



FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE BRASILEIRA  
DANIELA DE OLIVEIRA WERNECK RODRIGUES

**ANÁLISE DA COEXISTÊNCIA DA ALFA TALASSEMIA E IDENTIFICAÇÃO DE  
HAPLÓTIPOS DO CLUSTER DA BETA GLOBINA EM CRIANÇAS COM DOENÇA  
FALCIFORME**

**JUIZ DE FORA**

**2016**

**DANIELA DE OLIVEIRA WERNECK RODRIGUES**

**ANÁLISE DA COEXISTÊNCIA DA ALFA TALASSEMIA E IDENTIFICAÇÃO DE  
HAPLÓTIPOS DO CLUSTER DA BETA GLOBINA EM CRIANÇAS COM DOENÇA  
FALCIFORME**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, área de Concentração Saúde Brasileira, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Luiz Claudio Ribeiro  
Co-orientadora: Maria Teresa  
Bustamante Teixeira

Juiz de Fora

2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rodrigues, Daniela de Oliveira Werneck.

Análise da Coexistência da Alfa Talassemia e Identificação de Haplótipos do Cluster da Cadeia de Beta Globina em Crianças com Doença Falciforme / Daniela de Oliveira Werneck Rodrigues. -- 2016.

160 p. : il.

Orientador: Luiz Claudio Ribeiro

Coorientadora: Maria Teresa Bustamante Teixeira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2016.

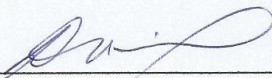
1. Principais haplótipos do cluster das cadeias de beta globina. I. Ribeiro, Luiz Claudio , orient. II. Teixeira, Maria Teresa Bustamante, coorient. III. Título.

DANIELA DE OLIVEIRA WERNECK RODRIGUES

**ANÁLISE DA COEXISTÊNCIA DA ALFA TALASSEMIA E IDENTIFICAÇÃO DE  
HAPLÓTIPOS DO CLUSTER DA BETA GLOBINA EM CRIANÇAS COM DOENÇA  
FALCIFORME**

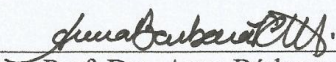
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, área de Concentração Saúde Brasileira, como requisito para obtenção do título de Doutor e aprovada em 20 de maio de 2016.

BANCA EXAMINADORA:



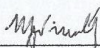
---

Prof. Dr. Luiz Claudio Ribeiro



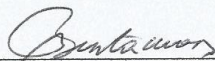
---

Prof. Dra. Anna Bárbara de Freitas Carneiro Proietti



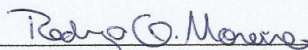
---

Prof. Dr. Marcos Alfredo Pimentel



---

Prof. Dra. Maria Teresa Bustamante Teixeira



---

Prof. Dr. Rodrigo de Oliveira Moreira

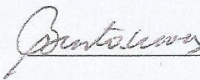
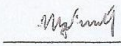
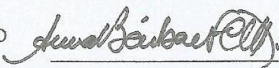
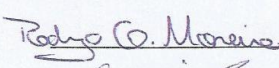
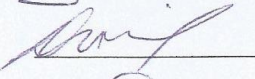
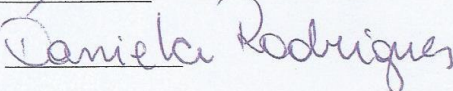
---



ATA N° \_\_\_\_\_

**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE – UFJF**

Aos vinte dias de maio de 2016, às 14h00min, realizou-se no Anfiteatro do NATES da UFJF, a defesa da Tese de Doutorado em Saúde – Área de Concentração em Saúde Brasileira intitulada: “Análise da Coexistência da Alfa Talassemia e Identificação de Haplótipos do Cluster da Beta Globina em Crianças com Doença Falciforme”, da doutoranda **Daniela de Oliveira Werneck Rodrigues**. A Banca Examinadora foi presidida pelo Professor Orientador Doutor Luiz Claudio Ribeiro / UFJF e constituída pelos Professores: Doutora Maria Teresa Bustamante Teixeira / UFJF, Doutor Marcos Alfredo Pimentel / UFJF, Doutora Anna Barbara de Freitas Carneiro Proietti / Fundação Hemominas e Doutor Rodrigo de Oliveira Moreira / UNIPAC. Às 14:00 horas o Presidente da Banca Examinadora, o Professor Doutor Luiz Claudio Ribeiro, abriu a sessão, instalou a Banca Examinadora e deu início aos trabalhos, passando a palavra para a doutoranda fazer a exposição oral. A seguir os membros da Banca Examinadora apresentaram suas considerações sobre o trabalho apresentado e emitiram a seguinte avaliação: **APROVADO (X), APROVADO COM MODIFICAÇÕES ( ), NÃO APROVADO ( )**. Nada mais havendo a tratar, eu, Luiz Claudio Ribeiro, presidente da Banca Examinadora, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada foi assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela doutoranda. Juiz de Fora, 20 de maio de 2016.

|   |  |                    |
|---|--|--------------------|
| Profª Drª Maria Teresa Bustamante Teixeira                        |  | CPF 568.600.307-63 |
| Prof. Dr. Marcos Alfredo Pimentel                                 |  | CPF 136.529.406-44 |
| Profª Drª Anna Barbara de Freitas Carneiro Proietti               |  | CPF 317.791.156-87 |
| Prof. Dr. Rodrigo de Oliveira Moreira                             |  | CPF 028.577.356-93 |
| Prof. Dr. Luiz Claudio Ribeiro<br>Presidente da Banca Examinadora |  | CPF 497.132.306-63 |
| Doutoranda: Daniela de Oliveira Werneck Rodrigues                 |  |                    |

**Dedico este trabalho aos meus pacientes com  
Doença Falciforme**

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar, não me deixar esmorecer e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos sem desanimar com as dificuldades.

Agradeço às minhas irmãs Cláudia e Renata, minhas sobrinhas Alice, Mariana e Raphaela e principalmente à minha mãe, Hortência, que sempre me motivaram, entenderam as minhas faltas e momentos de afastamento e reclusão. Ao meu pai, Nívio, que não viu fisicamente esta vitória, mas tenho certeza que estaria muito orgulhoso de mim.

Não tenho palavras para agradecer ao meu marido Sergio e à minha filha Luísa, com quem eu tenho muitos e muitos momentos de felicidade, meus companheiros nas horas boas e ruins, que ficam sentados comigo às noites me olhando trabalhar, que me fazem café para estudar, que fingem ser plateia para eu ensaiar, que me socorrem com o computador, que me tranquilizam dizendo: “calma, tudo vai dar certo!” e curtiram cada momento da aprovação do artigo.

Agradeço muito ao Luiz Claudio Ribeiro, meu orientador, que teve uma paciência infinita e a importância que teve e tem para mim não só na condução do trabalho, mas também como conselheiro e até nas horas em que parecia que nada estava dando certo e que eu precisava não só de um consolo, mas de um colo.

Agradeço às minhas amigas Gislaine Assis, Fernanda Kroger, Roberta Wolp e Jane Cintra, uma de mais longa data que compartilha comigo o “dom” de falar demais e que sei que torce diariamente por mim e as outras que apareceram na minha vida mais recentemente e que tem tudo a ver comigo e compartilham de vários momentos não só da vida acadêmica e ao meu amigo e “pai” Carlos Marcelino de Oliveira que sempre me incentivou a ser mais.

Agradeço à Maria Teresa Bustamante Teixeira, Teita, uma pessoa muito especial que tem doce no coração.

Ainda, quanto aos professores, agradeço à Anna Bárbara de Freitas Carneiro Proietti, minha mentora de longa data, pelos ensinamentos que passou desde o mestrado, projetos de extensão e atividades profissionais que foram, são e serão muito importantes para mim e para a minha vida profissional.

Agradeço à Marina Lobato Martins, chefe da Pesquisa da Fundação Hemominas, aos meus acadêmicos e bolsistas de iniciação científica: Lysla Cardoso Sudário, meu braço direito e esquerdo, Mônica de Albuquerque Costa, Felipe Affônseca Pedreira, Anuska Madruga de Oliveira Lagrotta Pittella e Irtis de Oliveira Fernandes Júnior, que trabalharam em todas as fases do estudo e que tornaram tudo isso possível.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro para a realização deste projeto.

Por último, agradeço à equipe da Fundação Hemominas que trabalha comigo e a todos os pacientes com Doença Falciforme por confiarem em mim.



*A meio caminho entre a fé e a crítica está a estalagem da razão.*

*A razão é a fé no que se pode compreender sem fé; mas é*

*uma fé ainda, porque compreender envolve*

*pressupor que há qualquer coisa compreensível.*

*(Fernando Pessoa)*

## RESUMO

**Introdução:** A doença falciforme (DF) é a doença hereditária monogênica mais comum no Brasil. O termo DF inclui Anemia Falciforme (AF) e condições patológicas em que o gene da hemoglobina S está associado a outras hemoglobinopatias hereditárias, tais como SC, S/beta<sup>0</sup> e S/beta<sup>+</sup> talassemia (S/b), SD Punjab, entre outras. Há descrição de 5 haplótipos do cluster da cadeia globina ( $\beta^S$ ) ligados à HbS: Asiático, Senegal, Benin, Bantu (CAR) e Camarões. A DF pode ainda coexistir com as  $\alpha$ -talassemias ( $\alpha$ -Tal). A complicação mais severa na DF é o Acidente Vascular Encefálico (AVE), responsável por 20% da mortalidade. As causas e fatores que aumentariam o risco de AVE não são completamente conhecidos. Várias linhas de evidência sugerem que uma assinatura genética poderia influenciar o desenvolvimento de AVE. **Objetivos:** Determinar a frequência de DF, investigar a coexistência da  $\alpha$ -Tal, identificar os haplótipos e estudar as associações entre estes determinantes genéticos com AVE em crianças triadas pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas na Hemominas de Juiz de Fora. **Metodologia:** Foi realizada uma coorte retrospectiva, na qual foram incluídas as crianças nascidas entre 1998 a 2007, com diagnóstico confirmado de DF. Foram considerados para inclusão no estudo, crianças com Anemia Falciforme (AF), SC, S/b<sup>0</sup> e S/b<sup>+</sup>. As informações clínicas e laboratoriais foram extraídas dos prontuários médicos até 31 de dezembro de 2013 permitindo um acompanhamento de no mínimo cinco anos. O perfil socioeconômico foi obtido através da aplicação do questionário do Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira. A determinação dos haplótipos e a presença da  $\alpha$ -Tal foi realizada por reação em cadeia da polimerase e polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição. A análise estatística das associações foi feita com aplicação do teste Qui-quadrado considerando-se um nível de significância de 5%, no programa SPSS Statistics<sup>®</sup> 14.0. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Hemominas. **Resultados:** Entre 1998 e 2007, foram

triadas 188.916 crianças nascidas na região da Zona da Mata Mineira e Vertentes, 110 crianças com DF preencheram os critérios de inclusão e constituíram a população deste estudo. Entre as crianças com DF, 60% eram portadoras de AF. A prevalência da coexistência com o  $\alpha$ -Tal foi de 30,3% e o haplótipo Bantu (CAR) foi identificado em 89,2%. A incidência de AVE foi significativamente maior nas crianças com AF (27,3% *versus* 2,3%;  $p = 0,001$ ) e no sexo masculino (24,1% *versus* 9,6%;  $p = 0,044$ ). A presença do  $\alpha$ -Tal ( $p = 0,196$ ), do haplótipo CAR ( $p = 0,543$ ) e fatores socioeconômicos não foram significativamente associadas à ocorrência de AVE. **Conclusões:** As crianças com AF tem 12 vezes mais risco de ter AVE do que as que têm outros tipos de DF. A incidência de AVE no sexo masculino foi maior. Coexistência de  $\alpha$ -Tal ou haplótipos CAR não apresentaram associação significativa com AVE. A heterogeneticidade entre as populações previamente avaliadas e a não reprodutibilidade entre estudos indicam a necessidade de realização de novas pesquisas para verificar o papel desses fatores genéticos em crianças com DF.

Palavras chave: Anemia Falciforme, Acidente Vascular Cerebral, Haplótipos,  $\alpha$ -Talassemia

## ABSTRACT

**Introduction:** Sickle cell disease (SCD) is the most common monogenic hereditary disease in Brazil. The term SCD includes sickle cell anaemia and pathological conditions in which the S haemoglobin gene is associated with other hereditary hemoglobinopathies, as SC, S/beta<sup>0</sup> and S/beta<sup>+</sup> thalassemia (S/b), SD Punjab, among others. Five different types of beta globin chain ( $\beta^S$ ) cluster haplotypes linked to HbS have been described: Asian, Senegalese, Benin, Bantu (CAR) and Cameroon. SCD can also coexist with alpha thalassemia ( $\alpha$ -Tal). The most severe complication on SCD is stroke, which is responsible for 20% of mortality. The causes and factors that could increase the risk of stroke are not completely known. Many lines of research suggest that a genetic signature could influence the occurrence of stroke. **Objective:** Determine the frequency of SCD, identify the haplotypes and study the associations between these genetic determinants and stroke in children screened by the Minas Gerais' State Program of Neonatal Screening and followed-up in Fundação Hemominas in Juiz de Fora. **Methods:** A retrospective cohort was established, in which were included children born between 1998 and 2007, with confirmed diagnosis of SCD. Children with sickle cell anaemia, SC, S/b<sup>0</sup> and S/b<sup>+</sup> were included. The clinical and laboratorial information were extracted from medical records until December 31<sup>st</sup>, 2013, allowing a follow-up of at least five years. The socioeconomic profile was obtained by applying the Anísio Teixeira National Institute of Studies and Educational Research questionnaire. The haplotype determination and presence of  $\alpha$ -Tal was documented through the usage of polymerase chain reaction and restriction fragments length polymorphisms. The statistical analysis of such associations was performed by application of the chi-square test considering a level of significance of 5%, with SPSS Statistics<sup>®</sup> 14.0 program. The project was approved by Fundação Hemominas's Research Ethics Committee. **Results:** Between 1998 and 2007, 188,916 children were screened in Minas Gerais' Zona da Mata e Vertentes region, 110 children with SCD fulfilled the inclusion

criteria and composed the population of this study. Among children with SCD, 60% were carriers of sickle cell anemia. The prevalence of coexistence with  $\alpha$ -Tal was 30.3% and the Bantu (CAR) haplotype was identified in 89.2%. The incidence of stroke was significantly higher in children with sickle cell anemia (27.3% *versus* 2.3%;  $p = 0.001$ ) and in the male gender (24.1% *versus* 9.6%;  $p = 0.044$ ). Presence of  $\alpha$ -Tal ( $p = 0.196$ ), CAR haplotype ( $p = 0.543$ ) and socioeconomic factors were not significantly associated with the occurrence of stroke. **Conclusion:** Children with sickle cell anemia have 12 times increased risk of having a stroke than patients with other types of SCD. The incidence of stroke in the male gender was higher. Coexistence with  $\alpha$ -Tal and CAR haplotype were not significantly associated with stroke. Heterogeneity between previously assessed populations and non reproducibility among studies indicate the need to conduct further research to determine the role of these genetic factors in children with SCD.

Keywords: sickle cell anemia, stroke, haplotypes, alpha thalassemia

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

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

Figura 2 – Incidência da doença falciforme em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde. Programa Estadual de Triagem Neonatal – Minas Gerais.

Figura 3 - Pontos de referência para insonação dos segmentos arteriais no Polígono de Willis

Figura 4 - Região de origem e abrangência dos três principais haplótipos  $\beta$ S africanos e um Asiático.

Figura 5- Unidades da Fundação Hemominas que atendem Portadores De Doença Falciforme em Minas Gerais, com destaque para Juiz De Fora.

Figura 6 - Fluxograma da seleção amostral na população estudada.

Figura 7- Principais haplótipos do cluster da cadeia de beta globina 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  $\gamma$ ,  $\psi\beta$ , 3' $\psi\beta$  e 5' $\beta$ .



## LISTA DE TABELAS

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

Tabela 2 - Principais alterações moleculares das hemácias em consequência do fenômeno de Falcização.

Tabela 3 - Manifestações clínicas da doença falciforme de acordo com o principal componente fisiopatológico.

Tabela 4 - Características gerais encontradas nos haplótipos clássicos da anemia falciforme.

Tabela 5 - Efeitos da  $\alpha$ -Tal em propriedades reológicas das hemácias.

## LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

$\alpha$  – alfa

$\alpha$ -Tal – talassemia alfa

$\beta$  – beta

$\gamma$  – gama

$\delta$  – delta

$\varepsilon$  – épsilon

$\delta$  – zeta

$\mu$ l – microlitros

$\mu$ M – micromolar

°C – Graus Celsius

A – Adenina

ACI - Artéria Carótida Interna

ACM – Artéria Cerebral Média

AVE - Acidente Vascular Encefálico

AF- Anemia Falciforme

ANGIORM- Angioressonância Magnética

Ben – Benin

BH - Belo Horizonte

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

C - Citosina

Ca<sup>++</sup> - 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

CEHMOB - Centro de Educação e Apoio para Hemoglobinopatias

cm/s – centímetros por segundo

CSSCD - Estudo Cooperativo para Doença Falciforme

DCV - Doença cerebrovascular

DF – Doença Falciforme

DNA - Desoxirribonucleic acid - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - deoxynucleotide triphosphate - desorribonucleotídeo trifosfatado

DRS - Diretoria Regional de Saúde

DTC – Doppler transcraniano cerebral

EDTA - EthyleneDiamineTetrAcetic acid - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA - Estados Unidos da América

FCP- Fcell production – Produção de células F

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

fL – fentolitros

G – guanina

g - gramas

g/dL – gramas por decilitro

Glu – ácido glutâmico

Haplótipos  $\beta$ S - haplótipos do agrupamento de genes da  $\beta$ S -globina

Hb - Hemoglobina

Hb A – Hemoglobina A

Hb AA - Genótipo homocigoto para hemoglobina A

Hb A2 - Hemoglobina A2

Hb AS - Traço falcêmico ou traço falciforme

Hb C - Hemoglobina C

Hb F - Hemoglobina Fetal

Hb S - Hemoglobina S

Hb SS –Genótipo homocigoto 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 – Hidroxiúria

IGF- Insulin-like Growth Factor

IGFBP - Insulin-like Growth Factor Binding Protein

IC – Intervalo de confiança

IEF - Isoelectric focusing - Eletroforese por Focalização Isoelétrica  
INEP Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira  
JFO – Hemominas Juiz de Fora  
LCR - Locus control region – Região controladora do locus  
MG - Minas Gerais  
MgCl<sub>2</sub> – 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  
PNTN Programa Nacional de Triagem Neonatal  
Pu – Purines – Purinas  
Py – Pyrimidines - Pirimidinas  
Retic – Contagem de reticulócitos  
RFLP - restriction fragment length polymorphism - polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição  
RM- Ressonância Magnética  
RR – Risco relativo  
Sβ + -talassemia - Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobina S β + -talassemia  
Sβ 0 - talassemia - Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobina S e Sβ 0 - talassemia  
SC – Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobinas S e C  
SDS – Sodium Dodecylsulphate – Dodecil Sulfato de Sódio  
SEA - Sequestro Esplênico Agudo  
Sen – Senegal

SM – Salário Mínimo

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

Unidade UFC - Universidade Federal do Ceará

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

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

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 APRESENTAÇÃO.....   | 23 |
| 2 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....   | 25 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA.....  | 27 |
| 3.1 HEMOGLOBINA.....  | 27 |
| 3.2 DOENÇA FALCIFORME: ASPECTOS CONCEITUAIS E MOLECULARES.....  | 30 |
| 3.3 ANEMIA FALCIFORME.....  | 31 |
| 3.4 PRINCIPIOS MOLECULARES DOS PROCESSOS DE FALCIZAÇÃO<br>VASOCLUSÃO E INFLAMAÇÃO NA ANEMIA FALCIFORME..... | 36 |
| 3.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA FALCIFORME.....  | 39 |
| 3.6 DOENÇA CEREBROVASCULAR E ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....  | 42 |
| 3.7 DOPPLER TRANSCRANIANO.....  | 45 |
| 3.8 HAPLÓTIPOS.....   | 49 |
| 3.9 ALFA-TALASSEMIA.....  | 57 |
| 3.10 PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL.....  | 62 |
| 4 OBJETIVOS.....  | 67 |
| 4.1 OBJETIVOS GERAIS.....   | 67 |
| 4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....  | 67 |
| 5 METODOLOGIA.....  | 67 |
| 5.1 DESENHO E LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....  | 67 |
| 5.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA E METODOLOGIA DE<br>SELEÇÃO.....                                   | 68 |
| 5.3 ANÁLISE SOCIOECONÔMICA.....   | 71 |
| 5.4 ANÁLISE LABORATORIAL.....   | 72 |



|  |     |
|--|-----|
|  | 21  |
| 5.5 VARIÁVEL CLÍNICA DE DESFECHO.....                        | 78  |
| 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                 | 80  |
| 5.7 ASPECTOS ÉTICOS.....                                     | 81  |
| 5.8 FINANCIAMENTO.....                                       | 81  |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO                                     |     |
| (APRESENTADOS COMO ARTIGO ORIGINAL) .....                    | 83  |
| 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                  | 102 |
| REFERÊNCIAS.....   | 105 |
| ANEXOS.....  | 118 |
| A – METODOLOGIA DA COLETA PARA O TESTE DO PEZINHO NUPAD UFMG | 119 |
| B – DOCUMENTO COM RESULTADO DA TRIAGEM NEONATAL              | 121 |
| C – FICHA DE PRIMEIRA CONSULTA                               | 122 |
| D – FICHA DE CONTRA-REFERÊNCIA                               | 123 |
| E – TERMO DE COOPERAÇÃO MÚTUA UFJF/HEMOMINAS                 | 124 |
| F – PARECER COMITE DE ÉTICA E PESQUISA DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS | 128 |
| G – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA JORNAL DE PEDIATRIA      | 129 |
| H – CARTA DE ACEITE DO ARTIGO                                | 136 |
| I – AVALIAÇÃO DA TRIAGEM NEONATAL PARA DOENÇA FALCIFORME E   | 137 |
| OUTRAS HEMOGLOBINOPATIAS: DO DIAGNÓSTICO NA ATENÇÃO BÁSICA   |     |
| À SAÚDE AO TRATAMENTO NA REDE PÚBLICA ESTADUAL – UMA         |     |
| ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E SOCIAL – HEMOCENTRO        |     |
| REGIONAL DE JUIZ DE FORA: PASSADO E PRESENTE DA DOENÇA       |     |
| FALCIFORME (ARTIGO)  |     |
| J-RETINOPATIA PROLIFERATIVA EM PACIENTE COM ANEMIA           | 140 |
| FALCIFORME: RELATO DE CASO”(ARTIGO)                          |     |

|  |     |
|--|-----|
| APÊNDICES.....                                     | 154 |
| A – FICHA DE REGISTRO DE PRONTUÁRIO E QUESTIONÁRIO |     |
| SOCIOECONÔMICO.....                                | 155 |
| B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E                 |     |
| ESCLARECIDO.....                                   | 158 |
| C–INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS.....              | 159 |

## 1 APRESENTAÇÃO

A presente tese tem como tema a análise da coexistência da alfa talassemia e identificação de haplótipos do cluster da cadeia de beta globina em crianças com diagnóstico de Doença Falciforme (DF), realizado através do Programa de Triagem Neonatal do Estado de Minas Gerais, através do Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Faculdade de Medicina da UFMG entre 1998 a 2007 e assistidas na Fundação Hemominas, no município de Juiz de Fora – Minas Gerais. As variáveis consideradas na análise foram: tipo de DF, sexo, presença ou ausência da mutação para o gene da  $\alpha$ -Tal, identificação do haplótipo, concentração relativa de hemoglobina fetal no lisado de Hemácias, características socioeconômicas (escolaridade do cuidador e renda familiar) e a presença de acidente vascular encefálico. Trata-se de uma pesquisa desenvolvida no âmbito do Núcleo de Assessoria e Treinamento em Educação e Saúde – NATES, no Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora.

Segundo o regimento deste Programa, é necessário que pelo menos um artigo tenha sido aceito ou publicado em revistas indexadas para a defesa da tese (Anexos G e H). No momento do término da coleta e de posse dos dados relativos às características dos pacientes, optamos por submeter um artigo baseado na análise dos determinantes genéticos estudados e manifestações clínicas neurológicas, denominado “**Determinantes genéticos e acidente vascular encefálico em crianças com doença falciforme**”. O que nos motivou a realizar tal artigo foi verificar se os haplótipos da cadeia de beta globina e a coexistência da alfa talassemia teriam um papel modulador positivo ou negativo para a ocorrência de acidente vascular encefálico (AVE) em crianças com Doença Falciforme. Este conhecimento pode ser usado para uma melhor orientação, entendimento das características clínicas e da evolução das crianças com doença falciforme. São apresentados ainda mais 2 artigos: “**Avaliação da**

**triagem neonatal para Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias: do diagnóstico na Atenção Básica à Saúde ao tratamento na rede Pública Estadual – Uma análise epidemiológica, clínica e social – Hemocentro Regional de Juiz de Fora: passado e presente da doença falciforme”**, publicado revista GERAIS: Revista de Saúde Pública do Sus/Mg, v. 1, n.1, p.135-137,Jul/Dez.2013 (Anexo I) e o artigo **“Retinopatia proliferativa em paciente com Anemia Falciforme: relato de caso”**, publicado na HU Revista, revista oficial da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, v. 41, n. 3 e 4, p. 129-135,Jul./Dez. 2015 (Anexo J).

A estrutura da tese foi composta por uma introdução que contém os aspectos gerais, onde são abordadas as principais questões relacionadas à Doença Falciforme. Segue-se uma justificativa para o estudo, com ênfase na necessidade do desenvolvimento de pesquisas vinculadas aos serviços de saúde, que possibilitem uma melhor compreensão acerca da doença. Posteriormente, foram apresentados os objetivos considerados e a metodologia adotada. Os resultados e a discussão da pesquisa foram apresentados sob a forma do artigo **“Determinantes genéticos e acidente vascular encefálico em crianças com doença falciforme”** submetido em 28 de novembro de 2015 e aceito em 14 de março de 2016 no Jornal de Pediatria, com previsão de publicação para número 6 (Nov. /Dez. 2016) volume 92, ISSN 1678-4782. Ao término, foram tecidas as considerações finais, contendo as reflexões e recomendações com base no estudo realizado, seguidas das referências bibliográficas da tese, apêndices e anexos.

As bolsas de iniciação científica (BIC) para os estudantes de graduação envolvidos, a bolsa de apoio técnico à pesquisa (BAT) e todo o material de laboratório utilizado no desenvolvimento do estudo, tais como, kits de extração de DNA, reagentes para PCR, enzimas de restrição foram adquiridos com recursos do Edital do Programa Pesquisa para o SUS - PPSUS via Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

sob o número CDS- APQ-01431-10. Todos os exames laboratoriais e genéticos foram realizados no Setor de Laboratório de Pesquisa da FUNDAÇÃO HEMOMINAS.

## **2 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

Doença Falciforme (DF) é um termo genérico usado para determinar um grupo de alterações genéticas caracterizadas pela presença da hemoglobina S (HbS). Essas alterações incluem a Anemia Falciforme, as duplas heterozigoses, ou seja, as associações de HbS com outras variantes de hemoglobinas, tais como, HbD, HbC, e as interações com as talassemias. A anemia falciforme (AF), uma doença hereditária causada por uma única mutação no gene da  $\beta$ -globina, produz uma diversidade de expressões fenotípicas nos pacientes acometidos (SERJEANT,1997). A AF é a forma mais grave de apresentação da doença falciforme e para que a doença se manifeste assim é necessário que ocorra uma homozigose dos alelos  $\beta^S$  no gene responsável pela síntese da cadeia  $\beta$  da hemoglobina, conferindo a formação da hemoglobina SS (HbSS). A HbSS em condições adversas, como a baixa oxigenação, a acidose metabólica ou a desidratação, se polimeriza o que faz com que a hemácia altere sua forma de maneira irreversível desencadeando uma oxigenação ineficiente e toda a complexa fisiopatologia da doença. (SAMARAH 2009; GONÇALVES, 2003; OKUMURA, 2013)

As cadeias de alterações que ligam o defeito molecular às manifestações clínicas nos pacientes com DF devem ser analisadas 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 a grande variabilidade clínica observada. Os principais fatores que podem influenciar o fenótipo da DF 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. polimorfismos nas moléculas celulares de adesão vascular 1 (VCAM 1);
- 4 . níveis de Hemoglobina Fetal (HbF);
5. 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).

Entre os fatores genéticos que explicam a variabilidade da expressão clínica da DF estão a co-herança de  $\alpha$ -Talassemia ( $\alpha$ -Tal) e os haplótipos do agrupamento de genes da  $\beta$ S-globina (Haplótipos  $\beta$ S) (NAGEL, 2005; STEINBERG, 2005; STEINBERG, 2009). Estes dois fatores foram analisados neste estudo associando-os a presença de doença cerebrovascular, tipo acidente vascular encefálico (AVE). O AVE é uma das mais sérias complicações e ocorre em aproximadamente 11% dos pacientes com doença falciforme até os 20 anos de idade (OHENE-FREMPONG et al., 1998).

A relação entre a interação de  $\alpha$  -Tal e os aspectos clínicos e hematológicos de pacientes portadores da AF é uma área pouco explorada no estado de MG, com trabalho realizado em 2010 por Belisário. Os estudos populacionais sobre os haplótipos  $\beta$ S em pacientes com AF realizados no Brasil nos últimos anos identificaram características próprias quanto à frequência dos diferentes haplótipos, refletindo a origem do fluxo de escravos africanos recebidos na época do Brasil colônia. Os estudos que avaliaram a relação entre os haplótipos  $\beta$ S e os aspectos clínicos e hematológicos dos pacientes com AF são controversos. 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; GONÇALVES et al., 1994; FIGUEIREDO et al., 1996; LYRA et al., 2005), no Rio de Janeiro (FLEURY, 2007) e em



Belo Horizonte (BELISÁRIO, 2010) mostraram uma grande prevalência de indivíduos homocigotos para o haplótipo CAR e Benin no sudeste brasileiro.

A Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (HEMOMINAS) via Serviço de Pesquisa e outras instituições tais como a Universidade Federal de Juiz de Fora através projetos de cooperação mútuos previstos (Anexo E) propõem-se a realizar pesquisas que possam melhorar a qualidade do atendimento aos pacientes com a aplicação de resultados na abordagem e manejo de doenças genéticas.

O ambulatório de Hemoglobinopatias da Fundação HEMOMINAS Juiz de Fora é referência na região da Zona da Mata e vertentes para o atendimento e acompanhamento dos pacientes com Doença Falciforme (DF). Estão cadastrados no ambulatório aproximadamente 1.000 pacientes com hemoglobinopatias, que são atendidos e orientados por uma equipe multidisciplinar composta por médicos, enfermeiros, psicólogo, assistente social, dentista, dentre outros, garantindo uma abordagem ampla para estes pacientes portadores de uma enfermidade tão complexa.

O presente estudo 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.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Hemoglobina**

Nos seres humanos o transporte de oxigênio para os tecidos é realizado por pigmentos respiratórios localizados no interior dos glóbulos vermelhos. Estes pigmentos são

denominados hemoglobinas (Hb) que transportam o oxigênio de forma mais eficiente do que as proteínas plasmáticas encarregadas dessa função em alguns animais menos complexos (RAMALHO, 2000). A produção da hemoglobina é controlada por transmissão genética.

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 ( $\delta$ ,  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ ) está localizado no cromossomo 16, e o agrupamento de genes da globina beta ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $A$ ,  $\delta$  e  $\beta$ ) está localizado no cromossomo 11. 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 A2 ( $\alpha 2\delta 2$ ) 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 crianças nasçam com formas mais graves destas doenças a cada ano. A Tabela 1 mostra a frequência gênica aproximada de algumas hemoglobinopatias, classificadas por regiões da Organização Mundial de Saúde (OMS).

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

| <b>Regiões de OMS</b> | <b>HbS</b> | <b>HbC</b> | <b>HbE</b> | <b><math>\beta</math>-Tal</b> | <b><math>\alpha^0</math>-Tal</b> | <b><math>\alpha^+</math>-Tal</b> |
|-----------------------|------------|------------|------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 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

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  $\alpha$  ou  $\beta$  (WENNING et al., 2000; WEATHERALL E CLEGG, 2001). As hemoglobinopatias são responsáveis pela maioria das doenças genéticas letais (MODELL e BULYZHENKOV, 1988).

Em determinadas circunstâncias, alguns indivíduos herdam genes anormais que determinam a síntese de moléculas de hemoglobinas com alterações das estruturas químicas. Essas alterações, com alguma frequência são capazes de modificar o comportamento funcional da hemoglobina. As alterações da estrutura e da função da Hb podem produzir alterações das hemácias que, por sua vez, podem afetar a captação, o transporte e a liberação do oxigênio para os tecidos do organismo (SOUZA, 2006).

### 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  $\beta$  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  $\beta$ - 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  $\beta$ -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).

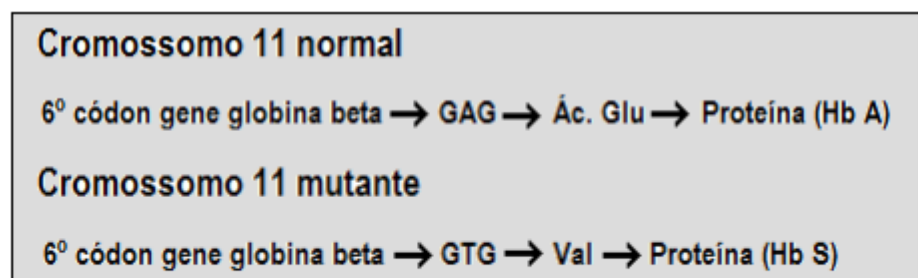


Figura 1 – Representação esquemática da mutação gênica responsável pela Hb S

Quando um alelo  $\beta$  S coexiste com um alelo causador de  $\beta$ -Talassemia ( $\beta$ -Tal – diversos alelos mutantes do gene da  $\beta$ -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  $\beta$ -Tal (STEINBERG, 2008). Quando o alelo  $\beta$ -talassêmico coexistente causa a completa inativação do gene  $\beta$ , a doença falciforme resultante é conhecida como  $S\beta^0$ -Talassemia ( $S\beta^0$ -Tal) e a gravidade clínica tende a ser semelhante à da anemia falciforme (Hb SS) (SERJEANT et al., 1979). Entretanto, quando o alelo  $\beta$ -talassêmico coexistente causa a diminuição da transcrição do gene  $\beta$ , 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).

### **3.3 Anemia Falciforme**

A Anemia Falciforme, como já descrito, é uma hemoglobinopatia de caráter genético, originada por uma mutação do cromossomo 11 (NAOUM, 2000) que resulta na substituição de um ácido glutâmico pela valina na posição 6 da extremidade N-Terminal na cadeia Beta ( $\beta$ ) de globina, dando origem a hemoglobina S, hemoglobina anormal, que irá substituir a hemoglobina A, hemoglobina normal. Essa substituição faz com que os eritrócitos, cujo conteúdo predominante é a HbS adquiram em condições de hipóxia forma semelhante à de uma foice – originando o nome falciforme – decorrente da polimerização da HbS (SERJEANT, 1997; COSTA, 2006).

Os eritrócitos em forma de foice não circulam adequadamente na microcirculação, resultando tanto em obstrução do fluxo sanguíneo capilar como em sua própria destruição precoce. Esse mecanismo fisiopatológico acarreta graves manifestações clínicas, com maior frequência após três meses de idade (SERJEANT, 1997). Durante os seis primeiros meses de vida esses indivíduos são, geralmente, assintomáticos devido aos altos níveis de HbF (Hemoglobina fetal) no sangue (GÓMEZ, 2003).

Estudos antropológicos associados às análises biomoleculares sugerem que o gene anormal para a síntese de HbS pode ter ocorrido entre os períodos Paleolítico e Mesolítico, aproximadamente entre 50 e 100 mil anos atrás, nas regiões centro-oeste da África, Índia e Leste da Ásia. A causa que motivou a mutação do gene da hemoglobina normal (HbA) para o gene HbS ainda permanece desconhecida. A origem da HbS foi multi-regional, atingindo populações com diferentes características genéticas. Sabe-se também que estudos realizados em populações africanas mostraram que a expansão do gene da HbS se deu efetivamente no período Pré-Neolítico entre 10 mil e 2 mil anos antes de Cristo, e foi marcada pela miscigenação entre os povos da região do Saara. Acredita-se que exista uma relação entre a transmissão da malária e a dispersão das hemoglobinopatias. (FERREIRA et al, 2011). No período Neolítico (3000 a 500 anos a.C.) iniciou-se a transmissão da malária causada pelo *Plasmodium falciparum* provavelmente da região que hoje corresponde à Etiópia. Destaca-se durante esse período um aumento do processo migratório, o assentamento de grupos populacionais e o estabelecimento de grandes centros de civilização no vale do Rio Nilo, bem como na Mesopotâmia, Índia e sul da China. Foi no continente africano que a malária se propagou da costa oriental para a costa ocidental formando uma faixa coincidente com a alta prevalência da HbAS. Esse fato levou Allison, em 1954, a estabelecer uma relação entre o efeito protetivo da HbS em portadores heterozigotos (HbAS) frente ao desenvolvimento da malária causada pelo *Plasmodium falciparum* (NAOUM, 1997).

Imagina-se que a disseminação das hemoglobinopatias iniciou-se com a desertificação do Saara ocorrida no período Neolítico posterior (2000 a 500 anos a.C), pois desta maneira suas populações foram obrigadas a migrar para outras regiões da África, atingindo aquelas banhadas pelo mar Mediterrâneo, o que facilitou sua introdução no continente Europeu notadamente ao sul da Itália e Grécia. Já no período Medieval, entre os séculos XIV e XV, o gene da HbS se expandiu para o leste e sudeste europeu (JACKSON, 1986). Entretanto a introdução da HbS nas Américas e no Brasil se deu com maior intensidade entre os séculos XVI e XIX motivado pelo tráfico de escravos africanos (NAOUM, 1983).

A primeira descrição na literatura médica de um caso clínico de Anemia Falciforme deveu-se à observação de hemácias alongadas e em forma de foice no esfregaço sanguíneo de Walter Clement Noel, jovem negro, originado de Granada (Índias Ocidentais), estudante do primeiro ano do Chicago College Of Dental Surgery, admitido no Presbyteriam Hospital com anemia, em 1910, por James Herrick, embora exista a controvérsia de que a patologia ocasionada pela presença de HbS muito provavelmente foi descrita pela primeira vez por Cruz Jobim no Rio de Janeiro em 1835 (RAMALHO, 1986). Em 1917, Emmel observou a transformação da hemácia na sua forma original, bicôncava, para a forma de foice, *in vitro*, e em 1922, o termo anemia falciforme foi utilizado por Manson. Dez anos mais tarde, Hanh e Gillepsie descobriram que a falcização dos eritrócitos ocorria como consequência da exposição das células à uma baixa tensão de oxigênio. E em 1947, Accioly, no Brasil, pela primeira vez sugeriu que a falcização ocorria por uma herança autossômica dominante, mas apenas em 1949, através de Neel e Beet, é que se definiu a doença somente em estado de homozigose, sendo os heterozigotos portadores assintomáticos (FIGUEIREDO, 1993).

Ainda em 1949, Linus Pauling e colaboradores, demonstraram que havia uma diferente migração eletroforética de Hb em pacientes com Anemia Falciforme quando em comparação com a Hb de indivíduos normais. Posteriormente, Ingram (1956) elucidou a

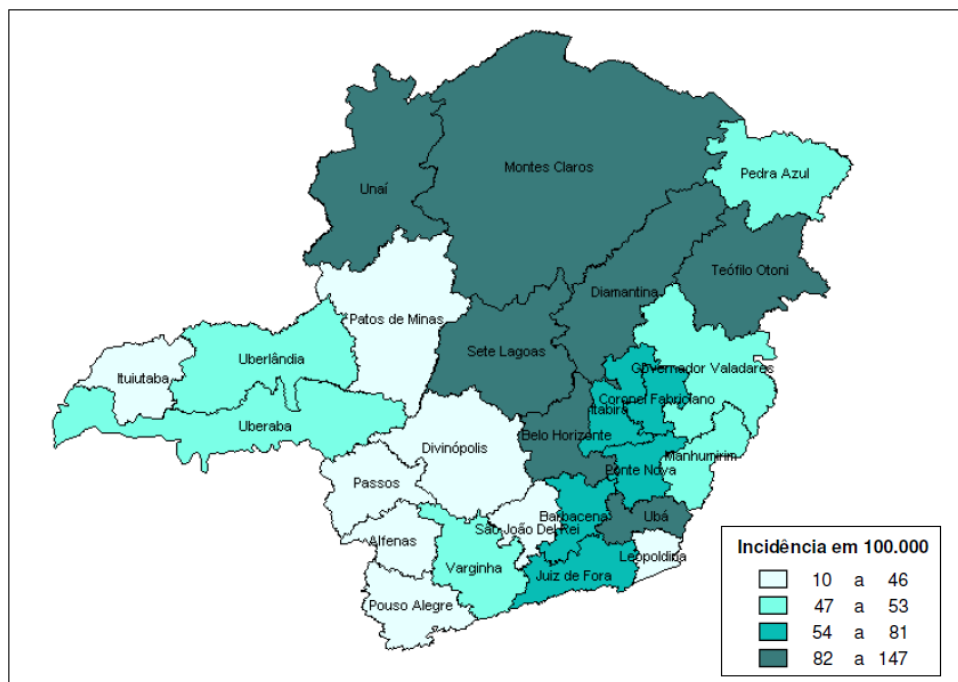
natureza bioquímica dessa doença, quando, através de um processo de fingerprint (eletroforese bidimensional associada com cromatografia), fracionou a Hb e estudou seus peptídeos. Em 1978, com os estudos de Kan e Dozy, foi dado novo impulso ao estudo de HbS, com a introdução de técnicas de biologia molecular (NAOUM, 1997). A mutação no gene da Hemoglobina humana na posição responsável pela Anemia Falciforme foi o primeiro a ser amplificado pelo PCR em 1985 (SAIKI, 1985).

A anemia falciforme é a doença hereditária monogênica mais comum do Brasil, ocorrendo, predominantemente, mas não exclusivamente, em afrodescendentes (DI NUZZO e FONSECA, 2004; CANÇADO e JESUS, 2007). O Ministério da Saúde estima 25.000 a 30.000 casos prevalentes de indivíduos com anemia falciforme no país e a incidência de 3.500 novos casos a cada ano (nascimento de uma criança com anemia falciforme para cada 1.000 recém-nascidos vivos).

A distribuição do alelo da Hb S no Brasil é bastante heterogênea. Estudos pontuais em diversas regiões do Brasil têm demonstrado essa distribuição. No estado da Bahia, em populações do Recôncavo Baiano, a prevalência de homozigotos (Hb SS) foi de 1,24% (SILVA et al., 2006), sendo que na cidade de Salvador a prevalência estimada da anemia falciforme foi 0,2% (ADORNO et al., 2005). No Distrito Federal, a prevalência da anemia falciforme foi de 0,09% (DINIZ et al., 2009). Na cidade de Natal, Rio Grande do Norte, a prevalência da anemia falciforme foi de 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  $\beta$ S, entre heterozigotos e homozigotos (DAUDT et al., 2002). 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



0,01% para anemia falciforme (BRANDALISE et al., 2004). As diferentes prevalências desta hemoglobinopatia, nas diferentes regiões, refletem a diversidade de origens raciais e os variados graus de miscigenação presentes no Brasil (SOMMER et al., 2006). Estima-se o nascimento de uma criança com anemia falciforme para cada 2.500 recém-nascidos vivos no estado de MG (JANUARIO, 2002). A Figura 2 mostra a incidência da doença falciforme em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde em Minas Gerais.



(\*) Inclui fenótipos: Hb SS, Hb SC, Hb S/β<sup>0</sup> tal, Hb S/β<sup>+</sup> tal, Hb S/D<sub>Punjab</sub>

Figura 2 – Incidência da doença falciforme (\*) em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde. Programa Estadual de Triagem Neonatal – Minas Gerais.

Fonte: Januário, 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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 discoide da hemácia para diversos formatos, dos quais a mais conhecida é o formato 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 2) (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 sobrevivência em circulação; c) provocam lesões microvasculares; d) causam depleção de óxido nítrico (NO), o que contribui para vasoconstrição e ativação da inflamação; e) ativam a coagulação. Essas modificações têm consequências que as amplificam, levando às manifestações clínicas (ZAGO E PINTO, 2007).

Tabela 2 – Principais alterações moleculares das hemácias em consequência ao fenômeno de falcização

---

|  |
|--|
| Aumento do $\text{Ca}^{2+}$ intracelular e de membrana                                       |
| Perda de íons monovalentes, especialmente $\text{K}^+$                                       |
| Perda de água (desidratação celular)   |
| Aumento da densidade dos eritrócitos   |
| Redução da deformabilidade, fragilidade e vesiculação dos eritrócitos                        |
| Oxidação 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

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 óxido nítrico. (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. Provavelmente esse 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).

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 discoides 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; CONRAN, 2009). 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 da DF**

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  $\beta$  variante já é claramente predominante em relação à cadeia  $\gamma$  da Hb F (NAOUM, 2000; THEIN E MENZEL, 2009).

O quadro clínico da anemia falciforme é oriundo das alterações físicas no fluxo sanguíneo, principalmente em virtude da rigidez e afoiçamento das hemácias, que pode culminar em obstrução, isquemia e dano orgânico irreversível (MARTINS et al., 2008). Os fenômenos vaso-oclusivos e a hemólise são os principais determinantes das manifestações clínicas da anemia falciforme. As complicações clínicas consequentes da evolução das doenças falciformes podem ser classificadas em dois grupos (Tabela 3).

O primeiro grupo se refere àquelas que interferem na qualidade de vida do paciente, mas que não estejam associadas diretamente à redução da expectativa de vida. Neste grupo encontram-se as úlceras de perna, retinopatia, necrose óssea (especialmente da cabeça do fêmur) e litíase biliar. Já no segundo grupo encontram-se as complicações que comprometem a função de órgãos vitais e que estão associadas a risco de morte. Entre elas estão as infecções, as complicações cardiorrespiratórias (especialmente a insuficiência cardíaca congestiva e a síndrome torácica aguda), a insuficiência renal e os acidentes vasculares encefálicos (ZAGO E PINTO, 2007).

Tabela 3 - Manifestações clínicas da doença falciforme de acordo com o principal componente fisiopatológico

| <b>Complicações da Doença Falciforme</b> |                              |
|--|------------------------------|
| <b>Hemólise</b>                          | <b>Vaso-oclusão</b>          |
|  | Crises de dor (crise álgica) |
|  | Síndrome torácica aguda      |
|  | Acidente vascular cerebral   |
| Anemia                                   | Priapismo                    |
| Litíase biliar                           | Retinopatia                  |
| Crise aplástica (eritrovírus)            | Necrose óssea avascular      |
| Icterícia                                | Sequestro esplênico          |
| Atraso no crescimento                    | Asplenia funcional           |
|  | Úlceras nas pernas           |
|  | Hipostenúria e enurese       |
|  | Nefropatia crônica           |

Fonte: Reed e Vichinsky, 1998

Os portadores de anemia falciforme são extremamente vulneráveis às infecções, principalmente do trato respiratório. Os principais agentes etiológicos associados a episódios de infecção bacteriana invasiva nestes indivíduos, em ordem decrescente de frequência, são: *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella spp*, *Haemophilus influenzae tipo b*, *Escherichia coli* e *Klebsiella spp*. Alguns estudos relatam 84% de redução de sepses pelo pneumococo em crianças que faziam correta profilaxia com penicilina, medicamento este de uso controlado pelo Sistema Único de Saúde, fornecido durante os cinco primeiros anos de vida aos pacientes diagnosticados pelo teste do pezinho.) A existência de centros especializados no tratamento da doença falciforme para que promovam a importância da adesão ao tratamento profilático com a penicilina pode diminuir significativamente a mortalidade na infância (TELFER et al, 2007).

Di Nuzzo e Fonseca (2004) acreditam que as maiores taxas de mortalidade ocorrem nos dois primeiros anos de vida, e que a inclusão obrigatória da pesquisa de hemoglobinopatias no exame de triagem neonatal vem demonstrando ser um passo importante para a diminuição dessas taxas, pois permite a identificação precoce desses indivíduos e a consequente introdução de profilaxia adequada. Aragon e colaboradores (2006) reafirmam a importância do diagnóstico precoce, já que o teste do pezinho permite o conhecimento da condição do recém-nascido e suas possíveis restrições, antes mesmo que se intensifiquem os sintomas da doença.

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 eficiente, e a mortalidade pela doença falciforme está

reduzindo, a idade média de morte está aumentando e uma menor proporção de mortes é causada por infecções (QUINN ET AL., 2004).

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).

### **3.6 Doença Cerebrovascular e Acidente Vascular Encefálico**

O acidente vascular cerebral isquêmico ocorre em aproximadamente 11% dos indivíduos com anemia falciforme até os 20 anos de idade. O risco é mais elevado na primeira década de vida, com incidência de 1% a 2%/ano entre os dois e cinco anos de idade. Há queda da incidência na segunda década com novo aumento após os 29 anos de idade. A incidência do AVC hemorrágico é menor nas crianças com anemia falciforme, embora seja responsável por aproximadamente 3% dos casos nesta faixa etária. Os eventos hemorrágicos ocorrem principalmente na terceira década de vida. O índice de mortalidade por AVC hemorrágico nos primeiros dias após o evento é cerca de 25%, mas o óbito é raro após AVC isquêmico.

Sem tratamento, o AVE isquêmico apresenta recorrência em 2/3 dos casos, dentro dos primeiros dois ou três anos após o evento inicial (SWITZER et al., 2006). Powars et al. (1978) descreveram a história natural do AVC em crianças com anemia falciforme e relataram 67% de recorrência do evento, sendo que em 80% ocorreu nos três primeiros anos após o evento primário. Em 2003, Mancini et al publicaram os resultados de uma série de 306 autopsias de pacientes com anemia falciforme para determinação da causa de morte; sinais de acidente vascular encefálico foram encontrados em 9,8% das necropsias. Ohene-Frempong et al., 1998,



analisaram uma coorte de 4.082 pacientes com diagnóstico de doença falciforme (2.675 HbSS), do Estudo Cooperativo para Doença Falciforme (CSSCD) nos Estados Unidos. Os fatores de risco associados ao AVC isquêmico (em análise multivariada) foram: acidente isquêmico transitório (AIT) prévio, concentração de hemoglobina baixa, síndrome torácica aguda nas duas semanas anteriores ao AVC, número de STAs na história do paciente e aumento da pressão arterial sistólica.

Os genótipos HbSC e HbS $\beta$ - talassemia apresentaram número de eventos neurológicos significativamente inferior ao apresentado pelo genótipo SS. A base fisiopatológica para o acidente vascular cerebral isquêmico ainda não está totalmente elucidada, provavelmente estando implicados fatores múltiplos. A vasculopatia com estenose dos grandes vasos cerebrais, do Polígono de Willis, mormente da parte distal da artéria carótida interna (ACI) e das regiões proximais das artérias cerebrais médias (ACM) e anteriores (ACA), é responsável pela maioria dos eventos agudos. A distribuição das lesões observadas em exames de imagens e em estudos anatomopatológicos confirma o papel da vasculopatia dos grandes vasos; em poucos casos os eventos são devidos ao acometimento de pequenos ramos corticais. A predominância das lesões funcionais corresponde aos territórios irrigados pela artéria cerebral média e cerebral anterior e o território limítrofe entre elas, sendo poupado o território da circulação posterior (SWITZER et al., 2006). A associação da vasculopatia envolvida no AVC com fatores “de risco” não está bem estabelecida.

Baixo nível de concentração de hemoglobina é fator de risco para desenvolvimento do evento e alguns trabalhos evidenciaram a presença da co-herança da  $\alpha$ -talassemia com efeito protetor, pois aumentaria a concentração da hemoglobina. O seguimento de pacientes submetidos à transfusão regular crônica para prevenção primária do AVC no estudo STOP (ADAMS et al.,1998) mostrou redução significativa dos níveis de hemoglobina livre em

comparação com controles não-submetidos à transfusão ou que receberam transfusão esporadicamente.

Em estudo realizado por Kirkham et al., (2001) levantou-se a hipótese de que a hipoxemia noturna poderia prever o risco de evento no Sistema Nervoso Central (SNC) melhor do que eventos clínicos, parâmetros laboratoriais ou medidas das velocidades nas ACM e ACI pelo teste Doppler Transcraniano (DTC). Acompanharam 95 pacientes com doença falciforme (recrutados em hospitais), sem AVE prévio, e realizaram oximetria de pulso noturna e DTC. Hsu et al. (2003) analisaram os pacientes do estudo STOP (ADAMS et al, 1998) e verificaram que a presença de deleção de um ou dois genes  $\alpha$ - talassemia (microdeleção de  $\alpha$  3.7) estava associada com teste DTC normal quando comparados aos pacientes que exibiram valores anormais ( $\geq 200$  cm/s ao teste DTC). A chance quatro vezes maior da ocorrência de teste DTC normal nesses pacientes mostrou o papel protetor da deleção do gene  $\alpha$ -talassemia na vasculopatia e AVE. Exemplo de um gene como fator epistático na doença cerebrovascular da doença falciforme.

Lesões cerebrais de infarto ou isquemia, sem história de AVE clínico, são comuns em crianças com anemia falciforme. Ocorreram em 17% dos pacientes com anemia falciforme e em 3% de crianças com HbSC, em estudo com 312 pacientes do CSSCD. Neste estudo, foram analisadas imagens de ressonância magnética cerebral. As taxas de prevalência dessas lesões silenciosas não aumentaram significativamente após os seis anos de idade, mas o aumento do número delas com a idade indicaria lesão cerebral progressiva (MOSER et al., 1996). Esses infartos silenciosos estão associados com baixo desempenho em testes psicométricos, com redução de habilidades nas áreas de linguagem, matemática, visual e motora. Houve associação significativa entre infartos silenciosos e o nível de hemoglobina, com maior taxa de infartos para os níveis mais baixos. Não houve diferença nas taxas de infartos na presença

ou ausência de deleção de genes  $\alpha$ -talassemia, mas a presença do haplótipo Senegal foi associada com maior ocorrência de infartos silenciosos.

### **3.7 Doppler Transcraniano**

O princípio Doppler foi primeiramente descrito por Christian Johann Doppler, em 1843. Seu uso na Neurologia foi introduzido em 1982 e desde então a técnica vem sendo aprimorada e ampliando-se como instrumento de avaliação da circulação intracraniana em várias doenças cerebrovasculares. Dá-se o nome de insonação ao exame dos vasos intracranianos pelo DTC (KASSAB et al., 2007).

O método Doppler transcraniano mede a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral nos segmentos arteriais insonados, determinando a velocidade média máxima ou VMM (do inglês TAMMV “time-average mean of maximum velocity”) no vaso, dentro do ciclo cardíaco abrangendo sístole e diástole.

Por muito tempo pensou-se que o crânio era impenetrável ao ultrassom, tornando impossível o estudo da circulação intracraniana por esse método. Entretanto, em 1982, Aaslid et al. descreveram o método não-invasivo para se obter a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral, usando ultrassom Doppler pulsado com sonda de 2 MHz, através das janelas cranianas naturais. Esta técnica tornou-se conhecida como Sonografia Doppler Transcraniano ou Doppler transcraniano (DTC).

O DTC utiliza áreas específicas da calota craniana que apresentam menor espessura ou forames naturais para ter acesso à circulação arterial intracraniana. São três as regiões convencionais do crânio através das quais penetra a onda ultrassonográfica. Essas regiões são denominadas janelas acústicas.

As três janelas acústicas são: janela acústica temporal, descrita por Aaslid em 1982, janela acústica transorbital, descrita por Spencer e Whisler em 1983, e a janela transforaminal, descrita em 1986, por Arnolds e von Reutern.

A janela transtemporal está localizada no osso temporal, logo acima do arco zigomático. Corresponde à camada escamosa, mais fina do osso temporal. Pode resultar em atenuação da imagem se a espessura óssea for maior. A intensidade acústica do ultrassom conduzido no tecido cerebral é 35% menor do que a intensidade acústica original. Apesar das várias modificações realizadas na instrumentação, cerca de 10%-15% de todos os pacientes apresentam janela temporal inacessível. A janela transtemporal está subdividida em três janelas: posterior, média e anterior.

No processo de procura pelo melhor local para penetração do ultrassom, a exploração dessas três regiões deve ser realizada. Na maioria dos pacientes, a janela posterior é a mais acessível. Está localizada acima do arco zigomático em frente ao meato auditivo externo, com consideráveis variações na localização precisa em que o transdutor deve ser posicionado. Identificada a melhor janela acústica, a relocação da posição sobre o osso temporal pode ser necessária durante o exame, especialmente durante as fases iniciais do processo de aprendizagem.

Os vasos acessados através da janela transtemporal são a porção distal da artéria carótida interna, artéria cerebral anterior, artéria cerebral média, artéria cerebral posterior (ACP), artéria comunicante anterior (ACoA) e artéria comunicante posterior (ACoP).

A porção distal da artéria carótida interna é o segmento supraclinóideo da ACI, próxima da bifurcação (BIF) em ACM e ACA. Angiograficamente, em projeção frontal, a dACI situa-se superior e lateralmente, podendo variar consideravelmente sua posição em cada indivíduo. O diâmetro médio da dACI é de 3,6 mm a 4,6 mm. Todas as ramificações maiores da ACI nascem da sua porção supraclinóidea. A artéria comunicante posterior (AcoP) emerge

da porção dorsal supraclinoídea do ACI e segue posterior e medialmente. Tem aproximadamente 1,5 cm de comprimento e comunica-se com a artéria cerebral posterior. É dificilmente acessada pela sonda do DTC, a menos que esteja funcionando como fonte de fluxo colateral.

A ACM é continuação e principal ramo da artéria carótida interna. Cursa em um plano horizontal, lateral e ligeiramente anterior. Da porção inicial da ACM emergem numerosos ramos perfurantes lentículo-estriados. Estes importantes pequenos ramos não podem ser acessados pelo DTC.

A ACA origina-se da terminação da artéria carótida interna e segue medialmente e ligeiramente anterior em direção à linha média do cérebro. Tem um segmento horizontal, referido como segmento A-1, ou segmento pré-comunicante, e um segmento vertical, referido como segmento A-2, ou pós-comunicante. Os segmentos A-1 em cada hemisfério são conectados pela artéria comunicante anterior (AcoA).

As artérias cerebrais posteriores são ramos terminais da artéria basilar. A porção da ACP que emerge da basilar até o ponto de comunicação com a AcoP é referido como segmento P-1, ou segmento pré-comunicante. O segmento P-1 cursa anterior e lateralmente e tem extensão de aproximadamente 6,3 mm. O segmento P-2, ou segmento pós-comunicante, tem curso posterior e superior, com diâmetro médio de 1,96 mm.

Vários autores têm mostrado, em estudos anatômicos, que o Polígono de Willis apresenta ampla variação anatômica, e que a configuração “normal” do polígono de Willis ocorre em apenas 18%-54% dos indivíduos. O conhecimento das variações anatômicas mais frequentes facilita a identificação dos vasos pelo DTC.

A ACA apresenta frequentes variações sendo a maioria representada pela hipoplasia ou atresia do segmento A-1 (25% dos casos); o segmento contralateral pode, nesses casos, suprir os segmentos A-2 e pós comunicantes.

A ACP geralmente se origina da artéria basilar. Em 18%-27% dos casos depende do fluxo da ACI ou está em combinação com o fluxo da AB (origem fetal da ACP). Neste caso é difícil de ser identificada pelo DTC.

A artéria temporal anterior, um ramo do segmento M-1 da ACM, pode ser relativamente ampla e quando cursa medialmente pode ser confundida com a bifurcação (ACM/ACA) pelo DTC. Esta “falsa” bifurcação pode ser evitada, insonando-se a verdadeira BIF que é mais profunda, aproximadamente aos 50 mm de profundidade.

A figura 3 mostra os pontos de referência para insonação dos segmentos arteriais no Polígono de Willis, segundo estudo STOP.

### Pontos de referência para o teste DTC segundo estudo STOP

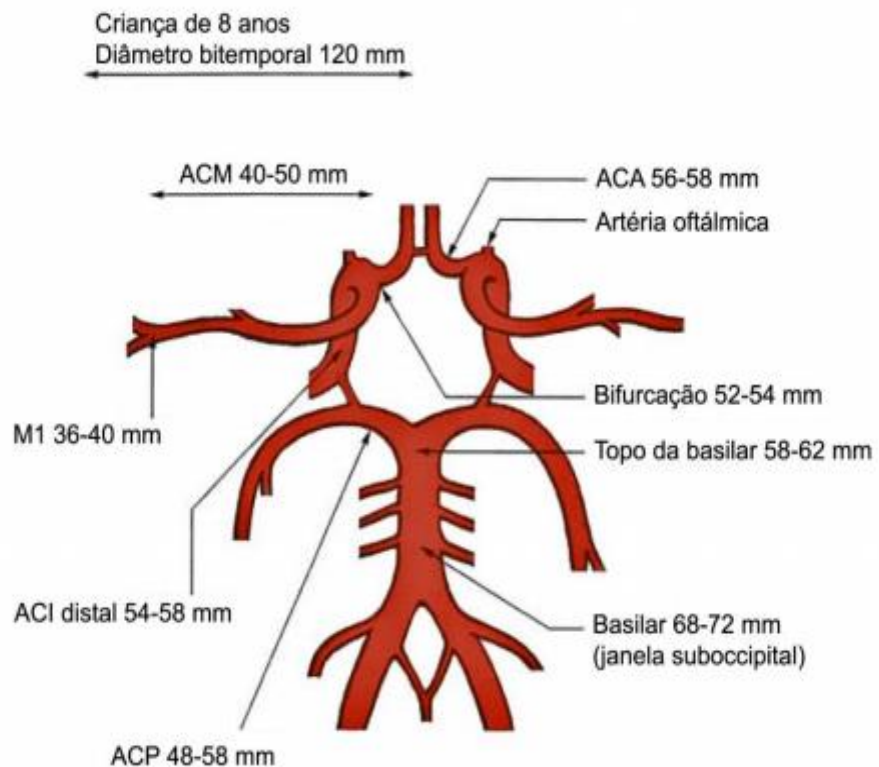


Figura 3: Pontos de referência para insonação dos segmentos arteriais no Polígono de Willis

### 3.8. Haplótipos

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  $\beta$  S (NAGEL E RANNEY, 1990).

A mutação  $\beta$  S está em desequilíbrio de ligação com múltiplos sítios polimórficos ao longo do agrupamento de genes da  $\beta$ -globina (HANCHARD et al., 2007; LIU et al., 2009). Os haplótipos  $\beta$  S são definidos pela variação de sequências de DNA no agrupamento de genes da  $\beta$ -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  $\beta$  S ; na discriminação entre os diversos eventos epistáticos ligados ao alelo  $\beta$  S que podem modular a expressão fenotípica da mutação estrutural; no monitoramento do fluxo do alelo  $\beta$ S em populações humanas; no estudo de origem e evolução da raça humana (NAGEL E RANNEY, 1990; LAPOUMEROLIE 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 4) (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).

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 (ESTIMATES DATABASE, 2010). Esses dados são concordantes com o perfil da frequência dos haplótipos  $\beta$  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.



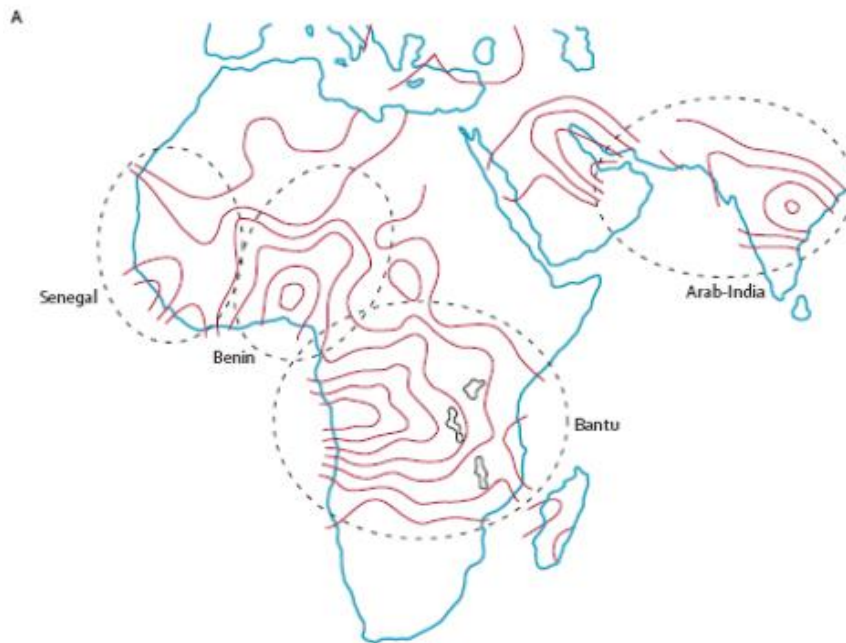


Figura 4 - Região de origem e abrangência dos três principais haplótipos  $\beta S$  africanos e um asiático

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  $\beta S$  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  $\beta$ 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). 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  $\beta$  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 4) (POWARS, 1991; POWARS E HITI, 1993; ASHLEY-KOCH et al., 2000; ADEKILE, 2005; STEINBERG, 2005; RUND E FUCHAROEN, 2008; STEINBERG, 2009).

Tabela 4 – Características gerais encontradas nos haplótipos clássicos da Anemia falciforme

| Características clínicas e laboratoriais |               |               |                  |
|--|---------------|---------------|------------------|
| Haplótipo                                | Hematócrito   | HbFetal       | Evolução Clínica |
| Sem/Árabe-Indiano                        | Mais elevado  | Mais elevada  | Melhor           |
| Ben                                      | Intermediário | Intermediária | 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  $\beta$  S e a expressão da cadeia  $\gamma$  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  $\alpha$ -Tal (NAGEL E RANNEY, 1990). Essa interação é associada a um fenótipo menos grave da doença (ELHAZMI, 1992; THOMAS et al., 1997).

Entre os vários polimorfismos do agrupamento de genes da  $\beta$ -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  $\beta S$  interfeririam nas expressões fenotípicas da anemia falciforme (POWARS et al., 1990). Mutações de ponto em regiões promotoras dos genes da  $\gamma$ -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).

O primeiro estudo que determinou os haplótipos  $\beta S$  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  $39,4 \pm 6,2\%$ ) 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).

Novamente no estado de São Paulo, Figueiredo et al. (1996) estudaram os efeitos dos haplótipos  $\beta S$  e da  $\alpha$ -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  $\beta$  S com relação aos eventos clínicos analisados (AVC, cálculos biliares, necrose asséptica e úlcera nas pernas).

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  $\beta$  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 colelitíase foi associada com os haplótipos atípicos em Salvador e com o CAR/CAR em São Paulo. Entretanto, não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa.

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  $\beta$  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  $\beta$  S e a frequência de dor, complicações cardíacas, sexo, idade e níveis de Hb F.

Ballas et al. (1991) determinaram os haplótipos  $\beta$ S, testaram a presença do polimorfismo C $\rightarrow$ 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.

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 significativamente inferior quando comparado com os pacientes homozigotos para os haplótipos Ben e Sem ( $p < 0,0001$ ), no entanto não houve associação entre os haplótipos  $\beta$  S e os níveis de Hb total e Hb F. Não houve correlação entre os haplótipos  $\beta$  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  $\beta$  S em 41 pacientes com anemia falciforme que se apresentaram ao hospital pediátrico de Michigan com sintomas e sinais clínicos de AVE. 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.

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  $\beta$  S. Também não houve diferença na frequência dos haplótipos  $\beta$  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  $\beta$  S e os eventos agudos (TARER et al., 2006).

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  $\beta$  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  $\beta$  S com o fenótipo.

Estudos anteriores mostraram que os haplótipos estão associados com um aumento do risco de AVE (BALKARAN, 1992; POWARS,1991; SARNAIK,2001; RUSANOVA,2011). Flanagan *et. al.* (2011), Belisário et al (2010) e Loghetto (2013) não encontraram correlação significativa entre os haplótipos e AVE. Domingos *et.al.* em 2014 estudaram população de Pernambuco diferente da de Bezerra *et. al.* (2007) com 261 pacientes, sendo 67 deles com AVE e não verificaram associação entre os haplótipos com AVE.

Os relatos sobre os efeitos dos haplótipos  $\beta$  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 qualidade da assistência médica, padrão socioeconômico e susceptibilidade a infecções.

### **3.9 Talassemia**

O agrupamento de genes da  $\alpha$ -globina está localizado no braço curto do cromossomo 16. Nos seres humanos, os genes  $\alpha$  são duplicados e, dessa forma, um indivíduo normal possui quatro genes alfa ativos, dois em cada cromossomo 16 ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) (HIGGS et al., 1989). Os éxons dos genes  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  são homólogos e codificam proteínas idênticas. Apesar dessa homologia, o gene  $\alpha 2$  apresenta uma expressão de duas a três vezes maior que o gene  $\alpha 1$  (LIEBHABER et al., 1986). Os genes da  $\alpha$ -globina são divididos em três éxons (I, II e III) e dois íntrons (IVS-1 e IVS-2) (HIGGS et al., 1989). A  $\alpha$ -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  $\alpha$ -Tal são resultantes da deficiência de um, dois, três ou dos quatro genes  $\alpha$ . Seus portadores são caracterizados segundo o número de genes afetados: portador silencioso, no qual um gene  $\alpha$  é afetado; traço  $\alpha$ -talassêmico, no qual dois genes  $\alpha$  são afetados; doença da hemoglobina H, na qual três genes  $\alpha$  são afetados; e síndrome da hidropsia fetal por hemoglobina Bart, onde todos os quatro genes  $\alpha$  são afetados (NAOUM, 1997)

As sete deleções mais comuns que causam a  $\alpha$ -Tal são:  $-\alpha$  3.7 e  $-\alpha$  4.2 que atingem apenas um gene da  $\alpha$ -globina, e as deleções que atingem os dois genes da  $\alpha$ -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).

No Brasil, a prevalência de  $\alpha$ -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  $\alpha$ -Tal é quase que exclusivamente a do tipo 3.7 (CANÇADO, 2006). 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).

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 afrodescendentes, essa frequência pode alcançar 20% a 25% (CANÇADO, 2006). A  $\alpha$ -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.

A possibilidade da interação de  $\alpha$ -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 (ELHAZMI, 1992; THOMAS et al., 1997). A  $\alpha$ -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).

A deformabilidade de hemácias falciformes de indivíduos que possuem a coexistência de  $\alpha$ -Tal é maior do que a dos pacientes sem a  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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).

Os efeitos benéficos da  $\alpha$ -Tal em propriedades reológicas das hemácias de indivíduos com anemia falciforme, mostradas na Tabela 5, são compensadas pelo aumento da viscosidade sanguínea devido aos níveis mais elevados de hematócrito conferido pela presença da  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -Tal na fisiopatologia da anemia falciforme ainda não são inteiramente entendidos e poderiam ser danosos em algumas situações (BALLAS, 2001).

Tabela 5 – Efeitos da  $\alpha$ -Tal em propriedades reológicas das hemácias

---

|   |
|---|
| Maior deformabilidade das hemácias                |
| Menor desidratação celular                        |
| Menor número de células falciformes irreversíveis |
| Menor número 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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.

No Brasil, poucos estudos estimaram a prevalência de  $\alpha$ -Tal em indivíduos com anemia falciforme e menos estudos ainda avaliaram os efeitos advindos da interação da mesma sobre dados clínicos e hematológicos. Costa et al. (1989) avaliaram 41 pacientes com anemia falciforme para estimar a coexistência da  $\alpha$ -Tal e avaliar o efeito dessa interação em alguns dados hematológicos. O genótipo  $-\alpha/\alpha\alpha$  foi encontrado em nove dos 41 pacientes (22%), o volume corpuscular médio (VCM) dos pacientes com a mutação foi significativamente menor do que nos pacientes sem  $\alpha$ -Tal. Não houve diferença nos valores de Hb total, Hb F e Hb A2.

Figueiredo et al. (1996) estudaram os efeitos da  $\alpha$ -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  $-\alpha/\alpha\alpha$  estava presente em 17,6% e o genótipo  $-\alpha/-\alpha$  em 1,2%, totalizando 18,8% de pacientes com a co-herança de  $\alpha$ -Tal. Não houve diferença significativa relacionando os genótipos de  $\alpha$ -Tal com os eventos clínicos analisados (AVE, cálculos biliares, necrose asséptica e úlcera nas pernas).

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  $\alpha$ -Tal ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) foi de 22,5% em São Paulo e de 28,2% em Salvador. Não houve diferença significativa nos 95 grupos com ou sem a coexistência de  $\alpha$ -Tal com relação à hospitalização devido a crises vaso-oclusivas, hospitalizações devido a infecções, AVE 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $-\alpha/\alpha\alpha$  estava presente em 14 (18,9%) pacientes e o genótipo  $-\alpha/-\alpha$  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  $-\alpha/-\alpha$  e 30 (27,3%) possuíam o genótipo  $-\alpha/\alpha\alpha$ . Os pacientes com a coexistência de  $\alpha$ -Tal apresentaram menores níveis de VCM e HCM e maiores níveis de Hb total e hematócrito quando comparados com os sem  $\alpha$ -Tal. Não houve diferença nos níveis de Hb F entre esses grupos. A deleção causadora de  $\alpha$ -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  $\alpha$ -Tal nessa população (STEINBERG e EMBURY, 1986).

### **3.10 Programa de Triagem Neonatal**

Inicialmente a anemia falciforme e várias outras doenças eram detectadas apenas quando surgiam os sintomas e muitas patologias só eram então diagnosticadas após a morte do indivíduo. Os primeiros programas populacionais de triagem neonatal no mundo tiveram início na década de 1960. Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde, 5% da população mundial é portadora do gene para hemoglobinopatias e a cada ano, nascem

aproximadamente 300.000 com essa doença (World Health Organization, 2005). No Brasil, estima-se que existam mais de 10.000 portadores de Anemia Falciforme e que ocorra o nascimento de 3.500 novos casos por ano.

No Brasil, a primeira iniciativa de regulamentação federal foi estabelecida pelo Estatuto da Criança e do Adolescente (Lei nº.8069/90), tornando obrigatória a realização de exames visando diagnóstico e terapêutica de anormalidades do metabolismo. Com isso, a partir de 1992, o SUS passou a custear a realização de exames neonatais, dentre eles o teste do pezinho.

Inicialmente, esta triagem era restrita ao diagnóstico do hipotireoidismo congênito e da fenilcetonúria, porém com o passar dos anos percebeu-se a necessidade do diagnóstico precoce de outras doenças tais como a anemia falciforme (Ministério da Saúde, 2012), uma vez que a doença falciforme é a hemoglobinopatia mais comum no Brasil (SILVA, 2006). O Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) tem a função de detectar, confirmar, diagnosticar, acompanhar e tratar os casos suspeitos de quatro importantes doenças (fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, fibrose cística e doenças falciformes e outras hemoglobinopatias). Este programa vem sendo implantado, em fases distintas, em virtude dos diferentes níveis de organização das redes assistenciais existentes nos estados, da variação percentual de cobertura dos nascidos vivos, da triagem que vinha sendo realizada no país e da diversidade das características populacionais existentes no país.

Para habilitação em cada fase, os estados ou Distrito Federal tem que se comprometer em cumprir alguns critérios estabelecidos na Portaria Ministerial GM nº 822/01, com respeito à rede de coleta e cobertura, ao serviço de referência, ao acompanhamento e tratamento das doenças.

Um dos principais objetivos do Programa de Triagem Neonatal é a garantia de que todos os nascidos vivos no território nacional sejam testados para as doenças pré-definidas por

este programa, mas infelizmente a cobertura populacional total é muitas vezes dificultada por problemas socioeconômicos e culturais, falta de informação quanto à importância da triagem e dificuldade dos pais em levar seus filhos para a realização dos exames agendados. No Brasil, para ser credenciado como um serviço de referência, a instituição deve obedecer alguns critérios básicos, assumindo responsabilidades com relação à rede estadual de coleta, à estruturação do laboratório especializado e do ambulatório multidisciplinar para acompanhamento dos pacientes (ALMEIDA et al., 2006).

O estado de Minas Gerais por meio de uma ação conjunta entre a Secretaria Estadual de Saúde e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), implantou o Programa Estadual de Triagem Neonatal. Minas Gerais foi o primeiro estado a fornecer uma política de atenção aos portadores de doença falciforme, sendo que desde 1998, a doença foi incluída na triagem neonatal, enquanto que o Programa Nacional só foi efetivado em 2001 (RODRIGUES et al.,2010). O PETN-MG 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.

Entre 1998 a 2007, foram triados em MG 2.549.097, sendo que, 188.916 nasceram nas 39 cidades de abrangência da HEMOMINAS de Juiz de Fora (JFO), o que representa **7,41%** do montante do estado. A cobertura do PETN-MG em 2007 foi de **88,57%**, valor este superior em **9,65%** a média nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE,2009).

Buscando melhores condições para o atendimento integrado dos pacientes com hemoglobinopatias, a Hemominas, o Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD), a Secretaria Estadual de Saúde, Associação dos Pais, Amigos e Pacientes com Doença Falciforme do Estado de Minas Gerais e o Ministério da Saúde, que aporta recursos federais para a iniciativa, criaram, em 2005, o Centro de Educação e Apoio para Hemoglobinopatias

(CEHMOB). O CEHMOB, hoje referência nacional, com sede em Belo Horizonte, acolhe famílias em tratamento de hemoglobinopatias.

O atendimento e acompanhamento médico são realizados nos ambulatórios da Fundação Hemominas onde os familiares recebem também informações pertinentes e atendimento multidisciplinar, inclusive com acompanhamento de Assistente Social.

Considerada como uma bem-sucedida experiência, a de Minas Gerais, este modelo foi disseminado e apontado como marco nas políticas públicas nacionais para o atendimento às hemoglobinopatias. O atendimento sistemático aos pacientes portadores de hemoglobinopatias em Minas Gerais foi iniciado em 1991 e desde então a Hemominas é referência nacional e internacional para o tratamento.

Um estudo realizado, no período entre 1998 e 2001, apontou dados importantes sobre a frequência da anemia falciforme em Minas Gerais, dentre eles a incidência da doença em todas as suas formas, em torno de 1 caso para cada 1.300 nascimentos. Ramalho (2002) entende que, ao incluir as hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal, a Portaria no 822/01 do Ministério da Saúde deu um passo importante no reconhecimento da sua relevância na saúde pública do Brasil. Diniz (2009) reitera que a identificação e tratamento precoces são requisitos indispensáveis para o aumento da expectativa de vida das crianças com anemia falciforme (Silva, 2006).

O Programa de Atenção a Doença Falciforme em Minas Gerais envolve:

1. A realização do “teste do pezinho”
2. O diagnóstico para doença falciforme através da Triagem Neonatal
3. A primeira consulta de orientação aos pais junto com uma equipe médica que orienta sobre a doença e sinais de alerta (alterações sugestivas de urgência/emergência médica), fornece folhetos explicativos sobre a hemoglobinopatia, inclusão no CEHMOB

O CEHMOB permite acesso através de uma central 0800, gratuita e com funcionalidade de 24 horas. O paciente recebe uma carteirinha, fornecida pelo CEHMOB em parceria com o NUPAD, Governo de Minas e a Fundação Hemominas que informa aos profissionais de saúde que a criança é portadora de doença falciforme e deve receber atendimento prioritário em qualquer centro médico.

Diante do exposto fica claro para Cançado e Jesus (2007) que devemos garantir ao indivíduo com doença falciforme o amplo acesso à saúde através de uma política de atenção integral a essas pessoas desde a Triagem Neonatal até medidas preventivas e tratamento das complicações agudas e crônicas. A implantação de programas de triagem neonatal para doença falciforme e a garantia do tratamento feito de maneira adequada, alcançando a adesão completa, o atendimento de qualidade e o acesso a todos, demonstra a possibilidade de diminuição da morbimortalidade da doença através de uma política pública de atenção à saúde, onde os princípios constitucionais básicos são conquistados pela população, gerando compromisso com os conceitos mais amplos de saúde conforme a Declaração de Alma-Ata e respondendo a questões contidas no planejamento do 1º. Congresso Mundial de Anemia Falciforme que foi realizado em 2010, cujo tema era “Anemia Falciforme, 1910-2010: 100 anos de ciência, ainda a procura por soluções mundiais”.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Verificar as associações entre os determinantes genéticos, demográficos e sócio – econômico e a ocorrência de AVE em crianças triadas pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas na Fundação Hemominas de Juiz de Fora.

### 4.2 Objetivos Específicos

**4.2.1 Determinar** a frequência de cada tipo de Doença Falciforme na Hemominas Juiz de Fora

**4.2.2** Identificar os haplótipos do agrupamento de genes da cadeia  $\beta$ s-globina e os genótipos de  $\alpha$ -Tal em crianças com doença falciforme

**4.2.3.** Determinar a concentração relativa de hemoglobina fetal no lisado de Hemácias

**4.2.4. Caracterizar** a população estudada em relação aos fatores socioeconômicos, escolaridade do principal cuidador e renda familiar

**4.2.5.** Determinar a frequência de AVE na população estudada

**4.2.6.** Avaliar a associação das variáveis estudadas ao desfecho AVE

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Desenho e local de realização do estudo

Tratou-se de um estudo do tipo coorte retrospectiva, observacional de natureza quantitativa, cuja população de estudo foi composta pelo total de crianças nascidas vivas, diagnosticadas com doença falciforme através do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN), entre 1998 e 2007 e que são acompanhadas no ambulatório da Hemominas Juiz de Fora (JFO) (Figura 5). Foram colhidas amostras para realização de exames

laboratoriais para identificação de determinantes genéticos (haplótipos e alfa-talassemia) e dosagem de hemoglobina fetal e aplicado questionário sócio econômico. O termo de cooperação para desenvolvimento desta pesquisa (Anexo E) envolve uma parceira da Fundação Hemominas e da Universidade Federal de Juiz de Fora.



FIGURA 5 - Unidades da Fundação Hemominas que atendem portadores de Doença Falciforme em Minas Gerais, com destaque para a de Juiz de Fora.

Fonte: Adaptado de MINAS GERAIS, 200-b.

## 5.2 Caracterização da população estudada e metodologia de seleção

No período entre 1998 e 2007, 188.916 crianças nascidas na região da Zona da Mata Mineira e Vertentes foram submetidas à triagem neonatal para DF através do PETN-MG. Neste período foram encaminhadas 135 crianças com DF para a Hemominas JFO, instituição de referência em hemoglobinopatias (Anexo B). Desse total, nove foram a óbito antes do início do projeto, seis crianças com DF tipo SD e S- foram excluídas do estudo e em dez

houve perda de acompanhamento, restando 110 crianças que constituem a população deste estudo. (Figura 2).

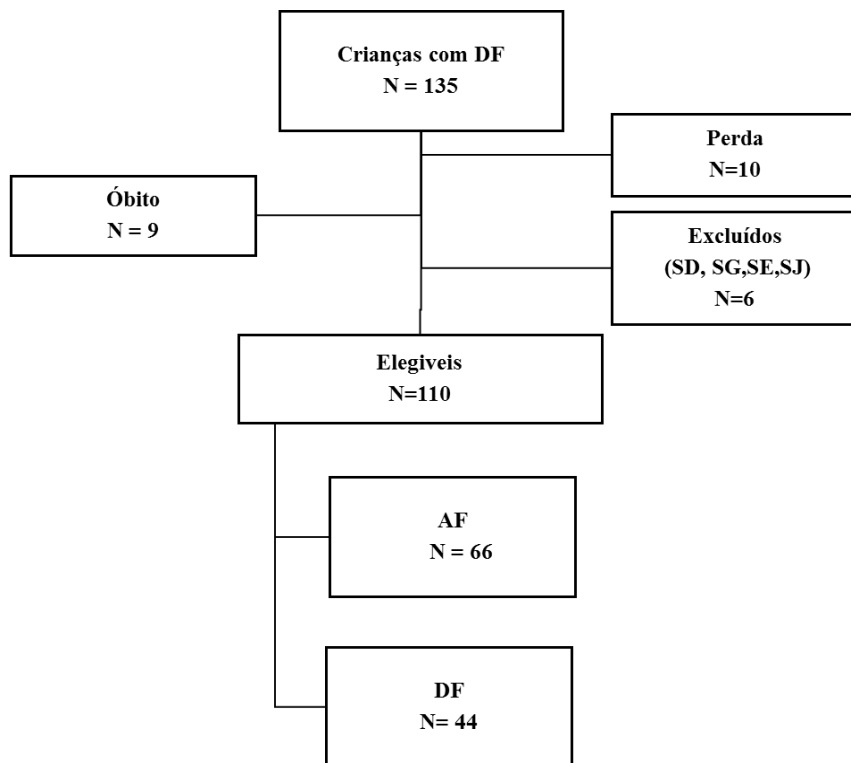


Figura 6 - Fluxograma da seleção amostral na população estudada

A identificação dos casos e a coleta de dados partiu do resultado da triagem neonatal enviado pelo NUPAD (Anexo B). Foram excluídas 19 crianças, os motivos das exclusões foram a indisponibilidade para coleta da amostra biológica, óbito e a falta de informações relativas ao acompanhamento clínico-laboratorial comprometendo o follow-up. Optou-se por incluir todas as crianças com DF e não realizar um cálculo amostral formal considerando que

os dados sobre a associação entre os haplótipos  $\beta$ s e genótipos de  $\alpha$ -Tal e variáveis clínicas e hematológicas foram controversos em relatos anteriores.

Também foram excluídas as crianças com perfil SD, SE, SJ e SG tornando a população mais homogênea para as análises das correlações clínicas e para discussão dos resultados com a literatura disponível. Essas variáveis de DF apresentam baixa prevalência na população brasileira e não estão correlacionadas com manifestações clínicas importantes como por exemplo o AVE.

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

- crianças triadas pelo NUPAD/PETN-MG, com perfil hemoglobínico compatível com doença falciforme (SS, SC,  $S\beta^+$ -talassemia,  $S\beta^0$ -talassemia) determinado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e eletroforese com focalização isoelétrica (IES) e acompanhadas na JFO, nascidas entre 01 de janeiro de 1997 e 31 de dezembro de 2007. (Anexo A);
- Concordância em participar do estudo e assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) pelos responsáveis. (Apêndice B).

Os critérios de exclusão da pesquisa foram:

- crianças com perfil hemoglobínico compatível com outros subtipos de doença falciforme (SD, SE, SJ e SG);
- crianças que foram a óbito por qualquer razão, antes do início do estudo;
- crianças encaminhadas a Hemominas JFO, que compareceram à primeira consulta e não deram seguimento ao acompanhamento clínico por qualquer razão;
- crianças transferidas para acompanhamento em outro centro.

O diagnóstico confirmatório de DF foi realizado através de eletroforese de hemoglobina em pH alcalino aos 6 e 12 meses de idade, dosagem de Hemoglobina A2 por cromatografia, imunodifusão radial para Hb Fetal e análise molecular do Códon 6 da beta globina.

As informações clínicas e laboratoriais foram extraídas dos prontuários médicos, no período compreendido entre a data de cadastro na instituição até 31 de dezembro de 2013 (término do acompanhamento da coorte), permitindo um acompanhamento de no mínimo cinco anos dos sujeitos da pesquisa. Os dados foram obtidos através do instrumento de coleta de dados (Apêndice C) e através da análise de fichas de consulta e contra referência utilizadas pela Fundação Hemominas (Anexos C e D). Todas essas informações foram armazenadas e lançadas no programa Excel® (Microsoft Redmond) em arquivo específico elaborado com a finalidade deste e de outros estudos em execução na JFO.

### **5.3 Análise dos fatores socioeconômicas**

As características socioeconômicas foram obtidas através da aplicação do questionário do Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira (INEP), acrescido de questões sobre a escolaridade do cuidador e renda familiar (Apêndice A). O questionário era composto de 40 questões com informações gerais e epidemiológicas como: nome, idade, sexo, naturalidade, cor da pele, tamanho da família, condições de moradia, renda familiar, escolaridade e acessibilidade. Para a análise as famílias foram estratificadas quanto à renda (até 2 salários mínimos e acima de 2 salários mínimos) e em relação à escolaridade do pai e mãe (fundamental incompleto e completo).

#### 5.4 Análise Laboratorial

A amostra de sangue para esta pesquisa foi coletada durante a rotina laboratorial de acompanhamento das crianças com DF e não foi necessária a retirada de novas amostras exclusivamente para a pesquisa. Foram coletados 5 ml de sangue total em tubos com EDTA para obtenção do DNA. As crianças e responsáveis foram previamente esclarecidos sobre a importância deste estudo e autorizaram sua participação através da assinatura do TCLE (Apêndice B). Os aspectos laboratoriais estudados foram:

1. A concentração relativa de hemoglobina fetal no lisado de Hemácias determinada aos 5 anos de idade e seu valor estratificado conforme Steinberg, 2009 em  $HbFetal \geq 10\%$  ou  $HbFetal < 10\%$ . A dosagem de Hemoglobina Fetal foi realizada através da técnica de imunodifusão radial padronizada no Laboratório Central de Hematologia da Fundação Hemominas em Belo Horizonte (HbF Quiplate, Helena Laboratories). <http://sa.hemominas.mg.gov.br:8080/sa/apps/dms/GlobalRepositoryApplication.jsp>.

2. A identificação dos haplótipos da cadeia da Beta globina e o estudo da coexistência da  $\alpha$ -talassemia. A coleta destes exames foi iniciada em novembro de 2010, após aprovação pela agência de fomento através do Programa Para a Saúde- PPSUS/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas, sob a responsabilidade da pesquisadora Marina Lobato Martins.

A extração do DNA genômico das amostras para ao estudo dos haplótipos e  $\alpha$ -talassemia nas 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 101 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 (15-25°C) 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 -200°C até o momento do uso.

A determinação da presença do alelo  $\beta$  S foi realizada por meio de PCR-RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição - "restriction fragments length polymorphisms" foi realizada conforme SUTTON et al. (1989), com modificações. Neste estudo foram analisados seis desses fragmentos para a determinação dos haplótipos. Excluiu-se a análise do fragmento  $3'\beta$ , 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, 1996).

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  $\mu$ l, contendo 200  $\mu$ M Tris-HCl (pH 8,4), 500  $\mu$ M KCl,  $MgCl_2$  em concentrações 107 distintas (Tabela 15), 200  $\mu$ M 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  $3'\Psi\beta$ : 60°C 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  $\mu$ l) foram digeridos com as enzimas adequadas à temperatura de 37°C numa reação de volume final de 20  $\mu$ L: 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  $\Psi\beta$  e na extremidade 3' de  $\beta$ ; e HinfI na extremidade 5' de  $\beta$ . Após a digestão, a enzima foi inativada com aumento da temperatura para 65°C durante 20 minutos. Para visualização dos produtos da restrição, 20  $\mu$ l do produto foram aplicados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (10 $\mu$ g/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 sítio polimórfico. Quaisquer outras combinações encontradas foram classificadas como haplótipos atípicos (Figura 3). Quando se verificava a heterozigose para dois haplótipos, presumiu-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 identificados haplótipos atípicos, a genotipagem foi realizada novamente para confirmação do resultado. A classificação dos haplótipos  $\beta$ S dos sujeitos da pesquisa foi antecedida pela aplicação da mesma metodologia em amostras de DNA com haplótipos previamente 108 conhecidos, cedidos gentilmente pela Dra. Marilda de Souza Gonçalves, da Fiocruz – Salvador, BA.

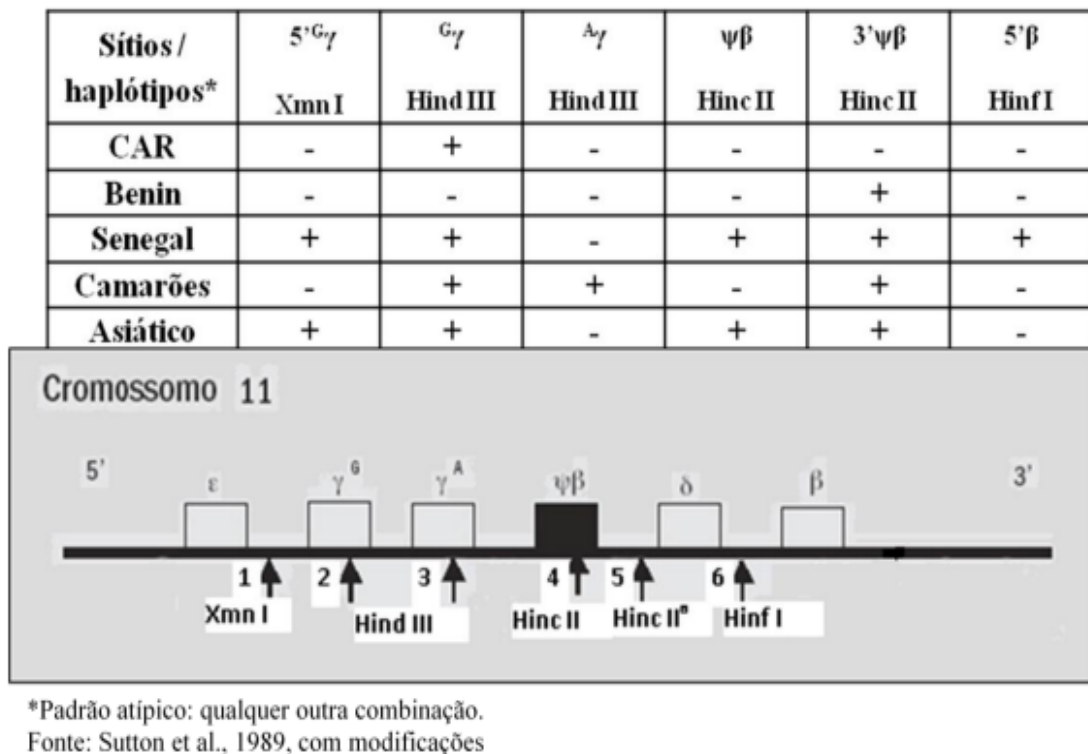


Figura 7 - Principais haplótipos do agrupamento de genes da globina beta definidos pelo padrão de atividade das enzimas de restrição Xmn I, Hind III, Hinc II e Hinf I nos seis fragmentos amplificados localizados em 5'<sup>G</sup>γ, Gγ, Aγ, ψβ, 3'ψβ e 5'β.

Para o diagnóstico molecular da α-talassemia foram realizadas 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 reação da PCR múltipla foi padronizada para permitir a detecção das sete deleções em uma reação de tubo único. A padronização ocorreu para a deleção - $\alpha$  3.7, seguido da padronização com todos os oligonucleotídeos sintéticos. A especificidade da técnica de PCR múltipla para o diagnóstico da deleção mais comum causadora de  $\alpha$ -Tal foi confirmada utilizando-se controles positivos, cedidos gentilmente pelo Dr. Samuel S. Chong (Universidade de Cingapura) ao Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas.

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  $\mu$ M de cada dNTP, 0,75  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub> 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  $\mu$ l. Nos ensaios seguintes e que levaram à padronização do teste molecular de diagnóstico de  $\alpha$ -Tal as condições para a amplificação da reação da PCR múltipla foram: volume final de 25  $\mu$ l contendo 100  $\mu$ M de cada dNTP, 0,75  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub> 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.

Para resolução dos produtos da PCR, 10  $\mu$ l do amplicon, adicionado de 1  $\mu$ l do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 1% contendo brometo de

etídio (10 $\mu$ g/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, Invitrogen).

### **5.5 Variável Clínica de Desfecho**

A variável clínica de desfecho foi dicotomizada em presença de AVE (sim ou não). O diagnóstico de AVE foi feito clinicamente (AVE isquêmico ou ataque isquêmico transitório) e/ou por meio de exames complementares tais como Doppler Transcraniano (DTC) e angioressonância magnética dos vasos cerebrais (AngioRM).

O rastreamento para a presença de AVE através do DTC tem sido oferecido anualmente a todas as crianças em acompanhamento de DF, entre 2 e 16 anos de idade, conforme preconizado pelo Protocolo Brasileiro, desde 2007 em Belo Horizonte, e a partir de 2012, na unidade regional deste estudo. O exame é realizado em todos pacientes com DF, apesar de não haver parâmetros de velocidades definidos para DF tipo SC e S/beta<sup>+</sup> <sup>1</sup>. A determinação da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral nas grandes artérias do Polígono de Willis foi baseada nos critérios do estudo “*Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia*” (STOP) (ADAM et al., 1998).

Os resultados 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  $\geq 170$  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  $\geq 170$  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  $\geq 200$  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.

As principais artérias insonadas foram: cerebrais médias e suas bifurcações e carótidas internas distais. A confirmação de teste anormal (risco alto) foi feita por dupla repetição do exame com intervalo de uma a quatro semanas. Crianças confirmadas como de alto risco para desenvolvimento de AVC isquêmico foram encaminhadas para tratamento preventivo primário do evento com regime de hipertransfusão. No momento da realização dos DTC não havia crianças em terapia transfusional de troca nem em tratamento com hidroxiureia.

## 5.6 Análise estatística

Os resultados quantitativos foram expressos como média  $\pm$  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 confiança a 95%.

Para verificar a possível associação dos genótipos de  $\alpha$ -Tal com aspectos clínicos e hematológicos da doença, os pacientes foram analisados independentemente como dois grupos de acordo com o genótipo, ou seja, AF e DF (SC,  $S\beta^+$ ,  $S\beta^0$ ). As crianças foram divididas em três grupos: I- ausência de  $\alpha$ -Tal (quatro genes alfa selvagens), II- heterozigose para  $\alpha$ -Tal-2 (um gene alfa afetado) e III- homozigose para  $\alpha$ -Tal- 2 (dois genes alfa afetados). Posteriormente, os pacientes foram divididos em dois grupos: ausência de  $\alpha$ -Tal (I) e presença de  $\alpha$ -Tal (II).

Para verificar a possível associação dos haplótipos do agrupamento da  $\beta$ S -globina com a variável de desfecho de AVE, os pacientes homozigotos SS foram analisados separadamente. Tendo em vista possível associação do haplótipo CAR com a forma mais grave da doença (POWARS 1993), a 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  $\alpha$ -Tal ou dos haplótipos  $\beta$ S com a ocorrência ou não de AVE, utilizando-se o teste do qui-quadrado. 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 Statistics® 14.0 (IBM Corporation, Somers, NY, EUA).

### **5.7 Aspectos éticos**

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B) foi apresentado ao responsável legal do potencial participante. 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 assinou 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 presente projeto de estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Hemominas, cadastrado com o parecer número 245 (Anexo F), aprovado em 09/10/2009 e encontra-se em consonância com o estabelecido na Resolução nº. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde e com o Código de Ética Médica de 1988 (Artigo 122 a 130).

### **5.8 Financiamento**

O material de laboratório utilizado no desenvolvimento do estudo, tais como, kits de extração de DNA, reagentes para PCR, enzimas de restrição foram adquiridos com recursos do Programa Pesquisa para o SUS - PPSUS via Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de

Minas Gerais (FAPEMIG) sob o número CDS- APQ-01431-10. Os tubos, ponteiros e equipamentos para realização de PCR foram adquiridos com recursos do orçamento do Serviço de Pesquisa da Fundação HEMOMINAS.

As bolsas de iniciação científica para os estudantes de graduação envolvidos e a bolsa de apoio técnico à pesquisa foram financiadas pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Adicionalmente, a pesquisa recebeu apoio logístico da Fundação Hemominas Juiz de Fora e da Universidade Federal de Juiz de Fora através do Núcleo de Assessoria, Treinamentos e Estudos em Saúde – NATES.



## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo Original



**Título: Determinantes genéticos e acidente vascular encefálico em crianças com doença falciforme**

**Título Abreviado: Acidente Vascular Encefálico e Doença Falciforme**

**Daniela de Oliveira Werneck Rodrigues<sup>1,2</sup>**

**Maria Teresa Bustamante Teixeira<sup>1</sup>**

**Lysla Cardoso Sudário<sup>3</sup>**

**Marina Lobato Martins<sup>2</sup>**

**Irtis de Oliveira Fernandes Filho<sup>3</sup>**

**Anuska Madruga de Oliveira Lagrotta Pittella<sup>3</sup>**

**Luiz Claudio Ribeiro<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, <sup>2</sup>Fundação Hemominas, <sup>3</sup>Bolsistas de Iniciação Científica – FAPEMIG/NIH

Correspondência

Daniela de Oliveira Werneck Rodrigues

Rua Doutor Antônio Carlos, 430/1400

Juiz de Fora – MG - 36.010-560

e-mail : [danielawerneckhemato@hotmail.com](mailto:danielawerneckhemato@hotmail.com)

Tel : (32) 32573126 e (32) 999796484

## RESUMO

Objetivo: Verificar fatores genéticos associados ao acidente vascular encefálico (AVE) em crianças com Doença Falciforme (DF).

Métodos: Coorte prospectiva de 110 crianças submetidas à triagem neonatal pelo Programa de Triagem Neonatal, entre 1998-2007 com o diagnóstico de DF, atendidas em serviço público regional de referência em hemoglobinopatias. As variáveis analisadas foram: tipo de hemoglobinopatia, sexo, coexistência da alfa Talassemia ( $\alpha$ -Tal), haplótipos do cluster da cadeia beta globina e AVE. A análise estatística final foi realizada com 66 crianças com Anemia Falciforme, por meio do teste do Qui-quadrado no programa SPSS® 14.0.

Resultados: Entre as crianças com DF, 60% eram portadoras de Anemia Falciforme. A prevalência da coexistência com a  $\alpha$ -Tal foi de 30,3% e o haplótipo Bantu (CAR) foi identificado em 89,2%. A incidência de AVE foi significativamente maior nas crianças com AF (27,3% *versus* 2,3%;  $p = 0,001$ ) e no sexo masculino (24,1% *versus* 9,6%;  $p = 0,044$ ). A presença da  $\alpha$ -Tal ( $p = 0,196$ ), do haplótipo CAR ( $p = 0,543$ ) e fatores socioeconômicos não foram significativamente associadas à ocorrência de AVE. Conclusão: O AVE apresenta alta incidência em crianças com AF e em crianças do sexo masculino. Coexistência de  $\alpha$ -Tal ou de haplótipos do cluster da beta globina não apresentaram associação significativa com AVE. A heterogeneticidade entre as populações previamente avaliadas e a não reprodutibilidade entre estudos indicam a necessidade de realização de novas pesquisas para verificar o papel desses fatores genéticos no AVE em crianças com DF.

Palavras chave: Anemia Falciforme, Acidente Vascular Cerebral, Marcadores Genéticos,  $\alpha$ -Talassemia, Haplótipos

## ABSTRACT

### **Genetic determinants and stroke in children with sickle cell disease**

#### **Shortened title: Stroke and sickle cell disease**

Objective: Verify genetic determinants associated with stroke in children with sickle cell disease (SCD).

Methods: Prospective cohort with 110 children submitted to neonatal screening by the Neonatal Screening Program, between 1998 and 2007, with SCD diagnosis, being followed up at regional public service reference in hemoglobinopathies. The analyzed variables were: type of hemoglobinopathy, gender, coexistence with alpha thalassemia ( $\alpha$ -Thal), haplotypes of the beta globin chain cluster and stroke. The final analysis was made with 66 children with sickle cell anemia (SCA), through the chi-square test in the program SPSS® version 14.0.

Results: Among children with SCD, 60% had SCA. The prevalence of coexistence with  $\alpha$ -Thal was 30.3% and the Bantu haplotype (CAR) was identified in 89.2%. The incidence of stroke was significantly higher in those with SCA (27.3% *versus* 2.3%;  $p = 0.001$ ) and male (24.1% *versus* 9.6%;  $p = 0.044$ ). The presence of  $\alpha$ -Thal ( $p = 0.196$ ), the CAR haplotype ( $p = 0.543$ ) and socioeconomic factors were not statistically significant in association with the occurrence of stroke.

Conclusion: Stroke presents great incidence in male children and in SCA. Coexistence with  $\alpha$ -Thal and haplotypes of the beta globin chain cluster did not show any relation that could associate them with stroke. The heterogeneity between populations previously evaluated, the non-reproducibility between studies and the necessity of identification of factors associated with stroke in patients with SCA indicate the necessity of conducting further research to demonstrate the relevance of genetic factors in stroke related to SCD.

Keywords: sickle cell anemia, stroke, genetic markers, alpha thalassemia, haplotypes

## INTRODUÇÃO

A doença falciforme (DF) é a doença hereditária monogênica mais comum no Brasil, ocorrendo predominantemente entre afrodescendentes. O termo DF inclui Anemia Falciforme (AF) e condições patológicas em que o gene da hemoglobina S está associado a outras hemoglobinopatias hereditárias, tais como SC, S/beta<sup>0</sup> e S/beta<sup>+</sup> talassemia (S/b), SD Punjab, entre outras<sup>1</sup>. A AF, causada por uma única mutação no gene da  $\beta$ -globina, produz uma diversidade de expressões fenotípicas nos pacientes acometidos<sup>2,3</sup>. A AF é a forma mais grave de apresentação da DF e para que a doença se manifeste é necessário que ocorra homozigose dos alelos  $\beta^S$  no gene responsável pela síntese da cadeia  $\beta$  da hemoglobina, determinando a formação da hemoglobina S (HbSS). A HbSS em condições como baixa oxigenação, acidose metabólica ou desidratação, se polimeriza alterando a estrutura da hemácia de forma irreversível determinando oxigenação ineficiente, reação inflamatória endotelial e toda a complexa fisiopatologia da doença<sup>3,4</sup>. O processo de polimerização leva à oclusão vascular que pode desencadear crises algicas, acidente vascular encefálico (AVE), síndrome torácica aguda, sequestro esplênico, priapismo, entre outras manifestações.

No Brasil os estudos mostram que nascem 700 a 1000 crianças por /ano com DF<sup>1,4-6</sup>, fazendo com que esta patologia seja um problema de saúde pública. Minas Gerais (MG) é pioneiro no Brasil no diagnóstico precoce das DF, com a introdução do Programa de Triagem Neonatal do Estado de Minas Gerais (PETN-MG) em março de 1998. O PETN-MG é coordenado pelo Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Universidade Federal de Minas Gerais, que encaminha os recém-nascidos diagnosticados com DF para acompanhamento na Fundação Hemominas. Entre 1998 a 2007, foram triados em MG 2.549.097 crianças, sendo que, 188.916 nasceram nas 39 cidades de abrangência do serviço público regional de referência em hemoglobinopatias - onde este estudo foi realizado -

o que representa 7,41% do montante do estado. A cobertura do PETN-MG em 2007 foi de 88,57%, valor este superior em 9,65% à média nacional (\*).

O AVE é uma das complicações mais graves da DF e é responsável por 20% da mortalidade entre estes pacientes.<sup>2,7</sup> De acordo com o Grupo Cooperativo de Estudo em DF, a incidência global do primeiro AVE foi de 0,08 eventos agudos / 100 pacientes / ano em menores de dois anos; 0,75 em pacientes entre dois e cinco anos de idade; 0,55 entre seis e nove anos de idade; 0,30 entre 10 e 19 anos; e 0,45 entre 20 e 29 anos. Entre as DF, a incidência de acidentes vasculares cerebrais é de 0,61 para pacientes com Hb SS, 0,17 para Hb SC e 0,11 e para Sbeta Talassemia.<sup>1,2,7</sup>

Atualmente a realização do Doppler transcraniano (DTC), método ultrassonográfico não invasivo que mensura as velocidades e alteração do fluxo dos vasos intracerebrais, é considerado uma ferramenta sensível para a identificação de risco para AVE isquêmico<sup>1</sup>.

A relação entre AVE, coexistência da alfa-Talassemia (<sup>del</sup>  $\alpha$ -3,7) ( $\alpha$ -Tal) e os haplótipos do cluster da Beta globina  $\beta^S$  é variável na literatura. Pesquisas publicadas com dados do Rio de Janeiro<sup>4,8</sup>, MG<sup>9</sup> e São Paulo<sup>4,9</sup> apresentam resultados controversos. Alguns estudos relatam que a coexistência da  $\alpha$ -Tal, contribuiria para reduzir o risco de AVE<sup>9-12</sup>, ao passo que outros não evidenciaram tal relação<sup>6,13</sup>.

Estes estudos identificaram características próprias quanto à frequência dos diferentes haplótipos, com grande prevalência de indivíduos homozigotos para o haplótipo CAR e Benin, refletindo a origem do fluxo de escravos africanos recebidos na época do Brasil colônia.<sup>4,9,14</sup> Na Jamaica e nos Estados Unidos o haplótipo Benin é muito mais frequente do que o CAR. Tais diferenças genéticas tornam inadequadas generalizações dos resultados entre as regiões.

O objetivo deste estudo foi verificar fatores genéticos associados ao risco de AVE em crianças com DF.

(\*) Ministério da Saúde. Programa Nacional de Triagem Neonatal. 2009

## MÉTODO

No período entre 1998 e 2007, 188.916 crianças nascidas na região da Zona da Mata Mineira e Vertentes foram submetidas à triagem neonatal para DF através do PETN-MG. Neste período foram encaminhadas 135 crianças com DF para a instituição pública de referência em hemoglobinopatias. Desse total, nove foram a óbito antes do início do projeto, seis crianças com DF tipo SD e S- foram excluídas e em dez houve perda de acompanhamento, restando 110 crianças que constituem a população deste estudo.

O diagnóstico confirmatório de DF foi realizado através de eletroforese de hemoglobina em pH alcalino aos 6 e 12 meses de idade, dosagem de Hemoglobina A2 por cromatografia, imunodifusão radial para HbFetal e análise molecular do Códon 6 da beta globina. Foram considerados para inclusão no estudo, crianças com AF, SC, S/b<sup>0</sup> e S/b<sup>+</sup>.

As informações clínicas e laboratoriais foram extraídas dos prontuários médicos, no período compreendido entre a data de cadastro na instituição até 31 de dezembro de 2013 (término do acompanhamento da coorte), permitindo um acompanhamento de no mínimo cinco anos dos sujeitos da pesquisa. As características socioeconômicas foram obtidas através da aplicação do questionário do Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira (INEP), acrescido de questões sobre a escolaridade do cuidador e renda familiar. Em novembro de 2010, foi iniciada a identificação dos haplótipos e pesquisa para  $\alpha$ -Tal, após aprovação pela agência de fomento através do Programa Para a Saúde-PPSUS/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

A variável de desfecho foi a presença de AVE (sim ou não). O diagnóstico de AVE foi feito clinicamente (AVE isquêmico ou ataque isquêmico transitório) ou por meio de exames complementares tais como Doppler Transcraniano (DTC) e angioressonância magnética dos vasos cerebrais (AngioRM).

O rastreamento para a presença de AVE através do DTC tem sido oferecido anualmente a todas as crianças em acompanhamento de DF, entre 2 e 16 anos de idade, conforme preconizado pelo Protocolo Brasileiro, desde 2007 em Belo Horizonte, e a partir de 2012, na unidade regional deste estudo. O exame é realizado em todos pacientes com DF, apesar de não haver parâmetros de velocidades definidos para DF tipo SC e S/beta<sup>+</sup> <sup>1</sup>. A determinação da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral nas grandes artérias do Polígono de Willis foi baseada nos critérios do estudo “*Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia*” (STOP) <sup>1</sup>.

Os resultados 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  $\geq 170$  cm/s como também representando risco elevado de desenvolvimento de AVC isquêmico<sup>15</sup>. As principais artérias insonadas foram: cerebrais médias e suas bifurcações e carótidas internas distais. A confirmação de teste anormal (risco alto) foi feita por dupla repetição do exame com intervalo de uma a quatro semanas. Crianças confirmadas como de alto risco para desenvolvimento de AVC isquêmico foram encaminhadas para tratamento preventivo primário do evento com regime de hipertransfusão. No momento da realização dos DTC não havia crianças em terapia transfusional de troca nem em tratamento com hidroxiureia.

Os fatores genéticos considerados na análise foram:

1. tipo de DF (AF ou as demais: SC, S/b<sup>0</sup> e S/b<sup>+</sup> talassemia) com diagnóstico confirmado por metodologia descrita acima;
2. sexo (masculino ou feminino);
3. presença ou ausência da mutação para o gene da  $\alpha$ -Tal;
4. identificação do haplótipo (CAR ou não CAR).

Para a determinação da mutação da deleção para  $\alpha$ -Tal e haplótipos foram coletados 5 ml de sangue total em tubos com etilenodiaminotetracético (EDTA) durante a rotina laboratorial de acompanhamento de DF. A extração e quantificação do DNA genômico foi feita através do kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®) e Invitrogen®, USA, com as enzimas de restrição (Ddel, New England BioLabs Inc.) de acordo com instruções do fabricante. As análises foram realizadas no laboratório de Pesquisa da instituição.

A identificação dos haplótipos foi realizada através de técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), de acordo com protocolo de Sutton<sup>16</sup>. Para as reações de PCR e pesquisa de mutação e deleção  $\alpha$ <sup>3.7</sup> foi utilizado kit comercial (QIAGEN® Multiplex PCR kit). A identidade de cada deleção foi obtida pela determinação do tamanho do fragmento amplificado em cada reação. Visto que qualquer uma das deleções remove parte ou todo o gene  $\alpha$ -2 globina, sua amplificação, juntamente com a amplificação de um alelo de deleção, indica que a mutação se encontra 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. Não foram pesquisadas outras mutações, considerando que no Brasil a deleção que leva à  $\alpha$ -Tal é do tipo <sup>(3.7)</sup> 9.

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

Além dos fatores genéticos descritos, foi verificada a associação entre HbFetal e AVE. A concentração relativa de hemoglobina fetal no lisado de Hemácias foi determinada aos 5 anos de idade e seu valor estratificado conforme Steinberg<sup>17</sup>, em HbFetal  $\geq$  10% ou HbFetal < 10%.



As crianças e responsáveis foram previamente esclarecidos sobre a importância deste estudo, e autorizaram sua participação através da assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

A análise estatística das associações foi feita com aplicação do teste Qui-quadrado considerando-se um nível de significância de 5%, no programa SPSS Statistics® 14.0 (IBM Corporation, Somers, NY, EUA).

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em 09/10/2009 sob Nº 245 e encontra-se em consonância com o estabelecido na Resolução 466/12 Conselho Nacional de Saúde/MS e com o Código de Ética Médica de 1988 (Artigo 122 a 130).

## **RESULTADOS**

Das 110 crianças, 52,7% eram do sexo masculino. A idade média ao final do acompanhamento foi de 11,2 anos, com desvio padrão de 2,84.

Da população do estudo, 60% eram portadores de AF, 33,6% apresentavam genótipo SC e 6,4% eram portadores de S/beta Talassemia (2 crianças com S/b<sup>0</sup> e 5 com S/b<sup>+</sup>). A incidência de AF foi de 1 caso para cada 2857 crianças nascidas vivas e 1 caso de DF tipo SC para cada 5128 nascidos vivos. A renda familiar foi de até 2 salários mínimos em 72,8% dos casos e a escolaridade da mãe, principal cuidadora, atingia o ensino fundamental completo em 60,9%.

A identificação dos haplótipos evidenciou a presença do gene CAR na maioria dos pacientes (89,2%), refletindo a origem da população afrodescendente avaliada neste estudo. Houve a presença de genes atípicos como Senegal e Camarões, anteriormente só descritos na região nordeste do Brasil. Não foi possível definir o haplótipo apenas em 1 criança. Sete crianças (6,4%) não realizaram o exame genético, devido recusa ou não comparecimento para coleta de amostra dentro do prazo estipulado para a pesquisa. Das 66 crianças com AF, 89,4% expressam pelo menos 1 alelo CAR (Tabela 1).

**Tabela 1: Haplótipos identificados nas Crianças com AF**

| Análise da Cadeia Beta Globina | Frequência | %    |
|--------------------------------|------------|------|
| CAR CAR                        | 35         | 53   |
| CAR BEN                        | 20         | 30,3 |
| CAR SEN                        | 1          | 1,5  |
| CAR ATIP                       | 3          | 4,5  |
| ATIP ATIP                      | 1          | 1,5  |
| Não realizado                  | 6          | 9,1  |
| Total                          | 66         | 100  |

A análise de deleções do gene da  $\alpha$  globina evidenciou incidência da  $\alpha$ -Tal em 30,9% dos indivíduos. Foram identificados 26,4% de crianças com deleção de 1 gene e 4,5% com deleção de 2 genes. Na nossa população não foram identificadas crianças com deleção de 3 genes. Em relação à AF, 22,7% das crianças possuem a deleção de 1 gene e 7,6% têm deleção de 2 genes para  $\alpha$ -Tal.

Foram identificadas 19 crianças com AVE, o que representou uma incidência de 17,2%. Destas, 3 casos foram identificados através da RM realizada após manifestação clínica de acidente vascular cerebral. Dezesesseis casos foram identificados pelo DTC, 13 dos quais foi evidenciada elevação das velocidades do fluxo cerebral e áreas de isquemia cerebral identificadas na AngioRM cerebral. O aumento da velocidade do fluxo da artéria cerebral média D e sua estenose foram as alterações mais prevalentes (8 casos). A incidência de AVE entre as crianças com AF foi de 27,3%. Não há nenhum caso de AVE entre as crianças SC e S/b<sup>+</sup>. A idade média do primeiro episódio de AVE foi de 7,7 anos, com mínima de 6 meses e máxima de 15 anos.

A Tabela 2 descreve os fatores associados à presença de AVE. Na amostra analisada somente uma criança com S/beta<sup>0</sup> talassemia manifestou AVE. Crianças com AF tem 12 vezes mais risco de ter AVE do que as que têm outros tipos de DF ( $p = 0,001$ ). A incidência

de AVE entre os meninos foi de 24,1%, contra 9,6% entre as meninas ( $p= 0,044$ ). Os demais fatores não apresentaram associação significativa com AVE.

**Tabela 2: Frequências dos fatores associados à AVE em indivíduos com DF**

| Fatores                                       | Frequência absoluta e |      | Frequência absoluta e  |      | Valor de p |
|---|-----------------------|------|------------------------|------|------------|
|   | percentual nas        |      | percentual de presença |      |            |
|   | variáveis             |      | de AVE                 |      |            |
|   | N                     | %    | N                      | %    |            |
| <b>Tipo de Hemoglobinopatia</b>               |                       |      |                        |      | 0,001      |
| AF  | 66                    | 60   | 18                     | 27,3 |            |
| S/beta <sup>0</sup> , Sbeta <sup>+</sup> , SC | 44                    | 40   | 1                      | 2,3  |            |
| <b>Sexo</b>                                   |                       |      |                        |      | 0,044      |
| Feminino                                      | 52                    | 47,3 | 5                      | 9,6  |            |
| Masculino                                     | 58                    | 52,7 | 14                     | 24,1 |            |
| <b>Alfa Talassemia <sup>(a)</sup></b>         |                       |      |                        |      | 0,164      |
| Presente                                      | 34                    | 32,1 | 3                      | 8,8  |            |
| Ausente                                       | 72                    | 67,9 | 14                     | 19,4 |            |
| <b>Haplótipos <sup>(a)</sup></b>              |                       |      |                        |      | 0,116      |
| CAR   | 91                    | 89,2 | 17                     | 18,7 |            |
| Não CAR                                       | 11                    | 10,8 | 0                      | 0,00 |            |
| <b>Hemoglobina Fetal</b>                      |                       |      |                        |      | 0,293      |
| (≥10%)  | 46                    | 41,8 | 10                     | 21,7 |            |
| (<10%)  | 64                    | 58,2 | 9                      | 14,1 |            |
| <b>Renda Familiar <sup>(b)</sup></b>          |                       |      |                        |      | 0,432      |
| Até 2 SM                                      | 80                    | 74   | 12                     | 15   |            |
| >2SM  | 28                    | 26   | 6                      | 21,4 |            |
| <b>Escolaridade Mãe <sup>(b)</sup></b>        |                       |      |                        |      | 0,329      |
| Fundamental Incompleto                        | 41                    | 38   | 5                      | 12,2 |            |
| Fundamental Completo                          | 67                    | 62   | 13                     | 19,4 |            |
| <b>Escolaridade Pai <sup>(b)</sup></b>        |                       |      |                        |      | 0,491      |
| Fundamental Incompleto                        | 56                    | 51,8 | 8                      | 14,3 |            |
| Fundamental Completo                          | 52                    | 48,2 | 10                     | 19,2 |            |

<sup>(a)</sup> Realizados 106 exames para alfa-tal e 102 para identificação de haplótipos.

<sup>(b)</sup> Aplicados 108 questionários socioeconômicos.

Crianças com AF são mais susceptíveis ao AVE. Por esse motivo, esse grupo foi considerado para verificação de associação de AVE com os demais fatores. Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que apenas a variável sexo apresentou associação significativa com o desfecho ( $p = 0,042$ ).

**Tabela 3: Frequências dos fatores associados à AVE em indivíduos com AF**

| Fatores                                | Frequência absoluta e percentual nas categorias dos fatores |      | Frequência absoluta e percentual de presença de AVE |      | Valor de p |
|--|---|------|---|------|------------|
|  | N   | %    | N   | %    |            |
|  | <b>Tipo de Hemoglobinopatia</b>                             |      |   |      |            |
| AF                                     | 66  | 100  | 18  | 27,3 |            |
| <b>Sexo</b>                            |   |      |   |      |            |
| Feminino                               | 28  | 42,4 | 4   | 14,3 | 0,042      |
| Masculino                              | 38  | 57,6 | 14  | 36,8 |            |
| <b>Alfa Talassemia <sup>(a)</sup></b>  |   |      |   |      |            |
| Presente                               | 20  | 30,3 | 3   | 15   | 0,196      |
| Ausente                                | 43  | 65,2 | 13  | 30,2 |            |
| <b>Haplótipos <sup>(a)</sup></b>       |   |      |   |      |            |
| CAR                                    | 59  | 89,4 | 16  | 27,1 | 0,543      |
| Não CAR                                | 1   | 1,5  | 0   | 0,00 |            |
| <b>Hemoglobina Fetal</b>               |   |      |   |      |            |
| ( $\geq 10\%$ )                        | 41  | 62,1 | 9   | 22   | 0,214      |
| (<10%)                                 | 25  | 37,9 | 9   | 36   |            |
| <b>Renda Familiar <sup>(b)</sup></b>   |   |      |   |      |            |
| Até 2 SM                               | 49  | 74,2 | 12  | 24,5 | 0,593      |
| >2SM                                   | 16  | 24,2 | 5   | 31,3 |            |
| <b>Escolaridade Mãe <sup>(b)</sup></b> |   |      |   |      |            |
| Fundamental Incompleto                 | 18  | 27,3 | 5   | 27,8 | 0,854      |
| Fundamental Completo                   | 47  | 71,2 | 12  | 25,5 |            |
| <b>Escolaridade Pai <sup>(b)</sup></b> |   |      |   |      |            |
| Fundamental Incompleto                 | 27  | 40,9 | 8   | 29,6 | 0,591      |
| Fundamental Completo                   | 38  | 57,6 | 9   | 23,7 |            |

<sup>(a)</sup> Realizados 63 exames para alfa-tal e 60 para identificação de haplótipos.

<sup>(b)</sup> Aplicados 65 questionários socioeconômicos.

## DISCUSSÃO

A complicação mais severa na AF é o AVE, sendo uma das principais causas de morte tanto em crianças quanto em adultos. Apesar de ter alta incidência, as causas e fatores que aumentariam o risco de AVE não são completamente conhecidos. Várias linhas de evidência sugerem que uma assinatura genética poderia influenciar o desenvolvimento de AVE e o efeito combinado destes genes pode afetar a gravidade da DF.<sup>2,6,9,15,18,19</sup>

Flanagan *et. al.* demonstraram uma associação significativa entre  $\alpha$ -Tal, os polimorfismos genéticos SNPs (single-nucleotide polymorphisms) ADCY9 rs2238432 na redução do AVE; 3 SNPs (ANXA2 rs11853426, TEK rs489347 e TGFBR3 rs284875) foram significativamente associados ao aumento do risco de AVE; a deficiência da glicose 6 fosfato desidrogenase e os haplótipos não foram relacionados ao aumento ou redução do risco. Belisário et al descreveram aumento do risco de AVE em pacientes que expressam o TNF-alpha (-308G>A), não evidenciaram associação significativa com a expressão do polimorfismo VCAM-1 (c.1238G>C) e associaram a  $\alpha$ -Tal com redução de AVE. Tais resultados sugerem que a associação entre AVE e polimorfismos permanece controversa<sup>1,2,9,15,20-22</sup>. Neste trabalho foram estudadas as associações entre AVE,  $\alpha$ -Tal e haplótipos e não foram encontrados resultados significativos o que poderia ser decorrente do tamanho reduzido da população do estudo. No nosso estudo não houve relato de AVE entre as crianças portadoras de DF tipo SC e S/beta+ Talassemia, dados consoantes com o Grupo Cooperativo de Estudo em DF<sup>1</sup>.

Cabe ressaltar que a população desta pesquisa é constituída por todas as crianças diagnosticadas com AF (n = 66) na área de abrangência da instituição de saúde que engloba uma população de 730.264 habitantes (CENSO IBGE 2010). Sarnaik e Ballas<sup>11</sup> enfatizaram a importância de estudos multicêntricos com um grande número de pacientes, com e sem AVE,

para determinar a implicação da pesquisa de marcadores genéticos na morbimortalidade na DF.

A incidência de AF, neste estudo, foi de 1 caso para cada 2857 nascidos vivos e 1 caso de DF tipo SC para 5128. Segundo o Ministério da Saúde, a incidência de DF detectada nos PETN foi: Bahia: 1:650, Rio de Janeiro 1:1.300, Pernambuco, Maranhão, MG e Goiás: 1:1.400, Espírito Santo 1:1.800, São Paulo 1:4.000, Rio Grande do Sul 1:11.000, Santa Catarina e Paraná 1:13.500<sup>19</sup>.

Bezerra *et al.*<sup>5</sup> caracterizaram geneticamente uma coorte de 74 crianças com AF em Pernambuco e demonstraram que aproximadamente 65% dos pacientes apresentaram o haplótipo CAR / CAR, uma frequência maior do que as de outros estados na região nordeste do Brasil e superior aos 53% encontrados em nosso estudo. Nesta pesquisa não foi identificado o haplótipo Benin/Benin entre as crianças com AF, resultados semelhantes encontrados no Rio de Janeiro<sup>13,14</sup>. Relatos anteriores mostraram que os haplótipos estão associados com um aumento do risco de AVE<sup>2,11,23,27</sup>. De acordo com os nossos dados, a presença do haplótipo CAR (presente em 89,2%) não foi associada ao desenvolvimento de AVE. Nossos resultados são semelhantes aos de Flanagan *et al.*<sup>22</sup> e Loghetto<sup>24</sup> que não encontraram correlação significativa entre os haplótipos e AVE. Domingos *et al.*<sup>12</sup> em 2011 estudaram população de Pernambuco diferente da de Bezerra *et al.*<sup>5</sup>, com 261 pacientes, sendo 67 deles com AVE e não verificaram associação entre os haplótipos com AVE.

No Brasil, o tipo de deleção que leva à  $\alpha$ -Tal é quase que exclusivamente a do tipo<sup>(-3.7)</sup>  
<sup>9</sup>. A incidência de  $\alpha$ -Tal encontrada nos indivíduos com AF nesta pesquisa foi de 30,3%, considerando deleção de 1 e 2 genes. Estes dados foram semelhantes aos encontrados em Salvador (28,2%) e superiores aos de Figueiredo, que encontrou 18,8% em São Paulo.<sup>4,9</sup>

Vários estudos<sup>12,15,22</sup> mostraram efeito preventivo de  $\alpha$ -Talassemia no desenvolvimento de AVE em crianças com AF. Belisário *et al.*<sup>9</sup> e Hsu *et al.*<sup>10</sup> relatam que a

frequência de  $\alpha$ -Tal foi significativamente maior em pacientes com AF sem alterações ao DTC, sugerindo proteção molecular no desenvolvimento de AVE. Diferentemente, em nossa análise estes marcadores não apresentaram associação significante com risco de AVE, resultados encontrados também por Silva Filho<sup>13</sup> e Sommet et al<sup>6</sup>. Estes achados sugerem uma possível heterogeneidade genética entre populações, o que poderia justificar as diferenças entre os resultados dos estudos. O manual de conduta e manejo de DF “Evidence-Based Management of Sickle Cell Disease” do National Institute of Health (NIH), publicado em 2014 não orienta o rastreamento genético para a prevenção de AVE<sup>25</sup>.

Os fatores socioeconômicos, como renda familiar e escolaridade do cuidador, são descritos como riscos de vulnerabilidade social e determinantes de maiores agravos à saúde da população com DF<sup>3,26,27-29</sup>. Tais relações não foram observadas neste estudo. Em MG, a implantação da política de atenção integral ao paciente com DF propicia um atendimento continuado e multidisciplinar, o que pode ter impactado positivamente, reduzindo os efeitos socioeconômicos sobre o manejo da patologia. (www.cehmob.org.br). (\*\*)

A incidência de AVE foi significativamente maior nas crianças com AF e no sexo masculino, dado já identificado no International Pediatric Stroke Group.<sup>30</sup> A pesquisa da coexistência de presença de  $\alpha$ -Tal e haplótipos neste estudo não evidenciou a correlação na gênese ou na prevenção do AVE. A heterogeneidade entre as populações previamente avaliadas, a não reprodutibilidade entre estudos e a necessidade de identificação de fatores associados ao AVE em pacientes com AF evidenciam a importância de realização de novas pesquisas, considerando esta patologia tratar-se da doença monogênica mais prevalente no mundo e ser uma questão de saúde pública.

(\*\*) Centro de Educação e Apoio para Hemoglobinopatias-MG. www.cehmob.org.br

## REFERÊNCIAS

1. Lobo CLC, Cançado RD, Leite ACCB, Anjos ACM, Pinto ACS, Matta APC et al. Brazilian Guidelines for transcranial doppler in children and adolescents with sickle cell disease. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2011; 33(1):43-48. <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20110014>
2. Balkaran B, Char G, Morris JS, Thomas PW, Serjeant BE, Serjeant GR. Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *J Pediatr.* 1992; 120:360–366.
3. Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin.* 2009; 33:1–16.
4. Okumura JV, Lobo CL, Bonini-Domingos CR. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. *Rev Bras Hematol. Hemoter.* 2013; 35(1):71-2.
5. 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. *Hemoglobin.* 2007; 31:83–88.
6. Sommet J, Alberti C, Couque N, Verlhac S, Haouari Z, Mohamed D et al. Clinical and haematological risk factors for cerebral macrovasculopathy in sickle cell disease newborn cohort: a prospective study. *Br J Haematol.* 2016 Jan 5. doi: 10.1111/bjh.13916
7. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood.* 1998; 91:288–294.
8. Silva Filho IL, Ribeiro GS, Moura PG, Vechi ML, Cavalcante AC, Andrada, Serpa MJ. Sickle cell disease: acute clinical manifestations in early childhood and molecular characteristics in a group of children in Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2012;34(3):196-201.



9. Belisário AR, Nogueira FL, Rodrigues RS, Toledo NE, Cattabriga AL, Velloso-Rodrigues C, et al. Association of alpha-thalassemia, TNF-alpha (-308G>A) and VCAM-1 (c.1238G>C) gene polymorphisms with cerebrovascular disease in a newborn cohort of 411 children with sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2015 Jan; 54(1):44-50. doi: 10.1016/j.bcmd.2014.08.001.
10. 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. Oncol*. 2003; 25: 622–628.
11. Sarnaik SA, Ballas SK. Molecular characteristics of pediatric patients with sickle cell anemia and stroke. *Am. J. Hematol*. 2001; 67:179–182.
12. Domingos IF, Falcão DA, Hatzlhofer BL, Cunha AF et al. Influence of the  $\beta$ s haplotype and  $\alpha$ -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Ann. Hematol*. 2014; 93:1123–1129.
13. Silva Filho IL, Leite AC, Moura PG, Ribeiro GS, Cavalcante AC, Azevedo FC et al. Reply: genetic polymorphisms and cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia from Rio de Janeiro. *Brazil Arq. Neuropsiquiatr*. 2012; 70:648–649.
14. Fleury MK. Determinação dos haplótipos do gene da globina beta em pacientes com anemia falciforme do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. [Internet]. 2001 Apr [cited 2016 Jan 06]; 23(1): 57-58. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842001000100011&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842001000100011&lng=en).  
<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842001000100011>.
15. Kwiatkowski JL, Webb, J. Stroke in patients with sickle cell disease. *Expert. Rev. Hematol*. 2013; 6(3):301–316.

16. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol*, v. 32, p. 66-9, 1989.
17. Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D , Baldwin CT, Sebastiani P, et. al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood* Jul 2011, 118 (1) 19-27; doi: 10.1182/blood-2011-03-32525.
18. Fernandes AP, Januário 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. doi:10.2223/JPED.2005
19. Ministério da Saúde. Doença falciforme: condutas básicas para tratamento. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 64 p.: il. ISBN 978-85-334-1932-2
20. Hoppe C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood*.2004; 103:2391–2396.
21. Sebastiani P, Solovieff N, Hartley SW, Milton JN, Riva A, DworkisDAet al. Genetic modifiers of the severity of sickle cell anemia identified through a genome-wide association study. *Am. J. Hematol*.2010; 85:29–35.
22. Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, Nagasubramanian R et al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2011; 117:6681–6684.
23. Rusanova I, CossioG, Moreno B, Javier PF, De Borace RG, PereaMet al.β-Globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panama. *Am. J. Hum. Biol*.2011;23:377–380.

24. Loghetto SR. Diversidade clínica da anemia falciforme e haplótipos do gene da globina beta-S. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2013;35(3):153-62 DOI: 10.5581/1516-8484.20130048
25. Yawn BP, Buchanan GR, Afenyi-Annan AN, Ballas SK, Hassell KL, James AH, Jordan L, Lanzkron SM, Lottenberg R, Savage WJ, Tanabe PJ, Ware RE, Murad MH, Goldsmith JC, Ortiz E, Fulwood R, Horton A, John-Sowah J. Management of sickle cell disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. *JAMA.* 2014; 312:1033–1048.
26. Fernandes TAA de M, Medeiros TMD de, Alves JJP, et al. Socioeconomic and demographic characteristics of sickle cell disease patients from a low-income region of northeastern Brazil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2015; 37(3):172-177.
27. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br. J. Haematol.* 2005; 129:465–481.
28. Robinson MR, Daniel LC, O'Hara EA, Szabo MM, Barakat LP. Insurance Status as a Sociodemographic Risk Factor for Functional Outcomes and Health-related Quality of Life Among Youth With Sickle Cell Disease. *J.Ped. Hematol. Oncol.* 2014; 36(1):51-56.
29. Sabarense AP, Lima GO, Silva LML, Viana MB. Caracterização do óbito de crianças com doença falciforme diagnosticadas por Programa de Triagem Neonatal. *J Pediatr.* 2015; 91:242-7 doi: 10.1016/j.jpdp.2015.03.009
30. Golomb MR, Fullerton HJ, Nowak-Gottl U, Deveber G. International Pediatric Stroke Study Group. Male predominance in childhood ischemic stroke: findings from the international pediatric stroke study. *Stroke*, 2009 Jan;40(1):52-7. Epub 2008 Sep 11 doi:10.1161/STROKEAHA.108.521203.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os recentes avanços na compreensão da fisiopatologia da doença falciforme trouxeram contribuições importantes para a abordagem de complicações graves como o acidente vascular encefálico. O conhecimento de fatores de risco como determinantes genéticos de hemólise acentuada, e detecção de risco elevado para o AVE isquêmico pelo DTC podem nortear as estratégias para modulação da doença e a redução das lesões a órgãos nobres como cérebro, rins e pulmões.

O presente estudo pretende constituir-se em fonte de dados referentes à frequência dos haplótipos  $\beta$ S e prevalência de  $\alpha$ -Tal em pacientes com doença falciforme em Minas Gerais associando-se aos estudos pioneiros de BELISÁRIO (2010). A identificação dos haplótipos  $\beta$ S e a investigação dos genótipos de  $\alpha$ -Tal poderão ser utilizados como marcadores prognósticos da doença em associação com outras características clínicas e hematológicas. Adicionalmente, estas informações podem ser úteis no estudo de populações, origem e evolução humana. Na população estudada nesta pesquisa, das 110 crianças, 52,7% eram do sexo masculino e a idade média ao final da pesquisa era de 11,2 anos. O diagnóstico de Anemia Falciforme foi identificado em 60% dos casos, 33,6% possuíam o genótipo SC e 6,4% eram portadores de Sbetatalassemia.

O Brasil possui diferenças regionais significativas na distribuição dos haplótipos  $\beta$ S, que pode ser explicada pela origem dos escravos africanos que desembarcaram em cada região durante o período colonial. Durante os anos de 1514 a 1866, aproximadamente 4,9 milhões africanos vieram para o Brasil. Para o estado da Bahia, vieram escravos principalmente da Baía 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. Esses dados explicam o pequeno predomínio do haplótipo Ben em

relação ao CAR no estado da Bahia e o predomínio absoluto do haplótipo CAR no Rio de Janeiro. O haplótipo Sen, encontrado no Pará e Amazonas e incomum em outras regiões, certamente é derivado de escravos embarcados na Senegâmbia. De acordo com dados históricos, o estado de Minas Gerais recebeu escravos desembarcados no Rio de Janeiro e Salvador. Nosso estudo está em concordância com esses dados históricos, que sugerem ainda uma ligeira predominância de escravos vindos do Rio de Janeiro para a região de Juiz de Fora (MG). A identificação dos haplótipos evidenciou neste estudo a presença do gene CAR em 89,2% das crianças.

No Brasil, a prevalência de  $\alpha$ -Tal se relaciona diretamente com as diferentes etnias estrangeiras que formaram e compõem a população de determinada região. A deleção causadora de  $\alpha$ -Tal em todos os estudos realizados no Brasil foi a do tipo  $-\alpha$  3.7 (CANÇADO,2006). Estima-se que na população afrodescendente, essa frequência pode alcançar 20% a 25%. A  $\alpha$ -Tal é uma das hemoglobinopatias de diagnóstico mais difícil pois o diagnóstico molecular é a única forma de confirmar o genótipo e diferenciar os tipos de deleção que a causam. No Brasil, poucos estudos estimaram a prevalência de  $\alpha$ -Tal em indivíduos com DF e menos estudos ainda avaliaram os efeitos advindos da interação da mesma sobre dados clínicos. A prevalência de  $\alpha$ -Tal do tipo  $-\alpha$  3.7, em heterozigose ou homozigose, atingiu 30,9% das crianças neste estudo. A avaliação dos níveis de Hb Fetal evidenciou que 58,2% das crianças tinham concentração de Hb fetal abaixo de 10%.

Em relação aos fatores socioeconômicos estudados foi identificado que a mãe é a principal cuidadora, com nível de escolaridade até o ensino fundamental em 60,9% das famílias com renda mensal de até 2 salários mínimos (72,8%).

No nosso estudo a incidência de AVE foi de 17,2% e significativamente maior nas crianças com AF (27,3%) e no sexo masculino (24,1%). A pesquisa da coexistência de

presença de  $\alpha$ -Tal e haplótipos neste estudo não evidenciou a correlação na gênese ou na prevenção do AVE ( $p = 0,164$  e  $p = 0,166$  respectivamente). Ressalte-se que a amostra de crianças proveio de uma única fonte de diagnóstico (PETN-MG) e o acompanhamento seguiu o mesmo protocolo de tratamento num único ambulatório (Fundação Hemominas), o que reforça as conclusões do estudo. Uma limitação deste estudo foi a utilização de registros médicos como fonte de dados retrospectivos, considerando que esses registros foram gerados para acompanhamento clínico e não para realização de pesquisa e ao tamanho limitado da amostra.

Outros polimorfismos em diversos genes vêm sendo identificados como marcadores de gravidade, mas nenhum, isoladamente, prediz, com segurança, o prognóstico da DF. 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 ideia de que outros genes possam afetar a evolução clínica dos pacientes com DF não é nova, mas a identificação destes genes e encontrar provas de seu envolvimento tem sido difícil. Novos estudos, por exemplo, usando a rede Bayesiana podem ser ferramentas inovadoras e úteis neste tipo de pesquisa, trazendo conhecimento adicional sobre como tratar essa doença tão grave.

## REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, J. Anemia Falciforme. *Arq Univ Bahia*,1947; 1:169
- ADAMS, R. J.; KUTLAR, A.; MCKIE, V.; CARL, E.; NICHOLS, F. T.; LIU, J. C.; *et al.* Alpha Thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. *Am J Hematol* 1994 Apr; 45(4):279-82.
- ADAMS, R. J.; MCKIE, V. C.; 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 Med* 1998 Jul 2; 339(1):5-11. 163.
- ADEKILE, A. Mild-phenotype sickle cell disease: molecular basis, clinical presentation and management recommendations. *Current Paediatrics*,2005; 15: 57-61.
- ADEKILE, A. D.; TULI, M.; HAIDER, M. Z.; 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 Hematol* 1996 Sep;53(1):1-5.
- ADORNO, E. V.; COUTO, F. D.; *et al.* Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad Saude Publica* 2005;21(1): 292-8.
- ADORNO, E. V.; ZANETTE, A.; LYRA, I.; SEIXAS, M. O.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. *Genet Mol Biol* 2008;31(3):621-5.
- ADORNO, E.V.; ZANETTE, A.; LYRA, I.; SOUZA, C. C.; SANTOS, L. F.; MENEZES, J. F.; *et al.* The beta globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. *Hemoglobin* 2004 Aug;28(3):267-71.
- AKINSHEYE, I.; ALSULTAN, A.; SOLOVIEFF, N.; NGO, D.; BALDWIN, C. T.; SEBASTIANI, P.; *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood* Jul 2011, 118 (1) 19-27; doi: 10.1182/blood-2011-03-32525.
- ALLISON, A.C. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J.* 1954 Feb;1(4857):290-4.
- ALMEIDA A.M.; GODINHO, T.M.; TELES, M.S.; REHEM, A.P.P.; JALIL, H.M.; FUKUDA,T.G.; *et al.* Avaliação do Programa de Triagem Neonatal na Bahia no ano de 2003. *Rev Bras Saude Mater Infant*, 2006; 1(6): 85-91.
- ARAGON, M.G.; *et al.* Incidência de anemia falciforme diagnosticada através do teste do pezinho na região metropolitana de Belém, fevereiro de 2002 a março de 2006. *Rev. Para. Med.*2006; Belém, v.20, n.2, p.70, Jun.
- ARAÚJO, M. C. P. E.; SERAFIM, S. S. *et al.* Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. *Cad. Saude Publica*, 2004; 20(1): 123-128.

ASHLEY-KOCH, A.; YANG, Q., *et al.* Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000;151(9): 839-45.

BALKARAN, B.; CHAR, G.; MORRIS, J. S.; THOMAS, P. W.; SERJEANT, B. E.; SERJEANT, G. R. Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *J Pediatr*. 1992; 120:360–366.

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

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

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

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

BELISÁRIO, A. R.; MARTINS, M. L.; BRITO, A. M. S.; VELLOSO-RODRIGUES, C.; SILVA, C. M.; VIANA, M. B. Beta-globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or S $\beta$ 0-thalassemia and its association with clinical and hematological features. *Acta Haematologica*, 2010; v. 124, p. 162-170.

BELISARIO, A R; MARTINS, M.L; Velloso-Rodrigues, C; SILVA, C.M; VIANA, M.B . Alpha-thalassemia protects against cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, São Paulo , v. 70, n. 8, p. 645, Aug. 2012 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-282X2012000800020&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2012000800020&lng=en&nrm=iso)>. access on 04 Apr. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2012000800020>

BELISÁRIO, A. R.; SALES, R. R.; TOLEDO, N. E.; VELLOSO-RODRIGUES, C ; SILVA, C. M. ; Viana, Marcos Borato . Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Brazilian Children With Sickle Cell Anemia is not Associated With Clinical Ischemic Stroke or High-Risk Transcranial Doppler. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 63, p. n/a-n/a, 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.25924>

BELISÁRIO, A. R.; NOGUEIRA, F. L.; RODRIGUES, R. S.; TOLEDO, N. E.; CATTABRIGA, A. L.; VELLOSO-RODRIGUES, C.; *et al.* Association of alpha-thalassemia, TNF-alpha (-308G>A) and VCAM-1 (c.1238G>C) gene polymorphisms with cerebrovascular disease in a newborn cohort of 411 children with sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2015 Jan; 54(1):44-50. doi: 10.1016/j.bcnd.2014.08.001.

BELISÁRIO, A. R.; RODRIGUES, C. V; MARTINS, M.L; SILVA, C.M; VIANA, M. B. Coinheritance of alpha-Thalassemia Decreases the Risk of Cerebrovascular Disease in a Cohort of Children with Sickle Cell Anemia. *Hemoglobin* 2010, v. 34, p. 516-529.



BELISÁRIO, A. R.; VIANA, M. B.. Efeitos da Talassemia Alfa nas manifestações clínicas e hematológicas da Anemia Falciforme: uma revisão sistemática. *Revista Médica de Minas Gerais* (Belo Horizonte) 2011, v. 21, p. 319-330.

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. *Blood* 2008 Nov 15;112(10):4314-7.

BEZERRA, M. A.; SANTOS, M. N.; ARAUJO, A. S.; GOMES, Y. M.; ABATH, F. G.; BANDEIRA, F.M. Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. *Hemoglobin*. 2007; 31:83–88.

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

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença falciforme: condutas básicas para tratamento. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 64 p.: il. ISBN 978-85-334-1932-2.

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

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007;29(3):203-6.

CASTRO, O.; BRAMBILLA, D. J.; THORINGTON, B.; REINDORF, C. A.; SCOTT R. B.; GILLETTE, P.; *et al.* The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1994 Jul 15;84(2):643-9.

CHANG, Y. C.; SMITH, K. D.; MOORE, R. D.; SERJEANT, G. R.; DOVER, G. J. 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* 1995 Feb 15;85(4):1111-7.

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

CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; COSTA, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*. 2009; 33:1–16.

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

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

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

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

DE CEULAER, K.; HIGGS, D. R.; WEATHERALL, D. J.; HAYES, R. J.; SERJEANT B. E.; SERJEANT, G. R. Alpha Thalassemia reduces the hemolytic rate in homozygous sickle-cell disease. *N Engl J Med*,1983; Jul 21;309(3):189-90.

DE CEULAER, K.; SERJEANT, G. R. Acute splenic sequestration in Jamaican adults with homozygous sickle cell disease: a role of alpha thalassaemia. *Br J Haematol* 1991 Apr;77(4):563-4.

DINIZ, D.; GUEDES, C.; et al. Prevalência do traço e da anemia falciforme em recém-nascidos do Distrito Federal, Brasil, 2004 a 2006. *Cad. Saúde Pública*, 2009; 25(1): 188- 194.

DI NUZZO, D.V.P.; FONSECA, S.F. Anemia falciforme e infecções. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro,2004; v.80, n.5, p.347-354.

DOMINGOS, I. F.; FALCÃO, D. A.; HATZLHOFER, B. L.; CUNHA, A. F.; *et al.* Influence of the  $\beta$ s haplotype and  $\alpha$ -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Ann. Hematol.* 2014; 93:1123–1129.

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

EMBURY, S. H.; CLARK, M. R.; MONROY, G.; MOHANDAS, N. Concurrent sickle cell anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes. *J Clin Invest*,1984; Jan;73(1):116-23.

EMBURY, S. H.; DOZY, A. M.; MILLER, J.; DAVIS, J. R.; KLEMAN, K. M.; PREISLER, H.; *et al.* Concurrent sickle-cell anemia and alpha-thalassemia: effect on severity of anemia. *N Engl J Med*,1982; Feb 4;306(5):270-4.

ESTIMATES DATABASE. Voyages: The transatlantic slave trade database. <http://www.slavevoyages.org/tast/assessment/estimates.faces>,2010. (acessado em 25 de Junho de 2015).

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

FELICE, A. E.; MCKIE, K. M.; CLEEK, M. P.; MARINO, E. M.; KUTLAR, A.; MCKIE, V. C. Effects of alpha-thalassemia-2 on the developmental changes of hematological values in children with sickle cell disease from Georgia. *Am J Hematol* 1987 Aug;25(4):389-400.

FERNANDES, A. P.; JANUÁRIO, J. N.; CANGUSSU, C. B.; DE MACEDO, D. L.; VIANA, M. B. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. *J Pediatr (Rio J)*. 2010;86(4):279-284. doi:10.2223/JPED.2005

FERREIRA, A.; MARGUITI, I.; BECHMANN, I.; JENEY, V.; CHORA, A.; PALHA, N.R; *et al.* Sickle Hemoglobin Confers Tolerance to Plasmodium Infection. *Cell* 2011 Apr;145 (3):398-409 DOI: [10.1016/j.cell.2011.03.049](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.049)

FIGUEIREDO, M.S. Efeitos da talassemia alfa e dos haplótipos do complexo da glicemia beta nas alterações clínicas e laboratoriais da anemia falciforme no Brasil, São Paulo. Tese (Doutorado). Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1993.

FIGUEIREDO, M. S.; KERBAUY, J.; GONCALVES, M. S.; ARRUDA, V. R.; SAAD, S. T.; SONATI, M. F.; *et al.* Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *Am J Hematol*, 1996; Oct;53(2):72-6.

FLANAGAN, J. M.; FROHLICH, D. M.; HOWARD, T. A.; SCHULTZ, W. H.; DRISCOLL, C.; NAGASUBRAMANIAN, R.; *et al.* Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2011; 117:6681–6684.

FLEURY, M. K. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais. *Rev Bras Anal Clin*, 2007;39(2): 89-93

FLEURY, M. K. Determinação dos haplótipos do gene da globina beta em pacientes com anemia falciforme do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* [Internet]. 2001 Apr [cited 2016 Jan 06] ; 23( 1 ): 57-58. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842001000100011&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842001000100011&lng=en).

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

GÓMEZ-CHIARI M. *et al.* Drepanocytosis: experiência de um centro. *An Pediatra*. 2003; v.58, p.95-99.

GONÇALVES, M.S; BONFIM, G.C; MACIEL, E; CERQUEIRA, I; LYRA, I, ZANETTE, A; *et al.* Beta S-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36:1283-8.

GONÇALVES, M.S; NETCHMAN, J.F; FIGUEIREDO, M.S; KERBAUY, J; ARRUDA, V.R, SONATI, M.F *et al.* Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the beta s haplotypes. *Hum Hered*. 1994;44(6):322-7.

GILL, F. M.; SLEEPER, L. A.; WEINER, S. J.; BROWN, A. K.; 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. *Blood* 1995 Jul 15;86(2):776-83.

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

HAGAR, W.; VICHINSKY, E. Advances in clinical research in sickle cell disease. *Br J Haematol*,2008; 141(3): 346-56.

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

HANKINS, J. S.; FORTNER, G. L.; MCCARVILLE, M. B.; SMELTZER, M. P.; WANG, W. C.; LI, C. S.; *et al.* The natural history of conditional transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2008 Jul;142(1):94-9.

HIGGS, D. R.; ALDRIDGE, B. E.; LAMB, J.; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J.; HAYES, R. J.; *et al.* The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. *N Engl J Med* 1982 Jun 17;306(24):1441-6.

HIGGS, D. R.; VICKERS, M. A.; WILKIE, A. O.; PRETORIUS, I. M.; JARMAN, A. P.; WEATHERALL, D. J. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood* 1989 Apr;73(5):1081-104.

HOPPE, C.; KLITZ, W.; CHENG, S.; APPLE, R.; STEINER, L.; ROBLES, L.; *et al.* Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2004; 103:2391–2396.

HSU, L. L.; MILLER, S. T.; 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. Oncol.* 2003; 25: 622–628. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842001000100011>.

JACKSON, F.L. C. *The Sickle Cell: From Myths to Molecules*, by Stuart Edlestein. Harvard University Press: Medical Anthropology Quarterly. 1986;197, Cambridge.

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

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

KASSAB, M.Y.; MAJID, A.; FAROOQ, M.U.; AZHARY, H.; HERSHEY, L.A, BEDNARCZYK, E.M.; GRAYBEAL, D.F.; JOHNSON, M.D. Transcranial Doppler: An Introduction for Primary Care Physicians. *J Am Board Fam Med* 2007; 20:65–71.

KIRKHAM, F. J. et al. Nocturnal hypoxaemia and central-nervous-system events in sickle-cell disease. *Lancet*,2001; v. 357, n. 9269, p. 1656-1659.

KWIATKOWSKI, J. L.; WEBB, J. Stroke in patients with sickle cell disease. *Expert. Rev. Hematol.*2013; 6(3):301–316.

KWIATKOWSKI, J. L.; 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 Oncol* 2004 May;26(5):323-6.

LABIE, D.; PAGNIER, J. et al. 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 SciUSA*,1985; 82(7): 2111-4.

LAPOUMEROULIE, C.; DUNDA, D.; et al. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Hum Genet* 1992; 89(3): 333-7.

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

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

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

LOBO, C. L. C.; CANÇADO, R. D.; LEITE, A. C. C. B.; ANJOS, A. C. M.; PINTO, A. C. S.; MATTA, A. P. C.; et al. Brazilian Guidelines for transcranial doppler in children and adolescents with sickle cell disease. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*2011; 33(1):43-48. <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20110014>

LOGHETTO, S. R. Diversidade clínica da anemia falciforme e haplótipos do gene da globina beta-S. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*2013;35(3):153-62 DOI: 10.5581/1516-8484.20130048.

LYRA, I. M.; GONCALVES, M. S.; BRAGA, J. A.; GESTEIRAMDE, F.; CARVALHO, M. H.; SAAD, S. T.; et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cad Saúde Pública*,2005; Jul-Aug;21 (4):1287-90

MANCI EA, C.D.;YANG Y.M.; GARDNER, T.M.; POWELL,R.; HAYNESS, J.R.; et al. Causes of death in sickle cell disease: an autopsy study. *Br J Haematol.* 2003;123:359-65.

MARTINEZ, G.; MUNIZ, A.; SVARCH, E.; ESPINOSA, E.; NAGEL, R. L. Age dependence of the gene frequency of alpha-thalassemia in sickle cell anemia in Cuba. *Blood* 1996 Sep 1;88(5):1898-9.

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

MESSMANN, R.; S. GANNON,S.; *et al.* Mechanical properties of sickle cell membranes. *Blood*,1990; 75(8): 1711-7.

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 Med* 2000 Jan 13;342(2):83- 9.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Triagem Neonatal. 2009 [http://www.portal.saude.gov.br/portal/sas/mac/area.cfm?id\\_area=830](http://www.portal.saude.gov.br/portal/sas/mac/area.cfm?id_area=830) (acessado em 30/março/2013).

MOUELE, R.; V. BOUKILA,V. Sickle-cell disease in Brazzaville, Congo: genetical, hematological, biochemical and clinical aspects. *Acta Haematol*,1999; 101(4): 178-84.

MOUELE, R.; PAMBOU, O.; FEINGOLD, J.; GALACTEROS, F. Alpha-thalassemia in Bantu population from Congo-Brazzaville: its interaction with sickle cell anemia. *Hum Hered* 2000 Mar-Apr;50(2):118-25.

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

MOSER, F.G.; MILLER, S.T.; BELLO, J.A.; PEGELOW, C.H.; ZIMMERMAN, R.A.; WANG, W.C.; OHENE-FREMPONG, K.; SCHWARTZ,A.; VICHINSKY, E.P.; GALLAGHER, D.; KINNEY, T.R. The Spectrum of Brain MR Abnormalities in Sickle-Cell Disease: A Report from the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *AJNR* 1996; 17:965–972.

MUKHERJEE, M. B.; COLAH, R. B.; GHOSH, K.; MOHANTY, D.; KRISHNAMOORTHY, R. Milder clinical course of sickle cell disease in patients with alpha thalassemia in the Indian sub continent. *Blood* 1997 Jan 15;89(2):732.

MUKHERJEE, M. B.; SURVE, R.; TAMANKAR, A.; GANGAKHEDKAR, R. R.; GHOSH, K.; LU, C. Y.; *et al.* The influence of alpha-thalassaemia on the haematological & clinical expression of sickle cell disease in western India. *Indian J Med Res* 1998 Apr;107: 178-81.

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

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

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

NAGEL, R. L.; RANNEY, H.M. Genetic epidemiology of structural mutations of the beta-globin gene. *Semin Hematol*,1990; 27(4): 342-59.

NAOUM, P.C. Hemoglobinopatias no Estado de São Paulo. Métodos de estudo, prevalência, distribuição geográfica, e relações históricas e antropológicas. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP. São José do Rio Preto, 1983.

NAOUM, P. C. Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo,1997. Sarvier.

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

NEONATO, M. G.; 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 Haematol* 2000 Sep; 65(3):155-64.

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

OHENE-FREMPONG, K.; WEINER, S. J.; SLEEPER, L. A.; MILLER, S. T.; EMBURY, S.; MOOHR, J. W.; *et al.* Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*. 1998; 91:288–294.

OKUMURA, J. V.; LOBO, C. L.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. *Rev Bras Hematol.Hemoter.*2013; 35(1):71-2.

NUPAD - Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico. Triagem Neonatal; 2009. <http://www.nupad.medicina.ufmg.br> (acessado em 28/maio/2014).

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

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

PLATT, O. S.; THORINGTON,B.D.; *et al.* Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med* ,1991; 325(1): 11-6.

POWARS, D. R. Sickle cell anemia: beta s-gene-cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ failure. *Semin Hematol*, 1991;28(3): 202-8.

POWARS, D.; CHAN, L.S.; *et al.* The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. *Semin Hematol*,1990; 27(4): 360-76.

POWARS, D; HITI, A. Sickle cell anemia. Beta s gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *Am J Dis Child* 1993; 147(11): 1197-202.

POWARS, D.; WILSON, B.; ET AL. The natural history of stroke in sickle cell disease. *Am J Med*, 1978; 65(3): 461-71.

QUINN, C. T.; ROGERS, Z. R.; et al. Survival of children with sickle cell disease. *Blood*, 2004 103(11): 4023-7.

RAMALHO, A.S. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/ CNPq. 1986; v.1, 160f.

RAMALHO, A.S.; MAGNA, L.A.; PAIVA E SILVA, R.B. A portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. *Bras Hematol Hemot*. 2002; 24(4):244-50.

RAMALHO, A.S.; PAIVA e SILVA, R.B. Community Genetics: a new discipline and its application in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 2000; v. 16, p. 261-263.

REED, W.; VICHINSKY, E. P. New considerations in the treatment of sickle cell disease. *Annu. Rev. Medicine*, 1998; v.49, p.461-474.

REZENDE, P. V.; VIANA, M. B.; MURAO, M.; CHAVES, A. C.; RIBEIRO, A. C. Acute splenic sequestration in a cohort of children with sickle cell anemia. *J Pediatr (Rio J)* 2009 MarApr;85(2):163-9.

ROBINSON, M. R.; DANIEL, L. C.; O'HARA, E. A.; SZABO, M. M.; BARAKAT, L. P. Insurance Status as a Sociodemographic Risk Factor for Functional Outcomes and Health-related Quality of Life Among Youth With Sickle Cell Disease. *J.Ped. Hematol. Oncol*.2014; 36(1):51-56.

RODRIGUES,D.O.W.;FERREIRA,M.C.B.;TEIXEIRA,M.T.B.;AMPOS,E.M.S.; PEREIRA, P.M.; OLIVEIRA, C.M. Diagnóstico Histórico da Triagem Neonatal para Doença Falciforme Rev. APS, Juiz de Fora, 2010; 13(1):34-45.

RUND, D.; FUCHAROEN, S. Genetic modifiers in hemoglobinopathies. *Curr Mol Med* 2008 Nov;8(7):600-8.

RUSANOVA, I.; COSSIO, G.; MORENO, B.; JAVIER, P. F.; DE BORACE, R. G.; PEREA M.; et al.  $\beta$ -Globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panama. *Am. J. Hum. Biol*.2011;23:377–380.

SABARENSE, A. P.; LIMA, G. O.; SILVA, L. M. L.; VIANA, M. B. Caracterização do óbito de crianças com doença falciforme diagnosticadas por Programa de Triagem Neonatal. *J Pediatr* .2015;91:242-7 doi: 10.1016/j.jpdp.2015.03.009

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIN, N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985; 230:1350-4

SAMARAH, F; AYESH, S, ATHANASIOU, M; CHRISTAKIS, J; VAVATSI, N. Beta(S)-Globin gene cluster haplotypes in the West Bank of Palestine. *Hemoglobin*. 2009;33(2):143-9. doi: 10.1080/03630260902861873.



SARNAIK, S. A.; BALLAS, S. K. Molecular characteristics of pediatric patients with sickle cell anemia and stroke. *Am. J. Hematol.* 2001; 67:179–182.

SCHROEDER, W. A.; POWARS, D. R.; et al. Beta-cluster haplotypes, alpha-gene status, and hematological data from SS, SC, and S-beta-thalassemia patients in southern California. *Hemoglobin*, 1989; 13(4): 325-53

SEBASTIANI, P.; SOLOVIEFF, N.; HARTLEY, S. W.; MILTON, J. N.; RIVA, A.; DWORKIS, D. A. *et al.* Genetic modifiers of the severity of sickle cell anemia identified through a genome-wide association study. *Am. J. Hematol.* 2010; 85:29–35.

SERJEANT, G. R. Sickle cell disease. New York, Oxford University Press, 1992

SERJEANT, G. R. Sickle-cell disease. *Lancet.* 1997; 50:725-30.

SERJEANT, B. E.; MASON, K. P.; et al. Effect of alpha thalassaemia on the rheology of homozygous sickle cell disease. *Br J Haematol* 1983; 55(3): 479-86.

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

SERJEANT, G. R.; SOMMEREUX, A. M.; *et al.* Comparison of sickle cell-beta<sup>0</sup> thalassaemia with homozygous sickle cell disease. *Br J Haematol*, 1979; 41(1): 83-93

SILVA, C. M. 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 Doutorado] pp 125.

SILVA FILHO, I. L.; LEITE, A. C.; MOURA, P. G.; RIBEIRO, G. S.; CAVALCANTE, A. C.; AZEVEDO, F. C.; *et al.* Reply: genetic polymorphisms and cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia from Rio de Janeiro. *Brazil Arq. Neuropsiquiatr.* 2012; 70:648–649.

SILVA FILHO, I. L.; RIBEIRO, G. S.; MOURA, P. G.; VECHI, M. L.; CAVALCANTE, A. C.; ANDRADA SERPA, M. J. Sickle cell disease: acute clinical manifestations in early childhood and molecular characteristics in a group of children in Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2012; 34(3): 196-201.

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

SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. *Rev Bras de Hem e Hemot*, 2006; 28(2), 144-148.

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

SOMMET, J.; ALBERTI, C.; COUQUE, N.; VERLHAC, S.; HAOUARI, Z.; MOHAMED, D.; et al. Clinical and haematological risk factors for cerebral macrovasculopathy in sickle cell disease newborn cohort: a prospective study. *Br J Haematol*. 2016 Jan 5. doi: 10.1111/bjh.13916.

STEINBERG, M. H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *Scientific World Journal* 2009;9:46-67.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br. J. Haematol*. 2005; 129:465–481.

STEINBERG, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Scientific World Journal* 2008;8:1295- 324. 2.

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

STEINBERG, M. H.; COLEMAN, M. B.; ADAMS, J. G.; ROSENSTOCK, W. Interaction between HB S beta-o-thalassemia and alpha-thalassemia. *Am J Med Sci* 1984 Dec;288(5):195-9. 164

STEINBERG, M. H.; HSU, H.; NAGEL, R. L.; MILNER, P. F.; ADAMS, J. G.; BENJAMIN, L.; et al. Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. *Am J Hematol* 1995 Mar;48(3):175-81.

STEVENS, M. C.; MAUDE, G. H.; BECKFORD, M.; GRANDISON, Y.; MASON, K.; TAYLOR, B.; et al. Alpha thalassemia and the hematology of homozygous sickle cell disease in childhood. *Blood* 1986 Feb;67(2):411-4.

STUART, M. J.; NAGEL, R.L. (2004). Sickle-cell disease. *Lancet* 2004;364(9442): 1343-60.

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

SWITZER J.A.; HESS D.C.; NICHOLS F.T.; ADAMS R.J. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. *Lancet Neurol*. 2006;5(6):501–512

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R. L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol*, v. 32, p. 66-9, 1989.

TAN, A. S.; QUAH, T. C.; LOW, P. S.; CHONG, S. S. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 2001 Jul 1;98:250-1.

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

TELFER, P.; et al. Clinical outcomes in children with sickle cell disease living in England: a neonatal cohort in East London. *Haematologica*,2007; v.92, n.7, p-905-912.

THEIN, S. L.; MENZEL, S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *Br J Haematol*, 2009; 145(4): 455-67.

THOMAS, P. W.; HIGGS, D. R.; SERJEANT, G. R. Benign clinical course in homozygous sickle cell disease: a search for predictors. *J Clin Epidemiol* 1997 Feb;50(2):121-6.

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

WALI, Y. A.; AL-LAMKI, Z.; HUSSEIN, S. S.; 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. *PediatrHematol Oncol* 2002 Oct-Nov;19(7):491-500.

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

WEATHERALL, D. J; CLEGG, J.B. Genetic disorders of hemoglobin. *Semin Hematol* 1999; 36(4 Suppl 7): 24-37.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ* , 2001;79(8): 704-12.

WENNING, M. R.; KIMURA, E.M, et al. (2000). Alpha-globin genes: thalassaemic and structural alterations in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 2000;33(9): 1041-5.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sickle cell anaemia. Report by the secretariat, Executive Board 117 th session. 2005; 5

VYAS, P.; HIGGS, DR.; WEATHERALL, DJ.; DUNN, D.; SERJEANT, B. E.; SERJEANT, G. R. The interaction of alpha thalassaemia and sickle cell-beta zero thalassaemia. *Br J Haematol* 1988 Dec;70(4):449-54

YAWN, B. P.; BUCHANAN, G. R.; AFENYI-ANNAN, A. N.; BALLAS, S. K.; HASSELL, K. L.; JAMES, A. H.; et al. Management of sickle cell disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. *JAMA*. 2014; 312:1033–1048.

ZAGO, M. A.; FIGUEIREDO, M.S. Bantu beta S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. *Am J Phys Anthropol* 1992 88(3): 295-8. 128

ZAGO, M. A; PINTO, A.C.S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2007. 29(3): 207-214

**ANEXOS**

## ANEXO A - Metodologia de coleta para o teste do pezinho adotada pelo Nupad/UFMG

O teste do pezinho deve ser realizado em uma sala ou ambiente tranquilo e é importante que os pais sejam orientados sobre a finalidade deste teste. Para a realização da triagem neonatal, é fundamental que a equipe de saúde esteja treinada e que todo o material necessário esteja disponível. O “Manual de Organização e Normas Técnicas para Triagem Neonatal” produzido pelo NUPAD (1998) contém todos os procedimentos técnicos e administrativos relevantes. Este manual é referência para a Hemominas. Os materiais necessários para coleta do teste do pezinho são: luvas de procedimento, recipiente com álcool a 70%, pacotes de gaze esterilizada ou algodão, lancetas esterilizadas descartáveis e com ponta triangular, envelopes com papel filtro, pregadores de roupa, caneco de alumínio (capacidade de 1 litro), ebulidor elétrico ou fogão, bolsa de água quente (20 x 25cm) e garroteador de borracha (o mesmo para punção venosa). Este teste deve ser realizado da seguinte forma:

1) Registro dos dados: Antes da coleta deve-se preencher os dados da criança, com letra legível e sem abreviaturas e com caneta esferográfica no livro de registro, no envelope branco e no papel filtro. Se a criança ainda não tem nome, colocar: recém-nascido de (nome da mãe). Os seguintes dados são necessários: nome completo, endereço completo; data de nascimento, data da coleta, Unidade de Saúde e código da Unidade.

2) Aquecimento do pé do recém-nascido: Ferver ½ litro de água, com ebulidor ou no fogão e acrescentar ½ litro de água da torneira. Esta mistura atinge em média 53° C e ao ser colocada na bolsa, reduz para 44°. Antes de se colocar a mistura na bolsa, verificar se a mesma está fria. Retirar todo o ar da bolsa, para facilitar sua dobra ao ser colocada no pé do bebê. Conferir com a mão se a temperatura não está muito excessiva. Manter o pé a ser aquecido coberto com uma peça fina (meia, sapatinho) e o outro também. Dobrar a bolsa de modo a envolver o pé, fixando-a com um garroteador de borracha ou elástico. Deixar a bolsa de água quente por 5 minutos. Manter a criança com o pé abaixo do nível do coração. Este procedimento só deverá ser realizado quando necessário e sob atenta supervisão de todos os passos, a fim de evitar queimaduras no pé da criança.

3) Posição e Antissepsia: A mãe ou pai deve ficar em pé e segurar a criança em posição vertical (de arrotado) ou inclinada (de mamada). O técnico deve estar sentado e próximo à mesa com o material. Após retirar a bolsa de água quente, realizar a antissepsia com álcool a 70% embebido em algodão ou gaze.

4) Punção - local e técnica: Lavar as mãos e calçar as luvas de procedimento. Envolver o pé e o tornozelo da criança com os dedos indicador e polegar, deixando exposta apenas a área do calcanhar a ser puncionada. A punção deve ser feita em uma das áreas laterais da região plantar do calcanhar, para evitar atingir o osso calcâneo. Após a antissepsia e a secagem do álcool, penetrar toda a porção triangular da lanceta (ponta) no local escolhido, de modo a realizar um pequeno corte, pouco profundo. Fazer suavemente com a lanceta, um movimento de rotação para a esquerda e para a direita, para alargar o corte. Retire com algodão seco ou gaze a primeira gota que começa a se formar. Aguarde a formação de uma grande gota. Fazer uma compressão leve com os dedos indicador e polegar envolvendo o calcanhar, seguida por uma descompressão. Esta manobra visa aumentar a circulação sanguínea e obter uma boa gota. Caso não sejam obtidas gotas suficientes após todas as manobras recomendadas, pegar outra lanceta e puncionar outro ponto do mesmo pé. Após cada punção deve-se desprezar a lanceta.

5) Obtenção da gota: Assim que a gota se formar, aproximar o papel-filtro da mesma, encostando-a no meio do círculo do papel. Caso não se obtenha uma gota de bom tamanho, deve-se conseguir outra gota e colocá-la exatamente em cima da primeira, nunca nos lados. Não se deve colocar mais de duas gotas no mesmo círculo.

Verificar se o sangue preencheu todo o círculo e se está visível no verso do papel-filtro. Após preencher um círculo com até duas gotas, passar para o círculo seguinte, repetindo todas as manobras. Após a coleta, colocar a criança deitada, levantar o pé que foi puncionado e comprimir levemente o local com algodão ou gaze.

6) Secagem: Logo após a coleta, o papel-filtro deve ser colocado para secar em temperatura ambiente e em local arejado, por um tempo mínimo de três horas. Não colocar o papel-filtro na geladeira imediatamente após a coleta. A secagem deve ser feita sempre com o papel-filtro na posição horizontal, utilizando-se suporte com haste de metal ou pregadores de roupa. Após a secagem, colocar o papel-filtro dentro do envelope branco que contém a identificação da criança. Os envelopes podem ser guardados em geladeira ou à temperatura ambiente por no máximo três dias.

7) Conservação e viabilidade das amostras: Os envelopes com as amostras devem ser guardados na geladeira (no meio ou parte baixa), dentro de um recipiente tampado (caixa de isopor ou de plástico), cobrindo-se os envelopes com uma toalha de papel para reter a umidade e evitar molhar as amostras.

8) Remessa das amostras: A remessa dos envelopes para o laboratório deve ser feita pelo menos duas vezes por semana. Deve-se destacar a importância da agilidade no transporte dos exames, considerando-se que o diagnóstico e tratamento precoce das hemoglobinopatias e outras doenças pesquisadas, evitará sequelas futuras.

9) Entrega dos resultados: Os resultados devem ser entregues em um prazo de três dias úteis após seu recebimento. Os resultados alterados são comunicados a Unidade de Saúde imediatamente após sua detecção pelo laboratório. Cabe à equipe da Unidade de Saúde, a responsabilidade de fazer a busca ativa da criança com resultado alterado e encaminhá-la para a consulta especializada na Fundação Hemominas (Doenças Falciformes).

10) Aconselhamento dos pais: A orientação dos pais sobre resultados alterados do teste do pezinho, as doenças diagnosticadas (Hipotireoidismo, Fenilcetonúria e Anemia Falciformes) e o aconselhamento dos pais sobre crianças portadoras de traço falciforme (possibilidade de filhos com a doença) deve ficar a cargo do pediatra ou enfermeiro da Unidade de Saúde. As equipes poderão utilizar como material de referência para as orientações aos familiares os documentos técnicos do NUPAD/UFMG, encaminhados a todos os Centros de Saúde.

## ANEXO B - Documento com o resultado da triagem neonatal

**NUCLEO DE AÇÕES E PESQUISA EM APOIO DIAGNÓSTICO – NUPAD/FMUFMG**  
Nº

**COMUNICAÇÃO DE: RESULTADO DE 1ª AMOSTRA ALTERADA**

|  |                 |                   |                                |
|--|-----------------|-------------------|--------------------------------|
| Referente a:<br>Nascimento:<br>Endereço:<br>Telefone:<br>Unidade de Saúde: | Data de Coleta: | Chegada ao NUPAD: | Código:<br>SAME:<br>Município: |
|--|-----------------|-------------------|--------------------------------|

**RESULTADO:**

| Tipo de Coleta      | Tipo de Exame                        | Método                               | Resultado Atual | Resultado Anterior Coletado em: | Valores Normais              |
|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------|---------------------------------|------------------------------|
| <b>Papel Filtro</b> | TSH Neon.                            | ELISA                                |                 |                                 | Até 10 mUI/L (triagem)       |
|                     | T4Total Neon.                        | ELISA                                |                 |                                 | Acima de 80 nmol/L (triagem) |
|                     | Phe (PKU)                            | FLUOR.                               |                 |                                 | Até 240 µmol/L (triagem)     |
|                     | Análise de Hemoglobinas              | ELETROFORESE FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA |                 |                                 |                              |
|                     | IRT (Tripsina Imunoreativa Neonatal) | ELISA                                |                 |                                 | Até 70 ng/ml (triagem)       |

Técnico: Data do Resultado: **Providências:**

-Encaminhar criança para consulta médica

**Dr. Otto G. Mourão**  
CRM MG 2.089  
Resp.Técnico

**Dr. José Nélio Januário**  
CRM MG 10.059  
Diretor

## COMUNICADO COM O MUNICÍPIO/CENTRO DE SAÚDE

|  |                      |              |                                 |
|--|----------------------|--------------|---------------------------------|
| Em: ...../...../.....  | Meio de Comunicação: |              |                                 |
| Por:   |                      |              |                                 |
| Mensagem recebida no município por:  |                      |              |                                 |
| CONSULTA MÉDICA: <input type="checkbox"/> HC <input type="checkbox"/> HEMOMINAS <input type="checkbox"/> OUTRO HEMOCENTRO <input type="checkbox"/> TESTE DO SUOR |                      |              |                                 |
| Dia: ...../...../.....   | Hora: .....          | Local: ..... | Médico: .....<br>Técnico: ..... |

## ANEXO C - Ficha Primeira Consulta

Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais / UFMG / Faculdade de Medicina /  
Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico - Nupad / Fundação Hemominas

**DOENÇA FALCIFORME (PETN-MG) - 1ª CONSULTA**

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Horário: \_\_\_\_\_  
Ref: Comunicação de:  1ª Consulta  Não comparecimento Motivo: \_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_\_  
Pont. do Hemominas: \_\_\_\_\_ Código NUPAD: \_\_\_\_\_ Sexo:  Masculino  Feminino  
Resultado da Triagem Neonatal: Hb: \_\_\_\_\_ Cor:  Leuco  Falso  Melano

**História Gestacional**

Tempo de gestação: \_\_\_\_\_ semanas G \_\_\_\_ E \_\_\_\_ A \_\_\_\_  
Parto:  Normal  Cesárea  Fórceps  Sofrimento agudo  Sofrimento crônico  
Intercorrências:  Infecção  Bolso rotar: \_\_\_\_\_ horas  DHEG  Outra: \_\_\_\_\_

**Período Neonatal**

Peso nasc: \_\_\_\_\_ Kg Altura nasc: \_\_\_\_\_ cm Apgar 1º: \_\_\_\_\_ 5º: \_\_\_\_\_  Ictericia  Infecção  
Eletr. Hb (Focalização isométrica): \_\_\_\_\_ Análise de DNA: \_\_\_\_\_  
Alimentação: \_\_\_\_\_

**História Familiar**

Número de irmãos: \_\_\_\_\_  
 Anemia  Diabetes  Cardiopatia  Hipertensão  Asma  
 Outra: \_\_\_\_\_

**Exame Físico**

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ Kg Altura: \_\_\_\_\_ cm PC: \_\_\_\_\_ cm  
Mucosas:  Coradas  Hipocoradas: \_\_\_\_\_ +/4+ Ictericia:  Sim  Não  
Ectoscopia: \_\_\_\_\_  
COONG: \_\_\_\_\_  
AR: \_\_\_\_\_  
ADV: \_\_\_\_\_  
Abdome: \_\_\_\_\_  
 Hepatomegalia: \_\_\_\_\_ cm RCD  Esplenomegalia: \_\_\_\_\_ cm RCD  
AGU: \_\_\_\_\_  
SN: \_\_\_\_\_  
AL: \_\_\_\_\_  
História social: \_\_\_\_\_

**Diagnóstico:**  SS  SC  SP - talassemia  Outras: \_\_\_\_\_

**Conduta:**  Orientação aos pais  Iniciar ácido fólico  Iniciar vacinação  
 Antibióticoterapia:  Pen-v-oral  Benzetaclil  Erisomicina  
 Relatório ao pediatra  Estudo familiar  
 Encaminhado para Hemocentro do Interior: Qual: \_\_\_\_\_  
 Outra: \_\_\_\_\_

| Vacina/mês | mês | mês | mês | mês | mês | mês | mês | mês | mês |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| BCG        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| DTP        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Sabin      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Hemófilo   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Sarampo    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Hepatite B |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| MMR        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Pneumovax  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

Outras vacinas: \_\_\_\_\_

**RETORNO:** Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Horário: \_\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

Médico Fundação Hemominas



## ANEXO D - Ficha de Contra Referência

Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais / UFMG / Faculdade de Medicina /  
Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico - Nupad / Fundação Hemominas

**FICHA DE CONTRA REFERÊNCIA - DOENÇA FALCIFORME (PETN-MG)**

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Horário: \_\_\_\_\_

Ref: Comunicação de:  1ª Consulta  Retorno  Não comparecimento Motivo: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Sexo:  Masculino  Feminino Código NUPAD: \_\_\_\_\_ Front. de Hemominas: \_\_\_\_\_

**Resultado da Triagem Neonatal: Hb \_\_\_\_\_ Diagnóstico:**  Doença Falciforme  Outras Hemoglobinopatias

Peso (nasc.): \_\_\_\_\_ g Estatura (nasc.): \_\_\_\_\_ cm PC (nasc.): \_\_\_\_\_ cm

Hb basal: \_\_\_\_\_ g/dL Total de Leucócitos basal: \_\_\_\_\_ (quando definidos)

**EVENTOS OCORRIDOS APÓS A ÚLTIMA CONSULTA:**

**1. Crise álgica:**  Não  Sim

Localização: \_\_\_\_\_ Duração: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Necessitou internação?  Não  Sim Hospital: \_\_\_\_\_

Analgésicos:  Não  Sim Qual: \_\_\_\_\_

Via de administração:  Oral  Parenteral

Automedicado  Serviço Médico Qual: \_\_\_\_\_ Duração: \_\_\_\_\_ hr

Localização: \_\_\_\_\_ Duração: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Necessitou internação?  Sim  Não Hospital: \_\_\_\_\_

Analgésicos:  Não  Sim Qual: \_\_\_\_\_

Via de administração:  Oral  Parenteral

Automedicado  Serviço Médico Qual: \_\_\_\_\_ Duração: \_\_\_\_\_ hr

**2. Sequestro esplênico:**  Não  Sim

Internação Hospital: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**3. Esplenectomia:**  Não  Sim Hospital: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**4. Infecções:**  Não  Sim

Pneumonia  Sepses  Meningite  Osteomielite  Gastroenterite  Outras

Necessitou internação?  Sim  Não Hospital: \_\_\_\_\_

Motivo: \_\_\_\_\_

Uso de antibióticos:  Não  Sim Qual: \_\_\_\_\_ Duração: \_\_\_\_\_ dias

Observações: \_\_\_\_\_

**5. Transfusão:**  Não  Sim Quantas? \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

**EXAME FÍSICO:** Peso: \_\_\_\_\_ Estatura: \_\_\_\_\_ PC: \_\_\_\_\_ cm

Ectoscopia: \_\_\_\_\_

AR: \_\_\_\_\_ ADV: \_\_\_\_\_

AGU: \_\_\_\_\_ SN: \_\_\_\_\_

AD: \_\_\_\_\_ COONG: \_\_\_\_\_

Fígado: \_\_\_\_\_ cm (reborço costal direito), \_\_\_\_\_ cm (apêndice xifóide) Baço: \_\_\_\_\_ cm (reborço costal esq.)

**EXAMES LABORATORIAIS:** Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Hb: \_\_\_\_\_ g/dL Ht: \_\_\_\_\_ VCM: \_\_\_\_\_ HCM: \_\_\_\_\_

LG: \_\_\_\_\_ mm<sup>3</sup> Bc: \_\_\_\_\_ Sr: \_\_\_\_\_ M: \_\_\_\_\_ L: \_\_\_\_\_ Teste de Falc.: \_\_\_\_\_

Plaquetas: \_\_\_\_\_ /mm<sup>3</sup> Retic: \_\_\_\_\_ % Hb Fetal: \_\_\_\_\_ % (aos 2 anos), \_\_\_\_\_ % (aos 5 anos)

**ESTUDO FAMILIAR (HF)** Pai: \_\_\_\_\_ Mãe: \_\_\_\_\_ Irmãos: \_\_\_\_\_

Realizado em:  Hemocentro  Nupad  Outro Laboratório OBS: \_\_\_\_\_

**Adesão ao Protocolo:** Uso de Ác. Fólico:  Sim  Não  Irregular

Uso de Antibióticos:  Sim  Não  Irregular

Vacinação:  Sim  Não  Irregular

**Orientações:** Manter ácido fólico:  Sim  Não Manter penicilinoterapia:  Sim  Não

Interconsulta: \_\_\_\_\_ Exames: \_\_\_\_\_

**Conduta Médica:**  Alta

Acompanhamento conforme protocolo p/ Doença Falciforme

Retorno p/ avaliação clínica de outras Hemoglobinopatias

Médico: \_\_\_\_\_ Hemocentro: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_

**RETORNO:** Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Horário: \_\_\_\_:\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

ANEXO E - Termo de cooperação



Conv/UFJF

TERMO DE COOPERAÇÃO 009/07

TERMO DE COOPERAÇÃO MÚTUA QUE ENTRE SI CELEBRAM A UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUÍZ DE FORA E A FUNDAÇÃO CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE MINAS GERAIS - HEMOMINAS, ATRAVÉS DO HEMOCENTRO REGIONAL DE JUÍZ DE FORA, PARA COOPERAÇÃO MÚTUA VISANDO A INTEGRAÇÃO DE ESFORÇOS NO CAMPO DE HEMATOLOGIA E DE HEMOTERAPIA, NO TRATAMENTO DE PACIENTES COM PATOLOGIAS HEMATOLÓGICAS E NA FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS PARA O SERVIÇO DE SAÚDE.

Pelo presente instrumento, de um lado a Universidade Federal de Juiz de Fora, com sede à Rua Benjamin Constant, n.º 790, em Juiz de Fora, inscrita no CNPJ sob o n.º 21.195.755/0001-69, neste ato representada pelo seu Reitor, Sr. Henrique Duque de Miranda Chaves Filho, brasileiro, casado, portador da C.T. n.º M-17.559 SSP/MG, e do CPF n.º 112.736.505-20, doravante denominada Universidade Federal de Juiz de Fora, de outro, a Fundação Centro de Hematologia Hemoterapia de Minas Gerais, com sede à Rua Grão Pará, nº 582, Bairro Santa Efigênia, em Belo Horizonte, inscrita no CNPJ sob o n.º 26.388.330/0501-90, inscrição Estadual n.º 062.779.821-0031, neste ato representada por sua Presidente, Dra. Anna Bárbara de Freitas Carneiro Proietti, brasileira, médica, CRM n.º 12.274, CPF n.º 517.791.156-87, CI. n.º M-370.703 SSP/MG, doravante denominada HEMOMINAS. Nos acordados o seguinte:

CLÁUSULA PRIMEIRA - DO OBJETO

Este Termo de Cooperação tem por objeto:

1. a integração entre os partícipes visando o desenvolvimento de pesquisas teórico-científicas e ensino nas áreas de hematologia e hemoterapia;
2. estabelecer intercâmbio em mútua cooperação por servidores docentes e técnico-administrativos, discentes e administradores da Universidade Federal de Juiz de Fora e da Fundação Hemominas, no que couber, com vistas ao desenvolvimento do ensino, da pesquisa, da extensão, dos serviços e da administração;
3. a integração de esforços entre a Hemominas e a Universidade Federal de Juiz de Fora, para acompanhar o atendimento multidisciplinar de pacientes com problemas hematológicos;
4. treinamento, qualificação e capacitação de Recursos Humanos;
5. o desenvolvimento do sistema de registro e informações de dados;
6. a prática de todas as demais ações e atividades compatíveis com os objetivos deste

Termo e com o interesse das partes.

CLÁUSULA SEGUNDA - DA EXECUÇÃO

O cumprimento das disposições e a observância operacional deste Termo de Cooperação será objeto de especificações próprias explicitadas por meio de Termos Aditivos, que se fizerem necessários, firmados entre a Hemominas e a Universidade Federal de Juiz de Fora, a fim de assegurar qualidade, eficiência, eficácia, efetividade e continuidade técnica e administrativa dos objetivos deste ajuste. Os Termos Aditivos específicos se tornarão parte integrante deste Termo de Cooperação.

PARÁGRAFO ÚNICO

Os programas a serem desenvolvidos, conjuntamente pelas partes, em decorrência do presente Termo, serão objeto de Termos Aditivos específicos, que deverão fazer constar:

- a) justificativa e objetivos dos trabalhos;
- b) atribuições das partes envolvidas;
- c) discriminação das atividades, serviços, equipamentos, condições e formas de execução, prazos, preços, critérios de reajustamento de preços e multas;
- d) cronograma físico-financeiro;
- e) regulamentações específicas quanto ao sigilo e à propriedade industrial, direitos, cessão e transferência;
- f) garantias para a execução dos projetos;
- g) encargos de cada partícipe;
- h) regulamentação específica quanto à participação de terceiros, incluindo centros de pesquisas, fundações e empresas nacionais e estrangeiras;
- i) condições de rescisão;
- j) aprovação prévia da Diretoria envolvida e dos coordenadores designados.

MOD/JM-G-DAC-JT

*[Handwritten signatures and stamps]*

1

Magda Cláudia...  
Advogada - OAB 19441  
Presidenta - Clube  
FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Presidente Mariana Freire Dias  
 Avenida de Cuba  
 Belo Horizonte - MG  
 CEP: 30173-3  
 FUNDAÇÃO HEMOMINAS



CoopUFJF

**CLÁUSULA TERCEIRA - DA COORDENAÇÃO GERAL E COORDENADOR TÉCNICO**

Para a plena execução do objeto do presente Termo de Cooperação, cada parte designará um Coordenador Geral, quando for o caso, que será responsável por este Termo de cooperação e um Coordenador Técnico responsável pelos Programas Específicos.

**PARÁGRAFO PRIMEIRO**

Aos Coordenadores Gerais caberá a emissão, o acompanhamento e a avaliação do Termo de Cooperação e Termos Aditivos, bem como a responsabilidade pela solução e encaminhamento de questões administrativas e financeiras, pertinentes ao presente instrumento.

**PARÁGRAFO SEGUNDO**

Os Termos Aditivos específicos terão coordenadores técnicos, explicitamente citados em seus termos, cujas funções estarão especificadas e serão reportadas sempre à Coordenação Geral do Termo de Cooperação.

**PARÁGRAFO TERCEIRO**

O controle geral, por parte da Universidade Federal de Juiz de Fora, ficará a cargo da Gerência de convênios da PROEX, ouvidos os Coordenadores Gerais.

O controle geral por parte da Fundação Hemomina/Hemocoito Regional de Juiz de Fora, ficará a cargo do setor de Recursos Humanos e de áreas afins aos projetos em curso.

**CLÁUSULA QUARTA - DOS COMPROMISSOS DA HEMOMINAS**

A Hemomina obriga-se a:

1. Permitir o trânsito do pessoal: docentes, alunos de graduação, de pós-graduação, residentes e técnicos da Universidade Federal de Juiz de Fora, nas dependências da Fundação Hemomina, de acordo com suas normas administrativas, proporcionando-lhes oportunidade de treinamento e aperfeiçoamento intelectual;
2. Manter ambulatório de coagulopatias e hemoclitinopatias, permitindo o livre trânsito do pessoal técnico da Universidade Federal de Juiz de Fora nas suas dependências, de acordo com as normas baseadas pelo mesmo;
3. Exercer, em colaboração mútua, atividades de formação, pesquisa e aprimoramento de técnicos em hemoterapia e hematologia de forma a garantir o desenvolvimento da área no Estado de Minas Gerais;
4. Arcar com os ônus, custos e despesas, que lhe couberem, no cumprimento deste Termo de Cooperação.

**CLÁUSULA QUINTA - DOS COMPROMISSOS DA UFJF**

A Universidade Federal de Juiz de Fora compromete a:

1. exercer, em colaboração mútua, atividade de formação, pesquisa e aprimoramento de técnicos e pesquisa em hemoterapia e hematologia de forma a garantir o desenvolvimento da área no Estado de Minas Gerais;
2. permitir o trânsito do pessoal técnico da Hemomina nas dependências da Universidade Federal de Juiz de Fora, de acordo com as normas administrativas de cada uma destas unidades, proporcionando-lhes oportunidade de treinamento e aperfeiçoamento intelectual;
3. acompanhar o atendimento multidisciplinar, em suas especialidades, a pacientes da Fundação Hemomina, conforme os fluxos estabelecidos pelas partes;
4. colaborar no processo de qualificação profissional do pessoal da Hemomina;
5. arcar com os ônus, custos e despesas, que lhe couberem, no cumprimento deste Termo de cooperação;

**CLÁUSULA SEXTA - DAS RETRIBUIÇÕES E DOS RESSARCIMENTOS DE DESPESAS**

As despesas decorrentes do cumprimento deste Termo serão custeadas pela Fundação Hemomina, como pela Universidade Federal de Juiz de Fora, à conta de suas respectivas dotações orçamentárias, observadas as normas específicas baseadas mediante consenso das partes cooperadas.

MOB-184-0 DAD-07

Magda Valéria Bonfatti  
Assessora - RAS 75.484  
Procuradora - Civil





Conv/FUP

**CLÁUSULA SÉTIMA - DA PROPRIEDADE DOS RESULTADOS**

Os resultados alcançados com o desenvolvimento das atividades, conforme a cláusula segunda, poderão ser utilizados pelas partes, ou segundo, sua conveniência, por terceiros por elas indicados, para publicação ou divulgação, desde que, obrigatoriamente, seja mencionada a "Cooperação" existente, em decorrência deste Termo de Cooperação.

**PARÁGRAFO PRIMEIRO**

Fica expressamente vedada a utilização do nome de qualquer das partes, pela outra, para fins promocionais, sem a respectiva aquiescência, por escrito.

**PARÁGRAFO SEGUNDO**

As partes obrigam-se a respeitar as disposições desta Cláusula, mesmo após o término da vigência do presente Termo de Cooperação.

**CLÁUSULA OITAVA - DOS CASOS OMISSOS**

Os casos omissos serão resolvidos mediante comum acordo, respeitada a legislação vigente.

**CLÁUSULA NONA - DA VIGÊNCIA**

O presente Termo de Cooperação vigorará, pelo prazo de 60 (sessenta) meses, contados a partir da data de sua assinatura, de acordo com o art. 57, II da Lei n.º 8.666/93.

**CLÁUSULA DÉCIMA - DA RESCISÃO E ALTERAÇÃO**

Este Termo de Cooperação poderá ser rescindido caso haja descumprimento das obrigações pactuadas, ou superveniência de fatos que o tornem inexecutível, bem como por interesse das partes, mediante denúncia de qualquer uma delas, com antecedência mínima de 90 (noventa) dias, podendo ainda ser alterado mediante Termo Aditivo.

**CLÁUSULA DÉCIMA PRIMEIRA - DO FORO**

As partes elegem a Justiça Federal de Juiz de Fora, Seção Judiciária do Estado de Minas Gerais, para dirimir dúvidas e/ou questões resultantes da interpretação e/ou execução do presente instrumento.

E, por estarem justas e acordadas, a Universidade Federal de Juiz de Fora e a FUNDAÇÃO HEMOMINAS assinam o presente Termo de Cooperação, em 04 (quatro) vias de igual teor e forma, para um só efeito, na presença das testemunhas abaixo.

Belo Horizonte, 19 de agosto de 2007.

*Henrique Duque de Miranda*  
 Prof. Henrique Duque de Miranda Chaves Filho  
 Reitor da Universidade Federal de Juiz de Fora

*Dra. Anna Bárbara de Freitas Carneiro Prietti*  
 Presidente da FUNDAÇÃO HEMOMINAS

**TESTEMUNHAS:**

NOME: *Ala Francisco de Azevedo* NOME: *Carla Cristina Pereira de Souza*  
 CPF: *623672028* O: *M 4 831.020* CPF: *3522311800* O: *1210600-53 P.06*

**VISTO**  
 O/Sec. Jurídica  
 Assessor de Gabinete  
 M.º 185/733  
 FUNDAÇÃO HEMOMINAS

*Magda Valéria de Souza*  
 Advogada - OAB/RS-401  
 Procuradora de Justiça  
 FUNDAÇÃO HEMOMINAS

sexta, 15 de Dezembro de 2007

DIÁRIO DO EXECUTIVO, LEGISLATIVO E PUBLICAÇÕES DE TERCEIROS

MINAS GERAIS - GOVERNO

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...

... e a ...


... e a ...

## ANEXO F – Comitê de Ética e Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP  
Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas

## PARECER CONSUBSTANCIADO

|   |   |
|---|---|
| Título do Projeto de Pesquisa: Avaliação da Triagem Neonatal para Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias, do Diagnóstico na atenção básica à Saúde ao Tratamento na Rede Pública Estadual - Uma análise epidemiológica, clínica e social - Hemocentro Regional de Juiz de Fora.   |   |
| <b>SUJEITOS DA PESQUISA</b>   |   |
| 2. Número de sujeitos:<br>No Centro: 180<br>Total: 180  | 3. Grupos Especiais: ( X ) Menor de 18 anos; ( ) Portador de deficiência mental ( ) Embrião/feto; ( ) Relação de dependência (militares, presidiários...) ( ) Outros: ( ) Não se aplica |
| <b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL</b>  |   |
| 4. Nome: Maria Tereza Bustamante Teixeira   |   |
| 5. Instituição a que pertence: UFJF   |   |
| <b>INSTITUIÇÃO (ÕES) ONDE SERÁ REALIZADO</b>  |   |
| 6. Nome: Fundação Hemominas   |   |
| 7. Unidade/Órgão: Hemocentro Regional de Juiz de Fora   |   |
| 8. Participação Estrangeira: Sim ( ) Não ( X )  |   |
| 9. Projeto Multicêntrico: Sim ( ) Não ( X ) Nacional ( ) Internacional ( )  |   |
| <b>PATROCINADOR</b>   |   |
| Não se aplica ( X )   |   |
| 10. Nome:   |   |
| <b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP</b>  |   |
| 11. Data de Entrada: 20/07/2009   | 12. Registro no CEP: 245  |
| 13. Objetivos:<br>Resgatar e avaliar a história da triagem neonatal em partes do mundo, no Brasil, Minas Gerais e Juiz de Fora. Determinar a adesão ao teste do pezinho em Juiz de Fora e região, entre os anos de 1998 e 2007. Verificar o número de pacientes cadastrados no Hemocentro Regional de Juiz de Fora triados através do teste do pezinho até 2007. Determinar a frequência da doença falciforme e outras hemoglobinopatias em Juiz de Fora e região de abrangência do Hemocentro segundo sexo, cidade e ano de nascimento, no período de 1998 a 2007. Comparar os resultados do perfil hemoglobínico na triagem neonatal com os resultados confirmatórios aos 6 meses e aos 2 anos de vida. Mensurar o espaço cronológico em dias entre as principais etapas do programa de triagem neonatal - do diagnóstico na atenção básica à saúde ao tratamento na rede pública estadual. Verificar a frequência às consultas, motivos de ausência e sua associação com gênero, grupo etário, dados sócio-econômico da família e acesso ao Hemocentro Regional de Juiz de Fora dos portadores de doença falciforme e outras hemoglobinopatias identificadas no programa de triagem neonatal. Descrever e avaliar a associação de fatores prognósticos tais como a porcentagem de hemoglobina fetal aos 2 a 5 anos de vida, a frequência dos haplótipos CAR, Benin, Senegal e Camarões do grupo do gene da beta globina e a morbi-mortalidade nos pacientes com doença falciforme. |   |
| 14. Sumário do Projeto:<br>Trata-se de estudo avaliativo de natureza quantitativa, cuja população de estudo será composta pelo total de pacientes portadores de anemia falciforme e outras hemoglobinopatias acompanhados pelo Hemocentro Regional de Juiz de Fora. Será coletada amostra de sangue (5 ml) durante a rotina laboratorial de acompanhamento do paciente. Será aplicado questionário para o responsável, sendo utilizados dados do prontuário. Também será feita pesquisa sobre a história da triagem neonatal em Juiz de Fora.   |   |
| 15. Comentário dos Relatores:<br>Após esclarecimentos e adequações, o projeto foi aprovado.   |   |
| 16. Parecer:<br>Aprovado ( X ) Pendência ( ) Não Aprovado ( )<br>Data: 09/10/09 Data: Data:   |   |
| 17. Cronograma de execução:<br>Início: out 2009 Fim: nov 2011   | 18. Enviar relatórios em:<br>novembro 2010 e novembro 2011  |
| 19. Coordenador   | <br>Assinatura<br>Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa<br>Fundação Hemominas                  |

## ANEXO G – Normas de Publicação da Revista Jornal de Pediatria

### Jornal de Pediatria | Instruções aos autores

O Jornal de Pediatria é a publicação científica da Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP), com circulação regular desde 1934. Todo o conteúdo do Jornal de Pediatria está disponível em português e inglês no site <http://www.jpmed.com.br>, que é de livre acesso. O Jornal de Pediatria é indexado pelo Index Medicus/ MEDLINE (<http://www.pubmed.gov>), SciELO (<http://www.scielo.org>), LILACS (<http://www.bireme.br/abd/P/lilacs.htm>), EMBASE/ Excerpta Medica (<http://www.embase.com>), Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC) Data Bases (<http://www.siicsalud.com>), Medical Research Index (<http://www.purplehealth.com/medical-research-index.htm>) e University Microfilms International. O Jornal de Pediatria publica resultados de investigação clínica em pediatria e, excepcionalmente, de investigação científica básica. Aceita-se a submissão de artigos em português e inglês. Na versão impressa da revista, os artigos são publicados em inglês. No site, todos os artigos são publicados em português e inglês, tanto em HTML quanto em PDF. Todo o conteúdo publicado pelo Jornal de Pediatria passa por processo de revisão por especialistas (peer review). Cada artigo submetido para apreciação é encaminhado aos editores, que fazem uma revisão inicial quanto aos padrões mínimos de exigência do Jornal de Pediatria e ao atendimento de todas as normas requeridas para envio dos originais. A seguir, remetem o artigo a dois revisores especialistas na área pertinente, selecionados de um cadastro de revisores. Os revisores são sempre de instituições diferentes da instituição de origem do artigo e são cegos quanto à identidade dos autores e ao local de origem do trabalho. Após receber ambos os pareceres, o Conselho Editorial os avalia e decide pela aceitação do artigo sem modificações, pela recusa ou pela devolução aos autores com as sugestões de modificações. Cada versão é sempre analisada pelo Conselho Editorial, que detém o poder da decisão final. Tipos de artigos publicados O Jornal de Pediatria aceita a submissão espontânea de artigos originais, artigos especiais e cartas ao editor. Artigos originais incluem estudos controlados e randomizados, estudos de testes diagnósticos e de triagem e outros estudos descritivos e de intervenção, bem como pesquisa básica com animais de laboratório. O texto deve ter no máximo 3.000 palavras, excluindo tabelas e referências; o número de referências não deve exceder 30. O número total de tabelas e figuras não pode ser maior do que quatro. Artigos que relatam ensaios clínicos com intervenção terapêutica (clinical trials) devem ser registrados em um dos Registros de Ensaios Clínicos listados pela Organização Mundial da



Saúde e pelo International Committee of Medical Journal Editors. Na ausência de um registro latino-americano, o Jornal de Pediatria sugere que os autores utilizem o registro [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), dos National Institutes of Health (NIH). O número de identificação deve ser apresentado ao final do resumo. Artigos especiais são textos não classificáveis nas demais categorias, que o Conselho Editorial julgue de especial relevância. Sua revisão admite critérios próprios, não havendo limite de tamanho ou exigências prévias quanto à bibliografia. Cartas ao editor devem comentar, discutir ou criticar artigos publicados no Jornal de Pediatria. O tamanho máximo é de 1.000 palavras, incluindo no máximo seis referências bibliográficas. Sempre que possível, uma resposta dos autores será publicada junto com a carta. São publicados, mediante convite, editoriais, comentários e artigos de revisão. Autores não convidados podem também submeter ao Conselho Editorial uma proposta para publicação de artigos dessas classificações. Editoriais e comentários, que geralmente se referem a artigos selecionados, são encomendados a autoridades em áreas específicas. Artigos de revisão são avaliações críticas e ordenadas da literatura em relação a temas de importância clínica, com ênfase em fatores como causas e prevenção de doenças, seu diagnóstico, tratamento e prognóstico – em geral são escritos, mediante convite, por profissionais de reconhecida experiência. Meta-análises são incluídas nesta categoria. Artigos de revisão devem limitar-se a 6.000 palavras, excluindo referências e tabelas. As referências bibliográficas devem ser atuais e em número mínimo de 30. Orientações gerais O arquivo original – incluindo tabelas, ilustrações e referências bibliográficas – deve estar em conformidade com os “Requisitos Uniformes para Originais Submetidos a Revistas Biomédicas”, publicado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (<http://www.icmje.org>). Cada seção deve ser iniciada em nova página, na seguinte ordem: página de rosto, resumo em português, resumo em inglês, texto, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas (cada tabela completa, com título e notas de rodapé, em página separada), figuras (cada figura completa, com título e notas de rodapé, em página separada) e legendas das figuras. A seguir, as principais orientações sobre cada seção: Página de rosto A página de rosto deve conter todas as seguintes informações: a) título do artigo, conciso e informativo, evitando termos supérfluos e abreviaturas; evitar também a indicação do local e da cidade onde o estudo foi realizado; Normas JORNAL PEDIATRIA PORTUGUES.indd 1 11/03/2013 9:16:57 Instruções aos autores b) título abreviado (para constar no topo das páginas), com máximo de 50 caracteres, contando os espaços; c) nome de cada um dos autores (primeiro nome e o último sobrenome; todos os demais nomes aparecem como iniciais); d) apenas a titulação mais importante de cada autor; e) endereço eletrônico de cada autor; f) informar se cada um dos autores possui



currículo cadastrado na plataforma Lattes do CNPq; g) a contribuição específica de cada autor para o estudo; h) declaração de conflito de interesse (escrever “nada a declarar” ou a revelação clara de quaisquer interesses econômicos ou de outra natureza que poderiam causar constrangimento se conhecidos depois da publicação do artigo); i) definição de instituição ou serviço oficial ao qual o trabalho está vinculado para fins de registro no banco de dados do Index Medicus/MEDLINE; j) nome, endereço, telefone, fax e endereço eletrônico do autor responsável pela correspondência; k) nome, endereço, telefone, fax e endereço eletrônico do autor responsável pelos contatos pré-publicação; l) fonte financiadora ou fornecedora de equipamento e materiais, quando for o caso; m) contagem total das palavras do texto, excluindo resumo, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas e legendas das figuras; n) contagem total das palavras do resumo; o) número de tabelas e figuras.

**Resumo** O resumo deve ter no máximo 250 palavras ou 1.400 caracteres, evitando o uso de abreviaturas. Não se devem colocar no resumo palavras que identifiquem a instituição ou cidade onde foi feito o artigo, para facilitar a revisão cega. Todas as informações que aparecem no resumo devem aparecer também no artigo. O resumo deve ser estruturado conforme descrito a seguir:

**Resumo de artigo original** **Objetivo:** informar por que o estudo foi iniciado e quais foram as hipóteses iniciais, se houve alguma. Definir precisamente qual foi o objetivo principal e informar somente os objetivos secundários mais relevantes. **Métodos:** informar sobre o delineamento do estudo (definir, se pertinente, se o estudo é randomizado, cego, prospectivo, etc.), o contexto ou local (definir, se pertinente, o nível de atendimento, se primário, secundário ou terciário, clínica privada, institucional, etc.), os pacientes ou participantes (definir critérios de seleção, número de casos no início e fim do estudo, etc.), as intervenções (descrever as características essenciais, incluindo métodos e duração) e os critérios de mensuração do desfecho. **Resultados:** informar os principais dados, intervalos de confiança e significância estatística dos achados. **Conclusões:** apresentar apenas aquelas apoiadas pelos dados do estudo e que contemplem os objetivos, bem como sua aplicação prática, dando ênfase igual a achados positivos e negativos que tenham méritos científicos similares.

**Resumo de artigo de revisão** **Objetivo:** informar por que a revisão da literatura foi feita, indicando se enfatiza algum fator em especial, como causa, prevenção, diagnóstico, tratamento ou prognóstico. **Fontes dos dados:** descrever as fontes da pesquisa, definindo as bases de dados e os anos pesquisados. Informar sucintamente os critérios de seleção de artigos e os métodos de extração e avaliação da qualidade das informações. **Síntese dos dados:** informar os principais resultados da pesquisa, sejam quantitativos ou qualitativos. **Conclusões:** apresentar as conclusões e suas aplicações clínicas, limitando generalizações ao

escopo do assunto em revisão. Após o resumo, inclua de três a seis palavras-chave que serão usadas para indexação. Utilize termos do Medical Subject Headings (MeSH), disponíveis em <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>. Abreviaturas devem ser evitadas, pois prejudicam a leitura confortável do texto. Quando usadas, devem ser definidas ao serem mencionadas pela primeira vez. Jamais devem aparecer no título e nos resumos.

Texto O texto dos artigos originais deve conter as seguintes seções, cada uma com seu respectivo subtítulo:

a) Introdução: sucinta, citando apenas referências estritamente pertinentes para mostrar a importância do tema e justificar o trabalho. Ao final da introdução, os objetivos do estudo devem ser claramente descritos.

b) Métodos: descrever a população estudada, a amostra e os critérios de seleção; definir claramente as variáveis e detalhar a análise estatística; incluir referências padronizadas sobre os métodos estatísticos e informação de eventuais programas de computação. Procedimentos, produtos e equipamentos utilizados devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir a reprodução do estudo. É obrigatória a inclusão de declaração de que todos os procedimentos tenham sido aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da instituição a que se vinculam os autores ou, na falta deste, por outro comitê de ética em pesquisa indicado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde.

c) Resultados: devem ser apresentados de maneira clara, objetiva e em sequência lógica. As informações contidas em tabelas ou figuras não devem ser repetidas no texto. Usar gráficos em vez de tabelas com um número muito grande de dados.

d) Discussão: deve interpretar os resultados e compará-los com os dados já descritos na literatura, enfatizando os aspectos novos e importantes do estudo. Discutir as implicações dos achados e suas limitações, bem como a necessidade de pesquisas adicionais. As conclusões devem ser apresentadas no final da discussão, levando em consideração os objetivos do trabalho. Relacionar as conclusões aos objetivos iniciais do estudo, evitando assertivas não apoiadas pelos achados e dando ênfase igual a achados positivos e negativos que tenham méritos científicos similares. O texto de artigos de revisão não obedece a um esquema rígido de seções. Sugere-se uma introdução breve, em que os autores explicam qual a importância da revisão para a prática pediátrica, à luz da literatura médica. Não é necessário descrever os métodos de seleção e extração dos dados, passando logo para a sua síntese, que, entretanto, deve apresentar todas as informações pertinentes em detalhe. A seção de conclusões deve correlacionar as ideias principais da revisão com as possíveis aplicações clínicas, limitando generalizações aos domínios da revisão. Agradecimentos devem ser breves e objetivos, somente a pessoas ou instituições que contribuíram significativamente para o estudo, mas que

não tenham preenchido os critérios de autoria. Integrantes da lista de agradecimento devem dar sua autorização por escrito para a divulgação de seus nomes, uma vez que os leitores podem supor seu endosso às conclusões do estudo. Referências bibliográficas: as referências devem ser formatadas no estilo Vancouver, também conhecido como o estilo Uniform Requirements, que é baseado em um dos estilos do American National Standards Institute, adaptado pela U.S. National Library of Medicine (NLM) para suas bases de dados. Os autores devem consultar *Citing Medicine, The NLM Style Guide for Authors, Editors, and Publishers* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=citmed>) para informações sobre os formatos recomendados para uma variedade de tipos de referências. Podem também consultar o site “sample references” ([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)), que contém uma lista de exemplos extraídos ou baseados em *Citing Medicine*, para uso geral facilitado; essas amostras de referências são mantidas pela NLM. As referências bibliográficas devem ser numeradas e ordenadas segundo a ordem de aparecimento no texto, no qual devem ser identificadas pelos algarismos arábicos respectivos sobrescritos. Para listar as referências, não utilize o recurso de notas de fim ou notas de rodapé do Word. Artigos aceitos para publicação, mas ainda não publicados, podem ser citados desde que indicando a revista e que estão “no prelo”. Os títulos dos periódicos devem ser abreviados conforme recomenda o Index Medicus; uma lista com suas respectivas abreviaturas pode ser obtida através da publicação da NLM “List of Serials Indexed for Online Users”, disponível no endereço <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html>. Para informações mais detalhadas, consulte os “Requisitos Uniformes para Originais Submetidos a Revistas Biomédicas”. Este documento está disponível em <http://www.icmje.org/>. Abaixo, apresentamos alguns exemplos do modelo adotado pelo *Jornal de Pediatria*: Artigos em periódicos: 1. Até seis autores: Araújo LA, Silva LR, Mendes FA. Digestive tract neural control and gastrointestinal disorders in cerebral palsy. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88:455-64. 2. Mais de seis autores: Ribeiro MA, Silva MT, Ribeiro JD, Moreira MM, Almeida CC, Almeida-Junior AA, et al. Volumetric capnography as a tool to detect early peripheral lung obstruction in cystic fibrosis patients. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88:509-17. 3. Organização como autor: Mercier CE, Dunn MS, Ferrelli KR, Howard DB, Soll RF; Vermont Oxford Network ELBW Infant Follow-Up Study Group. Neurodevelopmental outcome of extremely low birth weight infants from the Vermont Oxford network: 1998-2003. *Neonatology*. 2010;97:329-38. 4. Sem autor: Informed consent, parental permission, and assent in pediatric practice. Committee on Bioethics, American Academy of Pediatrics. *Pediatrics*. 1995;95:314-7. 5. Artigos com publicação eletrônica ainda sem publicação impressa: Carvalho CG, Ribeiro MR, Bonilha MM, Fernandes Jr M,

Procianoy RS, Silveira RC. Use of off-label and unlicensed drugs in the neonatal intensive care unit and its association with severity scores. *J Pediatr (Rio J)*. 2012 Oct 30. [Epub ahead of print]

Livros: Blumer JL, Reed MD. Principles of neonatal pharmacology. In: Yaffe SJ, Aranda JV, eds. Neonatal and Pediatric Pharmacology. 3rd ed. Baltimore: Lippincott, Williams and Wilkins; 2005. p. 146-58.

Trabalhos acadêmicos: Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertation]. Mount Pleasant, MI: Central Michigan University; 2002.

CD-ROM: Anderson SC, Poulsen KB. Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

Homepage/website: R Development Core Team [Internet]. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2003 [cited 2011 Oct 21]. Available from: <http://www.R-project.org>

Documentos do Ministério da Saúde: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde: cuidados gerais. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. v. 1. 192p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

Apresentação de trabalho: Bugni VM, Okamoto KY, Ozaki LS, Teles FM, Molina J, Bueno VC, et al. Development of a questionnaire for early detection of factors associated to the adherence to treatment of children and adolescents with chronic rheumatic diseases - "the Pediatric Rheumatology Adherence Questionnaire (PRAQ)". Paper presented at the ACR/ARHP Annual Meeting; November 5-9, 2011; Chicago, IL.

Tabelas: Cada tabela deve ser apresentada em folha separada, numerada na ordem de aparecimento no texto, e conter um título sucinto, porém explicativo. Todas as explicações devem ser apresentadas em notas de rodapé e não no título, identificadas com letras sobrescritas em ordem alfabética. Não sublinhar ou desenhar linhas dentro das tabelas e não usar espaços para separar colunas. Não usar espaço em qualquer lado do símbolo  $\pm$ .

Normas JORNAL PEDIATRIA PORTUGUES.indd 3 11/03/2013 9:16:57

Instruções aos autores Figuras (fotografias, desenhos, gráficos, etc.) Todas as figuras devem ser numeradas na ordem de aparecimento no texto. Todas as explicações devem ser apresentadas nas legendas, inclusive acerca das abreviaturas utilizadas. Figuras reproduzidas de outras fontes já publicadas devem indicar esta condição na legenda, assim como devem ser acompanhadas por uma carta de permissão do detentor dos direitos. Fotos não devem permitir a identificação do paciente; tarjas cobrindo os olhos podem não constituir proteção adequada. Caso exista a possibilidade de identificação, é obrigatória a inclusão de documento escrito fornecendo consentimento livre e esclarecido para a publicação. Microfotografias devem apresentar escalas internas e setas que contrastem com o fundo. Caso os autores julguem essencial que uma determinada imagem seja colorida mesmo

na versão impressa, solicita-se um contato especial com os editores. Imagens geradas em computador, como gráficos, devem ser anexadas sob a forma de arquivos nos formatos .jpg, .gif ou .tif, com resolução mínima de 300 dpi, para possibilitar uma impressão nítida; na versão eletrônica, a resolução será ajustada para 72 dpi. Gráficos devem ser apresentados somente em duas dimensões, em qualquer circunstância. Desenhos, fotografias ou quaisquer ilustrações que tenham sido digitalizadas por escaneamento podem não apresentar grau de resolução adequado para a versão impressa da revista; assim, é preferível que sejam enviadas em versão impressa original (qualidade profissional, a nanquim ou impressora com resolução gráfica superior a 300 dpi). Nesses casos, no verso de cada figura deve ser colada uma etiqueta com o seu número, o nome do primeiro autor e uma seta indicando o lado para cima. Legendas das figuras devem ser apresentadas em página própria, devidamente identificadas com os respectivos números.

Lista de verificação Como parte do processo de submissão, os autores são solicitados a indicar sua concordância com todos os itens abaixo; a submissão pode ser devolvida aos autores que não aderirem a estas diretrizes.

1. Todos os autores concordam plenamente com a Nota de Copyright.
2. O arquivo de submissão foi salvo como um documento do Microsoft Word.
3. A página de rosto contém todas as informações requeridas, conforme especificado nas diretrizes aos autores.
4. O resumo e as palavras-chave estão na língua de submissão (inglês ou português), seguindo a página de rosto.
5. O texto é todo apresentado em espaço duplo, utiliza fonte tamanho 12 e itálico em vez de sublinhado para indicar ênfase (exceto em endereços da internet). Todas as tabelas, figuras e legendas estão numeradas na ordem em que aparecem no texto e foram colocadas cada uma em página separada, seguindo as referências, no fim do arquivo.
6. O texto segue as exigências de estilo e bibliografia descritas nas normas de publicação.
7. As referências estão apresentadas no chamado estilo de Vancouver e numeradas consecutivamente na ordem em que aparecem no texto.
8. Informações acerca da aprovação do estudo por um conselho de ética em pesquisa são claramente apresentadas no texto, na seção de métodos.
9. Todos os endereços da internet apresentados no texto (p.ex., [http:// www.sbp.com.br](http://www.sbp.com.br)) estão ativos e prontos para serem clicados.

**ANEXO H - Carta de aceite do Artigo**

## Artigo 15-553 - Aceito

Prezada Dra. Daniela O.W. Rodrigues,

Informamos com satisfação que seu artigo "Determinantes genéticos e Acidente Vascular Encefálico em crianças com doença falciforme " foi aceito para publicação e está programado para a edição nº 6 (Nov/Dez), ano de 2016 (volume 92), do Jornal de Pediatria. Essa programação ainda pode ser alterada de acordo com a necessidade da Editora.

Solicitamos aos autores enviarem a carta de submissão anexa, assinada, via correio, de preferência até o dia 31/03. O endereço está na carta.

O artigo ainda passará por diversas revisões de formato, linguagem e tradução, talvez ainda seja necessário pedir algumas informações aos autores. Por isso pedimos manter seu e-mail atualizado, também para o envio das provas em PDF, posteriormente.

Agradecemos escolher o Jornal de Pediatria para enviar seu artigo.

Atenciosamente,

Maria de Fátima Machado

Editorial Assistance

Jornal de Pediatria

[jped@jped.com.br](mailto:jped@jped.com.br)

(51)33289520

(51)33925308

(51)91235308

## ANEXO I

Linha temática: REDES

## AVALIAÇÃO DA TRIAGEM NEONATAL PARA DOENÇA FALCIFORME E OUTRAS HEMOGLOBINOPATIAS: DO DIAGNÓSTICO NA ATENÇÃO BÁSICA À SAÚDE AO TRATAMENTO NA REDE PÚBLICA ESTADUAL – UMA ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E SOCIAL – HEMOCENTRO REGIONAL DE JUIZ DE FORA: PASSADO E PRESENTE DA DOENÇA FALCIFORME

Daniela O. W. Rodrigues<sup>1,2</sup>, Maria Teresa B. Teixeira<sup>3</sup>,  
Monica C. B. Ferreira<sup>2</sup>, Luiz C. Ribeiro<sup>2</sup>, Marina L. Martins<sup>1</sup>,  
Estela M. S. Campos<sup>2</sup>, Patricia M. Pereira<sup>2</sup>, Gabriel C. Ribeiro<sup>2</sup>

### Introdução

As hemoglobinopatias afetam cerca de 7% da população mundial, sendo as doenças hereditárias mais comuns. A Doença Falciforme (DF), com destaque para a Anemia Falciforme (AF), é a de maior impacto clínico, social e epidemiológico entre as hemoglobinopatias. A AF ocorre por uma mutação no gene da beta globina, que causa a substituição do ácido glutâmico pela valina no cromossomo 11, levando a formação da hemoglobina S (HbS). Há descrição de cinco haplótipos ligados à HbS: Astático, Senegal, Benin, Bantu (CAR) e Camarões. A DF resulta da heterocose da HbS com outras hemoglobinas e pode coexistir com as talassemias. A associação entre DF e alta talassemia determina um quadro clínico mais brando, com redução dos níveis de hemólise e inibição da polimerização da hemoglobina S.

Em razão das características raciais do Brasil, essas doenças representam um problema de saúde pública. Minas Gerais, através do Núcleo de Apoio Diagnóstico (Nupad) da Universidade Federal de Minas Gerais e da Fundação Hemominas, foi o estado pioneiro na implantação de uma política aos portadores de DF. Desde 1998, a doença foi incluída na triagem neonatal, enquanto o Programa Nacional de Triagem Neonatal só foi efetivado em 2001. No Brasil, apenas 18 estados realizam a triagem neonatal para a DF e outras hemoglobinopatias.

### Objetivos

Os objetivos foram avaliar os programas de triagem neonatal e sua efetividade, determinar a frequência da DF e outras

<sup>1</sup> Fundação Hemominas  
daniela.worrock@hemominas.org.gov.br

<sup>2</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

<sup>3</sup> Fapenmg  
(Biotemas BCB/BAT)

hemoglobinopatias segundo sexo, cidade e investigar fatores prognósticos como a coexistência da alfa talassemia, os haplótipos do grupo da beta globina e a morbimortalidade nos pacientes com DF.

### Metodologia

O estudo foi uma coorte, cuja população de estudo foram os pacientes nascidos em Minas Gerais, no período de 1998 a 2007, que obtiveram o diagnóstico de DF e outras hemoglobinopatias através da triagem neonatal, e que são acompanhados na Fundação Hemominas – Juiz de Fora (HRJF). A identificação dos casos foi por meio do resultado da triagem neonatal enviada pelo Nupad. A mensuração dos intervalos de tempo entre as principais etapas do programa de triagem neonatal – do diagnóstico na atenção básica ao tratamento na rede pública estadual – foi feita em dias.

Para a complementação dos dados e a identificação da morbimortalidade foram utilizados os prontuários médicos. Foi aplicado o questionário sobre a situação socioeconômica do Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Amílcar Teixeira (INEP), acrescido de questões sobre o acesso ao serviço e a escolaridade do cuidador. A determinação dos haplótipos do grupo do gene da globina beta e da co-existência da alfa talassemia foi realizada por PCR (reação em cadeia da polimerase) e RFLP (polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição), de acordo com protocolo de Sutton e colegas (1989). Foram extraídos dados do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC), referente aos números de nascidos vivos em Juiz de Fora e região. Para o armazenamento e a análise dos dados, foi utilizado o programa SPSS® versão 13. Foi fixado em 95% o intervalo de confiança das estimativas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Hemominas.

### Resultados

Entre 1998 e 2007, foram triados em Minas Gerais 2.549.097 recém-nascidos,

dos quais 210.696 nascidos nas 34 cidades que referenciam o tratamento para o HRJF. Dos 181 pacientes com hemoglobinopatias, 83,52% são portadores da DF (HbS) e 16,48% portadores de outra hemoglobinopatia. Entre os pacientes com DF, 61,18% são portadores de AF, 28,94% HbSC, 5,92% HbSBetatalassemia, 1,31% HbSD, e 2,63% são HbSj. A hemoglobinopatia mais prevalente foi a HbCC, com 90%; 3,39% formas não identificadas e seis formas raras ou não identificadas que, por exames de PCR, foram diagnosticadas com alfa talassemia, perfazendo 2% dos pacientes. As cidades com maior incidência de DF são Juiz de Fora e Uba. Não houve diferença significativa entre os gêneros, com 48,2% de meninos e 35,8% de meninas. A maioria das famílias (57%) relatou viver com renda menor que um salário mínimo mensal. Em 7,33%, o pai está desempregado, e as mães, em 32,1%, fato que reforça a vulnerabilidade social. O espaço cronológico entre a coleta de sangue e o cadastro no HRJF foi de 17 dias. Dos pacientes com DF, 23,43% evidenciaram o genótipo de portadores silênticos para alfa talassemia e 2,70% apresentavam deleção de 2 genes. Nos pacientes com AF, o perfil genético dos haplótipos foi: 55,17% CAR/CAR e 36,20% BEN/CAR. Os pacientes com DF-SC expressam em 61,11% o perfil CAR/Atípico. Uma família recusou participar da pesquisa, nove pacientes foram ao óbito e 10 crianças foram excluídas da pesquisa em razão da transferência de local de atendimento; 3,2% dos pacientes não compareceram para coletar amostra sanguínea.

### Conclusões

Os programas de triagem neonatal identificam precocemente a DF e a AF, o que permite reduzir as taxas de morbimortalidade nos primeiros cinco anos e aumentar a qualidade de vida. Os programas de rastreio e ações desenvolvidas pela atenção primária à saúde são um grande passo para o aumento da sobrevivência da DF. Foi possível



conhecer a frequência da DF falciforme dos pacientes acompanhados no HRJF, assim como suas características epidemiológicas. O estudo verificou a efetividade do sistema de rede de cuidados dos portadores de hemoglobinopatias, desde o diagnóstico da triagem neonatal na atenção primária à saúde até o serviço de atenção secundária, e identificou que o protocolo de triagem neonatal adotado em Minas Gerais tem sido efetivo,

podendo ser considerado referência para a Política Nacional para DF. A frequência de portadores silenciosos e heterozigotos para alfa-talassemia entre as crianças com DF foi de 26,12%. Houve grande prevalência do haplótipo CAR em Juiz de Fora e região. O nível de hemoglobina fetal e a evolução clínica estão sendo estudados para verificar o impacto desse marcador como fator prognóstico ou histórico. ■

**ANEXO J****RETINOPATIA PROLIFERATIVA EM PACIENTE COM ANEMIA FALCIFORME:****RELATO DE CASO****Daniela de Oliveira Werneck Rodrigues\*****Luiz Oscar Machado Martins\*\*****Felipe Affonsêca Pedreira\*\*****Carlos Marcelino de Oliveira\*\*\*****Mônica de Albuquerque Costa\*\*\*****Luis Cláudio Ribeiro\*\*\***

\* Universidade Federal de Juiz de Fora;

Universidade Presidente Antônio Carlos /FAME- Departamento de Hematologia, Juiz de Fora, MG

\*\* Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina, Juiz de Fora – MG.

\*\*\* Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Estatística-Juiz de Fora, MG.

**RESUMO**

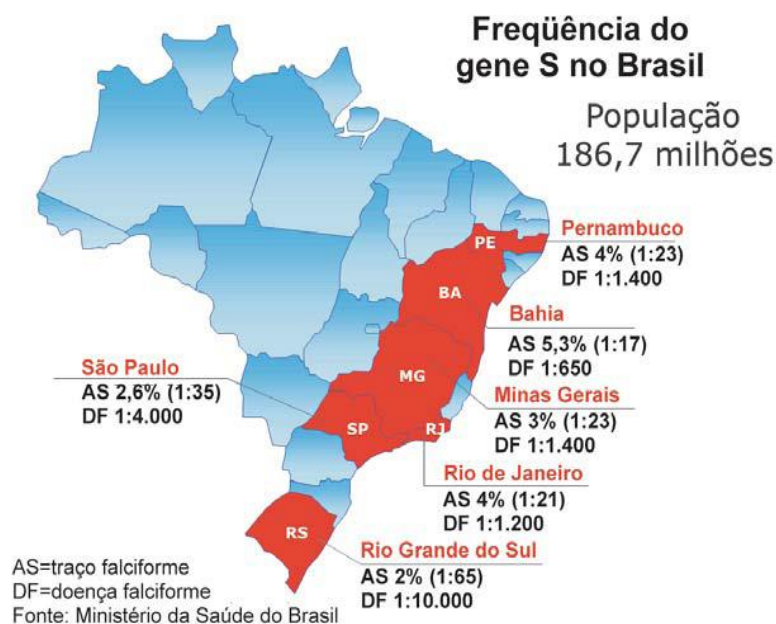
A Anemia Falciforme é uma anemia hemolítica que resulta da mudança estrutural na molécula de hemoglobina, devido à mutação no gene de globina no cromossomo 11. Esta mutação causa uma substituição de ácido glutâmico por valina na posição 6, com a formação da hemoglobina S. A hemoglobina S exposta à desoxigenação desencadeia fenômenos de vaso-oclusão na microcirculação com isquemia e injúria aos tecidos. As alterações oftalmológicas mais importantes relacionadas à Anemia Falciforme ocorrem principalmente pela obstrução dos vasos da retina. A retinopatia falciforme apresenta várias manifestações fundoscópicas, podendo, inclusive, levar à amaurose. Os autores relatam caso de paciente com retinopatia proliferativa falciforme severa e baixa acuidade visual que evoluiu com resposta favorável

após intervenção terapêutica. Os autores discutem as opções terapêuticas disponíveis e a necessidade da avaliação oftalmológica periódica aos pacientes com Anemia Falciforme, visando o diagnóstico e monitoramento de progressão ou regressão das lesões da retina.

**Palavras-chaves:** Anemia Falciforme. Manifestações Oculares. Retina. Fotocoagulação. Hidroxiuréia.

## 1 INTRODUÇÃO

A Anemia Falciforme (AF) é uma desordem hematológica hereditária que se caracteriza por uma substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 do segmento A da cadeia polipeptídica beta do cromossoma 11, com conseqüente modificação físico-química na molécula da hemoglobina originando a Hemoglobina S anômala (HbS).<sup>1,2,3,4,5</sup> No Brasil, a prevalência de AF é estimada ente 25.000 a 30.000 casos, com 3.500 novos casos a cada ano. (Figura 1).<sup>4,6</sup> A AF é uma doença hemolítica crônica com grande variabilidade clínica, determinada pelos fenômenos de vaso-oclusão, ativação de substâncias pró-inflamatórias e hiperviscosidade sanguínea.<sup>1,2,3,5</sup>

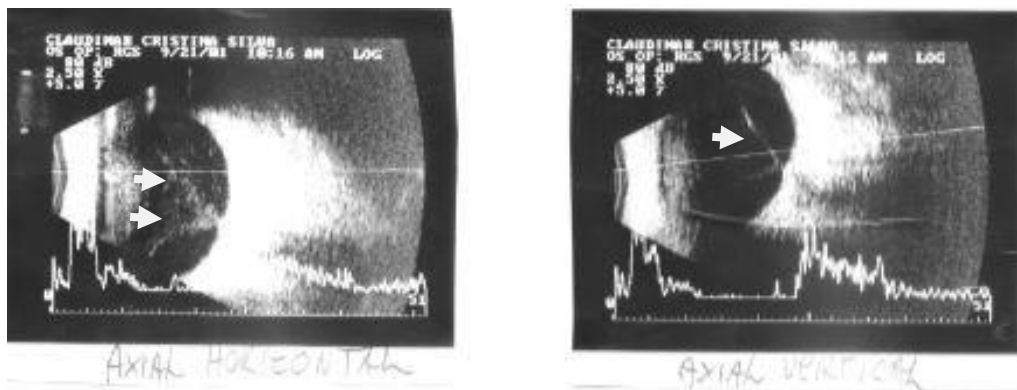


As manifestações oculares da AF podem afetar conjuntiva, úvea, retina, coróide, região periorbitária e câmara anterior do olho.<sup>7</sup> A retinopatia falciforme é classificada em não-proliferativa e proliferativa (RP)<sup>8,9</sup> e ambas possuem a mesma gênese. Segundo Downes et al., 2005, a RP desenvolveu-se em 14% dos pacientes.<sup>10</sup> A RP pode ocorrer em crianças, mas a faixa etária mais acometida pela doença é entre 20 e 39 anos.<sup>3,9,11,12,13</sup> Este artigo relata o caso de um paciente com AF com diagnóstico tardio que evoluiu com RP com perda de campo visual, sua evolução após intervenção oftalmológica e seu controle com a utilização de Hidroxiuréia (HU) conforme protocolo estabelecido pela Portaria SAS/MS nº 872 de 2002.<sup>14,15</sup> Os autores fazem uma revisão de literatura e discutem a necessidade de avaliação oftalmológica periódica nos pacientes com hemoglobinopatias e as opções terapêuticas disponíveis como fotocoagulação com laserterapia<sup>11,13,16</sup> e utilização da HU, potente droga indutora da síntese da Hemoglobina Fetal (HbF), como também redutora dos fenômenos inflamatórios e de vaso-oclusão. Discutem a necessidade de intercâmbio entre as diversas áreas da Medicina para diagnóstico precoce de lesões severas e incapacitantes como a retinopatia grave com amaurose.

## **2 RELATO DO CASO CLÍNICO**

Paciente de 46 anos, feminina, afrodescendente sabidamente portadora de AF e Hipertensão Arterial Sistêmica, natural e residente em Juiz de Fora – Minas Gerais com controle no Serviço de Hemoglobinopatia da Fundação Hemominas desde 1996. Em Março de 2001 procurou a Hemominas com queixas de borramento visual, dor aguda retrocular à esquerda e escotomas visuais com diminuição da acuidade. Foi encaminhada com urgência à Oftalmologia quando foi realizado mapeamento de retina que evidenciou área de hemorragia vítrea em olho esquerdo (OE), realizado fotocoagulação e indicado angi fluoresceinografia.

A retinografia e angiofluoresceinografia, em Junho de 2001, evidenciaram papila bem delimitada em olho direito (OD), com palidez, aumento da tortuosidade vascular, diminuição dos reflexos foveal e perimacular, e trânsitos coroidal e retiniano sem anormalidades significativas. No OE não foi possível à visualização da retina. A ecografia ocular em Setembro de 2001 revelou deslocamento incompleto posterior do vítreo (Fotografias 1 e 2) e hemorragia vítrea tênue no OE , confirmando o diagnóstico de retinopatia proliferativa falciforme estágio V, conforme classificação de Goldberg (Tabela 1). A paciente foi submetida a sessões de fotocoagulação/laserterapia com melhora da acuidade visual e redução da dor. Foi decidido manter controle rigoroso com a Oftalmologia e a introdução da HU conforme preconizado pelo protocolo do Ministério da Saúde.<sup>14,15</sup>

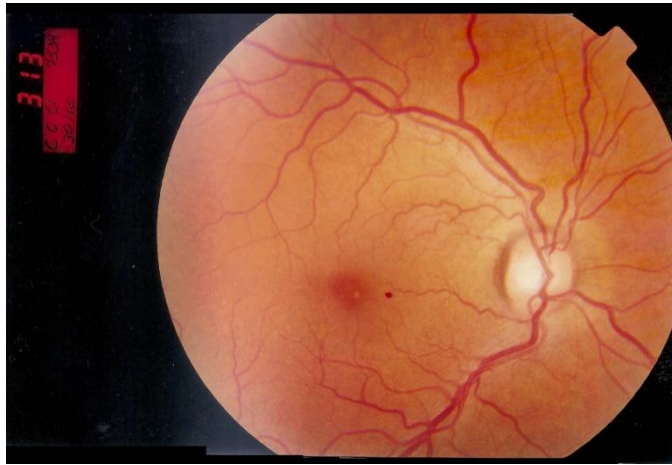


Fotografias 1 e 2: OE: Descolamento incompleto posterior do vítreo.

Fonte: Os autores (2001).

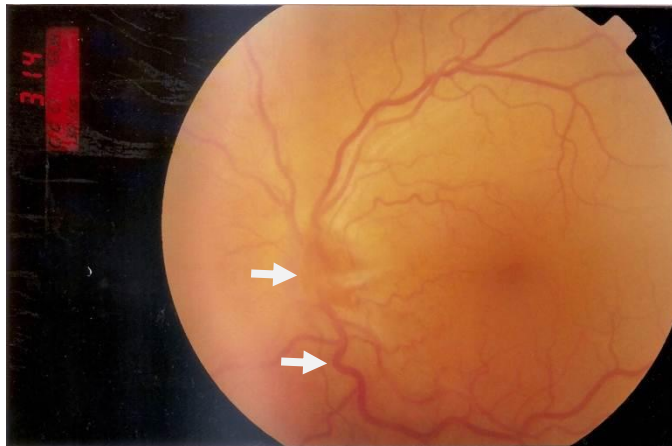
O controle da retinografia e angiofluoresceinografia, em Novembro de 2001, mostraram no OD (Fotografia 3) papila bem delimitada, com palidez temporal, aumento da tortuosidade vascular, diminuição dos reflexos foveal e perimacular, além de trânsitos coroidal e retiniano sem anormalidades significativas. No OE (Fotografia 4) havia hiperemia com acentuada hipofluorescência, presença de tecido fibroso, hemorragia vítrea, acentuada tortuosidade vascular, aumento do reflexo luminoso dorsal, cruzamentos vasculares com

desvio e ocultamento e rarefação do epitélio pigmentar em polo posterior. A equipe médica optou por nova sessão de laserterapia.



Fotografia 3: OD: Aumento da tortuosidade vascular.

Fonte: Os autores (2001).



Fotografia 4: OE: Hiperemia com acentuada hipofluorescência e presença de tecido fibroso. Presença de hemorragia vítrea e acentuada tortuosidade.

Fonte: Os autores (2001).

Paciente evoluiu com melhora importante do quadro oftalmológico com recuperação quase completa dos campos visuais. Em Dezembro de 2002 foi realizada nova angiofluoresceinografia que revelou acentuada hiperfluorescência papilar no OE com

congestão e grande aumento da tortuosidade vascular sugerindo neovascularização. Foi mantido o procedimento de fotocoagulação em OE.

A retinografia e angiofluoresceinografia em Fevereiro de 2004 mostrou reliquat fibroso na papila em OE com traves em região macular inferior, rarefação difusa do epitélio pigmentar, áreas de isquemia em região temporal, aumento da tortuosidade vascular e do reflexo luminoso dorsal. As sessões de laserterapia foram suspensas considerando a resposta clínica e melhora das lesões oftalmológicas.

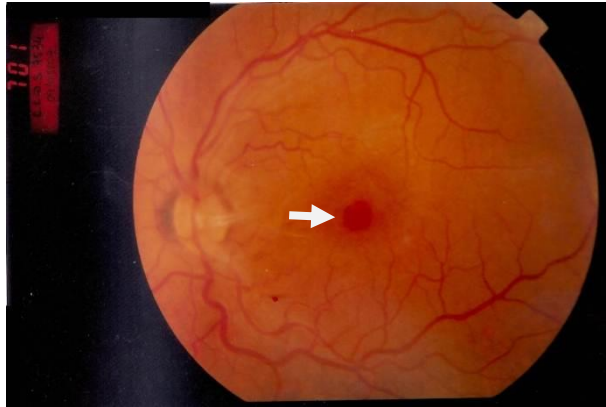
A retinografia de Maio de 2007 permitiu a visualização da escavação papilar, no OD (Fotografia 5), e vasos retinianos com aumento da tortuosidade e da turgência em ambos os olhos sobretudo em OE. A mácula e a coriorretina do OD tinham aspecto fisiológico. No OE (Fotografia 6), a mácula apresentava lesão hiperpigmentada arredondada e com bordos regulares sugestiva de buraco macular. A coriorretina do OE mostrou uma periferia temporal que apresentava exsudatos duros e hemorragias.

A angiofluoresceinografia em Maio de 2007 visualizou trânsitos coroidal e retiniano normais no OD. No OE teve diminuição da afluorescência macular e hiperfluorescência temporal periférica relacionada às fases do exame por extravasamento do corante.



Fotografia 5: OD: Discreto aumento da tortuosidade e da turgência nos vasos retinianos.

Fonte: Os autores (2007).



Fotografia 6: OE: Lesão hiperpigmentada arredondada e com bordos regulares sugestiva de buraco macular.

Fonte: Os autores (2007).

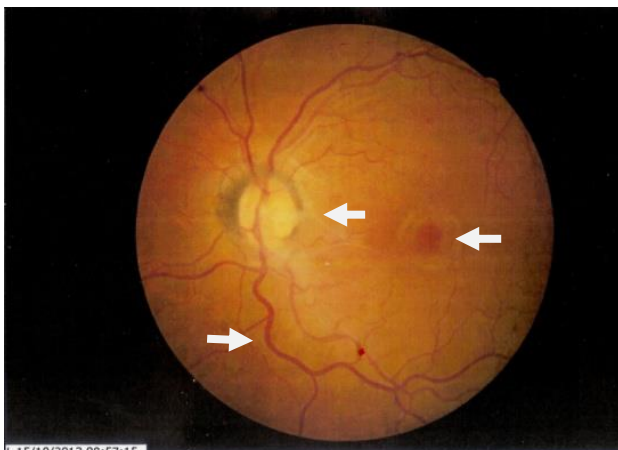
Em Outubro de 2013 foi realizada retinografia de controle que evidenciou em OD (Fotografia 7) a permanência da escavação no disco óptico de 0,5 com contornos regulares e presença de discreto aumento da tortuosidade e turgência dos vasos. O vítreo encontrava-se limpo e a retina sem alterações significativas. No OE (Fotografia 8), o disco óptico apresentava escavação 0,2 com contorno mal delimitado e presença de tecido fibroso. A mácula mostrou lesão hiperpigmentada e arredondada. A periferia da retina evidenciava exsudatos duros e hemorragias. Os vasos do OE apresentavam aumento da tortuosidade e turgência. O vítreo encontrava-se limpo.



Fotografia 7: OD: Disco óptico com escavação de 0,5 e contornos regulares. Vasos com aumento da tortuosidade e turgência.



Fonte: Os autores (2013).



Fotografia 8: OE: Mácula com lesão hiperpigmentada e arredondada. Retina com exsudatos duros e hemorragias. Vasos com aumento da tortuosidade e turgência.

Fonte: Os autores (2013).

Em Março de 2014 a paciente foi submetida à nova avaliação oftalmológica e apresentava acuidade visual com correção em OD de 20/25 e vultos em OE resultante do buraco macular. Do ponto de vista hematológico a paciente segue em uso de HU com elevação dos níveis de Hemoglobina Média e Fetal, controle trimestral e sem outras intercorrências.

O estudo do caso encontra-se autorizado pelo CEP e autorizado pelo paciente através de documento de consentimento livre esclarecido assinado.

### **3 DISCUSSÃO**

As lesões oculares mais frequentes da AF ocorrem na retina<sup>8</sup> e caracterizam-se pela tortuosidade e dilatação das vênulas. Em 1930,<sup>17</sup> foi descrito pela primeira vez as alterações fundoscópicas na AF que foram confirmadas por outros pesquisadores em 1954.<sup>18</sup> A retinopatia falciforme é classificada em não-proliferativa e proliferativa.<sup>9</sup> A retinopatia falciforme apresenta incidência de 3% na AF, já a retinopatia falciforme proliferativa se desenvolve em 14% dos pacientes. Além disso, a incidência da RP aumenta proporcionalmente com a idade e sua regressão espontânea foi observada em 32% dos casos.<sup>10</sup>

A perda da acuidade visual nos pacientes com AF não tratados da retinopatia ocorre em mais de 10%, com uma incidência estimada de perda visual em RP de 31/1000 olhos/anos comparada com 1.4/1000 olhos/anos nos pacientes sem RP.<sup>19</sup>

A evolução dos eventos oculares pode ser acompanhada pela análise da angiofluoresceinografia.<sup>3,13,20,21</sup> Os principais achados da fase não-proliferativa são: as hemorragias pré-retinianas do tipo “salmon patch” e hiperpigmentações retinianas tipo “black sunburst”. A RP foi classificada em cinco estágios segundo Goldberg, em 1971 (Tabela 1).<sup>9,19,22,23</sup>

| Tabela 1 - Estágios da retinopatia falciforme proliferativa |                            |
|---|----------------------------|
| Estágios  | Achados                    |
| I   | Obstrução Arteriolar       |
| II  | Anastomoses artériovenosas |
| III   | Proliferação neovascular   |
| IV  | Hemorragia Vítrea          |
| V   | Deslocamento de Retina     |

Fonte: Goldberg et al, 1971

O estágio I é caracterizado pela oclusão arteriolar definitiva, com conseqüente hipóxia retiniana e rearranjo dos capilares adjacentes. No estágio II, inicia-se eventos angiogênicos, com dilatação vascular, na tentativa nutrir a retina avascular. Os estágios I e II ocorrem em dois terços dos pacientes.<sup>11,14</sup> No estágio III ocorre a neovascularização pré-retiniana, formando uma imagem em leque (*sea fan*).<sup>9,13,19,20,21</sup> As neoformações vasculares, desenvolvidas a partir de alças ou cruzamentos arteriovenosos, podem sofrer processos isquêmicos.<sup>11,14,24</sup> Os novos vasos são frágeis, imaturos e aderentes ao gel vítreo, com possibilidade de hemorragia vítrea que caracteriza o estágio IV da RP na AF. Quando esta hemorragia atinge o eixo visual, causa sintomas de "moscas volantes" e de diminuição ou perda da visão. A repetição destes fenômenos hemorrágicos potencializa a tração, criada pelo tecido fibrogliial, e a adesão do vítreo à neovascularização, levando à rutura, descolamento da retina e perda da visão (estágio V), estágio final da RP.<sup>3,9,11,19,21,25</sup>

Os eventos oclusivo-neovascular–hemorrágicos na RP ocorrem em associação inicial com um evento necrótico e terminam com uma atrofia severa da retina periférica. A cegueira é rara devido à localização periférica desses eventos. A complicação que mais frequentemente leva à cegueira é o descolamento de retina.<sup>11,13,16</sup> Os neovasos devem ser submetidos à fotocoagulação com laser assim que detectados.<sup>11,13,16,19</sup>

A prevenção das complicações oculares pode ser atingida através da utilização de drogas que modificam a fisiopatologia da AF. A natureza multifacetada da AF predispõe às alterações embólicas e isquêmicas da microcirculação. As novas opções terapêuticas que são empregadas incluem drogas como a HU que estimula a síntese da HbF, promove a diminuição do número dos neutrófilos, reduz a expressão de moléculas de adesão dos eritrócitos, aumenta a síntese e biodisponibilidade de óxido nítrico pela ativação da guanilil ciclase e consequente aumento da GMP cíclico intraeritrocitária e endotelial<sup>12,15</sup>, outros tratamentos que modulam a densidade eritrocitária (clotrimazol, pidolato magnésio), drogas com efeito antiinflamatório e com redução da adesividade plaquetária (anticorpos anti-adesão, anticorpos antiintegrina, anti Fator Willebrand, sulfassalazina e estatinas), terapia antioxidante (glutamina, deferiprona), agentes antitrombóticos (heparina, ticlopidina, warfarina), vasodilatadores (óxido nítrico e arginina), aférese ou exsanguíneo terapêutica, utilização de células tronco hematopoéticas e terapia gênica estão sendo validados e ainda requerem mais estudos para serem introduzidos na prática médica com o objetivo de reduzir ou tratar a retinopatia falciforme proliferativa.<sup>13,27</sup>

O protocolo clínico e as diretrizes terapêuticas para o uso de HU na AF esclarece a vantajosa relação aos riscos a curto e longo prazos da terapia com essa droga. A RP é um dos critérios clínicos de indicação da utilização dessa droga. Observou-se que o uso de HU está associado com o aumento da produção intracelular e intra-eritrocitária de óxido nítrico o que facilita a vasodilatação e aumento dos níveis de HbF.<sup>14,15</sup>

A prevenção da retinopatia falciforme é o tratamento mais efetivo. Em 2009, o Ministério da Saúde, ciente da necessidade da prevenção e diagnóstico precoce das alterações retinianas publicou o Manual de Saúde Ocular em Doença Falciforme (DF)<sup>1,2</sup> que orienta a conduta a ser seguida. O protocolo define que os indivíduos com DF devem ser submetidos ao exame oftalmológico a cada dois anos, até os dez anos de idade e, anualmente, a partir de então. Caso seja identificado alguma alteração ocular, a periodicidade do controle e o tratamento devem ser reestabelecidos de acordo com a situação de cada paciente e discutida pela equipe médica. Os pacientes com retinopatia moderada e grave devem ser submetidos à angiofluoresceinografia e devem ser acompanhados pelo oftalmologista.<sup>11,28,29,30</sup>

A integração entre a Hematologia e Oftalmologia é muito importante para os cuidados de prevenção, promoção e reabilitação dos pacientes com AF considerando que as complicações podem culminar com a redução da acuidade visual, muitas vezes, irreversível.<sup>1,2</sup>

Os autores através deste relato de caso mostraram a efetividade do tratamento conjunto com laserterapia e HU em um paciente com AF culminando com a recuperação importante das lesões retinianas.

### **Proliferative retinopathy in a patient with Sickle Cell Anemia: case report**

#### **Abstract**

Sickle Cell Anemia is a hemolytic anemia that results from structural changes in the hemoglobin molecule due to a mutation in the globin gene on chromosome 11. This mutation causes a substitution of glutamic acid for valine in position 6, with the formation of hemoglobin S. Deoxygenation of hemoglobin S triggers phenomena of vascular occlusion in the microcirculation with ischemia and injury to tissues. The most important ocular changes related to Sickle Cell Anemia occur mainly by obstruction of retinal vessels. Sickle

cell retinopathy presents various fundus manifestations, and may even lead to blindness. The authors report a case of a patient with severe sickle cell retinopathy and low visual acuity who developed a favorable response to therapeutic intervention. The authors discuss the treatment options available and the need for periodic ophthalmologic evaluation for patients with Sickle Cell Anemia, targeting the diagnosis and the monitoring of progression or regression of retinal lesions.

**Keywords:** Sickle cell anemia. Eye Manifestations. Retina. Light Coagulation. Hydroxyurea.

## REFERÊNCIAS

- 1 - Ministério da Saúde. Manual de Saúde Ocular em Doença Falciforme. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. Brasília; 2009.
- 2 - Vilela RQB, Bandeira DM, Silva MAE. Alterações oculares nas doenças falciformes. Rev Bras Hematol Hemoter 2007;29(3):285-287.
- 3 - Bisol T, Fior O, Esteves JF, Friderich JR. Influencia do genótipo da hemoglobinopatia falciforme nas manifestações retinianas em pacientes de um hospital universitário. Arq Bras Oftal 2000;63(4):273-6.
- 4 - Ministério da Saúde. Doença falciforme: condutas básicas para tratamento. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. Brasília; 2012.
- 5 - Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. Seminar. Lancet 2010; 376: 2018–31.
- 6- Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. Rev Bras Hematol Hemoter 2007; 29(3):203–206.
- 7 - Lim JI. Ophthalmic manifestations of sickle cell disease: update of the latest findings. Curr Opin Ophthalmol 2012; 23:533–536.
- 8 - Hoang QV, Chau FY, Shahidi M, Lim JI. Central Macular Splaying and Outer Retinal Thinning in Asymptomatic Sickle Cell Patients by Spectral Domain Optical Coherence Tomography. Am J Ophthalmol 2011; 151(6): 990–994.
- 9 - Freitas LGA, Isaac DLC, Tannure WT, Lima EVS, Abudi MB, Tavares RS, Freitas CA, Ávila MP. Alterações retinianas apresentadas em pacientes portadores de hemoglobinopatia falciforme atendidos em um Serviço Universitário de Oftalmologia. Arq Bras Oftalmol 2011;74(5):335-7.

- 10 - Downes SM, Hambleton IR, Chuang EL, Lois N, Serjeant GR, Bird AC. Incidence and natural history of proliferative sickle cell retinopathy: observations from a cohort study. *Ophthalmology* 2005;112(11):1869-75.
- 11 - Luty GA, Goldberg MF Embury et al, Ophthalmologic complications in: Sickle cell disease: basic principles and clinical practice. Ed Raven Press; 1994; p 703-24.
- 12 - Elagouz M, Jyothi S, Gupta B, Sivaprasad S. Sickle cell disease and the eye: old and new concepts. *Surv Ophthalmol* 2010;55(4):359-77.
- 13 - Bonanomi MTBC, Lavezzo MM. Sickle cell retinopathy: diagnosis and treatment. *Arq Bras Oftalmol* 2013;76(5):320-7.
- 14 - Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 872, de 06 de novembro de 2002. Estabelece o uso de Hidroxiúreia. Disponível em <[www.saude.gov.br/sas/dsra/protocolos/do\\_d14\\_01.pdf](http://www.saude.gov.br/sas/dsra/protocolos/do_d14_01.pdf)> Acesso em: 10 dez. 2013.
- 15 - Cançado RD, Lobo C, Ângulo IL, Araújo PIC, Jesus JA. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2009;31(5):361-66.
- 16 - Farber MD, Jampol LM, Fox P, Moriarty BJ, Acheson RW, Rabb MF, et al. A randomized clinical trial of scatter photocoagulation of proliferative sickle cell retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1991;109:363-7.
- 17 - Cook WC. A case of sickle cell anemia with associated subarachnoid hemorrhage. *J Med* 1930;11:541.
- 18 - Henry MD, Chapman AZ. Vitreous hemorrhage and retinopathy associated with sickle cell disease. *Am J Ophthalmol* 1954;38:204-9.
- 19 - Fadugbagbe AO, Gurgel RQ, Mendonça CQ, Cipolotti R, Santos AM, Cuevas LE. Ocular manifestations of sickle cell disease. *Annals of Tropical Paediatrics* 2010; 30: 19–26.
- 20 - Goldberg MF. Natural history of untreated proliferative sickle retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1971;85:428-37.
- 21 - Goldberg MF. Classification and pathogenesis of proliferative sickle retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1971;71:649-65.
- 22 - Sobrinho EFA, Saraiva JCP, Silva JN, Silva APS, Lima RC. Manifestações retinianas em pacientes portadores de anemia de células falciformes. *Rev Bras Oftalmol* 2011; 70 (5): 284-9.
- 23 - Cury D, Sorte NB, Lyra IM, Zanette AD, Limat HC, Castro BG et al. Lesões oculares em pacientes com doença falciforme da Bahia, Brasil. *Rev Bras Oftalmol* 2010; 69 (4): 259-63.

- 24 – Condon PI, Serjeant GR. Behaviour of untreated proliferative sickle retinopathy. Br J Ophthalmol 1980;64:404-11.
- 25 - Gagliano D, Goldberg MF. Evolution of the salmon patch in sickle cell retinopathy. Arch Ophthalmol 1989;107:1814-5.
- 26 - Gallo H. Anemia falciforme e complicações oculares. Disponível em [www.fglaboratorio.com.br/artigo\\_02.htm](http://www.fglaboratorio.com.br/artigo_02.htm) > Acessado em 15 jan. 2013.
- 27 - Siqueira RC. Stem cell therapy in retinal diseases. Rev Bras Hematol Hemoter 2012;34(3):222-6.
- 28 - Emerson GG, Luty GA. Effects of sickle cell disease on the eye: clinical features and treatment. Hematol Oncol Clin North Am 2005;19(5):957-73.
- 29 – National Institute of Health. Management and therapy of sickle cell disease. 3 ed. 1995.
- 30- Yawn BP, Buchanan GR, Afenyi-Annan AN, Ballas SK, Hassell KL et al. Management of sickle cell disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. JAMA 2014;312:1033–1048.

## APÊNDICES



## APÊNDICE A - Ficha de registro e questionário sócio econômico

### REGISTRO DE DADOS DO PRONTUÁRIO

|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| Nome.....                                  | Nº do prontuário:.....              |
| Data de nascimento...../...../.....        | Idade .....Local de nascimento..... |
| Informante.....                            | Parentesco:.....                    |
| Local de coleta do teste do pezinho: ..... | Tipo de hemoglobinopatia.....       |

### QUESTIONÁRIO SOCIOECONOMICO

1. **Peso da criança (afenido por pesquisador):** (A) \_\_\_\_\_ Kg
2. **Altura da criança (afenido por pesquisador):** (A) \_\_\_\_\_ cm
3. **Qual o seu parentesco com a criança cadastrada na Fundação Hemominas?**
  - (A) Mãe.
  - (B) Pai.
  - (C) Avó.
  - (D) Avô.
  - (E) Outro: \_\_\_\_\_
4. **Como você considera esta criança?**
  - (A) Branco(a).
  - (B) Pardo(a).
  - (C) Preto(a).
  - (D) Amarelo(a).
  - (E) Indígena.
5. **Qual o estado civil da mãe desta criança?**
  - (A) Mãe solteira.
  - (B) Casada / mora junto com o pai desta criança.
  - (C) Casada / mora junto com outro que não é o pai desta criança.
  - (D) Separada / divorciada /desquitada.
  - (E) Viúva.
  - (F) Outro: \_\_\_\_\_
6. **Qual o estado civil do pai desta criança?**
  - (A) Pai desconhecido.
  - (B) Casado / mora junto com a mãe desta criança.
  - (C) Casado / mora junto com outra que não é a mãe desta criança.
  - (D) Separado / divorciado /desquitado.
  - (E) Viúvo.
  - (F) Outro: \_\_\_\_\_
- Quem mora com esta criança atualmente? Sim (A) Não (B)**
7. Pai (A) (B)
8. Mãe (A) (B)
9. Irmãos (A) (B)
10. Outros parentes (A) (B)
11. Amigos ou colegas (A) (B)
12. **Contando com esta criança, quantas pessoas moram na mesma casa que ela mora?**
  - (A) Duas pessoas.
  - (B) Três pessoas.
  - (C) Quatro pessoas.
  - (D) Cinco pessoas.
  - (E) Seis pessoas ou mais.
13. **Quantos filhos excluindo este, a mãe desta criança tem?**
  - (A) Nenhum filho.
  - (B) Um filho.
  - (C) Dois filhos.
  - (D) Três filhos.
  - (E) Quatro filhos ou mais
  - (F) Não sabe informar
14. **Quantos irmãos maternos e paternos esta criança tem?**
  - (A) Nenhum
  - (B) Um irmão.
  - (C) Dois irmãos.

- (D) Três irmãos.
- (E) Quatro ou mais irmãos.
- (F) Não sabe informar

**15. Quantos irmãos com Anemia Falciforme têm esta criança?**

- (A) Nenhum.
- (B) Um irmão.
- (C) Dois irmos.
- (D) Três ou mais irmãos.
- (F) Não sabe informar

**16. Quantos irmãos com Traço Falciforme têm esta criança?**

- (A) Nenhum.
- (B) Um irmão.
- (C) Dois irmos.
- (D) Três ou mais irmãos.
- (F) Não sabe informar

**17. Quantos irmãos têm esta criança sem Doença Falciforme (traço e anemia falciforme)?**

- (A) Nenhum.
- (B) Um irmão.
- (C) Dois irmos.
- (D) Três ou mais irmãos.
- (F) Não sabe informar

**18. Até quando o pai desta criança estudou?**

- (A) Não estudou.
- (B) Da 1.<sup>a</sup> à 4.<sup>a</sup> série do ensino fundamental (antigo primário).
- (C) Da 5.<sup>a</sup> à 8.<sup>a</sup> série do ensino fundamental (antigo ginásio).
- (D) Ensino médio (2.<sup>o</sup> grau) incompleto.
- (E) Ensino médio (2.<sup>o</sup> grau) completo.
- (F) Ensino superior incompleto.
- (G) Ensino superior completo.
- (H) Pós-graduação.
- (I) Não sei.

**19. Até quando a mãe desta criança estudou?**

- (A) Não estudou.
- (B) Da 1.<sup>a</sup> à 4.<sup>a</sup> série do ensino fundamental (antigo primário).
- (C) Da 5.<sup>a</sup> à 8.<sup>a</sup> série do ensino fundamental (antigo ginásio).
- (D) Ensino médio (2.<sup>o</sup> grau) incompleto.
- (E) Ensino médio (2.<sup>o</sup> grau) completo.
- (F) Ensino superior incompleto.
- (G) Ensino superior completo.
- (H) Pós-graduação.
- (I) Não sei.

**20. Em que o pai desta criança trabalha ou trabalhou, na maior parte da vida?**

- (A) Na agricultura, no campo, em fazenda ou na pesca.
- (B) Na indústria.
- (C) No comércio, banco, transporte ou outros serviços.
- (D) Funcionário público do governo federal, estadual ou do município ou militar.
- (E) Profissional liberal, professor ou técnico de nível superior.
- (F) Trabalhador do setor informal (sem carteira assinada).
- (G) Trabalha em casa em serviços (costura, cozinha, aulas particulares etc).
- (H) No lar.
- (I) Não trabalha.
- (J) Não sei.

**21. Qual a posição do pai desta criança no trabalho, na maior parte do tempo?**

- (A) Gerente, administrador ou diretor de empresa privada.
- (B) Funcionário público (federal, estadual ou municipal), com funções de direção.
- (C) Militar (guarda-civil, polícia estadual ou Forças Armadas), com posto de comando.
- (D) Empregado no setor privado, com carteira assinada.
- (E) Funcionário público (federal, estadual ou municipal), sem função de direção.
- (F) Militar (guarda-civil, polícia estadual ou Forças Armadas), sem posto de comando.
- (G) Trabalho temporário, informal, sem carteira assinada.
- (H) Trabalho por conta própria.
- (I) Desempregado.
- (J) Aposentado.
- (K) Outra situação.

(L) Não sei.

**22. Em que a mãe desta criança trabalha ou trabalhou, na maior parte da vida?**

- (A) Na agricultura, no campo, na fazenda ou na pesca.
- (B) Na indústria.
- (C) No comércio, banco, transporte ou outros serviços.
- (D) Como trabalhadora doméstica.
- (E) Como funcionária do governo federal, do estado ou do município ou militar.
- (F) Como profissional liberal, professora ou técnica de nível superior.
- (G) No lar.
- (H) Trabalha em casa em serviços (cozinha, costura, aulas particulares etc.).
- (I) Não trabalha.
- (J) Não sei.

**23. Qual a posição da mãe desta criança no trabalho, na maior parte do tempo?**

- (A) Gerente, administradora ou diretora de empresa privada.
- (B) Funcionária pública (federal, estadual ou municipal), com funções de direção.
- (C) Militar (guarda-civil, polícia estadual ou Forças Armadas), com posto de comando.
- (D) Empregada no setor privado, com carteira assinada.
- (E) Funcionária pública (federal, estadual ou municipal), sem função de direção.
- (F) Militar (guarda-civil, polícia estadual ou Forças Armadas), sem posto de comando.
- (G) Trabalho temporário, informal, sem carteira assinada.
- (H) Trabalho por conta própria.
- (I) Desempregada.
- (J) Aposentada.
- (K) Outra situação.
- (L) Não sei.

**24. Somando a sua renda das pessoas que moram com esta criança, quanto é, aproximadamente, a renda familiar?** (Considere a renda de todos que moram na sua casa.)

- (A) Até 1 salário mínimo (até R\$ 420,00 inclusive).
- (B) De 1 a 2 salários mínimos (R\$ 420,00 a R\$ 840,00 inclusive)
- (C) De 2 a 5 salários mínimos (R\$ 840,00 a R\$ 2.100,00 inclusive).
- (D) De 5 a 10 salários mínimos (R\$ 2.100,00 a R\$ 4.200,00 inclusive).
- (E) Nenhuma renda.

**Quais e quantos dos itens abaixo há em sua casa? 1 (A) 2 (B) 3 ou mais (C) Não tem (D)**

- 25. Rádio ou Som (A) (B) (C) (D)
- 26. Microcomputador (A) (B) (C) (D)
- 27. Acesso à Internet (A) (B) (C) (D)
- 28. Automóvel (A) (B) (C) (D)
- 29. Máquina de lavar roupa (A) (B) (C) (D)
- 30. Geladeira (A) (B) (C) (D)
- 31. Telefone fixo (A) (B) (C) (D)
- 32. Telefone celular (A) (B) (C) (D)
- 33. TV (A) (B) (C) (D)
- 34. Videocassete e/ou DVD (A) (B) (C) (D)

**Como é sua casa? Sim (A) Não (B)**

- 35. Própria? (A) (B)
- 36. É em rua calçada ou asfaltada? (A) (B)
- 37. Tem água corrente da torneira? (A) (B)
- 38. Tem eletricidade? (A) (B)
- 39. É situada em comunidade indígena? (A) (B)
- 40. Com que idade esta criança foi matriculada pela primeira vez na escola? (A) \_\_\_\_\_ ano(s).
- (B) ainda não foi matriculada na escola.

**41. Qual o tipo de escola esta criança freqüenta?**

- (A) Particular.
- (B) Pública.
- (C) Não esta matriculada em nenhuma escola.

**42. Que tipo de condução a criança usa para vir a Fundação Hemominas?**

- (A) Carro da família.
- (B) Ônibus urbano.
- (C) Ônibus intermunicipal.
- (D) Condução da prefeitura.
- (E) A pé.
- (F) Outro: \_\_\_\_\_

Data da entrevista: \_\_/\_\_/\_\_\_\_ Assinatura do responsável pela entrevista: \_\_\_\_\_

## APENDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96

Pesquisa: AVALIAÇÃO DA TRIAGEM NEONATAL PARA DOENÇA FALCIFORME E OUTRAS HEMOGLOBINOPATIAS: DO DIAGNÓSTICO NA ATENÇÃO BÁSICA À SAÚDE AO TRATAMENTO NA REDE PÚBLICA ESTADUAL - Uma análise epidemiológica, clínica e social - Hemocentro Regional de Juiz de Fora: passado e presente da doença falciforme”

Registro no Comitê de Ética em Pesquisa - 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 hereditária, 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 evolução clínica pode estar relacionada com características genéticas dos pacientes, e o objetivo desta pesquisa é estudar algumas destas características (haplótipos associados ao gene da HbS) que já foram associadas com a doença falciforme. Os 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 incluirmos seu(sua) filho(a) nesta pesquisa. Caso você autorize, você não terá nenhum custo. Você responderá a um questionário e 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. O material coletado ficará guardado no Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas e será usado apenas para os fins propostos nesta pesquisa (identificação dos haplótipos associados ao gene da HbS). O resultado dos testes genéticos será anexado ao prontuário do participante. Na divulgação dos resultados, o nome do paciente 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) nesta pesquisa, pois o paciente não será prejudicado em seu atendimento caso não participe. Também não sofrerá nenhum prejuízo se decidir participar, mas desistir depois.

Qualquer dúvida que você tiver, você poderá entrar em contato com Daniela Werneck no telefone 3257-3100, nos horários de 9:00 às 16:00h, para esclarecimentos.

Eu, \_\_\_\_\_, responsável pelo menor \_\_\_\_\_, após esclarecimentos, autorizo o pesquisador a incluir meu (minha) filho(a) nesta pesquisa.

Rua: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Local \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pesquisadores responsáveis: Daniela de Oliveira Werneck Rodrigues, Marina Lobato Martins, Maria Teresa Bustamante Teixeira, Luiz Claudio Ribeiro

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS: 3248-4535**

**APÊNDICE C: Instrumento De Coleta de Dados****FICHA DE COLETA DE DADOS**

Ficha n°  1. Prontuário Hemominas  2. Iniciais

3. Data de nascimento

4. Sexo: ( ) masculino ( ) feminino

5. Cor: ( ) branca ( ) negra ( ) parda ( ) outra ( ) sem informação

6. História familiar : MAE \_\_\_\_\_ PAI \_\_\_\_\_ IRMÃOS \_\_\_\_\_  
( ) sem informação

7. Naturalidade:

8. Distância entre residência e hemocentro:

( ) até 50 km ( ) de 50 a 100 km ( ) de 101 a 150 km ( ) de 151 a 200 km  
( ) de 201 a 250 km ( ) de 251 a 300 km ( ) maior que 300 km

9. Código do NUPAD:

10. Data do teste do pezinho:

11. Data de diagnóstico:

12. Tipo de hemoglobinopatia: \_\_\_\_\_

13. Data da 1ª Consulta na Hemominas : \_\_\_\_\_

14. Hematologista responsável:

15. PN \_\_\_\_\_ EN \_\_\_\_\_ PCN \_\_\_\_\_ ( ) sem informação: \_\_\_\_\_

16. Carteira de Vacinação: \_\_\_\_\_

17. Antibioticoprofilaxia:  18. Acido Fólico:

19. Manifestação clínica da doença falciforme:

( ) crise vasooclusiva ( ) litíase biliar  
( ) crise torácica aguda ( ) AVE  
( ) infecções ( ) ICC  
( ) sem informação

Listar todas as manifestações:

Número de Internações

20. Transfusões:

( ) Sim: Total: ( ) Não

( ) Regime de Hipertransusão

21. Dosagem da Hemoglobina Fetal: 2 anos \_\_\_\_\_ 5 anos \_\_\_\_\_

Dosagem de Ferritina: \_\_\_\_\_

22. Pesquisa da Alfa talassemia por PCR:

23. Número de atendimentos médicos no HRJF

24. Pesquisa das cadeias de Beta Globina:

( ) CAR ou Bantu (-+----)

( ) Benin (----+)

( ) Senegal (++-+++)

( ) Camarões (-++-+-)

( ) Asiático (++-+++)

( ) Outro \_\_\_\_\_

25. Grupo Sanguíneo e Fenotipagem: \_\_\_\_\_

26. Perfil sorológico:

|                | Positivo | Negativo | Sem informação |
|----------------|----------|----------|----------------|
| Anti-HIV I/II  |          |          |                |
| Anti-HCV       |          |          |                |
| VDRL           |          |          |                |
| Anti-HBc       |          |          |                |
| Anti-HTLV I/II |          |          |                |

27. Complicações

( ) hemossiderose

( ) dano neurológico permanente

( ) STA

( ) litíase

( ) Dactilite

( ) esplenectomia

( ) Priaprismo

( ) AVE

29. Outras Comorbidades: \_\_\_\_\_

30. HYDREA ( ) Sim ( ) Não

31. Óbito: ( ) sim ( ) não

32. Causa de óbito:

|                              |  |
|------------------------------|--|
| ( ) STA                      | ( ) Infecção                                 |
| ( ) Síndrome de Sequestração | ( ) Causa não relacionada à hemoglobinopatia |
| ( ) Sem informação           |  |