataforma do programa Microsoft Access 2003®, incluindo identificação, informações pessoais, dados hematológicos e eventos clínicos.

As variáveis hematológicas foram: concentração total de hemoglobina (Hb, g/dL), volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg),

leucometria total (LEU, 10^9/L), plaquetometria (PLAQ, 10^9/L), concentração de hemoglobina fetal (Hb F, %) e contagem de reticulócitos (Retic, %). Os valores de Hb total, VCM, HCM, LEU e PLAQ foram mensurados utilizando contador eletrônico de células (T-890, COUTER). A quantificação da porcentagem de Hb F foi realizada utilizando-se o método de imunodifusão radial (HbF Quiplate, Helena Laboratories). A contagem de reticulócitos foi realizada utilizando-se o método de azul de cresil brilhante na microscopia óptica.

A determinação dos valores basais das variáveis hematológicas obedeceu à seguinte metodologia:

1. Para determinação do nível de Hb total basal, foi considerada a média de todos os valores de hemoglobina, após os dois anos idade, desprezando-se os exames realizados após transfusões sanguíneas (90 dias) ou eventos clínicos significativos (Infecção grave, sequestro esplênico agudo e crise aplástica); nas crianças que entraram em regime de transfusão crônica os valores foram considerados até a data anterior ao início das transfusões. Nas crianças que iniciaram tratamento com hidroxiuréia, o nível da Hb total basal foi determinado com base na média dos valores anteriores ao início desta terapêutica. Para quatro crianças que não possuíam registro de exame após os dois anos de idade, o nível de Hb total basal foi tomado como o valor mais próximo a dois anos, no intervalo entre um ano e seis meses e dois anos.
2. Os níveis basais de VCM foram determinados de forma semelhante; para sete crianças que não possuíam registro de exame após os dois anos de idade, o nível basal de VCM foi tomado como o valor mais próximo a dois anos, no intervalo entre um ano e seis meses e dois anos.
3. Os níveis basais de HCM foram determinados de forma semelhante; para dez crianças que não possuíam registro de exame após os dois anos de idade, o nível basal de HCM foi tomado como o valor mais próximo a dois anos, no intervalo entre um ano e seis meses e dois anos.
4. Os níveis basais de Retic foram determinados de forma semelhante; para dez crianças que não possuíam registro de exame após os dois anos de idade, o nível basal de Retic foi tomado como o valor mais próximo a dois anos, no intervalo entre um ano e seis meses e dois anos. Uma criança não possuía registro de Retic no intervalo entre um ano e seis meses e dois anos, sendo assim excluída desta análise.
5. Os níveis basais de Hb F foram determinados de forma semelhante; para dez crianças que não possuíam registro de exame após os dois anos de idade, o nível basal de Hb F

foi tomado como o valor mais próximo a dois anos, no intervalo entre um ano e seis meses e dois anos. Doze crianças não possuíam registro de Hb F no intervalo entre um ano e seis meses e dois anos, sendo assim excluídas desta análise.

6. Os níveis basais de LEU foram determinados pela média dos valores de todos os exames.
7. Os níveis de basais de contagem de plaquetas foram determinados pelas médias dos valores de todos os exames.

5.9 Variáveis clínicas

Os eventos clínicos estudados foram:

- sequestro esplênico agudo (SEA), definido como o registro do evento no prontuário médico pelo hematologista responsável pelo acompanhamento da criança;
- síndrome torácica aguda (STA), definido como o registro do evento no prontuário médico pelo hematologista responsável pelo acompanhamento da criança;
- doença cerebrovascular (DCV), definido como a presença do exame Doppler transcraniano alterado ou acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico clínico (definido como o registro do evento no prontuário médico pelo hematologista responsável pelo acompanhamento da criança). Excluídas as crianças com DTC inadequados e aquelas em que o exame não foi realizado, os sujeitos da pesquisa foram dicotomizados em: 1) ausência de DCV e 2) presença de DCV (AVC ou DTC alterado nos três níveis de risco mencionados anteriormente).
- transfusões sanguíneas documentadas no prontuário médico.

Para tornar comparáveis as análises com relação à chance de ocorrência e ao número absoluto de eventos clínicos durante o tempo de acompanhamento da criança, foram

considerados: a) apenas os episódios de SEA até os 30 meses de idade, que representa o tempo mínimo de acompanhamento para todas as crianças da pesquisa e, ainda, idade em que mais de 75% desses eventos já ocorreram nas crianças acompanhadas no HBH (Rezende et al., 2009); b) com relação aos episódios de STA e transfusões sanguíneas foi utilizado o valor referente ao número absoluto de episódios do evento dividido pelo tempo de acompanhamento clínico (data de nascimento subtraída pela data da última consulta).

5.10 Análise estatística

Os resultados quantitativos foram expressos como média ± 1 desvio padrão (DP), ou pela mediana quando foi constatado que a média não era uma medida-resumo adequada. As prevalências foram expressas pelas porcentagens correspondentes ao item analisado e limites de confianças a 95%.

Para verificar a possível associação dos genótipos de α-Tal com aspectos clínicos e hematológicos da doença, os pacientes foram analisados independentemente como dois grupos de acordo com o genótipo, ou seja, SS e $S\beta^0$-tal. Os sujeitos homozigotos SS, inicialmente, foram divididos em três grupos: I- ausência de α-Tal (quatro genes alfa selvagens), II- heterozigose para α-Tal-2 (um gene alfa afetado) e III- homozigose para α-Tal-2 (dois genes alfa afetados). Posteriormente, os pacientes foram divididos em dois grupos: ausência de α-Tal (I) e presença de α-Tal (II e III). Os pacientes com o genótipo $S\beta^0$-talassemia foram divididos em dois grupos: ausência de α-Tal e heterozigose para α-Tal-2.

Para verificar a possível associação dos haplótipos do agrupamento da β^S-globina com aspectos clínicos e hematológicos da doença, apenas os pacientes homozigotos SS foram analisados. Inicialmente, os indivíduos com os genótipos CAR/CAR, Ben/CAR e Ben/Ben foram comparados entre si. Posteriormente, foi realizada uma comparação entre os indivíduos homozigotos CAR/CAR e Ben/Ben. Tendo em vista possível associação do haplótipo CAR com a forma mais grave da doença (Powars et al., 1990; Powars 1991; Powars e Hiti 1993),

uma última análise comparou os indivíduos com pelo menos um cromossomo do tipo CAR *versus* os indivíduos com ausência de cromossomos do tipo CAR.

O estudo estatístico compreendeu em:

- confecção de tabelas de frequência;
- análise univariada da associação dos genótipos de α-Tal ou dos haplótipos β^S com níveis de Hb total, VCM, HCM, LEU, PLAQ, Hb F e RETIC (variáveis contínuas), através da comparação das médias de três grupos utilizando a análise de variância (ANOVA One-Way) para variáveis com a distribuição normal e com homocedasticidade, ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para variáveis com a distribuição não-normal e/ou sem homocedasticidade. Quando foi feito uma comparação entre dois grupos utilizou-se o teste t de Student ou de Mann-Whitney para as variáveis com distribuição normal ou não-normal, respectivamente. A verificação da distribuição normal ou não-normal dos valores das variáveis contínuas foi feita utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para verificação do pressuposto de homocedasticidade foi utilizado o teste de homogeneidade da variância. Adicionalmente, utilizou-se o teste de Bonferoni para comparação de cada par de médias dos diferentes grupos e assim constatar em quais grupos as diferenças ocorriam.
- análise univariada da associação dos genótipos de α-Tal ou dos haplótipos β^S com a ocorrência ou não de SEA até 30 meses de idade e a ocorrência ou não de DCV (variáveis nominais), utilizando-se o teste do qui-quadrado, ou o teste exato de Fisher quando os valor esperado de alguma célula da tabela de contingência era inferior a 5. Para análise da associação dos genótipos de α-talassemia ou dos haplótipos β^S com número de STA/ano de seguimento e número de transfusões sanguíneas/ano de seguimento (variáveis contínuas com distribuição não-normal) foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ou de Mann-Whitney.

Uma associação foi considerada estatisticamente significativa quando a probabilidade de erro alfa foi igual ou inferior a 0,05. Todo o estudo estatístico foi processado utilizando o programa SPSS, versão 17.0.

5.11 Aspectos éticos

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1) foi apresentado ao responsável legal do potencial participante e, quando necessário, à própria criança (crianças com sete anos ou mais). O estudo foi explicado verbalmente pelos pesquisadores envolvidos durante as consultas de rotina do acompanhamento clínico. Quando foi concedida a autorização para participação, o responsável legal e, quando necessário, a própria criança, assinaram o TCLE, ficando sob sua guarda uma cópia e outra sob a guarda dos pesquisadores.

A consulta aos prontuários foi feita de modo a garantir o sigilo das informações pessoais de cada sujeito da pesquisa. Os pesquisadores envolvidos se comprometeram a utilizar o material biológico e os dados coletados exclusivamente para os fins previstos no projeto de pesquisa.

O projeto de pesquisa referente a este trabalho foi aprovado pela Câmara do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP; anexo 2) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOMINAS (CEP-HEMOMINAS; anexo 3).

5.12 Financiamento

Todo o material de laboratório utilizado no desenvolvimento do estudo, tais como, kits de extração de DNA, reagentes para PCR, enzimas de restrição, tubos e ponteiras foram adquiridos com recursos do orçamento do serviço de pesquisa da Fundação HEMOMINAS. As bolsas de iniciação científica para os estudantes de graduação envolvidos foram financiadas pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). O pesquisador autor da dissertação contou com uma bolsa de mestrado concedida pela

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O orientador é bolsista pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), nível 2. Adicionalmente, a pesquisa recebeu apoio logístico da central de projetos do NUPAD e do centro de pós-graduação da Faculdade de Medicina da UFMG.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, R. J., A. Kutlar, et al. (1994). "Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia." Am J Hematol **45**(4): 279-82.

Adams, R. J., V. C. McKie, et al. (1998). "Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography." N Engl J Med **339**(1): 5-11.

Adekile, A. (2005). "Mild-phenotype sickle cell disease: molecular basis, clinical presentation and management recommendations." Current Paediatrics **15**: 57-61.

Adekile, A., F. Kutlar, et al. (2005). "The influence of uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A promoter polymorphisms, beta-globin gene haplotype, co-inherited alpha-thalassemia trait and Hb F on steady-state serum bilirubin levels in sickle cell anemia." Eur J Haematol **75**(2): 150-5.

Adekile, A. D., R. Gupta, et al. (2001). "Avascular necrosis of the hip in children with sickle cell disease and high Hb F: magnetic resonance imaging findings and influence of alpha-thalassemia trait." Acta Haematol **105**(1): 27-31.

Adekile, A. D. and M. Z. Haider (1996). "Morbidity, beta S haplotype and alpha-globin gene patterns among sickle cell anemia patients in Kuwait." Acta Haematol **96**(3): 150-4.

Adekile, A. D. and T. H. Huisman (1993). "Level of fetal hemoglobin in children with sickle cell anemia: influence of gender, haplotype and alpha-thalassemia-2 trait." Acta Haematol **90**(1): 34-8.

Adekile, A. D., K. M. McKie, et al. (1993). "Spleen in sickle cell anemia: comparative studies of Nigerian and U.S. patients." Am J Hematol **42**(3): 316-21.

Adekile, A. D., M. Tuli, et al. (1996). "Influence of alpha-thalassemia trait on spleen function in sickle cell anemia patients with high HbF." Am J Hematol **53**(1): 1-5.

Adorno, E. V., F. D. Couto, et al. (2005). "Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil." Cad Saude Publica **21**(1): 292-8.

Adorno, E. V., J. P. Moura-Neto, et al. (2008). "Sequence change in the HS2-LCR and Ggamma-globin gene promoter region of sickle cell anemia patients." Braz J Med Biol Res **41**(2): 95-8.

Adorno, E. V., A. Zanette, et al. (2008). "Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil." Genetics and Molecular Biology **31**(3): 621-625.

Adorno, E. V., A. Zanette, et al. (2004). "The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view." Hemoglobin **28**(3): 267-71.

Aidoo, M., D. J. Terlouw, et al. (2002). "Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality." Lancet **359**(9314): 1311-2.

Aliyu, Z. Y., A. R. Tumblin, et al. (2006). "Current therapy of sickle cell disease." Haematologica **91**(1): 7-10.

Aluoch, J. R., Y. Kilinc, et al. (1986). "Sickle cell anaemia among Eti-Turks: haematological, clinical and genetic observations." Br J Haematol **64**(1): 45-55.

Araújo, M. C. P. E., E. S. S. Serafim, et al. (2004). "Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil." Cad. Saude Publica **20**(1): 123-128.

Arends, A., M. Alvarez, et al. (2000). "Determination of beta-globin gene cluster haplotypes and prevalence of alpha-thalassemia in sickle cell anemia patients in Venezuela." Am J Hematol **64**(2): 87-90.

Ashley-Koch, A., Q. Yang, et al. (2000). "Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review." Am J Epidemiol **151**(9): 839-45.

Bailey, S., D. R. Higgs, et al. (1991). "Is the painful crisis of sickle-cell disease due to sickling?" Lancet **337**(8743): 735.

Bakioglu, I., Y. Hattori, et al. (1985). "Five adults with mild sickle cell anemia share a beta S chromosome with the same haplotype." Am J Hematol **20**(3): 297-300.

Balkaran, B., G. Char, et al. (1992). "Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease." J Pediatr **120**(3): 360-6.

Ballas, S. K. (2001). "Effect of alpha-globin genotype on the pathophysiology of sickle cell disease." Pediatr Pathol Mol Med **20**(2): 107-21.

Ballas, S. K., J. Larner, et al. (1988). "Rheologic predictors of the severity of the painful sickle cell crisis." Blood **72**(4): 1216-23.

Ballas, S. K., C. A. Talacki, et al. (1991). "The Xmn I site (-158, C----T) 5' to the G gamma gene: correlation with the Senegalese haplotype and G gamma globin expression." Hemoglobin **15**(5): 393-405.

Ballas, S. K., C. A. Talacki, et al. (1989). "The prevalence of avascular necrosis in sickle cell anemia: correlation with alpha-thalassemia." Hemoglobin **13**(7-8): 649-55.

Bank, A. (2006). "Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities." Blood **107**(2): 435-43.

Bernaudin, F., S. Verlhac, et al. (2008). "G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia." Blood **112**(10): 4314-7.

Bezerra, M. A., M. N. Santos, et al. (2007). "Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the State of Pernambuco, Brazil." Hemoglobin **31**(1): 83-8.

Billett, H. H., K. Kim, et al. (1986). "The percentage of dense red cells does not predict incidence of sickle cell painful crisis." Blood **68**(1): 301-3.

Billett, H. H., R. L. Nagel, et al. (1995). "Paradoxical increase of painful crises in sickle cell patients with alpha-thalassemia." Blood **86**(11): 4382.

Braden, D. S., W. Covitz, et al. (1996). "Cardiovascular function during rest and exercise in patients with sickle-cell anemia and coexisting alpha thalassemia-2." Am J Hematol **52**(2): 96-102.

Brandelise, S., V. Pinheiro, et al. (2004). "Newborn screening for sickle cell disease in Brazil: the Campinas experience." Clin Lab Haematol **26**(1): 15-9.

Brasil (2006). Manual de condutas básicas na doença falciforme. D. d. A. Especializada. Brasília, Editora do Ministério da Saúde**:** 56.

Bridges, K. R., G. D. Barabino, et al. (1996). "A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing hydroxyurea therapy." Blood **88**(12): 4701-10.

Cançado, R. D. (2006). "Talassemias alfa." Rev. Bras. Hematol. Hemoter. **28**(2): 86-87.

Cançado, R. D. and J. A. Jesus (2007). "A doença falciforme no Brasil." Rev. Bras. Hematol. Hemoter. **29**(3): 203-206.

Castro, O. (1999). "Management of sickle cell disease: recent advances and controversies." Br J Haematol **107**(1): 2-11.

Castro, O., D. J. Brambilla, et al. (1994). "The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease." Blood **84**(2): 643-9.

Chaar, V., L. Keclard, et al. (2006). "UGT1A1 polymorphism outweighs the modest effect of deletional (-3.7 kb) alpha-thalassemia on cholelithogenesis in sickle cell anemia." Am J Hematol **81**(5): 377-9.

Chakravarti, A., K. H. Buetow, et al. (1984). "Nonuniform recombination within the human beta-globin gene cluster." Am J Hum Genet **36**(6): 1239-58.

Chan, L. S. and D. R. Powars (1994). "Controversies surrounding the effects of beta S-haplotype and alpha-thalassemia-2 on the clinical severity of sickle cell anemia." Blood **83**(9): 2754.

Chang, Y. C., K. D. Smith, et al. (1995). "An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, beta-globin haplotypes, alpha-globin gene number, gender, and age." Blood **85**(4): 1111-7.

Chang, Y. P., M. Maier-Redelsperger, et al. (1997). "The relative importance of the X-linked FCP locus and beta-globin haplotypes in determining haemoglobin F levels: a study of SS patients homozygous for beta S haplotypes." Br J Haematol **96**(4): 806-14.

Charache, S., G. J. Dover, et al. (1992). "Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia." Blood **79**(10): 2555-65.

Charache, S., M. L. Terrin, et al. (1995). "Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia." N Engl J Med **332**(20): 1317-22.

Cohen, A. R., M. B. Martin, et al. (1992). "A modified transfusion program for prevention of stroke in sickle cell disease." Blood **79**(7): 1657-61.

Condon, P. I., R. J. Marsh, et al. (1983). "Alpha thalassaemia and the macular vasculature in homozygous sickle cell disease." Br J Ophthalmol **67**(11): 779-81.

Costa, F. F., M. H. Tavella, et al. (1989). "Deletion type alpha-thalassemia among brazilian patients with sickle cell anemia." Brazil. J. Genetics **12**(3): 605-611.

Costa, P. J. M. S., R. Q. B. Vilela, et al. (2006). "Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo bantu da anemia falciforme." Rev. Bras. Hematol. Hemoter. **28**(1): 40-44.

Crawford, D. C., M. Caggana, et al. (2002). "Characterization of beta-globin haplotypes using blood spots from a population-based cohort of newborns with homozygous HbS." Genet Med **4**(5): 328-35.

Cuellar-Ambrosi, F., M. C. Mondragon, et al. (2000). "Sickle cell anemia and beta-globin gene cluster haplotypes in Colombia." Hemoglobin **24**(3): 221-5.

Currat, M., G. Trabuchet, et al. (2002). "Molecular analysis of the beta-globin gene cluster in the Niokholo Mandenka population reveals a recent origin of the beta(S) Senegal mutation." Am J Hum Genet **70**(1): 207-23.

Curtin, P. D. (1969). The Atlantic slave trade: a census. Milwaukee, The University of Wistoconsin Press.

Daudt, L. E., D. Zechmaister, et al. (2002). "Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil." Cad. Saude Publica **18**(3): 833-841.

de Ceulaer, K., D. R. Higgs, et al. (1983). "alpha-Thalassemia reduces the hemolytic rate in homozygous sickle-cell disease." N Engl J Med **309**(3): 189-90.

De Ceulaer, K. and G. R. Serjeant (1991). "Acute splenic sequestration in Jamaican adults with homozygous sickle cell disease: a role of alpha thalassaemia." Br J Haematol **77**(4): 563-4.

de Montalembert, M., M. Maier-Redelsperger, et al. (1993). "Beta-globin gene cluster haplotype and alpha-thalassemia do not correlate with the acute clinical manifestations of sickle cell disease in children." Blood **82**(8): 2595-6.

Di Nuzzo, D. V. and S. F. Fonseca (2004). "[Sickle cell disease and infection]." J Pediatr (Rio J) **80**(5): 347-54.

Dimovski, A. J., C. Oner, et al. (1991). "Certain mutations observed in the 5' sequences of the G gamma- and A gamma-globin genes of beta S chromosomes are specific for chromosomes with major haplotypes." Acta Haematol **85**(2): 79-87.

Diniz, D., C. Guedes, et al. (2009). "Prevalência do traço e da anemia falciforme em recém-nascidos do Distrito Federal, Brasil, 2004 a 2006." Cad. Saude Publica **25**(1): 188-194.

el-Hazmi, M. A. (1992). "Heterogeneity and variation of clinical and haematological expression of haemoglobin S in Saudi Arabs." Acta Haematol **88**(2-3): 67-71.

el-Hazmi, M. A. and A. S. Warsy (1999). "Alpha thalassaemia in Yemeni children with sickle cell disease." J Trop Pediatr **45**(6): 370-4.

el-Hazmi, M. A., A. S. Warsy, et al. (1999). "Haplotypes of the beta-globin gene as prognostic factors in sickle-cell disease." East Mediterr Health J **5**(6): 1154-8.

Embury, S. H. (1988). "The interaction of alpha-thalassemia with sickle cell anemia." Hemoglobin **12**(5-6): 509-17.

Embury, S. H., M. R. Clark, et al. (1984). "Concurrent sickle cell anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes." J Clin Invest **73**(1): 116-23.

Embury, S. H., A. M. Dozy, et al. (1982). "Concurrent sickle-cell anemia and alpha-thalassemia: effect on severity of anemia." N Engl J Med **306**(5): 270-4.

Estimates Database. 2010. Voyages: The trans-atlantic slave trade database. http://www.slavevoyages.org/tast/assessment/estimates.faces (acessado em 25 de Junho de 2010).

Fabry, M. E., J. G. Mears, et al. (1984). "Dense cells in sickle cell anemia: the effects of gene interaction." Blood **64**(5): 1042-6.

Falusi, A. G., G. J. Esan, et al. (1987). "Alpha-thalassaemia in Nigeria: its interaction with sickle-cell disease." Eur J Haematol **38**(4): 370-5.

Felice, A. E., K. M. McKie, et al. (1987). "Effects of alpha-thalassemia-2 on the developmental changes of hematological values in children with sickle cell disease from Georgia." Am J Hematol **25**(4): 389-400.

Feng, Z., D. L. Smith, et al. (2004). "Coupling ecology and evolution: malaria and the S-gene across time scales." Math Biosci **189**(1): 1-19.

Fernandes, A. P. P. C. (2007). Caracterização e circunstâncias da ocorrência de óbitos em crianças com doença falciforme triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais, no período de março de 1998 a fevereiro de 2005. Faculdade de Medicina. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. **Dissertação de Mestrado:** 156.

Figueiredo, M. S., J. Kerbauy, et al. (1996). "Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil." Am J Hematol **53**(2): 72-6.

Fleury, M. K. (2007). "Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais." RBCA **39**(2): 89-93.

Flint, J., R. M. Harding, et al. (1993). "Why are some genetic diseases common? Distinguishing selection from other processes by molecular analysis of globin gene variants." Hum Genet **91**(2): 91-117.

Fox, P. D., D. T. Dunn, et al. (1990). "Risk factors for proliferative sickle retinopathy." Br J Ophthalmol **74**(3): 172-6.

Fox, P. D., D. R. Higgs, et al. (1993). "Influence of alpha thalassaemia on the retinopathy of homozygous sickle cell disease." Br J Ophthalmol **77**(2): 89-90.

Frenette, P. S. and G. F. Atweh (2007). "Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise." J Clin Invest **117**(4): 850-8.

Gill, F. M., L. A. Sleeper, et al. (1995). "Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease." Blood **86**(2): 776-83.

Gilman, J. G. and T. H. Huisman (1985). "DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production." Blood **66**(4): 783-7.

Goncalves, M. S., G. C. Bomfim, et al. (2003). "BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil." Braz J Med Biol Res **36**(10): 1283-8.

Goncalves, M. S., J. F. Nechtman, et al. (1994). "Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the beta s haplotypes." Hum Hered **44**(6): 322-7.

Green, N. S., M. E. Fabry, et al. (1993). "Senegal haplotype is associated with higher HbF than Benin and Cameroon haplotypes in African children with sickle cell anemia." Am J Hematol **44**(2): 145-6.

Guasch, A., C. F. Zayas, et al. (1999). "Evidence that microdeletions in the alpha globin gene protect against the development of sickle cell glomerulopathy in humans." J Am Soc Nephrol **10**(5): 1014-9.

Gupta, R. B., R. S. Tiwary, et al. (1991). "Hemoglobinopathies among the Gond tribal groups of central India; interaction of alpha- and beta-thalassemia with beta chain variants." Hemoglobin **15**(5): 441-58.

Hagar, W. and E. Vichinsky (2008). "Advances in clinical research in sickle cell disease." Br J Haematol **141**(3): 346-56.

Haider, M. Z., S. Ashebu, et al. (1998). "Influence of alpha-thalassemia on cholelithiasis in SS patients with elevated Hb F." Acta Haematol **100**(3): 147-50.

Hanchard, N., A. Elzein, et al. (2007). "Classical sickle beta-globin haplotypes exhibit a high degree of long-range haplotype similarity in African and Afro-Caribbean populations." BMC Genet **8**: 52.

Heidenreich, R. A. Mutation examples: the hemoglobinopathies. **Medical and Molecular Genetics**, London, n.801, p.1-10, feb. 2005.

Higgs, D. R., B. E. Aldridge, et al. (1982). "The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease." N Engl J Med **306**(24): 1441-6.

Higgs, D. R., A. V. Hill, et al. (1984). "Independent recombination events between the duplicated human alpha globin genes; implications for their concerted evolution." Nucleic Acids Res **12**(18): 6965-77.

Higgs, D. R., M. A. Vickers, et al. (1989). "A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster." Blood **73**(5): 1081-104.

Hillery, C. A. and J. A. Panepinto (2004). "Pathophysiology of stroke in sickle cell disease." Microcirculation **11**(2): 195-208.

Hsu, L. L., S. T. Miller, et al. (2003). "Alpha Thalassemia is associated with decreased risk of abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia." J Pediatr Hematol Oncol **25**(8): 622-8.

Huisman, T. H., C. Altay, et al. (1981). "Quantitation of three types of gamma chain of HbF by high pressure liquid chromatography; application of this method to the HbF of patients with sickle cell anemia or the S-HPFH condition." Blood **57**(1): 75-82.

Inati, A., A. Taher, et al. (2003). "Beta-globin gene cluster haplotypes and HbF levels are not the only modulators of sickle cell disease in Lebanon." Eur J Haematol **70**(2): 79-83.

Januario, J. N. (2002). Incidência da doença falciforme em um milhão de nascidos vivos em Minas Gerais (1998-2001). Faculdade de Medicina. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. **Dissertação de Mestrado:** 124.

Joneckis, C. C., R. L. Ackley, et al. (1993). "Integrin alpha 4 beta 1 and glycoprotein IV (CD36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia." Blood **82**(12): 3548-55.

Kato, G. J., M. T. Gladwin, et al. (2007). "Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes." Blood Rev **21**(1): 37-47.

Keclard, L., V. Ollendorf, et al. (1996). "Beta S haplotypes, alpha-globin gene status, and hematological data of sickle cell disease patients in Guadeloupe (F.W.I.)." Hemoglobin **20**(1): 63-74.

Keclard, L., M. Romana, et al. (1997). "Sickle cell disorder, beta-globin gene cluster haplotypes and alpha-thalassemia in neonates and adults from Guadeloupe." Am J Hematol **55**(1): 24-7.

Koshy, M., R. Entsuah, et al. (1989). "Leg ulcers in patients with sickle cell disease." Blood **74**(4): 1403-8.

Kulozik, A. E., B. C. Kar, et al. (1987). "Fetal hemoglobin levels and beta (s) globin haplotypes in an Indian populations with sickle cell disease." Blood **69**(6): 1742-6.

Kutlar, A., F. Kutlar, et al. (2001). "The methylene tetrahydrofolate reductase (C677T) mutation as a potential risk factor for avascular necrosis in sickle cell disease." Hemoglobin **25**(2): 213-7.

Kwiatkowski, J. L., R. Zimmerman, et al. (2004). "Stroke and elevated blood flow velocity in the anterior cerebral artery in sickle cell disease." J Pediatr Hematol Oncol **26**(5): 323-6.

Labie, D., O. Dunda-Belkhodja, et al. (1985). "The -158 site 5' to the G gamma gene and G gamma expression." Blood **66**(6): 1463-5.

Labie, D., J. Pagnier, et al. (1985). "Common haplotype dependency of high G gamma-globin gene expression and high Hb F levels in beta-thalassemia and sickle cell anemia patients." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(7): 2111-4.

Labie, D., R. Srinivas, et al. (1989). "Haplotypes in tribal Indians bearing the sickle gene: evidence for the unicentric origin of the beta S mutation and the unicentric origin of the tribal populations of India." Hum Biol **61**(4): 479-91.

Lapoumeroulie, C., O. Dunda, et al. (1992). "A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type." Hum Genet **89**(3): 333-7.

Lemos Cardoso, G. and J. Farias Guerreiro (2006). "African gene flow to north Brazil as revealed by HBB*S gene haplotype analysis." Am J Hum Biol **18**(1): 93-8.

Liebhaber, S. A., F. E. Cash, et al. (1986). "Human alpha-globin gene expression. The dominant role of the alpha 2-locus in mRNA and protein synthesis." J Biol Chem **261**(32): 15327-33.

Lima, C. S., E. M. Rocha, et al. (2006). "Risk factors for conjunctival and retinal vessel alterations in sickle cell disease." Acta Ophthalmol Scand **84**(2): 234-41.

Liu, L., S. Muralidhar, et al. (2009). "High-density SNP genotyping to define beta-globin locus haplotypes." Blood Cells Mol Dis **42**(1): 16-24.

Lowenthal, E. A., A. Wells, et al. (1996). "Sickle cell acute chest syndrome associated with parvovirus B19 infection: case series and review." Am J Hematol **51**(3): 207-13.

Lu, Z. H. and M. H. Steinberg (1996). "Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: relation to regulatory sequences cis to the beta-globin gene. Multicenter Study of Hydroxyurea." Blood **87**(4): 1604-11.

Luporini, S. M., I. Bendit, et al. (2001). "Growth hormone and insulin-like growth factor I axis and growth of children with different sickle cell anemia haplotypes." J Pediatr Hematol Oncol **23**(6): 357-63.

Lyra, I. M., M. S. Goncalves, et al. (2005). "Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil." Cad Saude Publica **21**(4): 1287-90.

Magnus, S. A., I. R. Hambleton, et al. (1999). "Recurrent infections in homozygous sickle cell disease." Arch Dis Child **80**(6): 537-41.

Martinez, G., A. Muniz, et al. (1996). "Age dependence of the gene frequency of alpha-thalassemia in sickle cell anemia in Cuba." Blood **88**(5): 1898-9.

Martins, R., A. Morais, et al. (2008). "Early modification of sickle cell disease clinical course by UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene promoter polymorphism." J Hum Genet **53**(6): 524-8.

Mears, J. G., H. M. Lachman, et al. (1983). "Alpha-thalassemia is related to prolonged survival in sickle cell anemia." Blood **62**(2): 286-90.

Messmann, R., S. Gannon, et al. (1990). "Mechanical properties of sickle cell membranes." Blood **75**(8): 1711-7.

Miller, B. A., N. Olivieri, et al. (1987). "Molecular analysis of the high-hemoglobin-F phenotype in Saudi Arabian sickle cell anemia." N Engl J Med **316**(5): 244-50.

Miller, S. T., R. F. Rieder, et al. (1988). "Cerebrovascular accidents in children with sickle-cell disease and alpha-thalassemia." J Pediatr **113**(5): 847-9.

Miller, S. T., L. A. Sleeper, et al. (2000). "Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease." N Engl J Med **342**(2): 83-9.

Milner, P. F., G. J. Garbutt, et al. (1986). "The effect of Hb F and alpha-thalassemia on the red cell indices in sickle cell anemia." Am J Hematol **21**(4): 383-95.

Milner, P. F., A. P. Kraus, et al. (1991). "Sickle cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head." N Engl J Med **325**(21): 1476-81.

Milner, P. F., A. P. Kraus, et al. (1993). "Osteonecrosis of the humeral head in sickle cell disease." Clin Orthop Relat Res(289): 136-43.

Modell, B. and V. Bulyzhenkov (1988). "Distribution and control of some genetic disorders." World Health Stat Q **41**(3-4): 209-18.

Month, S. R., R. W. Wood, et al. (1990). "Analysis of 5' flanking regions of the gamma globin genes from major African haplotype backgrounds associated with sickle cell disease." J Clin Invest **85**(2): 364-70.

Morris, C. R. (2008). "Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 177-85.

Mouele, R., V. Boukila, et al. (1999). "Sickle-cell disease in Brazzaville, Congo: genetical, hematological, biochemical and clinical aspects." Acta Haematol **101**(4): 178-84.

Mouele, R., O. Pambou, et al. (2000). "alpha-thalassemia in Bantu population from Congo-Brazzaville: its interaction with sickle cell anemia." Hum Hered **50**(2): 118-25.

Mukherjee, M. B., R. B. Colah, et al. (1997). "Milder clinical course of sickle cell disease in patients with alpha thalassemia in the Indian subcontinent." Blood **89**(2): 732.

Mukherjee, M. B., R. Surve, et al. (1998). "The influence of alpha-thalassaemia on the haematological & clinical expression of sickle cell disease in western India." Indian J Med Res **107**: 178-81.

Nagel, R. L. (1991). "Severity, pathobiology, epistatic effects, and genetic markers in sickle cell anemia." Semin Hematol **28**(3): 180-201.

Nagel, R. L. (2005). "Epistasis and the genetics of human diseases." C R Biol **328**(7): 606-15.

Nagel, R. L., S. Erlingsson, et al. (1991). "The Senegal DNA haplotype is associated with the amelioration of anemia in African-American sickle cell anemia patients." Blood **77**(6): 1371-5.

Nagel, R. L., M. E. Fabry, et al. (1985). "Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type." N Engl J Med **312**(14): 880-4.

Nagel, R. L. and H. M. Ranney (1990). "Genetic epidemiology of structural mutations of the beta-globin gene." Semin Hematol **27**(4): 342-59.

Nagel, R. L., S. K. Rao, et al. (1987). "The hematologic characteristics of sickle cell anemia bearing the Bantu haplotype: the relationship between G gamma and HbF level." Blood **69**(4): 1026-30.

Nagel, R. L. and M. H. Steinberg (2001). "Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia." Pediatr Pathol Mol Med **20**(2): 123-36.

Naoum, P. C. (1997). Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo, Sarvier.

Naoum, P. C. (2000). "Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme." Rev. Bras. Hematol. Hemoter. **22**(1): 05-22.

Neonato, M. G., M. Guilloud-Bataille, et al. (2000). "Acute clinical events in 299 homozygous sickle cell patients living in France. French Study Group on Sickle Cell Disease." Eur J Haematol **65**(3): 155-64.

Neto, G. C. G., M. S. Pitombeira, et al. (2005). "Análise dos haplótipos do gene da bS-globina no Ceará." J. Bras. Patol. Med. Lab. **41**(5): 315-321.

Noguchi, C. T., G. J. Dover, et al. (1985). "Alpha thalassemia changes erythrocyte heterogeneity in sickle cell disease." J Clin Invest **75**(5): 1632-7.

Nolan, V. G., C. Baldwin, et al. (2005). "Association of single nucleotide polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia." Br J Haematol **128**(2): 266-72.

Ohene-Frempong, K., S. J. Weiner, et al. (1998). "Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors." Blood **91**(1): 288-94.

Ojwang, P. J., T. Ogada, et al. (1987). "Haplotypes and alpha globin gene analyses in sickle cell anaemia patients from Kenya." Br J Haematol **65**(2): 211-5.

Padmos, M. A., G. T. Roberts, et al. (1991). "Two different forms of homozygous sickle cell disease occur in Saudi Arabia." Br J Haematol **79**(1): 93-8.

Pagnier, J., J. G. Mears, et al. (1984). "Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(6): 1771-3.

Pante-De-Sousa, G., R. C. Mousinho-Ribeiro, et al. (1999). "Beta-globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa." Ann Hum Biol **26**(4): 365-73.

Pante-de-Sousa, G., R. C. Mousinho-Ribeiro, et al. (1998). "Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations." Genet. Mol. Biol. **21**(4): 427-430.

Platt, O. S., D. J. Brambilla, et al. (1994). "Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death." N Engl J Med **330**(23): 1639-44.

Platt, O. S., S. H. Orkin, et al. (1984). "Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia." J Clin Invest **74**(2): 652-6.
Platt, O. S., B. D. Thorington, et al. (1991). "Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors." N Engl J Med **325**(1): 11-6.
Powars, D., L. S. Chan, et al. (1990). "The variable expression of sickle cell disease is genetically determined." Semin Hematol **27**(4): 360-76.
Powars, D. and A. Hiti (1993). "Sickle cell anemia. Beta s gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression." Am J Dis Child **147**(11): 1197-202.
Powars, D., B. Wilson, et al. (1978). "The natural history of stroke in sickle cell disease." Am J Med **65**(3): 461-71.
Powars, D. R. (1991). "Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features." Hematol Oncol Clin North Am **5**(3): 475-93.
Powars, D. R. (1991). "Sickle cell anemia: beta s-gene-cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ failure." Semin Hematol **28**(3): 202-8.
Quadri, M. I., S. I. Islam, et al. (2000). "The effect of alpha-thalassemia on cord blood red cell indices and interaction with sickle cell gene." Ann Saudi Med **20**(5-6): 367-70.
Quinn, C. T., Z. R. Rogers, et al. (2004). "Survival of children with sickle cell disease." Blood **103**(11): 4023-7.
Rahimi, Z., A. Merat, et al. (2006). "Implications of the genetic epidemiology of globin haplotypes linked to the sickle cell gene in southern Iran." Hum Biol **78**(6): 719-31.
Reed, W. and E. P. Vichinsky (1998). "New considerations in the treatment of sickle cell disease." Annu Rev Med **49**: 461-74.
Rezende, P. V., M. B. Viana, et al. (2009). "Acute splenic sequestration in a cohort of children with sickle cell anemia." J Pediatr (Rio J) **85**(2): 163-9.
Rieder, R. F., S. Safaya, et al. (1991). "Effect of beta-globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia." Am J Hematol **36**(3): 184-9.
Rodgers, G. P., G. J. Dover, et al. (1990). "Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea." N Engl J Med **322**(15): 1037-45.
Rogers, Z. R., D. R. Powars, et al. (1989). "Nonblack patients with sickle cell disease have African beta S gene cluster haplotypes." JAMA **261**(20): 2991-4.
Roy, M. S., G. P. Rodgers, et al. (1985). "Conjunctival sign in sickle cell anaemia: an in-vivo correlate of the extent of red cell heterogeneity." Br J Ophthalmol **69**(8): 629-32.
Rund, D. and S. Fucharoen (2008). "Genetic modifiers in hemoglobinopathies." Curr Mol Med **8**(7): 600-8.
Saleh, A. W., H. F. Hillen, et al. (1999). "Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy." Acta Haematol **102**(1): 31-7.
Sarnaik, S. A. and S. K. Ballas (2001). "Molecular characteristics of pediatric patients with sickle cell anemia and stroke." Am J Hematol **67**(3): 179-82.
Schroeder, W. A., D. R. Powars, et al. (1989). "Beta-cluster haplotypes, alpha-gene status, and hematological data from SS, SC, and S-beta-thalassemia patients in southern California." Hemoglobin **13**(4): 325-53.
Scothorn, D. J., C. Price, et al. (2002). "Risk of recurrent stroke in children with sickle cell disease receiving blood transfusion therapy for at least five years after initial stroke." J Pediatr **140**(3): 348-54.
Serjeant, B. E., K. P. Mason, et al. (1983). "Effect of alpha thalassaemia on the rheology of homozygous sickle cell disease." Br J Haematol **55**(3): 479-86.
Serjeant, G., B. Serjeant, et al. (1996). "Determinants of haemoglobin level in steady-state homozygous sickle cell disease." Br J Haematol **92**(1): 143-9.
Serjeant, G. R. (1992). Sickle cell disease. New York, Oxford University Press.

Serjeant, G. R., M. T. Ashcroft, et al. (1973). "The clinical features of sickle-cell-thalassaemia in Jamaica." Br J Haematol **24**(1): 19-30.

Serjeant, G. R., B. E. Serjeant, et al. (1993). "Human parvovirus infection in homozygous sickle cell disease." Lancet **341**(8855): 1237-40.

Serjeant, G. R., A. Singhal, et al. (2001). "Sickle cell disease and age at menarche in Jamaican girls: observations from a cohort study." Arch Dis Child **85**(5): 375-8.

Serjeant, G. R., A. M. Sommereux, et al. (1979). "Comparison of sickle cell-beta0 thalassaemia with homozygous sickle cell disease." Br J Haematol **41**(1): 83-93.

Silva, C. M. (2009). Rastreamento de crianças com doença falciforme pelo Doppler transcraniano em uma coorte de pacientes triados pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal do Estado de Minas Gerais (PETN-MG) e acompanhados no Hemocentro de Belo Horizonte - MG - Brasil. Faculdade de Medicina. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. **Tese de Doutoramento:** 125.

Silva, M. A. L. (2006). Estudos da Identificação de Haplótipos e a Relação com as Manifestações Clínicas em Pacientes com Anemia Falciforme. Faculdade de Medicina. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Dissertação de Mestrado:** 105.

Silva, M. C. and E. L. T. Shimauti (2006). "Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme." Rev. Bras. Hematol. Hemoter. **28**(2): 144-148.

Silva, W. S., A. Lastra, et al. (2006). "Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em população do Recôncavo Baiano, Brasil." Cad. Saude Publica **22**(12): 2561-2566.

Singhal, A., J. Morris, et al. (1996). "Factors affecting prepubertal growth in homozygous sickle cell disease." Arch Dis Child **74**(6): 502-6.

Sommer, C. K., A. S. Goldbeck, et al. (2006). "Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul, Brasil." Cad. Saude Publica **22**(8): 1709-1714.

Sonati, M. F., S. B. Farah, et al. (1991). "High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil." Hemoglobin **15**(4): 309-11.

Steinberg, M. H. (2005). "Predicting clinical severity in sickle cell anaemia." Br J Haematol **129**(4): 465-81.

Steinberg, M. H. (2008). "Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches." ScientificWorldJournal **8**: 1295-324.

Steinberg, M. H. (2009). "Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia." ScientificWorldJournal **9**: 46-67.

Steinberg, M. H., F. Barton, et al. (2003). "Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment." JAMA **289**(13): 1645-51.

Steinberg, M. H. and S. H. Embury (1986). "Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene." Blood **68**(5): 985-90.

Steinberg, M. H., H. Hsu, et al. (1995). "Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia." Am J Hematol **48**(3): 175-81.

Steinberg, M. H., W. Rosenstock, et al. (1984). "Effects of thalassemia and microcytosis on the hematologic and vasoocclusive severity of sickle cell anemia." Blood **63**(6): 1353-60.

Stevens, M. C., G. H. Maude, et al. (1986). "Alpha thalassemia and the hematology of homozygous sickle cell disease in childhood." Blood **67**(2): 411-4.

Stuart, M. J. and R. L. Nagel (2004). "Sickle-cell disease." Lancet **364**(9442): 1343-60.

Swerlick, R. A., J. R. Eckman, et al. (1993). "Alpha 4 beta 1-integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium." Blood **82**(6): 1891-9.

Tan, A. S., T. C. Quah, et al. (2001). "A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia." Blood **98**(1): 250-1.

Tarer, V., M. Etienne-Julan, et al. (2006). "Sickle cell anemia in Guadeloupean children: pattern and prevalence of acute clinical events." Eur J Haematol **76**(3): 193-9.

Taylor, J. G. t., D. Ackah, et al. (2008). "Mutations and polymorphisms in hemoglobin genes and the risk of pulmonary hypertension and death in sickle cell disease." Am J Hematol **83**(1): 6-14.

Thein, S. L. and S. Menzel (2009). "Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults." Br J Haematol **145**(4): 455-67.

Thomas, P. W., D. R. Higgs, et al. (1997). "Benign clinical course in homozygous sickle cell disease: a search for predictors." J Clin Epidemiol **50**(2): 121-6.

Vasavda, N., S. Menzel, et al. (2007). "The linear effects of alpha-thalassaemia, the UGT1A1 and HMOX1 polymorphisms on cholelithiasis in sickle cell disease." Br J Haematol **138**(2): 263-70.

Vicari, P., A. Barretto de Mello, et al. (2005). "Effects of hydroxyurea in a population of Brazilian patients with sickle cell anemia." Am J Hematol **78**(3): 243-4.

Vichinsky, E. P. (1991). "Comprehensive care in sickle cell disease: its impact on morbidity and mortality." Semin Hematol **28**(3): 220-6.

Vichinsky, E. P., L. D. Neumayr, et al. (2000). "Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group." N Engl J Med **342**(25): 1855-65.

Wang, X. and E. E. Bouhassira (1992). "Hpal polymorphic site 3' of the human beta-globin gene is inside a repetitive sequence and cannot be ascertained by polymerase chain reaction." Am J Hematol **39**(3): 226-7.

Wainscoat, J. S., S. L. Thein, et al. (1985). "A genetic marker for elevated levels of haemoglobin F in homozygous sickle cell disease?" Br J Haematol **60**(2): 261-8.

Wali, Y. A., Z. Al-Lamki, et al. (2002). "Splenic function in Omani children with sickle cell disease: correlation with severity index, hemoglobin phenotype, iron status, and alpha-thalassemia trait." Pediatr Hematol Oncol **19**(7): 491-500.

Ware, R. E., S. A. Zimmerman, et al. (1999). "Hydroxyurea as an alternative to blood transfusions for the prevention of recurrent stroke in children with sickle cell disease." Blood **94**(9): 3022-6.

Watanabe, A. M., M. A. D. Pianovski, et al. (2008). "Prevalência da hemoglobina S no Estado do Paraná, Brasil, obtida pela triagem neonatal." Cad. Saude Publica **24**(5): 993-1000.

Weatherall, D. J. (2004). "Thalassaemia: the long road from bedside to genome." Nat Rev Genet **5**(8): 625-31.

Weatherall, D. J. (2008). "Hemoglobinopathies worldwide: present and future." Curr Mol Med **8**(7): 592-9.

Weatherall, D. J. and J. B. Clegg (1999). "Genetic disorders of hemoglobin." Semin Hematol **36**(4 Suppl 7): 24-37.

Weatherall, D. J. and J. B. Clegg (2001). "Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem." Bull World Health Organ **79**(8): 704-12.

Wenning, M. R., E. M. Kimura, et al. (2000). "alpha-globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population." Braz J Med Biol Res **33**(9): 1041-5.

Zago, M. A., M. S. Figueiredo, et al. (1992). "Bantu beta S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks." Am J Phys Anthropol **88**(3): 295-8.

Zago, M. A. and A. C. S. Pinto (2007). "Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de mútiplos orgãos." Rev. Bras. Hematol. Hemoter. **29**(3): 207-214.

Zago, M. A., W. A. Silva, Jr., et al. (2000). "Atypical beta(s) haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms." Am J Hematol **63**(2): 79-84.

7. ARTIGO 1

Artigo original

HAPLÓTIPOS DO AGRUPAMENTO DE GENES DA BETA-GLOBINA EM COORTE DE 221 CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME OU Sβ^0-TALASSEMIA E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS

André Rolim Belisário[1,2], Marina Lobato Martins[1], Ana Mercy Siebra Brito[1,4], Cibele Velloso Rodrigues[1,3], Célia Maria Silva[1], Marcos Borato Viana[2]

[1]Fundação HEMOMINAS, [2]Faculdade de Medicina – UFMG, [3]PUC-MG, [4]Faculdade de Farmácia – UFMG

Palavras-chave: Anemia Falciforme, Hemoglobinopatias, Gene da Globina Beta, Hematologia pediátrica, Genética Clínica, Prognóstico, Haplótipos

Correspondência:

Marcos Borato Viana
Faculdade de Medicina - Departamento de Pediatria
Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Alfredo Balena, 190/267
CEP 30130-100 - Belo Horizonte, MG
Tel.: (31) 3409.9772
Fax: (31) 3409.9770
E-mail: vianamb@gmail.com

Resumo

Introdução/Objetivos: No presente estudo foi estimada a prevalência dos haplótipos β^S e verificada as possíveis associações com características clínicas e hematológicas em amostra de crianças brasileiras com anemia falciforme ou $S\beta^0$-talassemia. **Métodos:** Um estudo de coorte retrospectivo aleatorizado foi realizado com 208 crianças SS e 13 $S\beta^0$-talassemia derivadas do Programa Estadual de Triagem Neonatal do Estado de Minas Gerais. Os haplótipos β^S foram determinados por PCR-RFLP. **Resultados:** Entre os sujeitos homozigotos SS, havia 82 (39%) com o genótipo CAR/CAR, 69 (33%) com o Ben/CAR, 49 (24%) com o Ben/Ben, dois (1%) com o CAR/Atp, dois (1%) com o Ben/Atp, dois (1%) com o Árabe-Indiano/Ben e dois (1%) não puderam ser caracterizados. Entre os sujeitos $S\beta^0$-talassemia, cinco eram CAR/indefinido, 2 Ben/indefinido e 1 CAM/indefinido. Não houve associação significativa entre haplótipos β^S e os níveis médios de Hb total, Hb F, VCM, HCM, leucócitos e reticulócitos nas crianças SS. Da mesma forma, não houve associação significativa entre haplótipos β^S e frequência de episódios de síndrome torácica aguda, transfusões sanguíneas, sequestro esplênico agudo e doença cerebrovascular (DTC alterado ou AVC clínico). O número limitado de crianças com o genótipo $S\beta^0$-talassemia impediu análises válidas para este grupo. **Conclusões:** 1. A prevalência dos haplótipos β^S encontrada no estudo está de acordo com os registros históricos de escravos africanos trazidos para o estado de Minas Gerais; 2. os haplótipos CAR e Ben não se associaram com as características clínicas ou hematológicas analisadas de crianças com anemia falciforme.

Introdução

A Anemia Falciforme é uma doença autossômica recessiva caracterizada pelo estado homozigoto da hemoglobina S($\alpha_2\beta_2^{6glu\rightarrow val}$), que é uma hemoglobina variante resultante de uma mutação no gene da globina beta (HBB:c.20A→T) (1). No Brasil, estima-se a prevalência de 25.000 a 30.000 casos da doença, com a incidência de 3.500 novos casos a cada ano (2). No estado de Minas Gerais, localizado no sudeste do Brasil, de 1,8 milhões de crianças nascidas entre 1998 e 2005, o Programa Estadual de Triagem Neonatal (PETN-MG) detectou 1:1.313 recém-nascidos com doença falciforme (SS, SC, Sβ-talassemia e SD) (3). O fenótipo hemoglobínico dos recém-nascidos SS é FS. O mesmo vale para Sβ^0-talassemia (Sβ^0-tal), que resulta da herança de um alelo β^S e um alelo β^0-tal, cada um herdado de um dos pais (1).

A Anemia Falciforme é caracterizada por diversas manifestações clínicas e gravidade, que abrange, em termos gerais, anemia hemolítica e fenômenos vaso-oclusivos (4). O fenótipo da doença é sujeito a fatores ambientais, tais como, a prevalência de doenças infecciosas, aspectos socioeconômicos, qualidade e o acesso à assistência médica. No Brasil, a maioria das famílias com doença falciforme tem baixa renda e os cuidados a saúde são assegurados por um sistema unificado público, denominado SUS (5). Embora determinada por um único defeito genético, a anemia falciforme possui vários fatores moduladores genéticos que influenciam na sua diversidade clínica e laboratorial, tais como a expressão de hemoglobina fetal (Hb F), a co-herança de α-Talassemia e os haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina (haplótipos β^S) (6, 7). A Sβ^0-tal possui um quadro clínico similar ao da anemia falciforme, entretanto, é menos estudada, pois se trata de um genótipo incomum (8).

Os haplótipos β^S são definidos como um padrão específico de polimorfismos reconhecidos por endonucleases de restrição na região do agrupamento de genes da globina beta, no cromossomo 11 (9). Existem cinco haplótipos clássicos ligados à mutação β^S que são nomeados de acordo com a origem geográfica e grupos étnicos nos quais eles são predominantemente encontrados: o Bantu ou República Central Africana (CAR), o Benin (Ben), o Senegal (Sen), o Árabe-Indiano e o Camarões (Cam) (10, 11). No Brasil, a maioria dos haplótipos β^S encontrados são do tipo CAR e Ben, com diferenças regionais significativas, caracterizando diferenças no fluxo de escravos africanos trazidos para o país durante o período colônia (12-20). Os alelos causadores de β^0-tal também estão associados a

específicos padrões de polimorfismos no gene da globina beta. Esses haplótipos são nomeados como números romanos (21).

Muitos estudos têm sido realizados para estabelecer uma relação entre os haplótipos β^S e o fenótipo da anemia falciforme. Os haplótipos Árabe-Indiano e Sen são geralmente associados a níveis elevados de Hb F e a um curso clínico menos grave. Em contraste, o haplótipo CAR é associado a níveis menores de Hb F e a maior gravidade da doença. Os portadores do haplótipo Ben tendem a apresentar características intermediárias (7, 10, 11, 22-24). Entretanto, essas associações haplótipo-fenótipo não estão definitivamente estabelecidas e nenhuma correlação robusta ainda foi encontrada, com exceção do curso clínico menos grave dos homozigotos para o haplótipo Árabe-Indiano (25). No Brasil, não há nenhum estudo verificando o efeito dos haplótipos β^S sobre características clínicas e hematológicas em uma grande população de crianças com anemia falciforme. No presente estudo, foi determinada a prevalência dos haplótipos β^S em uma coorte de crianças triadas pelo PETN-MG, e possíveis associações destes haplótipos com características clínicas e hematológicas foram investigadas. A prevalência dos haplótipos β^S foi comparada com a prevalência estimada pelos registros históricos sobre o comércio de escravos da África para o Brasil e, particularmente, para o estado de Minas Gerais.

Materiais e Métodos

População de estudo e metodologia de seleção

Tratou-se de um estudo do tipo coorte retrospectiva realizado com crianças com doença falciforme (Hb SS ou $S\beta^0$-talassemia). De aproximadamente 1,2 milhões de crianças nascidas entre 1 de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2006, 864 crianças tiveram o perfil hemoglobínico FS, FSC, ou FSA diagnosticados pelo PETN-MG por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese de focalização isoelétrica (IEF) e foram agendados para a sua primeira consulta clínica no ambulatório da Fundação HEMOMINAS em Belo Horizonte.

Foram excluídas 46 crianças que já haviam falecido quando o estudo se iniciou (março de 2008); 22 crianças que haviam sido transferidas para tratamento em outro hemocentro, duas crianças que abandonaram o acompanhamento e quatro crianças que obtiveram alta do acompanhamento clínico também foram excluídas. Das 790 crianças restantes, 357 foram

excluídas por ter o perfil hemoglobínico SC e 33 por apresentarem o perfil SA ($S\beta^+$-tal) na eletroforese de confirmação durante o primeiro ano de vida.

Das 400 crianças restantes com o perfil hemoglobínico FS, 280 foram selecionadas através de aleatorização. A aleatorização foi estratificada por ano de nascimento e 35 crianças/ano foram incluídas. Um cálculo amostral formal não foi feito porque os dados sobre a associação entre os haplótipos β^S e variáveis clínicas e hematológicas em indivíduos com anemia falciforme são controversos em relatos anteriores. Estabeleceu-se 70% do total da população como uma amostra de conveniência compatível com o orçamento e os prazos do projeto. Os pais de duas das 280 crianças não consentiram com a participação no estudo, 11 foram transferidas para tratamento em outro hemocentro após o início do estudo e 40 não foram encontradas no período experimental para assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) ou coleta do material biológico. O estudo familiar sugeriu que seis crianças possuiriam o genótipo S/Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal e, embora a confirmação por teste molecular não tenha sido realizada, eles foram excluídos do estudo. O estudo familiar também sugeriu que nove crianças possuiriam o genótipo $S\beta^0$-tal. A detecção do alelo β^S por PCR seguida de RFLP com enzima *Dde*I foi realizada em todas as crianças; 13 (incluindo todos os nove casos sugerido pelo estudo familiar) foram confirmados com o genótipo $S\beta^0$-tal, todos incluídos neste estudo. Dessa forma, a população deste estudo foi constituída de 221 crianças, sendo 208 SS e 13 $S\beta^0$-tal (Figura 1); 119 (53,8%) eram do sexo feminino e 102 (46,2%) do masculino.

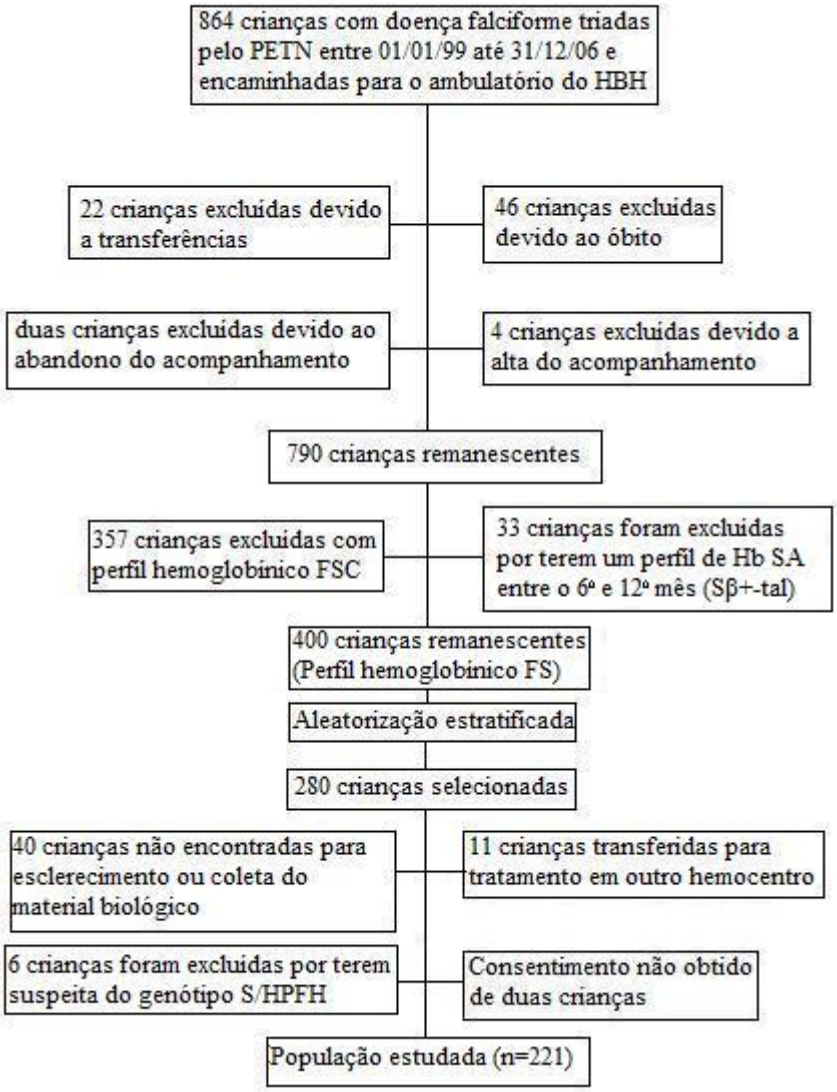


Figura 1 – Representação gráfica do procedimento de seleção da amostra estudada a partir da população de 864 crianças diagnosticadas com doença falciforme pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG) e encaminhadas para tratamento no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte (HBH).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOMINAS e pelo COEP/UFMG, e seguiu rigorosamente os princípios da Declaração de Helsinki. Os pais ou responsáveis pelas crianças deram o consentimento para a participação através da assinatura do TCLE.

Análises moleculares

A extração do DNA genômico das amostras de sangue foi realizada com o uso do kit comercial (QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAGEN) de acordo com instruções do fabricante. O genótipo do alelo β^S de todos os sujeitos foi confirmado por PCR (fragmento de 488 pares de bases amplificado pelos oligonucleotídeos sintéticos direto 5'TGATGGTATGGGGCCAAGA3' e reverso 5'GGGTGGGAAAATAGACCAATA3') seguido de digestão com a enzima de restrição *Dde*I (26). Quando o alelo β^S está presente, a enzima *Dde*I cliva o fragmento mencionado acima em 4 pequenos fragmentos e em um fragmento maior composto por 381 pares de base. Quando o alelo selvagem está presente, a enzima *Dde*I cliva o fragmento maior em dois fragmentos de 201 e 180 pares de base. Os haplótipos β^S foram determinados por PCR com oligonucleotídeos sintéticos específicos, seguida de digestão dos fragmentos resultantes de acordo com método descrito previamente (27), excluindo a análise do fragmento 3´HBB, que está localizado dentro de uma sequência repetitiva e não pode ser determinado por PCR (28). Foram analisados os seguintes sítios de restrição: XmnI na extremidade 5´ do gene HBG2; HindIII na região IVS2 do gene HBG2 e na região IVS2 do gene HBG1; Hinc II em HBBP1 e na extremidade 3´ de HBB; e HinfI na extremidade 5´ de HBB. Após a digestão, foi realizada eletroforese em gel de agarose 3%, visualização dos fragmentos resultantes em luz ultravioleta e interpretação dos resultados.

Variáveis clínicas e hematológicas

A evolução clínico-laboratorial dos pacientes foi revista da primeira consulta clínica, que ocorre após os dois meses de idade, até 31 de junho de 2009, de modo que todas as crianças foram acompanhadas por, no mínimo, dois anos e meio. Todas as informações foram retiradas dos prontuários médicos e lançadas num banco de dados específico do programa Microsoft Access.

Para as variáveis hematológicas, a média aritmética de todos os exames realizados após os dois anos de idade foi considerada como valor basal. Os valores de testes realizados após uso de hemocomponentes (90 dias) e eventos clínicos significativos (infecção grave, sequestro esplênico agudo e crise aplástica) foram desprezados. Nas crianças que entraram em regime de transfusão crônica ou iniciaram tratamento com hidroxiureia, o valor basal foi determinado com base na média dos valores anteriores ao início destas modalidades terapêuticas. As variáveis hematológicas foram: concentração total de hemoglobina (Hb,

g/dL), volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg), leucometria total (LEU, 10^9/L), plaquetometria (PLAQ, 10^9/L), concentração de hemoglobina fetal (Hb F, %) e contagem de reticulócitos (Retic, %). Os valores de Hb total, VCM, HCM, LEU e PLAQ foram mensurados utilizando contador eletrônico de células (T-890, Beckman Coulter). A quantificação da porcentagem de Hb F foi realizada utilizando-se o método de imunodifusão radial (HbF Quiplate, Helena Laboratories). A contagem de reticulócitos foi realizada utilizando-se o método de azul de cresil brilhante na microscopia óptica.

Como parte de outro estudo feito no HBH (29), 143 crianças SS já haviam sido submetidas ao exame de Doppler transcraniano (DTC; Companion III;VIASYS/Nicolet) para avaliar as artérias do polígono de Willis, e outras sete haviam sofrido AVC isquêmico (total 150/208 = 72,1%). Os exames foram feitos e interpretados por um único pesquisador (CMS), após treinamento no *Medical College of Geórgia*, EUA. Foi utilizado o protocolo do estudo STOP (30), com uma pequena modificação para incluir a velocidade do fluxo sanguíneo > 170 cm/s nas artérias cerebrais anteriores como também representando risco alto para desenvolvimento de AVC isquêmico (31).

Os eventos clínicos estudados foram o sequestro esplênico agudo (SEA) e a síndrome torácica aguda (STA), definidos como o registro do evento no prontuário médico pelo hematologista responsável pelo acompanhamento da criança. STA foi definida como aparência radiológica de um novo infiltrado pulmonar acompanhada de febre e dificuldade respiratória (9). O número de transfusões sanguíneas foi obtido no prontuário médico. Doença cerebrovascular (DCV) foi definida como a presença do DTC alterado ou AVC isquêmico clínico prévio ao estudo, como registrado por um dos pesquisadores (CMS). Excluídas as crianças com DTC inadequados e aquelas em que o exame não foi realizado, os sujeitos da pesquisa foram dicotomizados em: 1) ausência de DCV e 2) presença de DCV.

Dependendo da data de nascimento da criança, o período de acompanhamento e a idade em Junho de 2009 variou de 2,5 a 10,4 anos (6,51±2,28). Para excluir um possível viés devido a diferenças no tamanho do acompanhamento das crianças, o número de eventos clínicos foi padronizado da seguinte forma: 1) apenas os episódios de SEA até os 30 meses de idade foram considerados. Este período representa o tempo mínimo de acompanhamento para todas as crianças da pesquisa e, ainda, idade em que mais de 75% desses eventos já ocorreram nas crianças acompanhadas neste hemocentro (32); 2) com relação aos episódios de STA e transfusões sanguíneas, foi utilizado o valor referente ao número absoluto de episódios do evento dividido pelo tempo de acompanhamento clínico.

Análise Estatística

Os resultados quantitativos foram expressos como média ± 1 desvio padrão (DP), ou pela mediana quando a média não era uma medida-resumo adequada. As prevalências foram expressas pelas porcentagens correspondentes ao item analisado e limites de confiança a 95%.

Para a análise de associação dos haplótipos β^S com aspectos clínicos e hematológicos da doença, apenas os pacientes homozigotos SS foram analisados. Inicialmente, os indivíduos com os genótipos CAR/CAR, Ben/CAR e Ben/Ben foram comparados entre si. Posteriormente, foi realizada uma comparação entre os indivíduos homozigotos para os genótipos CAR/CAR e Ben/Ben. Tendo em vista possível associação do haplótipo CAR com a forma mais grave da doença (22, 24, 33), uma última análise comparou os indivíduos com pelo menos um cromossomo do tipo CAR *versus* os indivíduos com ausência de cromossomos do tipo CAR. Não foi realizada uma análise com as crianças $S\beta^0$-tal devido ao número reduzido de crianças neste grupo e devido a ausência de informações de algumas sítios polimórficos necessários para definir os haplótipos de β-talassemia, como sugerido por Orkin et al. (21).

Foi utilizada a análise de variância para variáveis hematológicas com a distribuição normal e com homocedasticidade, ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para variáveis com a distribuição não-normal e/ou sem homocedasticidade. A verificação da distribuição normal ou não-normal dos dados foi realizada utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. A associação dos haplótipos β^S e a ocorrência de SEA até 30 meses de idade e a ocorrência de DCV foi realizada utilizando o teste do qui-quadrado ou, quando necessário, o teste exato de Fisher. A associação dos haplótipos β^S com número de STA/ano de seguimento e número de transfusões sanguíneas/ano de seguimento foi realizada utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ou de Mann-Whitney. Consideraram-se significativos os testes em que a probabilidade de erro alfa foi $\leq$ 0,05. Todo o estudo estatístico foi processado utilizando o programa SPSS 17.0.

Resultados

Como afirmado anteriormente, 208 (94,1%) crianças eram homozigotas para o alelo β^S e 13 (5,9%; IC 95% 2,8-9) possuíam o genótipo $S\beta^0$-tal. (6,49 ± 2,28). Entre os 208

indivíduos com anemia falciforme (Hb SS), a maioria apresentou o haplótipo CAR em homozigose ou heterozigose. Dos 13 sujeitos $S\beta^0$-tal, a maioria apresentou o haplótipo CAR em heterozigose (Tabela 1). Dos 412 cromossomos β^S genotipados nos sujeitos com anemia falciforme, a maioria era do tipo CAR e Ben (Tabela 2).

Tabela 1 – Combinações haplotípicas em 221 crianças com anemia falciforme ou $S\beta^0$-talassemia

	Crianças com anemia falciforme (n=208)	
Genótipo	Número de crianças	Frequência
CAR/CAR	82	39,43%
Ben/CAR	69	33,17%
Ben/Ben	49	23,56%
CAR/Atp	2	0,96%
Ben/Atp	2	0,96%
Árabe-Indiano/Ben	2	0,96%
Indeterminados[1]	2	0,96%
	Crianças $S\beta^0$-tal (n=13)	
CAR/-----+[2]	4	30,8%
Ben/-----+	2	15,3%
CAM/-----+	1	7,7%
CAR/-+--++	1	7,7%
Atp/-----+	1	7,7%
Indeterminados[1]	4	30,8%

*Não puderam ser caracterizados com o método utilizado.

Sítios polimórficos: XmnI/5´HBG2; HindIII/HBG2; HindIII/HBG1; HincII/HBBP1; HincII/3´HBBP1 e HinfI/5´HBB. + = presença;- = ausência.

Tabela 2 – Haplótipos do agrupamento de genes da beta globina identificados em uma amostra de 412 cromossomos de crianças com anemia falciforme (Hb SS) do estado de Minas Gerais, Brasil

Haplótipo	Número de cromossomos (n=412)	Frequência	Intervalo de confiança 95% Limite inferior	Limite superior
CAR	235	0,570	0,522	0,618
Benin	171	0,415	0,367	0,463
Árabe-Indiano	2	0,005	0	0,012
Atípicos	4	0,010	0	0,020

Os níveis médios de Hb total, VCM, HCM, LEU e Retic foram muito semelhantes nos grupos de sujeitos com os genótipos CAR/CAR, Ben/CAR e Ben/Ben (tabela 3). A concentração de Hb F foi menor, mas não estatisticamente significante, no grupo de sujeitos com o genótipo CAR/CAR, seguido dos Ben/CAR e Ben/Ben. Homens tiveram a concentração de Hb F significativa menor que as mulheres (16,9±8,3 vs. 19,6±8,1%; p=0,015). O nível médio de PLAQ foi estatisticamente mais elevado no grupo de sujeitos com o genótipo Ben/CAR, quando comparado com os sujeitos Ben/Ben e CAR/CAR (P=0,022 e 0,001, respectivamente).

Tabela 3 - Associação de haplótipos β^S com variáveis hematológicas em 200 crianças com anemia falciforme

Dados hematológicos	Haplótipos β^S em crianças anemia falciforme (Hb SS)				
	CAR/CAR(n=82)	Ben/CAR(n=69)	Ben/Ben(n=49)	Valor de P	Valor de P CAR/CAR VS Ben/Ben
Hb (g/dL)	7,98±1,16	7,84±0,85	7,99±1,03	0,95*	0,94†
VCM (fl)	90,13±7,71	91,6±7,38	91,73±7,20	0,32*	0,18†
HCM (pg)	28,44±2,67	28,99±2,52	28,98±2,68	0,23*	0,13†
LEU (10^9/L)	16,88±4,1	16,04±4,18	16,72±4,19	0,44‡	0,83§
PLAQ (10^9/L)	377,25±88,7	426,4±73,67	385,86±73,31	0,001‡	0,57§
Hb F (%)	17,3±8,4	19,1±7,7	19,2±9,1	0,2*	0,27†
Retic (%)	15,7±4,1	15,9±4,1	15,9±4,2	0,78*	0,84†

*Teste de Kruskal-Wallis
†Teste de Mann-Whitney
‡ANOVA
§Teste t de Student

Foram identificados 63 (30,3%) crianças SS que apresentaram pelo menos um evento de SEA até os 30 meses de idade. Destes 63, 29 (46%) possuíam o genótipo CAR/CAR, 19 (30,2%) Ben/CAR, 12 (19%) Ben/Ben, 2 (3,2%) Árabe-Indiano/Ben e 1 (1,6%) não pode ser genotipado. A frequência relativa de SEA até os 30 meses de idade não foi significativamente diferente entre os grupos (P=0,2; tabela 4).

Excluídas as crianças com DTC inadequados ou não realizados (58 crianças), foram identificados 31 (20,7%) de 150 sujeitos com DCV, ou seja, crianças com DTC condicional ou anormal ou crianças com AVC clínico prévio ao estudo. Destes 31 sujeitos, 12 (38,7%) possuíam o genótipo CAR/CAR, 10 (32,3%) Ben/Ben, 8 (25,8%) Ben/CAR e 1 (3,2%) Árabe-Indiano/Ben. A frequência relativa de DCV não foi significativamente diferente entre os grupos (P=0,36; tabela 4).

Tabela 4 – Associação de haplótipos β^S com a ocorrência de sequestro esplênico agudo (SEA) até 30 meses de idade e ocorrência de doença cerebrovascular (DCV) em crianças com anemia falciforme (Hb SS)

	SEA até 30 meses (n=200)			DCV (n=143)		
Haplótipos β^S	Sim (n=60)	Não (n=140)	Valor de P	Sim (n=30)	Não (n=113)	Valor de P
CAR/CAR	29 (35,4%)	53 (64,6%)		12 (20,3%)	47 (79,7%)	
Ben/CAR	19 (27,5%)	50 (72,5%)		8 (16,7%)	40 (83,3%)	
Ben/Ben	12 (24,5%)	37 (75,5%)	0,2*	10 (27,8%)	26 (72,2%)	0,36*

* Teste do qui-quadrado de tendência

O número de transfusões por ano de acompanhamento e o número de STA por ano de acompanhamento não foram significativamente diferente entre os grupos (P=0,94 e P=0,35, respectivamente; tabela 5).

Tabela 5 – Associação dos haplótipos β^S com o número de transfusões sanguíneas e o número de ocorrências de síndrome torácica aguda (STA) em 200 crianças com anemia falciforme (Hb SS)

	N^0 Trasfusões/ano			N^0 STA/ano		
Haplótipos β^S	Média	Mediana	Valor de P	Média	Mediana	Valor de P
CAR/CAR	0,78	0,27		0,26	0,17	
Ben/CAR	0,71	0,38		0,30	0,18	
Ben/Ben	0,87	0,40	0,94*	0,32	0,26	0,35*

* Teste de Kruskal-Wallis

Não houve diferença estatisticamente significativa nas variáveis clínicas e hematológicas quando somente os indivíduos homozigotos CAR foram comparados com os indivíduos homozigotos Ben. O mesmo ocorreu quando os indivíduos com pelo menos um cromossomo CAR foram comparados com aqueles sem cromossomos do tipo CAR (dados não mostrados).

Discussão

O Brasil possui diferenças regionais significativas na distribuição dos haplótipos β^S, que pode ser explicada pela origem e quantidade de escravos africanos que desembarcaram

em cada região durante o período colonial, pelo fluxo interno de escravos e pela diversidade nos níveis de misigenação (12-20). Durante o período transatlântico de tráfico de escravos (1514-1866), aproximadamente 4,9 milhões africanos vieram para o Brasil (34). Para o estado da Bahia, vieram escravos principalmente da Baia de Biafra (cerca de 47%) e da região centro-oeste da África (cerca de 45%), onde os haplótipos Ben e CAR predominam, respectivamente. Em contraste, aproximadamente 86% dos escravos que desembarcaram no Rio de Janeiro vieram da região centro-oeste da África (34, 35). Esses dados explicam o pequeno predomínio do haplótipo Ben em relação ao CAR no estado da Bahia (12) e o predomínio absoluto do haplótipo CAR no Rio de Janeiro (20). O haplótipo Sen, encontrado no Pará e Amazonas (16, 18) e incomum em outras regiões, certamente é derivado de escravos embarcados na Senegâmbia (34). De acordo com dados históricos, o estado de Minas Gerais recebeu escravos desembarcados no Rio de Janeiro e Salvador (36). Nossos dados estão em concordância com esses dados históricos, que sugerem ainda uma ligeira predominância de escravos vindos do Rio de Janeiro para Minas Gerais (36). Este estudo relatou pela primeira vez a ocorrência dos haplótipos Árabe-Indiano e Cam (em um indivíduo $S\beta^0$-tal) na região sudeste do Brasil.

Houve uma tendência de diminuição da concentração de Hb F do genótipo Ben/Ben para Ben/CAR, e deste para o CAR/CAR, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. Em outra população de pacientes brasileiros (média de idade 21,9±10 anos), o haplótipo Ben foi associado significativamente a maiores concentrações de Hb F do que o haplótipo CAR (14). É possível que, mesmo com as amostras tendo sido as colhidas após os dois anos, muitas destas crianças, principalmente as menores de cinco anos, podem ainda não ter atingido níveis estáveis de produção de Hb F (37), fato confirmado pelos níveis elevados encontrados em todos os grupos (média>15%). Como dito anteriormente, a persistência hereditária de hemoglobina fetal foi excluída pelo estudo familiar, mas testes genéticos para confirmação não foram realizados. A maioria dos trabalhos que relata diferença significativa nos níveis de Hb F em relação aos haplótipos β^S foi realizada em populações com representação predominante dos haplótipos Árabe-Indiano ou Sen, que abrigam o SNP (*single-nucleotide polymorphism*) C→T na posição -158 a 5´ do gene HBG2 (rs7482144). Esse SNP está associado com elevação do nível de Hb F em indivíduos com anemia falciforme (10, 33, 38-43). A expressão de Hb F é regulada por interações complexas entre fatores genéticos e ambientais, fornecendo muitas oportunidades para modulação da concentração de Hb F na anemia falciforme (23). Adicionalmente, nós demonstramos, assim

como outros estudos (44, 45), que o gênero é um importante fator na regulação da concentração de Hb F.

Os haplótipos β^S não influenciaram significativamente os níveis médios de Hb total, VCM, HCM, LEU e Retic. Outros trabalhos anteriormente publicados mostraram associação significativa dos haplótipos β^S com características hematológicas da anemia falciforme (10, 33, 38, 39, 41, 46). Nos EUA, o genótipo Sen/Ben foi associado a maiores níveis de Hb total, o genótipo Ben/Ben a níveis intermediários e o genótipo CAR/Ben aos menores níveis (33). No continente africano, indivíduos com haplótipos Cam ou Ben apresentaram níveis menores de Hb total quando comparados com indivíduos com um ou dois cromossomos do tipo Sen (41). Na França, o haplótipo CAR foi associado com menor nível de VCM quando comparado com os haplótipos Ben e Sen (46). Entretanto, essas associações foram eventuais e nenhuma outra associação consistente entre os haplótipos β^S e características hematológicas, além dos níveis de Hb F, tem sido sugerida.

O nível médio de PLAQ foi significativamente maior no grupo de indivíduos com o genótipo Ben/CAR quando comparado com os indivíduos dos grupos CAR/CAR e Ben/Ben. Provavelmente trata-se de uma variação amostral, pois não há sentido biológico para o grupo heterozigoto ser diferente dos dois homozigotos que, por sua vez, não diferem entre si. Nenhum resultado semelhante foi encontrado na literatura consultada.

Desde a primeira demonstração que os haplótipos β^S podem influenciar as manifestações clínicas da anemia falciforme (33), esse campo virou alvo de várias pesquisas e tem sido objeto de controvérsias recorrentes. No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas na frequência das complicações clínicas estudadas de acordo com os haplótipos β^S, fato corroborado por outros estudos previamente publicados (14, 39, 42, 47). Há relatos de que portadores do haplótipos CAR teriam maior chance de apresentarem complicações como vasculopatias obstrutivas nos tecidos moles, incluindo cérebro, rins, pulmões e úlcera nas pernas (33), insuficiência renal (48), velocidade de crescimento mais lenta (49), falta de resposta à hidroxureia (50), menor sobrevida (51) e até mesmo morte (24, 33). A maioria desses trabalhos envolveu populações de indivíduos com representação do haplótipo Sen, que tem sido associado com menor gravidade da doença. No presente estudo, além da amostra ter sido aleatorizada, o número de indivíduos homozigotos para os haplótipos CAR e Ben era relativamente elevado, o que propiciou uma análise mais adequada dessas associações.

Apesar de algumas associações significativas entre os haplótipos β^S e o fenótipo da anemia falciforme terem sido relatadas na literatura, a sua utilidade como marcador de prognóstico no acompanhamento clínico, isoladamente, é muito limitada, com exceção do haplótipo Árabe-Indiano e, talvez, do Sen. Novos estudos em populações pouco miscigenadas podem contribuir para estabelecer o real efeito dos haplótipos β^S no fenótipo da anemia falciforme. Outros polimorfismos em diversos genes vêm sendo identificados como marcadores de gravidade (23), mas nenhum, isoladamente, prediz, com segurança, o prognóstico da doença. Destaca-se a necessidade de estudar outros fatores moduladores que possam ser utilizados em conjunto para definir subfenótipos da doença, e assim, poderem ser utilizados como ferramenta clínica no acompanhamento dos pacientes. A idéia de que outros genes possam afetar a evolução clínica dos pacientes com anemia falciforme não é nova, mas a identificação destes genes e encontrar provas de seu envolvimento tem sido difícil. Estudos usando a rede Bayesiana tem sido uma ferramenta inovadora e aparentemente útil neste tipo de pesquisa (52).

Uma limitação do estudo envolve o desenho retrospectivo e suas potencialidades para a perda de informação. Embora as informações do prontuário médico estarem bastante completas, esses registros foram gerados para fins clínicos e não para pesquisa. Alguns médicos podem não ter registrado todas as informações pertinentes, o que poderia ter provocado algum viés nos resultados, diminuindo assim o poder de detectar diferenças. A impossibilidade de garantir a precisão desses registros é uma limitação deste desenho metodológico (53). Embora a amostra final para este estudo (n = 221) represente 55,3% da população total (n = 400) e 78,9% da amostra aleatória (n = 280), 40 crianças não puderam ser encontradas para genotipagem durante o período do estudo e estas podem representar a forma mais branda da anemia falciforme.

Em conclusão, a prevalência dos haplótipos CAR e Ben no presente estudo está em concordância com os registros históricos de tráfico de escravos para Minas Gerais. Além disso, os haplótipos β^S não se associaram significativamente com a ocorrência dos eventos clínicos e dados hematológicos analisados em crianças com anemia falciforme. Ressalte-se que a amostra de crianças proveio de uma única fonte (PETN-MG), foi aleatorizada e o acompanhamento seguiu o mesmo protocolo de tratamento num único ambulatório, o que reforça as conclusões do estudo.

Referências bibliográficas

1. Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. ScientificWorldJournal2008;8:1295-324.
2. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. Rev Bras Hematol Hemoter2007;29(3):203-6.
3. Fernandes AP, Januario JN, Cangussu CB, de Macedo DL, Viana MB. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. J Pediatr (Rio J) 2010;86(4):279-284.
4. Reed W, Vichinsky EP. New considerations in the treatment of sickle cell disease. Annu Rev Med1998;49:461-74.
5. de Paiva e Silva RB, Ramalho AS, Cassorla RM. [Sickle cell disease as a public health problem in Brazil]. Rev Saude Publica1993 Feb;27(1):54-8.
6. Rund D, Fucharoen S. Genetic modifiers in hemoglobinopathies. Curr Mol Med2008 Nov;8(7):600-8.
7. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. Br J Haematol2005 May;129(4):465-81.
8. Serjeant GR, Sommereux AM, Stevenson M, Mason K, Serjeant BE. Comparison of sickle cell-beta0 thalassaemia with homozygous sickle cell disease. Br J Haematol1979 Jan;41(1):83-93.
9. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. Lancet2004 Oct 9-15;364(9442):1343-60.
10. Powars DR. Beta S-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. Hematol Oncol Clin North Am1991 Jun;5(3):475-93.
11. Nagel RL, Ranney HM. Genetic epidemiology of structural mutations of the beta-globin gene. Semin Hematol1990 Oct;27(4):342-59.
12. Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Seixas MO, Reis MG, Gonçalves MS. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. Genet Mol Biol2008;31(3):621-5.
13. Bezerra MA, Santos MN, Araujo AS, Gomes YM, Abath FG, Bandeira FM. Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the State of Pernambuco, Brazil. Hemoglobin2007;31(1):83-8.
14. Figueiredo MS, Kerbauy J, Goncalves MS, Arruda VR, Saad ST, Sonati MF, et al. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. Am J Hematol1996 Oct;53(2):72-6.
15. Goncalves MS, Nechtman JF, Figueiredo MS, Kerbauy J, Arruda VR, Sonati MF, et al. Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the beta s haplotypes. Hum Hered1994 Nov-Dec;44(6):322-7.
16. Lemos Cardoso G, Farias Guerreiro J. African gene flow to north Brazil as revealed by HBB*S gene haplotype analysis. Am J Hum Biol2006 Jan;18(1):93-8.
17. Pante-de-Sousa G, Mousinho-Ribeiro RC, Santos EJM, Zago MA, Guerreiro JF. Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. Genet mol biol1998 Dec;21(4):427-30.
18. Pante-De-Sousa G, Mousinho-Ribeiro RC, Dos Santos EJ, Guerreiro JF. Beta-globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. Ann Hum Biol1999 Jul-Aug;26(4):365-73.

19. Zago MA, Figueiredo MS, Ogo SH. Bantu beta S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. Am J Phys Anthropol1992 Jul;88(3):295-8.
20. Silva Filho IL; Ribeiro GS; Pimenta-Bueno, LM; Serpa; MJA. Frequência dos haplótipos da globina beta, da talassemia alfa e dos polimorfismos genéticos dos genes da metilenotetrahidrofolato redutase, do fator V Leiden e da protrombina em crianças com doença falciforme no Rio de Janeiro, Brasil. Rev Bras Hematol Hemoter2010;32(1):76-8.
21. Orkin SH, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, et al. Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. Nature1982 Apr 15;296(5858):627-31.
22. Powars DR. Sickle cell anemia: beta S-gene-cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ failure. Semin Hematol1991 Jul;28(3):202-8.
23. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. ScientificWorldJournal2009;9:46-67.
24. Powars D, Hiti A. Sickle cell anemia. Beta S gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. Am J Dis Child1993 Nov;147(11):1197-202.
25. Padmos MA, Roberts GT, Sackey K, Kulozik A, Bail S, Morris JS, et al. Two different forms of homozygous sickle cell disease occur in Saudi Arabia. Br J Haematol1991 Sep;79(1):93-8.
26. Chang JC, Kan YW. Antenatal diagnosis of sickle cell anaemia by direct analysis of the sickle mutation. Lancet1981 Nov 21;2(8256):1127-9.
27. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. Am J Hematol1989 Sep;32(1):66-9.
28. Wang X, Bouhassira EE. HpaI polymorphic site 3' of the human beta-globin gene is inside a repetitive sequence and cannot be ascertained by polymerase chain reaction. Am J Hematol1992 Mar;39(3):226-7.
29. Silva CM: Rastreamento de crianças com doença falciforme pelo doppler transcraniano em uma coorte de pacientes triados pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal do estado de Minas Gerais (PETN-MG) e acompanhados no Hemocentro de Belo Horizonte - MG - Brasil: Faculdade de Medicina. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009, Tese de Doutoramento, pp 125.
30. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. N Engl J Med1998 Jul 2;339(1):5-11.
31. Kwiatkowski JL, Zimmerman R, Greenbaum B, Ohene-Frempong K. Stroke and elevated blood flow velocity in the anterior cerebral artery in sickle cell disease. J Pediatr Hematol Oncol2004 May;26(5):323-6.
32. Rezende PV, Viana MB, Murao M, Chaves AC, Ribeiro AC. Acute splenic sequestration in a cohort of children with sickle cell anemia. J Pediatr (Rio J)2009 Mar-Apr;85(2):163-9.
33. Powars D, Chan LS, Schroeder WA. The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. Semin Hematol1990 Oct;27(4):360-76.
34. Estimates Database. 2010. Voyages: The trans-atlantic slave trade database. http://www.slavevoyages.org/tast/assessment/estimates.faces (accessed June 25, 2010).
35. Gabriel AP, J. Sickle-Cell Anemia: A Look at Global Haplotype Distribution. Nature Education2010;3(3):2.
36. Florentino MR, AV; Silva, DD;. Aspectos Comparativos do Tráfico de Africanos para o Brasil (Séculos XVIII e XIX) Afro-Ásia2004;31:83-126.

37. Schroeder WAH, T. H. J.; Brown, A. K.; Uy, R.; Bouver, N. G. Lerch, P. O.; Shelton, R. Shelton, JB; Apell, G. Postnatal Changes in the Chemical Heterogeneity of Human Fetal Hemoglobin. Pediat Res1971;5:493-9.
38. Nagel RL, Erlingsson S, Fabry ME, Croizat H, Susuka SM, Lachman H, et al. The Senegal DNA haplotype is associated with the amelioration of anemia in African-American sickle cell anemia patients. Blood1991 Mar 15;77(6):1371-5.
39. Rieder RF, Safaya S, Gillette P, Fryd S, Hsu H, Adams JG, 3rd, et al. Effect of beta-globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. Am J Hematol1991 Mar;36(3):184-9.
40. Gilman JG, Huisman TH. DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. Blood1985 Oct;66(4):783-7.
41. Green NS, Fabry ME, Kaptue-Noche L, Nagel RL. Senegal haplotype is associated with higher Hb F than Benin and Cameroon haplotypes in African children with sickle cell anemia. Am J Hematol1993 Oct;44(2):145-6.
42. de Montalembert M, Maier-Redelsperger M, Girot R, Belloy M, Vilmer E, Ducrocq R, et al. Beta-globin gene cluster haplotype and alpha-thalassemia do not correlate with the acute clinical manifestations of sickle cell disease in children. Blood1993 Oct 15;82(8):2595-6.
43. Adekile AD, Huisman TH. Level of fetal hemoglobin in children with sickle cell anemia: influence of gender, haplotype and alpha-thalassemia-2 trait. Acta Haematol1993;90(1):34-8.
44. Chang YC, Smith KD, Moore RD, Serjeant GR, Dover GJ. An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, beta-globin haplotypes, alpha-globin gene number, gender, and age. Blood1995 Feb 15;85(4):1111-7.
45. Steinberg MH, Hsu H, Nagel RL, Milner PF, Adams JG, Benjamin L, et al. Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. Am J Hematol1995 Mar;48(3):175-81.
46. Neonato MG, Guilloud-Bataille M, Beauvais P, Begue P, Belloy M, Benkerrou M, et al. Acute clinical events in 299 homozygous sickle cell patients living in France. French Study Group on Sickle Cell Disease. Eur J Haematol2000 Sep;65(3):155-64.
47. 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 Haematol2006 Mar;76(3):193-9.
48. Powars DR, Elliott-Mills DD, Chan L, Niland J, Hiti AL, Opas LM, et al. Chronic renal failure in sickle cell disease: risk factors, clinical course, and mortality. Ann Intern Med1991 Oct 15;115(8):614-20.
49. Luporini SM, Bendit I, Manhani R, Bracco OL, Manzella L, Giannella-Neto D. Growth hormone and insulin-like growth factor I axis and growth of children with different sickle cell anemia haplotypes. J Pediatr Hematol Oncol2001 Aug-Sep;23(6):357-63.
50. Steinberg MH, Lu ZH, Barton FB, Terrin ML, Charache S, Dover GJ. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. Multicenter Study of Hydroxyurea. Blood1997 Feb 1;89(3):1078-88.
51. Muniz A, Corral L, Alaez C, Svarch E, Espinosa E, Carbonell N, et al. Sickle cell anemia and beta-gene cluster haplotypes in Cuba. Am J Hematol1995 Jun;49(2):163-4.
52. Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT, Steinberg MH. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. Nat Genet2005 Apr;37(4):435-40.
53. Gordis L: Epidemiology, ed 3rd edition. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2004.

8. ARTIGO 2

Artigo original

CO-HERANÇA DE TALASSEMIA ALFA DIMINUI O RISCO DE DOENÇA CEREBROVASCULAR EM UMA COORTE DE CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME

André Rolim Belisário[1,2], Cibele Velloso Rodrigues[1,3], Marina Lobato Martins[1], Célia Maria Silva[1], Marcos Borato Viana[2]

[1]Fundação HEMOMINAS, [2]Faculdade de Medicina – UFMG, [3]PUC-MG

Palavras-chave: Anemia Falciforme, Talassemia alfa, Prognóstico

Correspondência:

Marcos Borato Viana
Faculdade de Medicina - Departamento de Pediatria
Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Alfredo Balena, 190/267
CEP 30130-100 - Belo Horizonte, MG
Tel.: (31) 3409.9772
Fax: (31) 3409.9770
E-mail: vianamb@gmail.com

Resumo

O estudo estimou a prevalência de α-Tal e avaliou seu efeito sobre características clínicas e hematológicas em amostra aleatorizada de crianças com doença falciforme (208 Hb SS e 13 $S\beta^0$-talassemia). A genotipagem de α-Tal foi realizada por PCR multiplex (alelos: $-\alpha^{3.7}$; $-\alpha^{4.2}$; $--^{SEA}$; $--^{FIL}$; $--^{MED}$; $-(\alpha)^{20.5}$ e $--^{THAI}$). Os dados clínicos e hematológicos foram extraídos dos 221 prontuários dos sujeitos da pesquisa. A idade variou entre 2,5 e 10,4 anos. Dos sujeitos homozigotos (Hb SS), 27,9% possuíam o genótipo $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ e 1,4% eram $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$. Dos sujeitos $S\beta^0$-tal, 38,5% possuíam o genótipo $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ A presença de α-Tal associou-se significativamente com a diminuição dos níveis de VCM, HCM, leucócitos e reticulócitos. Não houve associação significativa entre a presença de α-Tal e a frequência de síndrome torácica aguda, sequestro esplênico agudo ou transfusões sanguíneas. A presença de α-Tal foi fortemente associada com a diminuição do risco de doença cerebrovascular (Doppler transcraniano alterado ou AVC clínico; P=0,007). Não houve associação significativa entre a α-Tal e dados clínico e hematológicos analisados nos sujeitos $S\beta^0$-tal. A interação de α-Tal com outros fatores de moduladores deve ser investigada com o objetivo de definir subfenótipos da doença, para que assim estes fatores possam ser usados como ferramenta clínica no acompanhamento dos pacientes.

Introdução

A Anemia Falciforme é um distúrbio hereditário monogênico causado por uma mutação de ponto no sexto códon do gene da globina beta (GAG→GTG). Essa mutação resulta na produção de uma hemoglobina anormal, a hemoglobina S ($\alpha_2\beta_2^{6glu\rightarrow val}$) (1). No Brasil, estima-se a prevalência de 25.000 a 30.000 casos da doença, com a incidência de 3.500 novos casos a cada ano (2). No estado de Minas Gerais, a incidência proporcional estimada pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal (PETN-MG) foi de 1:2.400 (3).

Um amplo espectro de manifestações clínicas e heterogeneidade de gravidade caracterizam a anemia falciforme. Assim, fatores genéticos e ambientais têm sido invocados para explicar essas diferenças na gravidade clínica. Embora determinada por um único defeito genético, a anemia falciforme possui vários fatores moduladores genéticos que influenciam na sua diversidade clínica e laboratorial, como a expressão de hemoglobina fetal (Hb F), a co-herança de α-Talassemia (α-Tal) e os haplótipos do agrupamento de genes da β^S-globina (4, 5).

A α-Tal reduz a concentração de Hb S intraeritrocitária e, consequentemente, a polimerização da Hb e a intensidade de hemólise, o que produz consequências clínicas e laboratoriais que são benéficas em algumas situações e prejudiciais em outras (6). Com relação às características laboratoriais, a coexistência de α-Tal aumenta o número de hemácias, os níveis de Hb total e hematócrito, e diminui os níveis de VCM, HCM, CHCM (7-11), reticulócitos (11-13), leucometria (9, 11, 14) e células falcêmicas irreversíveis (7, 15). A coexistência de α-Tal aparentemente causa o aumento dos níveis de Hb A_2 (9, 14, 16) e não influencia os níveis de Hb F (10, 16, 17).

Estudos têm mostrado o efeito benéfico da α-Tal em manifestações clínicas vaso-oclusivas que estão associados com hematócrito mais baixo como, por exemplo, acidente vascular cerebral (AVC) (17-21), úlcera de pernas (7, 22) e função esplênica (23, 24); efeito prejudicial é observado em manifestações associadas com aumento da viscosidade do sangue como, por exemplo, crises álgicas (16, 17, 19, 25) e necrose óssea (25, 26). Também tem sido sugerido que a coexistência de α-Tal prolongaria a sobrevida de pacientes com anemia falciforme (27, 28).

No Brasil, não há nenhum estudo verificando o efeito de α-Tal sobre características clínicas e hematológicas em uma grande população de crianças com anemia falciforme. Mesmo a frequência da co-herança de α-Tal em Minas Gerais é desconhecida e, no País, não

há estudo aleatorizado que estime com maior grau de segurança qual seria essa prevalência. Dessa maneira, no presente estudo, foi estimada a prevalência de α-Tal e estudado seu efeito em características clínicas e hematológicas em uma coorte aleatorizada de crianças triadas pelo PETN-MG e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (HEMOMINAS).

Materiais e Métodos

População de estudo e metodologia de seleção

Tratou-se de um estudo do tipo coorte retrospectiva, realizado com crianças com doença falciforme (genótipos Hb SS ou $S\beta^0$-talassemia). De aproximadamente 1,2 milhões de crianças nascidas entre 1 de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2006, 864 crianças tiveram o perfil hemoglobínico FS, FSC, ou FSA diagnosticados pelo PETN-MG por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese de focalização isoelétrica (IEF) e foram agendados para a sua primeira consulta clínica no ambulatório da Fundação HEMOMINAS em Belo Horizonte.

Foram excluídas 46 crianças que já haviam falecido quando o estudo se iniciou (março de 2008); 22 crianças que haviam sido transferidas para tratamento em outro hemocentro, duas crianças que abandonaram o acompanhamento e quatro crianças que obtiveram alta do acompanhamento clínico também foram excluídas. Das 790 crianças restantes, 357 foram excluídas por ter o perfil hemoglobínico SC e 33 por apresentarem o perfil SA ($S\beta^+$-thal) na eletroforese de confirmação durante o primeiro ano de vida.

Das 400 crianças restantes com o perfil hemoglobínico FS, 280 foram selecionadas através de randomização. A randomização foi estratificada por ano de nascimento e 35 crianças/ano foram incluídas. Um cálculo amostral formal não foi feito porque os dados sobre a associação entre α-Tal e variáveis clínicas e hematológicas em indivíduos com anemia falciforme são controversos em relatos anteriores. Estabeleceu-se 70% do total da população como uma amostra de conveniência compatível com o orçamento e os prazos do projeto. Os pais de duas das 280 crianças não consentiram com a participação no estudo, 11 foram transferidas para tratamento em outro hemocentro após o início do estudo e 40 não foram encontradas no período experimental para assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) ou coleta do material biológico. O estudo familiar sugeriu que seis

crianças possuíam o genótipo S/Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal e, embora a confirmação por teste molecular não ter sido realizada, eles foram excluídos do estudo. O estudo familiar também sugeriu que nove crianças possuíam o genótipo $S\beta^0$-tal. A detecção do alelo β^S por PCR seguida de RFLP com enzima *Dde*I foi realizada em todas as crianças; 13 (incluindo todos os 9 casos sugerido pelo estudo familiar) foram confirmados com o genótipo $S\beta^0$-tal, todos incluídos neste estudo. Dessa forma, a população deste estudo foi constituída de 221 crianças, sendo 208 SS e 13 $S\beta^0$-tal (Figura 1).

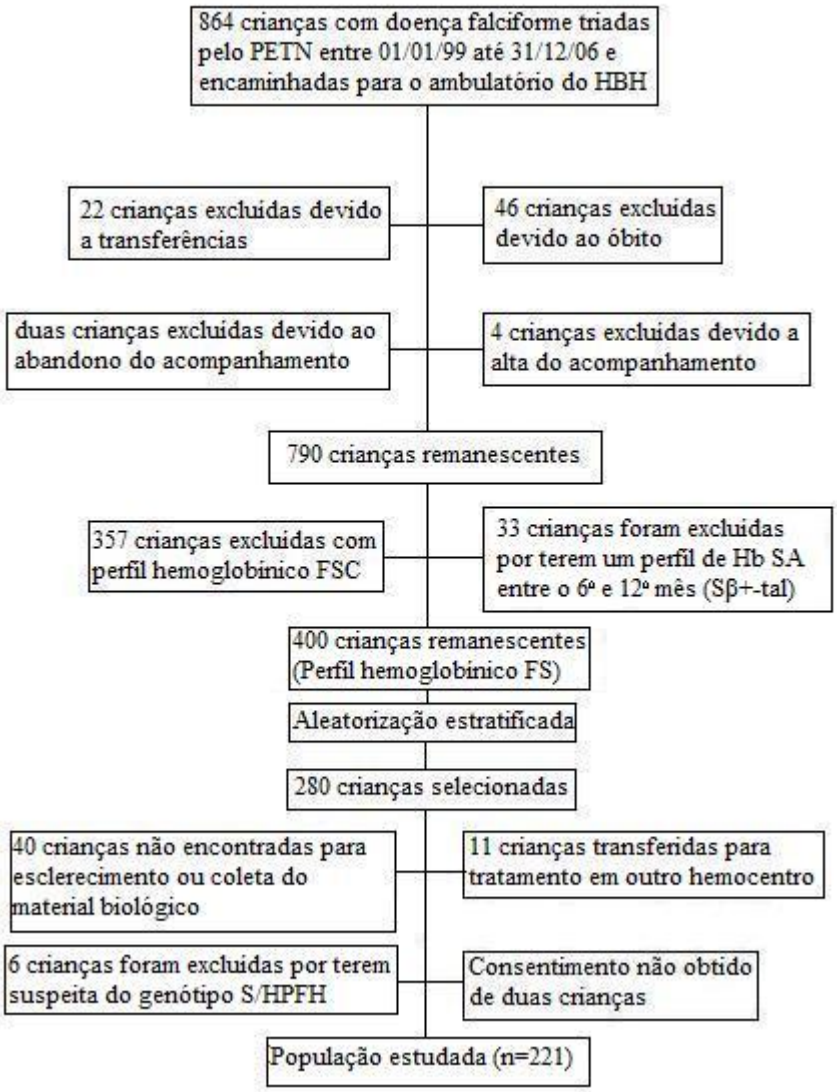


Figura 1 – Representação gráfica do procedimento de seleção da amostra estudada a partir da população de 864 crianças diagnosticadas com doença falciforme pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal (PETN) de Minas Gerais e encaminhadas para tratamento no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte (HBH).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOMINAS e pelo COEP/UFMG. Os pais ou os responsáveis pelas crianças deram o consentimento para a participação através da assinatura do TCLE.

Análises moleculares

A extração do DNA genômico das amostras de sangue foi realizada com o uso do kit comercial (QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAGEN) de acordo com instruções do fabricante. O genótipo do alelo β^S de todos os sujeitos foi confirmado por PCR (fragmento de 488 pares de bases amplificado pelos oligonucleotídeos sintéticos direto 5'TGATGGTATGGGGCCAAGA3' e reverso 5'GGGTGGGAAAATAGACCAATA3') seguida de digestão com a enzima de restrição DdeI (29). Para a genotipagem de α-Tal foram amplificados os fragmentos de DNA resultantes das sete deleções mais frequentes ($-\alpha^{3.7}$; $-\alpha^{4.2}$; $--^{SEA}$; $--^{FIL}$; $--^{MED}$; $-(\alpha)^{20.5}$ e $--^{THAI}$) utilizando a técnica de PCR multiplex (QIAGEN® Multiplex PCR kit, QIAGEN, EUA) descrita anteriormente (30), elevando-se a temperatura de anelamento dos iniciadores para 62° C.

Variáveis clínicas e hematológicas

A evolução clínico-laboratorial dos pacientes foi revista da primeira consulta clínica, que ocorre após os dois meses de idade, até 31 de junho de 2009, de modo que todas as crianças foram acompanhadas por, no mínimo, dois anos e meio. Todas as informações foram retiradas dos prontuários médicos e lançadas num banco de dados específico do programa Microsoft Access.

Para as variáveis hematológicas, a média aritmética de todos os exames realizados após os dois anos de idade foi considerada como valor basal, desprezando-se os valores dos exames realizados após uso de hemocomponentes (90 dias) e eventos clínicos significativos (Infecção grave, sequestro esplênico agudo e crise aplástica). Nas crianças que entraram em regime de transfusão crônica ou iniciaram tratamento com hidroxiureia, o valor basal foi determinado com base na média dos valores anteriores ao início destas modalidades terapêuticas. As variáveis hematológicas foram: concentração total de hemoglobina (Hb, g/dL), volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg), leucometria total (LEU, 10^9/L), plaquetometria (PLAQ, 10^9/L), concentração de hemoglobina

fetal (Hb F, %) e contagem de reticulócitos (Retic, %). Os valores de Hb total, VCM, HCM, LEU e PLAQ foram mensurados utilizando contador eletrônico de células (T-890, COULTER). A quantificação da porcentagem de Hb F foi realizada utilizando-se o método de imunodifusão radial (HbF Quiplate, Helena Laboratories). A contagem de reticulócitos foi realizada utilizando-se o método de azul de cresil brilhante na microscopia óptica.

Como parte de um outro estudo feito no HBH (31), 176 crianças (164 SS and 12 $S\beta^0$-tal) já haviam sido submetidas a pelo menos um exame de Doppler transcraniano (DTC; Companion III, Viasys/Nicolet) para avaliar as artérias do polígono de Willis; outras sete (todas Hb SS) haviam sofrido AVC isquêmico (total 183/221 = 82,8%). Os exames foram feitos e interpretados por um único pesquisador (CMS), após treinamento no *Medical College of Geórgia*, EUA. Foi utilizado o protocolo do estudo STOP (32), com uma pequena modificação para incluir a velocidade do fluxo sanguíneo > 170 cm/s nas artérias cerebrais anteriores como também representando risco alto para desenvolvimento de AVC isquêmico (33).

Os eventos clínicos estudados foram o sequestro esplênico agudo (SEA) e a síndrome torácica aguda (STA), definidos como o registro do evento no prontuário médico pelo hematologista responsável pelo acompanhamento da criança; número de transfusões sanguíneas documentadas no prontuário médico; e doença cerebrovascular (DCV), definida como a presença do DTC alterado (condicional ou anormal) ou AVC isquêmico clínico prévio ao estudo (11, 34, 35), como registrado por um dos pesquisadores (CMS). Apenas o primeiro teste de DTC legível para cada criança foi considerado para esta definição. Excluídas as crianças com DTC inadequados e aquelas em que o exame não foi realizado, os sujeitos da pesquisa foram dicotomizados em: 1) ausência de DCV e 2) presença de DCV.

Dependendo da data de nascimento da criança, o período de acompanhamento e a idade em Junho de 2009 variou de 2,5 a 10,4 anos (6,51±2,28). Para excluir um possível viés devido a diferenças no tamanho do acompanhamento, o número de eventos clínicos foi padronizado da seguinte forma: 1) apenas os episódios de SEA até os 30 meses de idade foram considerados. Este período representa o tempo mínimo de acompanhamento para todas as crianças da pesquisa e, ainda, idade em que mais de 75% desses eventos já ocorreram nas crianças acompanhadas neste hemocentro (36); 2) com relação aos episódios de STA e transfusões sanguíneas, foi utilizado o valor referente ao número absoluto de episódios do evento dividido pelo tempo de acompanhamento clínico.

Análise Estatística

Os resultados quantitativos foram expressos como média ± 1 desvio padrão (DP), ou pela mediana quando a média não era uma medida-resumo adequada. As prevalências foram expressas pelas porcentagens correspondentes ao item analisado e limites de confiança a 95%.

Para verificar a associação dos genótipos de α-Tal com os dados hematológicos e clínicos os sujeitos da pesquisa foram analisados independentemente como dois grupos de acordo com o genótipo (Hb SS ou $S\beta^0$-talassemia). Os sujeitos homozigotos (Hb SS), inicialmente, foram divididos em três grupos: I- ausência de α-Tal, II- heterozigose para α-Tal e III- homozigose para α-Tal. Posteriormente, os pacientes foram divididos em dois grupos: ausência de α-Tal (I) e presença de α-Tal (II e III). Os sujeitos $S\beta^0$-talassemia foram divididos em dois grupos: ausência de α-Tal e heterozigose para α-Tal.

Foi utilizada a análise de variância para variáveis hematológicas com a distribuição normal e com homocedasticidade, ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para variáveis com a distribuição não-normal e/ou sem homocedasticidade. A associação dos genótipos de α-Tal e a ocorrência de SEA até 30 meses de idade e a ocorrência de DCV foi realizada utilizando o teste do qui-quadrado ou, quando necessário, o teste exato de Fisher. A associação dos genótipos de α-Tal com número de STA/ano de seguimento e número de transfusões sanguíneas/ano de seguimento foi realizada utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ou de Mann-Whitney. Consideraram-se significativos os testes em que a probabilidade de erro alfa foi $\leq 0,05$. Todo o estudo estatístico foi processado utilizando o programa SPSS 17.0.

Resultados

Das 221 crianças, 119 (53,8%) eram do sexo feminino. A idade variou entre 2,5 e 10,4 anos (6,49 ± 2,28). Como dito anteriormente, 208 (94,1%; IC95% 91-97,2%) eram homozigotas para o alelo β^S e 13 (5,9%; IC95% 2,8-9%) possuíam o genótipo $S\beta^0$-tal. Os valores hematológicos basais e as características clínicas dos sujeitos da pesquisa são mostrados na tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas e hematológicas de 221 crianças acometidas por doença falciforme

	Crianças SS (n=208)								
Característica	**Média**	**Desvio Padrão (DP)**	**IC95% (Média) Limite inferior**	**Limite superior**	**Mínimo**	**P25**	**Mediana**	**P75**	**Máximo**
Hb (g/dL)	7,93	1,01	7,79	8,07	5,90	7,30	7,80	8,50	12,30
VCM (fL)	91,03	7,38	90,02	92,03	68,70	86,55	91,95	96,20	111
HCM (pg)	28,76	2,58	28,41	29,11	20,20	27,10	29,15	30,50	35,30
LEU (10^9/L)	16,55	4,11	15,98	17,11	6,30	13,86	16,24	19,25	29,67
PLAQ (10^9/L)	396,16	82,26	384,92	407,41	164,50	341,30	396,70	448,85	676,10
Hb F (%)	18,36	8,30	17,19	19,52	2	13	18	23	43
Retic (%)	15,84	4,11	15,28	16,40	4,60	14,10	16,30	18,60	34,20
Transfusões/ano	0,76	1,37	0,57	0,95	0	0	0,35	0,92	10,86
STA*/ano	0,29	0,34	0,24	0,34	0	0	0,21	0,43	1,93
	Número de crianças		**Limite inferior**	**Limite superior**	-	-	-	-	-
SEA‡	63/208 (30,3%)		24%	36,5%	-	-	-	-	-
AVC isquêmico	7/171 (4,1%)		1,1%	7,1%	-	-	-	-	-

	Crianças Sβ^0-talassemia (n=13)								
Characteristic	**Média**	**Desvio Padrão (DP)**	**IC95% (Média) Limite inferior**	**Limite superior**	**Mínimo**	**P25**	**Mediana**	**P75**	**Máximo**
Hb (g/dL)	8,57	1,32	7,77	9,37	6,40	7,70	8,10	9,950	10,40
VCM (fL)	76	6,70	72	80,10	69,70	71,10	75	78,80	94,80
HCM (pg)	23,30	2,50	21,80	24,80	20,30	21,40	23,10	24,30	29,60
LEU (10^9/L)	14,20	5,09	11,10	17,30	8,90	11,10	12,20	17,60	26,40
PLAQ (10^9/L)	374,80	104,60	311,60	438,10	237,70	303,50	332,70	484	541
Hb F (%)	25,50	9,40	19,60	31,50	9	17	28,80	33,50	36
Retic (%)	12,40	8,02	7,50	17,20	2	2,80	13,40	18	27,30
Transfusões/ano	0,43	0,53	0,11	0,75	0	0	0,15	0,95	1,36
STA*/ano	0,21	0,29	0,03	0,39	0	0	0,17	0,31	0,99
	Número de crianças		**Limite inferior**	**Limite superior**	-	-	-	-	-
SEA‡	4/13 (30,8%)		5,7%	55,9%	-	-	-	-	-
AVC isquêmico	0/11 (0%)		0	0	-	-	-	-	-

* Síndrome Torácica Aguda (episódios por ano de acompanhamento)
‡ Sequestro Esplênico Agudo até 30 meses de idade (sim ou não)

Dos 164 sujeitos com anemia falciforme submetidos ao DTC, 119 (72.6%) apresentaram risco baixo para desenvolvimento de AVC isquêmico, 12 (7,3%) apresentaram risco intermediário baixo, sete (4,3%) apresentaram risco intermediário alto, cinco (3%) apresentaram risco alto e em 21 (12,8%) o exame foi considerado inadequado. Então 31 de 150 crianças (20,7%; IC95% 14,2-27,1%) foram classificados como tendo DCV (24 com DTC alterado e sete com AVC isquêmico clínico).

A análise de deleções dos genes da α-globina mostrou a prevalência de α-Tal (apenas o alelo do tipo $-\alpha^{3.7}$) de 29,3% (IC95% 23,8-35,9%) e 38,5% (IC95% 12-64,9%) nos grupos de indivíduos SS e $S\beta^0$-tal, respectivamente (tabela 2).

Tabela 2 – Prevalência de α-Tal e frequência alélica do gene híbrido $-\alpha^{3.7}$ em 221 crianças com doença falciforme, genótipos SS e $S\beta^0$-tal

Genes da alfa-globina	Coorte total (n=221)	SS (n=208)	$S\beta^0$-tal (n=13)
αα/αα	155	147	8
αα/$-\alpha^{3.7}$	63	58	5
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	3	3	0
Prevalência de α-talassemia-2 ($-\alpha^{3.7}$), %	29,9%	29,3%*	38,5%*
Frequência alélica de $-\alpha^{3.7}$	0,156	0,154	0,192

*Teste exato de Fisher (P=0,54)

Nos indivíduos homozigotos (Hb SS), a presença de α-Tal não influenciou os níveis médios de Hb total, Hb F e PLAQ. Já os níveis médios de HCM, VCM, Retic e LEU foram significativamente afetados pela presença de α-Tal (Tabela 3).

Tabela 3 - Associação de α-Talassemia com variáveis hematológicas em 208 crianças com anemia falciforme (Hb SS)

	Crianças com anemia falciforme (Hb SS)				
	Grupo I αα/αα (n=147)	Grupo II -α/αα (n=58)	Grupo III -α/-α (n=3)	valor de P	valor de P – grupo I *vs* II+III
Hb total (g/dl)	7,85±0,95	8,12±1,15	8,3±0,75	0,217*	0,094†
VCM (fl)	93,52±6,34	85,70±5,51	71,93±3,2	<0,000*	<0,000†
HCM (pg)	29,62±2,25	26,93±1,78	21,7±1,45	<0,000*	<0,000†
LEU(10^9/L)	17,28±4,07	14,95±3,60	11,1±1,57	<0,000‡	<0,000§
PLAQ (10^9/L)	396,52±83,58	395,78±79,70	386±95,38	0,976‡	0,922§
Hb F (%)	18,63±8,02	17,95±9,08	13,33±5,51	0,411*	0,320†
Retic (%)	16,36±3,91	14,66±4,39	13,2±1,9	0,018*	0,011†

*Teste de Kruskal-Wallis
†Teste de Mann-Whitney
‡ANOVA
§Teste t de Student

Quando comparação foi limitada a apenas dois grupos (grupos I, sem deleção, *versus* II+III, com 1 ou 2 deleções) os resultados encontrados foram idênticos. Pelo teste de Bonferroni, o grupo sem deleções diferencia-se significativamente dos outros dois em relação

ao LEU (P=0,001 e 0,021, respectivamente), mas o grupo com uma deleção não diferencia-se do grupo com duas deleções. Usando o teste de Mann-Whitney, verificou-se que os três grupos diferenciam-se entre si na comparação grupo a grupo (I*vs*II; I*vs*III; II*vs*III) com relação às variáveis VCM e HCM. A mesma análise mostrou que o grupo sem deleções diferencia-se significativamente dos outros dois em relação ao Retic, mas o grupo com uma deleção não se diferencia do grupo com duas deleções (dados não mostrados).

Dos 214 sujeitos homozigotos (Hb SS), 63 (29,4%) apresentaram pelo menos um evento de SEA até os 30 meses de idade. A frequência de α-Tal (2 ou 3 genes alfa ativos) foi menor no grupo de sujeitos que desenvolveram pelo menos um evento de SEA até 30 meses de idade, mas a diferença não foi estatisticamente significativa (22,2% *vs* 31,8%; P=0,19) (Tabela 4).

No grupo de crianças SS sem deleções nos genes alfa, 26,2% apresentaram DCV, enquanto nos grupos de crianças heterozigotas e homozigotas para α-Tal a frequência de DCV foi 7,1% e 0%, respectivamente. A presença de α-Tal (3 ou 2 genes alfa ativos) associou-se com menor frequência de DCV, ou sendo mais preciso, a chance das crianças sem α-Tal apresentarem DCV foi 3,9 vezes maior do que as com α-Tal (IC95% 1,2 a 12,2; P=0,007) (Tabela 4).

Tabela 4 – Associação de α-Tal com a ocorrência de sequestro esplênico agudo (SEA) até 30 meses de idade e com a ocorrência de doença cerebrovascular (DCV) em crianças com anemia falciforme (Hb SS)

	SEA até 30 meses (n=208)			DCV (n=150)		
Genótipo de α-Tal	Sim (n=63)	Não (n=145)	Valor de P	Sim (n=31)	Não (n=121)	Valor de P
αα/αα	49 (33,3%)	98 (66,7%)		28 (26,5%)	79 (73,6%)	
-α/αα	12 (20,7%)	47 (79,3%)		3 (7,3%)	39 (92,7%)	
-α/-α	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,300*	0 (0%)	3 (100%)	0,008*
α-Tal (Não/Sim)	49/14	98/47	0,185†	28/3‡	78/41‡	0,007†

* Teste do qui-quadrado de tendência
† Teste exato de Fisher
‡ Razão de chances de DCV sim/não para α-Tal não/sim = 28/78 : 3/41 = 3,9 (IC95% 1,2 – 12,2)

A mediana do número de transfusões por ano de acompanhamento foi maior em pacientes sem deleções nos genes alfa quando comparado com aqueles com α-Tal em heterozigose ou homozigose (mediana 0,42 vs. 0,27, intervalo interquartil 0,97 e 0,77,

respectivamente), mas a diferença não foi estatisticamente significativa (P=0,10). Semelhantemente, mediana do número de STA por ano de acompanhamento foi maior, mas não significativamente, em crianças sem α-Tal do que naqueles com α-Tal em heterozigose ou homozigose (mediana 0,22 vs. 0,15, intervalo interquartil 0,47 e 0,13, respectivamente). A tabela 5 mostra os dados de associação entre α-Tal e ocorrência de STA e transfusões sanguíneas.

Tabela 5 – Associação de α-Tal com o número de transfusões sanguíneas, por ano de acompanhamento, e o número de ocorrências de síndrome torácica aguda (STA), por ano de acompanhamento, em 208 crianças com anemia falciforme (Hb SS)

	Nº Trasfusões/ano			Nº STA/ano		
Genótipo de α-Tal	Média	Mediana	Valor de P	Média	Mediana	Valor de P
αα/αα	0,87	0,42		0,31	0,22	
-α/αα	0,47	0,23		0,23	0,15	
-α/-α	1,06	1,27	0,051*	0,26	0,34	0,282*

*Teste de Kruskal-Wallis

Não houve associação significativa entre os genótipos de α-Tal e os eventos clínicos e hematológicos analisados em indivíduos com o genótipo $S\beta^0$-tal (dados não mostrados). No nosso estudo, nenhuma criança com o genótipo $S\beta^0$-tal apresentou DCV. Entretanto, quando comparado as taxas de DCV em indivíduos SS e $S\beta^0$-tal, a diferença não foi estatisticamente significativa (dados não mostrados).

Discussão

A prevalência de α-Tal em pacientes com anemia falciforme encontrada neste estudo foi similar à encontrada em estudos realizados no estado da Bahia (10, 37). Entretanto, ela é superior à encontrada no estado de São Paulo, localizado no sudeste brasileiro (37, 38). Tendo em vista a possível associação de α-Tal com um curso clínico menos grave da doença (25, 39) e, portanto, a involuntária exclusão de pacientes menos graves em estudos não-aleatorizados, é possível que tais estudos tenham subestimado a real prevalência de α-Tal. Outra possível explicação é a diferença no método de diagnóstico de α-Tal utilizado nesses estudos.

Desde a primeira demonstração de que a coexistência de α-Tal modifica as características hematológicas da anemia falciforme (7, 40), esse campo virou alvo de várias pesquisas envolvendo indivíduos de várias origens e nacionalidades.

Em concordância com outros autores, a análise dos dados laboratoriais do presente estudo mostrou que as crianças SS com α-Tal possuem uma diminuição significativa nos níveis médios de LEU (9, 11, 14) e reticulócitos (7, 11-13, 40, 41). Isso provavelmente ocorre devido à diminuição da taxa de hemólise (8, 11, 42) e células falcêmicas irreversíveis (7, 15), bem como de uma possível diminuição dos fenômenos inflamatórios. Também em concordância com outros estudos, os níveis médios de VCM (7-9, 11, 13, 14, 16, 17, 24, 34, 38, 41, 43, 44) e HCM (7, 9, 16, 24, 43, 44) foram significativamente mais baixos nos sujeitos com α-Tal. Isso ocorre devido à redução da síntese de cadeias alfa (45) (41).

Não houve diferença significativa nos níveis médios de Hb total entre os grupos com diferentes genótipos da α-globina. Este resultado está em concordância com alguns estudos (17, 41), mas em contraste com outros (7-9, 11, 13, 14, 34, 38, 40, 43). Essa divergência pode ser explicada pela diferença na idade dos sujeitos investigados nos diferentes trabalhos. É possível que a diferença no nível de hemoglobina total apareça apenas nas crianças mais velhas e, dessa forma, não pôde ser detectada no presente estudo (8, 41). Não houve diferença significativa nos níveis médios de Hb F entre os grupos com diferentes genótipos da α-globina. Este resultado corrobora a maioria dos estudos do gênero (8, 9, 12, 16, 17, 41, 43). Entretanto, alguns estudos sugerem que a α-Tal reduza o nível de Hb F em indivíduos com anemia falciforme (7, 46) e outros sugerem que ela eleve (24, 40).

Trabalhos publicados anteriormente têm mostrado associação entre algumas manifestações clínicas da anemia falciforme e genótipos de α-Tal. Para algumas manifestações α-Tal teria um efeito protetor e para outras conferiria maior susceptibilidade.

No presente estudo não houve associação entre a presença de α-Tal e a ocorrência de SEA, corroborando com alguns estudos (10, 13, 19, 25) e discordando de outros (44, 47). A presença de α-Tal, aparentemente, está associada com preservação da função esplênica (23, 24) e com a susceptibilidade à esplenomegalia (7, 14, 43), mas o real efeito sobre a ocorrência de SEA permanece controverso. Também não houve associação entre a presença de α-Tal e a ocorrência de STA, fato apoiado por estudos anteriormente publicados (13, 17, 25, 48). Outros estudos, entretanto, relataram associação significativa destas duas variáveis (7, 19).

No presente estudo, a presença de α-Tal foi fortemente associada com a diminuição do risco de ocorrência de DCV. Crianças com DTC condicional foram incluídas no grupo de

risco para DCV, pois a incidência cumulativa de 18 meses de conversão de DTC condicional para DTC anormal tem sido relatada tão alta quanto 23% (35). Alguns estudos já relataram que a coexistência de α-Tal reduz o risco de ocorrência de AVC (17-21) ou de DTC alterado (11, 34). Isso pode ser parcialmente explicado pelas modificações induzidas pela presença de α-Tal na fisiopatologia da anemia falciforme, tais como redução dos níveis de leucócitos e reticulócitos, aumento na capacidade de deformação dos eritrócitos e sua menor adesão às células endoteliais. Entretanto, novos estudos são necessários para esclarecer como a co-herança da α-Tal atuaria na fisiopatologia da doença e, assim, explicar o efeito protetor observado.

Nos indivíduos com o genótipo $S\beta^0$-tal, não houve associação entre a presença de α-Tal e as variáveis hematológicas e clínicas analisadas, provavelmente devido ao número reduzido de indivíduos investigados (13 indivíduos). Trabalhos publicados anteriormente mostraram que a α-Tal também pode modificar as características hematológicas e clínicas de sujeitos com o genótipo $S\beta^0$-tal (49, 50). É interessante notar que nenhum indivíduo com o genótipo $S\beta^0$-tal apresentou CVD, mesmo aqueles com genótipo o αα/αα. Entretanto, o número de sujeitos analisados com este genótipo foi pequeno demais para chegar a uma conclusão concreta.

Uma limitação deste estudo foi a utilização de registros médicos como fonte de dados retrospectivos, já que esses registros foram gerados para acompanhamento clínico e não para realização de pesquisa (51). Embora a amostra final para este estudo (n = 221) represente 55,3% da população total (n = 400) e 78,9% da amostra aleatória (n = 280), 40 crianças não puderam ser encontradas para genotipagem durante o período do estudo e estas podem representar a forma mais branda da anemia falciforme. Além disso, como já mencionado, o número de pacientes com o genótipo $S\beta^0$-tal é pequeno para inferências a partir da amostra analisada.

Outros polimorfismos em diversos genes vêm sendo identificados como marcadores de gravidade (52), mas nenhum, isoladamente, prediz, com segurança, o prognóstico da doença. Destaca-se a necessidade de estudar outros fatores moduladores que possam ser utilizados em conjunto para definir subfenótipos da doença, e assim, poderem ser utilizados como ferramenta clínica no acompanhamento dos pacientes.

Em conclusão, a prevalência de α-Tal do tipo $-\alpha^{3.7}$, em heterozigose ou homozigose, atingiu quase 30% das crianças neste estudo. Ficou evidenciado o papel protetor da α-Tal contra o desenvolvimento de DCV em indivíduos homozigotos SS, assim como seu efeito

modificador nas características hematológicas. Ressalte-se que a amostra de crianças proveio de uma única fonte (PETN-MG), foi aleatorizada e o acompanhamento seguiu o mesmo protocolo de tratamento num único ambulatório, o que reforça as conclusões do estudo.

Referências bibliográficas

1. Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. ScientificWorldJournal2008;8:1295-324.
2. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. Rev Bras Hematol Hemoter2007;29(3):203-6.
3. Fernandes AP, Januario JN, Cangussu CB, de Macedo DL, Viana MB. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. J Pediatr (Rio J)2010 May 27;86(4):279-284.
4. Rund D, Fucharoen S. Genetic modifiers in hemoglobinopathies. Curr Mol Med2008 Nov;8(7):600-8.
5. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. Br J Haematol2005 May;129(4):465-81.
6. Ballas SK. Effect of alpha-globin genotype on the pathophysiology of sickle cell disease. Pediatr Pathol Mol Med2001 Mar-Apr;20(2):107-21.
7. Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Hayes RJ, et al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. N Engl J Med1982 Jun 17;306(24):1441-6.
8. Felice AE, McKie KM, Cleek MP, Marino EM, Kutlar A, McKie VC. Effects of alpha-thalassemia-2 on the developmental changes of hematological values in children with sickle cell disease from Georgia. Am J Hematol1987 Aug;25(4):389-400.
9. Mouele R, Pambou O, Feingold J, Galacteros F. alpha-thalassemia in Bantu population from Congo-Brazzaville: its interaction with sickle cell anemia. Hum Hered2000 Mar-Apr;50(2):118-25.
10. Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Seixas MO, Reis MG, Gonçalves MS. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. Genet Mol Biol2008;31(3):621-5.
11. Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C, et al. G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. Blood2008 Nov 15;112(10):4314-7.
12. Steinberg MH, Hsu H, Nagel RL, Milner PF, Adams JG, Benjamin L, et al. Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. Am J Hematol1995 Mar;48(3):175-81.
13. 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 Haematol2006 Mar;76(3):193-9.
14. Mouele R, Boukila V, Fourcade V, Feingold J, Galacteros F. Sickle-cell disease in Brazzaville, Congo: genetical, hematological, biochemical and clinical aspects. Acta Haematol1999;101(4):178-84.

15. Embury SH, Clark MR, Monroy G, Mohandas N. Concurrent sickle cell anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes. J Clin Invest1984 Jan;73(1):116-23.
16. Mukherjee MB, Surve R, Tamankar A, Gangakhedkar RR, Ghosh K, Lu CY, et al. The influence of alpha-thalassaemia on the haematological & clinical expression of sickle cell disease in western India. Indian J Med Res1998 Apr;107:178-81.
17. Neonato MG, Guilloud-Bataille M, Beauvais P, Begue P, Belloy M, Benkerrou M, et al. Acute clinical events in 299 homozygous sickle cell patients living in France. French Study Group on Sickle Cell Disease. Eur J Haematol2000 Sep;65(3):155-64.
18. 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 Hematol1994 Apr;45(4):279-82.
19. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood1995 Jul 15;86(2):776-83.
20. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. Blood1998 Jan 1;91(1):288-94.
21. Sarnaik SA, Ballas SK. Molecular characteristics of pediatric patients with sickle cell anemia and stroke. Am J Hematol2001 Jul;67(3):179-82.
22. Koshy M, Entsuah R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, et al. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. Blood1989 Sep;74(4):1403-8.
23. Adekile AD, Tuli M, Haider MZ, Al-Zaabi K, Mohannadi S, Owunwanne A. Influence of alpha-thalassemia trait on spleen function in sickle cell anemia patients with high HbF. Am J Hematol1996 Sep;53(1):1-5.
24. Wali YA, Al-Lamki Z, Hussein SS, Bererhi H, Kumar D, Wasifuddin S, et al. Splenic function in Omani children with sickle cell disease: correlation with severity index, hemoglobin phenotype, iron status, and alpha-thalassemia trait. Pediatr Hematol Oncol2002 Oct-Nov;19(7):491-500.
25. Thomas PW, Higgs DR, Serjeant GR. Benign clinical course in homozygous sickle cell disease: a search for predictors. J Clin Epidemiol1997 Feb;50(2):121-6.
26. Milner PF, Kraus AP, Sebes JI, Sleeper LA, Dukes KA, Embury SH, et al. Sickle cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. N Engl J Med1991 Nov 21;325(21):1476-81.
27. Martinez G, Muniz A, Svarch E, Espinosa E, Nagel RL. Age dependence of the gene frequency of alpha-thalassemia in sickle cell anemia in Cuba. Blood1996 Sep 1;88(5):1898-9.
28. Miller ST, Sleeper LA, Pegelow CH, Enos LE, Wang WC, Weiner SJ, et al. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. N Engl J Med2000 Jan 13;342(2):83-9.
29. Chang JC, Kan YW. Antenatal diagnosis of sickle cell anaemia by direct analysis of the sickle mutation. Lancet1981 Nov 21;2(8256):1127-9.
30. Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. Blood2001 Jul 1;98(1):250-1.
31. Silva CM: Rastreamento de crianças com doença falciforme pelo Doppler transcraniano em uma coorte de pacientes triados pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal do estado de Minas Gerais (PETN-MG) e acompanhados no Hemocentro de Belo Horizonte - MG - Brasil: Faculdade de Medicina. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009, Tese de Doutoramento, pp 125.
32. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. N Engl J Med1998 Jul 2;339(1):5-11.

33. Kwiatkowski JL, Zimmerman R, Greenbaum B, Ohene-Frempong K. Stroke and elevated blood flow velocity in the anterior cerebral artery in sickle cell disease. J Pediatr Hematol Oncol2004 May;26(5):323-6.
34. Hsu LL, Miller ST, Wright E, Kutlar A, McKie V, Wang W, et al. Alpha Thalassemia is associated with decreased risk of abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia. J Pediatr Hematol Oncol2003 Aug;25(8):622-8.
35. Hankins JS, Fortner GL, McCarville MB, Smeltzer MP, Wang WC, Li CS, et al. The natural history of conditional transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia. Br J Haematol2008 Jul;142(1):94-9.
36. Rezende PV, Viana MB, Murao M, Chaves AC, Ribeiro AC. Acute splenic sequestration in a cohort of children with sickle cell anemia. J Pediatr (Rio J)2009 Mar-Apr;85(2):163-9.
37. Lyra IM, Goncalves MS, Braga JA, Gesteira Mde F, Carvalho MH, Saad ST, et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. Cad Saude Publica2005 Jul-Aug;21(4):1287-90.
38. Figueiredo MS, Kerbauy J, Goncalves MS, Arruda VR, Saad ST, Sonati MF, et al. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. Am J Hematol1996 Oct;53(2):72-6.
39. el-Hazmi MA. Heterogeneity and variation of clinical and haematological expression of haemoglobin S in Saudi Arabs. Acta Haematol1992;88(2-3):67-71.
40. Embury SH, Dozy AM, Miller J, Davis JR, Jr., Kleman KM, Preisler H, et al. Concurrent sickle-cell anemia and alpha-thalassemia: effect on severity of anemia. N Engl J Med1982 Feb 4;306(5):270-4.
41. Stevens MC, Maude GH, Beckford M, Grandison Y, Mason K, Taylor B, et al. Alpha thalassemia and the hematology of homozygous sickle cell disease in childhood. Blood1986 Feb;67(2):411-4.
42. de Ceulaer K, Higgs DR, Weatherall DJ, Hayes RJ, Serjeant BE, Serjeant GR. Alpha-Thalassemia reduces the hemolytic rate in homozygous sickle-cell disease. N Engl J Med1983 Jul 21;309(3):189-90.
43. Mukherjee MB, Colah RB, Ghosh K, Mohanty D, Krishnamoorthy R. Milder clinical course of sickle cell disease in patients with alpha thalassemia in the Indian subcontinent. Blood1997 Jan 15;89(2):732.
44. Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Souza CC, Santos LF, Menezes JF, et al. The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. Hemoglobin2004 Aug;28(3):267-71.
45. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. Blood1989 Apr;73(5):1081-104.
46. Chang YC, Smith KD, Moore RD, Serjeant GR, Dover GJ. An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, beta-globin haplotypes, alpha-globin gene number, gender, and age. Blood1995 Feb 15;85(4):1111-7.
47. De Ceulaer K, Serjeant GR. Acute splenic sequestration in Jamaican adults with homozygous sickle cell disease: a role of alpha thalassaemia. Br J Haematol1991 Apr;77(4):563-4.
48. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood1994 Jul 15;84(2):643-9.
49. Steinberg MH, Coleman MB, Adams JG, Rosenstock W. Interaction between HBS-beta-o-thalassemia and alpha-thalassemia. Am J Med Sci1984 Dec;288(5):195-9.

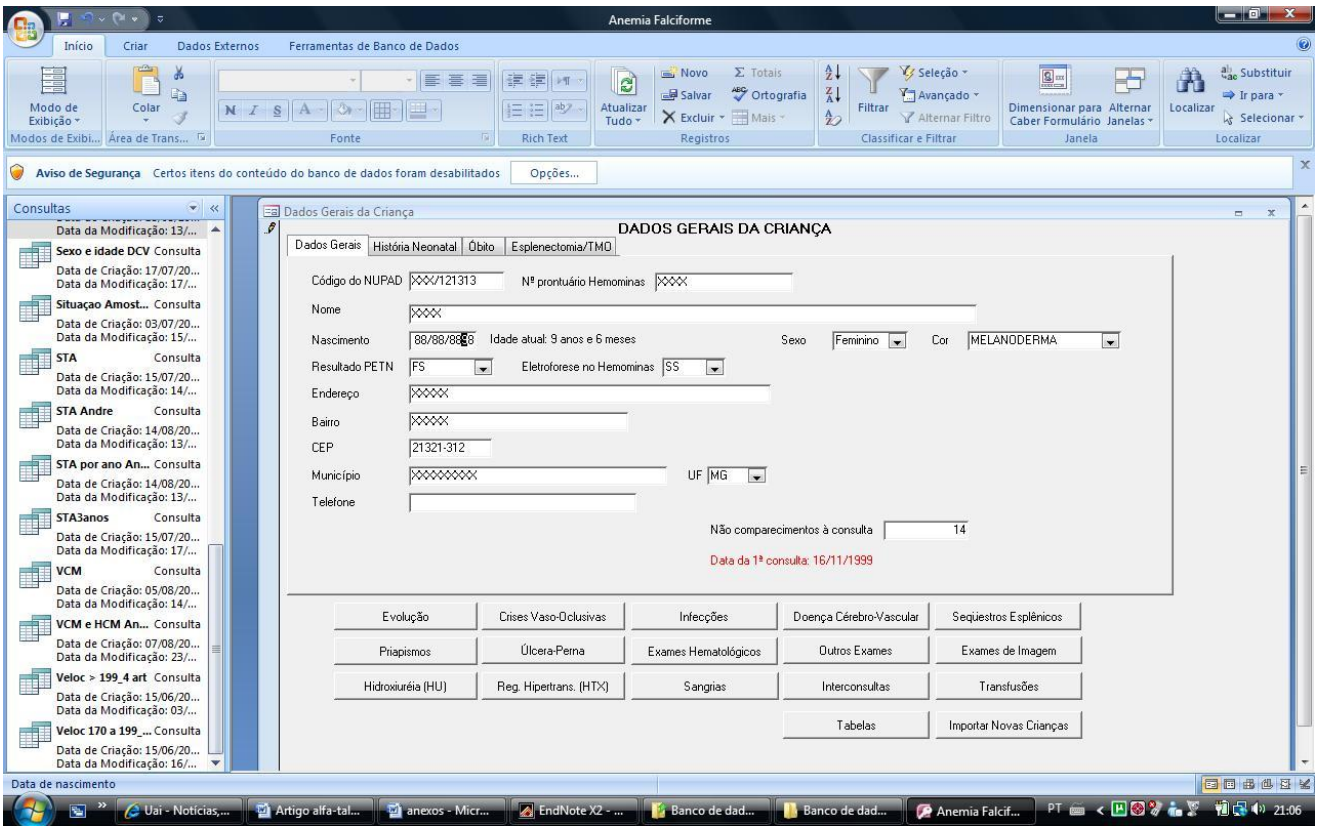
50. Vyas P, Higgs DR, Weatherall DJ, Dunn D, Serjeant BE, Serjeant GR. The interaction of alpha thalassaemia and sickle cell-beta zero thalassaemia. Br J Haematol1988 Dec;70(4):449-54.
51. Gordis L. Epidemiology. 3rd edition ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2004.
52. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. ScientificWorldJournal2009;9:46-67.

9. CONCLUSÕES

- A prevalência de α-Tal atingiu quase 30% das crianças estudadas.
- Como na maioria dos estudos realizados no Brasil, o haplótipo CAR foi o mais frequente, seguido do Ben.
- A prevalência dos haplótipos CAR e Ben no presente estudo está em concordância com os registros históricos de tráfico de escravos para Minas Gerais.
- Nas crianças SS, a presença de α-Tal associou-se com a diminuição dos níveis de VCM, HCM, leucócitos e reticulócitos, e não influenciou os níveis de Hb total, Hb F e plaquetas.
- Não houve associação entre haplótipos β^S e os níveis de Hb total, Hb F, VCM, HCM, leucócitos e reticulócitos; a associação do genótipo Ben/CAR com níveis elevados de plaquetas não possui significado clínico.
- A presença de α-Tal foi fortemente associada com a diminuição do risco de DCV nas crianças SS.
- Não houve associação entre os haplótipos β^S e os eventos clínicos analisados.
- A presença ou não de α-Tal ou o tipo do haplótipo β^S não permite prever, isoladamente, as características clínicas da doença.
- Outros fatores moduladores devem ser estudados para definir subfenótipos da doença e, assim, serem utilizados em conjunto como ferramenta clínica no acompanhamento dos pacientes.

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1 – Banco de Dados



10.2 Anexo 2 – Parecer COEP/UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 89/08

Interessado(a): Prof. Marcos Borato Viana
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de maio de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação de marcadores genéticos como fatores moduladores na doença falciforme: heplótipos do gene da beta-globina e genótipos da alfatalassemia"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Av. Pres. Antonio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II - 2º andar – Sala 2005 – Cep:31270-901 – BH-MG
Telefax: (031) 3409-4592 - e-mail: coep@prpq.ufmg.br

10.3 Anexo 3 – Parecer CEP-HEMOMINAS

Belo Horizonte, 06 de novembro de 2007.

OF. CEP nº 86 /2007

REF: Alteração dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido dos projetos CEP 122, CEP 143 e CEP 158.

Prezadas Senhoras,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOMINAS procedeu à análise da solicitação acima referida, apresentada por V.Sas. para autorização de agrupamento dos Termos de *Consentimento Livre e Esclarecido dos Projetos com número de registro* CEP122, CEP143 e CEP158, em um único TCLE, de modo a que se possa abordar todos os aspectos propostos em cada pesquisa nos mesmos sujeitos participantes das três (crianças com doença falciforme acompanhadas no *Ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte), e além disso a* possibilidade de se fazer um banco de amostras para atender às pesquisas citadas.

Consideradas as explicações fornecidas, as justificativas e o modelo de TCLE proposto para abranger os três projetos, e ainda os requisitos dispostos na Resolução nº 196/96, o CEP-HEMOMINAS em *reunião ocorrida nesta data, concluiu que a alteração proposta está* aprovada, podendo se efetivar conforme solicitado.

Pelo exposto, encaminhamos a V.Sas. a presente manifestação, e colocamo-nos à disposição para o que se fizer necessário.

Atenciosamente,

Susie Dutra

Susie Dutra
Coordenadora do CEP-HEMOMINAS

Susie Dutra
Coordenadora do Comitê
de Ética em pesquisa
Fundação Hemominas

Ilmas. Sras.
Marina Lobato Martins
Cibele Velloso Rodrigues
Célia Maria Silva

11 APÊNDICES

11.1 Apêndice 1 – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96

Pesquisa: Estudo de marcadores genéticos (haplótipos do grupo do gene da globina beta e alfa talassemia) e a relação com os aspectos clínicos e hematológicos em pacientes pediátricos com doença falciforme acompanhados no Hemocentro Regional de Belo Horizonte – Fundação HEMOMINAS

A anemia falciforme é uma doença do sangue causada pela alteração na forma das hemácias, que ficam parecidas com foice, ao invés de ter a forma normal arredondada. Ela é uma doença genética, ou seja, o pai e a mãe podem transmitir para os filhos o gene alterado (hemoglobina S) que leva à doença. A doença falciforme causa diferentes sintomas nos pacientes, com casos mais leves e outros mais graves. A gravidade da doença pode ser prevista por avaliação clínica ou estar relacionada com características genéticas dos indivíduos. Nosso objetivo é estudar algumas destas características (dados clínicos como condições do pulmão, dos vasos cerebrais, coração, ossos e outros órgãos, dados hematológicos, ou seja, composição do sangue, fatores genéticos, como grupos de genes associados ao gene da HbS e alfa talassemia) que podem influenciar a doença falciforme. Alguns resultados poderão ajudar o médico a conhecer quais os pacientes terão maior risco de ter uma doença mais grave, e assim orientá-lo no tratamento mais adequado para evitar as possíveis complicações.

É por isso que nós pedimos sua autorização para incluir seu(sua) filho(a) nestes estudos. Caso você autorize, você não terá nenhum custo. Iremos colher um pouco de sangue da veia (5 ml) da criança para realizar os testes genéticos. A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas, em alguns casos pode acontecer um hematoma (cor roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, esta mesma amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta. O material coletado ficará guardado no Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas e será usado apenas para os fins propostos nestas pesquisas (identificação dos grupos de genes associados ao gene da HbS, e alfa talassemia). Será necessário coletar dados no prontuário do seu (sua) filho(a). Além disso, faremos a avaliação dos vasos sangüíneos cerebrais através do ultra-som transcraniano, exame simples que não provoca dor, para detecção de doença neurológica. Este exame será realizado no Ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte, como parte da avaliação clínica. Os resultados dos testes clínicos e genéticos serão anexados ao prontuário do participante. Na divulgação dos resultados, o nome da pessoa não será mostrado, garantindo sigilo e privacidade. Também é importante esclarecer que você tem toda a liberdade para decidir se quer ou não autorizar a participação do seu (sua) filho(a) nestas pesquisas. Se você não autorizar, ele não será prejudicado no atendimento, e se desistir durante a pesquisa não sofrerá nenhum prejuízo.

Caso você autorize, o material genético (DNA) recolhido para estes estudos poderá ser usado pelos mesmos pesquisadores envolvidos nestas pesquisas em futuras investigações com os mesmos objetivos: investigar marcadores genéticos que podem ter influência nas manifestações clínicas da doença falciforme. Neste caso, a amostra da

criança será conservada sem prazo para descarte (**Banco de Amostras**). Entretanto, o uso futuro deste material nunca será ligado a nenhum dado pessoal do participante. Você pode negar a permissão para o uso da amostra em estudos futuros, e ainda participar deste projeto. Se você autorizar o uso futuro da amostra da criança, qualquer novo estudo utilizando esta amostra deverá ser avaliado e autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação. Se a nova pesquisa não trouxer benefícios ou riscos para o participante, você não será informado sobre seu uso.

Qualquer dúvida que você tiver, fale com Marina Lobato Martins ou Cibele Velloso Rodrigues no telefone 3248-4535, nos horários de 9:00 às 16:00h, para esclarecimentos, ou com o Professor Marcos Borato Viana, no telefone 31-3409-9773

Eu,_____,
responsável pelo menor_____ ,
após esclarecimentos, autorizo o pesquisador a incluí-lo(a) nestes estudos.
Data:

Assinatura: _____

Rua: **Bairro:**
Cidade: **CEP:**

Telefone:

Assinatura de crianças com 7 a 12 anos de idade

Quanto ao Banco de Amostras, marque com um X no quadrado abaixo sua decisão:

☐ Aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.

☐ NÃO aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.

Assinatura do pesquisador:_____

Local: _____

Data: _____/_____/_____

Pesquisadores responsáveis: Célia Maria Silva, Cibele Velloso Rodrigues, Marcos Borato Viana, Marina Lobato Martins, Mitiko Murao, André Rolim Belisário e Felipe Carlos Brito de Souza.

Serviço de Pesquisa – Fundação HEMOMINAS: 31-3248-4535
Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas: 31-3248-4587

COEP/ UFMG – COMITÊ DE ETICA EM PESQUISA

Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Unidade Administrativo II, 2º andar, sala 2005. CEP: 31.270-901 – BH – MG / TEL: 3409-4592 / coep@prpq.ufmg

11.2 Apêndice 2 – Análises Complementares

11.21 Análise Complementar 1

Nesta análise foram comparados os grupos de indivíduos com o genótipo SS, sem α-Tal concomitante (β^S/β^S e αα/αα; n=152) com o grupo de indivíduos $S\beta^0$-tal também sem α-Tal (n=8), sob os aspectos clínico e hematológico.

As médias de VCM e HCM, como esperado pelos dados de literatura, foram significativamente mais baixas nos indivíduos $S\beta^0$-tal. Não houve diferença significativa nos outros índices hematológicos (Tabela 1).

Tabela 1 –Índices hematológicos de crianças com os genótipos SS e $S\beta^0$-tal

	Crianças com doença falciforme sem α-Tal		
	SS (n=152)	$S\beta^0$-tal (n=8)	valor de P
Hb total (g/dl)	7,99±1,210	8,24±1,21	0,189†
VCM (fl)	93,05±6,867	73,84±2,52	<0,000†
HCM (pg)	29,52±2,353	22,51±1,61	<0,000†
LEU(10^9/L)	17,14±4,208	15,12±6,2	0,3§
PLAQ (10^9/L)	396,02±83,05	372,27±96,78	0,382§
Hb F (%)	19,59±9,155	23,93±8,85	0,164†
Retic (%)	15,8±4,715	15,7±7,96	0,662†

†Teste de Mann-Whitney

§Teste t de Student

A ocorrência de sequstro esplênico agudo (SEA) até 30 meses de idade foi maior no grupo de indivíduos com o genótipo SS quando comparado com o grupo $S\beta^0$-tal, mas a diferença não foi estatisticamente significativa (32,2% *vs* 25%; P=1,0; Tabela 2).

A doença cerebrovascular (DCV = indivíduos com AVC isquêmico+indivíduos com Doppler transcraniano alterado) ocorreu em 24,6% dos indivíduos com o genótipo SS (n=107) e em nenhum dos indivíduos com o genótipo $S\beta^0$-tal (n=7). Essa diferença

não foi estatisticamente significativa (P=0,19; Tabela 2), mas é recomendável aumentar o número de indivíduos na amostra.

Tabela 2 - Ocorrência de SEA até 30 meses de idade e de DCV em indivíduos SS e Sβ^0-tal sem a co-herança de α-Tal

	SEA até 30 meses (n=160)			DCV (n=114)		
Genótipo	Sim	Não	Valor de P	Sim	Não	Valor de P
SS	49 (32,2%)	103 (67,8%)		28 (24,6%)	79 (75,4%)	
Sβ^0-tal	2 (25%)	6 (75%)	1,00†	0 (0%)	7 (100%)	0,19†

†Teste exato de Fisher

A mediana do número de transfusões por ano de acompanhamento foi levemente maior no grupo de indivíduos com o genótipo Sβ^0-tal quando comparado com o grupo de indivíduos SS, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa (P=0,85; Tabela 3).

A mediana do número de síndrome torácica aguda (STA) por ano de acompanhamento foi exatamente igual nos grupos de indivíduos SS e Sβ^0-tal (P=0,97).

Tabela 3 – Número de transfusões e de STA, por ano de acompanhamento, em indivíduos SS e Sβ^0-tal sem a co-herança de α-Tal

	Nº Trasfusões/ano			Nº STA/ano		
Genótipo	Média	Mediana	Valor de P	Média	Mediana	Valor de P
SS	0,847	0,41		0,305	0,215	
Sβ^0-tal	0,525	0,475	0,85*	0,298	0,215	0,97*

* Teste de Mann-Whitney

11.22 Análise Complementar 2

Esta análise teve como objetivo comparar os índices hematológicos dos indivíduos com o genótipo SS e apenas três genes alfa funcionais (β^S/β^S e $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$; n=59), com os indivíduos $S\beta^0$-tal sem α-Tal (αα/αα; n=8).

O VCM e o HCM do grupo de indivíduos $S\beta^0$-tal e sem α-Tal foi significativamente menor quando comparado com o grupo de indivíduos SS e $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$. Não houve diferença estatisticamente significativa nos outros índices hematológicos (Tabela 1). Conforme já demonstrado na parte principal do estudo, a co-herança de $-\alpha^{3.7}$, em homozigose ou heterozigose, nos indivíduos SS determina queda estatisticamente significativa de VCM e HCM. O que se demonstra nesta análise complementar é que, comparativamente, a herança de um alelo β^0-tal em indivíduos αα/αα determina uma queda mais acentuada dos índices do que a herança de $-\alpha^{3.7}$/αα em indivíduos SS.

Tabela 1 – Índices hematológicos de crianças com os genótipos SS ($\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$) e $S\beta^0$-tal (αα/αα)

	Crianças com doença falciforme		
	SS e $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ (n=59)	Sβ-tal e αα/αα (n=8)	valor de P
Hb total (g/dl)	8,13±1,214	8,24±1,21	0,504†
VCM (fl)	85,58±5,51	73,84±2,52	<0,000†
HCM (pg)	26,91±1,824	22,51±1,61	<0,000†
LEU(10^9/L)	14,99±3,569	15,12±6,2	0,942§
PLAQ (109/L)	397,56±80,02	372,27±96,78	0,384§
Hb F (%)	18,41±9,636	23,93±8,85	0,124†
Retic (%)	14,44±4,745	15,7±7,96	0,985†

†Teste de Mann-Whitney

§Teste t de Student

11.23 Análise Complementar 3

Esta análise teve como objetivo comparar os índices hematológicos dos indivíduos com o genótipo SS e apenas dois genes alfa funcionais ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$; n=3), com os indivíduos $S\beta^0$-tal sem α-Tal (αα/αα; n=8).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos com relação aos índices hematológicos (Tabela 1). O efeito da deleção de dois genes alfa sobre VCM e HCM seria semelhante ao do alelo β^0-tal. Cumpre ressaltar o número pequeno de indivíduos em ambos os grupos, o que requer cautela na interpretação dos resultados.

Tabela 1 – Índices hematológicos de crianças com os genótipos SS ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) e $S\beta^0$-tal (αα/αα)

	Crianças com doença falciforme		
	SS e $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ (n=3)	Sβ-tal e αα/αα (n=8)	valor de P
Hb total (g/dl)	8,3±0,75	8,24±1,21	0,838†
VCM (fl)	71,93±3,2	73,84±2,52	0,307†
HCM (pg)	21,7±1,452	22,51±1,61	0,307†
LEU(10^9/L)	11,1±1,577	15,12±6,2	0,136§
PLAQ (10^9/L)	386±95,383	372,27±96,78	0,76§
Hb F (%)	13,33±5,507	23,93±8,85	0,11†
Retic (%)	13,2±1,9	15,7±7,96	0,838†

†Teste de Mann-Whitney

§Teste t de Student

11.3 Apêndice 3 – Genotipagem da Talassemia Alfa

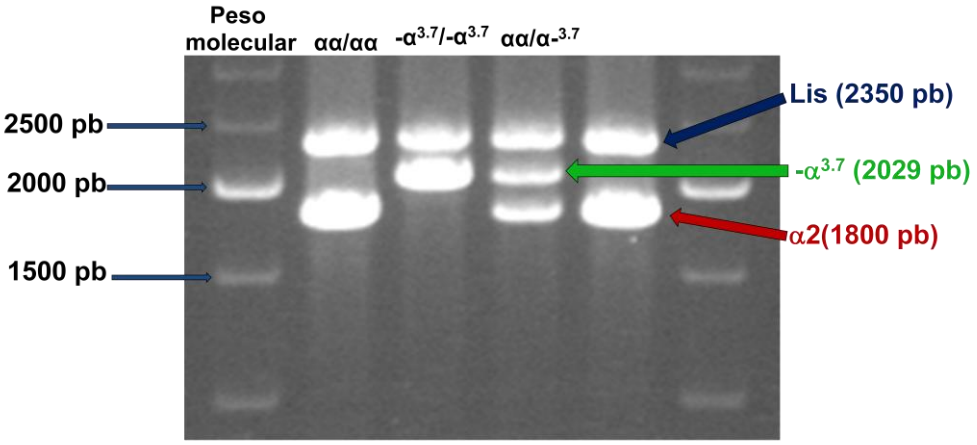


Figura 1: Fotografia do gel de agarose 1% contendo produtos da PCR Multiplex para genotipagem da alfa-talassemia. Nas canaletas 2, 3 e 4 estão amostras com os genótipos αα/αα, $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ e αα/$-\alpha^{3.7}$, respectivamente. Na canaleta 1 e 6 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 500 pares de base. As setas azul, verde e vermelha indicam, respectivamente, as bandas do gene controle LIS, deleção $-\alpha^{3.7}$ e do gene α2.

11.4 Apêndice 4 – Genotipagem dos haplótipos β^S

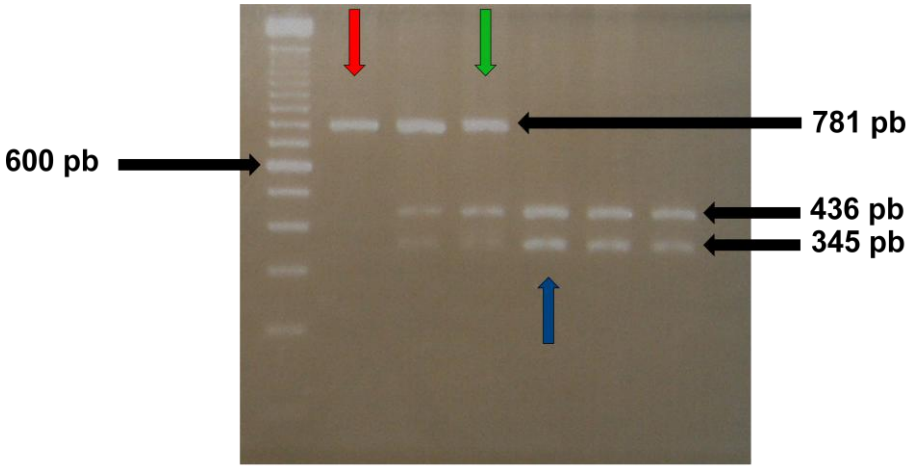


Figura 1: Fotografia do gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do gene $^{G}\gamma$, utilizado para determinação dos haplótipos do agrupamento de genes da β-globina. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pares de base. As setas vermelha, verde e azul indicam, respectivamente, sujeitos com os genótipos (-/-), (+/-) e (+/+) para o sítio de restrição da enzima HindIII.

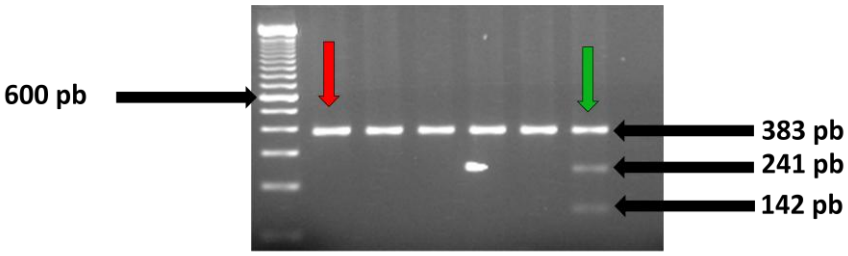


Figura 2: Fotografia do gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do gene 5´β, utilizado para determinação dos haplótipos do agrupamento de genes da β-globina. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pares de base. As setas vermelha e verde indicam, respectivamente, sujeitos com os genótipos (-/-) e (+/-) para o sítio de restrição da enzima HinfI.

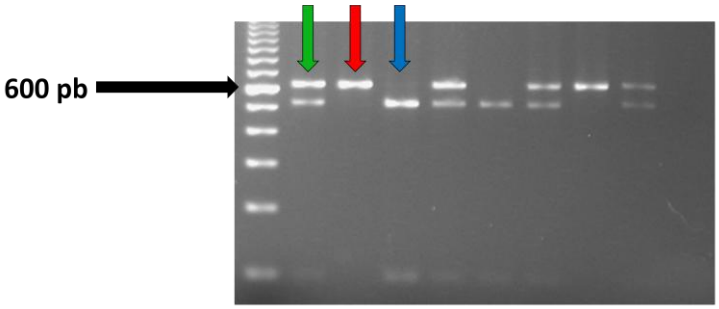


Figura 3: Fotografia do gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do gene 3´Ψβ, utilizado para determinação dos haplótipos do agrupamento de genes da β-globina. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pares de base. As setas vermelha, verde e azul indicam, respectivamente, sujeitos com os genótipos (-/-), (+/-) e (+/+) para o sítio de restrição da enzima HincII.

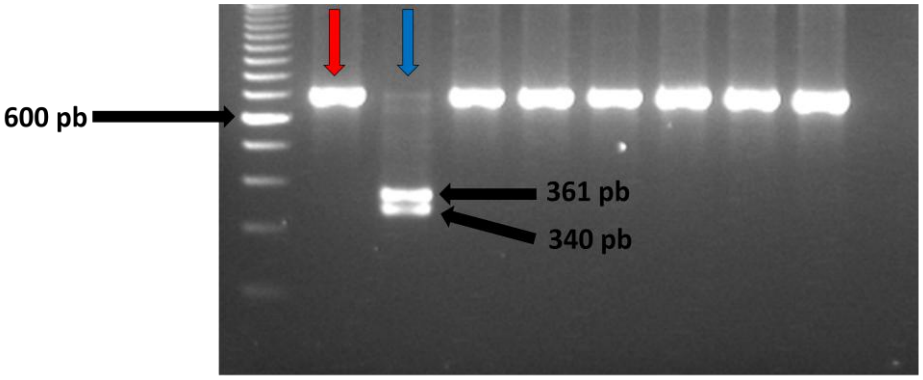


Figura 4: Fotografia do gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do gene Ψβ, utilizado para determinação dos haplótipos do agrupamento de genes da β-globina. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pares de base. As setas vermelha e azul indicam, respectivamente, sujeitos com os genótipos (-/-) e (+/+) para o sítio de restrição da enzima HincII.

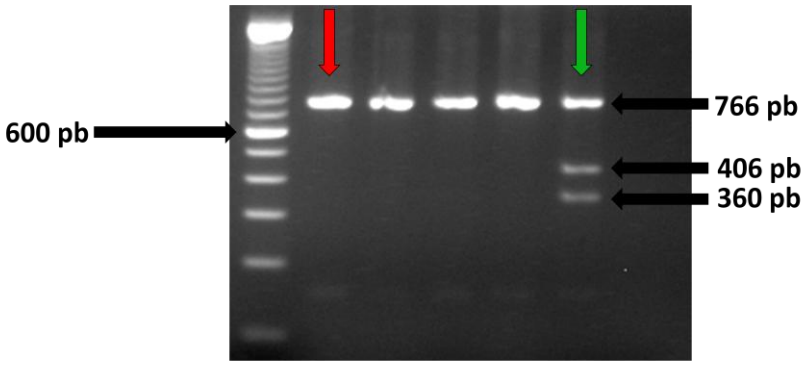


Figura 5: Fotografia do gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do gene $^{A}\gamma$, utilizado para determinação dos haplótipos do agrupamento de genes da β-globina. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pares de base. As setas vermelha e verde indicam, respectivamente, sujeitos com os genótipos (-/-) e (+/-) para o sítio de restrição da enzima HindIII.

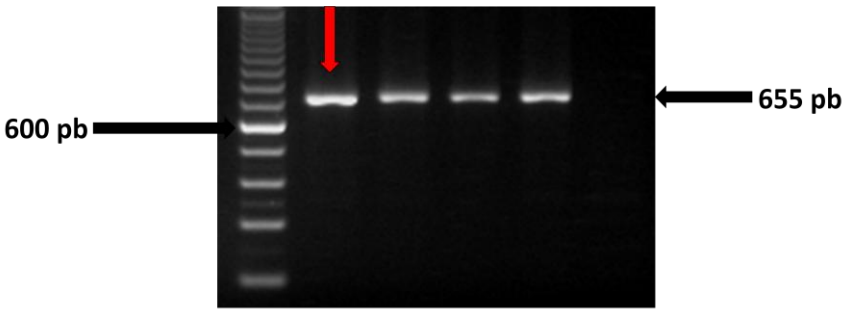


Figura 6: Fotografia do gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do gene $5'^{G}\gamma$, utilizado para determinação dos haplótipos do agrupamento de genes da β-globina. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pares de base. A seta vermelha indica um sujeito com os genótipos (-/-) para o sítio de restrição da enzima XmnI.

11.5 Apêndice 5 – Genotipagem do alelo β^S

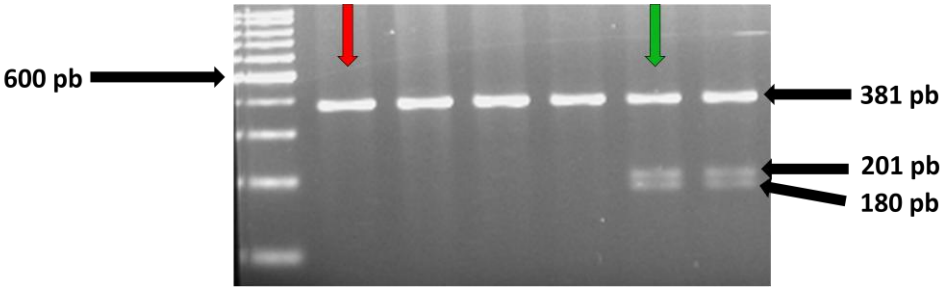


Figura 1: Fotografia do gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento do gene da β-globina. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pares de base. As setas vermelha e verde indicam sujeitos com os genótipos (-/-) e (+/-) para os sítios de restrição da enzima DdeI, caracterizando os genótipos SS e $S\beta^0$-tal, respectivamente.