

Paulo do Val Rezende

Estudo das manifestações clínicas e hematológicas da doença falciforme subtipos SC e SD em crianças do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Belo Horizonte

2016

Paulo do Val Rezende

Estudo das manifestações clínicas e hematológicas da doença falciforme subtipos SC e SD em crianças do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais

Texto a ser apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Marcos Borato Viana

R467e Rezende, Paulo do Val.
Estudo das manifestações clínicas e hematológicas da doença falciforme subtipos SC e SD em crianças do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais [manuscrito]. / Paulo do Val Rezende. - - Belo Horizonte: 2016.
140f.: il.
Orientador: Marcos Borato Viana.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Anemia Falciforme. 2. Hemoglobinopatias/epidemiologia. 3. Hemoglobinas. 4. Triagem Neonatal. 5. Desoxirribonuclease EcoRI. 6. Sobrevida. 7. Criança. 8. Dissertações Acadêmicas. I. Viana, Marcos Borato. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WS 300

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

Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramírez
Vice-Reitora: Profa. Sandra Regina Goulart Almeida
Pró-Reitora de Pós-graduação: Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira
Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Ado Jório

Faculdade de Medicina

Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes
Vice-diretor: Prof. Humberto José Alves

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

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Luiz Armando Cunha de
Marco

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Edson Samesima
Tatsuo

Chefe do Departamento de Pediatria: Profa. Maria do Carmo Barros de Melo

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área
de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente: Prof. Eduardo
Araújo Oliveira

Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina - Área de
Concentração em Pediatria: Prof. Jorge Andrade Pinto

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

Profa. Ana Cristina Simões e Silva – Titular
Prof. Leandro Fernandes Malloy Diniz - Suplente
Prof. Eduardo Araújo de Oliveira - Titular
Profa. Eleonora Moreira Lima - Suplente
Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira - Titular
Prof. Cássio da Cunha Ibiapina - Suplente
Prof. Jorge Andrade Pinto - Titular
Profa Helena Maria Gonçalves Becker – Suplente
Profa. Juliana Gurgel – Titular
Profa Ivani Novato Silva - Suplente
Profa. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana – Titular
Profa Luana Caroline dos Santos - Suplente
Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro – Titular
Prof. Marcos José Burle de Aguiar - Suplente
Profa Roberta Maia de Castro Romanelli – Titular
Profa. Débora Marques de Miranda - Suplente

“Com grandes poderes vêm grandes responsabilidades”

Benjamin Parker

Às crianças com anemia falciforme, pelo exercício diário de luta pela vida, e às suas famílias, pelo exemplo de dedicação.

Agradecimentos

Ao Professor Marcos Borato Viana, pelo privilégio de receber sua orientação e atenção durante cada passo da elaboração deste trabalho. Sua dedicação singular ajudou-me a lidar com as dificuldades inerentes ao processo de pesquisa científica e aproveitar essa gratificante experiência.

Aos funcionários da Fundação Hemominas, pelo apoio e colaboração na busca dos prontuários para a coleta de dados.

Aos funcionários do NUPAD, pelo apoio em diversas fases do projeto.

Aos acadêmicos de medicina, enfermagem e bioquímica, que participaram dessa pesquisa com empenho e responsabilidade.

Ao André Belisário pela realização e apoio nos exames moleculares.

À Dra. Célia Maria Silva pela disponibilidade na realização dos exames de Doppler transcraniano.

A todos os colegas do Serviço de Hematologia Pediátrica e de Hematologia Geral do Hospital das Clínicas - UFMG, pelo apoio, companheirismo e disponibilidade para ajudar nos momentos em que o tempo urge a nossa frente.

A todos os meus amigos e familiares, pelo apoio em todos os momentos.

A Deus, por Sua energia constante e por essa oportunidade de aprendizado e crescimento.

Aos meus pais, pelo exemplo de caráter e dedicação.

À Beth e Dindinha, presenças insubstituíveis e carinho inesgotável.

À Tati, pelo amor sem fronteiras, paciência, compreensão e cumplicidade em cada passo de nossas vidas.

Ao Billie Joe, pelo companheirismo durante toda a sua vida.

Ao Rafael e Victor por me lembrarem todos os dias que vale a pena viver.

A todos vocês, agradeço de coração!

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e acrônimos	9
Resumo	11
Abstract	13
Lista de tabelas	15
Lista de figuras	16
1. Introdução e Justificativa	17
2. Revisão bibliográfica	18
2.1. Anemia falciforme	18
2.2. Hemoglobinopatia SC	24
2.2.1. Aspectos históricos	24
2.2.2. Fisiopatologia	25
2.2.3. Características clínicas e laboratoriais	26
2.2.4. Tratamento	35
2.3. Hemoglobinopatia SD	41
2.3.1. Aspectos históricos	41
2.3.2. Fisiopatologia	43
2.3.3. Características clínicas e laboratoriais	44
2.3.4. Tratamento	46
3. Objetivos	48
3.1. Objetivo geral	48
3.2. Objetivos secundários	48
4. Casuística e métodos	49
4.1 Delineamento e local de realização	49
4.2 Programa Estadual de Triagem Neonatal para Doença Falciforme de Minas Gerais	49
4.3 População estudada, critérios de inclusão e exclusão	51
4.3.1. Hemoglobinopatia SD	52
4.3.2. Hemoglobinopatia SC	53
4.4 Coleta de Dados	55

4.5 Aspectos Éticos	57
4.6 Análise Estatística	58
4.7 Financiamento	59
5. Resultados	60
5.1. Hemoglobinopatia SD	60
5.2. Hemoglobinopatia SC	68
5.2.1. Mortalidade e curva de sobrevida (n=539)	68
5.2.2. Caracterização da amostra de crianças em que o TCLE foi colhido (n=461)	70
5.2.3. Características clínicas	73
5.2.4. Co-herança de alfa talassemia	80
6. Discussão	83
6.1. Hemoglobinopatia SD	83
6.2. Hemoglobinopatia SC	83
7. Conclusões	96
7.1. Hemoglobinopatia SD	96
7.2. Hemoglobinopatia SC	97
8. Referências Bibliográficas	99
9. Anexos	120

Lista de abreviaturas, siglas e acrônimos

- β^S - Gene mutante S da cadeia da beta globina
- β^C - Gene mutante C da cadeia da beta globina
- β^D - Gene mutante D da cadeia da beta globina
- AVC - Acidente Vascular Cerebral
- BH - Belo Horizonte
- CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média
- CVO - Crises vaso-oclusivas dolorosas
- DHL - desidrogenase láctica
- DTC - Doppler transcraniano
- DP - Desvio padrão
- Hb – Hemoglobina
- HBH - Hemocentro de Belo Horizonte
- Hb A – Hemoglobina A
- Hb A2 - Hemoglobina A2
- Hb AS - Traço S ou traço falciforme
- Hb C - Hemoglobina C
- Hb D - Hemoglobina D
- Hb F - Hemoglobina Fetal
- Hb S - Hemoglobina S
- Hb SS - Hemoglobinopatia SS
- Hb SC - Hemoglobinopatia SC
- Hb SD - Hemoglobinopatia SD
- HCM - Hemoglobina corpuscular média
- HEMOMINAS - Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de
Minas Gerais
- HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* -
Cromatografia Líquida de Alta Resolução
- HU – Hidroxiureia
- IEF - *Isoelectric focusing* - Eletroforese por focalização isoeletrica
- MA – Microalbuminúria
- MG - Minas Gerais
- n - número de indivíduos na amostra ou população
- NACF - Necrose avascular de cabeça de fêmur

NUPAD - Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico
da Faculdade de Medicina da UFMG

PAE-Cehmob – Programa de atenção às especialidades médicas do
Centro de educação e apoio para hemoglobinopatias

PCR-RFLP - Reação em cadeia da polimerase seguida de restrição
enzimática

PSAP – Pressão sistólica de artéria pulmonar

PTN - Programa Estadual de Triagem Neonatal

RMA - Ressonância magnética angiográfica

RNM - Ressonância nuclear magnética

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

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

SC – Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobinas S e C

SD – Genótipo duplo heterozigoto para hemoglobinas S e D

SEA - Sequestro Esplênico Agudo

SNC - Sistema Nervoso Central

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

STA – Síndrome torácica aguda

SUS – Sistema único de saúde

TCE – Traumatismo cranioencefálico

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TCTH – Transplante de células tronco hematopoéticas

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VCAM 1 - moléculas celulares de adesão vascular

VCM - Volume corpuscular médio

VMMáx – Velocidade média-máxima

Resumo

Introdução e Objetivos: As hemoglobina SC e SD são variantes da doença falciforme (DF). A hemoglobinopatia SC é a segunda variante mais comum da DF no mundo, logo depois da hemoglobinopatia SS. Entre as variantes SD, a SD-Punjab (*HBB*:c.364G>C; p.Glu121Gln) parece ser o subtipo mais comum descrito na literatura mundial, com prevalência mais elevada no norte da Índia. Outra variante é a HbSD-Korle-Bu (*HBB*:c.220G>A; p.Asp73Asn), descrita originalmente em Gana e cuja gravidade clínica parece ser leve. Os objetivos do presente estudo foram conhecer a prevalência e a história natural da hemoglobinopatia SC, e caracterizar os subtipos moleculares, estimar a prevalência em MG e traçar a história natural da doença SD em recém-nascidos (RN) diagnosticados pelo Programa de Triagem Neonatal-MG e encaminhados para a Fundação Hemominas.

Metodologia: Coorte de 21 RN com hemoglobinopatia SD e 461 com SC nascidos entre janeiro de 1999 e dezembro de 2012. Foram avaliadas manifestações clínicas, laboratoriais e genéticas das duas entidades.

Resultados: a) *Hemoglobinopatia SC*: 47,5% das 461 crianças eram do gênero feminino; mediana de idade de 9,2 anos. As médias dos valores dos exames hematológicos foram: hemoglobina 10,5 g/dL; reticulócitos 3,4%; leucometria $11.236/\text{mm}^3$; plaquetometria $337.098/\text{mm}^3$ e Hb fetal 6,3%. Eventos clínicos: SEA em 14,8%, crises dolorosas 74,6%, hemotransfusão 23,4%, AVC isquêmico 0,2%. Doppler transcraniano foi feito em apenas 15,4% das crianças, todos normais se utilizados os mesmos valores de referência de pacientes SS. Dez pacientes usaram hidroxiureia, todos com melhora das crises dolorosas. Retinopatia foi observada em 20,3% das 59 crianças que realizaram fundoscopia. Necrose avascular foi detectada em 7 de 12 pacientes avaliados, com predomínio em fêmur esquerdo. Ecocardiograma compatível com hipertensão pulmonar foi registrado em 4,6% de 130 crianças, com média estimada de 33,5 mm Hg de PSAP. Pesquisa de co-herança de alfa talassemia: 78 de 387 crianças (20,2%) apresentaram deleção do tipo $-\alpha^{3.7}$. O risco das crianças sem alfa talassemia para apresentarem CVO, infecções, transfusões de concentrado de hemácias e SEA foi 1,7, 1,3, 2,9 e 15 vezes maior do que no grupo com co-herança de alfa talassemia, respectivamente. Foi observada associação estatisticamente

significativa entre a co-herança de alfa talassemia e níveis mais baixos de VCM, HCM, contagem de reticulócitos e leucometria. A taxa de mortalidade por todas as causas foi de 4,3%; b) *Hemoglobinopatia SD*: Identificaram-se 11 crianças com a variante SD-Punjab (1:420.000), 8 S-Korle-Bu (1:480.000) e nenhuma outra variante D. Em 4 casos não se obteve amostra para análise. Dados basais médios de SD-Punjab e S-KorleBu: hemoglobina 8,1 e 12,1 g/dL ($p < 0,001$), leucometria 13.970 e 10.850/mm³ ($p = 0,02$), plaquetometria 361.000 e 330.000/mm³ ($p = 0,4$), reticulócitos 7,7 e 1,0% ($p = 0,002$), Hb fetal 14,8 e 6,0% ($p = 0,02$), Hb S 45,1 e 50% ($p = 0,28$), Hb D 36,3 e 41% ($p = 0,08$); saturimetria de O₂ 91,9 e 97% ($p = 0,002$). Eventos clínicos, na mesma ordem: sequestro esplênico agudo 2 vs 0; crises dolorosas 8 vs 2; hemotransfusão 5 vs 0; hidroxíureia por crises repetidas de dor 3 vs 0. Nenhum Doppler transcraniano (14 crianças) foi anormal.

Conclusões: A gravidade das manifestações clínicas na doença SC parece ser realmente menos intensa do que na forma SS. Contudo as complicações agudas e lesões de órgãos-alvo podem também ocorrer com intensidade variada. A triagem neonatal precoce e o estudo genético sistemático da co-herança de alfa talassemia podem ser úteis para o seguimento desses pacientes e orientação familiar sobre o prognóstico da doença. O curso clínico e exames hematológicos das crianças com hemoglobina S/D-Punjab foram muito semelhantes àqueles com hemoglobinopatia SS. Em contraste, crianças com hemoglobina S-Korle Bu tiveram curso clínico e laboratorial semelhante àqueles com traço falciforme.

Palavras-chave: Doença falciforme; Hemoglobinopatia SC; Hemoglobina D-Punjab; Hemoglobina Korle-Bu; Criança; Triagem neonatal; Nupad-UFMG; Sobrevida; Tratamento; Sequenciamento gênico; Enzima de restrição *EcoRI*; haplótipos; alfa talassemia.

Abstract

Introduction and Objectives: The hemoglobin SC and SD are variants of sickle cell disease (SCD). The hemoglobinopathy SC is the second most common variant of SCD in the world, right after the SS genotype. Among the variants SD, SD-Punjab (HBB: c.364G> C; p.Glu121Gln) seems to be the most common subtype described in the literature, with higher prevalence in Northern India. Another variant is the HbS-Korle-Bu (HBB: c.220G> A; p.Asp73Asn), originally described in Ghana and whose clinical severity appears to be mild. The objectives of this study were to determine the prevalence and natural history of the hemoglobinopathy SC, and to characterize the molecular subtypes, to estimate the prevalence in Minas Gerais and describe the natural history of SD disease in newborns screened as part of the Neonatal Screening Program in the Brazilian state of Minas Gerais and treated at Hemominas Foundation.

Methodology: Cohort of 21 infants with hemoglobinopathy SD and 461 with SC born between January 1999 and December 2012. The clinical, laboratory and genetic manifestations of the two entities were evaluated.

Results: a) *Hemoglobinopathy SC:* 47.5% of 461 children were female; median age of 9.2 years. The mean values of blood tests were: hemoglobin 10.5 g/dL; reticulocytes 3,4%; white blood cell count 11,236/mm³; platelet count 337,098/mm³ and fetal Hb 6.3%. Clinical events: ASSC 14.8%, painful crises 74.6%, blood transfusion 23.4%, overt stroke 0.2%. Transcranial doppler was done in only 15.4% of the children. They were all normal if used the same current reference values for SS patients. Ten children used hydroxyurea, all with improvement of painful crises. Retinopathy was observed in 20.3% of 59 children who underwent ophthalmoscopy. Avascular necrosis was detected in 7 of 12 patients evaluated, predominantly in the left femur. Echocardiogram compatible with pulmonary hypertension was recorded in 4.6% of 130 children, with an estimated average systolic pulmonary artery pressure of 33.5 mm Hg. Co-inheritance of alpha thalassemia: 78 of 387 children (20.2%) had a deletion type $-\alpha^{3.7}$. The risk of children without alpha thalassemia to present painful crises, infections, blood transfusions and ASSC was 1.7, 1.3, 2.9 and 15 times greater than in the group with alpha thalassemia co-inheritance, respectively. Statistically

significant association was observed between alpha thalassemia co-inheritance and lower levels of MCV, MCH, reticulocyte count and white blood cell count. The mortality rate from all causes was 4.3%; *b) Hemoglobinopathy SD*: 11 children with SD-Punjab variant (1: 420,000;), 8 S-Korle-Bu (1: 480,000) and no other variant of HbD were identified. In 4 cases, samples for analysis were missing. Mean baseline data of SD-Punjab and S-KorleBu: hemoglobin 8.1 and 12.1 g/dL ($p < 0.001$), white blood cell count 13,970 and 10,850/mm³ ($p=0.02$), platelet count 361,000 and 330,000/mm³ ($p=0.4$), reticulocytes 7.7 and 1.0% ($p=0.002$), fetal Hb 14.8 and 6.0% ($p=0.02$), HbS 45.1 and 50% ($p=0.28$), Hb D 36.3 and 41% ($p=0.08$); oxygen saturation 91.9 and 97% ($p=0.002$). Clinical events in the same order: acute splenic sequestration crises (ASSC) 2 vs 0; painful crises 8 vs 2; blood transfusion 5 vs 0; hydroxyurea because of repeated pain crises 3 vs 0. No transcranial Doppler (14 children) was abnormal

Conclusions: The severity of clinical manifestations in SC disease appears to be indeed less intense than in the SS form. However acute complications and organ damage may also occur with varying intensity. Early neonatal screening and systematic genetic study of alpha thalassemia co-inheritance can be useful for the follow-up of these patients and for family counseling about disease prognosis. The clinical course and blood cell counts of children with hemoglobin S/D-Punjab were very similar to those with hemoglobinopathy SS. In contrast, children with S-Korle Bu hemoglobin had clinical and laboratory course similar to those with sickle cell trait.

Keywords: sickle cell disease; hemoglobinopathy SC; hemoglobin D-Punjab; hemoglobin Korle-Bu; children; neonatal screening; Nupad-UFGM; survival; treatment; gene sequency; restriction enzyme EcoRI; haplotypes; alpha thalassemia.

Lista de tabelas

Tabela 1 – Idade ao óbito das 23 crianças entre as 539 que nasceram no período de 1 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2012.	69
Tabela 2 – Valores médios dos exames hematológicos dos pacientes incluídos no estudo.	72
Tabela 3 – Distribuição do número de eventos por paciente nas 68 crianças acometidas por SEA.	74
Tabela 4 – Distribuição das velocidades média-máximas (cm/s) do doppler transcraniano de 71 pacientes com hemoglobinopatia SC.	76
Tabela 5 – Características e resposta dos dez pacientes do grupo SC em uso de hidroxiureia.	79
Tabela 6 – Associação de co-herança de $-\alpha^{3.7}$ talassemia (um ou dois genes) e dados clínicos de 387 pacientes com hemoglobinopatia SC.	80
Tabela 7 – Associação de co-herança de $-\alpha^{3.7}$ talassemia (um ou dois genes) e dados laboratoriais médios de 387 pacientes com hemoglobinopatia SC.	82
Tabela 8 – Estudos anteriores sobre Hb SC publicados em revistas indexadas no banco de dados <i>Medline</i> .	85

Lista de figuras

Figura 1 – Fluxograma de inclusão das 19 crianças com Hb SD no estudo.	52
Figura 2 – Fluxograma de inclusão das 461 crianças com Hb SC no estudo.	54
Figura 3 – Causas de óbito das 23 crianças entre as 539, que nasceram no período de 1 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2012 e faleceram durante o seguimento, segundo as informações obtidas do documento de óbito e de dados do estudo de Sabarense.	68
Figura 4 – Distribuição por faixa etária dos óbitos das 23 crianças entre as 539 que nasceram no período de 1 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2012.	69
Figura 5 – Curva de sobrevida das 539 crianças com hemoglobinopatia SC, que nasceram no período de 01 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2012, acompanhadas no HBH (método de Kaplan-Meier) até 31 de dezembro de 2014.	70
Figura 6 – Distribuição dos 461 pacientes com hemoglobinopatia SC por gênero.	71
Figura 7 – Endereço de residência das 461 crianças com hemoglobinopatia SC, nascidas entre 1 de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2012 e encaminhadas ao Hemocentro de Belo Horizonte.	71
Figura 8 – Ano do nascimento das 461 crianças com perfil hemoglobínico FSC incluídas no estudo, ao longo do período proposto.	72
Figura 9 – Distribuição dos 2.486 eventos clínicos infecciosos em 461 crianças com hemoglobinopatia SC.	74
Figura 10 – Curva de probabilidade de ocorrência do primeiro episódio de SEA, conforme tempo de exposição de cada criança (Método de Kaplan-Meier).	75
Figura 11 – Curva de probabilidade da ocorrência do primeiro episódio de sequestro esplênico agudo, conforme a presença ou não de co-herança de alfa talassemia (Método de Kaplan-Meier).	81

1. Introdução e Justificativa

A doença falciforme caracteriza-se pelo predomínio da hemoglobina S (HbS) sobre outras hemoglobinas. O gene mutante da cadeia da beta globina (β^S) pode encontrar-se em homozigose ou em combinação com outras mutações que causam anormalidades hereditárias das hemoglobinas. As hemoglobinas variantes que se associam mais frequentemente com a HbS são a hemoglobina C (HbC) e a hemoglobina D (HbD), além de mutações que resultam em beta-talassemia. Essas combinações dão origem à hemoglobinopatia SC, hemoglobinopatia SD-Punjab e à S/beta-talassemia, respectivamente.

O total de pacientes com doença falciforme no Brasil é de 25.000 a 30.000 casos com cerca de 3.500 casos novos por ano (1). Em Minas Gerais foi detectado um em cada 1.313 nascidos com doença falciforme (SS, SC, S β -talassemia, e SD) (2). A homozigose para a HbS é o subtipo mais comum da doença falciforme, seguida da hemoglobinopatia SC(3). A hemoglobinopatia SD parece ser muito rara; ela engloba o subtipo SD-Punjab, aparentemente mais grave, e outros subtipos não-Punjab, de curso clínico pouco conhecido ou, mesmo, desconhecido.

Em Minas Gerais, os recém-nascidos que apresentam resultado de exame compatível com qualquer hemoglobinopatia são encaminhados a um dos centros regionais da Fundação Hemominas. O acompanhamento a esses pacientes segue o Protocolo para Portadores de Síndromes Falciformes, elaborado pela equipe multiprofissional. Este protocolo consiste de acompanhamento clínico trimestral das crianças, bem como assistência global da equipe multiprofissional (4).

A prevalência da hemoglobinopatia SC em crianças com doença falciforme triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de MG (PTN-MG) é um pouco mais baixa do que a da forma homozigótica (Hb SS). A gravidade das manifestações clínicas parece ser menos intensa, exceto quanto à retinopatia proliferativa e necrose da cabeça do fêmur. A prevalência da hemoglobinopatia SD é desconhecida em Minas Gerais.

Nota-se que a grande maioria dos dados disponíveis na literatura sobre as características e evolução clínico-laboratorial das crianças com hemoglobinopatia SC e SD é proveniente de outros países. Com o presente

estudo, pretende-se conhecer a prevalência e a história natural das hemoglobinopatia SC e SD em crianças com doença falciforme triadas pelo PTN-MG e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte (HBH) da Fundação Hemominas. Pretende-se, ainda, que as informações obtidas sejam repassadas ao sistema de saúde e que sejam do conhecimento de equipes de saúde e dos familiares.

A triagem neonatal precoce, com realização sistemática de estudo genético das variantes de hemoglobina D, pode ser de grande utilidade no acompanhamento dos pacientes e orientação familiar, já que a evolução clínica pode ser distinta, conforme a variante encontrada.

Os benefícios da pesquisa são de ordem teórica e prática. O primeiro, pelo valor científico esperado e o segundo, pelo conhecimento mais aprofundado do perfil clínico e laboratorial das crianças com doença das hemoglobinas SC e SD em nosso meio, visando a ações de saúde preventiva e curativa.

Devido ao curso relativamente benigno da história natural da hemoglobinopatia SC, a doença não é tão bem estudada como nos pacientes com hemoglobinopatia SS (3, 5-10) e esta constitui uma das razões do presente estudo.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Anemia Falciforme

A anemia falciforme é uma das doenças hereditárias mais comuns no Brasil (11). Foi descrita pela primeira vez em 1910 por um cardiologista de Chicago, James Herrick. Trata-se de uma mutação no gene que codifica a cadeia beta da globina, localizado no cromossoma 11. Como consequência dessa mutação, ocorre a troca do ácido glutâmico pela valina na posição 6, originando a hemoglobina HbS, em substituição à hemoglobina normal, a hemoglobina A (HbA). A troca do aminoácido acarreta alterações nas propriedades da hemoglobina, tornando a HbS mais propensa à polimerização, quando desoxigenada (12).

A HbS teve origem nos continentes africano e asiático, de forma independente. Sua introdução no Brasil remete ao período da escravidão,

quando da imigração forçada de negros. Embora a incidência precisa da HbS no País ainda não esteja estabelecida, estima-se que 3 a 8% da população brasileira apresentem o traço falciforme, de acordo com a amplitude da fixação original e do fluxo da população negra em cada região do País.

Segundo dados do PTN-MG, nos primeiros seis meses do programa, de março a agosto de 1998, foram triados 128.326 recém-nascidos. A incidência para Hb SS foi de 1:2.800 e para Hb SC de 1:3.450 nascimentos (13). Dados mais recentes mostram uma incidência da doença falciforme em Minas Gerais de 1:1.400 recém-nascidos triados. Em uma dissertação de mestrado (14), a incidência do traço falciforme (Hb AS) foi de 3,3% em um total de mais de um milhão de crianças triadas.

A hemoglobina humana resulta da combinação de duas cadeias polipeptídicas α e duas β . A produção de cada tipo de cadeia é controlada por genes α e β , localizados em cromossomas distintos, de números 16 e 11, respectivamente. Os indivíduos adultos possuem perfil hemoglobínico do tipo AA ($\alpha_2\beta_2$), com pequena porcentagem de HbF ($\alpha_2\gamma_2$) e de HbA2 ($\alpha_2\delta_2$).

A transmissão do gene β^S na anemia falciforme ocorre por herança autossômica recessiva. A pessoa é considerada doente se apresenta homozigose para o gene β^S e portadora do traço falciforme, se possui um gene selvagem (β^A) e um alterado (β^S). Portanto pais heterozigotos (AS) apresentam 25% de probabilidade estatística de conceberem filhos sem doença, 50% de heterozigotos e 25% de filhos com anemia falciforme.

Por definição, a doença falciforme é termo genérico para o grupo de desordens genéticas caracterizadas pela predominância da HbS em relação a outros tipos de hemoglobina. Essas desordens incluem a hemoglobinopatia SS, S- β talassemia e outras em que a HbS está associada com outra hemoglobina variante, por exemplo, SC, SD, SE, SO^{Arab}, etc. Apesar de particularidades que as distinguem e de graus variados de gravidade, todas essas doenças possuem manifestações clínicas e hematológicas bastante semelhantes.

A mutação do gene β^S está associada a diferentes haplótipos β^S , padrões de agrupamentos polimórficos que podem ser reconhecidos por meio de enzimas de restrição ou de outras técnicas. Eles são nomeados de acordo com a região geográfica em que tiveram origem de forma predominante, dentro dos continentes africano ou asiático. Os haplótipos

mais conhecidos são República Central Africana (CAR ou Bantu), Benin, Senegal, Árabe-indiano e Camarões (15, 16). A classificação desses haplótipos baseia-se nos artigos de Orkin et al (17) e Nagel et al (16). Há evidências inequívocas da origem independente da mutação responsável pela hemoglobina S em cada uma dessas regiões (18). A estreita relação da introdução do gene β^S no continente americano com o uso de mão de obra escrava pelo processo de colonização é evidenciada pela alta prevalência de haplótipos de origem africana em nosso meio, como CAR, Benin e Senegal. No Brasil, estudos mostram a maior prevalência dos haplótipos CAR e Benin, o que coincide com a região de origem do fluxo imigratório dos escravos segundo registros históricos, predominantemente do Congo, Gana/Benin e Angola (18-22). Algumas diferenças regionais em relação à predominância de determinado haplótipo são justificadas pela origem, quantidade e fluxo de migração interna de escravos africanos no país. Em Minas Gerais, dados históricos revelam que a maior parte dos escravos desembarcaram no país em Salvador ou no Rio de Janeiro, provenientes da África Central e Benin (23, 24). Belisario et al relataram em 2010 que a prevalência dos haplótipos β^S CAR e β^S Benin em 206 crianças com hemoglobinopatia SS (412 cromossomos), em tratamento na Fundação Hemominas, foi 57.0% (235 cromossomos) e 41.5% (171 cromossomos), respectivamente. Foram encontrados somente dois cromossomos com provável origem asiática e quatro foram considerados atípicos (24).

Além da importância antropológica relacionada à origem geográfica e distribuição da doença falciforme pelo mundo, os diferentes haplótipos β^S podem modular a gravidade clínica da doença falciforme. Os mecanismos pelos quais ocorreria essa variação não são completamente esclarecidos, mas existem relatos na literatura que postulam possível relação com a o nível da hemoglobina fetal, sendo a intensidade dos sintomas inversamente proporcional a sua concentração. Os estudos indicam uma evolução clínica mais benigna, intermediária e grave em pacientes com os haplótipos Árabe-indiano, Senegal, Benin e CAR, respectivamente (16, 18, 25). No estudo de Minas Gerais, entretanto, não se observaram diferenças clínicas ou laboratoriais estatisticamente significativas entre as crianças SS com os haplótipos CAR ou Benin (18).

A hemoglobina S, em situação de hipóxia, sofre polimerização, causando alteração da forma da hemácia normal, bicôncava, para a de foice. Ocorre aumento da viscosidade do citoplasma e alterações nos componentes da membrana celular, o que reduz a deformabilidade da hemácia, fundamental para suas funções na homeostase. Essa situação pode ser revertida se houver oxigenação, antes que ocorra lesão permanente da membrana eritrocitária. As hemácias falcizadas, além de possuírem maior adesão ao endotélio, diminuem o fluxo sanguíneo da microcirculação pré-capilar, provocando a vaso-oclusão e infarto na área afetada. Conseqüentemente, sobrevêm dor, necrose e disfunções, bem como danos permanentes a tecidos e órgãos. Além disso, alguns mediadores da resposta inflamatória, presença de leucócitos aderidos à microcirculação venosa pós-capilar e descontrole do tônus vasomotor devido a distúrbios nos mediadores vasculares, como o óxido nítrico, têm sido considerados importantes fatores que contribuem para a vaso-oclusão na fisiopatologia da doença (12, 26, 27). A falcização das hemácias pode ser influenciada por alguns fatores, como grau de hidratação celular, porcentagem dos tipos de hemoglobina dentro dos eritrócitos (HbA, HbS, HbC, HbF, etc), tempo pelo qual a célula é submetida à hipóxia, e alterações térmica e do equilíbrio ácido-básico. Além disso, ocorre diminuição da sobrevivência das hemácias por hemólise extravascular, fenômeno este decorrente da captação e destruição eritrocitária pelo sistema monocítico-fagocitário, em especial, do baço (4, 12, 28, 29).

Além da anemia crônica, a doença falciforme caracteriza-se por numerosas complicações que podem afetar quase todos os órgãos e sistemas. A doença apresenta espectro clínico bastante variado, desde formas leves, com poucos sintomas, até formas mais graves, com necessidade de internações frequentes e alta morbidade, com repercussão na rotina diária e prejuízo da qualidade de vida. Essa variabilidade clínica é influenciada por fatores genéticos, níveis de hemoglobina fetal, condições socioeconômicas e qualidade da assistência prestada aos pacientes (29).

As crises vaso-oclusivas dolorosas consistem na complicação mais frequente. A primeira manifestação na infância pode ser uma dactilite aguda, conhecida como "síndrome mão-pé". Habitualmente, a crise álgica tem duração de 4 a 6 dias, sendo desencadeada por alguns fatores, como

hipóxia, infecções, febre, acidose, desidratação, exposição ao frio, trauma, exaustão física, depressão e fatores não identificáveis. Sua distinção com outros processos agudos clínicos ou cirúrgicos pode ser difícil.

A infecção bacteriana é a causa mais frequente de mortalidade entre crianças com diagnóstico de anemia falciforme (2). A suscetibilidade mais acentuada dos pacientes com HbSS pode ser justificada devido à perda gradual da função esplênica, opsonização deficiente de antígenos, formação insuficiente de anticorpos e baixa atividade bactericida dos polimorfonucleares. Os patógenos mais prevalentes são bactérias encapsuladas, sendo o pneumococo responsável por mais de 70% das infecções nas crianças.

O sequestro esplênico agudo (SEA) é a segunda causa mais comum de mortalidade dentre as crianças acometidas (2). Ele ocorre principalmente em pacientes abaixo de cinco anos de idade e sua etiologia não é completamente conhecida. Apresenta como sinais clínicos e laboratoriais principais: aumento súbito do baço, queda abrupta de hemoglobina e aumento da contagem de reticulócitos. Se não houver intervenção em tempo hábil, existe o risco de evolução para choque hipovolêmico e óbito em algumas horas (29). Rezende et al (30) avaliaram 255 crianças com hemoglobinopatia SS/Sβ⁰talassemia em coorte retrospectiva e observaram incidência de 10,2 primeiros episódios de sequestro esplênico agudo por 100 pacientes/ano e recorrência dos episódios em 57,3% das crianças. Ocorreram 19 óbitos: 36,8% devido a infecções e 26,3% após o SEA.

A síndrome torácica aguda ocorre devido a acometimento pulmonar agudo, de etiologia imprecisa, caracteristicamente multifatorial, incluindo infecção, falcização intrapulmonar e tromboembolismo de medula óssea necrótica. As manifestações clínicas são dor torácica, taquipneia, febre, dispneia e hipoxemia. Trata-se de intercorrência clínica que gera elevada morbimortalidade em todas as faixa etárias.

A crise aplásica tem como principal causa a infecção pelo eritrovírus B19. Ocorre mais frequentemente entre 4 e 10 anos de idade, e manifesta-se com quadro de palidez súbita, fraqueza, queda dos níveis de hemoglobina e de reticulócitos. Usualmente o evento é transitório, com recuperação medular em 5 a 10 dias. Deve-se lembrar que outras infecções também podem levar a hipoplasia medular, com manifestações semelhantes.

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das complicações mais graves nos pacientes com anemia falciforme (SS). Pode apresentar-se como AVC isquêmico, mais frequente nas crianças, ou hemorrágico, mais frequente em adultos. Sua fisiopatologia ainda não está bem definida. O paciente apresenta história de alterações de consciência, déficits neurológicos focais, convulsões, parestias, afasias, confusão mental ou cefaleia de grande intensidade. Faz-se necessário realizar diagnóstico diferencial com outras causas neurológicas, como meningite, intoxicação ou abscesso cerebral.

O priapismo é definido como ereção persistente e dolorosa do pênis, sendo encontrado principalmente em pacientes com mais de dez anos de idade. Clinicamente pode ser classificado como priapismo repetitivo (ereção dolorosa reversível, com detumescência em algumas horas), prolongado (podendo permanecer por dias ou semanas, sendo seguida de impotência parcial ou completa) ou persistente (frequentemente sem dor, com aumento ou endurecimento do pênis, muito associado a impotência parcial ou completa). Apresenta como possíveis etiologias: infecção, trauma, medicações com efeito no β NC, abuso de álcool, uso de maconha e atividade sexual.

A hipertensão pulmonar é outra complicação relevante, reconhecida mais recentemente em crianças com anemia falciforme. Pashankar et al (31) realizaram estudo prospectivo, com a realização de ecocardiogramas em crianças com diagnóstico de hemoglobinopatia SS/S β^0 e idade superior a seis anos. Os autores observaram que 20% e 10%, dentre os 62 pacientes, apresentavam elevação leve e moderada, respectivamente, da velocidade de regurgitação na válvula tricúspide, sinal indireto de possível hipertensão pulmonar.

A hemólise crônica predispõe à formação de cálculos biliares, que podem ser sintomáticos ou assintomáticos. O paciente pode apresentar dor no quadrante superior direito do abdome, náuseas, vômitos e piora da icterícia. O diagnóstico diferencial deve ser feito com crise vaso-oclusiva dolorosa, colangite, vaso-oclusão intra-hepática, hepatite medicamentosa, hepatite virótica ou pancreatite aguda.

Pode haver, ainda, disfunção crônica de órgãos, nos olhos (retinite), rins (hipertrofia, tubulopatias, glomerulopatias), pulmões (hipertensão pulmonar), coração (insuficiência cardíaca), pele (úlceras crônicas de pele) e ossos (osteonecrose). Powars et al (32), em estudo de coorte na Califórnia

(EUA) iniciado em 1959, observaram que aproximadamente 50% dos pacientes apresentavam, até a quinta década de vida, um ou mais sinais de falência crônica de órgãos, secundária à vasculopatia da anemia falciforme.

2.2. Hemoglobinopatia SC

2.2.1. Aspectos históricos

A hemoglobina C decorre de uma mutação pontual no sexto códon do gene da cadeia beta globina, mesmo códon atingido pela mutação β^S . No caso da mutação β^C , (**GAG>AAG**), a consequência na transcrição é a substituição do ácido glutâmico por lisina. Os pacientes com hemoglobinopatia SC herdam um gene β^S de um dos pais e o gene β^C de outro, resultando em concentrações aproximadamente iguais de hemoglobina S e C. A hemoglobina A (HbA) está ausente e a hemoglobina fetal (HbF), excetuando-se o recém-nascido a as crianças até cerca de seis meses, está em concentração normal ou levemente aumentada (33, 34)

A hemoglobinopatia SC é a segunda variante mais comum da doença falciforme no mundo, logo depois da anemia SS. Sua incidência em afroamericanos é de 1:833 a 1:3.300 nascidos vivos (35-37). Os dados do programa de triagem neonatal de Quebec, no Canadá, identificaram 35 crianças entre os 9.619 afrodescendentes nascidos (1:250) (38). O programa de triagem neonatal do arquipélago francês de Guadalupe constatou, entre 1984 e 2010, incidência de 1:771 entre os 178.428 nascidos vivos (39). No Brasil, existe grande variação regional em relação à sua prevalência. Estimou-se uma frequência de Hb SC em cerca de 1:166 em negros do Sudeste brasileiro (40) e 1:62.500 no sul do país (41), respectivamente. A análise da triagem no Rio de Janeiro, entre agosto de 2000 e novembro de 2001, revelou incidência de 1:5.514 (42). Em Minas Gerais, a incidência da Hb SC segundo dados do Programa de Triagem Neonatal para Doença Falciforme, de março a agosto de 1998, foi de 1:3.450 nascimentos (13). Um estudo mais recente envolvendo crianças triadas no mesmo programa estadual, entre 1º de março de 1998 e 28 de fevereiro de 2005, revelou frequência de 1:3.300 (2).

A doença da hemoglobina SC foi descrita pela primeira vez em 1950 por Itano e Neel. Os autores avaliaram duas famílias que apresentavam crianças com histórico hematológico compatível com anemia falciforme, mas com menor gravidade clínica. Contudo, o estudo familiar mostrava que somente um dos progenitores apresentava hemácias que podiam ser induzidas à falcização, diferentemente dos casos prévios conhecidos de anemia falciforme em que o teste era positivo em ambos, refletindo serem portadores de traço falciforme. Assim, observou-se que se tratava de um componente proteico até então desconhecido, com mobilidade eletroforética diferente da hemoglobina normal (Hb A) e da hemoglobina S, sendo denominada, então, hemoglobina C (43).

A HbC teve sua origem provável em grupos étnicos africanos, na região de Burkina-Faso e apresenta frequência mais elevada na região centro-oeste da África (44). A análise dos haplótipos e polimorfismos associados ao alelo do gene alterado da beta globina sugere origem unicêntrica da doença (45-48). Alguns estudos levantam a hipótese de a hemoglobina C ter surgido como seleção natural de um mecanismo de proteção contra a malária, pela interferência da hemoglobina C com a destruição celular de hemácias parasitadas, reduzindo a liberação de merozoítos (3, 49). Modiano et al realizaram estudo tipo caso-controle na região africana de Burkina-Faso e observaram redução de 29% e 93% no risco de desenvolvimento de malária em indivíduos heterozigotos e homozigotos para hemoglobina C, respectivamente (50).

2.2.2. Fisiopatologia

O processo que levaria às complicações clínicas em indivíduos com hemoglobinopatia SC não é ainda completamente compreendido. Existe um aparente paradoxo quando se observa que, em co-herança com a hemoglobina A, as hemoglobinas S e C não provocam sintomas, mas quando combinadas podem levar a quadro clínico de hemólise e vaso-oclusão, em intensidade variável. Estudos revelam que hemácias que contêm apenas cristais de Hb C não são induzidas a vaso-oclusão, uma vez que esses cristais dissolvem-se rapidamente após desoxigenação e não provocam dano vascular. A Hb S por outro lado, ao sofrer o mesmo processo, muda a

conformação da hemácia e obstrui a microcirculação (3, 51). Contudo, os pacientes com hemoglobinopatia SC apresentam concentrações de Hb S mais baixas do que a forma homozigótica SS, de forma semelhante à concentração nos indivíduos com traço falciforme (Hb AS). Portanto, surge o questionamento sobre qual seria a razão pela qual os pacientes com Hb AS ou Hb AC e aqueles com Hb SC apresentam evoluções clínica e laboratorial tão diferentes?

A tendência para cristalização e desidratação causada pela perda de potássio e água, induzida pela HbC, parecem constituir a base da fisiopatologia da doença SC. Hemácias que contêm HbC apresentam efluxo aumentado de potássio, mediado por elevado cotransporte ativo de KCl, o que leva a uma desidratação celular, aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média e aumento da polimerização da hemoglobina S, amplificando seu efeito de vaso-oclusão e predisposição a hemólise e liberação de mediadores vasoativos, mesmo estando em concentrações intracelulares menos elevadas do que no paciente homozigoto (3, 5, 7, 33, 52-60). Contudo, o nível de hemólise parece ser menos intensa na hemoglobinopatia SC, sendo a sobrevivência das hemácias cerca de duas vezes maior do que na hemoglobinopatia SS, de 29 contra 15 dias, respectivamente (61). Essa observação parece indicar que a fisiopatologia da hemoglobinopatia SC possa ter relação mais relevante com hiperviscosidade e desidratação celular do que com a vasculopatia relacionada a hemólise, característica da doença SS (5, 6).

2.2.3. Características clínicas e laboratoriais

A hemólise na doença da Hb SC é menos ativa, ocasionando, em geral, morbidade e mortalidade menos intensas do que em pacientes com homozigose para a HbS (1-3). Porém, vários dos efeitos da hemoglobinopatia SC são semelhantes aos da anemia falciforme. Os sinais e sintomas foram descritos como um conjunto de características clínicas pela primeira vez em 1951 por Kaplan et al (62) e, a partir de então, outras publicações descreveram a experiência dos autores com casos semelhantes (7, 9).

As hemácias falciformes estão presentes, como consequência da baixa tensão de oxigênio, e ocorre vaso-oclusão, com dano tecidual

isquêmico em potencialmente todos os órgãos do corpo (7). Assim, todas os eventos clínicos encontrados na doença da hemoglobina SS podem também ocorrer em pacientes com hemoglobinopatia SC (63). Contudo, muitas dessas complicações são observadas com menor frequência e em períodos mais tardios da evolução clínica (3). O grupo cooperativo norte-americano observou coorte de 284 pacientes com hemoglobinopatia SC, com idades variáveis ao início da observação; 81% dos pacientes possuíam idade inferior a 20 anos. Os autores não observaram episódios de “síndrome mão-pé” nos lactentes ou acidente vascular cerebral. Foram relatados raros episódios de osteonecrose e infarto ósseo durante a primeira década de vida, havendo aumento progressivo de retinopatia e osteonecrose ao final da segunda década de vida (8). Lionnet et al publicaram os resultados de estudo observacional francês, envolvendo 179 pacientes adultos com hemoglobinopatia SC e verificaram que 90,5% da população estudada apresentou, pelo menos, uma complicação aguda ou crônica relacionada à doença (5).

Crises dolorosas ocorrem com cerca da metade da frequência do que se observa na anemia falciforme (3, 25, 64). Tuttle e Kock avaliaram 18 crianças com idade média de 9 anos e encontraram presença de crises em 78% dos casos (10). Entre as pesquisas brasileiras, Gomes e Ramalho observaram 54% de crises em 35 adultos atendidos na Universidade de Campinas (UNICAMP), em São Paulo (40). Estudo da Unifesp revelou frequência de 27,6% em 29 adultos (65). A coorte do grupo cooperativo americano revelou que 55,3% dos 284 avaliados apresentaram crises dolorosas (8). O mesmo grupo observou que o tempo para o primeiro relato de dor na infância foi influenciado pelo genótipo da doença, sendo significativamente mais precoce na doença SS (mediana de 13,9 meses) do que na doença SC (mediana de 43,6 meses) (66). Outro estudo americano mostrou frequência de 65% em 106 adultos avaliados (67). Lionnet et al relataram prevalência de 36%, constituindo-se na complicação aguda mais comum naquela população, seguida de síndrome torácica aguda e priapismo, ambos com 20% dos casos (5).

O crescimento em pacientes com doença da Hb SC tende a ser normal ou próximo ao normal (3, 68). Lionnet et al encontraram índice de massa corporal aumentado ($\geq 25 \text{ Kg/m}^2$) em 33% dos pacientes adultos

avaliados, com peso normal e abaixo da faixa de normalidade em 63% e 4%, respectivamente (5). Koumbourlis et al observaram que não havia diferença estatisticamente significativa quando se comparavam altura e peso em pacientes com hemoglobinopatia SC e anemia falciforme. Entretanto havia diferença estatisticamente significativa no índice de massa corporal entre os dois grupos, mas apenas no período inicial de observação (69). O grupo cooperativo norte-americano identificou atraso significativo de crescimento nas crianças com hemoglobinopatia SC, porém menos intenso do que naquelas com doença SS (70). Estudo em Minas Gerais comparou índices nutricionais (desvio padrão estandardizado - escore z) e não verificou presença de distúrbio nutricional significativo em 27 crianças com hemoglobinopatia SC (71). Os autores afirmaram que seriam necessárias amostras maiores, acompanhadas por longo período, para tentar esclarecer as questões que envolvem o crescimento das crianças com hemoglobinopatia SC.

Todas as complicações referentes aos órgãos-alvo encontradas em pacientes com anemia falciforme podem ocorrer em crianças com doença da Hb SC. Muitas, mas não todas essas complicações encontradas, aparecem menos frequentemente em indivíduos com Hb SC, quando comparadas com a anemia falciforme (3). Lemonne et al encontraram prevalência de 60% de retinopatia, 40% de microalbuminúria, 31% de osteonecrose e 20% de disfunção otológica em nove pacientes com idade média de 38 anos (\pm 13 anos) (54)

Algumas complicações como a persistência do baço palpável na idade adulta, hipertensão pulmonar, necrose da papila renal, perda auditiva, síndrome torácica aguda, acidente vascular encefálico podem estar presentes em pacientes com doença da Hb SC (25, 40, 69, 72-74). Cerca de 50% dos adultos têm esplenomegalia e 6% das crianças com hemoglobinopatia SC têm complicação esplênica, como crises de sequestro, dor, infarto e hemorragia no baço (7, 37, 72, 75). Da Silva Filho et al avaliaram 17 crianças no Rio de Janeiro e observaram dois episódios de sequestro esplênico agudo (76). O estudo francês revelou presença de infarto esplênico em três dentre os 179 pacientes e presença de esplenomegalia em 29%. Somente um paciente avaliado foi submetido a esplenectomia (5). A função esplênica é preservada por mais tempo do que nas crianças com

hemoglobinopatia SS e o risco de bacteremia parece ser menor nas crianças com hemoglobinopatia SC, porém maior do que na população normal (3, 77, 78). Por essa razão, todas as crianças devem ser vacinadas, principalmente contra agentes encapsulados, como *Streptococcus pneumoniae*. Alguns autores sugerem que o uso de penicilina profilática poderia ser desnecessário nesses casos, mas revisões sistemáticas e protocolos mais recentes concluíram que ainda não há dados na literatura suficientes para embasar tal conduta (79-81).

A função renal apresenta piora progressiva ao longo dos anos, mas insuficiência renal crônica ocorre com cerca de metade da frequência dos pacientes com hemoglobinopatia SS, com início mais tardio (3, 25). A hiperfiltração renal em pacientes com anemia falciforme manifesta-se clinicamente com microalbuminúria (MA) e proteinúria subsequente. Acredita-se que, como na diabetes mellitus, MA preceda o desenvolvimento de proteinúria na nefropatia falciforme e seja útil como marcador de lesão glomerular pré-clínica (82, 83). Existem poucos estudos envolvendo pacientes com hemoglobinopatia SC. Lionnet et al descreveram prevalência de nefropatia falciforme em 13% dos 179 pacientes adultos, sendo que 7% apresentaram albuminúria e 2% insuficiência renal crônica (5). O estudo de coorte da Jamaica é um dos mais importantes no mundo em relação ao acompanhamento, descrição da história natural e evolução clínica dos pacientes com anemia falciforme. Iniciado em junho de 1973, em associação ao programa de triagem neonatal, o programa detectou a presença de anemia falciforme em 314 crianças de um total de cem mil nascimentos até 1981. Esta coorte avaliou 37 adultos com idade média de 28,9 anos e revelou presença de microalbuminúria em 10,8% dos casos (84). Paula et al avaliaram 4 crianças na Bahia e foi detectado clareamento de creatinina dentro dos valores de referência e tendência de menor taxa de filtração glomerular, em comparação com crianças com Hb SS (85). Estudo em Gana avaliou 78 crianças com menos de 12 anos de idade e encontrou proteinúria qualitativa em 9% deles (86).

A hipertensão pulmonar não aparece na literatura atual como complicação relevante nas crianças com hemoglobinopatia SC, apesar de serem poucos os dados disponíveis (3). Os autores do estudo francês não observaram elevação da velocidade de regurgitação na válvula tricúspide,

sinal indireto de possível hipertensão pulmonar, nos 179 pacientes estudados (5). Estudo norte- americano avaliou 27 adultos, com idade média de 37,3 anos e constatou hipertensão pulmonar em 28% dos casos (87). Os dados de Taylor et al mostraram que 18,6% dos 43 adultos tinham hipertensão pulmonar e a curva de sobrevida indicou que ela consiste em fator de risco significativo para mortalidade naquela população (88). Estudo inglês avaliou 34 crianças com genótipo SS e 16 com SC e encontrou sinais ecocardiográficos de hipertensão pulmonar em 15 (44%) e uma criança (6%), respectivamente. (89)

A incidência de acidente vascular cerebral isquêmico é cerca de 4 vezes menor do que nos pacientes com hemoglobinopatia SS, mas 50 a 100 vezes maior do que na população pediátrica em geral, com taxas entre 0,8 e 3% (25, 90). Já foi demonstrado que o uso do doppler transcraniano (DTC) na avaliação dos vasos do polígono de Willis é eficaz para selecionar pacientes em alto risco de acidente vascular cerebral em crianças SS. Contudo, não existem estudos e dados suficientes a respeito dos valores de referência para os pacientes com hemoglobinopatia SC, sendo utilizada a mesma classificação dos pacientes com hemoglobinopatia SS: velocidades de fluxo sanguíneo com valores até 170 centímetros por segundo (cm/s) seriam consideradas normais, indicando baixo risco de AVC; velocidades intermediárias, entre 170 e 200 cm/s, indicariam risco intermediário e velocidades acima de 200 cm/s, indicativas de alto risco de AVC (80, 91, 92). Deane et al avaliaram 73 crianças com idade média de 8,1 anos, sendo realizado DTC em 48 delas, com velocidade média-máxima (VMMax) de 94 cm/s e valor máximo de 128 cm/s. Os autores observaram correlação positiva da VMMax com a contagem de plaquetas e sugerem que poderia haver associação na fisiopatologia do AVC, apesar da carência de estudos para confirmar ou não esses resultados (93). O mesmo estudo descreveu um paciente com hemoglobinopatia SC que teve diagnóstico de AVC isquêmico aos 5 anos de idade, considerado secundário à doença de base após descartadas outras possibilidades. A VMMax era de 146 cm/s na artéria cerebral média direita e 126 cm/s na artéria cerebral média esquerda (93). Um caso de AVC em criança de 7 anos foi também descrito por Powars et al em 1978 (94); uma criança nigeriana de 6 anos por Lagunju e Brown em 2012 (95) e três casos pediátricos por Ohene-Frempong no estudo

cooperativo norte-americano (90). Verlhac et al, que avaliaram 12 crianças com hemoglobinopatia SC em conjunto com duas com hemoglobinopatia $S\beta^+$ talassemia, observaram VMMax de 77 cm/s, sem diferença significativa em relação à dos pacientes controle (96). Estudo brasileiro recente realizado na Universidade de São Paulo avaliou o resultado do DTC em 19 crianças com idade média de 7,5 anos. Os dados também foram descritos em conjunto com crianças com diagnóstico de hemoglobinopatia $S\beta^+$ talassemia (n=4). Os autores encontraram VMMax de 103 ± 19 cm/s, com variação de 83 a 145 cm/s, sendo considerados como baixo risco para AVC, segundo os critérios propostos para hemoglobinopatia SS. Além disso, foi observada correlação positiva entre a VMMax e a contagem de reticulócitos e correlação negativa entre a VMMax e a concentração de hemoglobina fetal, resultado até então inédito na literatura médica (97). Na população adulta estudada pelo grupo francês não houve nenhum episódio de acidente vascular cerebral durante a infância (5). Quinn et al descreveram dados de grupo cooperativo norte-americano (Dallas) com seguimento de 145 crianças com idade até 18 anos e também não identificaram episódios de acidente vascular cerebral (98). Não há dados atuais que apresentem com clareza indicação e valores de estratificação de risco de VMMax para o rastreamento de AVC em pacientes com outras hemoglobinopatias. Esse tema torna-se relevante para investigações futuras, uma vez que infartos cerebrais silenciosos já foram descritos em estudos prévios com crianças portadoras de hemoglobinopatia SC, apresentando incidência de 5,8% (7/120) (90) e 13,5% (13/96) (99). Não existe tratamento bem estabelecido nesses casos e o risco de recorrência, bem como seu impacto nessa população, são desconhecidos. O protocolo do grupo brasileiro de Hematologia Pediátrica publicado em 2011 recomenda a realização de DTC em pacientes com doença falciforme, independente do genótipo da doença, mas com prioridade para aqueles com Hb SS e Hb $S\beta^0$ -talassemia (100). Protocolos mais recentes não orientam a realização de DTC em crianças e adolescentes com hemoglobinopatia SC (80).

Osteonecrose é comum nesses pacientes, com incidência levemente inferior em relação aos pacientes com hemoglobinopatia SS. Ela pode ocorrer onde existe oclusão dos capilares na região metafisária do osso, próximo a articulação, em região na qual o nível de hipóxia é mais acentuada e a circulação colateral não é eficaz. A manifestação mais comum é a

necrose avascular de cabeça de fêmur, com incidência de 1,9 por 100 pacientes/ano (101) e prevalência de 8,8 a 15% (5, 8, 25, 65, 80, 101). O envolvimento de outras articulações é menos comum (80). Akinyoola et al não encontraram diferença significativa na presença de necrose avascular de cabeça de fêmur entre pacientes com hemoglobinopatia SS e SC. Entre os 76 pacientes com doença SC, os autores observaram lesão em 13, sendo três adolescentes, com idade entre 11 e 20 anos (102).

A retinopatia proliferativa parece ser mais prevalente na doença da Hb SC do que na hemoglobinopatia SS, sendo encontrada em cerca de 33% dos pacientes adultos (3, 5, 103-107). Descrita pela primeira vez em 1966 por Welch e Golberg (108), a retinopatia é caracterizada por vasculopatia proliferativa, com áreas de infarto e hemorragia, que podem culminar com perda visual. Seu exato mecanismo fisiopatológico não está completamente esclarecido, mas parece relacionar-se com a interação dos efeitos do aumento do hematócrito, densidade celular e viscosidade sanguínea (3, 5, 56). A prevalência mais elevada nos pacientes com hemoglobinopatia SC poderia ser explicada pela evolução geral mais benigna da doença. Acredita-se que a circulação na retina seja preservada por um período mais longo, o que permitiria o desenvolvimento tardio de lesões proliferativas. Por outro lado, nos pacientes com hemoglobinopatia SS, os vasos retinianos periféricos seriam ocluídos precocemente, impedindo neoformações vasculares proliferativas, posteriormente (3, 104). A retinopatia ocorre geralmente na idade entre 15 e 30 anos de idade nos pacientes com doença da Hb SC (5, 103, 105, 109), mas oclusões de arteríolas periféricas já foram descritas em crianças de 6 anos de idade (110). A classificação da retinopatia foi proposta por Goldberg em 1971 e é composta por estádios que variam de I (oclusões arteriolas periféricas) a V (descolamento de retina), sendo considerada retinopatia não proliferativa os estádios I e II e retinopatia proliferativa os estádios III, IV e V (111). A coorte do grupo cooperativo norte-americano registrou a retinopatia como a causa mais frequente dentre as complicações crônicas relacionada a doença, atingindo 23% dos pacientes, com idade mediana de 28 anos. (8). Condon e Serjeant encontraram resultado semelhante na coorte jamaicana, com prevalência de 33% entre 70 adultos com hemoglobinopatia SC (109). Outra publicação dos mesmos autores mostrou prevalência de 11% entre 54 crianças com idade entre 2 e 15 anos,

sendo um paciente (1,8%) entre 2 e 8 anos de idade e dois pacientes (3,6%) entre 9 e 12 anos. (110). O mesmo estudo jamaicano publicou artigo posterior, com avaliação de crianças com idade entre 5 e 7,5 anos e não encontrou casos de retinopatia proliferativa (112). Rosemberg e Hutcheson avaliaram 55 crianças com idade entre 6 e 18 anos e observaram retinopatia proliferativa em 16,4%, sendo o paciente mais jovem diagnosticado aos 11 anos, com hemorragia vítrea (113). Lionnet et al encontraram prevalência de 71% entre os 179 adultos avaliados (5). Estudo brasileiro realizada na Bahia avaliou 15 crianças com idade média de 13,3 anos. Os autores não encontraram sintomas de alterações visuais e nenhum caso de retinopatia proliferativa (estádios III a V), mas observaram retinopatia não proliferativa em 60% dos casos (114). Não existem fatores de risco bem definidos para a ocorrência de retinopatia, mas alguns autores presumem que ela possa estar relacionada com maior concentração de hemoglobina total e menor concentração de hemoglobina fetal (8, 109, 115-117). Leveziel et al avaliaram 313 adultos com idade mediana de 33 anos e encontraram retinopatia proliferativa em 52,7% dos casos. Os autores observaram associação com idade mais avançada, surdez ou zumbido no ouvido, e menor concentração de hemoglobina fetal (117).

Distúrbio otológico neurosensorial foi constatado em 29% dos pacientes no grupo francês, sendo a segunda complicação crônica mais comum encontrada (5). Existem poucos relatos na literatura sobre o tema, mas acredita-se que possa haver relação de deterioração do ouvido interno com o aumento da viscosidade do sangue e prejuízo no transporte de oxigênio pelas artérias terminais da cóclea (5, 118-120).

A anemia na doença da Hb SC é leve ou inexistente. O volume corpuscular médio (VCM) pode estar diminuído e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) pode estar aumentada, devida à desidratação celular (59, 60, 121). Valores médios de hemoglobina descritos variam entre 10,5 e 11,5 g/dL (5, 40, 60). O estudo francês revelou valores de hemoglobina abaixo de 10 g/dL em apenas 10% dos casos (5). Os reticulócitos estão levemente aumentados em seu número absoluto e o esfregaço sanguíneo pode apresentar até 50% de hemácias em alvo. A contagem de leucócitos e a diferencial de leucócitos estão normais (122).

A concentração de hemoglobina fetal é usualmente mais baixa na doença SC, em relação à hemoglobinopatia SS, provavelmente devido a menor intensidade da hemólise e conseqüente menor resposta de atividade da medula óssea (8, 45, 123). Contudo, indivíduos com aumento constitucional de hemoglobina fetal podem ser beneficiados pelo seu efeito potencial de inibição da cristalização da hemoglobina C intracelular (3, 57).

O efeito da co-herança de alfa talassemia em pacientes com hemoglobinopatia SC ainda não é muito claro, devido ao pequeno número de estudos sobre o assunto. A frequência dessa co-herança varia na literatura entre 20 e 35% (5, 8, 65, 124-126). Steinberg et al não observaram associação de co-herança de alfa talassemia com a retinopatia, necrose avascular ou crises vaso oclusivas dolorosas em 14 pacientes com hemoglobinopatia SC (127). O estudo de Ballas sugere que poderia haver associação com esplenomegalia, necrose avascular de cabeça de fêmur e síndrome torácica aguda, apesar do pequeno número de pacientes avaliados (n=4) (128). Outros estudos sugerem que a presença de alfa talassemia poderia limitar o número de células com grande concentração intracelular de hemoglobina, com conseqüente atenuação do quadro clínico (3, 8, 129-132). Os dados de Powars et al sugerem que pacientes com alfa talassemia associada apresentaram evolução clínica mais favorável do que aqueles sem a co-herança, havendo menor risco de retinopatia, colelitíase, falência de órgãos, osteonecrose e crises vaso-oclusivas dolorosas (8).

A mortalidade dos pacientes com hemoglobinopatia SC é baixa, com taxas inferiores à metade daqueles com hemoglobinopatia SS (3, 25). Tal fato provavelmente relaciona-se com as características mais indolentes da doença SC, associado a menor prevalência de complicações que acarretam maior mortalidade, como doença cerebral vascular, doença renal crônica e hipertensão pulmonar (5). Leikin et al observaram sobrevida de 95% até 20 anos de idade em estudo do grupo cooperativo norte americano publicado em 1989 (133). Platt et al descreveram sobrevida média de 60 anos para os homens e 68 anos para as mulheres com hemoglobinopatia SC em 844 pacientes desse mesmo grupo, com mortalidade de 3%, comparado a 45 anos para os pacientes com hemoglobinopatia SS (134). O grupo cooperativo norte-americano relatou taxa de mortalidade de 9% dentre os 284 pacientes da coorte, tendo como causas principais complicações crônicas relacionadas

à doença de base, como doença renal crônica, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca congestiva (8). Quinn et al publicaram resultados do programa de triagem neonatal da Universidade do Texas e observaram dois óbitos entre as 145 crianças com até 18 anos de idade, em acompanhamento clínico desde novembro de 1983 (1,4%). Os dois eventos ocorreram por causas não relacionadas à doença, sendo um após acidente automobilístico aos 1,9 anos e outro após diagnóstico de linfoma de células T aos 12 anos (98). O grupo francês descreveu dois óbitos na população adulta estudada, com mortalidade de 1,1% (5). Os dados do programa de triagem neonatal de Minas Gerais mostraram 34 óbitos de crianças com hemoglobinopatia SC entre as 1.014 triadas, no período entre março de 1998 e fevereiro de 2012, com taxa de 3,4% (135).

2.2.4. Tratamento

Não existe tratamento específico para a doença da Hb SC. A hidratação abundante parece ser a melhor abordagem terapêutica para atenuar o quadro clínico (3).

A flebotomia periódica é descrita como forma de reduzir a hiperviscosidade e evitar eventos agudos recorrentes em pacientes com hemoglobinopatia SC, sendo recomendada por alguns autores quando existe elevação de hemoglobina e/ou hematócrito acima de 11 g/dL ou 32%, respectivamente (5, 54, 136). Contudo, nem todo indivíduo que preencha esses critérios laboratoriais seria beneficiado com o tratamento. Como a fisiopatologia da doença está relacionada com o aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média dentro da hemácia, secundária a desidratação celular, um paciente com hematócrito acima de 32% pode apresentar “hiperviscosidade teórica”, enquanto outro pode apresentar “hiperviscosidade real” com hematócrito dentro dos valores de referência (54). A conduta mais ponderada talvez seja a indicação da flebotomia em casos de pacientes muito sintomáticos e a realização da avaliação laboratorial de viscosidade sanguínea, não disponível rotineiramente na prática clínica (137).

A hidroxiureia e transfusões de concentrado de hemácias também podem ser usadas, mas indicações precisas são mais controversas do que na forma homozigótica da hemoglobina S.

O uso de transfusão de concentrado de hemácias tem indicações semelhantes às dos pacientes com hemoglobinopatia SS (3). Estudo multicêntrico norte-americano avaliou 92 procedimentos cirúrgicos em pacientes com hemoglobinopatia SC. Os autores observaram que não houve diferença significativa na taxa de complicações gerais entre aqueles que receberam, ou não, transfusão pré-operatória. Contudo, complicações relacionadas à doença falciforme foram mais comuns após procedimentos intrabdominais e os pacientes que não receberam transfusão apresentaram 35% de eventos agudos pós-operatórios (síndrome torácica aguda e crises vaso oclusivas dolorosas, enquanto no outro grupo não houve complicações ($P=0.009$) (138). Estudos posteriores apresentaram resultados semelhantes e a recomendação atual é a realização de transfusão de concentrado de hemácias fenotipadas e deleucocitadas como preparo pré-operatório de cirurgias com risco moderado e alto, como procedimentos abdominais e aquelas que envolvam microcirculação e órgãos nobres, como neurocirurgias, cardiovasculares, abdominais e oftalmológicas (80, 139). Por outro lado, a transfusão simples de hemocomponentes é terapia que leva a complicações potencialmente graves, mesmo com o rigor da triagem clínica e laboratorial empregada nos grandes centros. Consequências importantes como risco de aloimunização eritrocitária, imunomodulação, acúmulo tecidual de ferro, dificuldade progressiva de acesso a veias calibrosas e doenças infecciosas transmissíveis pelo sangue levam os profissionais de saúde a avaliar com muita cautela os riscos e benefícios de um programa de transfusão a longo prazo (140). Murao e Viana (2005) estudaram a frequência da aloimunização eritrocitária em pacientes com doença falciforme acompanhados no Hemocentro de Belo Horizonte. Constatou-se que pacientes SC desenvolveram aloimunização em frequência relativa mais elevada do que pacientes com hemoglobinopatia SS (14 e 8,1%, respectivamente; $P = 0.048$) (141). Outras limitações que devem ser levadas em consideração em nosso meio são o custo de programa transfusional e a baixa disponibilidade relativa de hemocomponentes, realidade de diversos países em desenvolvimento na atualidade.

O transplante alogênico de medula óssea constitui-se, atualmente, no único tratamento curativo para pacientes com anemia falciforme. Sua indicação atual é reservada a formas graves da doença, que apresentam morbidade significativa devido a lesões de diversos órgãos. Os resultados em crianças com hemoglobinopatia SS são indubitavelmente bons (142-146). Os resultados sobre transplante de medula em crianças com hemoglobinopatia SC são muito restritos e geralmente ficam incluídos nos resultados globais de doença falciforme. No Brasil, foi publicado em 2010 (147) o consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas, sendo indicada realização do transplante alogênico aparentado em crianças até 16 anos, com um dos seguintes critérios:

- Crises vaso-oclusivas recorrentes e/ou priapismo (pelo menos dois episódios no ano precedente ou no ano anterior ao início de um programa de transfusão crônica) após uso de hidroxiureia por seis meses sem resposta ou contraindicação ao uso da mesma.

- Presença de vasculopatia cerebral demonstrada por ressonância nuclear magnética (RNM) e requerendo programa de transfusão crônica.

- Presença de qualquer anormalidade à ressonância magnética angiográfica (RMA)/RNM (estenoses, oclusões).

- Doença pulmonar falciforme graus I e II

- Nefropatia falciforme (taxa de filtração glomerular entre 30% e 50% da esperada)

- Doppler transcraniano anormal

- Hipertensão pulmonar

- Infarto cerebral silencioso

- Recaída da anemia falciforme após um primeiro TCTH

- S beta talassemia dependente de transfusões.

Recentemente, o Ministério da Saúde publicou em 21 de dezembro de 2015 portaria incluindo na tabela de procedimentos do SUS a compatibilidade dos códigos internacionais de doença referentes aos transtornos falciformes homocigóticos e heterocigóticos com os procedimentos de transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas aparentado. O documento está disponível no endereço eletrônico:

ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssesp/bibliote/informe_eletronico/2015/iels.dez.15/iels237/U_PT-MS-SAS-1321_211215.pdf.

O uso de hidroxiureia, com o objetivo de prevenir ou reverter lesões crônicas de diversos órgãos provocadas pela anemia falciforme, tem sido discutido na literatura nos últimos 20 anos. Trata-se de agente quimioterápico inibidor da ribonucleotídeo-redutase, que atua especificamente na fase S da divisão celular. A literatura médica tem avalizado seu uso na anemia falciforme pelo aumento da concentração da hemoglobina fetal, produção *in vivo* de óxido nítrico, inibição da adesão de hemácias falciformes ao endotélio vascular, redução na expressão de moléculas celulares de adesão vascular (VCAM-1) e redução da leucometria (12, 26, 27, 148, 149).

Thornburg et al descreveram o acompanhamento de 96 crianças com anemia falciforme (Hb SS) que iniciaram o uso da medicação entre 9 e 18 meses de vida em estudo fase 3, multicêntrico, randomizado, duplo cego, controlado por grupo de 97 crianças que fizeram uso de placebo, realizado entre outubro de 2003 e setembro de 2009, para prevenção de crises vaso-oclusivas de repetição (dor e síndrome torácica aguda). Os resultados mostraram que o uso de hidroxiureia teve associação estatisticamente significativa com baixas taxas de crises dolorosas (episódios iniciais e recorrentes), dactilite aguda, síndrome torácica aguda e internações hospitalares. Não houve associação com risco aumentado de bacteremia, infecções graves ou diminuição do crescimento (150, 151). Não foi constatada, durante o período de dois anos, associação significativa com estabilização da função glomerular, como hipotetizado inicialmente pelo ensaio clínico (152).

O efeito potencial da hidroxiureia sobre a hemoglobinopatia SC é distinto daquele esperado na hemoglobinopatia SS e pode não estar relacionado com o aumento de hemoglobina fetal. Apesar da indesejável elevação esperada do hematócrito, com consequente aumento da viscosidade sanguínea, o uso de doses baixas de hidroxiureia está relacionado com aumento do volume eritrocitário médio, diminuição da concentração de reticulócitos e redução dos níveis de hemólise, efeitos benéficos nessa variante da doença falciforme (3). Estudo americano avaliou de forma retrospectiva 15 crianças com diagnóstico de hemoglobinopatia SC com idade entre 3 e 14 anos e relatou redução significativa nos episódios de

síndrome torácica aguda e de hospitalização por crises vaso-oclusivas dolorosas com o uso de hidroxiureia. O tempo mediano de seguimento clínico foi de 4,8 anos e não houve efeitos adversos significativos (153). Miller et al acompanharam o tratamento de seis crianças com idades entre 6,7 e 17,5 anos durante tempo mediano de 27 meses (12 a 41 meses). Os autores observaram que todas as crianças evoluíram com número mais baixo e menor intensidade dos eventos vaso-oclusivos, com redução significativa na taxa de hospitalização e 50% deles apresentaram toxicidade hematológica transitória, sem outras reações adversas relevantes (154). O mesmo grupo publicou artigo em 2004 envolvendo sete crianças, com resultado muito semelhante (155). Wang et al avaliaram 44 pacientes com idade média de 13,6 anos com hemoglobinopatia SC em um estudo fase II sobre o efeito da hidroxiureia em parâmetros laboratoriais. O estudo foi encerrado devido ao pequeno número de pacientes recrutados e perspectiva de um longo período para recrutar o número de pacientes necessários (156).

Recentemente foi publicado um estudo tipo coorte retrospectiva, envolvendo 133 crianças com hemoglobinopatia SC tratados com hidroxiureia, em 18 centros de referência norte-americanos. A indicação mais frequente para seu início foi em decorrência de crises dolorosas de repetição, seguida de síndrome torácica aguda. O estudo mostrou uma redução global de 38% dos eventos dolorosos após 12 meses de uso da medicação. O tratamento com hidroxiureia foi associado a estabilidade na concentração de hemoglobina, aumento da concentração de hemoglobina fetal e volume corpuscular médio das hemácias, além de redução da contagem de leucócitos e reticulócitos, quando comparados aos valores basais de cada paciente (157).

No Brasil, o Ministério da Saúde aprovou em 6 de novembro de 2002 o uso de hidroxiureia para pacientes com doença falciforme e publicou em 2009 portaria aprovando o protocolo de diretrizes clínicas e terapêuticas na doença falciforme (158). A versão atualizada em 2010, disponível no endereço eletrônico http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2010/prt0055_29_01_2010.html, recomenda o uso de hidroxiureia em crianças com hemoglobinopatia SC, com as mesmas indicações clínicas e laboratoriais relacionadas para pacientes com hemoglobinopatia SS, que incluem:

- Três ou mais episódios álgicos agudos com necessidade de atendimento médico hospitalar ou comprovada incapacidade produtiva (escola/trabalho);

- Mais de um evento de síndrome torácica aguda (STA), definida como a presença de infiltrado pulmonar recente, não atelectásico, envolvendo pelo menos um segmento pulmonar completo, acompanhado de dor torácica, temperatura superior a 38,5 °C, taquipneia, sibilos, ou tosse em paciente com doença falciforme; ou um episódio de STA que necessitou de O₂ ou transfusão sanguínea ou um episódio de STA que necessitou de internação em unidade de tratamento intensivo;

- Hipoxemia crônica: saturação de oxigênio persistentemente abaixo de 94%, medida em duas visitas clínicas consecutivas, fora de um evento agudo e afastada a possibilidade de obstrução adenoidal/amigdaliana em crianças;

- Outras situações em que haja comprovação de lesão crônica de órgão (priapismo, necrose óssea, retinopatia proliferativa, entre outras);

- Concentração de Hb < 7g/dL (média de 3 valores fora de evento agudo);

- Concentração de Hb F < 8% após dois anos de idade (notar que esse parâmetro não pode ser usada nos pacientes com Hb SC);

- Leucocitose > 20.000/mm³ (média de 3 valores fora de evento agudo);

- Desidrogenase láctica (DHL) duas vezes acima do valor de referência para a idade;

- Alterações no ecodoppler transcraniano (> 200cm/s, com impossibilidade de regime transfusional crônico).

O uso de hidroxiureia parece ser atualmente a melhor estratégia terapêutica disponível. Contudo, seu efeito na redução da morbidade e mortalidade de crianças com hemoglobinopatia SC, além dos efeitos benéficos e adversos a longo prazo, devem ser avaliados com cautela, em estudos clínicos com número maior de pacientes (159).

2.3. Hemoglobinopatia SD

2.3.1. Aspectos históricos

A hemoglobina SD é variante rara da doença falciforme. Estima-se que sua incidência em MG seja de 1:180.000, ou seja 0,7% do total de recém-nascidos triados com doença falciforme no estado de Minas Gerais (2).

A variante D-Punjab é o subtipo mais comum descrito na literatura mundial. A prevalência mais elevada ocorre no norte da Índia. O indivíduo com hemoglobinopatia SD-Punjab desperta mais interesse porque, aparentemente, comporta-se clinicamente como se tivesse hemoglobinopatia SS. A hemoglobina D resulta da substituição do aminoácido glutamato por glutamina na posição 121 da cadeia da beta globina [beta 121(GH4) Glu>Gln; HBB:c.364G>C]. Também é conhecida por hemoglobina D Los-Angeles, D-Portugal, D-Carolina do Norte, D-Chicago e D-Oak Ridge, conforme o local de relato dos primeiros casos, quando ainda não se sabia tratar-se da mesma variante. Baglioni publicou em 1962 artigo sobre sua investigação em cinco amostras de hemoglobina D obtidas de diferentes localidades: Punjab, Portugal, ilha mediterrânea de Ciprus, Carolina do Norte e paciente de família ítalo-americana residente em Chicago. A análise mostrou padrão semelhante entre elas, indicando que se tratava do mesmo subtipo (160).

Ela foi descrita pela primeira vez em 1951 por Itano (161) como hemoglobina D-Los Angeles em uma família caucasiana americana, sendo classificada na época como a terceira hemoglobina anormal associada com anemia hemolítica hereditária. O autor relatou o caso de um paciente com características clínicas e laboratoriais compatíveis com anemia falciforme, mas que possuía a co-herança de uma hemoglobina com características distintas da conhecida hemoglobina S. Apesar de apresentar o mesmo padrão de mobilidade eletroforética em pH alcalino, a recém-nomeada hemoglobina D era mais solúvel e não provocava falcização nas amostras de sangue da mãe e de dois irmãos, portadores assintomáticos. A partir desses dados, a interação das hemoglobinas S e D passou a ser estudada e diversos casos muito semelhantes começaram a ser descritos em várias partes do mundo, inicialmente na América do Norte (162-164), seguido por Espanha (165), Áustria (166), Itália (167, 168), México (169), Bélgica (170),

Venezuela (171), Emirados Árabes (172), Índia (173, 174), Tailândia (175), Turquia (176), Irã (177) e China (178). Apesar da ampla distribuição em todos os continentes, nota-se prevalência particularmente elevada na região do Paquistão, Oriente médio, China e, principalmente, no estado de Punjab, situado no norte da Índia (177-180).

A origem e propagação da hemoglobina D-Punjab não são muito claras, sendo propostas duas teorias principais. Alguns autores acreditam que ela tenha surgido uma única vez, provavelmente no norte da China e na região de Punjab, e disseminada para o ocidente pelos fluxos migratórios, como a rota da seda e processos de colonização (167, 176, 178). Contudo, a identificação de diferentes haplótipos do gene da beta globina, associados à hemoglobina D em várias regiões do mundo e nas quais a relação com processos migratórios não é evidente, sugere a hipótese de origem multicêntrica para a mutação (170, 173, 181).

No Brasil a literatura sobre a frequência da hemoglobina D-Punjab é muito escassa. Sonati et al realizaram triagem para hemoglobinopatias em cerca de 12.000 indivíduos no hospital da Universidade de Campinas/SP (UNICAMP) em 1996. Os autores encontraram hemoglobinas variantes em 34,4% dos casos, sendo 0,4% deles compatíveis com hemoglobina D-Punjab (182). O resultado corresponde à terceira variante mais comum naquela população, resultado semelhante ao encontrado por Bonini-Domingos em tese de doutorado em 1993, que avaliou a prevalência de hemoglobinopatias em cerca de 100.000 pessoas (183). Recentemente, Torres et al (184) publicaram estudo sobre 12 pacientes com Hb SD-Punjab e haplótipo β^S do tipo Bantu, constatando grande variabilidade nas manifestações clínicas entre pacientes e, adicionalmente, no mesmo paciente durante o acompanhamento realizado no Hemorio.

Outra variante com padrão eletroforético de hemoglobina D é a Hb Korle-Bu. Resulta da substituição do aminoácido ácido aspártico por asparagina na posição 73 da cadeia da beta globina [beta 73(E17) Asp>Asn; HBB:c.220G>A]. Sua origem remete à região oeste do continente africano, sendo descrita inicialmente como hemoglobina G-Accra em um paciente do Hospital Korle-Bu na cidade de Accra, capital de Gana (185). Estudos posteriores revelaram características eletroforéticas semelhantes às da hemoglobina D, podendo ser distinguida da hemoglobina S em pH ácido. Sua

distinção da variante D-Punjab por meio da HPLC (cromatografia líquida de alta resolução) é possível (186), mas somente técnicas moleculares a identificam com precisão (187-190). Existem relatos da variante D-Korle Bu na Espanha e México. Sua propagação para fora do continente africano está provavelmente relacionada ao processo de colonização das Américas entre os séculos 17 e 19, com o uso de mão de obra escrava (191, 192).

Outras hemoglobinas, todas muito raras (às vezes com descrição em apenas uma família), com padrão de mobilidade eletroforética D estão relacionadas por Hocking (1997), no apêndice B de seu guia interpretativo de hemoglobinas variantes, ou pelo site HbVar (<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>). (193).

2.3.2. Fisiopatologia

O pilar da fisiopatologia da anemia falciforme é a polimerização da hemoglobina S em situação de hipóxia, o que altera a forma da hemácia normal para a de foice, com consequente aumento da viscosidade do citoplasma e alterações nos componentes da membrana celular. O processo fisiopatológico reduz a capacidade de flexibilidade e deformabilidade da hemácia, fundamental para suas funções na homeostase.

Como será descrito adiante, o curso clínico dos pacientes com hemoglobinopatia SD é heterogêneo conforme a variante de hemoglobina D, o que sugere que o processo de falcização não é desencadeado somente pela presença de hemoglobina S intracelular, mas provavelmente é fruto da interação com a hemoglobina variante D. O mecanismo exato não é claramente conhecido, mas parece que as mutações relacionadas às hemoglobinas D alterariam a superfície de contato com a hemoglobina S desoxigenada, influenciando a falcização de formas distintas. Estudos *in vitro* mostram que a substituição do aminoácido glutamato por glutamina na variante D-Punjab contribui para o fortalecimento das reações hidrofóbicas interproteicas, favorecendo a polimerização da hemoglobina S. Por outro lado, a substituição do aminoácido aspartato por asparagina na variante D-Korle-Bu parece inibir essas interações e restringir o processo de polimerização (180, 187, 194-197). Os mecanismos de interação da Hb S com outras variantes são, em geral, desconhecidos.

2.3.3. Características clínicas e laboratoriais

Os pacientes que possuem a variante D-Punjab ou D-Korle Bu em estado de homozigose ou heterozigose são assintomáticos, com parâmetros hematológicos dentro dos valores de referência para a idade da pessoa e sem evidência clínica ou laboratorial de hemólise (181, 187, 198, 199). Contudo, a co-herança da hemoglobina S pode acarretar sintomas de espectro clínico variado. O estudo clínico dessas variantes é ausente no Brasil e, no mundo, são registrados apenas relatos de casos.

As crianças com hemoglobinopatia SD-Punjab parecem ter curso clínico semelhante ao da forma homozigota SS, com crises dolorosas, sequestro esplênico agudo, hepatoesplenomegalia e infecções recorrentes. A avaliação laboratorial também revela anemia hemolítica, reticulocitose, hiperbilirrubinemia indireta e elevação de desidrogenase láctica (169, 172, 198-201). Devido à prevalência mais elevada, as séries mais numerosas de casos são provenientes da Índia. Oberoi *et al* (2013) avaliaram dez pacientes com idade entre 1 e 19 anos. Todos eles apresentavam anemia moderada a grave (média 6,8 g/dL) e pelo menos uma complicação clínica relacionada à doença, como crises vaso-oclusivas dolorosas, síndrome torácica aguda, colelitíase, necrose avascular de cabeça de fêmur e infecções recorrentes. Oito pacientes necessitaram receber, em média, três transfusões de concentrado de hemácias durante seu acompanhamento clínico (198). Italia *et al* (2014) relataram 15 casos com idade entre 1 e 34 anos. Classificaram apenas um como quadro leve, dois como portadores de crises moderadas e 12 como anemia hemolítica grave, apresentando crises vaso-oclusivas dolorosas de repetição e necessidade transfusional frequente (199). El-Kalla e Mathews (1997) avaliaram nove pacientes com idade entre 3 e 10 anos nos Emirados Árabes e relataram crises vaso-oclusivas dolorosas com intensidade variada, sequestro esplênico agudo e infecções de repetição em sete deles. As outras duas crianças eram assintomáticas, apesar de apresentarem anemia, com reticulocitose. A maior casuística da literatura foi publicada por Patel *et al* (2014) e consiste na descrição de 42 pacientes indianos com idade média de 22 anos, sendo 25 considerados graves, por apresentarem, no ano anterior ao estudo, três ou mais episódios vaso-oclusivos e/ou duas ou mais transfusões sanguíneas. Os demais pacientes

apresentavam formas leve ou moderada. No grupo considerado "grave", 20 foram submetidos a, pelo menos, 24 meses de hidroxiureia, com resultado satisfatório (202).

Em relação ao risco de AVC isquêmico, os dados da literatura mundial sobre velocidades de fluxo cerebral medidos pelo doppler transcraniano e sobre eventos clínicos agudos são derivados de estudos em pacientes com hemoglobinopatia SS. Sabe-se que um evento isquêmico nesses pacientes pode ocorrer em cerca de 10% dos casos (90, 203). Silva et al descreveram que a probabilidade de AVC isquêmico até os 10 anos de idade em coorte de crianças com anemia falciforme na Fundação Hemominas/MG foi de 8,3% (204). Não há relato disponível na literatura em crianças com hemoglobinopatia SD.

A influência da concentração relativa basal da hemoglobina fetal na redução dos sintomas nos pacientes com SD-Punjab não está ainda muito clara. Essa associação já foi descrita por vários estudos em pacientes com hemoglobinopatia SS ao longo do tempo e tem sido justificada pelo fato de que hemácias com maior quantidade de hemoglobina fetal possuem níveis mais baixos de hemoglobina S, apresentando menor chance de falcização e, conseqüentemente, menor probabilidade de manifestações clínicas (149, 205, 206). Dessa forma, Patel *et al* observaram que a concentração elevada de hemoglobina fetal foi associada a menor frequência de crises vasculares dolorosas nos 42 pacientes incluídos no estudo de pacientes com SD-Punjab (202). Em contraponto, três outros estudos não evidenciaram a mesma relação, mas apresentavam casuística muito menos numerosa que a de Patel et al, com 5, 9 e 15 pacientes, respectivamente (172, 195, 199).

O curso clínico dos portadores de hemoglobinopatia SD-Korle-Bu parece ser de pouca gravidade, com sintomas de pequena monta ou, até mesmo, inexistentes. Alguns autores chegam a comparar esses pacientes com portadores de traço falciforme, com evolução clínica favorável e exames hematológicos sem alterações significativas em relação a valores de referência (187, 190).

No Brasil, o primeiro caso comprovado de Hb SD-Los Angeles foi descrito por Zago & Costa, em 1988 (207). Outras crianças com Hb SD foram identificadas pela triagem neonatal no Rio de Janeiro (42, 208). Em 100 mil recém-nascidos triados entre agosto de 2000 e novembro de 2001, três

apresentavam, por HPLC, padrão compatível com Hb SD e 142, com Hb AD. Estendendo a coorte até dezembro de 2009, foram detectadas 37 crianças com Hb SD (Tabela I do artigo de 2013); em quatro foi-lhes administrada hidroxiureia, motivo do artigo que relatou a experiência do Hemorio com o uso do medicamento em crianças com doença falciforme. Não há identificação molecular das hemoglobinas variantes D encontradas, sendo provável que a variante D-Punjab seja uma delas, pois houve necessidade do uso de hidroxiureia em quatro crianças.

A Hb D (sem identificação molecular e em heterozigose com a Hb A) também foi descrita no Brasil por Bonini-Domingos em sua tese de doutorado, em 1993 (183). Na região de Campinas, Sonati e colaboradores também relataram ser a Hb D a terceira variante mais comum na área de estudo, seguindo a Hb S e a Hb C (182). Como já mencionado na seção 2.3.1, Torres et al (184) relataram recentemente dados clínicos e laboratoriais de 12 pacientes com Hb SD-Punjab e haplótipo β^S do tipo Bantu, comprovados por exames moleculares.

2.3.4. Tratamento

Existe relativo consenso de que pacientes com hemoglobinopatia SD-Punjab devam receber o mesmo protocolo de tratamento recomendado àqueles com hemoglobinopatia SS, uma vez que eles também podem apresentar complicações potencialmente fatais durante a vida, como sequestro esplênico agudo e sepse bacteriana. Os cuidados devem incluir orientações preventivas e terapêuticas a respeito do manejo das crises vaso-oclusivas dolorosas, diagnóstico precoce de sequestro esplênico agudo, profilaxia com antimicrobianos para prevenção de infecções por germes encapsulados, realização de cobertura vacinal completa, suplementação diária com ácido fólico e realização de estudo familiar para aconselhamento genético sobre gestações futuras (172, 198-200, 209).

O uso da hidroxiureia em crianças com os subtipos SS ou $S\beta^0$ -talassemia tem sido recomendado na literatura, conforme já descrito no item 2.2.4 No caso de pacientes com hemoglobinopatia SD, os dados sobre eficácia e segurança no uso da medicação estão restritos a casos isolados (210, 211) e aos poucos estudos que apresentam maior casuística sobre o

assunto. Entre as dez crianças incluídas no estudo de Oberoi *et al*, cinco receberam tratamento com hidroxiureia devido a crises vaso-oclusivas de repetição e/ou anemia grave, com período de acompanhamento que variou entre 6 e 50 meses após o início do uso da medicação. Em todos os casos houve redução dos episódios dolorosos, com ausência de efeitos colaterais significativos secundários ao uso de hidroxiureia, com exceção de um paciente que apresentou neutropenia transitória (198). Conforme mencionado anteriormente, a maior coorte indiana incluiu 20 pacientes com idade entre um e 45 anos, que fizeram uso de hidroxiureia por um período mínimo de dois anos. Os autores avaliaram os dados clínicos e laboratoriais antes e após o uso da medicação e compararam com um grupo de 17 pacientes que não a receberam. A indicação mais frequente foi em razão de crises vaso-oclusivas de repetição (13 casos), seguida por anemia grave com indicação frequente de transfusão de concentrado de hemácias (sete casos). Os resultados mostraram redução na frequência das crises e interrupção da necessidade transfusional em todos os pacientes. Houve melhora do quadro de hemólise, indicado pelo aumento significativo do valor da hemoglobina basal e redução dos níveis de plaquetas, leucócitos, desidrogenase láctica e bilirrubinas. Não foram observadas em nenhum caso toxicidade medular, cutânea, alérgica ou disfunção hepática e renal secundárias ao uso da medicação (209).

Dado que o uso da hidroxiureia consegue apenas amenizar algumas das manifestações clínicas, o transplante alogênico de medula óssea constitui-se, atualmente, no único tratamento curativo para pacientes com anemia falciforme. Assim como nos pacientes com hemoglobinopatia SC, sua indicação atual é reservada a formas graves da doença, que apresentam morbidade significativa devido a lesões de diversos órgãos. Os resultados sobre transplante de medula em crianças com hemoglobinopatia SD também são muito restritos e ficam igualmente inseridos nos resultados globais de doença falciforme. Hamidieh *et al* relataram o caso de uma criança iraniana de 11 anos de idade com a variante SD-Punjab, que apresentou melhora parcial das crises vaso-oclusivas dolorosas com hidroxiureia e foi, então, submetido a transplante alogênico de medula óssea. O doador foi o irmão gemelar não idêntico. O paciente evoluiu sem complicações significativas, curando-se da doença que o acometia (211).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Estimar a prevalência e história natural das hemoglobinopatias SC e SD em crianças com doença falciforme triadas pelo Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Faculdade de Medicina da UFMG, por meio do Programa de Triagem Neonatal de MG (PTN-MG) e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte (HBH) da Fundação Hemominas.

3.2. Objetivos secundários

- Determinar, por métodos moleculares, as variantes de hemoglobina D;
- Avaliar os parâmetros hematológicos na doença falciforme SC e SD ao longo do seguimento dos pacientes;
- Estimar a prevalência e incidência de eventos clínicos relacionados à doença falciforme;
- Verificar se existe associação de dados hematológicas com as manifestações clínicas;
- Estimar a sobrevida das crianças com hemoglobinopatia SC e SD;
- Avaliar o risco de acidente vascular cerebral pelo Doppler transcraniano;
- Determinar os haplótipos dos alelos β^S e β^D nas crianças com hemoglobinopatia SD
- Determinar a prevalência da co-herança de alfa-talassemia nas crianças SC e SD;
- Verificar se haplótipos dos alelos β^S e β^D e a co-herança de alfa-talassemia alteram o curso clínico e laboratorial da hemoglobinopatia SD.

4. Casuística e métodos

4.1 Delineamento e local de realização

Trata-se de estudo do tipo coorte, parte retrospectiva e parte prospectiva, em crianças com hemoglobinopatia SC e SD, triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PTN-MG), nascidas entre 1 de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2012 e acompanhadas no ambulatório da Fundação Hemominas, de Belo Horizonte (HBH). A parte retrospectiva do estudo incluiu a coleta dos dados clínicos e hematológicos das crianças nos prontuários médicos arquivados no ambulatório do HBH e no banco de dados do PTN-MG até a data de início do estudo. A parte prospectiva refere-se ao seguimento de todas as crianças desde início do estudo até 31/12/2014. Nessa fase foi feita a coleta de sangue para determinar os haplótipos dos alelos β^S e β^D nas crianças com hemoglobinopatia SD e para a pesquisa de co-herança de alfa talassemia nas crianças SC e SD.

4.2 Programa Estadual de Triagem Neonatal para Doença Falciforme de Minas Gerais

O PTN-MG teve início em setembro de 1993, com o objetivo de identificar precocemente o hipotireoidismo congênito e a fenilcetonúria. O programa foi ampliado em março de 1998, com a inclusão de triagem para hemoglobinopatias e, em julho de 2003, com a triagem para fibrose cística. Em maio de 2014 foram incorporadas a deficiência de biotinidase e a hiperplasia adrenal congênita. Entre janeiro de 1999 e dezembro de 2012 foram triadas em Minas Gerais 3.590.315 crianças para hemoglobinopatias.

A coleta do sangue para a triagem é realizada em postos de coleta localizados, em sua grande maioria, nas Unidades Básicas de Saúde de todos os municípios do Estado. Os recém-nascidos retidos em maternidades têm seu sangue colhido nessas instituições.

As amostras de sangue são coletadas, preferencialmente, entre o terceiro e o quinto dia de vida em papel-filtro tipo *Schleicher & Schuell 903*®

(Dassel, Alemanha), e, após secagem, acondicionadas em envelope contendo todos os dados de identificação da criança. O material é então transportado ao laboratório de triagem neonatal do Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (NUPAD), localizado na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte.

Do início do programa para hemoglobinopatias até março de 2002, o laboratório do Nupad utilizou, na determinação do perfil hemoglobínico, o método de eletroforese por focalização isoelétrica (IEF) com insumos e equipamentos de eletroforese RESOLVE Systems, Neonatal Hemoglobin Test Kit (PerkinElmer). Amostras com resultado alterado ou suspeito foram imediatamente repetidas pelo mesmo método para confirmação. A partir de março de 2002, o laboratório passou a trabalhar, primariamente, com a técnica de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), utilizando o equipamento VARIANT da BIO-RAD e o *kit* "Sickle Cell Short". Amostras com resultados alterados ou suspeitos passaram a ser repetidos por IEF, para confirmação. A partir de 2010, a IEF passou novamente a ser a metodologia primária, sendo a suspeita de doença falciforme confirmada por reação de cadeia da polimerase, alelo-específica, para as mutações S, C e D-Punjab, além do alelo selvagem A.

O NUPAD é o centro de referência mineiro do Ministério da Saúde, sendo responsável pela coordenação do PTN-MG, o que inclui a comunicação dos resultados alterados da triagem neonatal, solicitação de amostras para estudo familiar, quando necessário, e controle do fluxo de referência e contrarreferência dos pacientes triados pelo programa. Segundo dados do NUPAD, o PTN-MG apresenta elevada cobertura, atingindo 91,8% da população de recém-nascidos e 100% dos municípios do Estado. Os restantes 8,2% dos recém-nascidos são triados em laboratórios privados, sem interface com o Nupad.

Os recém-nascidos que apresentam resultado de exame compatível com qualquer hemoglobinopatia são encaminhados a um dos centros regionais da Fundação Hemominas. As crianças são direcionadas ao centro de referência conforme a localização geográfica do município de nascimento, independentemente de sua evolução clínica ou eventual necessidade de transfusões regulares e uso de hidroxiureia. O acompanhamento a esses

pacientes segue o Protocolo para Portadores de Síndromes Falciformes, elaborado pela equipe multiprofissional do ambulatório da Fundação Hemominas. Este protocolo consiste de acompanhamento clínico periódico das crianças, bem como assistência global da equipe multiprofissional (4). Em toda consulta hematológica, há registro de todas as intercorrências no período avaliado, em formulário próprio, incluindo os episódios de crises dolorosas, episódios infecciosos, crises de sequestração esplênica aguda, interconsultas realizadas, internações, exames hematológicos e bioquímicos, e realização do Doppler transcraniano para as crianças SS e S β^0 -talassemia.

4.3 População estudada, critérios de inclusão e exclusão

Entre as crianças nascidas no período de 1 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2012, foram triadas pelo PTN-MG 21 crianças com perfil hemoglobínico compatível com hemoglobinopatia SD e foram encaminhadas ao HBH 569 crianças com hemoglobinopatia SC. A data de 31 de dezembro de 2012 foi adotada para que todas as crianças fossem acompanhadas por, no mínimo, dois anos. Foram analisados todos os prontuários médicos disponíveis no HBH dentro do período relatado, sendo considerados critérios de inclusão:

- Crianças triadas pelo PTN-MG entre janeiro de 1999 e dezembro de 2012, com o diagnóstico de Hb SC ou SD;
- Crianças SC que foram encaminhadas para o HBH e que permaneceram em acompanhamento clínico naquele hemocentro da Fundação Hemominas até a data final do presente estudo;
- Crianças SD acompanhadas em todos os hemocentros de Minas Gerais ou que foram transferidos para outros estados.

Os critérios de exclusão utilizados nesta pesquisa foram:

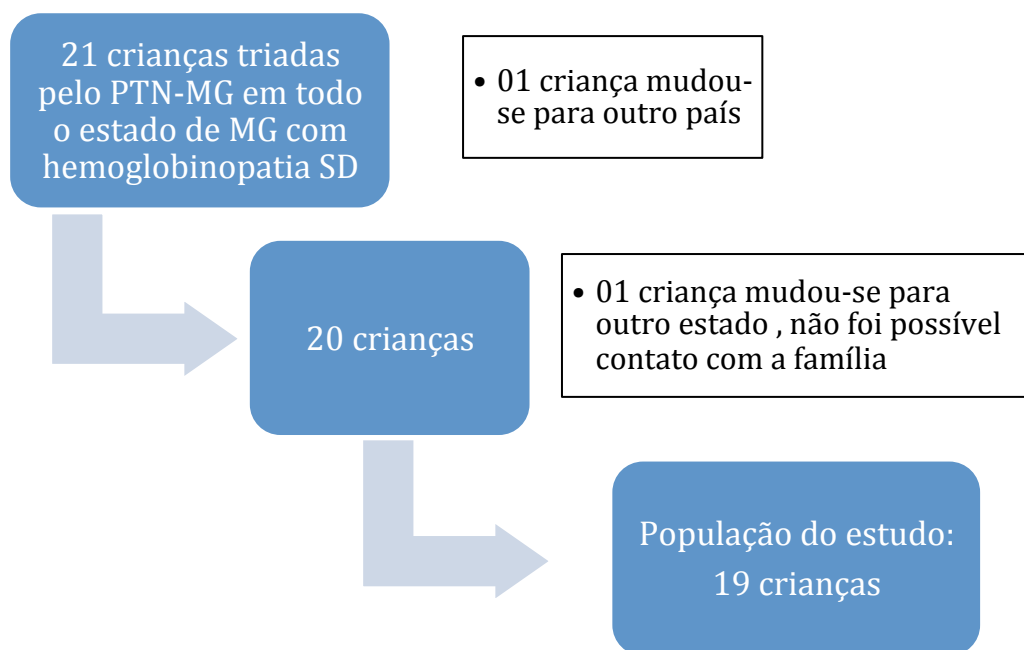
- Crianças com perfil hemoglobínico compatível com outros subtipos de doença falciforme (SS, S/beta talassemia, SE ou SO^{Arab});
- Crianças que evoluíram para o óbito antes do início do estudo;

- Crianças encaminhadas ao HBH que compareceram à primeira consulta e não deram seguimento ao acompanhamento clínico por qualquer razão;
- Crianças que obtiveram alta do programa de acompanhamento clínico por qualquer razão;
- Crianças transferidas para acompanhamento em outro hemocentro, exceto as crianças SD.

4.3.1. Hemoglobinopatia SD

Das crianças nascidas entre 1 de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2012 e triadas pelo PTN de Minas Gerais, vinte e um (21) apresentavam o perfil hemoglobínico FSD. Deste total foram excluídos 2 pacientes, porque não se obteve amostra de sangue para análise. Uma criança mudou-se para o exterior e outra mudou-se para outro estado. Não foi possível contato com as famílias. Estas crianças foram consideradas somente para o cálculo da incidência da hemoglobinopatia SD nesta coorte. Foram estudadas, portanto, 19 crianças com perfil eletroforético compatível com hemoglobinopatia SD (figura 1).

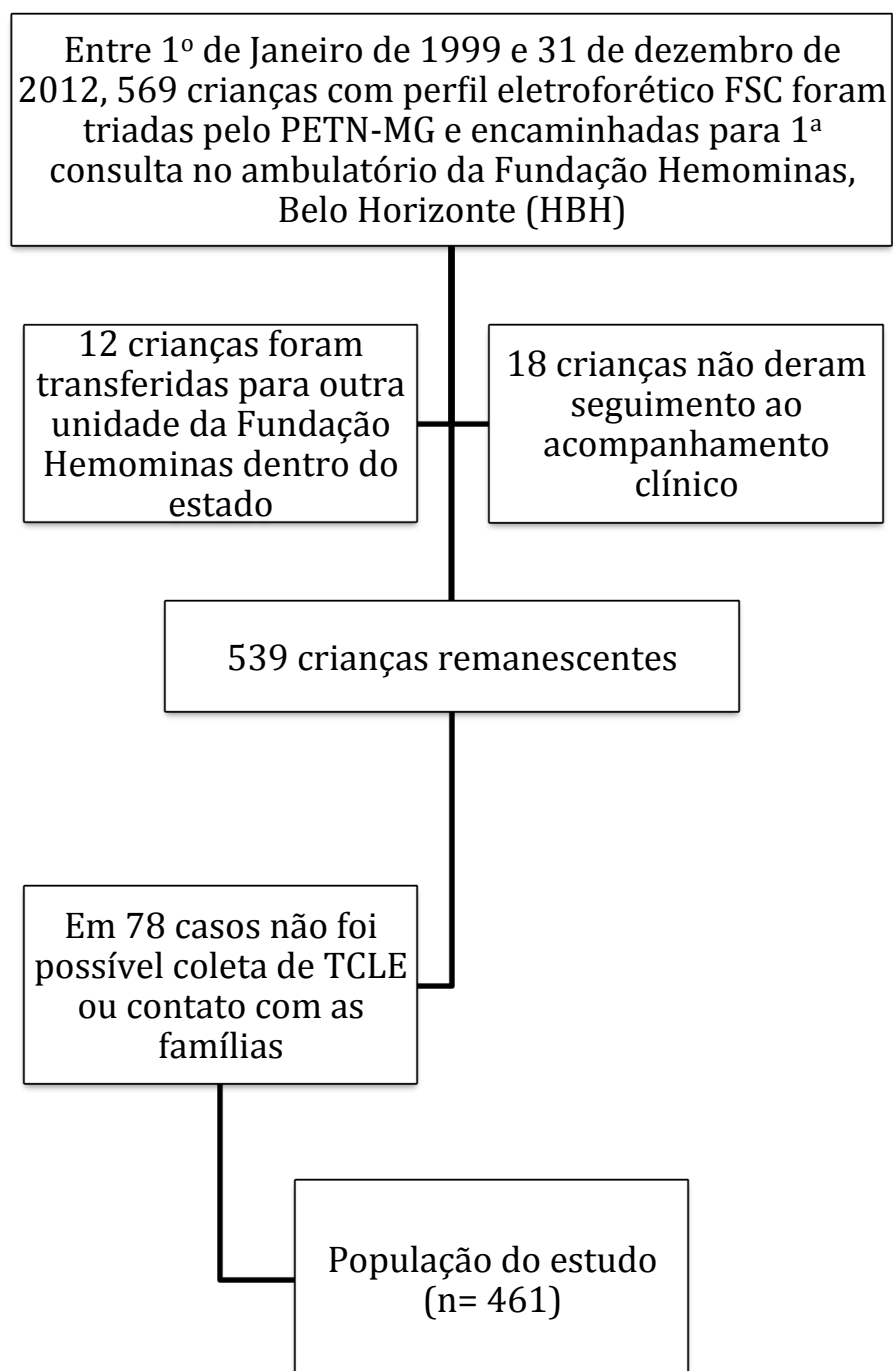
Figura 1. Fluxograma de inclusão das 19 crianças com Hb SD no estudo.



4.3.2. Hemoglobinopatia SC

Das crianças nascidas entre 1 de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2012 triadas pelo PTN de Minas Gerais e encaminhadas ao HBH, 569 apresentavam o perfil hemoglobínico FSC. Como apresentado na figura 2, foram excluídas 12 crianças devido a transferência para outra unidade da Fundação Hemominas e outras 18 por perda de seguimento clínico. Para que a taxa de mortalidade não fosse superestimada ou, inversamente, que a curva de sobrevida fosse subestimada, foi utilizado como denominador dessas estimativas o número total de 539 crianças. Contato com as famílias e assinatura do TCLE não foram possíveis em 78 casos. Por isso, os demais resultados que serão descritos na seção 5.2.2 referem-se ao número de 461 crianças (ver Figura 1).

Figura 2. Fluxograma de inclusão das 461 crianças com Hb SC no estudo



4.4 Coleta de Dados

Os dados dos prontuários da Fundação Hemominas foram coletados pelo pesquisador com a ajuda de quatro acadêmicos de medicina da UFMG, e uma acadêmica de enfermagem da Unifenas/BH, selecionados pelo Nupad e Fundação Hemominas.

As informações pessoais, dados hematológicos e eventos clínicos foram extraídos dos prontuários médicos arquivados no ambulatório do HBH e NUPAD. As consultas médicas das crianças triadas pelo PETN-MG são registradas em formulário padronizado pela instituição em duas vias iguais e arquivadas no hemocentro de referência e na central do Nupad, respectivamente. Os dados clínicos e hematológicos dos pacientes com hemoglobinopatia SD em acompanhamento nos hemocentros do interior do estado foram extraídos das cópias arquivadas no Nupad. Os dados foram digitados e armazenados em um banco de dados específico, derivado do Microsoft Access, já implantado para outras projetos sobre doença falciforme. Todo o processo de coleta de dados e digitação realizado pelos acadêmicos foi orientado pelo pesquisador. Na eventualidade de haver citação apenas do mês do episódio de intercorrência clínica, e não do dia exato do episódio, convencionou-se registrar a data como o dia 15 do respectivo mês.

Os municípios de nascimento das crianças foram divididos em três grupos: Belo Horizonte, região metropolitana de Belo Horizonte e interior do estado de Minas Gerais. A região metropolitana de Belo Horizonte é atualmente constituída por 50 municípios: Baldim, Belo Horizonte, Betim, Brumadinho, Caeté, Capim Branco, Confins, Contagem, Esmeraldas, Florestal, Ibité, Igarapé, Itaguara, Itatiaiuçu, Jaboticatubas, Juatuba, Lagoa Santa, Mário Campos, Mateus Leme, Matozinhos, Nova Lima, Nova União, Pedro Leopoldo, Raposos, Ribeirão das Neves, Rio Acima, Rio Manso, Sabará, Santa Luzia, São Joaquim de Bicas, São José da Lapa, Sarzedo, Taquaraçu de Minas, Vespasiano, Barão de Cocais, Belo Vale, Bonfim, Fortuna de Minas, Funilândia, Inhaúma, Itabirito, Itaúna, Moeda, Pará de Minas, Prudente de Moraes, Santa Bárbara, São José da Varginha e Sete Lagoas.

As variáveis hematológicas registradas foram concentração total de hemoglobina, níveis de HbF e HbA₂, leucometria total, plaquetometria, contagem de reticulócitos no sangue periférico, volume corpuscular médio

(VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), ferro sérico, índice de saturação da transferrina e ferritina sérica, dados laboratoriais relativos aos haplótipos do cluster do gene beta e de co-herança de deleções do gene alfa (alfa-talassemia).

As crianças com hemoglobinopatia SD tiveram suas amostras analisadas por PCR-RFLP (reação em cadeia de polimerase com restrição enzimática), utilizando-se, inicialmente, a enzima de restrição *EcoRI* para detectar a mutação subjacente à variante D-Punjab no terceiro éxon do gene beta (*HBB*) (173). Caso a reação fosse negativa, foi feito sequenciamento do gene *HBB*, para identificar a mutação subjacente a outras hemoglobinas variantes. Ver detalhes dos dois métodos nos Anexos I e II.

A detecção de sete deleções subjacentes à alfa talassemia foi realizada por meio da reação *multiplex gap-PCR* (Anexo III). A identificação dos haplótipos do gene da β -globina foi realizada por meio de PCR-RFLP em seis sítios de restrição conhecidos. Adicionalmente outros dois sítios foram determinados por sequenciamento gênico (Anexo IV).

Todos os valores hematológicos foram transcritos das anotações médicas, na ausência de processos infecciosos ou crise algica e, no mínimo, 3 meses após uso de hemocomponentes. A média aritmética de cada item foi considerada como valor basal para cada paciente em questão. A concentração relativa de hemoglobina fetal basal foi obtida a partir das eletroforeses de hemoglobina registradas no prontuário médico de cada paciente. Optou-se por considerar a eletroforese realizada na idade mais avançada dentro do período de acompanhamento, desde que tivesse sido colhida após dois anos de vida, época em que a concentração fisiológica de hemoglobina fetal já se encontra relativamente estável.

Foram realizados exames de doppler transcraniano para avaliar o risco de acidente vascular cerebral isquêmico. Os exames foram realizados e interpretados por uma única especialista, usando um equipamento modelo EME TC 2000, Nicolet, Madison, WI, USA. Um exame com resultado de alto risco foi definido como a $V_{Max} \geq 200$ cm/s na carótida interna ou nas artérias cerebrais médias, conforme originalmente definido pelos investigadores do estudo americano sobre prevenção primária de acidente vascular cerebral isquêmico em pacientes com anemia falciforme (STOP)

(212). O exame de dois pacientes foi excluído da análise de resultados porque eles foram realizados após o início de hidroxiureia.

Em conjunto com o programa de especialidades médicas para doença falciforme (PAE-Cehmob), houve o planejamento de realizar interconsultas oftalmológicas, ortopédicas e cardiológicas para avaliação de retinopatia falciforme, necrose avascular de cabeça de fêmur/úmero e hipertensão pulmonar, respectivamente. Contudo, não foi possível a realização dessas interconsultas durante o transcorrer do projeto, por limitação orçamentária e dificuldade logística. Foram, então, extraídas dos prontuários médicos informações sobre as consultas oftalmológicas, ortopédicas e cardiológicas realizadas de acordo com o protocolo clínico de atendimento da Fundação Hemominas (4). As solicitações de consultas ortopédicas são feitas por hematologista do HBH sob demanda, ou seja, de acordo com a presença de sintomas sugestivos de complicações osteoarticulares. As interconsultas são encaminhadas para a unidade básica de saúde mais próxima do endereço residencial da criança e direcionadas para a avaliação do(s) ortopedista(s) de referência de cada município. Já as consultas oftalmológicas e cardiológicas são solicitadas anualmente para todos os pacientes com doença falciforme acima de 5 anos de idade, ou antes, se houver sintoma relacionado. As solicitações de consultas oftalmológicas e cardiológicas seguem o mesmo fluxo de encaminhamento e o atendimento realizado no serviço de referência do bairro ou município. No presente estudo, foi considerada retinopatia falciforme qualquer referência de tortuosidade vascular à fundoscopia, registrada em prontuário médico. Além disso, foi considerada hipertensão pulmonar a pressão estimada de artéria pulmonar (PSAP) acima de 30 mm Hg, inferida a partir da velocidade de regurgitação na valva tricúspide, medida por ecocardiograma.

As informações relacionadas às crianças que faleceram foram obtidas dos registros nos prontuários médicos do HBH e cópia das certidões de óbito fornecidas pelo NUPAD.

4.5 Aspectos Éticos

A busca de dados foi desenvolvida no ambulatório da Fundação Hemominas, com garantia de sigilo das informações pessoais de cada sujeito

da pesquisa. Os pesquisadores comprometeram-se a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no projeto de pesquisa. Foi colhido termo de consentimento livre e esclarecido dos responsáveis e pacientes, conforme orientação do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (Anexo V).

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Câmara do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG e pelos Comitês de Ética em Pesquisa da UFMG e da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais – Hemominas (Plataforma Brasil, CAAE: 13327713.5.0000.5149; Anexo VI).

4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0, utilizando-se testes estatísticos adequados a cada situação.

Os resultados quantitativos foram expressos pela média \pm desvio padrão (DP), ou pela mediana e intervalo interquartil, quando foi constatado que a média não era medida-resumo adequada (distribuição não-gaussiana). As prevalências foram expressas pelas porcentagens correspondentes ao item analisado e limites de confiança a 95%.

Associação da co-herança de alfa talassemia com o gênero, município de residência (BH, região metropolitana ou interior do estado) e presença de esplenomegalia basal foram testadas com o qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Comparações entre as médias de diferentes grupos de crianças (por exemplo, com ou sem alfa talassemia) quanto ao nível de hemoglobina, porcentagem de Hb S, Hb C, Hb F, valores médios de VMMax, contagens basais de leucócitos, plaquetas e reticulócitos foram feitas com o teste t adotando-se os valores estatísticos correspondentes a distribuição homocedástica (variância homogênea) ou heterocedástica (variância heterogênea), conforme o teste de Levene.

A incidência de eventos clínicos, como SEA, crises dolorosas, infecções e transfusões sanguíneas foram expressas por taxas relativas a 100 pacientes-ano, com limites de confiança a 95%. Comparações entre

taxas de incidência relativas a dois grupos distintos de crianças foram feitas por meio do teste de Fisher.

As curvas de sobrevida seguiram o modelo de Kaplan-Meier. A curva de probabilidade de ocorrência do primeiro episódio de SEA foi construída levando-se em consideração que o tempo de “exposição” ao primeiro episódio de SEA é, pela natureza do estudo, diferente para cada criança, conforme sua data de nascimento. As curvas de probabilidade para a ocorrência do primeiro episódio de SEA e probabilidade de óbito foram obtidas, no Programa SPSS, pela escolha do gráfico “One minus Survival”, que representa a função $(1 - \text{Função de sobrevida})$. Havendo necessidade de comparação entre grupos de crianças, foi utilizado o teste de logrank.

Consideraram-se significativos os testes em que a probabilidade de erro alfa foi igual ou inferior a 0,05.

4.7 Financiamento

Essa pesquisa recebeu o apoio logístico do Nupad e Hemominas. Os recursos financeiros para compra de insumos foram obtidos de projeto aprovado pelo CNPq e pela Fapemig. Os bolsistas do projeto foram estagiários contratados pelo Nupad ou alunos de iniciação científica do Programa PIBIC e PROBIC da UFMG. O orientador do doutorando, Professor Marcos Borato Viana, é bolsista de produtividade científica do CNPq.

5. Resultados

5.1. Hemoglobinopatia SD

Segue, nas páginas seguintes, cópia do artigo "Clinical, hematological and genetic data of a cohort of children with hemoglobin SD", recém-publicado pela Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, fascículo 3, volume 38, julho a setembro de 2016, páginas 240-246 (DOI: 10.1016/j.bjhh.2016.05.002), com os principais resultados encontrados.



Original article

Clinical, hematological and genetic data of a cohort of children with hemoglobin SD



Paulo do Val Rezende^{a,*}, Kenia da Silva Costa^a, Jose Carlos Domingues Junior^a,
Paula Barezani Silveira^a, André Rolim Belisário^a, Celia Maria Silva^a,
Marcos Borato Viana^b

^a Fundação Hemominas, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2016

Accepted 2 May 2016

Available online 21 May 2016

Keywords:

Sickle cell disease

Hemoglobin S/D-Punjab

Hemoglobin S-Korle Bu

Children

Haplotypes

ABSTRACT

Introduction: The hemoglobin FSD is very uncommon in newborn screening programs for sickle cell disease. In the program of Minas Gerais, Brazil, the clinical course of children with hemoglobin SD was observed to be heterogeneous. The objective of this study was to estimate the incidence (1999–2012) and to describe the natural history of a cohort of newborns with hemoglobin SD.

Methods: Isoelectric focusing was the primary method used in newborn screening. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and gene sequencing were used to identify mutant alleles and for haplotyping. Gap-polymerase chain reaction was used to detect alpha-thalassemia.

Results: Eleven cases of hemoglobin S/D-Punjab and eight of Hb S-Korle Bu were detected. Other variants with hemoglobin D mobility were not identified. All hemoglobin D-Punjab and hemoglobin Korle Bu alleles were associated with haplotype I. Among the children with hemoglobin S/D-Punjab, there were four with the β^S CAR haplotype, six with the Benin haplotype, and one atypical. Results of laboratory tests for hemoglobin S/D-Punjab and hemoglobin S-Korle Bu were: hemoglobin 8.0 and 12.3 g/dL (p -value <0.001), leukocyte count $13.9 \times 10^9/L$ and $10.5 \times 10^9/L$ (p -value = 0.003), reticulocytes 7.5% and 1.0% (p -value <0.001), hemoglobin F concentration 16.1% and 6.9% (p -value = 0.001) and oxygen saturation 91.9% and 97% (p -value = 0.002), respectively. Only hemoglobin S/D-Punjab children had acute pain crises and needed blood transfusions or hydroxyurea. Those with the Benin β^S haplotype had higher total hemoglobin and hemoglobin F concentrations compared to the CAR haplotype. Transcranial Doppler was normal in all children.

Conclusion: The clinical course and blood cell counts of children with hemoglobin S/D-Punjab were very similar to those of hemoglobin SS children. In contrast, children with hemoglobin S-Korle Bu had clinical course and blood cell counts like children with the sickle cell trait.

© 2016 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author at: Rua Frei Gonzaga, 301, 30315-170 Belo Horizonte, MG, Brazil.

E-mail address: paulinhovarezende@gmail.com (P.d.V. Rezende).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.05.002>

1516-8484/© 2016 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Sickle cell disease (SCD) is a public health problem worldwide. The hemoglobin (Hb) SD subtype seems to be very rare. It includes the Hb S/D-Punjab variant that apparently is associated with a more severe clinical course, and other Hb S-non-Punjab variants, with limited information regarding laboratory and clinical data.¹⁻³

The Hb D-Punjab variant is the most common D-subtype described in the literature worldwide. It was first described in 1951 by Itano.⁴ It results from the replacement of the amino acid glutamate with glutamine at position 121 of the beta-globin chain [beta 121(GH4) Glu>Gln; HBB: c.364G>C].

Another variant within the window of Hb D using isoelectric focalization (IEF), but not using high-performance liquid chromatography (HPLC), is Hb Korle Bu, which results from the replacement of the amino acid aspartate with asparagine at position 72 of the beta-globin chain [beta 73(E17) Asp>Asn; HBB: c.220G>A]. It originates from the western region of Africa, and its dissemination to America is probably linked to the slave trade in the 17th to 19th centuries.⁵

The clinical course of patients with Hb SD disease seems to be heterogeneous, depending on the Hb D variant. This suggests that the sickling process is likely the result of the interaction between the intracellular Hb S and Hb D variants. This interaction may be strengthened or weakened, depending on the Hb variant co-inherited with the β^S mutation.⁶⁻¹⁴ Children with Hb S/D-Punjab disease seem to present a clinical course similar to those with homozygous Hb SS disease.^{8,10,11,15,16}

Thus, patients with Hb S/D-Punjab disease should receive the same treatment protocol as those with Hb SS disease because they may also experience potentially fatal complications during their lives.^{10,11,17} The use of hydroxyurea in children with Hb SD disease has been restricted to isolated cases.^{11,18,19}

The objective of this study was to estimate the incidence and to describe the natural history of newborns with the Hb SD pattern by IEF, screened as part of the Neonatal Screening Program in the Brazilian state of Minas Gerais (PTN-MG). Additionally, beta-globin cluster haplotypes for the β^S , β^D -Punjab and $\beta^{\text{Korle Bu}}$ mutations were determined in order to try to trace the origin of the respective mutations.

Methods

This descriptive study is based on a retrospective cohort. Archived medical records from the Fundação Hemominas (Government Blood Center) and the PTN-MG databank were used. IEF of dried blood spot samples (Neonatal Hemoglobin Resolve Screen Kit, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Finland) has been the primary method of newborn screening at PTN-MG. Allele-specific polymerase chain reaction (PCR) for β^A , β^S , β^C , and β^D -Punjab alleles was introduced in the blood bank protocol as a confirmatory test in 2010.

The population initially comprised 21 children with Hb FSD at birth. Hb FSD means that the children were born with three Hb fractions: Hb F (the major fraction at birth that steadily

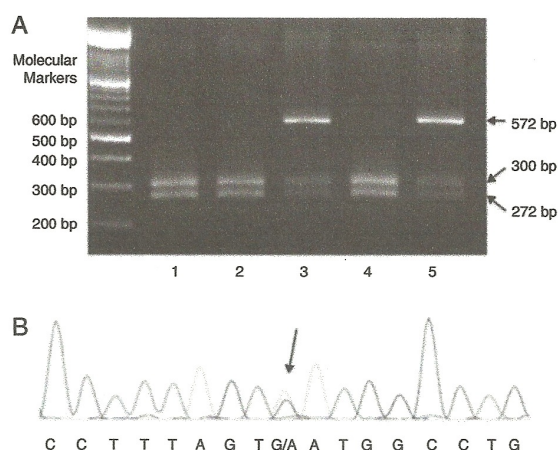


Figure 1 – Molecular detection of mutations in Hb D-Punjab and Hb Korle Bu. (A) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism with EcoRI in five children with Hb D-Punjab. Patients 1, 2, and 4 had wild alleles (two bands of 300 and 272 base pairs) and Patients 3 and 5 had an additional band of 572 base pairs that indicates a heterozygous mutation in the codon 121 of HBB (Hb D-Punjab); (B) electropherogram of a child with Hb Korle Bu. The arrow points to the heterozygous mutation HBB:c.220G>A (GAT>AAT; Asp>Asn) detected through gene sequencing.

decreases over the first year of life), Hb S, and an Hb with a zone D mobility in electrophoresis. They were born between January 1, 1999 and December 31, 2012; a total of 3,590,315 children were screened in this period. The patients' clinical and laboratory data up to December 31, 2014 were reviewed so that all children, except two, had been followed up for at least two years.

Two patients were excluded from the clinical and molecular analyses because ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-anticoagulated blood samples had not been obtained for molecular tests: one child moved abroad and another moved out of the state. Contact with the families has failed thus far. These children were used only to calculate the incidence of Hb SD in the cohort.

Fragments of the beta-globin gene (HBB) containing exon 3 (forward primer 5'-TCATGCCTCTTTGCACCAATTC-3'; reverse primer 5'-CACTGACCTCCCACATTC-3') were amplified using PCR, and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was conducted with the EcoRI enzyme to detect the D-Punjab allele (Figure 1A). If the reaction was negative, the three exons of the HBB gene were sequenced to identify the mutation underlying the other Hb variants (primer composition available on request). DNA sequencing was done in an ABI 3130 capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Figure 1B illustrates the gene sequencing of the region in which the HBB: c.220G>A mutation underlying Hb Korle Bu is located. Detection of seven more common HBA deletions was carried out by multiplex gap-PCR.²⁰

The β -globin gene cluster haplotyping was carried out by PCR-RFLP of six restriction sites: *HindIII* in the IVS-II of G_γ (rs113425530), *HindIII* in the IVS-II of A_γ (rs28440105), *HincII* in $\psi\beta$ (rs10128556), *HincII* 3' to $\psi\beta$ (without rs), *HinfI* 5' to β (rs16911905), and *HinfI* 3' to β (rs10837631). Additionally, *HincII* 5' to ϵ (rs3834466) and *AvaII* at IVS-II-16 of β (rs10768683) were determined by gene sequencing. Restriction enzymes used for the haplotype analyses were purchased from New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, USA). Classification of haplotypes was based on Orkin et al.²¹ and Nagel et al. for the β^S gene.²² The assignment of specific haplotypes in heterozygous states should be interpreted with caution if family studies or allele cloning are not performed. In the present study, the interpretation of the results was facilitated by our previous report showing that in 206 Hb SS children from Minas Gerais, 98.5% of the β^S chromosomes were of the types CAR or Ben.²³

A Coulter T-890 hematology counter was used to perform all blood cell counts. Reticulocytes were counted in blood smears stained with brilliant cresyl blue. All hematological values were transcribed from the medical records in the absence of acute clinical manifestations and at least three months after the use of blood products. The mathematical average of each item was considered as the baseline value for each patient. The relative baseline concentration of Hb F was obtained from the Hb electrophoresis results reported in each patient's medical record. The results of electrophoresis testing performed at the oldest age possible within the follow-up period were used as long as the sample had been collected after two years of age.

Transcranial Doppler (TCD) examinations were performed in 14 children and interpreted by a single expert using a Nicolet equipment (model EME TC 2000, Nicolet, Madison, WI, USA). High-risk TCD was defined as a time-averaged mean of the maximum velocity (TAMMX) ≥ 200 cm/s in the internal carotid or middle cerebral artery as originally defined by stroke prevention in sickle cell anemia (STOP) investigators.²⁴ The examination could not be performed in five patients: three examinations were impossible because of the lack of cooperation on the part of the children and two were not performed because the children failed to attend the examination.

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences program (SPSS), version 20.0. Quantitative results are expressed as the average \pm standard deviation or as the median and range when distribution was non-Gaussian. Prevalence was expressed as a percentage and a 95% confidence interval (CI) was applied. Unpaired *t* tests were used to compare mean values between Hb S/D-Punjab and Hb S-Korle Bu groups. Test results were considered significant when the probability of alpha error was ≤ 0.05 .

The study was approved by the Ethics Research Committee at the involved institutions (case No. 13327713.5.0000.5149). It was conducted in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2008. Patients and/or guardians were asked to sign the informed consent form.

Results

The incidence of Hb FSD at birth was 1:171,000 (95% CI: 1:120,000–1:299,000). Molecular analyses were applied to

samples from 19 out of the 21 children because as previously mentioned, sample collection from two children was not possible. The ages ranged from 2.8 to 16.2 years, with a median of 8.9 years. Thirteen children were male (68.4%) and six were female (31.6%).

Out of the 19 children, 11 children (ten families) were diagnosed with Hb S/D-Punjab disease and eight were diagnosed with Hb S-Korle Bu. No other variants were found. Gender distribution in the Hb S/D-Punjab group was four females (36.4%) and seven males (63.6%) and gender distribution in the Hb S-Korle Bu group was two females (25%) and six males (75%). The median age was 11 years (range: 2.8–16.2) in the Hb S/D-Punjab group and 7.7 years (range: 3–13.7) in the Hb S-Korle Bu group.

All children of the Hb S/D-Punjab group were found to have baseline Hb levels below 10 g/dL (average: 8.0 g/dL) and the reticulocyte counts varied. The baseline values of the hematologic tests and genetic results for each child are reported in Table 1. Figure 2 compares the main results found in both groups. The Hb S/D-Punjab group was found to have lower average baseline Hb values and higher reticulocyte counts than the Hb S-Korle Bu group (*p*-value < 0.001 for both comparisons). Relative Hb F concentrations were higher in the children of the Hb S/D-Punjab group (*p*-value = 0.001). Total leukocyte and platelet counts were also higher in the Hb S/D-Punjab group (*p*-value = 0.003 and *p*-value = 0.06, respectively). Mean ratios between Hb S and Hb D concentrations were 1.06 and 1.14 in the Hb S/D-Punjab and Hb S-Korle Bu groups, respectively (*p*-value = 0.61).

The coinheritance of alpha-thalassemia ($\alpha\alpha/\alpha^3.7$) was detected in four children (two with Hb S/D-Punjab and two with Hb S-Korle Bu). Mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular Hb (MCH) were significantly lower in children who co-inherited the alpha-thalassemia deletion (*p*-value = 0.008 and *p*-value = 0.03, respectively). The Hb S/D-Punjab group was analyzed separately: the MCVs of the patients with and without alpha-thalassemia averaged 76.6 fL and 85.9 fL, respectively (*p*-value = 0.001), while the MCHs averaged 24.2 pg and 29.1 pg, respectively (*p*-value = 0.001).

In terms of the associated clinical findings, two (18.2%) of the children in the Hb S/D-Punjab group had acute splenic sequestration crises (ASSCs), and all 11 experienced at least one acute pain episode. However, there were no ASSCs in the Hb S-Korle Bu group, and three patients (37.5%) had at least one acute pain episode reported as such in the patients' medical records. None of the children in the Hb S-Korle Bu group received blood transfusions; however, seven (63.6%) children in the Hb S/D-Punjab group received transfusions.

No child had an overt stroke. Mean Doppler TAMMX values for Hb S/D-Punjab and Hb S-Korle Bu children were 131.1 cm/s [standard error of the mean (SEM): 6.7] and 89.2 cm/s (SEM: 6.5), respectively (*p*-value = 0.001). All children were classified as being at low risk for strokes.

Baseline oxygen saturation was lower in the Hb S/D-Punjab group and significantly differed from the Hb S-Korle Bu group. Average values in the two groups were 91.9% and 97%, respectively (*p*-value = 0.002). There were no deaths in the study population.

Clinical treatment was also reviewed. All patients received a prescription for antimicrobial prophylaxis, daily folic acid supplements, and immunizations. Three (27.3%) of the

Table 1 – Mean baseline hematological data and genetic results of 11 children with Hb S/D^{Punjab} and eight children with Hb S-Korle-Bu.

Id/Gender	Hemoglobin (g/dL)	Leukocytes ($\times 10^9/L$)	Platelets ($\times 10^9/L$)	Reticulocytes (%)	Hb F (%)	Hb S (%)	Hb D (%)	β^S haplotype/ $\alpha^{-3.7}$ thal ^b
Children with Hb S/D^{Punjab} (n = 11)								
1/F	7.2	13.9	347.7	4.0	13	48	37	CAR/–
2/M	7.9	16.1	431.8	14.7	13	45	39	ATP/–
3/F	6.8	13.7	368.0	8.7	14	38	44	BEN/–
4/M	6.8	18.0	552.0	7.5	4	44	37	CAR/–
5/F	8.3	15.2	300.2	9.5	22	41	35	BEN/–
6/M ^a	8.6	11.2	335.0	3.9	23	33	40	BEN/+
7/F	9.5	12.6	353.8	3.2	16	47	39	BEN/–
8/M ^a	8.9	15.0	454.0	6.4	21	36	40	BEN/–
9/M	8.4	13.6	432.2	10.3	10	40	46	CAR/+
10/M	6.2	13.3	308.8	8.7	16	39	35	CAR/–
11/M	9.5	11.2	430.9	5.9	25	37	36	BEN/–
Mean	8.0	14.0	392.2	7.5	16.1	40.7	38.9	
Children with Hb S-Korle-Bu (n = 8)								
1/M	11.7	12.2	397.3	1.8	6	58	34	CAR/+
2/M	12.8	10.8	366.9	1.2	9	45	45	CAR/–
3/M	11.5	7.1	326.6	1.0	7	45	42	CAR/–
4/F	12.8	7.7	257.0	1.1	6	59	33	BEN/–
5/F	13.2	10.1	275.6	0.4	9	41	48	CAR/+
6/M	12.3	11.4	331.7	0.6	6	39	52	CAR/–
7/M	12.0	14.3	407.9	1.3	4	50	44	CAR/–
8/M	11.8	10.5	266.3	0.8	8	39	50	CAR/–
Mean	12.3	10.5	328.7	1.0	6.9	47.0	43.5	

^a Brothers.

^b Co-inheritance (+ or –) of the alpha-thalassemia gene $-\alpha^{3.7}$ ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$).

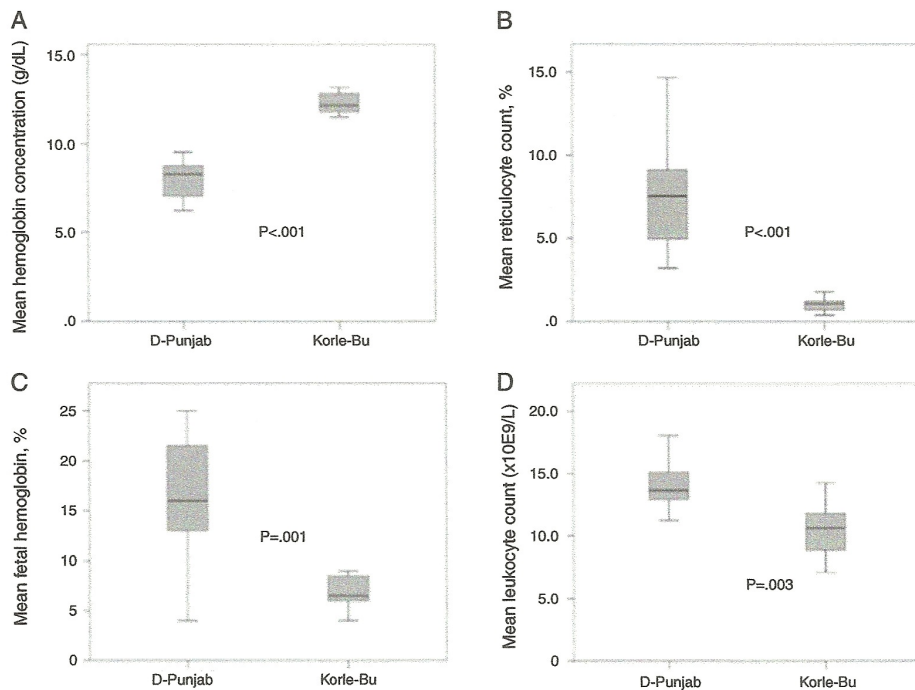


Figure 2 – Mean baseline hematological data of 11 children with Hb S/D-Punjab and eight children with Hb S-Korle Bu. (A) Total hemoglobin concentration (g/dL); (B) reticulocytes (%); (C) fetal hemoglobin (%); (D) leukocyte count ($\times 10^9/L$). The unpaired t test was used to compare mean values between Hb S/D-Punjab and Hb S-Korle Bu groups.

Table 2 – Clinical and laboratorial data in three children with Hb SD-Punjab and response to hydroxyurea.

Id/gender	Age (years) at start of HU	Clinical indication for HU	Dose (mg/kg/day)	Duration (months)	Before hydroxyurea		After hydroxyurea		Decreased number of clinical events
					Total Hb (g/dL)/Hb F (%)	Ret (%)	Total Hb (g/dL)/Hb F (%)	Ret (%)	
11/M	14	Severe vaso-occlusive pain episodes	20	8	9.5/26.7	6.1	11.1/34	0.4	Yes
9/M	6.6	Severe vaso-occlusive pain episodes	27	76	8.5/9.0	8.4	10.2/17	3.4	Yes
4/M ^a	0.8	Anemia	15	36	7.6/4.0	11.7	8.8/20	6.3	Yes
	8	Severe vaso-occlusive pain episodes	26	27					

Id: identification refers to numbers in Table 1; HU: hydroxyurea; Ret: reticulocyte count.

^a This child was given hydroxyurea in August 2005 because of Hb < 5.0 g/dL. Hydroxyurea was withdrawn in July 2008 by his mother, not by the hematologist. The drug was restarted in September 2012, because of multiple episodes of vaso-occlusive pain.

children with Hb S/D-Punjab disease were found to have used hydroxyurea, as indicated for recurring episodes of pain crisis. All children presented increased total Hb and Hb F as well as lower reticulocyte counts and fewer pain episodes after hydroxyurea therapy. Another patient who had also received an indication for the use of hydroxyurea because of recurring pain crises is likely to begin using the medication soon. Table 2 shows the data on the use of hydroxyurea.

Haplotyping of Hb S/D-Punjab showed that all patients presented haplotype I for the D-Punjab allele (+----+++, for the eight analyzed polymorphic sites in the 5'→3' direction). In respect to the β-globin gene cluster, six were Benin, four CAR, and one had an atypical haplotype (+----+++, e.g., haplotype I in homozygosis). Similarly, all Hb S-Korle Bu alleles presented haplotype I. Seven had the β^S CAR haplotype and only one, the β^S Benin haplotype.

Comparing hematological data between β^S CAR and β^S Benin haplotypes within the Hb S/D-Punjab group of children, Hb concentration (7.2 g/dL versus 8.6 g/dL, respectively) and fetal Hb (10.8% versus 20.2%, respectively) were significantly higher for the Benin haplotype (*p*-value=0.05 and *p*-value=0.01, respectively). No other data, including Doppler TAMMX values, oxygen saturation, and number of transfusions, were significantly different between CAR and Benin groups.

Discussion

Two variants with the IEF profile of Hb D were identified: D-Punjab and Korle Bu. The clinical and laboratory characteristics of the two groups were very different.

Children with Hb S/D-Punjab disease presented many different symptoms. This clinical course is similar to that observed in children with homozygous Hb SS disease as has already been reported in other studies.^{10,11,16,17,25} Oberoi et al. evaluated ten patients aged between 1 and 19 years. All of them presented with moderate or severe anemia (average: 6.8 g/dL) and at least one clinical complication related to the

disease, such as pain crisis, acute chest syndrome, gallstones, avascular necrosis of femoral head, and recurrent infections. Furthermore, eight patients required an average of three red blood cell transfusions during their clinical follow-up period.¹¹ In the present study, blood transfusions were required by 63.6% of patients.

Italia et al. reported on 15 patients with ages between 1 and 34 years. They classified only one patient as mild; two were classified as having experienced moderate crises, and 12 were found to have severe hemolytic anemia; these 12 presented recurrent pain crises and required frequent transfusions.¹⁰ El-Kalla & Mathews evaluated nine patients aged between 3 and 10 years in the United Arab Emirates. They reported pain crises of varying intensity, acute splenic sequestration crises, and repeated infections in seven patients. The other two children were asymptomatic, although anemic and with increased reticulocyte counts.¹⁷ The largest sample size in the literature was published by Patel et al. Of 42 Indian patients with an average age of 22 years, 25 were considered to be severe cases for presenting three or more acute pain crises and/or the need of two or more blood transfusions in the year prior to the study.²⁵

The group of children with Hb S-Korle Bu disease did not present clinical complications. Three children presented with mild to moderate diffuse abdominal pain that was considered secondary to the underlying disease. However, a pain crisis is frequently inferred as the cause of abdominal pain when signs and symptoms related to other etiologies (such as fever, vomiting, and blood in the stools) are absent in children. During the crises, these children are generally assumed to have Hb S/D-Punjab even if they have not been submitted to molecular testing. Pain crises may be difficult to distinguish from other equally prevalent etiologies in children such as constipation and functional abdominal pain.²⁶ It is known that abdominal pain affects 38% of the school-aged pediatric population weekly; no reliable biological markers clearly define a diagnosis of functional pain.²⁷ In addition, few studies show that the clinical course of Hb S-Korle Bu disease carriers may be mild, with minor or even absent symptoms, but the number

of patients and length of follow-up preclude a solid conclusion. Some authors have compared these patients to sickle cell trait carriers.⁷ Therefore, the exact definition of the Hb D variant that the patient has is important for the correct differential diagnosis of abdominal pain in children. It also aids in decreasing both the unnecessary stigma against chronic diseases and unnecessary treatments, such as the indiscriminate use of powerful anti-inflammatory medications and painkillers.

There seems to be no reports available in the literature about transcranial Doppler examinations in children with Hb SD disease. In the present study, all children were found to be at low risk for strokes. As expected, the mean value of TAMMX was significantly higher in Hb S/D-Punjab than in Hb S-Korle Bu children because the Hb concentration was significantly lower in the former group.

Higher Hb F baseline percentages were observed in the Hb S/D-Punjab group; there was a statistically significant difference from the values observed in the Hb S-Korle Bu group. The influence of this percentage on decreasing symptoms in children with Hb S/D-Punjab disease remains unclear. This association has been described in patients with Hb SS disease and has been explained by the fact that red blood cells with larger quantities of Hb F possess lower levels of Hb S; therefore, they have a lower chance of sickling, and as a result, a lower probability of experiencing clinical manifestations.²⁸ Patel et al. found higher Hb F concentrations to be associated with a lower frequency of acute pain crises in the 42 patients with Hb S/D-Punjab disease.²⁵ Meanwhile, three other studies failed to find this association; however, they did include much smaller sample populations than Patel et al. The other studies included five, nine, and 15 patients, respectively.^{9,10,17}

Three children with the Hb S/D-Punjab variant took hydroxyurea, and all children experienced significant clinical and laboratory improvements. In children with Hb SS, the use of hydroxyurea has been determined to be safe and to provide satisfactory results.²⁹ In patients with Hb SD disease, the data on the efficacy and safety of this medication are limited to isolated cases¹⁹ and to a few studies with a larger number of cases. Out of the ten children included in the study by Oberoi et al., five received hydroxyurea to treat recurrent pain episodes and/or severe anemia. Their follow-up periods ranged from 6 to 50 months. In all cases, there was a decrease in the number of pain crises and a lack of significant side effects.¹¹ The largest cohort included 20 Indian patients aged between 1 and 45 years who took hydroxyurea for at least two years. Decreased frequencies of crises and interruptions in transfusions were recorded for all patients. No side effects were observed.¹⁸

Haplotype I is the commonest type of D-Punjab allele in almost all ethnic populations so far described.^{6,14,15,30} The exception is Thailand, where haplotype II was found in nine patients from five families.³¹ So it is impossible to trace back the origin of the allele in the population of this study. Haplotypes for the Hb Korle Bu allele have not been described yet. Because all children in the present study are also type I, it is improbable that the origin of the allele will be determined for sure. It would be interesting to know whether the same

haplotype is present in Western Africa where the mutation seemingly originated.⁵

As far as is known from international reports, the present study demonstrated for the first time that, within the Hb S/D-Punjab group, children with the β^S Benin haplotype had higher total Hb concentrations and higher relative concentrations of fetal Hb than children with the β^S CAR haplotype.

The limitations of the present study include the fact that it was a retrospective analysis and a low number of patients were involved. These factors limit conclusions regarding the incidence of clinical complications in cases of Hb S/D-Punjab and Hb S-Korle Bu disease as well as a reliable evaluation of the late-onset effects of the use of hydroxyurea. Furthermore, had high performance liquid chromatography (HPLC) been used as the primary screening test at PTN-MG, children with Hb S-Korle Bu would not be classified as having Hb SD, but instead as having an unknown variant within the HPLC window of Hb A2/Hb E.

In conclusion, this is the first study in Brazil to evaluate children with Hb SD disease detected at birth by IEF. It offers a clear description of two variants: Hb S/D-Punjab and Hb S-Korle Bu. Early newborn screening and the systematic genetic study of Hb D variants are useful in treating patients and in informing the family members about the prognosis of each variant. Children with Hb S/D-Punjab have a clinical course similar to those with Hb SS disease. The subgroup with the β^S CAR haplotype have lower total Hb concentrations and lower relative Hb F concentrations than those with the β^S Benin haplotype, but the limited number of patients precludes definitive conclusions. In contrast, the clinical course and laboratory data in children with Hb S-Korle Bu appear to be similar to those in children with the sickle cell trait, but caution should be taken with this statement, considering the limited number of children and short follow-up thus far reported.

Funding

Fundação Hemominas, Newborn Screening Program (Nupad-UFMG), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors acknowledge all subjects and parents for their cooperation in the study. The authors also thank the financial support of Fundação Hemominas, Newborn Screening Program (Nupad-UFMG), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG; grant # PPM-00780-15), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant # 448594/2014-5).

REFERENCES

- Smith EW, Conley CL. Sick cell hemoglobin D disease. *Ann Intern Med.* 1959;50(1):94-105.
- Cawein MJ, Lappat EJ, Brangle RW, Farley CH. Hemoglobin S-D disease. *Ann Intern Med.* 1966;64(1):62-70.
- Torres LS, Okumura JV, Silva DG, Bonini-Domingos CR. Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2015;37(2):120-6.
- Itano HA. A third abnormal hemoglobin associated with hereditary hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1951;37(12):775-84.
- Honig GR, Seeler RA, Shamsuddin M, Vida LN, Mompoin M, Valcourt E. Hemoglobin Korle Bu in a Mexican family. *Hemoglobin.* 1983;7(2):185-9.
- Yavarian M, Karimi M, Paran F, Neven C, Hartevelde CL, Giordano PC. Multi centric origin of Hb D-Punjab [β 121(GH4)Glu→Gln, GAA>CAA]. *Hemoglobin.* 2009;33(6):399-405.
- Akl PS, Kutlar F, Patel N, Salisbury CL, Lane P, Young AN. Compound heterozygosity for hemoglobin S [β 6(A3)Glu6Val] and hemoglobin Korle Bu [β 73(E17)Asp73Asn]. *Lab Hematol.* 2009;15(3):20-4.
- Adachi K, Kim J, Ballas S, Surrey S, Asakura T. Facilitation of Hb S polymerization by the substitution of Glu for Gln at beta 121. *J Biol Chem.* 1988;263(12):5607-10.
- Adekile A, Mullah-Ali A, Akar NA. Does elevated hemoglobin F modulate the phenotype in Hb SD-Los Angeles? *Acta Haematol.* 2010;123(3):135-9.
- Italia K, Upadhye D, Dabke P, Kangane H, Colaco S, Sawant P, et al. Clinical and hematological presentation among Indian patients with common hemoglobin variants. *Clin Chim Acta.* 2014;431:46-51.
- Oberoi S, Das R, Trehan A, Ahluwalia J, Bansal D, Malhotra P, et al. HbHb S/D-Punjab: clinical and hematological profile of a rare hemoglobinopathy. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2014;36(3):e140-4.
- Nagel RL, Lin MJ, Witkowska HE, Fabry ME, Bestak M, Hirsch RE, et al. Compound heterozygosity for hemoglobin C and Korle Bu: moderate microcytic hemolytic anemia and acceleration of crystal formation. *Blood.* 1993;82(6):1907-12.
- Adachi K, Kim J, Kinney TR, Asakura T. Effect of the beta 73 amino acid on the hydrophobicity, solubility, and the kinetics of polymerization of deoxyhemoglobin S. *J Biol Chem.* 1987;262(22):10470-4.
- Patel DK, Mashon RS, Patel S, Dash PM, Das BS. Beta-globin gene haplotypes linked with the Hb D-Punjab [β 121(GH4)Glu→Gln, GAA>CAA] mutation in eastern India. *Hemoglobin.* 2010;34(6):530-7.
- Rahimi Z, Akramipour R, Korani S, Nagel RL. Hb D-Punjab [β 121 (GH4) Glu→Gln]/ β 0-thalassemia [IVSII.1(G→A)] in two cases from an Iranian family: first report. *Am J Hematol.* 2006;81(4):302-3.
- Kelleher JF Jr, Park JO, Kim HC, Schroeder WA. Life-threatening complications in a child with hemoglobin SD-Los Angeles disease. *Hemoglobin.* 1984;8(3):203-13.
- el-Kalla S, Mathews AR. Hb D-Punjab in the United Arab Emirates. *Hemoglobin.* 1997;21(4):369-75.
- Patel S, Purohit P, Mashon RS, Dehury S, Meher S, Sahoo S, et al. The effect of hydroxyurea on compound heterozygotes for sickle cell-hemoglobin D-Punjab – a single centre experience in eastern India. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(8):1341-6.
- Udden MM, Lo MN, Sears DA. Successful hydroxyurea treatment of a patient with SD hemoglobinopathy. *Am J Hematol.* 1999;60(1):84-5.
- Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood.* 2001;98(1):250-1.
- Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, et al. Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. *Nature.* 1982;296(5858):627-31.
- Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, Zohoun I, Wajcman H, Baudin V, et al. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. *N Engl J Med.* 1985;312(14):880-4.
- Belisário AR, Martins ML, Brito AM, Rodrigues CV, Silva CM, Viana MB. β -Globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or S β^0 -thalassemia and their association with clinical and hematological features. *Acta Haematol.* 2010;124(3):162-70.
- Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med.* 1998;339(1):5-11.
- Patel DK, Purohit P, Dehury S, Das P, Dutta A, Meher S, et al. Fetal hemoglobin and alpha thalassemia modulate the phenotypic expression of HbHb S/D-Punjab. *Int J Lab Hematol.* 2014;36(4):444-50.
- Rhodes MM, Bates DG, Andrews T, Adkins L, Thornton J, Denham JM. Abdominal pain in children with sickle cell disease. *J Clin Gastroenterol.* 2014;48(2):99-105.
- Saps M, Seshadri R, Sztainberg M, Schaffer G, Marshall BM, Di Lorenzo C. A prospective school-based study of abdominal pain and other common somatic complaints in children. *J Pediatr.* 2009;154(3):322-6.
- Steinberg MH, Rodgers GP. Pharmacologic modulation of fetal hemoglobin. *Medicine.* 2001;80(5):328-44.
- Thornburg CD, Files BA, Luo Z, Miller ST, Kalpatthi R, Iyer R, et al. Impact of hydroxyurea on clinical events in the BABY HUG trial. *Blood.* 2012;120(22):4304-10.
- Atalay EÖ, Atalay A, Üstel E, Yıldız S, Öztürk O, Kösele A, et al. Genetic origin of Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln, GAA→CAA] according to the β -globin gene cluster haplotypes. *Hemoglobin.* 2007;31(3):387-91.
- Fucharoen S, Changtrakun Y, Surapot S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K. Molecular characterization of Hb D-Punjab [β 121(GH4)Glu→Gln] in Thailand. *Hemoglobin.* 2002;26(3):261-9.

5.2. Hemoglobinopatia SC

5.2.1. Mortalidade e curva de sobrevida (n = 539)

Das crianças nascidas entre 1 de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2012 triadas pelo PTN de Minas Gerais e encaminhadas ao HBH, 569 apresentavam o perfil hemoglobínico FSC. Como já resumido pela figura 2 da seção 4.3.2, foram excluídas 30 crianças devido a transferência para outra unidade da Fundação Hemominas ou a perda de seguimento clínico.

Entre as 539 crianças remanescentes, ocorreram 23 óbitos, o que resulta em taxa de mortalidade de 4,3%. A figura 3 mostra que em 26% (6/23) dos casos não foi possível determinar a causa do óbito. Entre as causas conhecidas, houve 10 casos (43,5%) relacionados a complicações infecciosas, sendo 6 (26%) episódios de pneumonia/síndrome torácica aguda (STA) e 4 (17,4%) de sepse. Dos sete óbitos remanescentes, três ocorreram após sequestro esplênico agudo (SEA). Crise aplásica aguda, gastroenterite/desidratação, traumatismo crânio-encefálico (TCE) e choque hemorrágico foram responsáveis por um óbito, cada uma delas.

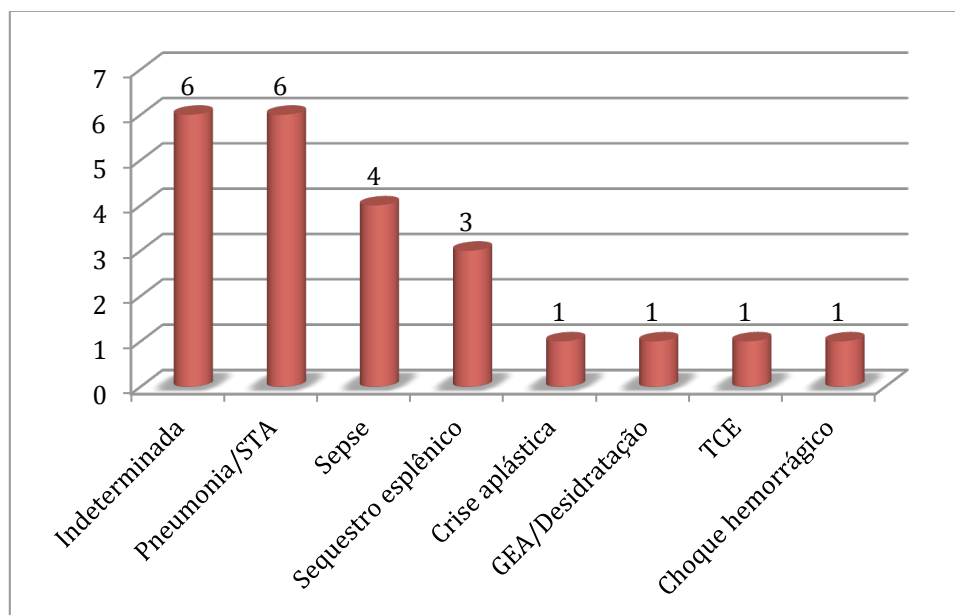


Figura 3 – Causas de óbito das 23 crianças entre as 539, que nasceram no período de 1 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2012 e faleceram durante o seguimento, segundo as informações obtidas do documento de óbito e de dados do estudo de Sabarense (135).

A tabela 1 mostra dados relacionados à idade ao óbito das 23 crianças. Ela variou entre 3 meses e 9 anos e 8 meses, com mediana de 3 anos e 2 meses. A distribuição dos óbitos de acordo com a faixa etária pode ser observada na figura 4. Nota-se que 34,8% e 65,2% das 23 crianças faleceram com idade inferior a 2 e a 5 anos, respectivamente.

Tabela 1: Idade ao óbito das 23 crianças entre as 539 que nasceram no período de 1 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2012

	Idade ao óbito
Média	3 anos e 9 meses
Mínimo	3 meses
P25	11 meses
Mediana	3 anos e 2 meses
P75	6 anos e 1 mês
Máximo	9 anos e 8 meses

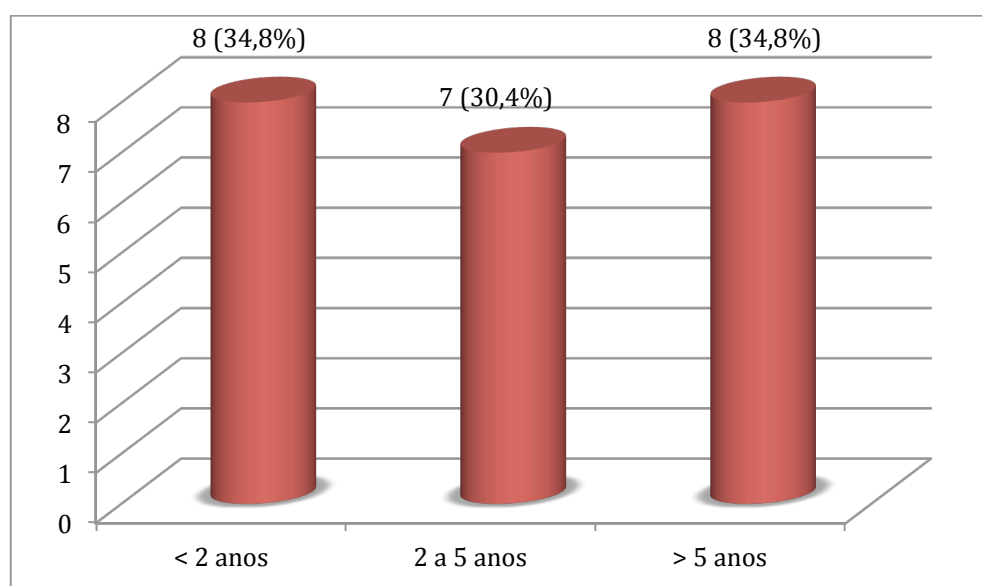


Figura 4: Distribuição por faixa etária dos óbitos das 23 crianças entre as 539 que nasceram no período de 1 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2012.

A figura 5 mostra a curva de sobrevida dessas 539 crianças. A probabilidade estimada de óbito até os 10 anos de vida foi de 5,4% (I.C. 95% = 3,2% a 7,6%). As probabilidades estimadas de óbito desses pacientes com um, dois e cinco anos são de 1,1% (I.C. 95% = 0,1% a 2,1%), 1,5% (I.C. 95% = 0,5% a 2,5%) e 3,0% (I.C. 95% = 1,4% a 4,6%), respectivamente.

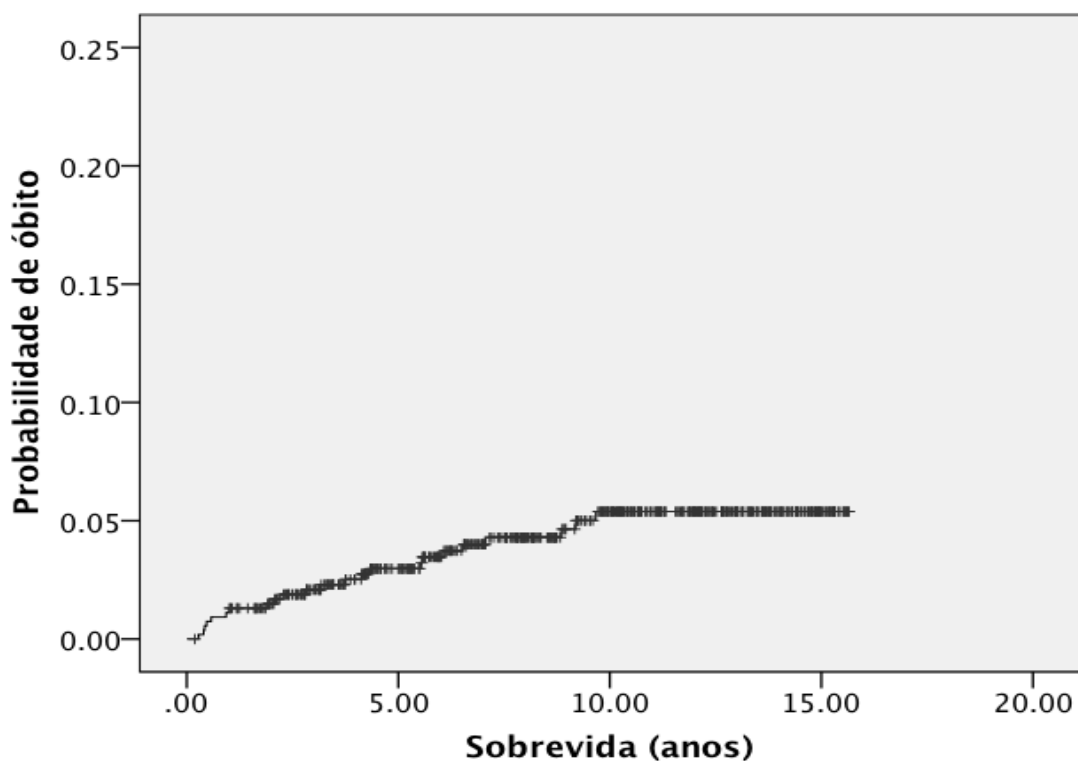


Figura 5: Curva de sobrevida das 539 crianças com hemoglobinopatia SC, que nasceram no período de 01 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2012, acompanhadas no HBH (método de Kaplan-Meier) até 31 de dezembro de 2014.

5.2.2. Caracterização da amostra de crianças em que o TCLE foi colhido (n=461)

Na população total de 539 crianças, a coleta de TCLE ou contato com as famílias não foi possível em 78 casos (figura 2 da seção 4.3.2.), resultando, assim, na casuística final do estudo de 461 crianças. Todos os dados descritos a seguir referem-se a essa casuística.

A figura 6 mostra a distribuição dos pacientes por gênero, com discreto predomínio do masculino.

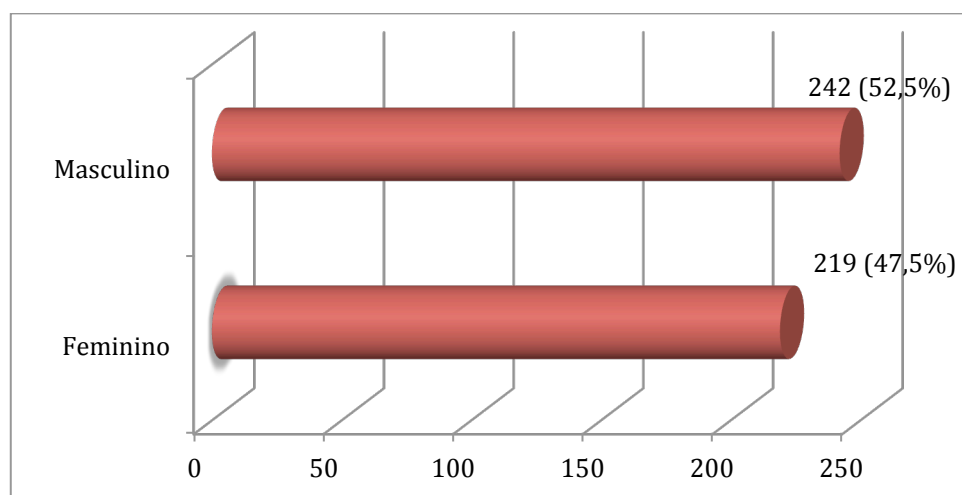


Figura 6: Distribuição dos 461 pacientes com hemoglobinopatia SC por gênero

A idade ao final do período de observação para os pacientes que não faleceram durante o período do estudo variou de 1 ano a 15 anos e 8 meses, com mediana de 9 anos e 2 meses. A figura 7 mostra a distribuição das crianças conforme o local de residência, sendo que a maior parte delas (58%) morava em Belo Horizonte ou região metropolitana à época do diagnóstico.

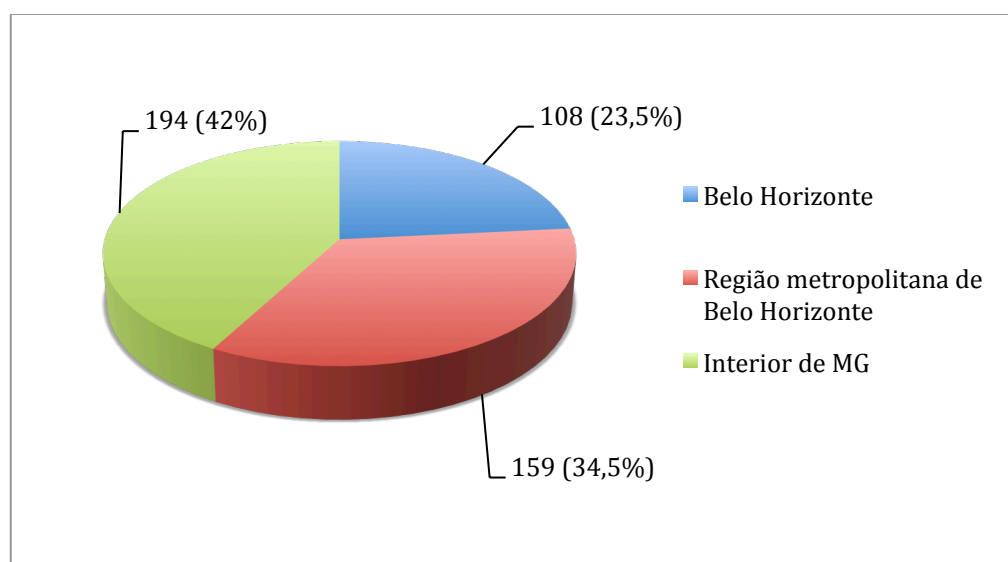


Figura 7: Endereço de residência das 461 crianças com hemoglobinopatia SC, nascidas entre 1 de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2012 e encaminhadas ao Hemocentro de Belo Horizonte

A figura 8 mostra a distribuição das crianças em relação ao ano de nascimento, com média de 33 crianças por ano.

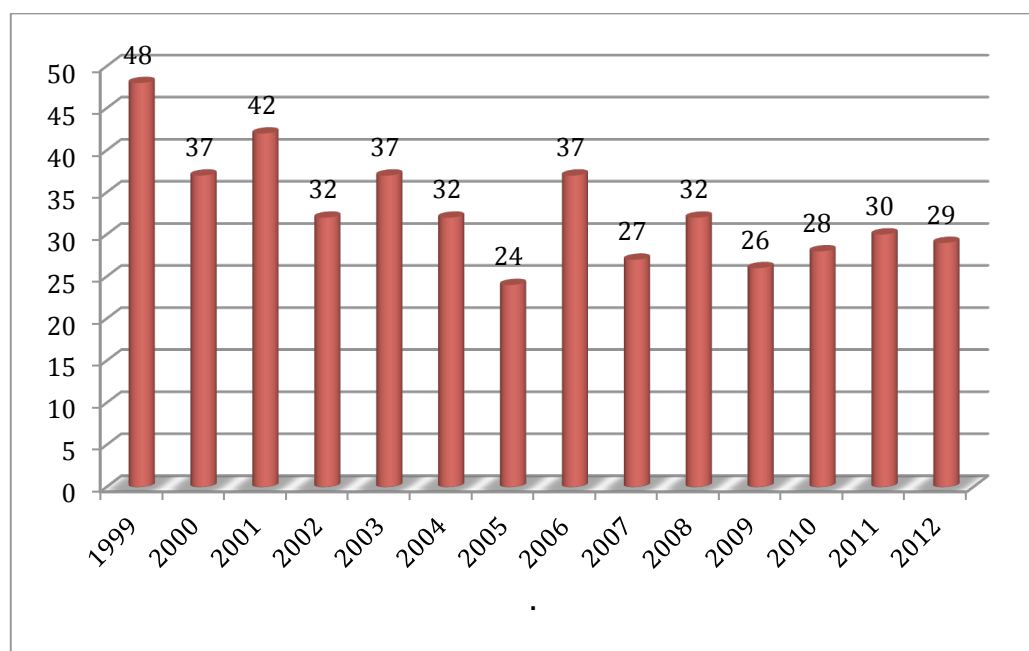


Figura 8 - Ano do nascimento das 461 crianças com perfil hemoglobínico FSC incluídas no estudo, ao longo do período proposto.

As crianças apresentaram hemoglobina mediana de 10,5 g/dL e contagem mediana de reticulócitos de 3,2%. A distribuição de valores dos exames hematológicos registrados no banco de dados estão representados, de forma condensada, na tabela 2.

Tabela 2: Valores médios dos exames hematológicos dos pacientes incluídos no estudo.

	Hemoglobina (g/dL, n=450)	Leucometria (/mm ³ , n=457)	VCM (fL, n=457)	HCM (pg, n=428)	Hb Fetal (%, n= 316*)	Hb S (%, n= 405)	Hb C (%, n= 405)	Plaquetometria (/mm ³ , n=457)	Reticulócitos (%, n= 442)
Média	10,5	11236	75,8	24,9	4,9	46,8	45,4	337098	3,4
Mínimo	7,9	5374	53	16,8	0,5	21,5	25	129500	0,6
p25	10	9399	72	23,4	3,0	45,7	44	279619	2,4
Mediana	10,5	11067	75,9	24,9	4,0	47,5	46	327769	3,2
p75	11	13015	80,1	26,5	6,0	49	47,5	385857	4,2
Máximo	12,5	24514	93,2	38,3	27,0	56	53,5	786000	12,8

* Só foram incluídos os exames de Hb fetal nas crianças com idade superior a 2,0 anos.

5.2.3. Características clínicas

Trezentas e dezessete crianças (68,8%) apresentavam baço palpável abaixo do rebordo costal esquerdo em algum momento da evolução clínica, na ausência de processo infeccioso (tamanho basal do baço). As médias do valor máximo e do último valor do tamanho do baço pela palpação abdominal no exame clínico foi de 2 e 0,5 centímetros abaixo do rebordo costal esquerdo, respectivamente. As médias de idade quando da medida do valor máximo e do último valor foi 5 anos e 9 meses, e 8 anos e 7 meses, respectivamente.

Trezentos e quarenta e quatro pacientes (74,6%) apresentaram pelo menos uma crise vaso-oclusiva dolorosa (CVO), totalizando 2.043 eventos clínicos, com necessidade de internação hospitalar em 21,9% deles (447). O tempo para o primeiro registro de CVO variou entre 2 meses e 15 anos, com mediana de 5 anos e 1 mês. A incidência de CVO para toda a população avaliada foi de 51 crises por 100 pacientes-ano (IC 95% = 48,9 a 53,4), ou seja, cerca de uma CVO por paciente para cada dois anos em que a coorte foi observada. Cabe ressaltar que aproximadamente 25% das crianças não tiveram nenhuma CVO registrada nos prontuários médicos durante o período de observação. Cerca de 50% dos pacientes tiveram até uma CVO a cada 3 anos, enquanto 12% apresentaram pelo menos uma CVO por ano.

Em relação aos eventos infecciosos associados, 425 crianças (92,2%) apresentaram 2.486 episódios, com incidência de 62,2 episódios de infecção por 100 paciente-ano (IC 95% = 59,8 a 64,8). Ressalte-se que 7,8% dos pacientes não tiveram nenhuma infecção registrada durante um período médio de 4,4 anos, 54,9% dos pacientes apresentaram pelo menos uma infecção registrada a cada 2 anos e que cerca de 20% teve registrada uma ou mais infecções por ano até o máximo de quatro infecções a cada 3 anos de observação. Houve maior prevalência de infecção de vias aéreas superiores (26,5%), seguidas de pneumonia/síndrome torácica aguda (17,2%), amigdalite (14,6%), otite média aguda (8%) e febre sem foco definido (6,2%), como mostra a figura 9.

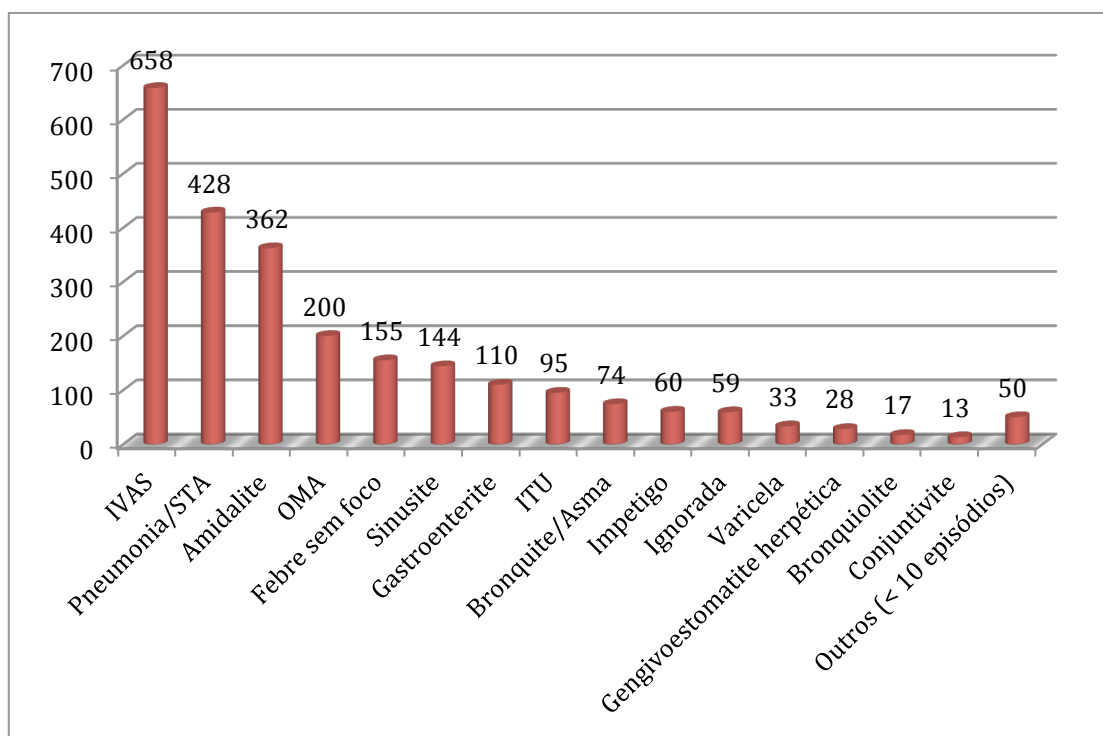


Figura 9: Distribuição dos 2.486 eventos clínicos infecciosos em 461 crianças com hemoglobinopatia SC.

Dentro da casuística estudada e do tempo de avaliação proposto, 68 (14,8%) pacientes apresentaram um total de 88 eventos de sequestro esplênico agudo (SEA), com distribuição do número de eventos por criança relacionada na tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição do número de eventos por paciente nas 68 crianças acometidas por SEA.

	Número de pacientes	Número de eventos	Total
	51	1	51
	14	2	28
	3	3	9
Total	68	-	88

Desse total, observa-se que 51 pacientes tiveram somente um episódio, enquanto 17 tiveram mais de um SEA, indicando uma recorrência de 25%.

A incidência de SEA foi de 1,9 primeiros eventos por 100 pacientes-ano (IC 95% = 1,5 a 2,4), ou seja, houve a ocorrência de 1,9 primeiros

episódios para cada 100 pacientes, a cada ano em que a coorte foi observada.

A idade ao primeiro evento variou entre 3,5 meses e 12 anos e 10 meses, com mediana de 3 anos e 10 meses. A maior parte dos primeiros episódios de SEA (70% dos 68 casos) ocorreu até 5 anos de vida. A curva de probabilidade de ocorrência do primeiro episódio de SEA está representada na figura 10. A estimativa para a idade de dois e cinco anos, por exemplo, é a de que 2,6% (IC 95% = 1,0% a 4,2%) e 11,8% (IC 95% = 8,7% a 14,9%) das crianças já teriam sofrido o primeiro episódio de SEA quando atingida a idade de dois e cinco anos, respectivamente. A probabilidade estimada para todo o período de observação foi de 20,6% (IC 95% = 15,7% a 25,5%).

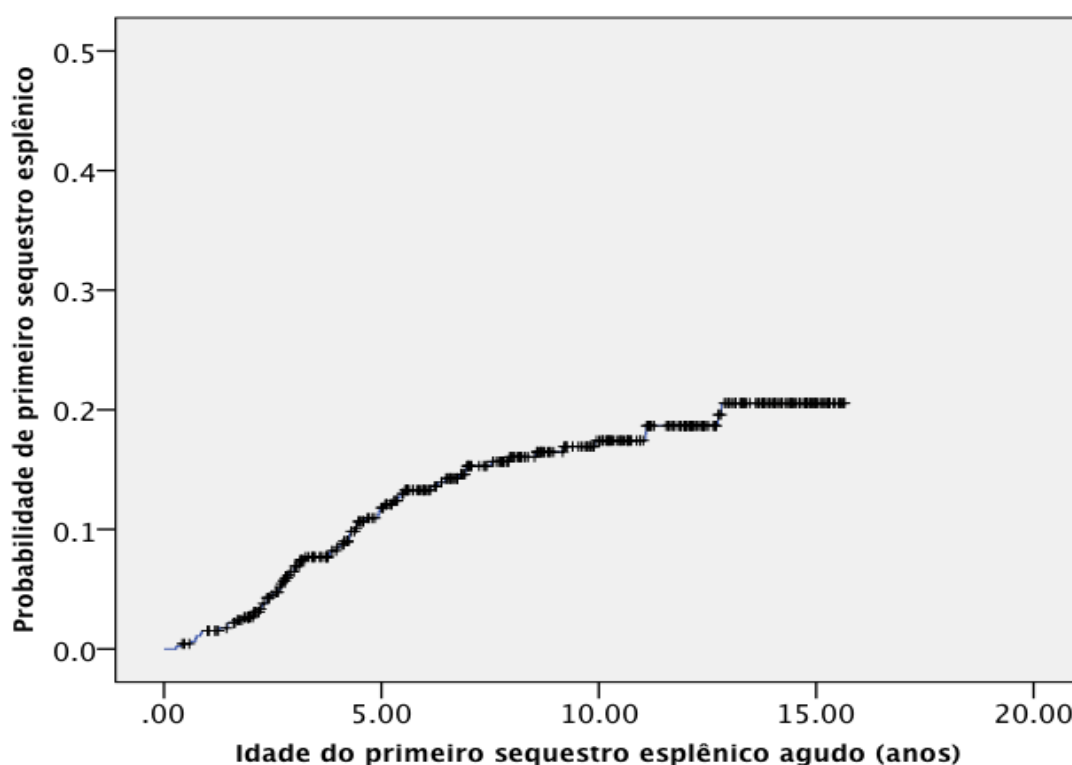


Figura 10 - Curva de probabilidade de ocorrência do primeiro episódio de SEA, conforme tempo de exposição de cada criança (Método de Kaplan-Meier).

Sete crianças foram submetidas a esplenectomia, sendo duas após o primeiro episódio de SEA, três após o segundo e uma após o terceiro. A idade de realização do procedimento variou entre 2 anos e 10 meses e 12 anos e 9 meses, com mediana de 5 anos e 9 meses.

Quatro crianças (0,9%) tiveram episódios de priapismo durante o período de acompanhamento. Um paciente teve dois eventos em um intervalo inferior a 30 dias, com idade de 7 anos e 11 meses, enquanto os outros três tiveram um evento cada, com 6 anos e 3 meses, 7 anos e 4 meses, e 9 anos e 8 meses.

Doppler transcraniano foi realizado em 71 das 461 crianças (15,4%), sendo utilizados os mesmos valores de referência atuais para os pacientes com hemoglobinopatia SS. Todas as crianças apresentaram baixo risco de acidente vascular cerebral isquêmico. A tabela 4 mostra a distribuição das VMMax dos exames realizados.

Tabela 4: Distribuição das velocidades média-máximas (cm/s) do doppler transcraniano de 71 pacientes com hemoglobinopatia SC.

	ACMD (n= 71)	ACME (n= 70)	Artéria basilar (n= 69)	ACID (n= 70)	ACIE (n= 65)	ACAE (n= 68)	ACAD (n= 71)	ACPE (n= 69)	ACPD (n= 71)
Media	95,4	95,2	66,0	76,4	74,3	70,8	70,3	56	58,9
Min	64	62	25	39	48	29	30	24,3	17
p25	86	79	57	66,3	65	60,3	57	50	53
Mediana	95	94,5	64	76,5	74,3	70,5	72	56	62
p75	106	109,3	72	87	82,5	79,6	80	63	67
Max	139	137	113	123	103	122	117	89	84

ACMD: artéria cerebral média direita; ACME: artéria cerebral média esquerda; ACID: artéria carótida interna direita; ACIE: artéria carótida interna esquerda; ACAD: artéria cerebral anterior direita; ACAE: artéria cerebral anterior esquerda; ACPD: artéria cerebral posterior direita; ACPE: artéria cerebral posterior esquerda

Uma criança do gênero feminino, nascida em 24/09/99, apresentou episódio de acidente vascular cerebral isquêmico aos 11 anos de idade (21/10/2010), sendo iniciado regime de exsanguineotransfusão parcial repetida. Foram realizados exames de ecocardiografia transtorácica e transesofágica, que não mostraram presença de comunicações intracardíacas. A investigação clínica e laboratorial para trombofilias apresentou resultado negativo. A angiressonância nuclear magnética

cerebral evidenciou alterações indicativas de vasculopatia bilateral, sendo portanto considerada isquemia provocada pela hemoglobinopatia SC, confirmada por sequenciamento do gene *HBB*. Atualmente, a criança apresenta convívio social adequado para a idade, porém expressa leve/moderada claudicação do membro inferior esquerdo, diminuição leve de acuidade visual e moderada lentidão no raciocínio matemático como sequelas do evento. Encontra-se em tratamento transfusional a cada quatro semanas e acompanhamento psicopedagógico regular.

Sobre a avaliação de órgãos alvo, foram encaminhadas para avaliação oftalmológica 232 crianças (50,3%). Desse total, foi encontrada descrição de realização de fundoscopia em 59 (25,4%), sendo verificada anotação compatível com retinopatia em 12 casos, o que corresponde a 20,3% das crianças que realizaram fundoscopia. A idade mediana da identificação da retinopatia foi de 9 anos e meio. Quanto à avaliação ortopédica, foi encontrado registro de consulta em 12 crianças (2,6%), com descrição de necrose avascular em 7 casos, o que corresponde a 58,3% dos pacientes avaliados. Em relação à localização da necrose avascular, houve predomínio em fêmur esquerdo, com cinco casos. Uma criança apresentou necrose avascular bilateral em ombros e outra apresentou evento também bilateral em fêmur. A respeito da avaliação cardiológica, 130 crianças (28,2%) fizeram ecocardiograma durante o período de seguimento, sendo que 6 delas (4,6%) apresentaram exame compatível com hipertensão pulmonar, com média estimada de 33,5 mmHg de PSAP, que variou entre 31 e 38 mmHg. Não foram encontrados nos prontuários médicos registros referentes ao diagnóstico de nefropatia falciforme em nenhum paciente desta casuística.

Em relação ao tratamento clínico, a prescrição de profilaxia antimicrobiana, suplementação diária com ácido fólico e a indicação de vacinação especial ocorreram para todos os pacientes, conforme o Protocolo para Portadores de Síndromes Falciformes (4). Em relação à avaliação da adesão dos pacientes ao Protocolo para Portadores de Síndromes Falciformes, não foi possível quantificá-la adequadamente, já que não houve padronização no registro desses dados pelos médicos assistentes em cada consulta.

Houve necessidade de transfusão de concentrado de hemácias em 108 crianças (23,4%). Um paciente recebeu 63 transfusões em regime de exssanguineotransfusão parcial como forma de prevenção secundária de acidente vascular cerebral isquêmico. As demais 107 crianças receberam 185 procedimentos transfusionais, com incidência média de 4,7 transfusões por 100 pacientes-ano (IC 95% = 4,0 a 5,4). Foram motivadas por sequestro esplênico agudo, preparo prévio para procedimentos cirúrgicos e intercorrências clínicas ligadas a infecções. Em relação ao número de procedimentos, observou-se que 76,6% dos pacientes não receberam transfusão, 15% receberam uma única transfusão, 8,4% receberam duas ou mais, 1,3% receberam cinco ou mais e que apenas uma criança, além da que foi submetida ao regime de profilaxia secundária de AVC, recebeu sete transfusões durante o período de observação.

Entre as 461 crianças com hemoglobinopatia SC incluídas no estudo, dez (2,2%) encontram-se em uso de hidroxiureia, indicada pela presença de CVO de repetição em seis casos, seguida de necrose avascular de cabeça de fêmur, CVO de repetição mais síndrome torácica aguda e priapismo mais síndrome torácica aguda, em um caso cada. Todos apresentaram significativa redução das crises vaso-oclusivas dolorosas. A criança com necrose óssea evoluiu com melhora acentuada da marcha e expressiva redução da dor. A tabela 5 mostra os dados relacionados ao uso da hidroxiureia.

Tabela 5: Características e resposta dos dez pacientes do grupo SC em uso de hidroxiureia

#	Idade de início de HU (anos)	Indicação de uso de HU	Dose (mg/Kg/dia)	Duração (meses)	Antes do uso de hidroxiureia		Após o uso de hidroxiureia		Redução dos eventos agudos
					Hb total (g/dL) / Hb F (%)	Ret (%)	Hb total (g/dL) / Hb F (%)	Ret (%)	
1	9	CVO + STA	27	24	9,9/5,0	3,5	11,5/16	2,3	Sim
2	3,6	CVO	25	23	10,5/5,0	3,6	11,8/15	1,8	Sim
3	10,6	CVO	11	26	9,1/0,9	5,1	11,2/4,0	2,0	Sim
4	7,1	CVO	10	4	11,6/3,0	0,7	11,7/5,0	1,8	Sim
5	10,2	NACF	15	3	11,6/3,0	4,8	10,5/1,0	3,2	Sim
6	8,5	CVO	20	7	11,4/1,0	1,0	10,4/5,0	4,0	Sim
7	13	CVO	29	8	12,0/0,6	4,0	11,8/?	3,6	Sim
8	8,9	CVO	32	28	11,2/3,0	5,1	11,0/8,0	3,0	Sim
9	6,9	STA + priapismo	24	20	10,2/5,0	1,8	10,8/11	2,0	Sim
10	12,8	STA	23	5	10,8/1,0	2,0	11,3/?	2,2	Sim

HU: hidroxiureia; CVO: crises vaso-oclusivas dolorosas; Ret: reticulócitos; STA: síndrome torácica aguda; NACF: necrose avascular de cabeça de fêmur; ?: ausência de dado disponível em prontuário médico.

5.2.4. Co-herança de alfa talassemia

Entre as 461 crianças, 387 (83,9%) realizaram exame para pesquisa de co-herança de alfa talassemia; 78 (20,2%) apresentaram resultado positivo (IC 95%: 16,3 – 24,5). Em uma criança foi encontrada deleção de dois genes ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) e em 77, deleção de um gene ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$).

Em relação aos dados clínicos, houve diferença significativa na incidência de CVO, transfusões e infecções entre os dois grupos. A tabela 6 mostra que o risco aproximado das crianças sem alfa talassemia para apresentarem CVO, infecções e transfusões de concentrado de hemácias foi 1,7 , 1,3 e 2,9 vezes maior do que no grupo com co-herança de alfa talassemia, respectivamente.

Tabela 6 – Associação de co-herança de $-\alpha^{3.7}$ talassemia (um ou dois genes) e dados clínicos de 387 pacientes com hemoglobinopatia SC*

	Co-herança de alfa talassemia	Sem alfa talassemia
CVO		
Incidência em 100 pacientes-ano (IC 95%)	32,86 (28,71 - 37,45)	56,99 (54,23 - 59,84)
Risco estimado (IC 95%)	1,73 (1,51 - 2,0)	
Valor de P	< 0,000001	
Transfusões		
Incidência em 100 pacientes-ano (IC 95%)	1,75 (0,91 – 3,06)	5,07 (4,27 – 5,97)
Risco estimado (IC 95%)	2,89 (1,61 – 5,73)	
Valor de P	0,00004	
Infecções		
Incidência em 100 pacientes-ano (IC 95%)	48,19 (43,13 – 53,69)	63,15 (60,25 – 66,15)
Risco estimado (IC 95%)	1,31 (1,16 – 1,48)	
Valor de P	0,000002	

* Teste exato de Fisher

Das 78 crianças com co-herança de alfa talassemia, apenas uma (1,3%) teve SEA. Já entre as 309 sem alfa talassemia, 55 (17,8%) tiveram SEA. A incidência do primeiro SEA e co-herança de alfa talassemia foi de 0,15 para 100 pacientes-ano (IC 95% 0 a 1,09), enquanto a incidência para

aqueles sem alfa talassemia foi de 2,2 para 100 pacientes-ano (IC 95% 1,66 a 2,87). O risco dos pacientes sem alfa talassemia apresentarem o primeiro episódio de SEA foi, aproximadamente, 15 vezes maior (IC 95% 2,58 a 602,7; $p=0,00002$) do que aqueles com alfa talassemia. Graficamente, a figura 11 mostra que a probabilidade estimada de apresentar o primeiro episódio de SEA nos grupos com e sem co-herança de alfa talassemia foi de 1,3% (IC 95% 0% a 3,8%) e 24,2% (IC 95% 17,9% a 30,5%), respectivamente.

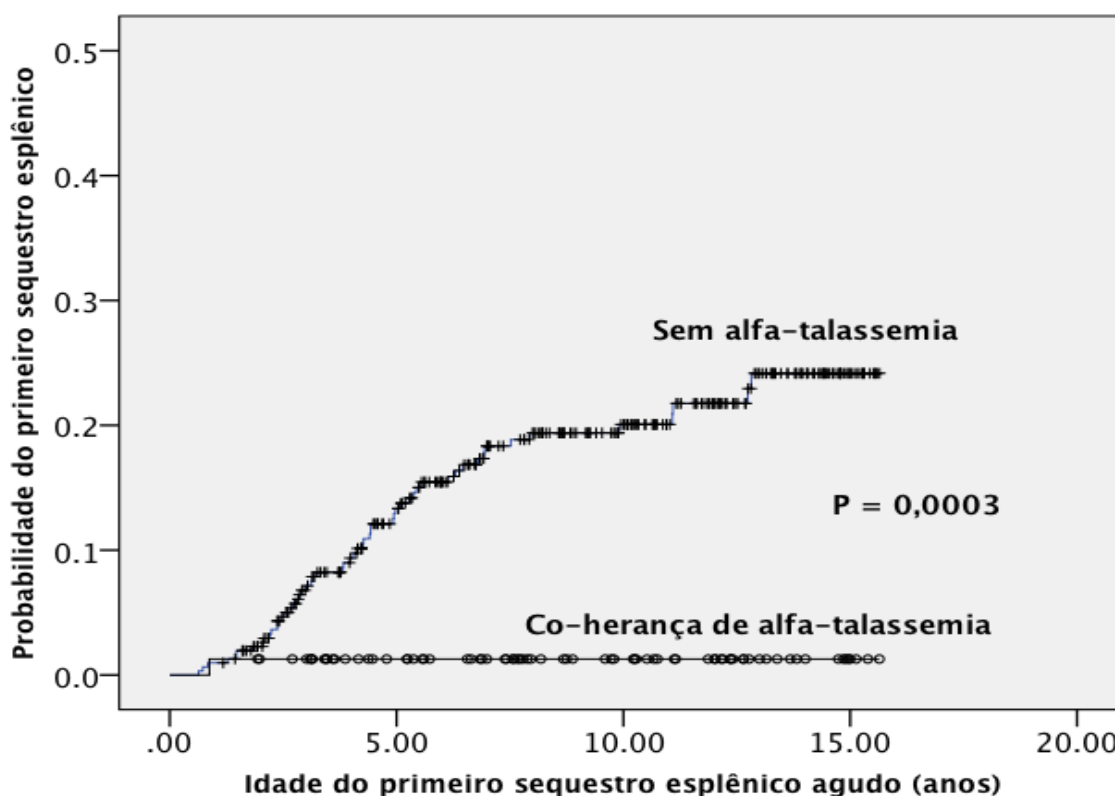


Figura 11 - Curva de probabilidade da ocorrência do primeiro episódio de sequestro esplênico agudo, conforme a presença ou não de co-herança de alfa talassemia (Método de Kaplan-Meier).

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre a presença de alfa talassemia e o valor máximo registrado do tamanho do baço ou VMMax das artérias cerebrais médias direita, esquerda e carótidas internas direita e esquerda ($p=0,13$; $p=0,75$; $p=0,4$; $p=0,7$; $p=0,8$, respectivamente).

Em relação aos dados dos exames laboratoriais hematológicos basais, foi observada associação estatisticamente significativa entre a co-herança de alfa talassemia e níveis mais baixos de VCM, HCM, contagem de reticulócitos e leucometria ($p < 0,001$). Também foi observada associação estatisticamente significativa entre a alfa talassemia e concentrações mais altas de Hb C ($p = 0,03$; tabela 7). Não houve associação estatisticamente significativa entre a co-herança de alfa talassemia e os valores de hemoglobina basal, plaquetometria, Hb S ou Hb F ($p = 0,47$; $p = 0,7$; $p = 0,052$; $p = 0,07$, respectivamente).

Tabela 7 – Associação de co-herança de $-\alpha^{3.7}$ talassemia (um ou dois genes) e dados laboratoriais médios de 387 pacientes com hemoglobinopatia SC*

	Co-herança de alfa talassemia (n)	Sem alfa talassemia (n)	Valor de p
Hemoglobina basal	10,6 g/dL (78)	10,5 g/dL (307)	0,47
Plaquetometria	329.860/mm ³ (78)	333.195/mm ³ (309)	0,7
Hb S	47,4% (69)	46,7% (278)	0,052
Hb C	46,1% (69)	45,3% (278)	0,03
Hb F	5,1% (68)	6,0% (277)	0,07
Leucometria	10.292/mm ³ (78)	11.404/mm ³ (307)	<0,001
Reticulócitos	2,9% (76)	3,6% (306)	<0,001
VCM	71 fL(78)	76,9 fL (309)	<0,001
HCM	23,1 pcg (70)	25,4 pcg (297)	<0,001

* teste t de Student

6. Discussão

6.1. Hemoglobinopatia SD

O artigo "Clinical, hematological and genetic data of a cohort of children with hemoglobin SD", recém-publicado pela Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, fascículo 3, volume 38, julho a setembro de 2016, páginas 240-246 (DOI: 10.1016/j.bjhh.2016.05.002) discute os resultados encontrados (ver seção 5.1).

6.2. Hemoglobinopatia SC

A doença falciforme é um problema de saúde pública em todo o mundo. De acordo com dados do *National Institutes of Health* (NIH), mais de 70 mil americanos têm diagnóstico de anemia falciforme, doença que acomete um em cada 500 afro-americanos nascidos vivos. Estima-se que 2 milhões de americanos sejam portadores do traço falciforme, sendo um em cada 12 afro-americanos (213). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças norteamericano (CDC) apresenta dados de um estudo que revela uma média de 75 mil internações hospitalares devido a complicações da anemia falciforme entre 1989 e 1993, com um custo aproximado para a sociedade no valor de aproximadamente 475 milhões de dólares (214).

A situação no Brasil não é muito diferente. O número estimado de indivíduos com traço falciforme no país é de 7.200.000, com prevalência na população geral que varia entre 2% e 8%. Nas regiões sul e sudeste do país, a prevalência é de cerca de 2% a 3%, proporção que ascende a 6%-10% entre afrodescendentes nas regiões norte e nordeste do país (1, 11). Em Minas Gerais, a frequência de recém-nascidos portadores do traço falciforme é de 3,3% (1:30) (2) e de recém-nascidos com doença falciforme, de 1:1.400 (135). No Brasil, existe grande variação regional em relação à prevalência de hemoglobinopatia SC, com frequência de cerca de 1:166 em negros do Sudeste brasileiro (40) e 1:62.500 no sul do país (41). Em Minas Gerais, a incidência da Hb SC segundo dados do Programa de Triagem Neonatal para Doença Falciforme situa-se em torno de 1:3.300 (2), representando cerca de 39,4% dos recém-nascidos com a doença (215).

Assim como outros pesquisadores brasileiros, Zago (11) destacou predomínio do gene da hemoglobina S na população afro-descendente que, na realidade do nosso País, concentra-se no estrato social mais desfavorecido economicamente. Segundo o autor, “esta situação exige estratégias que, para serem eficazes, devem estar associadas à melhoria das condições básicas de higiene, saúde pública e educação dos focos de miséria”. Além disso, uma política de saúde mais ampla é fundamental, com foco não somente no tratamento das complicações da anemia falciforme, mas na prevenção e detecção precoce das situações de risco, bem como na manutenção de uma estrutura organizada do Sistema Único de Saúde, capaz de atender os pacientes de forma global, em todas as suas necessidades biopsicossociais.

No presente estudo foram incluídas 461 crianças com perfil eletroforético compatível com hemoglobinopatia SC, nascidas no período de 01 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2012. A figura 8 mostra que houve progressiva redução do número de recém-nascidos ao longo dos anos de triagem neonatal pelo PETN e de encaminhamento ao HBH. De acordo com dados do IBGE a natalidade no Brasil tem reduzido ao longo dos últimos anos (<http://brasilemsintese.ibge.gov.br/populacao/taxas-brutas-de-natalidade.html>), e isso, com certeza, refletiu-se no número de diagnósticos neonatais de doença falciforme.

Ao se comparar a presente casuística com importantes estudos sobre o assunto na literatura médica, observa-se que há uma grande variabilidade na idade e no número de pacientes acompanhadas, como mostra a tabela 8. Deve-se ressaltar que o tempo de acompanhamento, tamanho amostral e características metodológicas foram bastante diversos nos diversos estudos, o que dificulta comparações mais acuradas.

Tabela 8: Estudos anteriores sobre Hb SC publicados em revistas indexadas no banco de dados *Medline*

Autores (ano)	Período do estudo	Local do estudo	Total (n) de pacientes acompanhados com Hb SC	Idade (Anos)	Pacientes em uso de HU
Tuttle e Koch (1960)	n.i.	EUA	18	1-15	0
Platt et al (1994)	n.i.	EUA	844	0-66	n.i.
Miller et al (2001)	n.i.	EUA	n.i.	6,7-17	6
Powars et al (2002)	1964-1994	EUA	284	0->60	n.i.
Quinn et al (2004)	1977-2002	EUA	145	<18	n.i.
Zimmerman et al (2004)	1995-2002	EUA	n.i.	9-17	7
Deane et al (2007)	2005-2007	Londres	74	< 18	0
Osei-Yeboah (2011)	2008	Gana	78	1-12	0
Wang et al (2011)	n.i.	EUA	64	5-16	15
Lionnet et al (2012)	2007-2010	França	179	> 18	1
Lamarre et al (2012)	2010-2011	Guadalupe	49	8-16	n.i.
Yates et al (2013)	n.i.	EUA	n.i.	3-14	15
Lori Luchtman-Jones (2016)	n.i.	EUA	133	0-18	133
Rezende et al (2016)	1999-2012	MG/Brasil	461	0-15	10

n.i.: o número de pacientes, período do estudo ou uso de HU não foi informado pelos autores no artigo original

No presente estudo, como em outros, a distribuição dos casos de acordo com o gênero ocorreu de forma relativamente semelhante, com 47,5% crianças do gênero feminino e 52,5% do masculino.

A distribuição dos casos por município de residência (figura 2) mostra uma significativa porcentagem da procedência de cidades do interior do estado (42%) em relação à capital (23,5%) e região metropolitana de Belo Horizonte (34,5%). O número significativo de pacientes que residem no interior e acompanhados na capital é explicado pelo direcionamento das crianças ao centro de referência da Fundação Hemominas conforme a localização geográfica do município de nascimento. Isso faz com que os familiares muitas vezes tenham que enfrentar horas de viagem por estradas

em mau estado de conservação para realizar atendimento, que poderia ser resolvido em um local mais perto de sua residência. Esse comportamento expõe a fragilidade do atual sistema de descentralização da saúde, cuja estrutura é insuficiente para o atendimento adequado aos pacientes com anemia falciforme. As deficiências são evidentes em diversos aspectos, desde a falta de capacitação da equipe de saúde para o atendimento dos eventos relacionados a anemia falciforme, até a falta de recursos materiais das unidades de saúde localizadas no interior ou nas periferias urbanas.

A idade ao final do período de observação para os pacientes que não faleceram durante o período do estudo variou de 1 ano a 15 anos e 8 meses, com mediana de 9 anos e 2 meses, observação muito semelhante à de outras casuísticas. Na de Tuttle e Kock (10), a idade média foi de 9 anos. Em estudo realizado em Londres, Deane et al (93) descreveram idade média de 8,1 anos.

Aproximadamente 75% dos pacientes apresentaram pelo menos uma CVO, resultado semelhante aos 78% encontrados por Tuttle e Kock (10), e superior ao relatado por Powars (25), com 60% dos casos. A incidência de CVO para toda a população avaliada no presente estudo foi de 51 crises por 100 pacientes-ano. A coorte americana apresentou em dois estudos incidência média de 40 e 30 CVO por 100 pacientes-ano, respectivamente (8, 64). O mesmo grupo observou que o tempo para o primeiro relato de dor na infância foi influenciado pelo genótipo da doença, sendo significativamente mais precoce na doença SS (mediana de 13,9 meses) do que na doença SC (mediana de 43,6 meses) (66). No presente estudo, a mediana foi de 61 meses. Crises dolorosas nas crianças com hemoglobinopatia SC ocorrem com cerca da metade da frequência do que se observa na anemia falciforme (3, 25, 64). De fato, observou-se que aproximadamente 25% das crianças não tiveram nenhuma CVO registrada nos prontuários médicos durante o período de observação. Cerca de 50% dos pacientes tiveram até uma CVO a cada 3 anos, enquanto 12% apresentaram pelo menos uma CVO por ano. Contudo, cabe ressaltar que apesar da incidência ser mais baixa, ela é relevante e deve ser destacada para as equipes de saúde em unidades de urgência, com o objetivo de evitar o subtratamento e desvalorização das queixas de dor em pacientes com hemoglobinopatia SC.

Sobre a avaliação de órgãos-alvo, foi verificada anotação compatível com retinopatia em 20,3% (12 casos) das 59 crianças que realizaram fundoscopia. A maior parte dos estudos sobre retinopatia foi realizada em pacientes adultos, com prevalência média de aproximadamente 33% (3, 5, 103-107). Entre os estudos que incluem crianças, o resultado foi semelhante ao encontrado por dois grupos norte-americanos com 23% e 16,4%, respectivamente (8, 113). Outras publicações envolvendo pacientes adultos mostraram prevalência de 52,7% a 71%, resultado bem acima do encontrado (5, 117). A respeito de avaliação cardiológica, 4,6% (n = 6) das crianças que fizeram ecocardiograma apresentaram hipertensão pulmonar, resultado semelhante ao encontrado por estudo inglês (89), com 6%. Contudo, o que chama a atenção no presente estudo foi o pequeno número de crianças que realizaram fundoscopia (25%) e ecocardiograma (28,2%), uma vez que os pacientes são encaminhados para avaliações oftalmológicas e cardiológicas preventivas anuais após os 5 anos de idade. Os resultados sugerem que as incidências reais de retinopatia falciforme e de hipertensão pulmonar na população investigada devem estar subestimadas e demonstram a necessidade de se estabelecer uma rede permanente de interconsultores experientes em retinopatia proliferativa e cardiologia infantil para detecção e tratamento precoces adequados. Quanto à avaliação ortopédica, foi encontrada descrição de necrose avascular em 58,3% dos pacientes avaliados (n=7), com predominância absoluta da necrose em cabeça de fêmur. Na literatura, a prevalência varia entre 8,8 a 15% (5, 8, 25, 65, 80, 101), mas o pequeno número de casos da presente casuística prejudica conclusão sólida. Quatro crianças (0,9%) tiveram episódios de priapismo durante o período de acompanhamento. Os dados publicados sobre priapismo geralmente resultam da análise conjunta dos genótipos SS, SC e S-beta talassemia, com prevalência aproximada de 35% em adultos (216, 217). Da mesma forma, o pequeno número de casos e o desenho retrospectivo do estudo limita a análise dos dados. Não foram encontrados nos prontuários médicos registros referentes ao diagnóstico de nefropatia falciforme em nenhum paciente desta casuística, o que, na realidade, é pouco provável de ser verdadeiro.

Sessenta e oito crianças (14,8%) apresentaram um total de 88 eventos de sequestro esplênico agudo (SEA), com incidência de 1,9 primeiros

eventos por 100 pacientes-ano. Existem poucos estudos envolvendo crianças com hemoglobinopatia SC e SEA. A prevalência situa-se entre 5 e 12% (7, 37, 75, 76). Quando comparados com os dados sobre SEA em crianças com hemoglobinopatia SS, observa-se incidência muito mais baixa. Emond et al (218) encontraram taxa de incidência nos 10 anos da coorte jamaicana de 8,2 por 100 pacientes-ano, semelhante à taxa encontrada em estudo retrospectivo jamaicano (219), com taxa de incidência de 9,2 por 100 pacientes-ano. Na coorte norte-americana (220), 43 de 430 crianças SS (10%) sofreram 61 episódios de SEA. Estudo realizado na Fundação Hemominas também envolvendo somente crianças SS relatou que a incidência de SEA foi de 10,2 primeiros episódios por 100 pacientes-ano, com recorrência de 57,3% (30). A idade mediana ao primeiro evento de SEA foi 3 anos e 10 meses, acima do encontrado em pacientes SS em outras casuísticas (30, 218, 221, 222).

A maior parte dos primeiros episódios de SEA do presente estudo (70% dos 68 casos) ocorreu até 5 anos de vida, época de incidência mais elevada de eventos agudos em crianças com doença falciforme. Entre os 17 pacientes que tiveram mais de um episódio de SEA, sete foram submetidas a esplenectomia, sendo duas após o primeiro episódio de SEA, três após o segundo e uma após o terceiro. Os dados indicam uma convergência na indicação do procedimento cirúrgico após dois ou mais episódios de SEA. A maioria dos autores, entretanto, recomenda a realização de esplenectomia após o primeiro ou, no máximo, após o segundo episódio de SEA (4, 29, 72, 75, 80, 218, 221), o que denota uma conduta ainda um pouco conservadora por parte dos médicos assistentes da Fundação Hemominas, talvez influenciada pelas dificuldades sócio-econômicas e de compreensão das famílias atendidas e pelos obstáculos do acesso a serviços capacitados para o procedimento cirúrgico. Em relação aos exames laboratoriais hematológicos basais (tabela 1), a hemoglobina apresentou variação entre 7,9 g/dL e 12,5 g/dL (média 10,5 g/dL); a leucometria oscilou entre 5.374/mm³ e 24.514/mm³ (média 11.236/mm³); a contagem de reticulócitos variou entre 0,6% e 12,8% (média 3,4%) e a plaquetometria encontrada foi de 129.500/mm³ a 786.000/mm³, com média de 337.098/mm³. A anemia na hemoglobinopatia SC é geralmente mais leve do que em pacientes SS, com valores médios de hemoglobina descritos que variam entre 10,5 e 11,5 g/dL

(5, 40, 60). Assim como previamente descrito, os reticulócitos estão ligeiramente aumentados, a contagem de plaquetas e de leucócitos estão normais (3, 121).

Doppler transcraniano foi realizado em 71 das 461 crianças (15,4%), e todas apresentaram baixo risco de acidente vascular cerebral isquêmico (tabela 3). Sabe-se que a incidência de acidente vascular cerebral isquêmico é cerca de 4 vezes menor do que nos pacientes com hemoglobinopatia SS, mas 50 a 100 vezes maior do que na população pediátrica em geral, com taxas entre 0,8 e 3% (25, 90). Atualmente não existem estudos e dados suficientes a respeito dos valores de referência de velocidade média-máxima (VMMmax) para os pacientes com hemoglobinopatia SC, sendo utilizada a mesma classificação dos pacientes com hemoglobinopatia SS (80, 90, 91). Os valores médios de VMMax encontrados em artéria cerebral média direita, cerebral média esquerda, carótida interna direita e carótida interna esquerda foram 95,4; 95,2; 76,4 e 74,3 cm/s, respectivamente (tabela 3). Uma criança do presente estudo apresentou episódio de acidente vascular cerebral isquêmico aos 11 anos de idade, sendo considerada isquemia provocada pela hemoglobinopatia SC. Deane et al descreveram um paciente com hemoglobinopatia SC que teve diagnóstico de AVC isquêmico aos 5 anos de idade, considerado secundário à doença de base após descartadas outras possibilidades. A VMMax era de 146 cm/s na artéria cerebral média direita e 126 cm/s na artéria cerebral média esquerda (93). Um caso de AVC em criança de 7 anos foi também descrito por Powars et al em 1978 (94); uma criança nigeriana de 6 anos por Lagunju e Brown em 2012 (95) e três casos pediátricos por Ohene-Frempong no estudo cooperativo norte-americano (90). Não há dados atuais que apresentem com clareza indicação e valores de estratificação de risco de VMMax para o rastreamento de AVC em pacientes com hemoglobinopatia SC. Contudo, os resultados apresentados representam importante contribuição para o entendimento da vasculopatia cerebral destas crianças, com descrição de dados de VMMax até então escassos em outras publicações.

Hidroxiureia foi iniciada em 2,2% das crianças (n=10), com significativa redução dos sintomas (tabela 4), semelhante ao descrito previamente (153-155, 223, 224). Nota-se que nenhum paciente atingiu a dose máxima prevista pelo protocolo do Ministério da Saúde (158) (35 mg/Kg/dia) devido a

superveniência de toxicidade hematológica. Recentemente foi publicado estudo com a maior casuística conhecida, 133 crianças com hemoglobinopatia SC tratados com hidroxiureia, em 18 centros de referência norte-americanos. O estudo mostrou redução de 38% dos eventos dolorosos após 12 meses de uso da medicação. O tratamento com hidroxiureia foi associado a estabilidade na concentração de hemoglobina, aumento da concentração de hemoglobina fetal e volume corpuscular médio das hemácias, além de redução da contagem de leucócitos e reticulócitos, quando comparados aos valores basais de cada paciente. Os autores consideram que ensaio clínico deveria ser realizado para comparar o resultado do uso de dose máxima e doses baixas de hidroxiureia com placebo e assim tentar definir o uso e manejo da medicação em crianças com hemoglobinopatia SC (157).

Em relação à co-herança de alfa talassemia, 20,2% das crianças que realizaram exame apresentaram resultado positivo. Apenas o subtipo $-\alpha^{3.7}$ foi detectado. A frequência dessa co-herança varia na literatura entre 20 e 35% (5, 8, 65, 124-126). O efeito da co-herança de alfa talassemia em pacientes com hemoglobinopatia SC ainda não é muito claro, devido ao pequeno número de estudos sobre o assunto. Estudos sugerem que a presença de alfa talassemia poderia limitar o número de células com grande concentração intracelular de hemoglobina, com consequente atenuação do quadro clínico (3, 8, 129-132). No presente estudo, foi observado que o risco estimado das crianças sem alfa talassemia para CVO, infecções e transfusões de concentrado de hemácias foi 1,7, 1,3 e 2,9 vezes maior do que no grupo com co-herança de alfa talassemia, respectivamente (tabela 6). De forma semelhante, os dados de Powars et al e Rodgers et al sugeriram que pacientes com alfa talassemia associada apresentaram evolução clínica mais favorável do que aqueles sem a co-herança, havendo menor risco de retinopatia, colelitíase, falência de órgãos, osteonecrose e crises vaso-oclusivas dolorosas (8, 132). O estudo de Ballas sugere que poderia haver associação com esplenomegalia, necrose avascular de cabeça de fêmur e síndrome torácica aguda, apesar do pequeno número de pacientes avaliados (n=4) (128). Por outro lado, Steinberg et al não observaram associação de co-herança de alfa talassemia com a retinopatia, necrose avascular ou crises vaso oclusivas dolorosas em 14 pacientes com hemoglobinopatia SC (127).

Até onde temos conhecimento de relatos internacionais publicados, o presente estudo demonstrou pela primeira vez em uma população de crianças com hemoglobinopatia SC que o risco dos pacientes sem alfa talassemia apresentarem o primeiro episódio de SEA foi, aproximadamente, 15 vezes maior do que aqueles com alfa talassemia (figura 6). Somados aos resultados já relatados, é possível afirmar com segurança que a triagem neonatal precoce e o estudo genético sistemático da co-herança de alfa talassemia seriam úteis para o seguimento desses pacientes e orientação familiar sobre o prognóstico.

Em relação aos dados hematológicos basais, foi observada associação estatisticamente significativa entre a co-herança de alfa talassemia e níveis mais baixos de VCM, HCM, contagem de reticulócitos e leucometria (tabela 5). Os dados reforçam a hipótese de que esses pacientes apresentam comportamento clínico de menor gravidade, com menos hemólise e viscosidade do sangue. Powars et al (8) e Steinberg et al (127) também observaram diferença estatisticamente significativa em relação ao VCM e HCM. Não houve associação estatisticamente significativa entre a co-herança de alfa talassemia e os valores de hemoglobina basal, plaquetometria, Hb S, Hb F, valor máximo registrado do tamanho do baço ou VMMax das artérias cerebrais. A coorte americana também não encontrou diferença significativa em relação aos valores de Hb F (8). Não foram encontrados outras informações sobre estas interações tanto em estudos nacionais quanto internacionais.

Na população inicialmente selecionada para o estudo (n=539), ocorreram 23 óbitos. A taxa de mortalidade por todas as causas, foi de 4,3%. A curva de sobrevivência das crianças (figura 6) mostra que a probabilidade estimada de óbito destes pacientes com um ano é de 1,1%, aos 2 anos é de 1,5% e aos 5 anos é de 3,0%. Em recente artigo publicado, Sabarense (135) observou que, entre as 1.014 crianças com hemoglobinopatia SC diagnosticadas em Minas Gerais entre março de 1998 e fevereiro de 2012, ocorreram 34 óbitos, com taxa de 3,4%. Como parte considerável da presente casuística está incluída na que foi estudada por Sabarense, representando cerca de 50% do total relatado pelos referidos autores, esperava-se que as taxas fossem realmente muito semelhantes. As pequenas diferenças observadas devem-se ao fato de que a presente

casuística inclui crianças matriculadas apenas no Hemocentro de BH, enquanto a de Sabarense inclui todo o estado de Minas Gerais. Uma ressalva deve ser feita na presente análise, pois parte dessas crianças foi acompanhada somente até os dois anos de vida. Esse fato poderia superestimar um pouco a prevalência dos óbitos nesta faixa etária. Contudo, os dados encontrados são compatíveis com os encontrados na literatura. O grupo cooperativo norte-americano relatou taxa de mortalidade de 3,2% em 844 pacientes entre 0 e 66 anos durante um período de 6 anos de seguimento (134). Alguns anos depois, o mesmo grupo publicou uma taxa de 9% entre 284 pacientes da coorte. Os autores justificaram o aumento pela presença de mais indivíduos adultos com idade avançada e doença mais grave (8). A curva de sobrevivência do presente estudo mostrou estimativa de 94,6% para todo o período, semelhante à descrição de Leikin et al (133) e Platt et al (134), com sobrevivência aproximada de 95% e 97% até os 20 anos de idade, respectivamente.

Em relação às causas dos óbitos, 43,5% foram devido a complicações infecciosas (26% pneumonia/síndrome torácica aguda e 17,4% sepse) seguido de 13% secundárias a sequestro esplênico agudo (figura 4). Dados consistentes sobre esse tema, somente em crianças com hemoglobinopatia SC, são escassos na literatura. A maior parte dos trabalhos inclui os genótipos SS e Sbeta⁰talassemia na população estudada. Sabarense et al (135) encontraram os processos infecciosos (incluindo sepse, pneumonia/síndrome torácica aguda e gastroenterite) como causa mais frequente entre os 193 óbitos em Minas Gerais (45%), seguido de causas indeterminadas (28%) e SEA (14%). Os resultados encontrados são similares aos dados publicados por alguns autores (133, 220, 222, 225-229), que também apontaram infecções como a principal causa de óbito, entre as causas conhecidas. Nota-se, no presente estudo, a presença significativa de óbitos secundários a causas indeterminadas ($6/23 = 26\%$), o que corrobora haver dificuldade das equipes de saúde em identificar as possíveis intercorrências clínicas secundárias à anemia falciforme. Como bem observado por Fernandes (2), “o óbito com causa indeterminada poderia sugerir certa dificuldade da equipe de saúde em reconhecer a doença falciforme e os eventos agudos graves determinantes do óbito”. A autora, que analisou os 78 óbitos que ocorreram em 1.396 crianças com doença

falciforme em Minas Gerais, diagnosticadas de março de 1998 a fevereiro de 2005, observou que o sequestro esplênico foi a causa de 7 dos 52 óbitos nesse grupo de pacientes, quando se considerou a informação do documento de óbito. Quando se considerou a entrevista com os familiares, o sequestro esplênico passou a responder por 16 dos 52 óbitos, isto é cerca de 30% dos óbitos.

Observa-se que a maior parte das crianças (65,2% ou 15 crianças) faleceu com idade inferior a cinco anos. Outros autores publicaram dados semelhantes, mostrando também uma maior concentração da mortalidade nos primeiros cinco anos de vida dos pacientes com anemia falciforme (2, 133-135, 220, 225, 230). Essa constatação pode ser explicada pela maior incidência, na faixa etária descrita, de eventos agudos graves e alto potencial de letalidade, tais como infecções e SEA.

A mortalidade dos pacientes com hemoglobinopatia SC relatada na literatura é baixa, com taxas inferiores à metade daqueles com hemoglobinopatia SS (2, 3, 25). Tal fato provavelmente relaciona-se com a menor prevalência de complicações que acarretam maior mortalidade. Contudo, os dados são ainda preocupantes. A mortalidade infantil para as crianças com anemia falciforme no presente estudo foi de 11,1 óbitos para cada mil pacientes (6/539). De acordo com dados do Sistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde (SIM), a taxa de mortalidade infantil em Minas Gerais no ano de 2014 foi de 11,3 por mil. Descontada a taxa de mortalidade neonatal precoce (óbitos entre 0 e 6 dias de vida, período em que a doença falciforme ainda não acarreta nenhuma manifestação clínica), a taxa de mortalidade em MG foi de 5,1 por mil, valor aproximadamente duas vezes inferior ao verificado no presente estudo.

Uma dificuldade encontrada durante o estudo foi a obtenção de alguns dados clínicos e laboratoriais, sem registro nos prontuários. Essa ausência de dados sempre limita a análise de dados em estudos retrospectivos. Os prontuários médicos consultados destinam-se ao acompanhamento clínico dos pacientes e não para realização de pesquisas clínicas.

A avaliação de todas as informações obtidas pelo presente estudo traz à tona uma reflexão sobre a situação das crianças com doença falciforme no contexto atual do sistema de saúde pública no país. Não há dúvida em relação à prevalência e às peculiaridades biopsicossociais diretamente

vinculadas à doença. Todavia as evidências mostram que ações relacionadas à capacitação profissional, estruturação do atendimento primário e pronto acesso das crianças aos serviços de urgência ainda são insuficientes para o adequado acompanhamento desses pacientes.

A gravidade das manifestações clínicas na doença SC parece ser realmente menos intensa do que na forma SS. Contudo as complicações agudas e lesões de órgãos-alvo podem também ocorrer com intensidade variada, acarretando aumento de morbidade e sofrimento para a criança e seus familiares. Torna-se, assim, fundamental o melhor entendimento da prevalência e da história natural da hemoglobinopatia SC e o repasse dessas informações ao sistema de saúde para que sejam do conhecimento de equipes de saúde e dos familiares.

Não se pode negar que alguns passos importantes na direção de tentar melhorar a situação em Minas Gerais já foram dados. A triagem neonatal para Doença Falciforme, iniciada em 1998, representa marco na atenção aos pacientes com diagnóstico de doença falciforme. Algumas iniciativas bem sucedidas, como realização de treinamentos periódicos para várias equipes de saúde, criação e divulgação de protocolos específicos relacionados ao manejo dos eventos agudos da doença, início do funcionamento de uma central de informações sobre hemoglobinopatias, disponível 24 horas por dia (CHEMOB ATENDE), e acompanhamento multidisciplinar em instituições especializadas (como o HBH), dentre outras iniciativas, constituem a esperança de que as dificuldades descritas possam ser superadas em curto e médio prazos. Outra questão fundamental no acompanhamento clínico destas crianças consiste na educação familiar. Durante as consultas no HBH, as famílias são orientadas a observar sinais sugestivos de situações de urgência (febre, taquidispneia, prostração, aumento do volume basal do baço), sendo orientados a procurar imediatamente o serviço de urgência de referência. A literatura mostra que essas medidas simples são capazes de permitir o diagnóstico precoce de complicações agudas e conseqüente redução da mortalidade (218, 222, 231).

Fica evidente que não se trata de problema com resolução simples, uma vez que a situação não é simples. Porém, o presente estudo serve como alerta que ainda há um longo caminho pela frente. O programa de atenção integral à pessoa com doença falciforme é um objetivo a ser alcançado por

todos os envolvidos, incluindo gestores, profissionais de saúde e familiares. As questões relacionadas à doença devem ser reconhecidas como prioridade para o adequado atendimento global, não da anemia falciforme, mas da criança com anemia falciforme.

7. Conclusões

7.1. Hemoglobinopatia SD

- Foram identificadas 9 crianças SD-Punjab, 8 SD-Korle-Bu e nenhuma outra variante de Hb D.
- Todas as crianças do grupo S/D-Punjab apresentaram níveis de hemoglobina basal abaixo de 10 g/dL (média de 8.0 g/dL).
- Os pacientes do grupo S/D-Punjab tinham valores médios de hemoglobina basal e saturimetria basal de O₂ mais baixos e contagem de reticulócitos mais elevada que o grupo S-Korle Bu.
- Concentrações relativas de hemoglobina fetal, leucometria e plaquetometria foram mais elevadas nas crianças do grupo S/D-Punjab.
- Somente crianças com hemoglobina S/D-Punjab tiveram crises vaso oclusivas dolorosas, receberam transfusão de hemácias ou fizeram uso de hidroxiureia.
- A avaliação dos haplótipos da Hb S/D-Punjab mostrou que todos apresentaram haplótipo I para o alelo D-Punjab. Em relação ao cluster do gene da beta globina, foram identificados seis Benin, quatro CAR e um haplótipo atípico.
- Todos os alelos da Hb S-Korle Bu apresentaram haplótipo I. Sete crianças tinham haplótipo β^S CAR e apenas uma o haplótipo β^S Benin.
- Os pacientes com haplótipo β^S Benin apresentaram dosagens de hemoglobina total e hemoglobina fetal mais elevadas quando comparadas aqueles com haplótipo CAR.
- A co-herança de alfa talassemia foi detectada em quatro crianças (duas com Hb S/D-Punjab e duas com Hb S-Korle Bu). O volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) foram significativamente mais baixas nas crianças com co-herança de alfa talassemia.
- Doppler transcraniano foi normal em todas as crianças.
- Não ocorreram óbitos nas crianças acompanhadas durante o período do estudo.

- Em resumo: o curso clínico e exames hematológicos das crianças com hemoglobina S/D-Punjab foram muito semelhantes àqueles com hemoglobinopatia SS; crianças com hemoglobina S-Korle Bu tiveram curso clínico e laboratorial semelhante àqueles com traço falciforme.

7.2. Hemoglobinopatia SC

- As médias dos valores dos exames hematológicos foram: hemoglobina 10,5 g/dL; reticulócitos 3,4%; leucometria 11.236/mm³; plaquetometria 337.098/mm³ e hb fetal 4,9%.
- Entre os eventos clínicos foram observados SEA em 14,8%, crises vaso oclusivas dolorosas em 74,6%, necessidade de hemotransfusão em 23,4% e AVC isquêmico em 0,2% das crianças.
- Doppler transcraniano foi realizado em apenas 15,4% das crianças, todos normais se utilizados os mesmos valores de referência atuais para os pacientes com hemoglobinopatia SS.
- Dez pacientes fizeram uso de hidroxiureia; todos apresentaram melhora dos sintomas.
- Retinopatia falciforme foi observada em 20,3% das 59 crianças que realizaram fundoscopia.
- Necrose avascular foi detectada em 58,3% de 12 pacientes avaliados, com predomínio em fêmur esquerdo.
- Ecocardiograma foi compatível com hipertensão pulmonar em 4,6% de 130 crianças.
- Pesquisa de co-herança de alfa talassemia foi realizada em 387 crianças; 78 (20,2%) apresentaram resultado positivo.
- O risco das crianças sem alfa talassemia de apresentarem CVO, infecções, transfusões de concentrado de hemácias e SEA foi 1,7 , 1,3, 2,9 e 15 vezes maior do que no grupo com co-herança de alfa talassemia, respectivamente.
- Foi observada associação estatisticamente significativa entre a co-herança de alfa talassemia e níveis mais baixos de VCM, HCM, contagem de reticulócitos e leucometria.
- A taxa de mortalidade por todas as causas, foi de 4,3%. A probabilidade estimada de óbito até os 10 anos de vida foi de 5,4%.

- A gravidade das manifestações clínicas na doença SC parece ser realmente menos intensa do que na forma SS.
- As complicações agudas e lesões de órgãos-alvo podem também ocorrer com intensidade variada nas crianças com hemoglobinopatia SC.
- A triagem neonatal precoce e o estudo genético sistemático da co-herança de alfa talassemia podem ser úteis para o seguimento desses pacientes e orientação familiar sobre o prognóstico da doença.

8. Referências Bibliográficas

1. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):203-6.
2. Fernandes AP, Januario JN, Cangussu CB, Macedo DL, Viana MB. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. *J Pediatr (Rio J).* 2010;86(4):279-84.
3. Nagel RL, Fabry ME, Steinberg MH. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Rev.* 2003;17(3):167-78.
4. Hemominas F. Protocolo para Portadores de Síndromes Falciformes. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde; 2002.
5. Lionnet F, Hammoudi N, Stojanovic KS, Avellino V, Gâteau G, Girot R, et al. Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases. *Haematologica.* 2012;97(8):1136-41.
6. Lamarre Y, Romana M, Waltz X, Lalanne-Mistrih ML, Tressieres B, Divialle-Doumbo L, et al. Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica.* 2012;97(11):1641-7.
7. Ballas SK, Lewis CN, Noone AM, Krasnow SH, Kamarulzaman E, Burka ER. Clinical, hematological, and biochemical features of Hb SC disease. *Am J Hematol.* 1982;13(1):37-51.
8. Powars DR, Hiti A, Ramicone E, Johnson C, Chan L. Outcome in hemoglobin SC disease: a four-decade observational study of clinical, hematologic, and genetic factors. *Am J Hematol.* 2002;70(3):206-15.
9. River GL, Robbins AB, Schwartz SO. S-C hemoglobin: a clinical study. *Blood.* 1961;18:385-416.
10. Tuttle AH, Koch B. Clinical and hematological manifestations of hemoglobin CS disease in children. *J Pediatr.* 1960;56:331-42.
11. Zago MA. Anemia Falciforme e Doença Falciforme. Ministério da Saúde Manual de doenças mais importantes, por razões étnicas, na população afro-descendente Brasília: Secretaria de Políticas de Saúde. 2001.
12. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet.* 2004;364(9442):1343-60.

13. Paixao MC, Cunha Ferraz MH, Januario JN, Viana MB, Lima JM. Reliability of isoelectrofocusing for the detection of Hb S, Hb C, and HB D in a pioneering population-based program of newborn screening in Brazil. *Hemoglobin*. 2001;25(3):297-303.
14. Januario JN. Incidência de Doença Falciforme em um milhão de nascidos vivos em Minas Gerais [dissertação de mestrado]. . Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); 2002.
15. Powars DR. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1991;5(3):475-93.
16. Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, Zohoun I, Wajcman H, Baudin V, et al. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. *N Engl J Med*. 1985;312(14):880-4.
17. Orkin SH, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, et al. Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. *Nature*. 1982;296(5858):627-31.
18. Zago MA, Figueiredo MS, Ogo SH. Bantu beta s cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. *Am J Phys Anthropol*. 1992;88(3):295-8.
19. Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Souza CC, Santos LF, Menezes JF, et al. The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. *Hemoglobin*. 2004;28(3):267-71.
20. Bezerra MA, Santos MN, Araujo AS, Gomes YM, Abath FG, Bandeira FM. Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the State of Pernambuco, Brazil. *Hemoglobin*. 2007;31(1):83-8.
21. Figueiredo MS, Kerbauy J, Goncalves MS, Arruda VR, Saad ST, Sonati MF, et al. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *Am J Hematol*. 1996;53(2):72-6.
22. Cabral CH, Serafim ES, de Medeiros WR, de Medeiros Fernandes TA, Kimura EM, Costa FF, et al. Determination of beta haplotypes in patients with

sickle-cell anemia in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genet Mol Biol.* 2011;34(3):421-4.

23. Florentino MR, A.V.; da Silva, D.D. Aspectos comparativos do trafico de africanos para o Brasil (seculos XVIII e XIX). *Afro-Asia.* 2004;31:83-126.

24. Belisario AR, Martins ML, Brito AM, Rodrigues CV, Silva CM, Viana MB. beta-globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or Sbeta(0)-thalassemia and their association with clinical and hematological features. *Acta Haematol.* 2010;124(3):162-70.

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

26. Aliyu ZY, Tumblin AR, Kato GJ. Current therapy of sickle cell disease. *Haematologica.* 2006;91(1):7-10.

27. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest.* 2007;117(4):850-8.

28. Dover GJP, O.S. Sickle cell disease. In: Nathan DG, Orkin SH. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood.* 5th ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company;1998:762-809. 1998.

29. Serjeant GR, Serjeant BE. Management of sickle cell disease; lessons from the Jamaican Cohort Study. *Blood Rev.* 1993;7(3):137-45.

30. Rezende PV, Viana MB, Murao M, Chaves AC, Ribeiro AC. Acute splenic sequestration in a cohort of children with sickle cell anemia. *J Pediatr (Rio J).* 2009;85(2):163-9.

31. Pashankar FD, Carbonella J, Bazy-Asaad A, Friedman A. Prevalence and risk factors of elevated pulmonary artery pressures in children with sickle cell disease. *Pediatrics.* 2008;121(4):777-82.

32. Powars DR, Chan LS, Hiti A, Ramicone E, Johnson C. Outcome of sickle cell anemia: a 4-decade observational study of 1056 patients. *Medicine.* 2005;84(6):363-76.

33. Bunn HF, Noguchi CT, Hofrichter J, Schechter GP, Schechter AN, Eaton WA. Molecular and cellular pathogenesis of hemoglobin SC disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79(23):7527-31.

34. Hunt JA, Ingram VM. Abnormal human haemoglobins. IV. The chemical difference between normal human haemoglobin and haemoglobin C. *Biochim Biophys Acta.* 1960;42:409-21.

35. Motulsky AG. Frequency of sickling disorders in U.S. blacks. *N Engl J Med.* 1973;288(1):31-3.
36. Chernoff AI. The human hemoglobins in health and disease. *N Engl J Med.* 1955;253(8):322-31.
37. Serjeant GR, Ashcroft MT, Serjeant BE. The clinical features of haemoglobin SC disease in Jamaica. *Br J Haematol.* 1973;24(4):491-501.
38. Robitaille N, Delvin EE, Hume HA. Newborn screening for sickle cell disease: A 1988-2003 Quebec experience. *Paediatr Child Health.* 2006;11(4):223-7.
39. Saint-Martin C, Romana M, Bibrac A, Brudey K, Tarer V, Divialle-Doumndo L, et al. Universal newborn screening for haemoglobinopathies in Guadeloupe (French West Indies): a 27-year experience. *J Med Screen.* 2013;20(4):177-82.
40. Gomes RRR, A.S. Hemoglobin SC disease in a Brazilian population. *Ver Bras Genet.* 1989;12:369-78.
41. Wagner SC, de Castro SM, Gonzalez TP, Santin AP, Zaleski CF, Azevedo LA, et al. Neonatal screening for hemoglobinopathies: results of a public health system in South Brazil. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010;14(4):565-9.
42. Lobo CL, Bueno LM, Moura P, Ogeda LL, Castilho S, de Carvalho SM. Neonatal screening for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Panam Salud Publica.* 2003;13(2-3):154-9.
43. Itano HA, Neel JV. A new inherited abnormality of human hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1950;36(11):613-7.
44. Labie D, Richin C, Pagnier J, Gentilini M, Nagel RL. Hemoglobins S and C in Upper Volta. *Human genetics.* 1984;65(3):300-2.
45. Steinberg MH, Nagel RL, Lawrence C, Swaminathan V, Lu ZH, Plonczynski M, et al. Beta-globin gene haplotype in Hb SC disease. *Am J Hematol.* 1996;52(3):189-91.
46. Boehm CD, Dowling CE, Antonarakis SE, Honig GR, Kazazian HH, Jr. Evidence supporting a single origin of the beta(C)-globin gene in blacks. *Am J Hum Genet.* 1985;37(4):771-7.
47. Kan YW, Dozy AM. Evolution of the hemoglobin S and C genes in world populations. *Science.* 1980;209(4454):388-91.

48. Talacki CA, Rappaport E, Schwartz E, Surrey S, Ballas SK. Beta-globin gene cluster haplotypes in Hb C heterozygotes. *Hemoglobin*. 1990;14(3):229-40.
49. Olson JA, Nagel RL. Synchronized cultures of *P falciparum* in abnormal red cells: the mechanism of the inhibition of growth in HbCC cells. *Blood*. 1986;67(4):997-1001.
50. Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simporé J, Verra F, Konate A, et al. Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2001;414(6861):305-8.
51. Hirsch RE, Raventos-Suarez C, Olson JA, Nagel RL. Ligand state of intraerythrocytic circulating HbC crystals in homozygote CC patients. *Blood*. 1985;66(4):775-7.
52. Brugnara C, Kopin AS, Bunn HF, Tosteson DC. Regulation of cation content and cell volume in hemoglobin erythrocytes from patients with homozygous hemoglobin C disease. *J Clin Invest*. 1985;75(5):1608-17.
53. Canessa M, Spalvins A, Nagel RL. Volume-dependent and NEM-stimulated K⁺,Cl⁻ transport is elevated in oxygenated SS, SC and CC human red cells. *FEBS Lett*. 1986;200(1):197-202.
54. Lemonne N, Lamarre Y, Romana M, Hardy-Dessources MD, Lionnet F, Waltz X, et al. Impaired blood rheology plays a role in the chronic disorders associated with sickle cell-hemoglobin C disease. *Haematologica*. 2014;99(5):74-5.
55. Nagel RL, Lawrence C. The distinct pathobiology of sickle cell-hemoglobin C disease. Therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1991;5(3):433-51.
56. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. 2007;21(1):37-47.
57. Fabry ME, Kaul DK, Raventos-Suarez C, Chang H, Nagel RL. SC erythrocytes have an abnormally high intracellular hemoglobin concentration. Pathophysiological consequences. *J Clin Invest*. 1982;70(6):1315-9.
58. Lin MJ, Nagel RL, Hirsch RE. Acceleration of hemoglobin C crystallization by hemoglobin S. *Blood*. 1989;74(5):1823-5.
59. Ballas SK, Lerner J, Smith ED, Surrey S, Schwartz E, Rappaport EF. The xerocytosis of Hb SC disease. *Blood*. 1987;69(1):124-30.

60. Dalibalta S, Ellory JC, Browning JA, Wilkins RJ, Rees DC, Gibson JS. Novel permeability characteristics of red blood cells from sickle cell patients heterozygous for HbS and HbC (HbSC genotype). *Blood Cells Mol Dis.* 2010;45(1):46-52.
61. McCurdy PR, Mahmood L, Sherman AS. Red cell life span in sickle cell-hemoglobin C disease with a note about sickle cell-hemoglobin O ARAB. *Blood.* 1975;45(2):273-9.
62. Kaplan E, Zuelzer WW, Neel JV. A new inherited abnormality of hemoglobin and its interaction with sickle cell hemoglobin. *Blood.* 1951;6(12):1240-9.
63. Ayeroue J, Kafando E, Kam L, Gue E, Vertongen F, Ferster A, et al. Hemoglobin sickle cell disease: Experience of the Yalgado Ouedraogo University Hospital of Ouagadougou, Burkina Faso. *Arch Pediatr.* 2009;16(4):316-21.
64. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med.* 1991;325(1):11-6.
65. Cabanas-Pedro AC, Braga JA, Camilo-Araujo RF, Silva AI, Vicari P, Figueiredo M. Hemoglobin sickle cell disease in Brazil. *Haematologica.* 2013;98(1):e9.
66. Dampier C, Ely B, Brodecki D, Coleman C, Aertker L, Sendekci JA, et al. Pain characteristics and age-related pain trajectories in infants and young children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(2):291-6.
67. Koduri PR, Agbemadzo B, Nathan S. Hemoglobin S-C disease revisited: clinical study of 106 adults. *Am J Hematol.* 2001;68(4):298-300.
68. Stevens MC, Maude GH, Cupidore L, Jackson H, Hayes RJ, Serjeant GR. Prepubertal growth and skeletal maturation in children with sickle cell disease. *Pediatrics.* 1986;78(1):124-32.
69. Koumbourlis AC, Lee DJ, Lee A. Lung function and somatic growth in patients with hemoglobin SC sickle cell disease. *Pediatr Pulmonol.* 2008;43(2):175-8.
70. Platt OS, Rosenstock W, Espeland MA. Influence of sickle hemoglobinopathies on growth and development. *N Engl J Med.* 1984;311(1):7-12.

71. Silva CM, Viana MB. Growth deficits in children with sickle cell disease. *Arch Med Res.* 2002;33(3):308-12.
72. Subbannan K, Ustun C, Natarajan K, Clair B, Daitch L, Fields S, et al. Acute splenic complications and implications of splenectomy in hemoglobin SC disease. *Eur J Haematol.* 2009;83(3):258-60.
73. De Castro LM, Jonassaint JC, Graham FL, Ashley-Koch A, Telen MJ. Pulmonary hypertension associated with sickle cell disease: clinical and laboratory endpoints and disease outcomes. *Am J Hematol.* 2008;83(1):19-25.
74. Stadius van Eps LW, Schouten H, Haar Romeny-Wachter CC, La Porte-Wijsman LW. The relation between age and renal concentrating capacity in sickle cell disease and hemoglobin C disease. *Clin Chim Acta.* 1970;27(3):501-11.
75. Aquino VM, Norvell JM, Buchanan GR. Acute splenic complications in children with sickle cell-hemoglobin C disease. *J Pediatr.* 1997;130(6):961-5.
76. da Silva Filho IL, Ribeiro GS, Moura PG, Vechi ML, Cavalcante AC, de Andrada-Serpa MJ. Sickle cell disease: acute clinical manifestations in early childhood and molecular characteristics in a group of children in Rio de Janeiro. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(3):196-201.
77. Rogers ZR, Buchanan GR. Bacteremia in children with sickle hemoglobin C disease and sickle beta(+)-thalassemia: is prophylactic penicillin necessary? *J Pediatr.* 1995;127(3):348-54.
78. Topley JM, Cupidore L, Vaidya S, Hayes RJ, Serjeant GR. Pneumococcal and other infections in children with sickle-cell hemoglobin C (SC) disease. *J Pediatr.* 1982;101(2):176-9.
79. Hirst C, Owusu-Ofori S. Prophylactic antibiotics for preventing pneumococcal infection in children with sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;9:CD003427.
80. Yawn BP, Buchanan GR, Afenyi-Annan AN, Ballas SK, Hassell KL, James AH, et al. Management of sickle cell disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. *Jama.* 2014;312(10):1033-48.
81. Lane PA, Rogers ZR, Woods GM, Wang WC, Wilimas JA, Miller ST, et al. Fatal pneumococcal septicemia in hemoglobin SC disease. *J Pediatr.* 1994;124(6):859-62.

82. McKie KT, Hanevold CD, Hernandez C, Waller JL, Ortiz L, McKie KM. Prevalence, prevention, and treatment of microalbuminuria and proteinuria in children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007;29(3):140-4.
83. Dharnidharka VR, Dabbagh S, Atiyeh B, Simpson P, Sarnaik S. Prevalence of microalbuminuria in children with sickle cell disease. *Pediatr Nephrol.* 1998;12(6):475-8.
84. Asnani MR, Fraser RA, Reid ME. Higher rates of hemolysis are not associated with albuminuria in jamaicans with sickle cell disease. *PLoS One.* 2011;6(4):e18863.
85. de Paula RP, Nascimento AF, Sousa SM, Bastos PR, Barbosa AA. Glomerular filtration rate is altered in children with sickle cell disease: a comparison between Hb SS and Hb SC. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013;35(5):349-51.
86. Osei-Yeboah CT, Rodrigues O. Renal status of children with sickle cell disease in Accra, Ghana. *Ghana Med J.* 2011;45(4):155-60.
87. Klings ES, Anton Bland D, Rosenman D, Princeton S, Odhiambo A, Li G, et al. Pulmonary arterial hypertension and left-sided heart disease in sickle cell disease: Clinical characteristics and association with soluble adhesion molecule expression. *Am J Hematol.* 2008;83(7):547-53.
88. Taylor JGt, Ackah D, Cobb C, Orr N, Percy MJ, Sachdev V, et al. Mutations and polymorphisms in hemoglobin genes and the risk of pulmonary hypertension and death in sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2007;83(1):6-14.
89. Chaudry RA, Cikes M, Karu T, Hutchinson C, Ball S, Sutherland G, et al. Paediatric sickle cell disease: pulmonary hypertension but normal vascular resistance. *Arch Dis Child.* 2011;96(2):131-6.
90. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood.* 1998;91(1):288-94.
91. Adams R, McKie V, Nichols F, Carl E, Zhang DL, McKie K, et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med.* 1992;326(9):605-10.
92. Adams RJ, Nichols FT, 3rd, Aaslid R, McKie VC, McKie K, Carl E, et al. Cerebral vessel stenosis in sickle cell disease: criteria for detection by transcranial Doppler. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1990;12(3):277-82.

93. Deane C, Goss D, O'Driscoll S, Mellor S, Pohl K, Dick MC, et al. Transcranial Doppler Scanning and the Assessment of Stroke Risk in Children with HbSC disease. *Arch Dis Child*. 2007;93(2):138-41.
94. Powars D, Wilson B, Imbus C, Pegelow C, Allen J. The natural history of stroke in sickle cell disease. *Am J Med*. 1978;65(3):461-71.
95. Lagunju IA, Brown BJ. Adverse neurological outcomes in Nigerian children with sickle cell disease. *Int J Hematol*. 2012;96(6):710-8.
96. Verlhac S, Bernaudin F, Tortrat D, Brugieres P, Mage K, Gaston A, et al. Detection of cerebrovascular disease in patients with sickle cell disease using transcranial Doppler sonography: correlation with MRI, MRA and conventional angiography. *Pediatr Radiol*. 1995;25 Suppl 1:S14-9.
97. Hokazono M, Silva GS, Silva EM, Braga JA. Results from transcranial Doppler examination on children and adolescents with sickle cell disease and correlation between the time-averaged maximum mean velocity and hematological characteristics: a cross-sectional analytical study. *Sao Paulo Med J*. 2011;129(3):134-8.
98. Quinn CT, Rogers ZR, Buchanan GR. Survival of children with sickle cell disease. *Blood*. 2004;103(11):4023-7.
99. Guilliams KP, Fields ME, Hulbert ML. Higher-than-expected prevalence of silent cerebral infarcts in children with hemoglobin SC disease. *Blood*. 2015;125(2):416-7.
100. Lobo CL, Cancado RD, Leite AC, Dos Anjos AC, Pinto AC, Matta AP, et al. Brazilian Guidelines for transcranial doppler in children and adolescents with sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;33(1):43-8.
101. Milner PF, Kraus AP, Sebes JI, Sleeper LA, Dukes KA, Embury SH, et al. Sickle cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. *N Engl J Med*. 1991;325(21):1476-81.
102. Akinyoola AL, Adediran IA, Asaley CM. Avascular necrosis of the femoral head in sickle cell disease in Nigeria: a retrospective study. *Niger Postgrad Med J*. 2007;14(3):217-20.
103. Downes SM, Hambleton IR, Chuang EL, Lois N, Serjeant GR, Bird AC. Incidence and natural history of proliferative sickle cell retinopathy: observations from a cohort study. *Ophthalmology*. 2005;112(11):1869-75.
104. Elagouz M, Jyothi S, Gupta B, Sivaprasad S. Sickle cell disease and the eye: old and new concepts. *Surv Ophthalmol*. 2010;55(4):359-77.

105. Clarkson JG. The ocular manifestations of sickle-cell disease: a prevalence and natural history study. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1992;90:481-504.
106. Fadugbagbe AO, Gurgel RQ, Mendonca CQ, Cipolotti R, dos Santos AM, Cuevas LE. Ocular manifestations of sickle cell disease. *Ann Trop Paediatr.* 2010;30(1):19-26.
107. Freitas LG, Isaac DL, Tannure WT, Lima EV, Abud MB, Tavares RS, et al. Retinal manifestations in patients with sickle cell disease referred to a University Eye Hospital. *Arq Bras Oftalmol.* 2011;74(5):335-7.
108. Welch RB, Goldberg MF. Sickle-cell hemoglobin and its relation to fundus abnormality. *Arch Ophthalmol.* 1966;75(3):353-62.
109. Condon PI, Serjeant GR. Ocular findings in hemoglobin SC disease in Jamaica. *Am J Ophthalmol.* 1972;74(5):921-31.
110. Condon PI, Gray R, Serjeant GR. Ocular findings in children with sickle cell haemoglobin C disease in Jamaica. *Br J Ophthalmol.* 1974;58(7):644-9.
111. Goldberg MF. Classification and pathogenesis of proliferative sickle retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1971;71(3):649-65.
112. Talbot JF, Bird AC, Serjeant GR, Hayes RJ. Sickle cell retinopathy in young children in Jamaica. *Br J Ophthalmol.* 1982;66(3):149-54.
113. Rosenberg JB, Hutcheson KA. Pediatric sickle cell retinopathy: correlation with clinical factors. *J Aapos.* 2011;15(1):49-53.
114. de Almeida Oliveira DC, Carvalho MO, do Nascimento VM, Villas-Boas FS, Galvao-Castro B, Goncalves MS. Sickle cell disease retinopathy: characterization among pediatric and teenage patients from northeastern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2014;36(5):340-4.
115. Fox PD, Dunn DT, Morris JS, Serjeant GR. Risk factors for proliferative sickle retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 1990;74(3):172-6.
116. Serjeant BE, Mason KP, Condon PI, Hayes RJ, Kenny MW, Stuart J, et al. Blood rheology and proliferative retinopathy in sickle cell-haemoglobin C disease. *Br J Ophthalmol.* 1984;68(5):325-8.
117. Leveziel N, Bastuji-Garin S, Lalloum F, Querques G, Benlian P, Binaghi M, et al. Clinical and laboratory factors associated with the severity of proliferative sickle cell retinopathy in patients with sickle cell hemoglobin C (SC) and homozygous sickle cell (SS) disease. *Medicine (Baltimore).* 2011;90(6):372-8.

118. Crawford MR, Gould HJ, Smith WR, Beckford N, Gibson WR, Bobo L. Prevalence of hearing loss in adults with sickle cell disease. *Ear Hear.* 1991;12(5):349-51.
119. Burch-Sims GP, Matlock VR. Hearing loss and auditory function in sickle cell disease. *J Commun Disord.* 2005;38(4):321-9.
120. Onakoya PA, Nwaorgu OG, Shokunbi WA. Hearing impairment in persons with the hemoglobin SC genotype. *Ear Nose Throat J.* 2010;89(7):306-10.
121. Ballas SK, Kocher W. Erythrocytes in Hb SC disease are microcytic and hyperchromic. *Am J Hematol.* 1988;28(1):37-9.
122. Lukens JN. Hemoglobinopathies S, C, D, E and O. In: Greer JPF, J.; Lukens, J.N.; Rodgers, G.M.; Paraskevas, F.; Glader, B., editor. *Wintrobe's Clinical Hematology.* 11th ed: Lippincott Williams & Wilkins;p.1161-205;2003.
123. Barbosa CG, Aleluia AC, Pacheco AP, Paz SS, Zanette AM, Lyra IM, et al. Genetic modulation of HbF in Brazilians with HbSC disease and sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2013;88(10):923-4.
124. Schroeder WA, Powars DR, Kay LM, Chan LS, Huynh V, Shelton JB, et al. Beta-cluster haplotypes, alpha-gene status, and hematological data from SS, SC, and S-beta-thalassemia patients in southern California. *Hemoglobin.* 1989;13(4):325-53.
125. Lee K, Prehu C, Merault G, Keclard L, Roudot-Thoraval F, Bachir D, et al. Genetic and hematological studies in a group of 114 adult patients with SC sickle cell disease. *Am J Hematol.* 1998;59(1):15-21.
126. Higgs DR, Clegg JB, Weatherall DJ, Serjeant BE, Serjeant GR. Interaction of the alpha alpha alpha globin gene haplotype and sickle haemoglobin. *Br J Haematol.* 1984;57(4):671-8.
127. Steinberg MH, Coleman MB, Adams JG, Platica O, Gillette P, Rieder RF. The effects of alpha-thalassaemia in HbSC disease. *Br J Haematol.* 1983;55(3):487-92.
128. Ballas SK. Effect of alpha-globin genotype on the pathophysiology of sickle cell disease. *Pediatr Pathol Mol Med.* 2001;20(2):107-21.
129. Lawrence C, Fabry ME, Nagel RL. The unique red cell heterogeneity of SC disease: crystal formation, dense reticulocytes, and unusual morphology. *Blood.* 1991;78(8):2104-12.

130. Fabry ME, Mears JG, Patel P, Schaefer-Rego K, Carmichael LD, Martinez G, et al. Dense cells in sickle cell anemia: the effects of gene interaction. *Blood*. 1984;64(5):1042-6.
131. Embury SH, Clark MR, Monroy G, Mohandas N. Concurrent sickle cell anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes. *J Clin Invest*. 1984;73(1):116-23.
132. Rodgers GP, Sahovic EA, Pierce LE, Anagnou NP, Noguchi CT, Schechter AN. Hemoglobin SC disease and alpha-thalassemia. Prolonged survival and mild clinical course. *Am J Med*. 1986;80(4):746-50.
133. Leikin SL, Gallagher D, Kinney TR, Sloane D, Klug P, Rida W. Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Pediatrics*. 1989;84(3):500-8.
134. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994;330(23):1639-44.
135. Sabarense AP, Lima GO, Silva LM, Viana MB. Characterization of mortality in children with sickle cell disease diagnosed through the Newborn Screening Program. *J Pediatr (Rio J)*. 2015;91(3):242-7.
136. Markham MJ, Lottenberg R, Zumberg M. Role of phlebotomy in the management of hemoglobin SC disease: case report and review of the literature. *Am J Hematol*. 2003;73(2):121-5.
137. Lionnet F. Venous and arterial viscosity-associated thrombosis in hemoglobin SC disease. *Am J Med*. 2013;126(10):e13.
138. Neumayr L, Koshy M, Haberkern C, Earles AN, Bellevue R, Hassell K, et al. Surgery in patients with hemoglobin SC disease. Preoperative Transfusion in Sickle Cell Disease Study Group. *Am J Hematol*. 1998;57(2):101-8.
139. Koshy M, Weiner SJ, Miller ST, Sleeper LA, Vichinsky E, Brown AK, et al. Surgery and anesthesia in sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Diseases. *Blood*. 1995;86(10):3676-84.
140. Serjeant GR. Chronic transfusion programmes in sickle cell disease: problem or panacea? *Br J Haematol*. 1997;97(2):253-5.
141. Murao M, Viana MB. Risk factors for alloimmunization by patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(5):675-82.

142. Hsieh MM, Fitzhugh CD, Tisdale JF. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: the time is now. *Blood*. 2011;118(5):1197-207.
143. Locatelli F, Pagliara D. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(2):372-6.
144. Bernaudin F, Socie G, Kuentz M, Chevret S, Duval M, Bertrand Y, et al. Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood*. 2007;110(7):2749-56.
145. Panepinto JA, Walters MC, Carreras J, Marsh J, Bredeson CN, Gale RP, et al. Matched-related donor transplantation for sickle cell disease: report from the Center for International Blood and Transplant Research. *Br J Haematol*. 2007;137(5):479-85.
146. Angelucci E, Matthes-Martin S, Baronciani D, Bernaudin F, Bonanomi S, Cappellini MD, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major and sickle cell disease: indications and management recommendations from an international expert panel. *Haematologica*. 2014;99(5):811-20.
147. Simoes BPP, F.; Barros, G.M.N.; Machado, C.L.; Cancado, R.D.; Salvino, M.A.; Angulo, I.; Voltarelli, J.C. Brazilian consensus meeting on stem cell transplantation: hemoglobinopathies committee. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(Suppl 1):44-53.
148. Bridges KR, Barabino GD, Brugnara C, Cho MR, Christoph GW, Dover G, et al. A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing hydroxyurea therapy. *Blood*. 1996;88(12):4701-10.
149. Steinberg MH, Rodgers GP. Pharmacologic modulation of fetal hemoglobin. *Medicine*. 2001;80(5):328-44.
150. Thornburg CD, Files BA, Luo Z, Miller ST, Kalpatthi R, Iyer R, et al. Impact of hydroxyurea on clinical events in the BABY HUG trial. *Blood*. 2012;120(22):4304-10.
151. Rana S, Houston PE, Wang WC, Iyer RV, Goldsmith J, Casella JF, et al. Hydroxyurea and growth in young children with sickle cell disease. *Pediatrics*. 2014;134(3):465-72.
152. Alvarez O, Miller ST, Wang WC, Luo Z, McCarville MB, Schwartz GJ, et al. Effect of hydroxyurea treatment on renal function parameters: results

from the multi-center placebo-controlled BABY HUG clinical trial for infants with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(4):668-74.

153. Yates AM, Dedeken L, Smeltzer MP, Lebensburger JD, Wang WC, Robitaille N. Hydroxyurea treatment of children with hemoglobin SC disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(2):323-5.

154. Miller MK, Zimmerman SA, Schultz WH, Ware RE. Hydroxyurea therapy for pediatric patients with hemoglobin SC disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001;23(5):306-8.

155. Zimmerman SA, Schultz WH, Davis JS, Pickens CV, Mortier NA, Howard TA, et al. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. *Blood*. 2004;103(6):2039-45.

156. Wang W, Brugnara C, Snyder C, Wynn L, Rogers Z, Kalinyak K, et al. The effects of hydroxycarbamide and magnesium on haemoglobin SC disease: results of the multi-centre CHAMPS trial. *Br J Haematol*. 2011;152(6):771-6.

157. Luchtman-Jones L, Pressel S, Hilliard L, Brown RC, Smith MG, Thompson AA, et al. Effects of hydroxyurea treatment for patients with hemoglobin SC disease. *Am J Hematol*. 2016;91(2):238-42.

158. Cançado RDL, C.; Angulo, I.L.; Araujo, P.I.; Jesus, J.A. Clinical protocol and therapeutic guidelines for the use of hydroxyurea in sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(5):361-6.

159. Strouse JJ, Lanzkron S, Beach MC, Haywood C, Park H, Witkop C, et al. Hydroxyurea for sickle cell disease: a systematic review for efficacy and toxicity in children. *Pediatrics*. 2008;122(6):1332-42.

160. Baglioni C. Abnormal human haemoglobins. VII. Chemical studies on haemoglobin D. *Biochim Biophys Acta*. 1962;59:437-49.

161. Itano HA. A Third Abnormal Hemoglobin Associated with Hereditary Hemolytic Anemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1951;37(12):775-84.

162. Sturgeon P, Itano HA, Bergren WR. Clinical manifestations of inherited abnormal hemoglobins. I. The interaction of hemoglobin-S with hemoglobin-D. *Blood*. 1955;10(5):389-404.

163. Cawein MJ, Lappat EJ, Brangle RW, Farley CH. Hemoglobin S-D disease. *Ann Intern Med*. 1966;64(1):62-70.

164. Smith EW, Conley CL. Sick cell hemoglobin D disease. *Ann Intern Med.* 1959;50(1):94-105.
165. Baiget M, del Rio E, Gimferrer E. Hemoglobin D-Punjab (beta 121 Glu leads to Gln) in a Spanish family. *Hemoglobin.* 1982;6(2):193-8.
166. Lischka A, Pollak A, Bauer K, Aschauer H, Braunitzer G. Hemoglobin D "Los Angeles" in an Austrian family: biochemical identification, clinical aspects, and kindred study. *Hemoglobin.* 1984;8(4):353-61.
167. Fioretti G, De Angioletti M, Pagano L, Lacerra G, Viola A, de Bonis C, et al. DNA polymorphisms associated with Hb D-Los Angeles [beta 121(GH4)Glu-->Gln] in southern Italy. *Hemoglobin.* 1993;17(1):9-17.
168. Samperi P, Dibenedetto SP, di Cataldo A, Mancuso GR, Schiliro G. Unusual sick cell disease observed for the first time in Italy: Hb S-Hb D Los Angeles. *Haematologica.* 1990;75(5):464-6.
169. Perea FJ, Casas-Castaneda M, Villalobos-Arambula AR, Barajas H, Alvarez F, Camacho A, et al. Hb D-Los Angeles associated with Hb S or beta-thalassemia in four Mexican Mestizo families. *Hemoglobin.* 1999;23(3):231-7.
170. Husquinet H, Parent MT, Schoos-Barbette S, Dodinval-Versie J, Lambotte C, Galacteros F. Hemoglobin D-Los Angeles [beta 121(GH4)Glu----Gln] in the Province of Liege, Belgium. *Hemoglobin.* 1986;10(6):587-92.
171. Guevara JM, Arends-Merino A, Arends T. Disease caused by sick cell anemia and hemoglobin D-Punjab. 3d case found in Venezuela. *Sangre.* 1985;30(2):185-9.
172. el-Kalla S, Mathews AR. Hb D-Punjab in the United Arab Emirates. *Hemoglobin.* 1997;21(4):369-75.
173. Patel DK, Mashon RS, Patel S, Dash PM, Das BS. Beta-globin gene haplotypes linked with the Hb D-Punjab [beta121(GH4)Glu-->Gln, GAA>CAA] mutation in eastern India. *Hemoglobin.* 2010;34(6):530-7.
174. Ropero P, Gonzalez FA, Sanchez J, Armada B, Marti E, Valdes B, et al. The association of beta zero-thalassemia and Hb D Punjab in a family of Indian origin. The second case reported in Spain. *Med Clin (Barc).* 1997;108(10):385-8.
175. Fucharoen S, Changtrakun Y, Surapot S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K. Molecular characterization of Hb D-Punjab [beta121(GH4)Glu-->Gln] in Thailand. *Hemoglobin.* 2002;26(3):261-9.

176. Atalay EÖ, Atalay A, Üstel E, Yildiz S, Öztürk O, Köseleler A, et al. Genetic Origin of Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu \rightarrow Gln, GAA \rightarrow CAA] According to the β -Globin Gene Cluster Haplotypes. *Hemoglobin*. 2007;31(3):387-91.
177. Rahimi Z, Akramipour R, Nagel RL, Ahmadi AS, Merat A, Bahrehmand F. The beta-globin gene haplotypes associated with Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu \rightarrow Gln] in Western Iran. *Hemoglobin*. 2006;30(1):39-44.
178. Li HJ, Liu DX, Li L, Liu ZG, Lo SL, Zhao J, et al. A note about the incidence and origin of Hb D-Punjab in Xinjiang, People's Republic of China. *Hemoglobin*. 1986;10(6):667-71.
179. Ghalaut PSD, A.; Singh, V. Hemoglobin D-Thalassemia-Double heterozygous state: a case report from Haryana. *Indian J Hematol Blood Transf*. 1998;16(3):81-2.
180. Torres Lde S, Okumura JV, Silva DG, Bonini-Domingos CR. Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(2):120-6.
181. Yavarian M, Karimi M, Paran F, Neven C, Hartevelde CL, Giordano PC. Multi centric origin of Hb D-Punjab [β 121(GH4)Glu \rightarrow Gln, GAA \rightarrow CAA]. *Hemoglobin*. 2009;33(6):399-405.
182. Sonati MF, Kimura EM, Grotto HZ, Gervasio SA, Costa FF. Hereditary hemoglobinopathies in a population from southeast Brazil. *Hemoglobin*. 1996;20(2):175-9.
183. Bonini-Domingos CR. Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil – Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial. São José do Rio Preto-SP: Univ. Estadual Paulista – Unesp; 1993.
184. Torres LS, Okumura JV, Belini-Junior E, Oliveira RG, Nascimento PP, Silva DG, et al. Phenotypic Diversity of Sickle Cell Disease in Patients with a Double Heterozygosity for Hb S and Hb D-Punjab. *Hemoglobin*. 2016:1-7. DOI: 10.1080/03630269.2016.1222295
185. Boi-Doku FS, Lehmann H, Beale D. Haemoglobin Gacca. *Nature*. 1964;203:363-5.
186. Bain B.J. WBJ, Stephens A.D., Phelan L. Variant Haemoglobins. A Guide to Identification.: Wiley-Blackwell:Oxford.; 2010.

187. Akl PS, Kutlar F, Patel N, Salisbury CL, Lane P, Young AN. Compound heterozygosity for hemoglobin S [$\beta 6(A3)Glu6Val$] and hemoglobin Korle-Bu [$\beta 73(E17)Asp73Asn$]. *Lab Hematol*. 2009;15(3):20-4.
188. Kossover CL, Eckman JR, Young AN. Compound heterozygosity for hemoglobin C and hemoglobin Korle-Bu. *Lab Hematol*. 2008;14(3):30-4.
189. Nagel RL, Lin MJ, Witkowska HE, Fabry ME, Bestak M, Hirsch RE. Compound heterozygosity for hemoglobin C and Korle-Bu: moderate microcytic hemolytic anemia and acceleration of crystal formation [corrected]. *Blood*. 1993;82(6):1907-12.
190. Konotey-Ahulu FI, Gallo E, Lehmann H, Ringelhann B. Haemoglobin Korle-Bu (beta 73 aspartic acid replaced by asparagine) showing one of the two amino acid substitutions of haemoglobin C Harlem. *J Med Genet*. 1968;5(2):107-11.
191. Honig GR, Seeler RA, Shamsuddin M, Vida LN, Mompoin M, Valcourt E. Hemoglobin Korle Bu in a Mexican family. *Hemoglobin*. 1983;7(2):185-9.
192. Ropero P, Villegas A, Gonzalez FA. Hemoglobin Korle-Bu [$\beta 73(E17)Asp \rightarrow Asn$]. First cases described in Spain. *Med Clin (Barc)*. 2004;123(7):260-1.
193. Hocking DR. The separation and identification of hemoglobin variants by isoelectric focusing electrophoresis: an interpretive guide. Akron: Isolab Inc; p. 115; 1997.
194. Adachi K, Kim J, Ballas S, Surrey S, Asakura T. Facilitation of Hb S polymerization by the substitution of Glu for Gln at beta 121. *J Biol Chem*. 1988;263(12):5607-10.
195. Adekile A, Mullah-Ali A, Akar NA. Does elevated hemoglobin F modulate the phenotype in Hb SD-Los Angeles? *Acta Haematol*. 2010;123(3):135-9.
196. Bookchin RM, Nagel RL, Ranney HM. The effect of beta 73 Asn on the interactions of sickling hemoglobins. *Biochim Biophys Acta*. 1970;221(2):373-5.
197. Bookchin RM, Nagel RL, Balazs T. Role of hybrid tetramer formation in gelation of haemoglobin S. *Nature*. 1975;256(5519):667-8.
198. Oberoi S, Das R, Trehan A, Ahluwalia J, Bansal D, Malhotra P, et al. HbSD-Punjab: Clinical and Hematological Profile of a Rare Hemoglobinopathy. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013;36(3):e140-4.

199. Italia K, Upadhye D, Dabke P, Kangane H, Colaco S, Sawant P, et al. Clinical and hematological presentation among Indian patients with common hemoglobin variants. *Clin Chim Acta*. 2014;431:46-51.
200. Kelleher JF, Jr., Park JO, Kim HC, Schroeder WA. Life-threatening complications in a child with hemoglobin SD-Los Angeles disease. *Hemoglobin*. 1984;8(3):203-13.
201. Srinivas U, Pati HP, Saxena R. Hemoglobin D-Punjab syndromes in India: a single center experience on cation-exchange high performance liquid chromatography. *Hematology*. 2010;15(3):178-81.
202. Patel DK, Purohit P, Dehury S, Das P, Dutta A, Meher S, et al. Fetal hemoglobin and alpha thalassemia modulate the phenotypic expression of HbSD-Punjab. *Int J Lab Hematol*. 2014;36(4):444-50.
203. Steen RG, Xiong X, Langston JW, Helton KJ. Brain injury in children with sickle cell disease: prevalence and etiology. *Ann Neurol*. 2003;54(5):564-72.
204. Silva CM, Giovani P, Viana MB. High reticulocyte count is an independent risk factor for cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56(1):116-21.
205. Bainbridge R, Higgs DR, Maude GH, Serjeant GR. Clinical presentation of homozygous sickle cell disease. *J Pediatr*. 1985;106(6):881-5.
206. Stevens MC, Hayes RJ, Vaidya S, Serjeant GR. Fetal hemoglobin and clinical severity of homozygous sickle cell disease in early childhood. *J Pediatr*. 1981;98(1):37-41.
207. Zago MA, Costa FF. Hb D-Los Angeles in Brazil: simple heterozygotes and associations with beta-thalassemia and with Hb S. *Hemoglobin*. 1988;12(4):399-403.
208. Lobo CL, Pinto JF, Nascimento EM, Moura PG, Cardoso GP, Hankins JS. The effect of hydroxycarbamide therapy on survival of children with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2013;161(6):852-60.
209. Patel S, Purohit P, Mashon RS, Dehury S, Meher S, Sahoo S, et al. The effect of hydroxyurea on compound heterozygotes for sickle cell-hemoglobin D-Punjab--a single centre experience in eastern India. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(8):1341-6.
210. Udden MM, Lo MN, Sears DA. Successful hydroxyurea treatment of a patient with SD hemoglobinopathy. *Am J Hematol*. 1999;60(1):84-5.

211. Hamidieh AA, Jalili M, Khojasteh O, Ghavamzadeh A. First report of successful stem cell transplantation in a patient with sickle cell hemoglobin D disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010;32(5):397-9.
212. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med.* 1998;339(1):5-11.
213. National Heart, Lung, and Blood Institute; National Institutes of Health. The management of sickle cell disease. Bethesda, MD: NIH; p. 119-22; 2002.
214. Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000;151(9):839-45.
215. Sabarense AP, Lima GO, Silva LM, Viana MB. Survival of children with sickle cell disease in the comprehensive newborn screening programme in Minas Gerais, Brazil. *Paediatr Int Child Health.* 2015;35(4):329-32.
216. Adeyoju AB, Olujuhunge AB, Morris J, Yardumian A, Bareford D, Akenova A, et al. Priapism in sickle-cell disease; incidence, risk factors and complications - an international multicentre study. *BJU Int.* 2002;90(9):898-902.
217. Olujuhunge AB, Adeyoju A, Yardumian A, Akinyanju O, Morris J, Westerdale N, et al. A prospective diary study of stuttering priapism in adolescents and young men with sickle cell anemia: report of an international randomized control trial--the priapism in sickle cell study. *J Androl.* 2011;32(4):375-82.
218. Emond AM, Collis R, Darvill D, Higgs DR, Maude GH, Serjeant GR. Acute splenic sequestration in homozygous sickle cell disease: natural history and management. *J Pediatr.* 1985;107(2):201-6.
219. King L, Fraser R, Forbes M, Grindley M, Ali S, Reid M. Newborn sickle cell disease screening: the Jamaican experience (1995-2006). *J Med Screen.* 2007;14(3):117-22.
220. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood.* 1995;86(2):776-83.
221. Seeler RA, Shwiaki MZ. Acute splenic sequestration crises (ASSC) in young children with sickle cell anemia. Clinical observations in 20 episodes in 14 children. *Clin Pediatr (Phila).* 1972;11(12):701-4.

222. Vichinsky E, Hurst D, Earles A, Kleman K, Lubin B. Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality. *Pediatrics*. 1988;81(6):749-55.
223. Wang W, Brugnara C, Snyder C, Wynn L, Rogers Z, Kalinyak K, et al. The effects of hydroxycarbamide and magnesium on haemoglobin SC disease: results of the multi-centre CHAMPS trial. *Br J Haematol*. 2011;152(6):771-6.
224. Lebensburger JD, Patel RJ, Palabindela P, Bemrich-Stolz CJ, Howard TH, Hilliard LM. Hydroxyurea decreases hospitalizations in pediatric patients with Hb SC and Hb SB+ thalassemia. *J Blood Med*. 2015;6:285-90.
225. Seeler RA. Deaths in children with sickle cell anemia. A clinical analysis of 19 fatal instances in Chicago. *Clin Pediatr (Phila)*. 1972;11(11):634-7.
226. Gray A, Anionwu EN, Davies SC, Brozovic M. Patterns of mortality in sickle cell disease in the United Kingdom. *J Clin Pathol*. 1991;44(6):459-63.
227. Rogers DW, Clarke JM, Cupidore L, Ramlal AM, Sparke BR, Serjeant GR. Early deaths in Jamaican children with sickle cell disease. *Br Med J*. 1978;1(6126):1515-6.
228. Mancini EA, Culberson DE, Yang YM, Gardner TM, Powell R, Haynes J, Jr., et al. Causes of death in sickle cell disease: an autopsy study. *Br J Haematol*. 2003;123(2):359-65.
229. Miller ST, Sleeper LA, Pegelow CH, Enos LE, Wang WC, Weiner SJ, et al. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2000;342(2):83-9.
230. Thomas AN, Pattison C, Serjeant GR. Causes of death in sickle-cell disease in Jamaica. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982;285(6342):633-5.
231. Wright JG, Hambleton IR, Thomas PW, Duncan ND, Venugopal S, Serjeant GR. Postsplenectomy course in homozygous sickle cell disease. *J Pediatr*. 1999;134(3):304-9.
232. Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood*. 2001;98(1):250-1.
233. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol*. 1989;32(1):66-9.

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

9. Anexos

Anexo I – Protocolo de determinação do alelo D-Punjab

A amplificação do fragmento do *HBB* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM de cada dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatados), 10 pmoles de cada oligonucleotídeo (direto: 5'- TCATGCCTCTTTGCACCATTC -3'; reverso: 5'- GGGAAATGTGGGAGGTCAGTG -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A reação de amplificação foi feita em termociclador (Veriti, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) com uma fase inicial a 96°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos a 96°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na reação de restrição enzimática (RFLP), o produto da amplificação da PCR (572 pares de base - pb) foi digerido com enzima de restrição (EcoRI) à temperatura de 37°C durante 3 horas, numa reação de volume final de 20 µL (10 µL do produto da amplificação, 2 µL de tampão da enzima 1X, 2 µL da enzima EcoRI [20U] e 6 µL de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 µL do produto da RFLP adicionados a 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X (Tris 50mM pH 7,6; EDTA 5M; SDS 5%; xileno cianol 0,1%; sacarose 28%) foram aplicados em gel de agarose 3% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo brometo de etídio (10µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba (LCH – 13 x 15, Loccus Biotecnologia) contendo tampão TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético; 1 mM EDTA - pH 8,0). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos (Gel Doc™, XR+ com image Lab™ software, BIO-RAD). Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A enzima EcoRI reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...G↓AATTC...3'. Dessa forma, o fragmento de 572 pb contendo o alelo selvagem G em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 300 pb e

272 pb. O fragmento de 572 pb contendo o alelo mutante C (que codifica a Hb D-Punjab) em homozigose não apresenta sítio de restrição, permanecendo íntegro após a restrição. O genótipo heterozigoto foi identificado pela presença de todos os fragmentos (572 pb, 300 pb e 272 pb). A figura 1 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

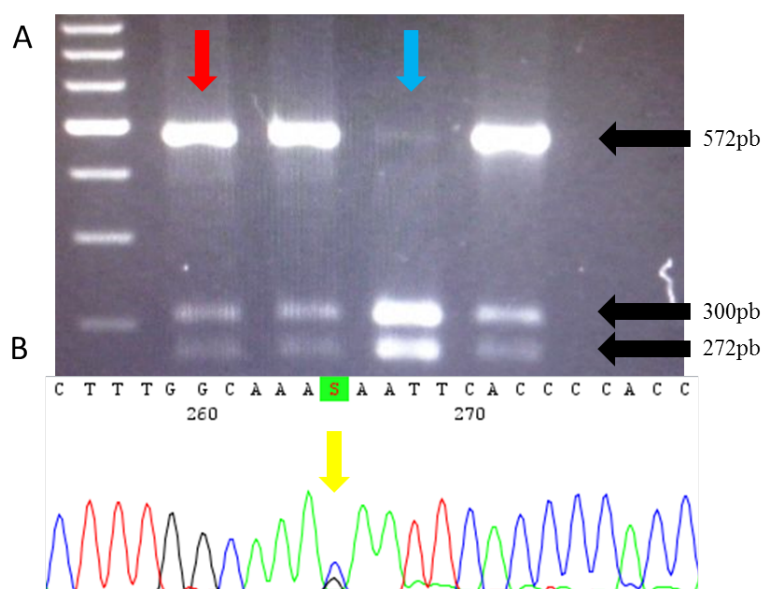


Figura 1 – Genotipagem do alelo D-Punjab. (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento de 572 pb amplificado do gene *HBB*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pb. A seta azul indica a amostra de indivíduo homozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GG, selvagem. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo heterozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GC (heterozigoto para o alelo D-Punjab). (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento em quatro cores do fragmento do gene *HBB*, mostrando os alelos GC em heterozigose (seta amarela).

Anexo II – Protocolo de sequenciamento para determinar outras variantes de Hb D

Após testagem inicial das amostras dos indivíduos com perfil hemoglobínico Hb SD para o alelo D-Punjab (anexo I), as amostras homozigotas selvagens (perfil na RFLP não característico de Hb D-Punjab) foram submetidas ao sequenciamento de fragmento do gene *HBB* para determinar outras variantes de Hb D.

A amplificação do fragmento do *HBB* de 771 pb foi feita utilizando 250 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 50 µL contendo tampão para PCR 1X, 2 mM de MgCl₂, 200 mM de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'-TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG -3'; reverso: 5'-TTTCTTGCCATGAGCCTTC -3') e 5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador (Veriti, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) com uma fase inicial a 96°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos a 96°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

A purificação do produto de PCR foi realizada utilizando kit comercial (kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*, MACHEREY-NAGEL), de acordo com instruções do fabricante. Para quantificação do produto purificado, 4 µL do produto adicionados de 0,5 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A eletroforese foi feita a 90 volts, durante 60 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de foto documentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. A quantificação foi obtida através da comparação visual da quantidade de DNA no fragmento purificado com a quantidade de DNA dos fragmentos do padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

As amostras foram sequenciadas utilizando o método de Sanger. Cerca de 150 ng de produto de PCR purificado, 1 µL do oligonucleotídeo sintético (10 pmoles), 3 µL do tampão de diluição (5X Sequencing Buffer; Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), 2 µl de BigDye v3.1 (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) e água para completar um volume final de 20 µL. As reações de sequenciamento foram feitas em termociclador (Veriti,

Applied Biosystems ou T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) com uma fase inicial a 96°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos a 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Após o término da reação, as amostras foram mantidas a 4°C.

Para precipitação, 90 µL de uma mistura contendo 60 µL de etanol 100%, 3 µL de acetato de sódio 3M e 27 µL de água tipo I foram adicionados ao produto da reação de sequenciamento. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, homogeneizando-a por inversão a cada 3 minutos. Centrifugou-se a 2.000 x g por 30 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi descartado por inversão da placa. Em seguida, 150 µL de etanol 70% mantido a -20°C foram adicionados. Posteriormente, a placa foi homogeneizada por inversão 10 vezes e centrifugada a 2.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e a placa foi centrifugada invertida a 50 x g durante 1 minuto. Foram adicionados 10 µL de formamida (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) em cada poço e a placa homogeneizada vigorosamente por 5 minutos. Posteriormente, a placa foi submetida a temperatura de 95°C por 5 minutos e, em seguida, colocada no gelo até o início da eletroforese capilar.

A eletroforese capilar foi realizada em aparelho ABI3130 (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), utilizando-se polímero POP7 (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) e capilar 48 centímetros (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA).

Os dados foram analisados comparando-se a sequência resultante da reação com a sequência do *HBB* depositada no GenBank (NG_000007.3), utilizando o programa Codon Code Aligner (CodonCode Corporation, USA). A figura 2 mostra o resultado do sequenciamento de DNA, mostrando a mutação subjacente à Hb Korle-bu em heterozigose (HBB:c.220G>A; **GAT>AAT**; Asp>Asn).

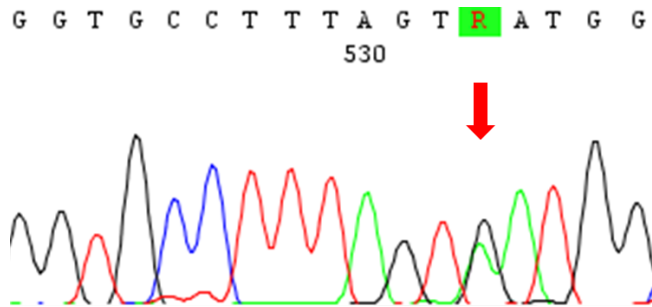


Figura 2 – Genotipagem do alelo Korle-bu. Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento de 771 pb do gene *HBB*, mostrando a mutação Hb Korle-bu (HBB:c.220G>A;) em heterozigose.

Anexo III – Protocolo de diagnóstico molecular de talassemia alfa

O diagnóstico molecular de alfa-talassemia foi feito por *gap-PCR* múltipla, capaz de detectar as sete principais deleções dos genes *HBA* em tubo único (232). A Figura 3 representa esquematicamente o agrupamento de genes da α -globina, indicando-se a extensão representativa de cada deleção e a posição relativa de cada oligonucleotídeo (Tabela 1).

A identidade de cada deleção foi obtida pela determinação do tamanho do fragmento amplificado na reação. Visto que qualquer uma das sete deleções remove parte ou todo o gene *HBA2*, a amplificação do gene *wild* juntamente com a amplificação de um fragmento correspondente a alguma deleção indica que a mutação encontra-se em heterozigose. Como controle positivo para o sucesso da amplificação do DNA, foi utilizado um segmento de 2.350 pb, referente à região 3' não transcrita do gene *LIS1* (fator plaquetário), localizado no cromossomo 17p13.3.

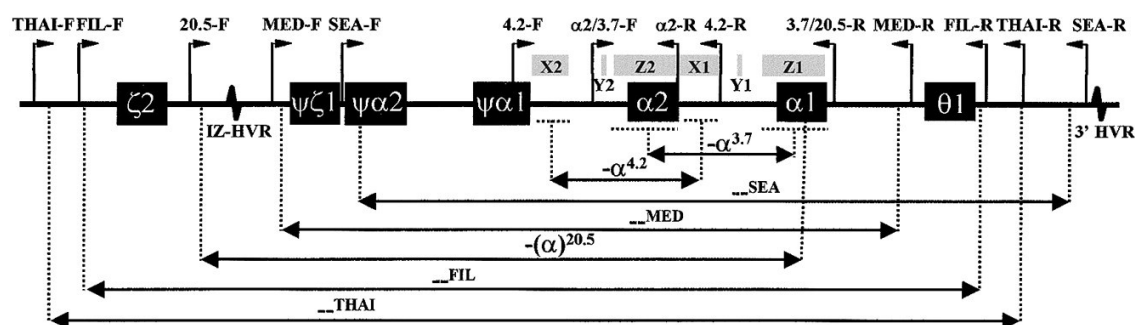


Figura 3 - Ilustração do agrupamento de genes da globina alfa, extensão das deleções e posição dos oligonucleotídeos .

Fonte: Tan et al., 2001 (232)

As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit comercial para PCR múltipla (QIAGEN® Multiplex PCR kit, QIAGEN). Os ensaios para diagnóstico molecular de α -Tal foram realizados nas seguintes condições: volume final de 15 μ L, contendo 100 μ M de cada dNTP, 0,75 μ M $MgCl_2$ e 1,25 U HotStarTaq DNA polimerase (*Qiagen master mix*), oligonucleotídeos sintéticos em concentrações distintas (Tabela 1), 1X solução Q e 250 ng de DNA genômico. Com relação aos ciclos da PCR, estabeleceu-se: ativação da enzima *hot start* e desnaturação do DNA a 96°C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos de 98°C por 45 segundos para desnaturação do DNA, 62°C durante 90 segundos para anelamento dos iniciadores, 72°C por 135 segundos para

ação da DNA polimerase, seguido por uma extensão final de 5 minutos a 72°C (Veriti, Applied Biosystems).

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos sintéticos para cada tipo de deleção da α -Tal, respectivas concentrações utilizadas nas reações de PCR e tamanho esperado dos produtos da amplificação

Gene ou tipo de deleção	Sequência 5`-3`	Concentração	Tamanho do fragmento esperado
LIS1-F	ATACCATGGTTACCCCATTGAG C	0.5 mM	2350 pb 2022/2029 pb
LIS1-R	AGGGCTCATTACATGTGGACCC	0.5 mM	
α 2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	0.2 mM	1800 pb
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	0.2 mM	
α 2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	0.2 mM	1628 pb
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC CCCGTTGGATCTTCTCATTTC	0.5 mM	
4.2-R	C	0.5 mM	1349 pb
SEA-F	CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	0.2 mM	
SEA-R	AGCCCACGTTGTGTTTCATGGC	0.2 mM	1153 pb
THAI-F	GACCATTCTCAGCGTGGGTG	0.3 mM	
THAI-R	CAAGTGGGCTGAGCCCTTGAG	0.3 mM	1007 pb
20.5-F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	0.2 mM	
MED-F	TACCCTTTGCAAGCACACGTAC	0.2 mM	807 pb
MED-R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC TTTAAATGGGCAAACAGGCCA	0.2 mM	
FIL-F	GG	1.0 mM	546 pb
FIL-R	ATAACCTTTATCTGCCACATGTA GC	1.0 mM	

Fonte: Tan et al., 2001 (232)

Para resolução dos produtos da PCR, 15 μ L do produto adicionados de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (10 μ g/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 90 volts durante 2 horas em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. A determinação do genótipo foi realizada de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados, quando comparados com o padrão de peso molecular 500 pb (500 bp DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Figura 4).

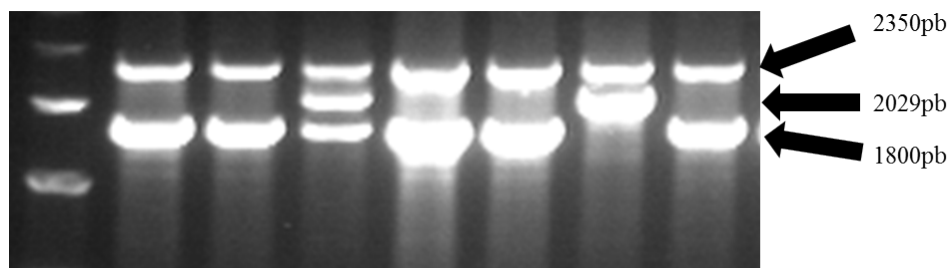


Figura 4 – Fotografia do gel de agarose 1% contendo produtos da PCR múltipla para diagnóstico molecular da talassemia alfa. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 500 pares de base. Nas canaletas 2, 4 e 7 foram aplicadas amostras com os genótipos $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $\alpha\alpha/\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$, respectivamente.

Anexo IV – Determinação dos haplótipos do agrupamento de genes da globina beta

Haplótipos β^S

A determinação dos haplótipos do agrupamento de genes da β^S -globina foi realizada por meio de PCR-RFLP conforme SUTTON *et al.* (233), com modificações. Foram analisados cinco fragmentos para a determinação desses haplótipos (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequências dos oligonucleotídeos e características dos RFLPs para genotipagem dos haplótipos do agrupamento de genes da β^S -globina

Sequência do oligonucleotídeo	Direção	Posição	Gene	Enzima	Fragmentos de restrição
AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	Reverso	44538	$G\gamma$	HindIII 5'...A↓AGCTT...3'	346+434
TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	Direto	43779 G γ /A γ 48699			
TAAATGAGGAGCATGCACACAC	Reverso	49457	$A\gamma$	HindIII	344+436
GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	Direto	54793	$\psi\beta$	HincII 5'...GTY↓ RAC...3'	369+337
ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	Reverso	55479			
TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	Direto	57870		HincII	517+97
GGACCCTAACTGATATAACTA	Reverso	58463	3' $\psi\beta$	5'...GTY↓ RAC...3'	239+147
CTACGCTGACCTCATAAATG	Direto	69314		Hinfl	
CTAATCTGCAAGAGTGTCT	Reverso	69681	5' β	5'...G↓ANTC...3'	

A amplificação dos fragmentos utilizados para determinação dos haplótipos β^S -globina foi feita utilizando 100 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 20 ml, contendo 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl, MgCl₂ em concentrações distintas, 200 mM de cada dNTPs, 2 pmol de cada oligonucleotídeo sintético e 0,8 U de Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA). A reação de amplificação foi feita em termociclador (Veriti, Applied Biosystems ou T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) com uma fase inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 57°C por 30 segundos (exceto para 3' $\psi\beta$: 60°C por 30 segundos), e 72°C por 45 segundos, mais uma fase de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Na análise de RFLP, os produtos da amplificação da PCR (10 ml) foram digeridos com as enzimas adequadas à temperatura de 37°C numa reação de volume final de 20 μ L: HindIII na região IVS2 do gene $G\gamma$ e na região IVS2 do gene $A\gamma$; Hinc II em $\psi\beta$ e na extremidade 3' de β ; e HinfI na

extremidade 5' de β . Após a digestão, a enzima foi inativada com aumento da temperatura para 65°C durante 20 minutos (Tabela 2).

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

Utilizando-se esses cinco polimorfismos, os cromossomos foram agrupados em cinco haplótipos clássicos, de acordo com o padrão de restrição: CAR ou Bantu (+----), Benin (---+-), Senegal (+----), Camarões (+++-) e Asiático (+---+), sendo que “+” representa a presença e “-” representa a ausência do sítio polimórfico. Quaisquer outras combinações encontradas foram classificadas como haplótipos atípicos (Tabela 3). Quando se verificava a heterozigose para dois haplótipos, pressunha-se, com base na maior prevalência de haplótipos comuns em indivíduos com doença falciforme, que um haplótipo comum estava presente, juntamente com um haplótipo atípico, em vez de dois haplótipos atípicos. Todas as amostras em que foram indentificados haplótipos atípicos, a genotipagem foi realizada novamente para confirmação do resultado.

Tabela 3 - Principais haplótipos do agrupamento de genes da β^S globina

Sítios / haplótipos	^G γ Hind III	^A γ Hind III	$\psi\beta$ Hinc II	3' $\psi\beta$ Hinc II	5' β Hinf I
CAR	+	-	-	-	-
Benin	-	-	-	+	-
Senegal	+	-	+	+	+
Camarões	+	+	-	+	+
Asiático	+	-	+	+	-

Haplótipos β^C

Para determinação dos haplótipos do alelo β^C , além dos cinco fragmentos utilizados na determinação dos haplótipos β^S , também foi analisado o sítio polimórfico HpaI a 3' do gene *HBB*. O sítio polimórfico HpaI está localizado em uma região repetitiva e não pode ser amplificado por PCR convencional (234). Dessa forma, esse fragmento foi amplificado por “PCR a longa distância” (*Longe Range PCR*).

As reações de “PCR a longa distância” foram realizadas utilizando-se o kit comercial (QIAGEN® LongRange PCR kit, QIAGEN). Os ensaios foram realizados nas seguintes condições: volume final de 50 μ L contendo 500 μ M de cada dNTP, 1X de LongRange PCR Buffer, 0,8U LongRange PCR Enzyme, 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'-CCCAAAGTAGAACTATCAAGGGAG-3'; reverso: 5'-TGGCTCTACGGATGTGTGAGATCA-3') e 250 ng de DNA genômico. A reação de amplificação foi feita em termociclador (Veriti, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) com uma fase inicial a 93°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos a 93°C por 15 segundos, 62°C por 30 segundos e 68°C por 7 minutos.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (6.542 pb) foi digerido com enzima de restrição HpaI à temperatura de 37°C durante 60 minutos, numa reação de volume final de 20 μ L (10 μ L do produto da amplificação, 2 μ L de tampão 1X, 1,0 μ L da enzima HpaI [5U] e 7 μ L de água tipo I).

Para resolução dos produtos da RFLP, 20 μ L do produto adicionado de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (10 μ g/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 90 volts durante 2 horas em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. A determinação do genótipo foi realizada de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados, quando comparados com o padrão de peso molecular 250 pb (500 bp DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Figura 5).

A enzima HpaI reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...GTT↓AAC...3'. Dessa forma, o fragmento de 6.542 pb contendo o alelo selvagem A (muito mais comum do que o alelo G, este geralmente presente em alelos de

indivíduos com Hb C) é clivado pela HpaI, gerando fragmentos de 3.575 pb e 2.967 pb. O alelo polimórfico G não é clivado pela HpaI e permanece íntegro. O genótipo heterozigoto foi identificado pela presença de todos os três fragmentos (6.542 pb, 3.575 pb e 2.967 pb). O genótipo homozigoto selvagem A não apresenta o fragmento de 6.542 pb e o homozigoto mutado G, ao contrário, só apresenta esse fragmento. A figura 5 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item.

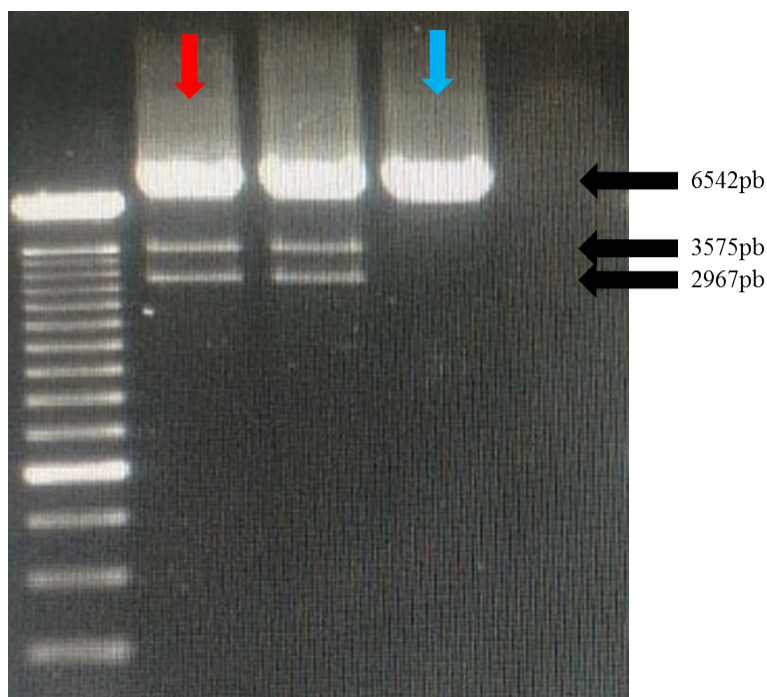


Figura 5 – Gel de agarose 1% contendo produtos da RFLP. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 250 pb. A seta azul indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GG (-/-). A seta vermelha indica amostra de indivíduo heterozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo AG (+/-).

Utilizando-se esses seis polimorfismos, os alelos foram agrupados em três haplótipos clássicos, de acordo com o padrão de restrição: I (+---+-), II (----+-) e III (----+-), sendo que “+” representa a presença e “-” representa a ausência do sítio polimórfico. Quaisquer outras combinações encontradas foram classificadas como haplótipos atípicos (Tabela 4). Em todas as amostras com identificação de haplótipos atípicos, repetiu-se a genotipagem para confirmação do resultado.

Tabela 4 - Principais haplótipos do agrupamento de genes da β^C globina

Sítios / haplótipos	^G γ Hind 	^A γ Hind 	$\psi\beta$ Hinc 	3' $\psi\beta$ Hinc 	5' β Hinf I	3' β HpaI
I	+	-	-	+	+	-
II	-	-	-	+	+	-
III	-	-	-	-	+	-

Haplótipos β^D

Para determinação dos haplótipos de β^D foram analisados os seguintes sítios polimórficos: ϵ (Hinc II), $G\gamma$ (Hind III), $A\gamma$ (Hind III), $\Psi\beta$ (Hinc II), $3'\Psi\beta$ (Hinc II), β (Avall) e $3'\beta$ (Hinf I). A determinação do padrão de restrição dos sítios polimórficos $G\gamma$ (Hind III), $A\gamma$ (Hind III), $\Psi\beta$ (Hinc II), $3'\Psi\beta$ (Hinc II) e $3'\beta$ (Hinf I) foi feita utilizando os mesmo protocolos descritos na seção “Haplótipos β^S ” deste anexo.

Os sítios polimórficos nas regiões ϵ (rs3834466) e β (rs10768683) foram determinados por sequenciamento de DNA.

A amplificação do fragmento de 761 pb do *HBE* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 20 μ L contendo tampão para PCR 1X, 2,0 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP (Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados), 10 pmoles de cada oligonucleotídeo (direto: 5' TCTCTGTTTGATGACAAATTC 3'; reverso: 5'-AGTCATTGGTCAAGGCTGACC-3') e 0,5 U de Platinum@Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A reação de amplificação foi feita em termociclador (Veriti, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) com uma fase inicial a 96°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos a 96°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

O protocolo de amplificação do fragmento de 771 pb do *HBB* utilizado para determinação do polimorfismo em β (rs10768683) foi descrito anteriormente (Anexo 2).

Os protocolos de purificação, reação de sequenciamento, precipitação da reação de sequenciamento e eletroforese capilar para determinação dos sítios polimórficos ϵ e β foram os descritos anteriormente (Anexo 2).

A figura 6 mostra o resultado do sequenciamento de DNA do fragmento *HBE*, mostrando o polimorfismo rs3834466 em heterozigose.

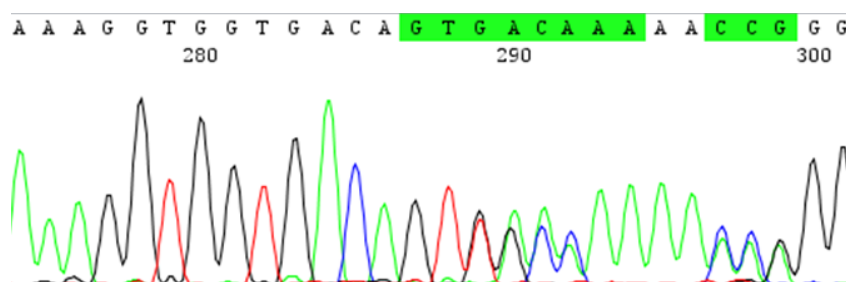


Figura 6 – Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *HBE*, mostrando o polimorfismo rs3834466 em heterozigose (AAC/AC).

A figura 7 mostra o resultado do sequenciamento de DNA do fragmento *HBB*, mostrando o alelo C (rs10768683) em homozigose.

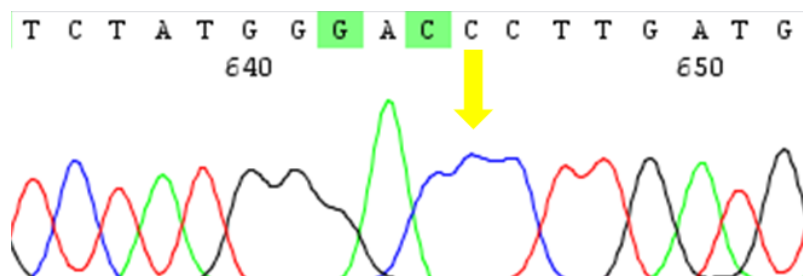


Figura 7 – Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *HBB*, mostrando o alelo C (rs10768683) em homozigose (seta amarela).

Utilizando-se esses sete polimorfismos, os haplótipos β^D foram determinados comparando-se os resultados obtidos com os perfis polimórficos listados por Patel et al. 2010 (173).

Anexo V – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO **(Para pais de crianças com até 7 anos incompletos)** Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96

Pesquisa: Estudo das manifestações clínicas e hematológicas da doença falciforme subtipos SC e SD em crianças do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais

As doenças falciformes são doenças do sangue causadas pela alteração na forma dos glóbulos vermelhos do sangue (hemácias), que ficam parecidas com foice, ao invés de ter a forma normal arredondada. Ela é uma doença genética, ou seja, o pai e a mãe transmitem para os filhos o gene alterado que leva à doença. A doença acontece por um defeito na hemoglobina, que é a parte do glóbulo vermelho responsável por carregar o oxigênio para todo o corpo. A hemoglobina normal é a hemoglobina A, mas no caso desta doença, a pessoa tem hemoglobinas S, C ou D (hemoglobinas alteradas) e não possuem hemoglobina A. Na doença da hemoglobina SC existem duas hemoglobinas alteradas: a hemoglobina S e a hemoglobina C. Na doença da hemoglobina SD existem duas hemoglobinas alteradas: a hemoglobina S e a hemoglobina D. As doenças das hemoglobinas SC e SD podem causar diferentes sintomas e em diversos graus de intensidade. Nosso objetivo é estudar essas características clínicas e de alterações no sangue e de outras partes do corpo, como vasos sanguíneos cerebrais, vasos do fundo dos olhos, ossos e outros órgãos que podem ser atingidos pelas doenças das hemoglobinas SC e SD. As crianças serão beneficiadas diretamente porque a pesquisa busca conhecer melhor como a doença se manifesta no paciente, para que o médico tenha condições de realizar ações mais adequadas de tratamento e prevenção de complicações.

Ao concordar com a participação na pesquisa, você estará autorizando que os pesquisadores consultem os dados clínicos e laboratoriais de seu filho ou da criança pela qual você é responsável nos prontuários médicos. Caso você autorize, você não terá nenhum custo. Os dados coletados ficarão guardados na Fundação Hemominas e serão usados apenas para os fins propostos nesta pesquisa

Iremos colher 5 ml de sangue da veia da criança no dia da consulta agendada na Fundação Hemominas para realizar exames genéticos que podem ajudar o médico a conhecer quais os pacientes terão maior risco de ter uma doença mais grave, e assim orientá-lo no tratamento mais adequado para evitar as possíveis complicações. A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas em alguns casos pode ocorrer um hematoma (cor roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, o que ocorre comumente, a amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta. Parte do sangue coletado será usado para estudos do DNA da criança, relacionados aos genes que controlam a produção das hemoglobinas.

Você poderá se recusar a participar ou solicitar desligamento do projeto, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem nenhum prejuízo ao cuidado de seu filho em seu atendimento e acompanhamento ambulatorial e laboratorial na Fundação Hemominas. Você não receberá remuneração por participar do estudo. Na divulgação dos resultados, o nome da pessoa não será mostrado, garantindo sigilo e privacidade.

Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones para contato com os pesquisadores são 32484596 ou 34099772. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2o andar, sala 2005. Telefone 34094592) e/ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas (Alameda Ezequiel Dias, 321. Telefone 32484587).

CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa "Estudo das manifestações clínicas e hematológicas da doença falciforme subtipos SC e SD em crianças do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais", consinto em participar na qualidade de responsável pela criança _____, até que eu decida em contrário. Permito, também, que parte do sangue coletado seja utilizado para estudos do DNA, relacionados aos genes que controlam a produção de hemoglobinas.

Data: Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__

Responsável.....

Pesquisador.....

Pesquisadores responsáveis: Marcos Borato Viana e Paulo do Val Rezende

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Para pais e crianças de 7 até 12 anos incompletos)
Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96

Pesquisa: Estudo das manifestações clínicas e hematológicas da doença falciforme subtipos SC e SD em crianças do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais

As doenças falciformes são doenças do sangue causadas pela alteração na forma dos glóbulos vermelhos do sangue (hemácias), que ficam parecidas com foice, ao invés de ter a forma normal arredondada. Ela é uma doença genética, ou seja, o pai e a mãe transmitem para os filhos o gene alterado que leva à doença. A doença acontece por um defeito na hemoglobina, que é a parte do glóbulo vermelho responsável por carregar o oxigênio para todo o corpo. A hemoglobina normal é a hemoglobina A, mas no caso desta doença, a pessoa tem hemoglobinas S, C ou D (hemoglobinas alteradas) e não possuem hemoglobina A. Na doença da hemoglobina SC existem duas hemoglobinas alteradas: a hemoglobina S e a hemoglobina C. Na doença da hemoglobina SD existem duas hemoglobinas alteradas: a hemoglobina S e a hemoglobina D. As doenças das hemoglobinas SC e SD podem causar diferentes sintomas e em diversos graus de intensidade. Nosso objetivo é estudar essas características clínicas e de alterações no sangue e de outras partes do corpo, como vasos sanguíneos cerebrais, vasos do fundo dos olhos, ossos e outros órgãos que podem ser atingidos pelas doenças das hemoglobinas SC e SD. As crianças serão beneficiadas diretamente porque a pesquisa busca conhecer melhor como a doença se manifesta no paciente, para que o médico tenha condições de realizar ações mais adequadas de tratamento e prevenção de complicações.

Ao concordar com a participação na pesquisa, você estará autorizando que os pesquisadores consultem os dados clínicos e laboratoriais de seu filho ou da criança pela qual você é responsável nos prontuários médicos. Caso você autorize, você não terá nenhum custo. Os dados coletados ficarão guardados na Fundação Hemominas e serão usados apenas para os fins propostos nesta pesquisa.

Tomaremos 5 ml de sangue da veia da criança no dia da consulta agendada na Fundação Hemominas para realizar exames genéticos que podem ajudar o médico a conhecer quais os pacientes terão maior risco de ter uma doença mais grave, e assim orientá-lo no tratamento mais adequado para evitar as possíveis complicações. A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas em alguns casos pode ocorrer um hematoma (cor roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, a amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta. Parte do sangue coletado será usado para estudos do DNA da criança, relacionados aos genes que controlam a produção das hemoglobinas.

Você poderá se recusar a participar ou solicitar desligamento do projeto, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem nenhum prejuízo ao cuidado de seu filho em seu atendimento e acompanhamento ambulatorial e laboratorial na Fundação Hemominas. Você não receberá remuneração por participar do estudo. Na divulgação dos resultados, o nome da pessoa não será mostrado, garantindo sigilo e privacidade.

Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones para contato com os pesquisadores são 32484596 ou 34099772. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2o andar, sala 2005. Telefone 34094592) e/ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas (Alameda Ezequiel Dias, 321. Telefone 32484587).

CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa "Estudo das manifestações clínicas e hematológicas da doença falciforme subtipos SC e SD em crianças do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais", consinto em participar na qualidade de responsável pela criança _____, até que eu decida em contrário. Permito, também, que parte do sangue coletado seja utilizado para estudos do DNA, relacionados aos genes que controlam a produção de hemoglobinas.

Data: Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__

Responsável _____

Pesquisador _____

Paciente _____

Pesquisadores responsáveis: Marcos Borato Viana e Paulo do Val Rezende

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Para pais de crianças acima de 12 anos)
Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96

Pesquisa: Estudo das manifestações clínicas e hematológicas da doença falciforme subtipos SC e SD em crianças do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais

As doenças falciformes são doenças do sangue causadas pela alteração na forma dos glóbulos vermelhos do sangue (hemácias), que ficam parecidas com foice, ao invés de ter a forma normal arredondada. Ela é uma doença genética, ou seja, o pai e a mãe transmitem para os filhos o gene alterado que leva à doença. A doença acontece por um defeito na hemoglobina, que é a parte do glóbulo vermelho responsável por carregar o oxigênio para todo o corpo. A hemoglobina normal é a hemoglobina A, mas no caso desta doença, a pessoa tem hemoglobinas S, C ou D (hemoglobinas alteradas) e não possuem hemoglobina A. Na doença da hemoglobina SC existem duas hemoglobinas alteradas: a hemoglobina S e a hemoglobina C. Na doença da hemoglobina SD existem duas hemoglobinas alteradas: a hemoglobina S e a hemoglobina D. As doenças das hemoglobinas SC e SD podem causar diferentes sintomas e em diversos graus de intensidade. Nosso objetivo é estudar essas características clínicas e de alterações no sangue e de outras partes do corpo, como vasos sanguíneos cerebrais, vasos do fundo dos olhos, ossos e outros órgãos que podem ser atingidos pelas doenças das hemoglobinas SC e SD. As crianças e adolescentes serão beneficiados diretamente porque a pesquisa busca conhecer melhor como a doença se manifesta no paciente, para que o médico tenha condições de realizar ações mais adequadas de tratamento e prevenção de complicações.

Ao concordar com a participação na pesquisa, você estará autorizando que os pesquisadores consultem os dados clínicos e laboratoriais de seu filho ou da criança pela qual você é responsável nos prontuários médicos. Caso você autorize, você não terá nenhum custo. Os dados coletados ficarão guardados na Fundação Hemominas e serão usados apenas para os fins propostos nesta pesquisa

Iremos colher 5 ml de sangue da veia da criança no dia da consulta agendada na Fundação Hemominas para realizar exames genéticos que podem ajudar o médico a conhecer quais os pacientes terão maior risco de ter uma doença mais grave, e assim orientá-lo no tratamento mais adequado para evitar as possíveis complicações. A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas em alguns casos pode ocorrer um hematoma (cor roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, a amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta. Parte do sangue coletado será usado para estudos do DNA da criança, relacionados aos genes que controlam a produção das hemoglobinas.

Você poderá se recusar a participar ou solicitar desligamento do projeto, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem nenhum prejuízo ao cuidado de seu filho em seu atendimento e acompanhamento ambulatorial e laboratorial na Fundação Hemominas. Você não receberá remuneração por participar do estudo. Na divulgação dos resultados, o nome da pessoa não será mostrado, garantindo sigilo e privacidade.

Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones para contato com os pesquisadores são 32484596 ou 34099772. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2o andar, sala 2005. Telefone 34094592) e/ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas (Alameda Ezequiel Dias, 321. Telefone 32484587).

CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa "Estudo das manifestações clínicas e hematológicas da doença falciforme subtipos SC e SD em crianças do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais", consinto em participar na qualidade de responsável pela criança _____, até que eu decida em contrário. Permito, também, que parte do sangue coletado seja utilizado para estudos do DNA, relacionados aos genes que controlam a produção de hemoglobinas.

Data: Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__

Responsável _____

Pesquisador _____

Pesquisadores responsáveis: Marcos Borato Viana e Paulo do Val Rezende

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Para crianças e adolescentes acima de 12 anos)
Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96

Pesquisa: Estudo das manifestações clínicas e hematológicas da doença falciforme subtipos SC e SD em crianças do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais

As doenças falciformes são doenças do sangue causadas pela alteração na forma dos glóbulos vermelhos do sangue (hemácias), que ficam parecidas com foice, ao invés de ter a forma normal arredondada. Ela é uma doença genética, ou seja, o pai e a mãe transmitem para os filhos o gene alterado que leva à doença. A doença acontece por um defeito na hemoglobina, que é a parte do glóbulo vermelho responsável por carregar o oxigênio para todo o corpo. A hemoglobina normal é a hemoglobina A, mas no caso desta doença, a pessoa tem hemoglobinas S, C ou D (hemoglobinas alteradas) e não possuem hemoglobina A. Na doença da hemoglobina SC existem duas hemoglobinas alteradas: a hemoglobina S e a hemoglobina C. Na doença da hemoglobina SD existem duas hemoglobinas alteradas: a hemoglobina S e a hemoglobina D. As doenças das hemoglobinas SC e SD podem causar diferentes sintomas e em diversos graus de intensidade. Nosso objetivo é estudar essas características clínicas e de alterações no sangue e de outras partes do corpo, como vasos sanguíneos cerebrais, vasos do fundo dos olhos, ossos e outros órgãos que podem ser atingidos pelas doenças das hemoglobinas SC e SD. As crianças e adolescentes serão beneficiados diretamente porque a pesquisa busca conhecer melhor como a doença se manifesta no paciente, para que o médico tenha condições de realizar ações mais adequadas de tratamento e prevenção de complicações.

Ao concordar com a participação na pesquisa, você estará autorizando que os pesquisadores consultem os dados clínicos e laboratoriais de seu filho ou da criança pela qual você é responsável nos prontuários médicos. Caso você autorize, você não terá nenhum custo. Os dados coletados ficarão guardados na Fundação Hemominas e serão usados apenas para os fins propostos nesta pesquisa.

Iremos colher 5 ml de sangue da sua veia no dia da consulta agendada na Fundação Hemominas para realizar exames genéticos que podem ajudar o médico a conhecer quais os pacientes terão maior risco de ter uma doença mais grave, e assim orientá-lo no tratamento mais adequado para evitar as possíveis complicações. A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas em alguns casos pode ocorrer um hematoma (cor roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Caso seja feita uma coleta de sangue para exams referentes ao acompanhamento clínico, a amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta. Parte do sangue coletado será usado para estudos do DNA da criança, relacionados aos genes que controlam a produção das hemoglobinas.

Você poderá se recusar a participar ou solicitar desligamento do projeto, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem nenhum prejuízo ao cuidado de seu filho em seu atendimento e acompanhamento ambulatorial e laboratorial na Fundação Hemominas. Você não receberá remuneração por participar do estudo. Na divulgação dos resultados, o nome da pessoa não será mostrado, garantindo sigilo e privacidade.

Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones para contato com os pesquisadores são 32484596 ou 34099772. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2o andar, sala 2005. Telefone 34094592) e/ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas (Alameda Ezequiel Dias, 321. Telefone 32484587).

CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa "Estudo das manifestações clínicas e hematológicas da doença falciforme subtipos SC e SD em crianças do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais", consinto em participar na qualidade de responsável pela criança _____, até que eu decida em contrário. Permito, também, que parte do sangue coletado seja utilizado para estudos do DNA, relacionados aos genes que controlam a produção de hemoglobinas.

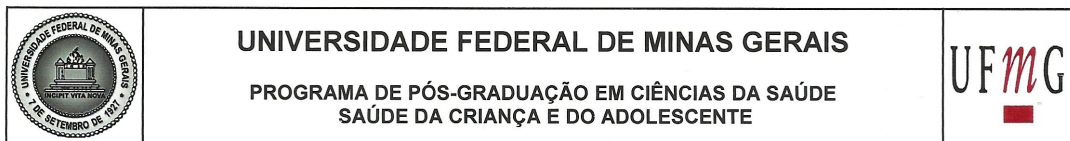
Data: Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__

Responsável _____

Pesquisador _____

Pesquisadores responsáveis: Marcos Borato Viana e Paulo do Val Rezende

Anexo VI – Termos de aprovação da defesa de tese



FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS DA DOENÇA FALCIFORME SUBTIPOS SC E SD EM CRIANÇAS DO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS

PAULO DO VAL REZENDE

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Ciências da Saúde.

Aprovada em 29 de setembro de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Marcos Borato Viana - Orientador
UFMG


Prof. Joaquim Antônio César Mota
UFMG


Prof.ª Benigna Maria de Oliveira
UFMG


Prof.ª Ana Cristina Silva Pinto
FMRP


Prof. Jorge Andrade Pinto
UFMG

Belo Horizonte, 29 de setembro de 2016.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO PAULO DO VAL REZENDE

Realizou-se, no dia 29 de setembro de 2016, às 13:30 horas, sala 268, 2º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada "ESTUDO DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS DA DOENÇA FALCIFORME SUBTIPOS SC E SD EM CRIANÇAS DO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS", apresentada por PAULO DO VAL REZENDE, número de registro 2012655267, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente à seguinte Comissão Examinadora formada pelos Professores Doutores: Marcos Borato Viana - Orientador (UFMG), Joaquim Antônio César Mota (UFMG), Benigna Maria de Oliveira (UFMG), Ana Cristina Silva Pinto (FMRP), Jorge Andrade Pinto (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 29 de setembro de 2016.

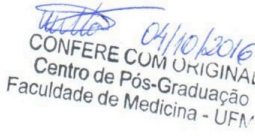

Prof. Marcos Borato Viana (Doutor)


Prof. Joaquim Antônio César Mota (Doutor)


Prof.ª Benigna Maria de Oliveira (Doutora)


Prof.ª Ana Cristina Silva Pinto (Doutora)


Prof. Jorge Andrade Pinto (Doutor)


CONFERE COM ORIGINAL
04/10/2016
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

Centro de Pós Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG
Av. Prof. Alfredo Baeta, 190, 5º Andar
CEP 30130-100 - Funcionários - BH/UFMG