

1. INTRODUÇÃO

A doença falciforme é uma doença hereditária e tem por principal característica a deformação dos eritrócitos, os quais mudam para forma de foice (*sickle* em inglês) quando em baixa tensão de oxigênio. Sua causa é resultado de uma mutação pontual no ácido desoxirribonucleico (DNA) do cromossomo 11, com substituição da timina por adenina (GTG para GAG) ocasionando a substituição do ácido glutâmico pela valina (BALLAS; MOHANDAS, 1996; BONINI-DOMINGOS et. al., 1997; LAGURADIA, 2006).

Há uma grande variabilidade na gravidade do quadro clínico do paciente com a doença falciforme, porém a de maior relevância clínica é a Anemia Falciforme (AF) ou homozigose da hemoglobina S (HbSS). A clínica da anemia falciforme é afetada por fatores como: os níveis de hemoglobina fetal (HbF), a determinação de outras hemoglobinopatias agindo em conjunto com a HbS e a presença de haplótipos herdados de acordo com a origem étnica do paciente (BRASIL, 2002; SILVA, 2006).

Além dos fatores já citados, podem interferir na clínica da doença falciforme: fatores genéticos que influenciam no processo de polimerização da hemoglobina S (HbS), no fenômeno da falcilização, na hemólise e a resposta do indivíduo às complicações ou ao tratamento. Existem ainda fatores ambientais como o local onde vive o paciente, doenças infectocontagiosas, condições socioeconômicas e acesso à assistência médica (PINTO; ZAGO, 2007).

Os haplótipos da região dos genes da globina β^S possuem papel importante na determinação da gravidade da doença, pois influenciam nos níveis HbF; são caracterizados por sequências de bases nitrogenadas que compõem o DNA do agrupamento de genes (*cluster*) que orientam a síntese dessas proteínas, e sua determinação se faz por meio de técnicas de Biologia Molecular, utilizando-se variedade de enzimas de restrição que se diferenciam pela especificidade em fragmentar o DNA conforme sequência de bases nitrogenadas reconhecida. Assim, com a utilização de técnicas de Biologia Molecular no estudo da anemia falciforme, tornou-se possível conhecer cinco haplótipos de HbSS, denominados conforme a origem de sua procedência geográfica: Asiático (ou Indiano-Asiático), Senegal, Benin, Bantu ou CAR, e Camarões. A partir da identificação de haplótipos obtiveram-se embasamentos para admitir que a origem da HbS foi de caráter multirregional (NAOUM, 1997; NAOUM, 2000).

Os haplótipos são relevantes tanto para o esclarecimento da diversidade clínica da anemia falciforme, quanto para os estudos sobre a origem étnica da população. Assim, o haplótipo Senegal, raro no Brasil, está associado a níveis elevados de HbF, enquanto o

haplótipo Árabe-Indiano, que quase não ocorre no Brasil, tem os níveis mais elevados de HbF e corresponde à forma mais benigna de anemia falciforme. Portanto, a partir do exposto, observa-se que a gravidade e a evolução clínica da anemia falciforme no Brasil, podem ser divergentes quando comparadas a outros países (ANVISA, 2002; PINTO; ZAGO, 2007).

Os pacientes têm grande morbidade e mortalidade, por causa principalmente das crises dolorosas vasos-oclusivas e infartamento de órgãos vitais que comprometem a qualidade de vida do indivíduo. Em se tratando de crianças, há ainda outras complicações devido ao menor calibre de seus vasos facilitarem o seu entupimento, podendo causar complicações como crise de infarto ósseo, síndrome torácica aguda, acidente vascular encefálico, entre outras (SILLA, 1999).

Um dos primeiros sintomas é a anemia hemolítica que é ocasionada pelo declínio dos níveis de hemoglobina fetal logo após o sexto mês de vida pós-natal. A HbF, sintetizada pelos genes gama (γ), encontra-se elevada no período fetal com concentrações que variam entre 90 e 100%, diminuem para 0 a 2% após o sexto mês de vida. Ela é um importante fator de proteção contra fenômenos de falcilização, em virtude de possuir maior afinidade pelo oxigênio e não se polimerizar em baixa tensão de oxigênio como ocorre na Hb S (NAOUM, 1997; PINTO; ZAGO, 2007; MOUSINHO-RIBEIRO et. al., 2008).

A variabilidade clínica da doença falciforme depende dos fatores adquiridos (haplótipos e associação com outras hemoglobinopatias) e de fatores ambientais, como: o nível socioeconômico, o acesso à assistência médica e à prevenção contra infecções. Segundo dados do IBGE, a população de etnia negra é a que possui menor nível sócio econômico, sem falar na falta de conhecimento durante o atendimento realizado por profissionais despreparados para com portadores do HbSS (ASHLEY-KOCH et al, 2000; FRY, 2005).

A taxa de mortalidade entre crianças menores de 5 anos com Anemia Falciforme varia entre 25 a 30%, sendo que a maioria é causada por infecções fatais, sequestro esplênico ou crises aplásticas (INIGUEZ *et. al.*, 2003)

Assim como em outras doenças crônicas, pacientes com anemia falciforme tem dificuldades de adaptação emocional, social e acadêmica; causando dificuldade de relacionamento familiar, na interação com os colegas, no rendimento acadêmico e no desenvolvimento de uma imagem positiva. As repetidas crises de dor e internações podem levar o paciente a depressão, ansiedade, comportamento agressivo e ao medo (SANTOS; MIYAZAKI, 1999)

Apesar da inclusão das hemoglobinopatias na fase II do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) a partir da portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde, vê-se que nem todos os estados do Brasil aplicam da fase II do “teste do pezinho”, uma parte ainda utiliza apenas a fase I, esta por sua vez não possui a detecção das hemoglobinopatias. Isso demonstra as peculiaridades que o sistema pública de saúde tem em cada região do Brasil (RAMALHO et. al., 2003).

O estado do Amapá ainda não possui a fase II do PNTN. Observa-se que o diagnóstico tardio da doença é fator agravante, tendo em vista que piora a taxa de sobrevivência e a qualidade de vida dos doentes falciforme. As constantes crises de dor, as internações hospitalares e as consultas médicas fazem com que os pacientes não consigam manter um emprego regular, tornando-os inativos ou exercem atividades não remuneradas (SILVA et. al., 1993).

A população amapaense tem em sua fundação histórica a presença de negros oriundos da África, principalmente no período da construção da Fortaleza de São José de Macapá. Tal origem infere grandemente na prevalência de pessoas com HbS no estado do Amapá. Foi visto anteriormente que a anemia falciforme causa diminuição da qualidade de vida e morbi-mortalidade elevada devido à multiplicidade de suas manifestações clínicas, ocasionando o aumento da demanda de pacientes atendidos nos hospitais públicos do estado. O comprometimento de regiões diferentes do corpo dificulta o diagnóstico da doença, pois muitas das vezes o doente é encaminhado aos médicos da especialidade da região afetada, e não ao hematologista. O presente estudo tem por principal objetivo associar as manifestações clínicas de pessoas com anemia falciforme do estado do Amapá com seus respectivos haplótipos, para que, com essas informações, seja direcionado um tratamento mais eficaz melhorando a qualidade de vida do doente e diminuindo a demanda dos hospitais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Relacionar as manifestações clínicas com os haplótipos da anemia falciforme

2.2 Objetivos específicos

a) concatenar as manifestações clínicas de pacientes com anemia falciforme com seu haplótipo;

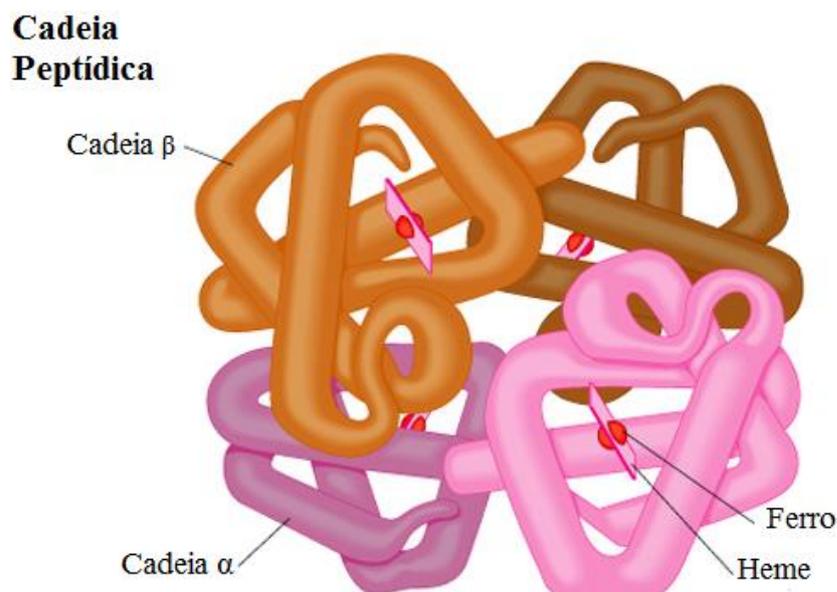
b) associar os resultados da hemoglobina fetal com os haplótipos caracterizado e suas manifestações clínicas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. ESTRUTURA E ORIGEM DA HEMOGLOBINA NORMAL

A hemoglobina (Hb) é uma proteína presente nos eritrócitos dos mamíferos com função primordial de transportar o oxigênio (O_2). A molécula de hemoglobina humana é formada por diferentes tipos de cadeias: α (alfa), β (beta), γ (gama), δ (delta), ϵ (épsilon) e ξ (zeta); as quais constituem um tetrâmero de polipeptídios de globina formado por duas cadeias α mais duas cadeias não- α . A ponte de ligação química é um núcleo prostético de ferro, a ferroprotoporfirina IX (conhecido como “heme”), o qual tem a propriedade de receber, ligar e/ou liberar o O_2 nos tecidos (Figura 01) (NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Figura 01 – Estrutura da cadeia peptídica da hemoglobina.



Fonte: adaptado de <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/chemistry/hemoglobin.jpg>

Os genes envolvidos na gênese das cadeias globínicas são regulados por agrupamentos (*clusters*) presentes nos cromossomos 16 e 11. Em um segmento de DNA de 35kb presente no braço curto do cromossomo 16 localizam-se os genes importantes para síntese da hemoglobina: o gene zeta (ξ) que codifica a cadeia globínica ξ ; dois pseudogenes ($\psi\xi$ e $\psi\alpha$); e os genes alfa 1 ($\alpha 1$) e alfa 2 ($\alpha 2$), estes por sua vez codificam as cadeias globínicas alfa (BRASIL, 2002; NETO; PITOMBEIRA, 2003).

No cromossomo 11, os genes que interessam para a formação da hemoglobina são: os genes ϵ (épsilon), gama glicina- γ^G , gama adenina- γ^A , um pseudogene $\psi\beta$ e os genes δ (delta) e β (beta) (BONINI-DOMINGOS et. al., 1997).

São produzidas diversas hemoglobinas desde o período embrionário até a fase adulta (Figura 02). Em um indivíduo adulto normal, os eritrócitos são compostos por 96-98% de hemoglobina A; 2,5-3% de hemoglobina A₂ e 0-1% de hemoglobina fetal (BRASIL, 2002; NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Figura 2 – Tipos de hemoglobina de acordo com seu período de produção e composição da cadeia globínica.

Tipo de hemoglobina	Período preponderante de síntese	Cadeias globínicas
Gower-1	Embrião/até 3º mês de gestação	$\xi_2\varepsilon_2$
Portland	Embrião/até 3º mês de gestação	$\xi_2\gamma_2$
Gower-2	Embrião/até 3º mês de gestação	$\alpha_2\varepsilon_2$
Hb Fetal	Feto/até 6º mês de vida	$\alpha_2\gamma_2$
HbA ₂	Feto/vida adulta	$\alpha_2\delta_2$
HbA	Vida adulta	$\alpha_2\beta_2$

Fonte: NETO; PITOMBEIRA, 2003.

O gene ε é expresso na fase embrionária, enquanto os genes g^A (gama-alanina) e g^G (gamaglicina) são característicos do período fetal. Os genes δ e β são atuantes a partir do período fetal e se expressam por toda a vida após o nascimento. Pelo fato da espécie humana ser diplóide, podemos representar a presença normal dos diferentes genes para um indivíduo da seguinte forma: β/β , γ/γ , δ/δ e $\alpha_1\alpha_2/\alpha_1\alpha_2$ (NAOUM, 1997; NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Variantes estruturais raras se originam da deleção de um nucleotídeo, o que resulta em um desvio da fase de leitura no sentido descendente, com conseqüente alteração da seqüência de aminoácidos ou, por outro lado, extensão da cadeia polipeptídica porque o códon da terminação está alterado. Dependendo do tipo e do local onde ocorre uma substituição de aminoácido em uma cadeia de globina, esta poderá ou não alterar o comportamento da molécula de hemoglobina. Se a anormalidade estrutural produz manifestações clínicas, o indivíduo apresenta uma hemoglobinopatia. Mutações que alteram quantitativamente a síntese de uma das cadeias da globina originam as síndromes talassêmicas (RAPAPORT, 1990; LEE et. al, 1998; SILVA, 2006).

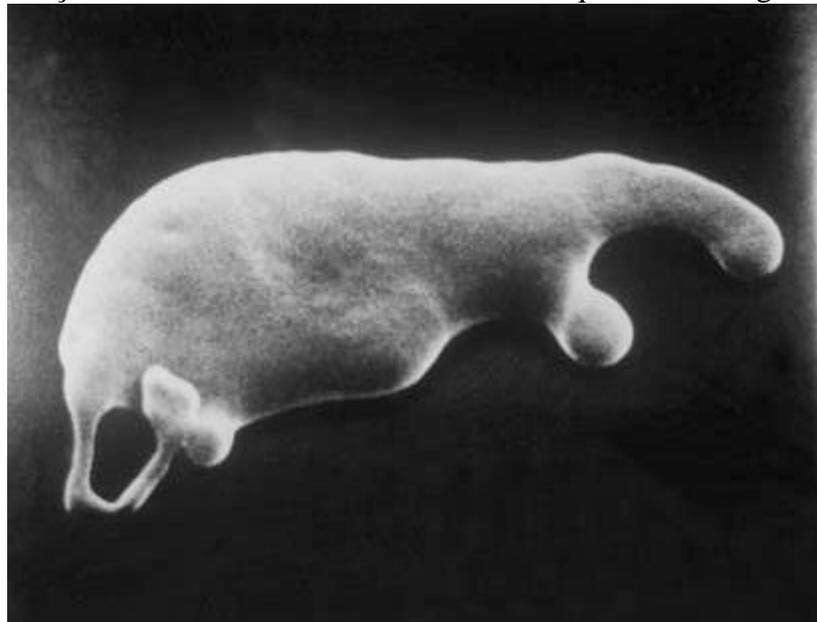
Há quase 600 variantes de hemoglobina já descritas, porém, poucas estão associadas a manifestações clínicas e alterações hematológicas. O melhor exemplo é a hemoglobina S (OSÓRIO; ROBINSON, 1993).

3.2 ALTERAÇÕES MOLECULARES, ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DA HEMOGLOBINA S

A substituição do ácido glutâmico, na 6ª posição da cadeia beta, pela valina gera diversas modificações estruturais e funcionais na molécula da hemoglobina. A Hb S possui uma mobilidade mais lenta quando comparada com a Hb A em eletroforese de pH alcalino, devido a valina ser um aminoácido neutro enquanto que o ácido glutâmico é carregado negativamente. Vale ainda lembrar que a carga negativa do ácido glutâmico auxilia no afastamento das moléculas de hemoglobina, enquanto que a carga neutra da valina favorece a polimerização, sob a condição de baixo teor de oxigênio (BONNINI-DOMINGOS et. al., 1997; NAOUM, 2000).

A polimerização provoca alteração na forma do eritrócito quando este não está ligado à molécula de oxigênio, onde ele deixa de ser um disco bicôncavo e passa para a forma de foice. Essa polimerização é dependente da concentração de Hb S e podem ser mediadas pela desidratação das células e perda de oxigênio, ou seja, quanto mais desidratada e/ou maior perda de oxigênio mais densa é o eritrócito, isso facilitaria o processo da falcilização (figura 03) (DOMINGOS et. al., 1997).

Figura 03 – Alteração estrutural de um eritrócito em foice quando desoxigenado.



Fonte: NAOUM, 2000.

O alongamento do eritrócito provocado pela polimerização da HbS altera a estabilidade da bomba de sódio e potássio com consequente perda de potássio e água, e aumento da concentração de Hb S. Outra consequência é o aumento da concentração

intracelular de cálcio pela falência da bomba de cálcio/ATPase e aumento da permeabilidade da membrana a esse íon. Fatos esses deletérios são as principais causas da irreversibilidade dos eritrócitos falcêmicos (NAOUM, 2000).

Alterações na membrana eritrocitária são caracterizadas por desarranjos das proteínas espectrina-actina, diminuição das glicoproteínas, geração de radicais livres oxidantes e orientação anormal dos fosfolípidos. Apresenta deformações sob forma de escavações na membrana dos eritrócitos, alterando a plasticidade tornando-os com maior possibilidade de aderirem ao endotélio, aderência essa também causada pela fosfatidil serina está localizada externamente nos eritrócitos falcêmicos enquanto que o normal seria estar internamente na membrana (BONNINI-DOMINGOS et. al., 1997; NAOUM, 2000).

Sem as anormalidades estruturais, a hemoglobina é uma proteína respiratória presente no interior dos eritrócitos (células arredondadas e flexíveis) dos mamíferos que tem como principal função o transporte de oxigênio (O₂) por todo o organismo. Sua estrutura é de uma proteína esférica formada de quatro cadeias polipeptídicas bastante semelhantes entre si e, quatro grupos heme, nos quais os átomos de ferro estão no estado ferroso (Fe²⁺). A porção protéica – chamada globina – consiste de duas cadeias α (cada uma com 141 resíduos de aminoácidos) e duas cadeias β (cada uma com 146 resíduos de aminoácidos) (NETO;PITOMBEIRA, 2003; VALTER, 2006).

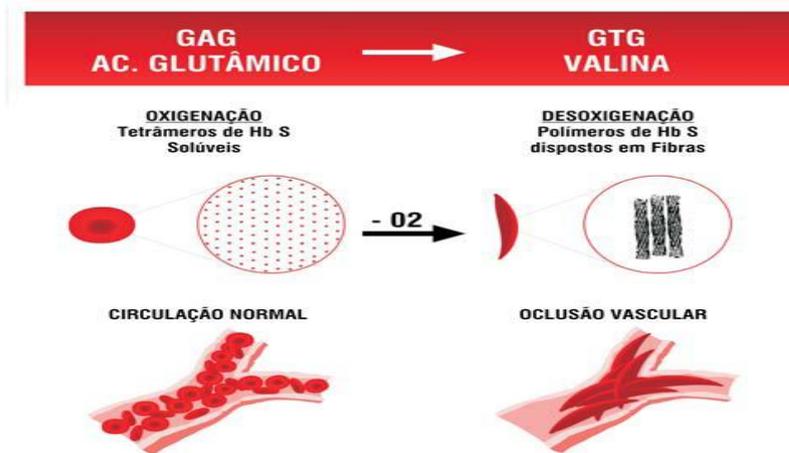
Por ser uma anomalia da globina beta, as características clínicas da anemia falciforme são percebidas após a estabilização da produção das globinas, fato que ocorre por volta do sexto mês de vida, pois até este período, o gene da cadeia beta (β) globínica é expresso com pouca intensidade, sendo que por volta do sexto mês ocorrerá uma mudança (*switch*), quando a síntese de cadeia gama (γ) é largamente substituída pela síntese de cadeia β , dando origem à produção da hemoglobina A (α_2/β_2), no entanto, na anemia falciforme serão sintetizadas hemoglobinas anormais HbS (NAOUM, 2000; NETO;PITOMBEIRA, 2003).

A hemoglobina mutante (α_2/β_S_2 ou Hb S) possui propriedades físico-químicas bastante diferentes da hemoglobina normal devido à perda de duas cargas elétricas por molécula de hemoglobina (NETO;PITOMBEIRA, 2003).

As moléculas quando desoxigenadas, se organizam em longos polímeros de filamentos duplos, que por sua vez, associam-se em feixes com um duplo filamento central rodeado de seis filamentos duplos de polímeros. Esses feixes de “cristais” dentro das hemácias podem ser vistos à microscopia eletrônica e determinam deformações das células. A deformação mais conhecida é provocada por feixes de polímeros organizados mais ou

menos paralelamente, dando à hemácia uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice” ou “falcizada”. A formação de polímeros de HbS dentro das hemácias tem como consequência múltiplas alterações da célula, sendo as mais importantes: o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular e da membrana, a formação de polímeros da hemoglobina com proteínas da membrana e a exposição de moléculas de adesão da membrana celular (Figura 04) (PINTO; ZAGO, 2007).

Figura 04 – Processo de indução à falcização das hemácias pela polimerização da desoxiemoglobina diante da baixa concentração de oxigênio.



Fonte: LOBO et. al. 2007.

A membrana é desta forma, o principal espelho onde se refletem alterações moleculares que estão ocorrendo no interior da célula. Essas modificações têm consequências que as amplificam, levando às manifestações clínicas: a) provocam um aumento da adesão de hemácias ao endotélio, desencadeando fenômenos inflamatórios que influenciam também os granulócitos e plaquetas; b) enrijecem a membrana e toda a hemácia, encurtando sua sobrevida em circulação; c) provocam lesões microvasculares; d) causam depleção de óxido nítrico que contribui para vasoconstrição e ativação da inflamação; e) ativam a coagulação. Esses fenômenos resultam em dano celular irreversível, traduzido clinicamente pelo surgimento dos sinais e sintomas da doença (Figura 05) (LOBO et. al., 2007; PINTO; ZAGO, 2007).

Figura 05 – Eritrócito normal e um com HbS oxigenado, o qual apresenta as escavações devido deformações sofrida.



Fonte: NAOUM, 2000.

3.3 HEMOGLOBINOPATIAS

As hemoglobinopatias compreendem um grupo de doenças genéticas caracterizadas por alterações na porção protéica da molécula de Hb, sendo classificadas em estruturais ou de síntese. As hemoglobinopatias estruturais são decorrentes da presença de mutação pontual, inserções e deleções de nucleotídeos que ocorrem em regiões codificantes dos genes da globina, levando à substituição de aminoácidos na cadeia polipeptídica (BUNN,1997; SONATI; COSTA, 2008).

As hemoglobinopatias de síntese, denominadas talassemias, são decorrentes da ausência ou redução de um ou mais tipo de cadeia da globina α , β , γ ou δ , desequilibrando as suas quantidades relativas, sendo as talassemias α e β as mais comuns, uma vez que compõem as hemoglobinas presentes na vida adulta (SONATI; COSTA, 2008). Nas síndromes talassêmicas as cadeias produzidas em quantidades normais podem formar tetrâmeros que precipitam e lesam a membrana do eritrócito, promovendo a sua destruição prematura. A hemoglobinizacão deficiente resulta em hipocromia e microcitose dos eritrócitos, que são sinais característicos desse grupo de doenças (NUSSBAUM et al., 2008; SHAH, 2004; WENNING & SONATI, 2007).

Foram descritas mais de 1200 mutações nos genes da globina, entre as variantes estruturais mais frequentemente encontradas estão as Hb S (HbB; glu6val), C (HbB; glu6lys), D (HbB;glu121gln) e E (HbB;lys26glu) (SILVA; YAMAGUCHI, 2007), sendo que a Hb S, seguida da Hb C são as mais frequentes na população brasileira (ZAGO et. al, 2000).

A distribuição das hemoglobinopatias variantes varia de acordo com as populações estudadas, sendo que a miscigenação racial característica da população brasileira é um fator que deve ser levado em consideração quando se analisa a prevalência das doenças falciforme (DF) (BRANDELISE; CZERESNIA., 2004).

3.4 HEMOGLOBINOPATIA SC

A Hb C é decorrente da mutação pontual GAG>AAG no gene da globina β , que leva a substituição do ácido glutâmico por lisina; esta variante da hemoglobina proporciona a formação de cristais intraeritrocitários (COSTA, 2001; ZAGO, 2001). A doença da hemoglobina C (HbCC) é caracterizada pela homozigose da Hb C, que apresenta quadro clínico de hemólise crônica e hepatoesplenomegalia; os indivíduos heterozigotos HbAC possuem o traço C (ZAGO et. al., 2000; RAMALHO,2003).

A hemoglobina C pode formar heterozigoto duplo com outras Hb variantes como a HbS, esta não participa da formação do polímero de HbS quando desoxigenada, por isso os indivíduos com HbSC têm evolução clínica menos grave que os indivíduos com anemia falciforme (AF). Estes indivíduos apresentam quase todas as complicações clínicas da AF, tais como susceptibilidade a infecções e crises de vaso-oclusão, sendo que o comprometimento oftalmológico pode ser até mais frequente na HbSC do que na AF (ZAGO et al., 2000).

Dentre os indivíduos com DF as alterações fundoscópicas oculares são mais frequentes em indivíduos com HbSC do que nos AF, sendo que a causa não está completamente elucidada. Existe a hipótese de que essas alterações ocorram devido ao aumento da viscosidade sanguínea, uma vez que nos indivíduos com AF a anemia é mais grave, tendo um efeito protetor contra eventos vaso-oclusivos no olho; já os indivíduos HbSC apresentam anemia moderada, com viscosidade sanguínea elevada, quando comparados aos AF, o que favoreceria o evento vaso-oclusivo retiniano recorrente e suas consequências, como isquemia, neovascularização, hemorragia vítrea, proliferação fibrovascular e descolamento de retina (BISOL et al., 2000).

A Hb C em heterozigose apresenta prevalência de 3% entre afro-americanos e a doença por hemoglobina C (homozigoto) em 1/6.000 (NAGEL; STEINBERG, 2001). No Brasil a Hb C é a segunda hemoglobina variante mais comum, Azevedo e colaboradores em 1980 estudando crianças em idade escolar na Bahia encontraram a frequência de 2,2 a 5,2% para a HbC; Adorno e colaboradores em 2005 descreveram a frequência de 6,5% para HbC estudando recém-nascidos da Maternidade Pública Tsylla Balbino em Salvador na Bahia.

3.5 HEMOGLOBINOPATIA S

A Hb S é resultado da mutação pontual no sexto códon do gene da globina β , GAG>GTG, o que leva à substituição do ácido glutâmico por valina. A Hb S apresenta estabilidade e solubilidade diferente quando submetida a concentrações baixas de oxigênio, tendendo a se polimerizar e formar feixes, o que leva à deformação e enrijecimento da membrana do eritrócito, compreendendo o fenômeno de falcização (BACKES et al., 2005). Os indivíduos homozigotos para a hemoglobina S (HbSS) possuem a AF, que é caracterizada por 80% ou mais de HbS e presença de anemia hemolítica grave com manifestações clínicas heterogêneas; os heterozigotos possuem o traço falciforme ou HbAS, com 20 a 45% de HbS, sendo assintomáticos (WEATHERALL & PROVAN, 2000; ZAGO, 2001).

A doença falciforme (DF) é o termo utilizado para definir o grupo de doenças que tem como característica comum a presença da hemoglobina variante S. As DFs incluem a anemia falciforme (HbSS) e as situações em que a HbS se combina com outras hemoglobinas variantes e de síntese, como ocorre com a S-beta talassemia (S/ β tal), a doença SC, doença SD e a HbS-persistência hereditária de Hb fetal (S/PHHF) (ZAGO *et al.*, 2001).

3.6 ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme é uma doença genética com herança autossômica recessiva caracterizada pela homozigose da hemoglobina S. A criar uma projeção hidrofóbica nos tetrâmeros de Hb S após a desoxigenação. A interação dos tetrâmeros resulta na formação de polímeros ou fibra de Hb S nos eritrócitos, que se tornam rígidos e passam a apresentar a forma de foice (WU *et al.*, 2006; ALABDULAALI, 2007).

O fenômeno de falcização é reversível, porém depois de repetidos eventos, o eritrócito perde a flexibilidade, tornando-se irreversivelmente rígido e distorcido (foice). Os eritrócitos irreversivelmente falcizados apresentam alterações nas proteínas de membrana, interação ativada com o endotélio vascular, plaquetas, leucócitos, fatores da coagulação e citocinas, fatores que contribuem para a obstrução vascular e isquemia e consequentemente para a ocorrência de crises dolorosas e hemólise intra e extravascular (BUNN, 1997; NOGUICH *et al.*, 2003; MONTALEMBERT, 2008).

Assim, o traço falciforme ou heterozigose para hemoglobina S corresponde a uma condição em que o indivíduo herda de um dos pais o gene para hemoglobina A e do outro o gene para a hemoglobina S. Os indivíduos heterozigotos (HbAS) não apresentam nenhuma

anormalidade hematológica e clínica, sendo que os sinais clínicos associados ao traço falciforme, só ocorrem sob condições que propiciam o processo de falcização, como hipóxia, acidose e desidratação, portanto a expectativa de vida é semelhante a da população geral (FERRAZ; MURAO, 2007; WATANABE, 2007).

Percebe-se que pela alta frequência do gene HbAS na população, é comum a união dessas pessoas entre si, geralmente são casais portadores do traço falciforme que desconhecem tal condição genética e possuem a probabilidade de 25% a cada gestação, gerarem filhos com anemia falciforme (WATANABE, 2007).

Figura 06 – Probabilidade de geração de filhos com o gene da Anemia Falciforme

Os indivíduos heterozigotos para a hemoglobina S possuem um percentual de hemoglobina anômala que varia de 22 a 45% da hemoglobina total, enquanto que um indivíduo homozigoto tem quase que sua totalidade de hemoglobina anômala. Há controversas se esse percentual de hemoglobina S em indivíduos heterozigotos causa ou não sintomas, no entanto, a opinião mais comum é que essas complicações ocorram muito raramente, pois o baixo potencial de falcilização dos eritrócitos nos AS exige fatores desencadeantes (hipóxia, acidose, desidratação) muito intensos (SILVA; RAMALHO, 1997).

Uma medida para tentar conter o aumento de pacientes com a doença falciforme é o aconselhamento genético. Essa ferramenta é a mais importante no campo das doenças hereditárias, tendo em vista abordarem aspectos educacionais e reprodutivos em pacientes com traço falciforme. Quando há a união entre casais com traço AS, o aconselhamento genético orienta-os sobre os riscos de se ter uma criança com anemia falciforme, e se, por ventura, vierem a ter um descendente, detectar precocemente para saber se herdou a doença para que o tratamento seja iniciado rapidamente (GUIMARÃES; COELHO, 2010).

3.7 EPIDEMIOLOGIA DA HEMOGLOBINA S

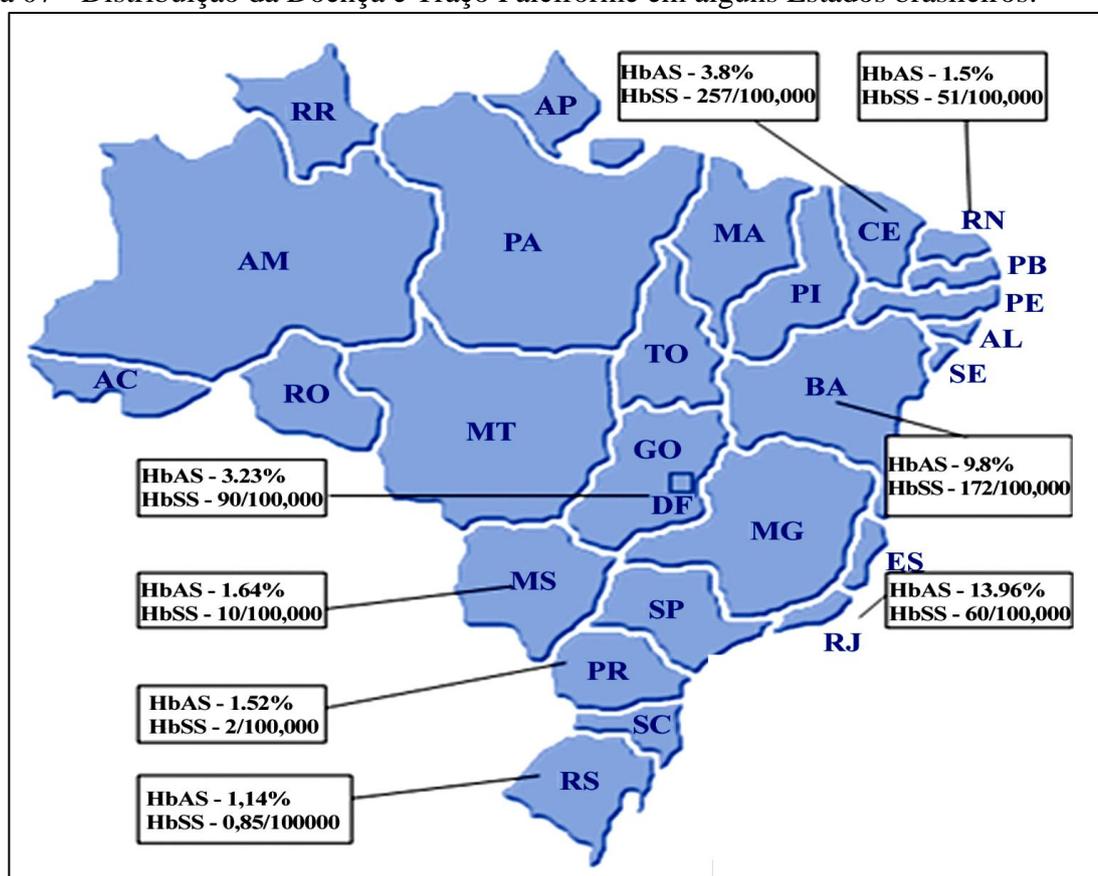
A hemoglobina S é mundialmente distribuída apresentando frequência elevada na África, principalmente na região Centro-Occidental, Sul e Atlântico-Occidental com frequência gênica de 0,12 a 0,14 no Congo e 0,1 no Senegal (LEE, et. al., 1998); também é encontrada em países do Mediterrâneo, na Arábia Saudita e Índia. Na América Latina e Estados Unidos cerca de 8% dos descendentes de negros é portador da HbS, estimando-se a incidência de 1/625 nascidos com doença falciforme nos Estados Unidos (ZAGO, 2001).

A distribuição da HbS é heterogênea entre os estados brasileiros. No Sul e Sudeste do Brasil observam-se frequências menores que no Nordeste. Ramalho em 1986 estudando a população negra de São Paulo descreveu a frequência de 6,6% para os heterozigotos HbAS. Brandelise, em 2004, ao realizar a triagem neonatal em Campinas - SP, descreveu a incidência de 0,02% para DF do tipo HbSS e HbSC. A frequência de 0,09% para os heterozigotos AS foi descrita em doadores de sangue descendentes de italianos da região Sul (LISOT & SILLA, 2004). No Nordeste brasileiro observa-se prevalência elevada para a AF. Em Natal, Rio Grande do Norte, Araújo e col., em 2004, descreveram a frequência de 1,5% para indivíduos AS e a incidência de 0,05% para a AF em recém-nascidos.

A Bahia apresenta a frequência brasileira mais elevada para a HbS. Azevedo em 1980 estudando crianças em idade pré-escolar descreveram a frequência de 7,4% para indivíduos AS; Adorno e col. em 2005 observaram ao estudarem recém-nascidos, a frequência de 9,8% para o genótipo AS; a incidência de 0,9% para a doença SC e de 0,2% para AF.

Cançado e Jesus (2007) compilaram os dados epidemiológicos fornecidos pelo Ministério da Saúde referentes à DF, onde se observou número maior de indivíduos heterozigotos nas regiões onde o tráfico de escravos foi mais intenso (Figura 07).

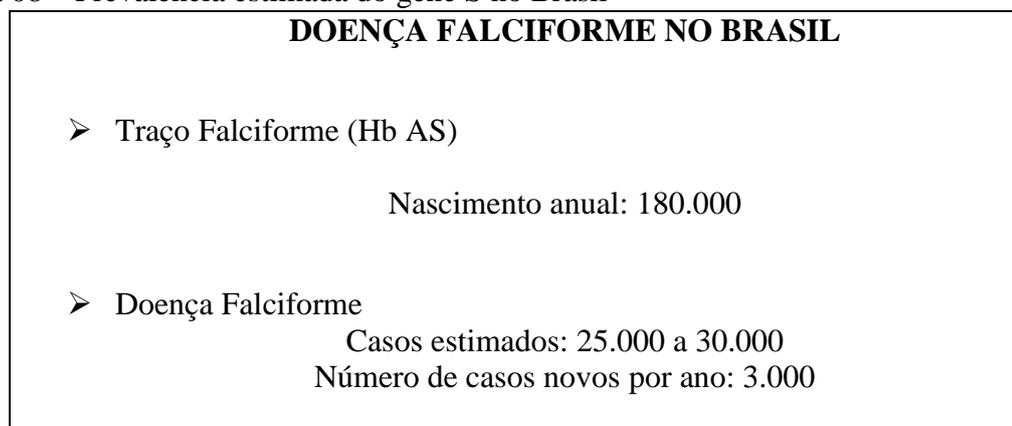
Figura 07 - Distribuição da Doença e Traço Falciforme em alguns Estados brasileiros.



Fonte: BALDIN et al., 2011.

Assim, verifica-se que a distribuição do gene βS é bastante heterogênea no Brasil. Com base nos dados do programa nacional de triagem neonatal (PNTN), estima-se a existência de 25.000 a 30.000 pessoas com doença falciforme no Brasil, e o surgimento de 3.000 novos casos anualmente, por conseguinte, fundamentando-se nestes dados, pode-se afirmar que as doenças falciformes são problemas de saúde pública no Brasil (Figura 08) (BRASIL, 2008; MANFREDINI; ZANATTA, 2009).

Figura 08 – Prevalência estimada do gene S no Brasil



Fonte: BRASIL, 2008.

Tabela 01- Proporção de nascidos vivos diagnosticados com doença falciforme de acordo com o programa de triagem neonatal

Estados	Proporção/Nascidos vivos
Bahia	1:650
Rio de Janeiro	1:1.200
Pernambuco, Maranhão, Minais Gerais e Goiás	1:1.400
Espírito Santo	1:1.800
São Paulo	1:4.000
Mato Grosso do Sul	1:5.850
Rio Grande do Sul	1:11.000
Santa Catarina e Paraná	1:13.500

Fonte: SIMÕES et al., 2010.

Afetando parcela significativa da população brasileira, a anemia falciforme ocorre também em populações não afrodescendentes, caracterizando-se como doença

eminentemente geográfica, que afeta populações da África, do Mediterrâneo e/ou da Ásia, sendo possivelmente produto de uma bem sucedida estratégia evolucionária humana para lidar com a malária causada pelo *Plasmodium falciparum* (CAMPBELL et. al., 1996).

3.8 FATORES MODULADORES DA ANEMIA FALCIFORME

Nos indivíduos com AF há fatores genéticos que são considerados moduladores da gravidade da doença por influenciarem os níveis intra-eritrocitário de Hb S, entre eles encontram-se a talassemia alfa, a concentração de hemoglobina fetal e o tipo de haplótipo ligado ao grupo de genes da globina β S (ZAGO et al., 2007).

3.8.1 Talassemia Alfa

A talassemia α é uma hemoglobinopatia de síntese, onde ocorre a diminuição ou ausência das cadeias α , devido a deleções ou mutações nos genes responsáveis pela síntese destas cadeias. A presença da talassemia α em indivíduos com AF reduz a disponibilidade desta cadeia reduzindo sua incorporação na molécula de HbS, com redução de sua concentração. Esses indivíduos têm taxa menor de hemólise, concentração elevada de Hb e expectativa maior de vida quando comparado com indivíduos com AF que não apresentam talassemia, com eritrócitos menos desidratados e mais flexíveis (STEINBERG; RODGERSA, 2001; STEINBERG, et. al., 2005).

Os indivíduos normais apresentam quatro genes que codificam as cadeias α , a talassemia α pode ser decorrente de deleções ou mutações pontuais nos genes $\alpha 1$ e /ou $\alpha 2$. A talassemia α^+ é representada pela perda de um dos genes α em pelo menos um dos cromossomos ($-\alpha/\alpha$) e na talassemia α^0 há a perda de dois genes α no mesmo cromossomo ($--/\alpha$) (LEONOVA et al., 1996; CANÇADO, 2009). Os eventos de recombinação gênica (*crossing over* desigual) que ocorrem durante a meiose podem levar a deleção de um cromossomo α ($-\alpha$) e triplicação no outro ($\alpha\alpha\alpha$) devido à similaridade entre os genes α . Dois tipos de deleção são mais frequentes na talassemia $\alpha 2$, a de 3,7 kilobases (Kb) e a de 4,2 Kb (THOMPSON et al., 2004). A deleção de 3,7 kb é encontrada no mundo inteiro, sendo a mais prevalente no África, Índia, no Nepal, na Sardenha e em muitas outras populações, como as do Mediterrâneo, China e outras da Ásia Oriental. A deleção $\alpha 4.2$ Kb também tem distribuição mundial, apesar de ser mais comumente encontrada na Índia, Melanésia, Tailândia e outras populações do sudeste asiático (HUISMAN et al., 1987; WEATHERALL et al., 2010).

A incidência da talassemia α é elevada na Ásia, Oriente Médio, Oceania, Mediterrâneo e África. A talassemia α 3,7Kb é a mais frequente, sendo que no Brasil foi descrita uma

frequência de 20 a 25% na população negróide do sudeste por Sonati e col. (1994); na Bahia, Albuquerque (2002) descreveu a frequência de 19,3% para a talassemia $\alpha 2$ 3,7Kb e 0,51% para talassemia $\alpha 2$ 4,2Kb em gestantes baianas; Couto e col. (2003) estudando gestantes com perfil de Hb AC e AA, encontraram a frequência de 23% para a talassemia $\alpha 2$ 3,7Kb (LEONOVA *et al.*, 1996).

3.8.2 Hemoglobina Fetal

A hemoglobina fetal (HbF) é formada pelas cadeias globínicas γ^A e γ^B que diferem quanto ao aminoácido presente na posição 136, podendo ser alanina ou glicina. A proporção de cadeias γ^A ou γ^G é constante durante o desenvolvimento fetal, com cerca de 75% de γ^G e 25% de γ^A . Entretanto, no adulto a quantidade de cadeias γ da HbF é composta principalmente de 60% de γ^A versus 40% de γ^G (JENSEN *et al.*, 1982).

A contribuição das cadeias γ^G e γ^A da HbF na prevenção do processo de falcização parece ser diferente. A presença da alanina em substituição a glicina na posição 136 da cadeia polipeptídica interfere com a interação entre a cadeia γ e a cadeia βS devido à flexibilidade reduzida da cadeia γ^A . Logo, a γ^A é menos efetiva que a γ^G na prevenção da polimerização da cadeia βS (BHAUMIK, 1994; STUART; NAGEL, 2004).

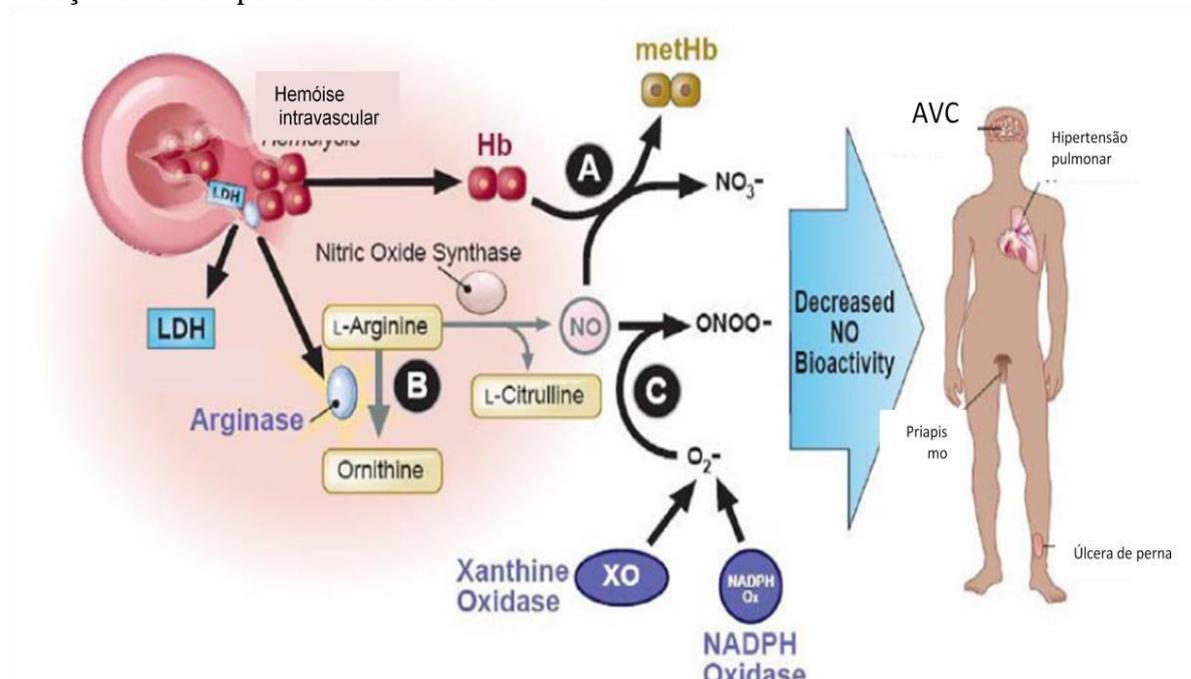
A HbF é considerada como fator modulador de prognóstico importante para a AF, sendo que a presença de alelos que determinem elevações ligeiras nos níveis de HbF está associada a manifestações clínicas mais brandas da doença, com redução das crises de dor e internações (ZAGO *et al.*, 2001; PINTO; ZAGO, 2007). A hemoglobina fetal forma o híbrido assimétrico com a hemoglobina S ($\alpha 2\beta S$), sendo que este interage com os sítios de estabilização dos polímeros de HbS desoxigenada, inibindo a sua formação (STUART; NAGEL, 2004).

3.8.3 Óxido Nítrico

A hemoglobina liberada no plasma pela destruição dos eritrócitos converte o óxido nítrico (NO) em nitrato inativo. É liberado ainda a arginase que destrói L-arginina, substrato para a produção de NO, contribuindo para diminuição da concentração do NO. O NO é um importante cofator da enzima guanilato-ciclase a qual é responsável pela conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em monofostato de guanina cíclica (cGMP) que leva ao relaxamento dos músculos lisos vasculares e vasodilatação. A baixa bioatividade do NO leva ainda ao aumento da ativação plaquetária e a adesão de moléculas ao endotélio, diminuindo

assim o lúmen dos vasos facilitando o fenômeno da vaso-occlusão (Figura 09) (FIGUEREDO, 2007).

Figura 09 – Contribuição da hemólise para a fisiopatologia da anemia falciforme pela redução da biodisponibilidade do óxido nítrico.



Fonte: Adaptado de KATO; MACKA 2006.

3.8.4 Haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta-S

Outro fator modulador da AF é a presença de haplótipos ligados ao grupo de genes da globina βS , que são definidos como a associação não randômica de vários sítios para endonucleases de restrição localizados ao longo do grupo de genes da globina βS . Os haplótipos estão classificados em cinco diferentes tipos de acordo a região geográfica de origem, o Benin (Ben) descrito na África Ocidental; o Bantu ou República Centro Africana (Car) na África Oriental e Centro-Sul; o Senegal (Sen) na África Atlântico Ocidental; o Índia-Arábia Saudita (Saudi) na Índia e Península Arábica Oriental e o Camarões (Cam) na Costa Ocidental Africana (Sutton et al., 1989).

O tipo do haplótipo tem sido frequentemente relacionado às concentrações de Hb F e ao quadro clínico apresentado pelos indivíduos com AF. O haplótipo Sen está associado a concentrações elevadas de HbF (>15%) e ao curso clínico menos grave; o haplótipo Saudi a concentrações elevadas de HbF e ao curso clínico heterogêneo; o Ben a concentrações de HbF entre 5 e 15% e ao curso clínico intermediário; o Car está associado a níveis diminuídos de HbF (<5%) com curso clínico mais grave (STUART; NAGEL,2004).

3.8.5 O estado inflamatório na Anemia Falciforme

A patogênese da AF tem sido atribuída à passagem dos eritrócitos falcizados pelos vasos, o que leva a diminuição no fluxo sanguíneo em decorrência do empilhamento das hemácias em foice ou ao aumento da adesão das hemácias às células endoteliais, ao mesmo tempo em que desencadeia os fenômenos inflamatórios, alterações de coagulação e mobilização de células inflamatórias agudas (granulócitos) e crônicas (monócitos), favorecendo desta forma a ocorrência de eventos de vaso-oclusão (ZAGO et al., 2007). O fenômeno de falcização das hemácias é bem discutido na literatura científica, e há evidências que vários eventos inflamatórios estejam envolvidos neste processo, incluindo o aumento nos níveis de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias; o aumento na expressão de moléculas relacionadas à adesão celular (ICAM, VCAM, Integrinas e P-selectinas); a adesão ao endotélio de neutrófilos polimorfonucleares ativados; a participação das plaquetas ativadas e a presença de biomarcadores inflamatórios, como a proteína C reativa e prostaglandinas. Estes fatores contribuem para a ocorrência de vaso-oclusão e lesão crônica de órgãos, favorecendo a produção aumentada de eritrócitos falcilizados. (FRANCIS & HAYWOOD, 1992; HEBBEL, 1997; ASLAN *et al.*, 2000; GLADWIN; JISON, 2003).

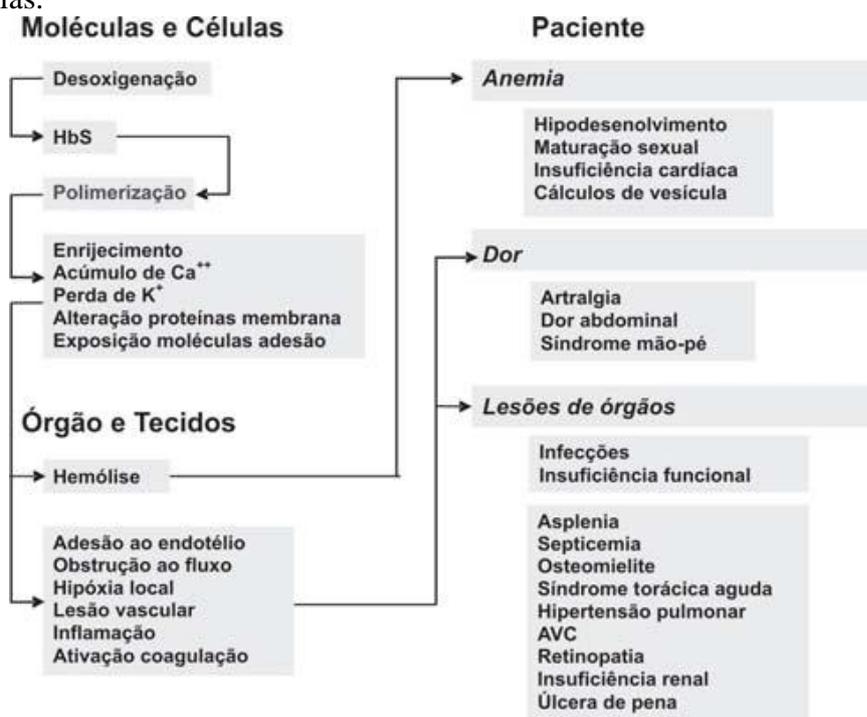
3.9 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E COMPLICAÇÕES

A anemia falciforme é caracterizada por manifestações clínicas heterogêneas, com anemia hemolítica grave, retardo no crescimento e desenvolvimento e lesões em diversos órgãos, como consequência de episódios intermitentes de vaso-oclusão que levam ao dano tecidual por isquemia e reperfusão e ao grau variável de hemólise (BENDER; HOBBS, 2009; BUCHANAN *et al.*, 2012).

As hemácias de indivíduos com AF, quando submetidas a condições de baixa tensão de oxigênio (O₂), são mais sensíveis a formação de polímeros intraeritrocitário de HbS, o que leva a rigidez do glóbulo, distorção, dano na membrana e hemólise (BUNN, 1997; NOGUCHI *et al.*, 2003). A vaso-oclusão ocorre principalmente em vasos de pequeno calibre, onde o fluxo sanguíneo é lento e a tensão de O₂ e pH está diminuída. Vários fatores estão associados a ocorrência da vaso-oclusão, incluindo a concentração de HbS, desidratação celular, a rigidez do eritrócito, elevação da viscosidade sanguínea, ativação de plaquetas, leucócitos e de células endoteliais e ao desequilíbrio do tônus vascular, com redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e elevação de endotelina (STUART; NAGEL, 2004).

As manifestações clínicas podem ser consideradas em três níveis (alterações moleculares e celulares, alterações em órgãos e tecidos, alterações no paciente) com consequências variadas, onde cada um desses níveis unidos aos fatores condicionantes podem intensificar ou diminuir os efeitos, ocasionando uma impressionante variabilidade clínica (Figura 10) (PINTO; ZAGO, 2007).

Figura 10: Alterações molecular e celular, órgão e tecidos e no paciente; e suas consequências.



Fonte: PINTO; ZAGO, 2007.

O fenômeno da vaso-oclusão é causado por diversos fatores que interligados diminuem o lúmen do vaso. Inicia com a inversão da fosfatidil serina, que é um receptor interno da membrana do eritrócito, o qual se apresenta do lado externo devido às suscetíveis mudanças de forma que o eritrócito com HbS sofre quando ele é oxigenado e dexogenado. A lise dos eritrócitos libera substâncias estimuladoras da inflamação, essas substâncias expõem receptores do vaso os quais são específicos para as plaquetas e leucócitos. Vale ainda lembrar a ação do NO sobre a parede da musculatura lisa dos vasos. Toda essa cadeia de reações causa a agregação de eritrócitos, plaquetas e leucócitos em um vaso que está com seu diâmetro reduzido devido ao estímulo da inflamação (DOMINGOS et. al., 1997; NAOUM, 2000; LOBO et. al., 2007).

A vaso-oclusão é a causa das crises álgicas, síndrome mão-pé (dactilite), necrose da cabeça do fêmur, vasculopatia cutânea (úlceras crônicas), priapismo, retinopatias

proliferativas, hemólise, osteomielite; entre outras. O acidente vascular encefálico é causado também pela vaso-oclusão que tem por consequência o aumento da velocidade do fluxo sanguíneo detectado precocemente pelo doppler transcraniano, até a vaso-oclusão com consequente isquemia da região (BRASIL, 2002; DI NUZZO; FONSECA, 2004).

As crises de dor são as causas mais frequentes de morbidade na AF, como consequência da vaso-oclusão e isquemia tecidual, sendo que em crianças estas ocorrem mais frequentemente nas extremidades e em adultos na região da cabeça, tórax e abdome (BENDER ;HOBBS, 2009).

A dactilite (dor e inchaço nos pés e mãos) é a manifestação clínica mais precoce da AF, ocorrendo nos primeiros anos de vida, considerado um indicador de maior fator de risco de gravidade da doença (MILLER *et al.*, 2000).

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma complicação grave da AF, que está associada à taxa elevada de mortalidade (BENDER; HOBBS, 2009); ocorre em cerca de 10% das crianças com AF e possui frequência maior entre os dois e nove anos de idade. Vinte e dois por cento de indivíduos com AF desenvolvem infartos silenciosos, e este evento tem sido associado a deficiência neuro cognitiva e ao risco de AVE (MILLER *et al.*, 2001; PEGELOW *et al.*, 2002).

A velocidade elevada de fluxo sanguíneo no Doppler transcraniano (DTC) tem sido identificada como fator de risco para o AVE em crianças com AF (BENDER; HOBBS, 2009). O acidente vascular cerebral isquêmico é mais comum em crianças e adultos, já o AVE hemorrágico é mais frequente entre os 20 e 29 anos (OHENE-FREMPONG *et al.*, 1998). Alguns biomarcadores estão relacionados ao risco de desenvolver AVE, como concentrações diminuídas de Hb e HbF, contagem elevada de leucócitos, pressão sanguínea sistólica elevada, ocorrência prévia de AVE isquêmico e STA (BUCHANAN *et al.*, 2004; STUART; NAGEL, 2004). O acidente vascular encefálico tem associação com os subfenótipos de vaso-oclusão e hemólise (BENDER; HOBBS, 2009).

A crise de sequestro esplênico é uma complicação aguda com maior incidência na faixa etária entre três meses a cinco anos, é uma complicação da maior gravidade. Instala-se subitamente causando piora progressiva da palidez e dor abdominal acompanhada de sudorese, taquicardia, taquipnéia com queda progressiva nos índices hematimétricos. O mecanismo pela qual se estabelece ainda não está determinado, porém muitas vezes esta associada a infecções virais e bacterianas; leva ao choque hipovolêmico se não tratada imediatamente (BRUNIERA, 2007).

O priapismo é definido como ereção peniana prolongada acompanhada de dor, porém sem estímulo sexual ou desejo. O mecanismo exato que causa o priapismo ainda não foi definido nos pacientes com anemia falciforme, sabe-se que durante a ereção ocorre relaxamento da musculatura lisa das artérias do corpo cavernoso, desta forma há aumento do fluxo aferente e diminuição do eferente, chegando ao ponto de que a pressão interna do corpo cavernoso aumente e o fluxo aferente cesse. Essa condição, se persistir, causa aumento da hipóxia, elevação da pressão de CO₂ e acidose. Devido á hipóxia, novos eritrócitos são falcilizados com conseqüente estase venosa e perpetuação do priapismo. Isquemia prolongada esta associada a edema tissular, necrose da muscular e reação inflamatória, cujo resultado final é fibrose trabecular e provável disfunção erétil (KATO, 2012; VICARI; FIGUEIREDO, 2007).

A Síndrome Torácica Aguda (STA) é uma complicação pulmonar que tem como sinais e sintomas principais a dispneia, dor torácica, febre, tosse e um novo infiltrado pulmonar, em geral multifocal, na radiografia do tórax. É potencialmente grave porque pode evoluir para Síndrome da Angústia Respiratória, é mais frequente em crianças, porém a mortalidade é maior em adultos. Diferentemente dos outros órgãos, a vasculatura pulmonar reage à hipóxia com vasoconstrição, a qual agrava a falcilização dos eritrócitos com conseqüente aumento da hemólise; esta por sua vez libera hemoglobina na circulação que potencializa a vasoconstrição (GUALANDRO et. al., 2007).

Nefropatia é uma complicação comum da doença falciforme que inicia-se na infância, presumivelmente em conseqüência da anemia crônica, fluxo sanguíneo aumentado e eventos de vaso-oclusão intraparenquimatose. A hipertrofia glomerular tende a aumentar com a idade e apresenta alterações histológicas com hiper celularidade e lobulação dos tufos glomerulares (POWARS et. al., 1991; MAGALHÃES, 2007).

Os indivíduos com AF apresentam susceptibilidade elevada para o desenvolvimento de infecções. O mecanismo envolvido nesta susceptibilidade ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que os indivíduos com AF apresentam disfunção esplênica já nos primeiros meses de vida, o que dificulta a opsonização de bactérias encapsuladas. Desta forma, crianças na primeira infância apresentam o risco de desenvolver septicemia e meningite por *Streptococcus pneumoniae* e por outros microorganismos encapsulados como *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenza* (BENDER; HOBBS, 2009). Outros fatores têm sido associados à susceptibilidade à infecção, como deficiências na via alternativa do complemento, de opsoninas séricas e alterações funcionais nos leucócitos (STUART; NAGEL, 2004; GARY, 2003).

Outros agentes bacterianos podem causar infecções em indivíduos com AF, são eles a *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Klebsiella* sp, *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* (DI NUZZO & FONSECA, 2004). A causa mais comum de óbito entre crianças com AF é a sepse por *S. pneumoniae*, com risco importante nos primeiros três anos de vida. Após o início do uso profilático de penicilina e das vacinas especiais, a prevalência dessas infecções tem decrescido na AF (ADAMKIEWICZ *et al.*, 2003).

A úlcera maleolar tem prevalência de 5 a 10% em adultos jovens. Sugere-se que a rigidez dos eritrócitos contendo HbS dificulta a circulação sanguínea nos capilares da derme, porém a fisiopatologia desta manifestação não esta completamente esclarecida. Alguns fatores parecem contribuir para o desenvolvimento da úlcera maleolar, como o clima tropical, a anemia, problemas circulatórios e infecção local. As concentrações elevadas de HbF parecem proteger os indivíduos com AF desta manifestação clínica (OHENE-FREMPONG & STEINBERG, 2001; STUART & NAGEL, 2004).

3.10 DIAGNÓSTICO DA ANEMIA FALCIFORME

O diagnóstico laboratorial da anemia falciforme, especialmente a triagem neonatal, configura-se como estratégia de prevenção, entendida como prevenção de óbito (ou de incapacidade) ou morbidade. Observa-se que o diagnóstico desta doença é complexo, e envolve uma análise que deve considerar, além dos dados clínicos e herança genética, fatores como idade, tempo de estocagem e condições de armazenamento da amostra, entre outros, sendo conveniente que o laboratório tenha um consultor especializado na área para auxiliar no esclarecimento dos casos mais complicados. Assim, espera-se que o diagnóstico laboratorial correto, sobretudo o precoce, associado às medidas terapêuticas e ao seguimento ambulatorial regular, garantam maior sobrevivência e melhor qualidade de vida as pessoas com anemia falciforme (FERRAZ; MURAO, 2007; SILVA; YAMAGUCHI, 2007).

O diagnóstico compreende primeiro passo para reduzir a morbimortalidade dos indivíduos com anemia falciforme. Observa-se quão importante é o diagnóstico precoce, todavia, em recém-nascidos, só serão encontrados traços de hemoglobina variante, sendo o perfil hemoglobínico característico obtido somente após o sexto mês de vida, desta forma, é fundamental a repetição dos exames até o final do primeiro ano de vida (FERRAZ; MURAO, 2007; MAIA *et al.*, 2009).

O monitoramento laboratorial da anemia falciforme é efetuado a partir da conclusiva determinação do genótipo, podendo ser realizado por meio de eletroforeses alcalina e ácida, dosagens das frações separadas na eletroforese, dosagem bioquímica e distribuição intra-

eritrocitária da Hb Fetal. Porém, a maioria dos programas de triagem neonatal substituiu estes métodos convencionais pela eletroforese por focalização isoelétrica (IEF) e/ou pela cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), sendo que qualquer dessas técnicas pode ser utilizada de forma isolada para a triagem inicial, pois, constituem métodos de elevada precisão, devendo todo resultado positivo ser repetido em mesma amostra para confirmação, e todos os casos que apresentarem padrão inconclusivo ou duvidoso pela técnica de escolha, deverão ser reavaliados por outro método visando aumentar a sensibilidade e a especificidade (FERRAZ; MURAO, 2007; NAOUM, 2000).

Todavia, apesar das técnicas de eletroforese de hemoglobina e HPLC representarem um passo importante no reconhecimento da relevância das hemoglobinopatias como problema de saúde pública no Brasil e também o início da mudança da história natural da anemia falciforme no país, essas técnicas não são confirmatórias para anemia falciforme, pois não diferenciam com muita precisão a anemia falciforme das outras hemoglobinopatias. Desta forma, o diagnóstico confirmatório para esta doença é a biologia molecular por meio das técnicas de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), que consiste na amplificação seletiva de fragmento do DNA, onde é possível obter uma sequência de DNA no qual se encontra a mutação (CANÇADO, JESUS, 2007; NAOUM, 1997).

Assim, determinado o genótipo, é importante que se faça um estudo familiar, preferencialmente do pai e da mãe, para que o mesmo possa ser geneticamente estabelecido. Além da determinação do genótipo e do estudo familiar, torna-se fundamental a correlação com diagnósticos sugestivos. Desta forma, o hemograma do paciente é um dos importantes diagnósticos sugestivos, pois revela uma anemia grave com presença de degranócitos (células em foice), reticulocitose, plaquetas aumentadas em função da atrofia do baço e leucócitos elevados durante processos hemolíticos ou infecciosos. Outras alterações laboratoriais indicativas de hemólise elevada também ocorrem como o aumento da bilirrubina indireta; aumento de desidrogenase láctica e elevação da lipoproteína de densidade alta (HDL), sendo também, importante correlacionar os achados laboratoriais com os clínicos (ANVISA, 2002; NAOUM, 2000; OLIVEIRA; 2007).

Observa-se que a padronização dos resultados normais e das hemoglobinas variantes encontradas na população brasileira se faz necessária, bem como o estabelecimento dos padrões para cada laboratório, além disso, devem ser utilizadas técnicas ainda mais sensíveis para elucidação da suspeita, bem como a associação de várias delas, objetivando um diagnóstico preciso. O correto diagnóstico laboratorial é, portanto de grande importância para as formas interativas de hemoglobinas, especialmente no Brasil, tendo em vista os

inúmeros casos de associação de hemoglobinopatias, além de variantes que apresentam co-migração; a ocorrência de tais associações exige que todos os recursos disponíveis, em nível laboratorial, sejam utilizados em benefício do paciente e seus familiares (FIGUEIREDO, 2007).

Deste modo, o diagnóstico precoce e a terapia adequada representam papel fundamental na redução da morbimortalidade desses pacientes. A realização do diagnóstico laboratorial desta alteração hemoglobínica o mais precocemente possível, é primordial, devido à alta mortalidade na infância. Portanto, a organização de um programa preventivo para anemia falciforme requer suporte de órgãos oficiais de saúde e diagnóstico realizado por pessoal capacitado (SILVA; YAMAGUCHI, 2007).

Atualmente, a maioria dos programas de triagem neonatal substituíram a aplicação simultânea de eletroforese em pH ácido e em pH básico pela eletroforese por focalização isoelétrica (IEF) ou pela cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) por apresentarem maiores precisão, sensibilidade e especificidade no diagnóstico neonatal. As hemoglobinas encontradas deverão ser relatadas em ordem crescente de concentração (Tabela 02) e, se apresentar padrão inconclusivo ou duvidoso, deverá ser repetido por outro método (NAOUM, 2000; FERRAZ; MURÃO 2007).

Tabela 02 – Resultado dos testes de triagem neonatal para Doença Falciforme

FS	Anemia falciforme SS	Hemólise e anemia moderada a grave 6-12 meses
FS	S/ β^0 talassemia	Hemólise e anemia moderada a grave 6-12 meses
FS	S/PHHF	Ausência de hemólise e anemia
FSA ou FS (se A abaixo de limite de detecção do método)	S/ β^+ talassemia	Anemia discreta
FSC	Hemoglobinopatia SC	Anemia discreta ou ausência por 2 anos
FSD-Punjad	Hemoglobinopatia SD	Anemia discreta ou ausência por 2 anos

Fonte: FERRAZ; MURÃO 2007

O diagnóstico clínico é complexo e multicausal devido às várias manifestações clínicas presentes no doente falciforme. Elas começam a aparecer assim que a síntese de

HbF começa a reduzir, por volta do 6º mês de vida. Uma das manifestações mais frequentes que se observa no bebê é a Síndrome Pé-mão (dactilia), onde os pés e/ou mãos incham devido ao fenômeno da vaso-oclusão e causam dor, ocasionando uma criança irritada e com choro constante. Outras manifestações podem ocorrer como febre, inchaço do abdômen, icterícia, hepatoesplenomegalia; porém são inespecíficas (GANGULY et. al., 2011).

3.7 TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME

Na anemia falciforme a melhora da sobrevida e da qualidade de vida desses pacientes se baseia em medidas gerais e preventivas, sendo o acompanhamento ambulatorial ponto fundamental para adequado manejo do paciente com a doença, devendo este ser sempre priorizado nos serviços de saúde. Este manejo adequado possibilita diminuição dos sinais e sintomas que acometem os doentes falciformes. O acompanhamento ambulatorial visa não só a avaliação periódica dos diversos órgãos e sistemas, com finalidade de precocemente serem detectadas alterações, mas também, a orientação do paciente e de seus familiares sobre a doença (BRAGA, 2007; DI NUZZO; FONSECA, 2004).

A transfusão de hemácias tem sido recurso terapêutico cada vez mais utilizado, sobretudo, porque é capaz de prevenir complicações graves. Estima-se que cerca de 20% a 30% dos pacientes com anemia falciforme são mantidos em regime crônico de transfusão de hemácias, desenvolvendo inexoravelmente, sobrecarga de ferro após a transfusão de 10 a 20 unidades de concentrado de hemácias. Assim, mesmo sendo um procedimento bastante utilizado, a transfusão crônica provoca valores elevados de concentrações de ferro, tornando-se perigoso, porque há acúmulo nas células de órgãos como fígado, coração e rins, o que lhes conferem maior risco de complicações, como doença cardíaca e morte precoce. Para eliminar o excesso de ferro recomenda-se quelante de ferro, devendo fazer parte integrante do tratamento dos indivíduos com anemia falciforme (FERRAZ; MURAO, 2007).

Sabe-se que o aumento no nível de Hb F está associado às manifestações clínicas mais brandas, já que esta hemoglobina interfere na polimerização da Hb S. Como consequência do papel inibitório que a Hb F exerce sobre o processo de falcização, desenvolveu-se uma busca ativa por drogas que reativassem sua síntese. Essa busca levou à descoberta do efeito terapêutico da hidroxiuréia na doença, e à investigação de numerosos outros compostos em fase experimental; a hidroxiuréia está reservada para pacientes com manifestações consideradas de moderadas a graves, entretanto, apesar dos bons resultados obtidos, cerca de 25% dos pacientes graves não apresentam melhora com este tratamento. Mas, mesmo não atingindo 100% de eficácia, verifica-se que a droga é a melhor opção

terapêutica disponível para obtenção da melhora clínica e hematológica, apresentando efeitos altamente benéficos em curto prazo, elevando os níveis de hemoglobina fetal, reduzindo hemólises e crises vaso-oclusivas. No entanto, apesar de seu benefício, há necessidade de uma atenção e investigação cuidadosa quanto suas possíveis ações genotóxicas, pois, pode causar alterações irreversíveis no material genético, com sérias consequências ao organismo (FIGUEIREDO, 2007; PINTO; ZAGO, 2007; SILVA; SHIMAUTI, 2006).

O tratamento curativo para pacientes com doença falciforme é o transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico de medula óssea (TCTH alo). O objetivo do TCTH em pacientes falciformes é restabelecer uma hematopoese normal, eliminando as obstruções vasculares causadas pelas hemácias falcizadas, bem como, lesões crônicas e recorrentes do endotélio vascular. O uso desta modalidade terapêutica no tratamento da anemia falciforme é restrito, devendo a abordagem e o peso das diferentes estratégias terapêuticas serem considerados de forma diferencial, com indicações, limitações e toxicidades próprias, com necessidade de realização de mais estudos randomizados (SIMÕES et al., 2010).

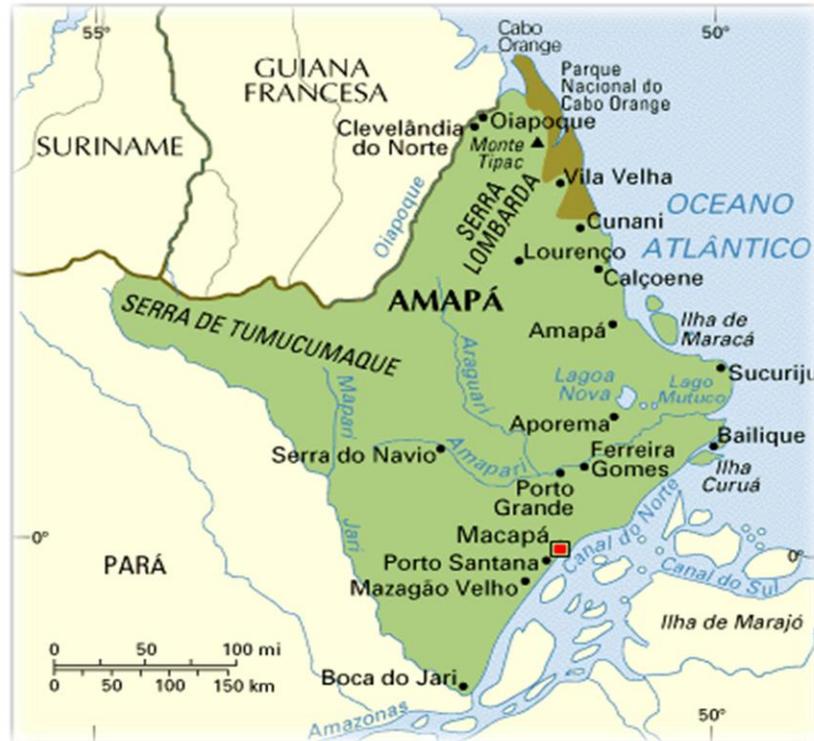
Assim, percebe-se que o diagnóstico e tratamento precoces comprovadamente aumentam a sobrevida e melhoram a qualidade de vida das pessoas com anemia falciforme que, para tanto, devem ser acompanhadas em centros de referência especializados capazes de oferecer atendimento global, multidisciplinar e multiprofissional, sendo que a partir da Portaria Nº 1.391, de 16 de agosto de 2005, institui-se no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS as diretrizes para a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com doença falciforme e outras hemoglobinopatias, cujo objetivo é mudar a história natural desta doença no Brasil, reduzindo a morbimortalidade e trazendo qualidade de vida com longevidade a todas essas pessoas, portanto, tanto o diagnóstico precoce quanto os procedimentos e medicamentos para o tratamento da doença estão disponíveis no SUS. (SIMÕES et al., 2010; CANÇADO; JESUS, 2007).

4. METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ÁREA DE OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

O Estado do Amapá (Figura 11) está localizado no extremo Norte do Brasil tendo sua capital Macapá cortada pela linha do equador e banhada pelo braço norte do rio Amazonas. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) estimou uma população de 608.689 habitantes em 2010, onde 398.204 residem na capital Macapá (IBGE, 2010).

Figura 11 – Mapa do Estado do Amapá.



Fonte: Guia Internet Brasil, 2000.

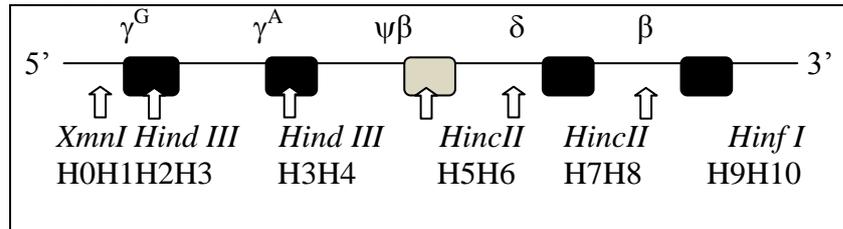
4.2 MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de um estudo corte transversal em 44 pacientes voluntários, de ambos os sexos, com diagnósticos clínico e laboratorial de Doença Falciforme (forma homozigótica SS), atendidos no ambulatório de hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Amapá-HEMOAP. O projeto foi submetido à análise pelos relatores do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humano da Universidade Federal do Amapá e teve o parecer favorável para execução com número de protocolo FR – 476933/2012 – CEP (Anexo A)

Coletou-se de cada participante 5mL de sangue por punção venosa em tubos contendo EDTA (ácido etileno diaminotetracético) como anticoagulante. Realizou-se a triagem laboratorial para hemoglobinopatia, por meio de eletroforese em pH alcalino (pH 8,6); eletroforese em pH ácido (pH 6,2) e HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Pressão).

Posteriormente, procedeu-se a extração de DNA com fenol-clorofórmio, confirmando a presença de HbSS por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) seguida por clivagem com a endonuclease *DdeI*. Para identificação dos haplótipos, o DNA foi amplificado e clivado com enzimas de restrição (PCR - RFLP) específicas aos sítios polimórficos (Figura 12).

Figura 12 – Localização dos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição ao longo do *cluster* β no cromossomo 11.



Fonte: CABRAL, 2010

Os sítios polimórficos permitem caracterizar os haplótipos de acordo com a presença (+) ou ausência (-) dos perfis de restrição para as regiões polimórficas. Definindo-se, portanto, Bantu (-+ - - -); Benin (- - - - + -); Senegal (+ + - + +).

Em seguida fizemos a associação dos resultados dos haplótipos e suas manifestações clínicas nos prontuários de cada paciente participante do estudo. A análise dos resultados foi feita utilizando o programa Biostat 2.0 (AYRES et. al., 2007) para consolidação dos dados e cálculo de média, desvio padrão e percentual.

5. RESULTADOS

5.1 Distribuição de idade e gênero dos pacientes

Foram analisados prontuários de 44 pacientes com média de idade de 16,7 anos, com mínimo de 2 e máximo de 50 anos de idade. A distribuição de pacientes por idade foi: 1 - |10 (22,7%), entre 10 - |20 (50,0%) anos, entre 20 - |30 anos (15,9%), entre 30 - |40 anos (9,1%), entre 40 - |50 (2,3%). Em relação ao sexo, 36,4% eram feminino e 63,6% eram masculino.

5.2 Distribuição dos haplótipos Hb S

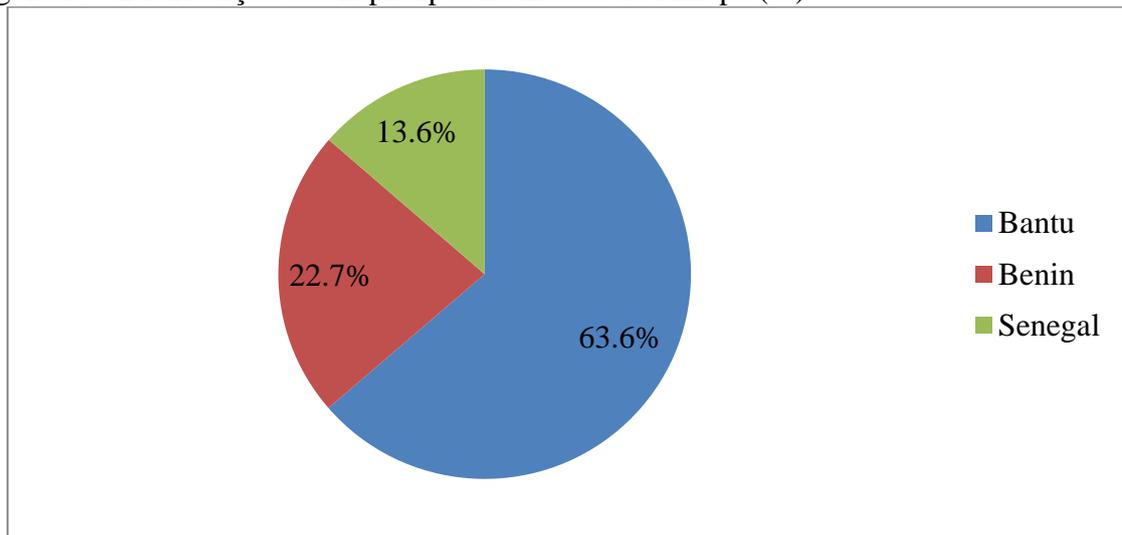
A distribuição dos haplótipos identificados nos 44 pacientes se deu da seguinte forma: Bantu/Bantu 20 (45,5%), Bantu/Benin 10 (22,7%), Bantu/Senegal 6 (13,6%), Benin/Benin 3 (6,8%), Benin/Senegal 4 (9,1%), Senegal/Senegal 1 (2,3%). Em se tratando dos cromossomos, foram evidenciados Bantu 56 (63,6%), Benin 20 (22,7%), Senegal 12 (13,6%). Não foi evidenciado haplótipos atípicos na população estudada (Tabela 03) (Figura 13).

Tabela 03 – Distribuição dos haplótipos e cromossomos na população do Estado do Amapá.

Haplótipos	Nº de indivíduos (%)	Nº de cromossomos		
		Bantu	Benin	Senegal
Bantu/Bantu	20 (45,5%)	40	-	-
Bantu/Benin	10 (22,7%)	10	10	-
Bantu/Senegal	6 (13,6%)	6	-	6
Benin/Benin	3 (6,8%)	-	6	-
Benin/Senegal	4 (9,1%)	-	4	4
Senegal/Senegal	1 (2,3% %)	-	-	2
Total	44 (100%)	56 (63,6%)	20 (22,7%)	12 (13,6%)

Fonte: própria

Figura 13 - Distribuição dos haplótipos no Estado do Amapá (%)



Fonte: própria

5.3 Distribuição da HbF na população estudada

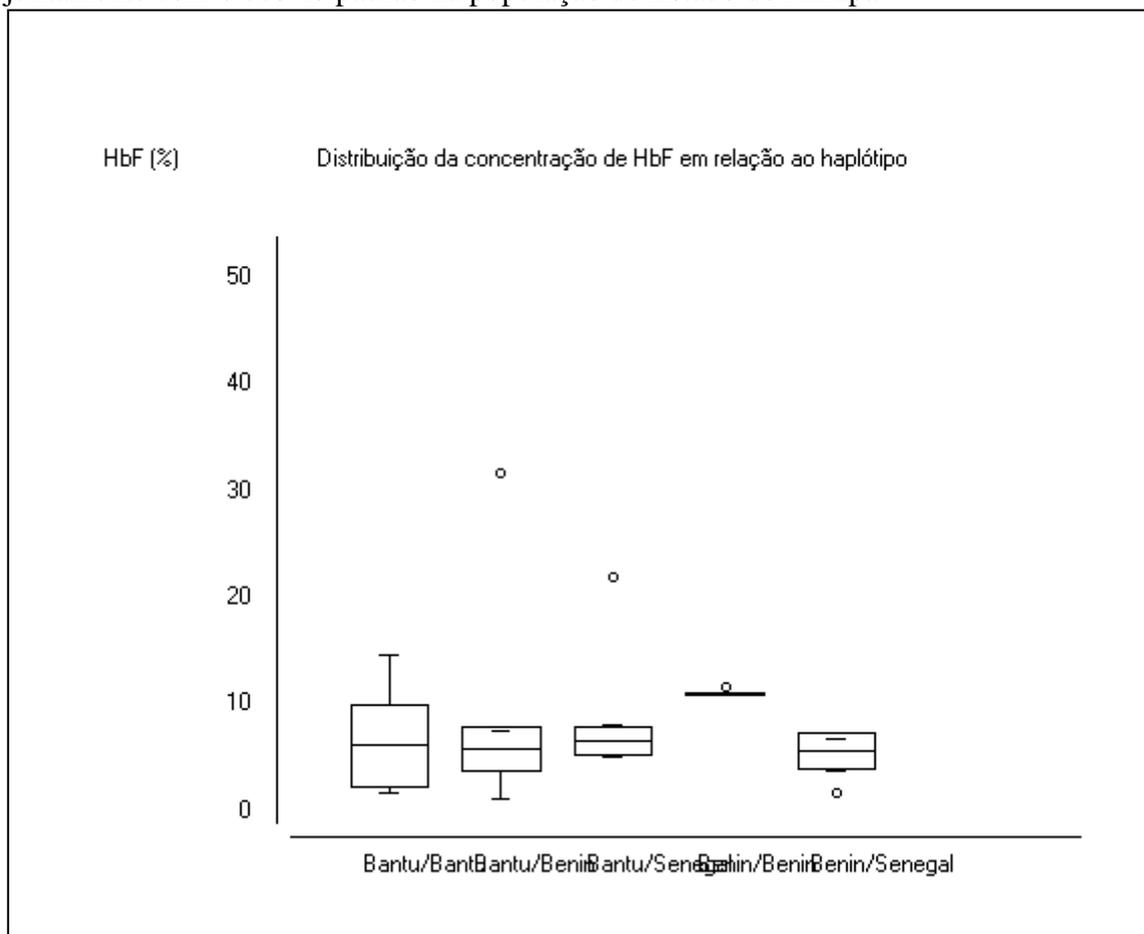
Dos 44 pacientes, 22 (50,0%) não utilizavam Hidroxiuréia ou qualquer outro agente estimulador da síntese de hemoglobina fetal. A dosagem de HbF foi obtida em 41 pacientes antes de iniciar a administração da medicação, em três pacientes não foi possível saber a dosagem da HbF antes do início da medicação. A média da HbF foi $7,31 \pm 5,57$; conforme a distribuição na Tabela 04 e Figura 14.

Tabela 04 – Distribuição da média da HbF relacionado aos haplótipos na população do Estado do Amapá.

Haplótipos	Média HbF (%)
Bantu/Bantu	6,11 ± 3,8
Bantu/Benin	8,63 ± 8,42
Bantu/Senegal	6,40 ± 1,47
Benin/Benin	11,20 ± 0,36
Benin/Senegal	4,63 ± 2,37

Fonte: própria.

Figura 14 – Distribuição da concentração de HbF em relação ao seu respectivo haplótipo juntamente com o desvio padrão na população do Estado do Amapá.



Fonte: própria.

5.4 Tipo de haplótipo relacionados às manifestações clínicas

Foi observado ausência de sequestro esplênico, anemia aplástica, síndrome torácica e úlceras de membros tanto superiores quando inferiores nos pacientes desse estudo (Tabela 05).

Tabela 05 – Frequência das manifestações clínicas relacionadas aos haplótipos na população do Estado do Amapá.

	Bantu/ Bantu	Bantu/ Benin	Bantu/ Senegal	Benin/ Benin	Benin/ Senegal
Crises hemolíticas	7/20 (35%)	5/10 (50%)	-	-	-
AVE	2/20 (10%)	1/10 (10%)	-	-	-
Colesistomizada	3/20 (15%)	-	-	-	-
Litíase biliar	1/20 (5%)	-	-	-	-
Necrose de úmero/fêmur	2/20 (10%)	-	-	-	-
Cardiomegalia	-	1/10 (10%)	-	-	-
Priaprismo	1/20 (5%)	1/10 (10%)	-	-	-
Internações por infecções	10/20 (50%)	-	2/5 (40%)	2/3 (66,6%)	2/3 (66,6%)
Dactilite	6/20 (30%)	2/10 (20%)	1/5 (20%)	-	-
Sopro diastólico	2/20 (10%)	2/10 (20%)	-	-	-
Tumor na vesícula	-	1/10 (10%)	-	-	-
Nefropatia aguda	-	-	1/5 (20%)	-	-

Fonte: própria.

5.5 Nível de HbF em relação às complicações clínicas

Foram divididas as complicações clínicas relacionadas aos intervalos de concentração de HbF nos 41 pacientes os quais foi possível obter a dosagem de HbF. Observa-se que quando a HbF é menor que 10, há maior complicações clínicas, em quanto que quando é maior que 10 há uma redução substancial das manifestações (Tabela 06).

Tabela 06 – Complicações clínicas dos pacientes de acordo com o nível de HbF na população do Estado do Amapá.

Complicações clínicas	HbF ≤ 5	HbF > 5 e ≤ 10	HbF > 10
Crises hemolíticas	4/13 (30,8%)	5/19 (26,3%)	1/9 (11,1%)
AVE	-	2/19 (10,5%)	-
Colesistomizada	1/13 (7,7%)	2/19 (10,5%)	-
Litíase biliar	-	1/19 (5,3%)	-
Necrose de úmero/fêmur	1/13 (7,7%)	1/19 (5,3%)	-
Cardiomegalia	1/13 (7,7%)	-	-
Priapismo	1/13 (7,7%)	-	-
Internações por infecções	7/13 (53,8%)	12/19 (63,2%)	2/9 (22,2%)
Dactilite	3/13 (23,1%)	2/19 (10,5%)	2/9 (22,2%)
Sopro diastólico	2/13 (15,4%)	-	1/9 (11,1%)
Nefropatia aguda	-	1/19 (5,3%)	-

Fonte: própria.

7. DISCUSSÃO

Analizamos os prontuários de 44 pacientes com doença falciforme a partir dos resultados dos haplótipos do gene da globina beta-S com a finalidade de avaliarmos as características clínicas em relação aos haplótipo do gene da globina beta-S. A literatura relata que o tipo de haplótipo associado ao gene beta-S tem importância na gravidade clínica da anemia falciforme, estando relacionado a um quadro clínico e níveis de Hemoglobina Fetal (HbF) variados (SILVA e GONÇALVES,2009). Sendo relevantes também para o esclarecimento da diversidade clínica da anemia falciforme. Assim, o haplótipo Senegal está associado a níveis elevados de HbF, correspondendo à forma mais branda da doença, enquanto o haplótipo Bantu, mais frequente na população brasileira, está relacionado a níveis baixos de HbF, refere-se a forma mais grave. A partir do exposto, observa-se que a gravidade e a evolução clínica da anemia falciforme são heterogêneas estando moduladas por diversos fatores, entre os quais se enquadra os haplótipos do gene da globina beta-S.

Entre as variáveis estudadas foi utilizada a idade, por ter significativa relação com outras variáveis, e ser responsável pela maior fração da diversidade total da doença. Em nosso estudo a faixa etária mais prevalente ficou entre 10 a 20 anos (50%), seguido da faixa etária de 2 a 10 anos (22,7%) assim, nosso estudo apresentou maior participação de crianças e adolescentes. Nossos resultados em relação a faixa etária estão semelhantes com de

COSTA et.al, 2006, isso significa que as crianças e os adolescentes com anemia falciforme comparecem nas consultas médicas com mais frequência do que os pacientes adultos.

Países como os Estados Unidos e a Jamaica já demonstraram que maneira mais eficiente e efetiva para reduzir a morbi-mortalidade da anemia falciforme é a triagem neonatal, uma vez que o diagnóstico precoce permite a inserção do paciente em programas de saúde multidisciplinares, com a utilização de cuidados preventivos e orientação aos pais, proporcionando melhora na qualidade e sobrevivência desses pacientes. No Brasil, a portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde inclui as hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal, permitindo assim o diagnóstico já ao nascimento, mas nem todos os estados brasileiros implementaram essa segunda fase do teste do pezinho onde se detecta a doença falciforme (ZAGO, 2002).

O Brasil é um país de grande heterogeneidade étnica. Um dos fatores mais marcante da história do Brasil foi a grande influência africana, fazendo-se de forma mais ou menos intensa, a depender da região do país e da diversidade étnica dos imigrantes. Como visto anteriormente, a presença da anemia falciforme está relacionada com o componente afro-descendente.

As identificações genótípicas dos haplótipos amapaenses são bastante relevantes quando comparadas a outras pesquisas, pois, no Amapá determinou-se uma alta frequência de homozigose Bantu/Bantu (45,5%) (tabela 1), divergindo de outras regiões, como na Bahia, onde a maior frequência encontra-se na heterozigose Bantu/Benin.

Portanto, conforme estudos realizados sobre haplótipos HbS, observa-se que a proporção de pacientes com os diversos haplótipos diverge em diferentes regiões do continente Americano, especialmente no Brasil, que apresenta uma elevada e importante miscigenação. Na América do Norte e no Caribe predomina o haplótipo Benin seguido pelo Senegal e Bantu, enquanto no Brasil, embora haja certa diversidade regional, de um modo geral, prevalece o haplótipo Bantu seguido do Benin, com pouca frequência de Senegal.

As combinações genótípicas resultando na alta frequência de homozigose Bantu/Bantu, com identificações de somente três haplótipos e principalmente ausência de atípicos, sugerem que no Amapá há pouca miscigenação, conseqüentemente migração, com ligações restritas de seus grupos fundadores. Esta informação está de acordo com AGUIAR et al., 1999 que descreve que a região amazônica brasileira abriga diversas comunidades formadas por descendentes africanos, algumas das quais ainda relativamente isoladas, apresentando pequena proporção de imigrantes, sugerindo que houve a existência de uma barreira relativamente forte contra mistura inter-étnica.

A determinação dos haplótipos da maioria dos estudos brasileiros (Bantu → Benin → Senegal) corrobora os dados encontrados no estado do Amapá, na qual as amostras (HbSS) analisadas, determinou-se três tipos de haplótipos: Bantu (63,6%), Benin (22,7%) e Senegal (13,6%). Assim, está de acordo com registros históricos que indicam que cerca de 90% dos escravos enviados ao Norte do Brasil eram de Angola, Congo e Moçambique, onde o haplótipo Bantu predomina. Todavia, destaca-se que na presente pesquisa têm-se uma frequência elevada do haplótipo Senegal (13,6%) quando comparada alguns estudos brasileiros.

A frequência do haplótipo Senegal no Amapá confirma-se com os dados históricos, indicando que aproximadamente 10% dos escravos da África Atlântico Ocidental foram destinados na região norte brasileira, precisamente de Senegâmbia, Guiné-Bissau e Cabo Verde, onde o haplótipo Senegal é prevalente. Sendo semelhantes aos estudos realizados no Pará (66% Bantu, Benin 21,8%, 10,9% Senegal e de 1,3% Camarões; 60% Bantu, 27% Benin, 12% Senegal e 1% Camarões), na qual se torna referência, uma vez que Amapá pertenceu ao Pará, estimando-se assim, que a população seja de origens etnológicas equivalentes.

Em uma comunidade Amapaense (Curiau) situada dentro da capital e semi-isolada, alguns resultados de estudos realizados foram incomuns com outras regiões brasileiras e parecidos com os atuais dados amapaenses, tais como: 50% Bantu, 17% Benin e 33% Senegal, atribuindo-se especialmente a fatores como efeito fundador junto à contribuição da população da Guiana francesa que migrava para região norte do Brasil, uma vez que entre os escravos trazidos a este país a maioria era de Senegâmbia e Guiné na África Ocidental. Assim, estes resultados indicam que a contribuição dos povos da África Ocidental para a formação das populações amazônicas foi heterogênea.

Ressalta-se que no presente estudo não foram encontrados haplótipos Camarões e Saudi, semelhante ao estudo de ADORNO et al., 2003 realizado na Bahia que não identificaram Camarões e Saudi, entretanto, neste estudo foram determinados haplótipos Atípicos, divergente dos dados amapaenses que não há Atípicos.

Os haplótipos atípicos observados em associação com o gene da β^S são gerados por diversos mecanismos genéticos: a) mudança de um nucleotídeos em um dos sítios polimórficos de restrição; b) simples e duplo *crossing-over* entre dois haplótipos β^S típicos, transferência não recíproca de sequencias de conversão. Em um estudo realizado por ROMANA et.al, 2000, verificaram que 15 dos 20 diferentes haplótipos atípicos teriam se originado por recombinação.

Em um estudo envolvendo 244 pacientes com Anemia falciforme (156 brasileiros e 88 de Benin) analisou 488 cromossomos, sendo que destes, 15 (3,2%) eram haplótipos atípicos. A frequência de haplótipos atípicos observada na amostra brasileira foi de 3,9% e na amostra de Benin foi de 2,2%. O percentual de haplótipos atípicos encontrado nas duas populações variou entre 5,3 e 7,0% (SILVA, 2008).

Determinando-se desta forma, que os resultados amapaenses apresentam características únicas quando relacionados aos haplótipos de outras regiões, com alta frequência de Senegal e Benin, ausência de Atípicos, Camarões e Saudi, confirmando que o Brasil apresenta diversidades de origens étnicas, bem como, diferentes frequências de haplótipos.

A concentração de HbF é descrita como haplótipo dependente e diretamente correlacionada ao curso clínico da doença. Os níveis de HbF no haplótipo Benin/Benin ($11,20 \pm 0,36$) foram superiores aos níveis dos haplótipos Bantu/Benin ($8,63 \pm 8,42$), Bantu/Bantu ($6,11 \pm 3,8$), Bantu/Senegal ($6,40 \pm 1,47$), Benin/Senegal ($4,63 \pm 2,37$).

A hemoglobina fetal é um importante fator de proteção contra os fenômenos de falcilização, pois possui maior afinidade pelo oxigênio quando comparada a hemoglobina S, ocasionando a diminuição da polimerização quando a hemácia estiver em baixa tensão de oxigênio. A concentração de HbF em pacientes com Anemia Falciforme varia de 0,5% a 30%, com média de aproximadamente 8%. (FIGUEREDO, 2007).

Em estudo realizado por SILVA, 2009 no Ceará, a média da HbF foi $6,72 \pm 3,73$, já a média de HbF encontrada por CABRAL e col. (2010) foi de $8,43 \pm 3,65$ no Rio Grande do Norte. O presente estudo encontrou uma média de $7,31 \pm 5,57$, próximo a média encontrada em outros artigos, corroborando com a literatura sobre a doença.

Estudos brasileiros também encontraram correlação entre as manifestações clínicas da Anemia Falciforme, Hemoglobina Fetal e o haplótipo do gene da globina beta-S, incluindo mais crises vasclusivas, mais infecções e velocidade de crescimento mais lenta no haplótipo Bantu, altos níveis de HbF e nitrito no haplótipo Benin e aumento do risco de doença cerebrovascular em crianças com haplótipo Bantu/Atípico em comparação com outros haplótipos da globina beta-S. Pacientes com haplótipo Bantu/Benin tem menos crises dolorosas em comparação com o outros haplótipos. Estudos não mostraram correlação entre a co-herança com alfa-talassemia e sintomas clínicos, apesar de ter sido associada a menos infecções ou mesmo a dor aguda recorrente (LOGGETO, 2013).

Entretanto, recentes publicações brasileiras não descrevem correlação entre haplótipo do gene da globina beta-S e o curso clínico da Anemia Falciforme. Fatores de risco para

alteração dos vasos sanguíneos da conjuntiva foram hemoglobina e hematócrito mais baixos e fenótipo SS, e para a alteração dos vasos sanguíneos da retina foi idade acima de 17 anos. Mas nenhuma correlação foi encontrada com HbF ou haplótipo do gene da globina beta-S ou alfa-talassemia (Lima, et.al,2006) em nossos estudos não encontramos nenhuma amostra associada com a alfa-talassemia ou outro tipo de hemoglobina variante.

As manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes da anemia falciforme são influenciadas pelo haplótipo presente, concentração de HbF, coexistência de alfa-talassemia, condições socioeconômicas e de acesso ao serviço especializado de saúde.

A literatura relata maior frequência de complicações clínicas em pacientes com haplótipo Bantu/Bantu quando comparados ao Benin/Benin, tendo como mais grave a insuficiência cardíaca, AVE, úlcera de perna, sequestro esplênico e necrose do fêmur. Estudo realizado no nordeste do Brasil, relata maior severidade nas manifestações clínicas em pacientes Bantu/Bantu, apresentando maiores quantidades de internações, úlcera de perna, AVE, sequestro esplênico (POWARS, 1991; GONÇALVEZ et. al., 2008; ADORNO et. al. 2008; SILVA, 2009).

Nesse estudo realizado no Amapá, observa-se também maior frequência de manifestações clínicas (principalmente as manifestações graves) elevadas em pacientes com haplótipo Bantu/Bantu quando comparado aos outros haplótipos, corroborando com a literatura.

Estudo feito no Rio de Janeiro por FILHO et. al (2012) demonstrou como evento clínico mais frequente a infecção em crianças, sendo a crise dolorosas mais frequentes na primeira infância, sequestro esplênico na segunda infância e infecção durante toda essa fase da vida.

A crise do sequestro esplênico é uma complicação muito frequente na infância, entretanto pode ocorrer em adultos, é um quadro grave que instala-se subitamente, havendo progressiva queda nos valores da hemoglobina, podendo evoluir para choque hipovolêmico com mortalidade elevada. Sua incidência varia conforme região estudada, acometendo 30% dos paciente jamaicanos e 7,5% dos americanos (Khatib et. al. 2009; Bruniera, 2007).

Alguns tipos de vírus estão associados à crise aplástica transitória em pacientes com anemia falciforme. O principal agente etiológico é o parvovírus B19, causando importante queda no hematócrito com grave reticulopenia. Sua prevalência aumenta com idade, variando 2 a 10% em crianças menores de 5 anos e de 40 a 60% em adultos maiores de 20 anos (DI NUZZO; FONSECA, 2004).

Síndrome torácica aguda (STA) é uma complicação potencialmente muito grave que pode evoluir para síndrome da angústia respiratória aguda do adulto (SARA). Estima-se que metade dos pacientes adultos apresentem pelo menos um episódio de STA durante a vida. (GUALANDRO, 2007)

Úlceras são complicações que podem ser causadas por fatores ambientais e genéticos. Frequentes em adultos, ficando entre 8% a 10 %, porém há relatos de até 50% em pacientes que residem em áreas tropicais (PALADINO, 2007). Em nosso estudo encontramos apenas dois pacientes com úlcera de perna e necrose no fêmur, respectivamente. O que diferente de outros estudos realizados no Brasil onde quase todos os pacientes falciformes apresentaram úlcera de perna e necrose no fêmur (COSTA, et.al,2006, SILVA, et.al, 2009 , CABRAL,2010).

Ainda com relação à HbF e as manifestações clínicas, verificou-se que pessoas com anemia falciforme com valores desta hemoglobina menores que a média do grupo estudado tinham um número maior de crises álgicas, por ano de acompanhamento. Achados semelhantes foram descritos em um outro estudo, realizado em crianças com anemia falciforme, na faixa etária de 06 meses a 02 anos de idade, evidenciando que os que tinham níveis mais baixos de HbF manifestavam mais dactilite, além de esplenomegalia, crises de seqüestração esplênica e até mesmo aumento da mortalidade. Tabela 04.

Com base em uma investigação que envolveu mais de 3 mil indivíduos com Hb SS, que demonstrou uma relação inversa entre os níveis de Hb F e as crises de dor, foi sugerido que a HbF seria um marcador para a severidade da doença. A maneira pela qual os níveis aumentados de HbF estariam relacionados com a melhora das crises álgicas nos pacientes com anemia falciforme e, conseqüentemente, com sua melhor evolução clínica é atribuída ao fato de que a HbF dilui a HbS nos eritócitos e inibe a polimerização da desoxi-Hb S (COSTA et al, 2006).

Na análise das correlações, o número de transfusões por ano de acompanhamento dos pacientes teve correlação significativa com o número de crises álgicas, de infecções e de internamentos. Isto, possivelmente, deve-se ao fato de que no período de acompanhamento destes pacientes não havia um protocolo de transfusão consensual para as pessoas com anemia falciforme, o que levou a muitos pacientes serem transfundidos, quando estas transfusões poderiam ter sido evitadas. No momento atual, os critérios de transfusão para o pacientes falciformes estão mais bem definidos. Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura (COSTA, et.al,2006, SILVA, et.al, 2009 , CABRAL,2010).

Outras duas variáveis clínicas que também se mostraram correlacionadas foram o número de infecções com o número de internamentos. A infecção, além de ser a causa mais comum de morte em crianças falciformes abaixo de 5 anos de idade é uma significativa causa de morbidade em pacientes de outras faixas etárias. Embora o número de mortes causadas por infecção tenha diminuído, como resultado do melhor entendimento da fisiopatologia da doença, da prevenção e do diagnóstico e tratamentos mais precoces, infecções graves permanecem como uma freqüente complicação da doença. Além do mais, a suspeita de infecção, baseada sobretudo na presença de febre e/ou infiltrados pulmonares, é a razão mais comum para admissão hospitalar.

Apesar da HbF e dos haplótipos da globina betaS serem amplamente estudados como um modulador genético para a Anemia Falciforme, a diversidade clínica da doença não é totalmente explicada. Nossos resultados demonstram essa diferença, podemos observar uma diversidade clínica diferente e, algumas vezes, ausente nas pessoas com doença falciforme na população amapaense. Um ponto que já foi citado, é a ausência dos haplótipos Atípicos, ausência de STA, sequestro esplênico e poucos casos de doenças cardiovasculares. Assim, estudos moleculares envolvendo alguns polimorfismos genéticos poderiam explicar a diversidade clínica da Doença Falciforme em nossas amostras.

Mais estudos de polimorfismos genéticos são necessários para melhor entender Anemia Falciforme e, se possível, encontrar moduladores genéticos de gravidade da doença que possam gerar fatores prognósticos para determinar a prevenção e o melhor tratamento para as complicações agudas e crônicas da Anemia Falciforme.

8. CONCLUSÃO

A análise dos haplótipos dos 44 pacientes no Amapá revelou uma situação atípica no perfil das manifestações clínicas associadas aos haplótipos.

Foi evidenciado convergências desse estudo com outros no que diz respeito há concentração de HbF, frequência de haplótipos, maior gravidade do haplótipo Bantu em relação aos outros.

Apesar de apresentar a distribuição dos haplótipos semelhantes ao restante do Brasil, onde o Bantu tem maior frequência, observa-se um abrandamento nas manifestações clínicas nos pacientes desse estudo, isso é evidenciado pela ausência de sequestro esplênico, crise aplástica, STA e úlceras. Por ser região tropical, onde o paciente está sempre exposto a lesões causadas por mosquitos, esperava-se uma alta incidência de úlceras de membros, o que não foi possível evidenciar nesse estudo.

Vale ainda lembrar que o Estado do Amapá possui apenas um centro especializado para atendimento desses pacientes, os quais, muitas das vezes, necessitam deslocar-se de regiões distantes através de rios ou estradas, o que dificulta a assiduidade do paciente, podendo ocasionar manifestações clínicas graves já em estado avançado.

As possibilidades de causas desse abrandamento podem ser diversas: perfil gênico diferente (ressaltando aqui a ausência de haplótipo atípico), isolamento regional, hábitos culturais, entre outras.

Há a necessidade de um aprofundamento na identificação dos fatores que podem estar influenciando, de certa forma positivamente, nas manifestações clínicas apresentadas por esses pacientes através de um estudo mais amplo e multidisciplinar que busque elucidar as possíveis causas desse abrandamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADORNO, E. V. et al. **β S-Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 36, p. 1283-1288, 2003.

ADORNO, E. V., COUTO, F. D., MOURA, N. J. P., MENEZES, J. F., RÊGO, M., REIS, M. G. **Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil,** Caderno de Saúde Pública, 2005.

ALABDULAALI, M. K. **Sickle cell disease patients in eastern province of Saudi Arabia suffer less severe acute chest syndrome than patients with African haplotypes,** Annals of Thoracic Medicine - Vol 2, Issue 4, October-December 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de diagnóstico e tratamento de doença falciforme.** Brasília, 2002. 142p.

ASHLEY-KOCH, A.; YANG, Q.; OLNEY, R. S. **Sickle Hemoglobin (Hb S) Allele and Sickle Disease: A HuGE Review.** American Journal of Epidemiology, v.151, n. 9, p. 839-845, May 2000.

ASLAN, Mutay., THORNLEY-BROWN, Denyse., FREEMAN, Bruce A. **Reactive Species in Sickle Cell Disease,** Annals of the New York Academy of Sciences, volume 899, pages 375–391, January 2000.

AYRES, M; AYRES JUNIOR M.; AYRES D. L.; SANTTOS A. S. **Biostat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Sociedade Civil Mamirauá: MCC-CNPq, s.d., 2007.

AZEVEDO, E. S. **Subgroup studies of black admixture within a mixed population of Bahia, Brazil.** Annals of Human Genetics, 44:55-60, 1980.

BACKES, C. E., MALLMANN, F. G., DASSI T., BAZZO M. L., SANTOS-SILVA M. C. **Triagem neonatal como um problema de saúde pública.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 27(1): 43-47, 2005.

BALLAS, S. K.; MOHANDAS, N; **Pathophysiology of vaso-occlusion.** Hematology/Oncology Clinics of North America – Sickle Cell Disease, v. 10, n. 6, p. 1221-40, 1996.

BHAUMIK, Kabita. **Fetal hemoglobin synthesis in sickle cell anemia: Some molecular considerations,** American Journal of Hematology, Volume 46, Issue 2, pages 101–106, June 1994.

BISOL, Tiago., FIOR Odinei., ESTEVES, Jorge Freitas., FRIDERICH, João Ricardo. **Influência do genótipo da hemoglobinopatia falciforme nas manifestações retinianas em pacientes de um hospital universitário.** Arquivo Brasileiro de Oftalmologia, 63(4), AGOSTO/2000.

BONNINI-DOMINGOS, C. R. B.; NAOUM, P. C.; VIANA, L. M. S.; MATOS, L. C.; FILHO, F. A.; MOREIRA, H. W. **Hemoglobina S – uma revisão.** UNICiências, v. 1, n. 1, São Paulo – SP, 1997.

BORTOLINI, MC; SALZANO, FM. **β S haplotype diversity in afro-americans, africanos, and Euro-Asiatics-An attempt at a synthesis.** Ciências e cultura journal of the Brazilian association for the advancement of science, 1999, 51 (3/4): 175-180.

BOYER, Véronique. **Passado português, presente negro e indizibilidade ameríndia: o caso de Mazagão Velho-Amapá,** Revista Religião e Sociedade [online], vol.28, n.2, pp. 11-29, ISSN 0100-8587, 2008.

BRANDALIZE, S. R. C., CZERESNIA, D. **Avaliação do programa de prevenção e promoção da saúde de fenilcetonúricos.** Rev. Saúde Pública [online], vol.38, n.2 ISSN 0034-8910, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Indicadores do Programa Nacional de Triagem Neonatal.** Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de diagnóstico e tratamento de doença Falciforme.** Brasília – DF; 2002.

BRUNIERA, P. **Crise de sequestro esplênico na doença falciforme.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 29 (3):259-261, 2007.

BUCHANAN, George R., DEBAUN, Michael R., QUINN, Charles T., STEINBERG, Martin H. **Sickle Cell Disease,** Blood, 120:3891-3897, 2012.

BUNN, H. F. **Pathogenesis and treatment of sickle cell disease,** New England Journal Medicine, 11;337(11):762-9, 1997.

BUNN, H. F. **Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease,** The New England Journal of Medicine; DOI: 10.1056/NEJM199709113371107; 337:762-769 September 11, 1997.

CALDAS, P.; BOA-SORTE, N.; AMORIN, T.; FREITAS, M.; RIBEIRO, R.; FONSECA, S.F. **Eventos clínicos e fatores associados em uma coorte de crianças com doença falciforme.** Gazeta Médica Bahia, 80(3):14-19, 2010.

CAMPBELL, G., HEWITT, R., KRAUSE, A., GOLDMAN, A., JENKINS T. **Beta-globin haplotype analysis suggests that a major source of Malagasy ancestry is derived from Bantu-speaking Negroids**, Am J Hum Genet. Jun; 58(6): 1303–1308, 1996.

CANCADO, R. D., JESUS, J. A. **A doença falciforme no Brasil**, Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, 2007.

CARDOSO, G. L; GUERREIRO, J. F. **African Gene Flow to North Brazil as Revealed by HBB*S Gene Haplotype Analysis**. American Journal of Human Biology, v. 18, p. 93–98, 2006.

CASTILHOS, J. K. **Análise de haplótipos β S em pacientes com anemia falciforme de Porto Alegre – RS. 2008**. Trabalho de Conclusão de Curso II, Centro Universitário Feevale, Instituto de Ciências da Saúde, Nova Hamburgo, 2008.

CIPOLOTTI, Rosana et al. **Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo bantu da anemia falciforme**. Revista brasileira de hematologia e hemoterapia, v.28, p.40-44, 2006.

DI NUZZO, D. V. P; FONSECA S. F. **Anemia falciforme e infecções**. Jornal de Pediatria, Rio de Janeiro, 80:347-54, 2004

FELIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. **Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme**. Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia [online], vol.32, n.3, pp. 203-208, 2010.

FERRAZ, M. H. C.; MURRAO, M. **Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos após o sexto mês de vida**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 29(3):218-222, 2007.

FIGUEIREDO, **Fatores moduladores da gravidade da evolução clínica da anemia falciforme**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 29(3):215-217, 2007.

FIGUEIREDO, M. S. **Agentes indutores da síntese de hemoglobina fetal**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia [online], vol.29, n.3, pp. 313-315. ISSN 1516-8484, 2007.

FLEMING, A. F; NAGEL, R.L. **Genetic epidemiology of the β s gene**. Baillier's Clinical Hematology, v. 5, n.2, 1992

FLEURY, M. K. **Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais**. Revista brasileira de análises clínicas, v. 39, p.89-93, 2007

FRANCIS, R. B., HAYWOOD, L. J. **Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease**, Natl Med Assoc. 84(7): 611–615, 1992, 1992.

FRY, P. H.: **O significado da anemia falciforme no contexto da “política racial” do Governo Brasileiro 1995-2004**. História, Ciências, Saúde – Manguinhos, v. 12, n. 2, p. 374-70, maio-ago, 2005.

GANGULY, A.; BOSWELL, W.; ANIQ, H. **Musculoskeletal Manifestations of Sickle Cell Anaemia: A Pictorial Review**, Hindawi Publishing Corporation, Vol. 2011, article ID 794283, doi:10.1155/2011/794283, 2011.

GLADWIN, Mark T., JISON, Maria L. **Hemolytic Anemia-associated Pulmonary Hypertension of Sickle Cell Disease and the Nitric Oxide/Arginine Pathway**, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Vol. 168, No. 1, pp. 3-4. 2003.

GUALANDRO, S. F. M.; FONSECA, G. H. H.; GUALANDRO, D. M. **Complicações cardiopulmonares das doenças falciformes**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. [online], vol.29, n.3, pp. 291-298. ISSN 1516-8484, 2007.

GUIA NET BRASIL. **Mapa Rodoviário do Estado do Amapá**. Disponível em: <<http://www.guianet.com.br/ap/mapaap.htm>>. Acesso em: 9 ago. 2013.

GUIMARÃES, C. T. L., COELHO, G. O. **A importância do aconselhamento genético na anemia falciforme**, Ciência & Saúde Coletiva, 15(Supl. 1):1733-1740, 2010.

GUIMARÃES, C. T. L.; COELHO, G. O. **A importância do aconselhamento genético na anemia falciforme**. Ciência e Saúde Coletiva, 15 (Supl. 1): 1733-1740, 2010.

HEBBEL, R. P. **Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium**, J Clin Invest. 99(11): 2561–2564, 1997.

HUISMAN, Titus H.J., MILLER, Barbara A., OLIVIERI, Nancy., SALAMEH, Mohammed., AHMED, Mohammed., ANTOGNETTI, Giovanna., NATHAN, David G., ORKIN, Stuart H. **Molecular Analysis of the High-Hemoglobin-F Phenotype in Saudi Arabian Sickle Cell Anemia**, N Engl J Med 1987; 316:244-250 January 29, 1987.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo 2010: população do Brasil**, 2010, Acesso em: 03 Mai. 2012.

JENSEN, M., ATTENBERGER, H., SCHNEIDER, C., WALTHER, U. **The developmental change in the γ G and γ A globin. Proportions in hemoglobin**. Eur J. Pediatr. 138:311-314, 1982.

KATO, G. J. **Priapism in Sickle cell disease: a hematologist's perspective**. J Sex Med, 9(1): 70–78, 2012.

KATO, G. J., MACKA, Kyle, **Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift?**, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Volume 38, Issue 8, Pages 1237–1243, 2006.

LAGUARDIA, J. **No fio da navalha: anemia falciforme, raça e as implicações no cuidado à saúde**. Revista Estudos Feministas [online], vol.14, n.1, pp. 243-262, 2006.

LEE, G. R., BITHELL, T. C., FOERSTER, J., ATHENS, J. W., LUKENS, J. N. **HEMATOLOGIA CLINICA – WINTROBE**, volume 2º, editora Manole, 8ª edição, 1998.

LEONOVA, J. Y., KAZANETZ, E. G., SMETANINA, N. S., ADEKILE, A. D., EFREMOV, G. D., HUISMAN, T. H. **Variability in the fetal hemoglobin level of the normal adult**, American Journal of Hematology, Volume 53, Issue 2, pages 59–65, October 1996.

LIMA, P. D. L.; CARDOSO, P. C. S.; KHAYAT, A. S.; BAHIA, M. O.; BURBANO, R. R. **Evaluation of the mutagenic activity of hydroxiurea on the G1-S-G2 phases of the**

cycle cell: na *in vitro* study. Genetics and molecular research (online journal), 2(3):328-333, 2003.

LISOT, C. L. A; SILLA, L. M. R. **Triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil: prevalência em área de colonização italiana.** Caderno de Saúde Pública, v.20, n°.6, Rio de Janeiro, RJ. 2004.

LOBO, C.; MARRA, V. N.; SILVA, R. M. **Crises dolorosas na anemia falciforme.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v 29(3):47-258, 2007.

LOGGETTO, S.R. **Diversidade clínica da anemia falciforme e haplótipos do gene da globina beta-S.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 35(3), 2013.

MAGALHÃES, I. Q. **Alterações renais na doença falciforme.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 29(3):279-284, 2007.

MANFREDINI, V., ZANATTA, T. **Comparação entre métodos laboratoriais de diagnóstico de Doenças Falciformes**, edição 94, Newslab. Artigo - curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia da Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2009.

MILLER, Scott T., SLEEPER, Lynn A., PEGELOW, Charles H., ENOS Laura E., WANG, Winfred C., WEINER, Steven J., WETHERS, Doris L., SMITH, Jeanne., KINNEY, Thomas R. **Prediction of Adverse Outcomes in Children with Sickle Cell Disease** N Engl J Med 2000; 342:83-89 January 13, 2000.

MODELL, B.; DARLISON, M. **Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators.** Bull World Health Organ, vol.86, no.6, Genebra June 2008.

MONTALEMBERT, M. **Management of sickle cell disease**, BMJ, 337:a1397, 2008.

MOUSINHO-RIBEIRO, R. C.; CARDOSO, G. L.; SOUSA, I. E. L.; MARTINS, P. K. C.. **Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme.** Rev. Bras. Hematol. Hemoter. [online], vol.30, n.2, pp. 136-141. ISSN 1516-8484, 2008.

NAGEL, R. L., STEINBERG, M. H. **Genetics of the beta S gene: Origins, genetic epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia.** Cambridge University Press, New York, pp 711-755, 2001.

NAOUM, P. C., **Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme.** Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia, v.22, p.05-22, 2000.

NAOUM, P. C.; **Hemoglobinopatias e Talassemias.** São Paulo, Editora Sarvier, pag. 171, 1997.

NAOUM, P.C. **Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme.** Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia, v.22, p.05-22, 2000.

NETO, G. C. G.; PITOMBEIRA, M. S. **Aspectos moleculares da anemia falciforme.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.39, p.51-56, 2003.

NOGUCHI, T., MIZUTANI, A1., OKAJIMA, K., UCHIBA, M., ISOBE, H., HARADA, N., MIZUTANI. S. **Antithrombin reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in**

rats by inhibiting leukocyte activation through promotion of prostacyclin production, Blood, 15;101(8):3029-36, 2003.

NUSSBAUM, R. L., MCINNES, R. R., WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson – Genética na medicina**, 7ª edição, editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2008.

ORLANDO, G. M.; NAOUM, P. C.; SIQUEIRA, F. A. M.; BONINI-DOMINGOS, C. R. **Diagnóstico diferencial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas**. . Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 22(20):111-121, 2000.

OSORIO, B., ROBINSON, W. **Genética Humana**, 3ª edição, editora Artmed, 2013.

PINTO, A. C. S.; ZAGO, M. A. **Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v.29, p.207-214, 2007.

PINTO, A. C. S.; ZAGO, M. A. **Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v.29, p.207-214, 2007

POWARS, D. R.; ELLIOT-MILLS, D. D.; CHAN, L.; NILAND, J.; HITI, AL.; OPAS, L. M. **Chronic renal failure in sickle cell disease: risk factors, clinical course, and mortality**. Annals of Internal Medicine, 115:614-20, 1991.

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**. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro – RJ, 19(4):1195-1199, 2003.

RAPAPORT, S. I. **Hematologia – introdução**, 2ª edição, editora Roca, Santos-SP, 1990.

SANTOS, B. P. **Envolvimento de polimorfismos do gene de lectina de ligação à manose em pacientes com anemia falciforme**, Trabalho de Conclusão de Curso,

SHAH, A. **Thalassemia Syndromes**. Indian Journal of Medicine Science, 58:445-9, 2004.

SILLA, L. M. R. **Doença falciforme: um grave e desconhecido problema de saúde pública no Brasil**, Jornal de Pediatria-RJ. 1999.

SILVA, K. R.; YAMAGUCHI, M. U. **Os benefícios da inclusão das hemoglobinopatias na triagem neonatal**. Arquivo de Ciências da Saúde – Unipar, Umuarama, v. 11, n. 1, p. 67-73, jan./abr. 2007.

SILVA, L.B., GONÇALVEZ, R. P., MARTINS, M.F. **Estudo da correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e o prognóstico dos paciente com anemia falciforme**. Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia, 2009.

SILVA, M. **Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em paciente com Anemia Falciforme**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas. 2006.

SILVA, M.A.L. **Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com doença falciforme**. 2006. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Ciências Médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008

SILVA, R. B. P.; RAMALHO, A. S. **Riscos e benefícios da triagem genética: o traço falciforme como modelo de estudo em uma população brasileira.** Caderno Saúde Pública [online], vol.13, n.2, pp. 285-294. ISSN 0102-311X, 1997.

SILVA, R. B. P; RAMALHO, A; S.; CASSORLA, R. M. S. **A anemia falciforme como problema de Saúde Pública no Brasil.** Revista de Saúde Pública [online], vol.27, n.1, pp. 54-58. ISSN 0034-8910, 1993.

SIMÕES, B. P., PIERONI, F., BARROS, G. M. N., MACHADO, CANÇADO, C. L., R. D., SALVINO, M. A., ÂNGULO, VOLTARELLI, I. J. C. **Consenso Brasileiro em Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas: Comitê de Hemoglobinopatias,** Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia, 32(Supl. 1):46-53, 2010.

SONATI M.F., GONCALVES M. S., NECHTMAN J. F., FIGUEIREDO M.S., KERBAUY J., ARRUDA V. R., SAAD S.O.T., COSTA F.F., STOMING T.A. **Sickle Cell Disease in a Brazilian Population from Sao Paulo: A Study of the β s Haplotypes,** Human Heredity, 44:322–327, 1994.

SONATI, M. F., COSTA, F. F. **Genética das doenças hematológicas: as hemoglobinopatias hereditárias.** Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro) [online], vol.84, n.4, suppl., pp. S40-S51. ISSN 0021-7557, 2008.

STEINBERG, M. H., SEBASTIANI, P., RAMONI, M. F., NOLAN, V., BALDWIN, C. T. **Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia,** Nature Genetics 37, 435 – 440, 2005.

STEINBERG, Martin H., RODGERSA, G. P. **Pathophysiology of sickle cell disease: Role of cellular and genetic modifiers,** Seminars in Hematology, Volume 38, Issue 4, Pages 299–306, October 2001.

STUART, Marie J., NAGEL, Ronald L. **Sickle-cell disease,** The Lancet, Volume 364, Issue 9442, 9–15, Pages 1343–1360, October 2004.

SUTTON, Millicent., BOUHASSIRA, Eric E., NAGEL, Ronald L. **Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes,** American Journal of Hematology, Volume 32, Issue 1, pages 66–69, September 1989.

VICARI, F.; FIGUEIREDO, M. S. **Priapismo na doença falciforme.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 29(3):275-278, 2007.

WATANABE, A. M., **Prevalência da anemia falciforme no estado do Paraná.** 122 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

WEATHERALL, D. J. **Thalassaemias,** eLS, DOI: 10.1002/9780470015902.a0002274.pub2, 2010.

WEATHERALL, D. J., PROVAN, A. B. **Red cells I: inherited anaemias.** The Lancet - Vol. 355, Issue 9210, Pages 1169-1175) DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02073-0, 2000.

WU, L. C., SUN, C. W., RYAN, T. M., PAWLIK, K. M., Ren. J., TOWNES, T. M. **Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells.** Blood. 108:1183–8, 2006.

ZAGO, M. A. **Hematologia: fundamentos e prática.** Rio de Janeiro: Atheneu, 2001.

ZAGO, M.A., SILVA, W.A.Jr., DALLE, B., GUALANDRO, S., Hutz, M.H., Lapoumeroulie, C. Tavella, M.H. Araujo, Krieger, A.G; J.E. J. Elion, R. Krishna moorthy. **Atypical β S haplotypes Are Generated by Diverse Genetic Mechanisms.** American Journal of Hematology 63:79–84, 2000.

ZAGO, Marco Antonio, PINTO, Ana Cristina Silva. **Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v.29, p.207-214, 2007.

PEGELow, Charles H. et. al. **Risk of recurrent stroke in children with sickle cell disease receiving blood transfusion therapy for at least five years after initial stroke,** The Journal of Pediatrics, Volume 140, Issue 3, Pages 348–354, March 2002.

OHENE-FREMPONG, Kwaku., WEINER, Steven J., SLEEPER, Lynn A., MILLER, Scott T., EMBURY, Stephen., MOOHR, John W., WETHERS, Doris L., PEGELow, Charles H., GILL, Frances M. **Cerebrovascular Accidents in Sickle Cell Disease: Rates and Risk Factors,** Blood: 91 (1), January 1, 1998.

ADAMKIEWICZ, T. V et. al. **Invasive pneumococcal infections in children with sickle cell disease in the era of penicillin prophylaxis, antibiotic resistance, and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccination,** The Journal of Pediatrics, Volume 143, Issue 4, Pages 438–444, October 2003.

SILVA, Karina Renata; YAMAGUCHI, Miriam Ueda. **Os benefícios da inclusão das hemoglobinopatias na triagem neonatal.** Arquivo ciências saúde UNIPAR;11(1), jan.-abr. 2007.

MAIA, A. C. S., SIQUEIRA, B. R., ZANOTTI, L. C., NOGUEIRA, A. **Incidência de anemia falciforme, traço falcêmico e perfil hemoglobínico dos casos diagnosticado na triagem neonatal no estado de Rondônia no ano de 2003.** Saber Científico Porto Velho, 2 (1): 43 - 53, jan./jun., 2009.

SILVA, M. C., SHIMAUT, E. L. T. **Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme,** Rev. bras. hematol. hemoter.; 28(2):144-148, 2006.

ANEXOS

ANEXO A – Documento de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo no. FR-476933/2012 – CEP sobre **"IDENTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS DO GENE DA GLOBINA-BS EM PESSOAS COM ANEMIA FALCIFORME DO ESTADO DO AMAPÁ"**, sob a responsabilidade de **Natália de Morais Castelo**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Humana, adotados pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), em reunião realizada em 16/02/2012.

Data para apresentação do relatório no CEP-UNIFAP: 15/02/2013

CERTIFICATE

We certify that the protocol number FR-476933/2012 – CEP about **"IDENTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS DO GENE DA GLOBINA-BS EM PESSOAS COM ANEMIA FALCIFORME DO ESTADO DO AMAPÁ"**, **Natália de Morais Castelo** is in agreement with the Ethical Principles in Human Research adapted by National Ethical Committee (CONEP) and was approved by the Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) – Ethical Committee for Research (CEP) in 16/02/2012.

Macapá, 16 de fevereiro de 2012

Prof. Msc. Alexandre Souto Santiago
Coordenador - CEP-UNIFAP

Universidade Federal do Amapá
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP - UNIFAP
Rod. JK km 2, Marco Zero CEP 68908-130 – Macapá – AP - Brasil
Email: cep@unifap.br