



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

LETÍCIA EDUARDA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS β_s E DA
ALFA TALASSEMIA NA VARIABILIDADE CLÍNICA DE
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME**

Recife
2023

LETÍCIA EDUARDA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS β s E DA
ALFA TALASSEMIA NA VARIABILIDADE CLÍNICA DE
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Msc. Gabriela da Silva Arcanjo
Co-orientador: Prof Dr. Marcos André
Cavalcante Bezerra

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Oliveira, Letícia Eduarda de.

Análise da influência dos háplotipos Bs e da alfa talassemia na
variabilidade clínica de pacientes pediátricos com anemia falciforme / Letícia
Eduarda de Oliveira. - Recife, 2023.

63 p. : il., tab.

Orientador(a): Gabriela da Silva Arcanjo

Coorientador(a): Marcos André Cavalcanti Bezerra

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

Inclui referências, anexos.

1. Doença Falciforme. 2. Marcadores Genéticos. 3. Variabilidade fenotípica.
4. Fisiopatologia. 5. AVC. I. Arcanjo, Gabriela da Silva. (Orientação). II.
Bezerra, Marcos André Cavalcanti. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

LETÍCIA EDUARDA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS β s E DA ALFA
TALASSEMIA NA VARIABILIDADE CLÍNICA DE PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 19/09/2023

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): Mestre Gabriela da Silva Arcanjo
UFPE/ Departamento de Genética

Msc. Madi Veiga Diniz
UFPE/ Hospital das Clínicas

Esp. Alexsandro Pedro da Silva
UFPE/ Hospital das Clínicas

Dedico este trabalho àqueles que
tornaram esse sonho possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, como base de forças do meu caminho para chegar até aqui. À minha família que sempre me apoiou e incentivou a ser mais forte e corajosa em busca dos meus sonhos, proporcionando meu alicerce durante a minha caminhada.

Agradeço à minha orientadora, Msc. Gabriela Arcanjo, por todo suporte, dedicação e companheirismo, desde o início da minha iniciação científica. Obrigado por ter compartilhado tanto conhecimento com tanta leveza, serei sempre grata a você.

Ao professor Dr. Marcos André por ter proporcionado a melhor oportunidade de crescimento na minha formação acadêmica, além do suporte na realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Antônio Roberto e Dra. Betania Lucena que também auxiliaram na construção do meu conhecimento.

Aos companheiros do NHCL, Carlos Brandão e João Paulo por terem me recebido de braços abertos desde que entrei no laboratório.

A instituição de ensino UFPE pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao HEMOPE pela disponibilidade e estrutura, e aos pacientes que se voluntariaram a participar da pesquisa.

Agradeço àquelas que estiveram comigo durante a graduação, tornando o caminho mais leve, compartilhando as dificuldades e alegrias, através de todo companheirismo, Júlia Jordão, Luiza Macambira e Carolina Reis.

Por fim, gostaria de fazer um agradecimento ao meu namorado, Alexandre Henrique, por todo apoio e companheirismo durante o percurso.

Só se pode alcançar um grande êxito quando
nos mantemos fiéis a nós mesmos.
Friedrich Nietzsche

OLIVEIRA, Letícia Eduarda. **Análise da influência dos haplótipos β s e da alfa talassemia na variabilidade clínica de pacientes pediátricos com anemia falciforme**. 2023. 63. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é um tipo de hemoglobinopatia causada pela substituição única de nucleotídeo (β 6 GAG→GTG; glu 6 →val 6) no códon 6 do gene da globina β (*HBB*), levando a troca do aminoácido ácido glutâmico por valina, resultando na formação de uma hemoglobina anormal (HbS). A elevada taxa de morbimortalidade, que acomete especialmente os pacientes mais jovens, reflete a gravidade da doença e a necessidade de estudos na população pediátrica, com o objetivo de identificar precocemente fatores de risco, que possam gerar ações profiláticas que minimizem a doença. Diante disso, esse estudo teve como objetivo avaliar a influência dos haplótipos β s e da alfa talassemia nas manifestações clínicas de pacientes pediátricos com AF acompanhados regularmente no HEMOPE. Por meio da análise dos prontuários médicos foram avaliadas a frequência e a data de ocorrência das seguintes complicações clínicas: crises vaso-oclusivas, dactilite, sequestro esplênico, acidente vascular cerebral, síndrome torácica aguda e priapismo. As análises de determinação dos haplótipos β s e pesquisa genética da alfa talassemia foram realizadas pela amplificação de cada região do DNA, por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), de acordo com cada especificidade da reação. Observou-se associação entre alfa talassemia com parâmetros laboratoriais, como contagem de hemácias ($p=0,001$), hemoglobina ($p=0,001$), hematócrito ($p=0,007$), volume corpuscular médio ($p<0,0001$), hemoglobina corpuscular média ($p<0,0001$). Em relação às variáveis clínicas analisadas, obteve-se associação com doppler transcraniano de alto risco ($p=0,034$). Em relação ao haplótipo β s, o CAR/CAR foi descrito como sendo mais frequente em pacientes pediátricos, demonstrando associação com maiores níveis de contagem leucocitária ($p=0,028$), com o desenvolvimento de acidente vascular cerebral ($p=0,035$) e priapismo ($p=0,031$). Assim, nossos resultados demonstram que a alfa talassemia e haplótipos são importantes moduladores de marcadores laboratoriais, além de influenciarem no fenótipo clínico de pacientes com AF. Dessa forma, novos estudos se fazem necessários, uma vez que, maiores esclarecimentos acerca dessa associação são essenciais para uma melhor condução clínica dos pacientes com AF.

Palavras-chave: Doença Falciforme. Marcadores Genéticos. Variabilidade fenotípica. Fisiopatologia. AVC.

OLIVEIRA, Letícia Eduarda. **Analysis of the influence of β s haplotypes and alpha thalassemia on the clinical variability of pediatric patients with sickle cell anemia**. 2023. 63. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a type of hemoglobinopathy caused by a single nucleotide substitution (β 6 GAG→GTG; glu 6 →val 6) in codon 6 of the β globin gene (HBB), leading to the exchange of the amino acid glutamic acid for valine, resulting in the formation of abnormal hemoglobin (HbS). The high rate of morbidity and mortality, which especially affects younger patients, reflects the severity of the disease and the need for studies in the pediatric population, with the aim of identifying risk factors early, which can generate prophylactic actions that minimize the disease. Therefore, this study aimed to evaluate the influence of β s and alpha thalassemia haplotypes on the clinical manifestations of pediatric patients with SCA regularly monitored at HEMOPE. By analyzing medical records, the frequency and date of occurrence of the following clinical complications were assessed: vaso-occlusive crises, dactylitis, splenic sequestration, stroke, acute chest syndrome and priapism. The analyzes to determine the β s haplotypes and genetic research for alpha thalassemia were carried out by amplification of each region of the DNA, using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, according to each specificity of the reaction. An association was observed between alpha thalassemia and laboratory parameters, such as red blood cell count ($p= 0,001$), hemoglobin ($p= 0,001$), hematocrit ($p= 0,007$), mean corpuscular volume ($p <0,0001$), mean corpuscular hemoglobin ($p <0,0001$). Regarding the clinical variables analyzed, an association was found with high-risk transcranial Doppler ($p= 0,034$). Regarding the β s haplotype, CAR/CAR was described as being more frequent in pediatric patients, demonstrating an association with higher levels of leukocyte count ($p= 0,028$), with the development of stroke ($p= 0,035$) and priapism ($p = 0,031$). Thus, our results demonstrate that alpha thalassemia and haplotypes are important modulators of laboratory markers, in addition to influencing the clinical phenotype of patients with SCA. Therefore, new studies are necessary, since further clarification about this association is essential for better clinical management of patients with SCA.

Key words: Sickle Cell Disease. Genetic Markers. Phenotypic variability. Pathophysiology. Stroke.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Número estimado de nascimentos de indivíduos com anemia falciforme por 100.000 nascimentos por país em 2015.....	16
Figura 2 - Fisiopatologia molecular da doença falciforme.....	18
Figura 3 - Padrões de distribuição dos haplótipos β^s na África e sua herança no Brasil.....	26
Figura 4 - Classificação dos defeitos α -talassemia e expressão fenotípica.....	27
Figura 5 - Tamanho dos produtos amplificados após a clivagem.....	32
Figura 6 - Identificação dos padrões de restrição que determinam os haplótipos β^s	32
Figura 7 - Produto dos fragmentos amplificados diferenciados por gel de agarose.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reação de PCR para haplótipos β s.....	30
Tabela 2 – Ciclagem de temperatura para reação dos haplótipos β s.....	31
Tabela 3 – Reação de PCR para pesquisa da deleção $-\alpha^{3,7}$ Kb.....	33
Tabela 4 – Sequência dos primers para pesquisa da deleção $-\alpha^{3,7}$ Kb.....	33
Tabela 5 – Condições de ciclagem para a pesquisa da deleção $-\alpha^{3,7}$ Kb.....	33
Tabela 6 – Características clínicas dos pacientes pediátricos portadores de AF....	36
Tabela 7 – Frequência dos haplótipos β s e da alfa talassemia (deleção $-\alpha^{3,7}$ Kb)....	37
Tabela 8 – Análise de associação entre as características clínicas e laboratoriais dos pacientes pediátricos em relação à alfa talassemia.....	38
Tabela 9 – Análise de associação entre as características clínicas e laboratoriais dos pacientes pediátricos em relação aos haplótipos β s.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α - Alfa
 $\alpha^{3,7}$ Kb - Deleção 3.7kb
 α -tal - Alfa Talassemia
 β - Beta
 β s - Beta S
 μ L - Microlitro
 γ - Gama
°C - Graus Celsius
AF - Anemia Falciforme
ARB - Árabe-Indiano
AVC - Acidente Vascular Cerebral
BEN - Benin
CAM - Camarões
CAR - República Central Africana
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
CNS - Conselho Nacional de Saúde
CVO - Crise Vaso Oclusiva
DF - Doença Falciforme
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
dNTP - Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
DTC - Doppler transcraniano
DMSO - Dimetil Sulfóxido
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético
Hb - Hemoglobina
HBB - Gene da β Globina
HBF - Hemoglobina Fetal
HBS - Hemoglobina S
HbSS - Genótipo homozigoto para hemoglobina S
HCM - Hemoglobina Corpuscular Média
HEMOPE - Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
LabCen - Laboratório Central do Centro de Biociências
NHCL - Núcleo de Hematologia Clínico e Laboratorial
NO - Óxido Nítrico
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
STA - Síndrome Torácica Aguda
SEA - Sequestro Esplênico Agudo
SEN - Senegal
VCM - Volume Corpuscular Médio
VMMF - Média da Velocidade Máxima de Fluxo
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFPE - Universidade Federal de Pernambuco
WBC - Do inglês, White blood cells

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Anemia Falciforme: definição.....	15
2.1.1 Fisiopatologia da Anemia Falciforme.....	16
2.1.2 Complicações Clínicas.....	18
2.1.2.1 Crises vaso oclusivas.....	19
2.1.2.2 Dactilite.....	19
2.1.2.3 Sequestro esplênico agudo.....	19
2.1.2.4 Acidente vascular cerebral.....	20
2.1.2.5 Síndrome torácica aguda.....	21
2.1.2.6 Priapismo.....	22
2.2 Moduladores Genéticos da Anemia Falciforme.....	22
2.2.1 Haplótipos do Gene da Globina β s.....	23
2.2.2 Alfa Talassemia.....	25
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Aspectos Éticos.....	27
4.2 Grupo de estudo.....	27
4.3 Dados Clínicos e Laboratoriais.....	28
4.4 Análise Molecular.....	28
4.4.1 Coleta de sangue.....	28
4.4.2 Extração do DNA genômico.....	28
4.4.3 Determinação dos haplótipos β s.....	29
4.4.4 Pesquisa do genótipo α	31
4.5 Análise Estatística.....	33
5. RESULTADOS.....	33
5.1 Caracterização da coorte.....	33
5.2 Caracterização molecular dos moduladores genéticos.....	35
5.3 Associação dos moduladores com as variáveis clínico-laboratoriais.....	36
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
Anexo A- Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE.....	63

1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia autossômica recessiva caracterizada pela herança em homozigose de uma mutação no gene que codifica a cadeia globínica β (*HBB*). Essa condição leva à formação da HbS que, quando desoxigenada, se organiza na forma de polímeros que alteram o formato do eritrócito, adquirindo morfologia semelhante a uma foice. Esse afoijamento dos eritrócitos consiste em um dos principais mecanismos responsáveis pelo quadro fisiopatológico da doença, caracterizada patologicamente pela anemia hemolítica crônica, fenômenos vaso-oclusivos, alterações imunológicas e comprometimento multissistêmico. A ocorrência desses eventos compõe fatores determinantes nas complicações clínicas dos pacientes pediátricos com AF.

Dentre as complicações clínicas que acometem os pacientes com AF incluem crises de dor, dactilite, sequestro esplênico, síndrome torácica aguda, priapismo e complicações cerebrovasculares, como o acidente vascular cerebral (AVC), sendo esse mais comum em pacientes pediátricos.

Apesar de ser uma doença monogênica, os pacientes com AF apresentam grande heterogeneidade fenotípica entre si. Essa heterogeneidade pode ser explicada em termos de haplótipos beta S (β s) e coexistência da alfa talassemia (α -tal), considerados como modificadores genéticos clássicos estabelecidos na literatura, em que ambos os fatores influenciam na polimerização da HbS, evento molecular fundamental na fisiopatologia da doença.

Os haplótipos do agrupamento de genes da globina beta humana são definidos pelo grupo de endonucleases de restrição que clivam os sítios polimórficos. Esses locais estão presentes em combinações diferentes, mas limitadas, e têm sido úteis em estudos antropológicos, pois funcionam como potenciais marcadores genéticos da heterogeneidade fenotípica da AF. Os diferentes haplótipos de AF são Bantu, Benin, Senegal, Camarões e Árabe-Indiano. Esses haplótipos estão associados a grupos étnicos e também baseados na origem geográfica.

A diminuição da expressão de globinas, decorrente da alfa talassemia, leva a uma redução da concentração de cadeias globínicas alfa no paciente. Na AF isso acarreta em redução da HbS, induzindo a uma menor polimerização intra corpuscular e menor hemólise. Assim, esta mutação foi descrita com um papel protetor para complicações clínicas relacionadas à hemólise que envolve

vasculopatia proliferativa, como o acidente vascular cerebral, a úlcera de perna e o priapismo.

Devido a isso, a elucidação dessas variantes genéticas e dos mecanismos responsáveis pela variabilidade fenotípica na anemia falciforme terá importantes implicações clínicas para o aconselhamento genético e manejo clínico direcionado aos pacientes pediátricos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anemia Falciforme: definição e prevalência

A anemia falciforme (AF) é um tipo de hemoglobinopatia causada pela substituição única de nucleotídeo (β 6 GAG→GTG; glu 6 →val 6) no códon 6 do gene da globina β (*HBB*), levando à troca do aminoácido ácido glutâmico por valina, que se polimeriza em estado de hipóxia, resultando na formação de uma hemoglobina anormal (HbS) (Steinberg, 1995; Amlie Lefond *et al.*, 2018). Sob condições de hipóxia, a HbS polimeriza tornando as hemácias deformadas e rígidas, causando alterações morfológicas, resultando, por fim, na sua falcização. Essa falcização altera as propriedades físicas dos eritrócitos e tem como alguns resultados o quadro inflamatório crônico e fenômenos vaso-oclusivos na microcirculação. A ocorrência desses eventos, juntamente com a hemólise, compõe um conjunto de fatores fisiopatológicos determinantes nas complicações clínicas dos pacientes pediátricos com AF (Kato *et al.*, 2017).

A herança da HbS pode ocorrer em hetero ou homozigose, sendo a forma homozigótica (HbSS) associada com AF. Quando em heterozigose com outra hemoglobina variante, diz-se que o indivíduo é portador de doença falciforme (DF), a qual é de gravidade variável e, quando herdada com HbA (HbAS), diz-se que apresenta o traço falciforme, condição comumente benigna, uma vez que as concentrações de HbS são inferiores a 50% nos eritrócitos (Araújo *et al.* 2004).

A distribuição geográfica é variada de acordo com o padrão migratório da região em questão. Estimativas apontam que, por ano, aproximadamente 300.000 indivíduos nasçam com AF no mundo e este número pode chegar a 400.000 nascimentos no ano de 2.050 (PIEL *et al.*, 2013) (Figura 1).

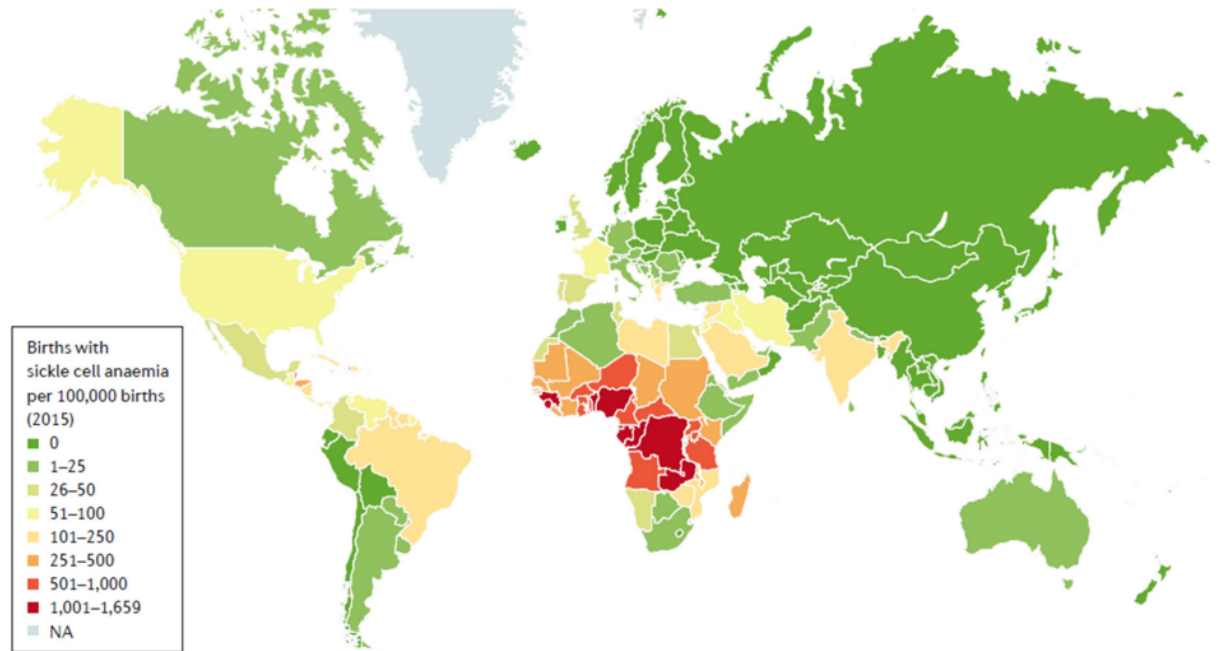


Figura 1: Número estimado de nascimentos de indivíduos AF por 100.000 nascimentos em 2015 (Kato *et al.*, 2018).

De acordo com a Carga Global de Doença (do inglês Global Burden of Disease – GBD), 3,2 milhões de pessoas vivem no mundo com a Doença Falciforme, 43 milhões são portadoras do traço (portadores heterozigóticos) e 176.000 pessoas morrem por ano em decorrência de complicações da doença (Sundd *et al.*, 2019).

No Brasil, entre 2014 e 2020, a média anual de novos casos de crianças diagnosticadas com DF no Programa Nacional de Triagem Neonatal foi de 1.087, em uma incidência de 3,78 a cada 10 mil nascidos vivos. Estima-se que, atualmente, há entre 60 mil e 100 mil pacientes com DF no país. A distribuição no Brasil é bastante heterogênea, sendo a Bahia, o Distrito Federal e o Piauí as unidades federadas de maior incidência. Dados do Sistema de Informações de Mortalidade do SUS apontam que, entre 2014 e 2019, a maior parte dos pacientes com DF no Brasil faleceu na segunda década de vida (20 aos 29 anos). O Brasil registra mais de um óbito por dia em decorrência da doença e mantém uma média de um óbito por semana em crianças de 0 a 5 anos (BRASIL. Ministério da Saúde, 2022).

2.1.1 Fisiopatologia da Anemia Falciforme

A anormalidade estrutural da HbS é o fator desencadeador das complicações clínicas nos indivíduos com doença falciforme. Em condições de baixas

concentrações de oxigênio, as moléculas de HbS estabelecem ligações intermoleculares hidrofóbicas, precipitando e conduzindo a modificações na morfologia e membrana celulares, levando a uma série de alterações na funcionalidade dos eritrócitos (Hebbel, Robert P. *et al* 2020).

Essas alterações celulares alteram o equilíbrio das hemácias, prejudicam a deformabilidade das células, tornam-nas mais adesivas e as deixam suscetíveis à liberação de micropartículas, bem como à ativação do complemento e do sistema de coagulação, o que pode contribuir para processos inflamatórios na DF (Figura 2) (Wandersee NJ, *et al.*, 2016).

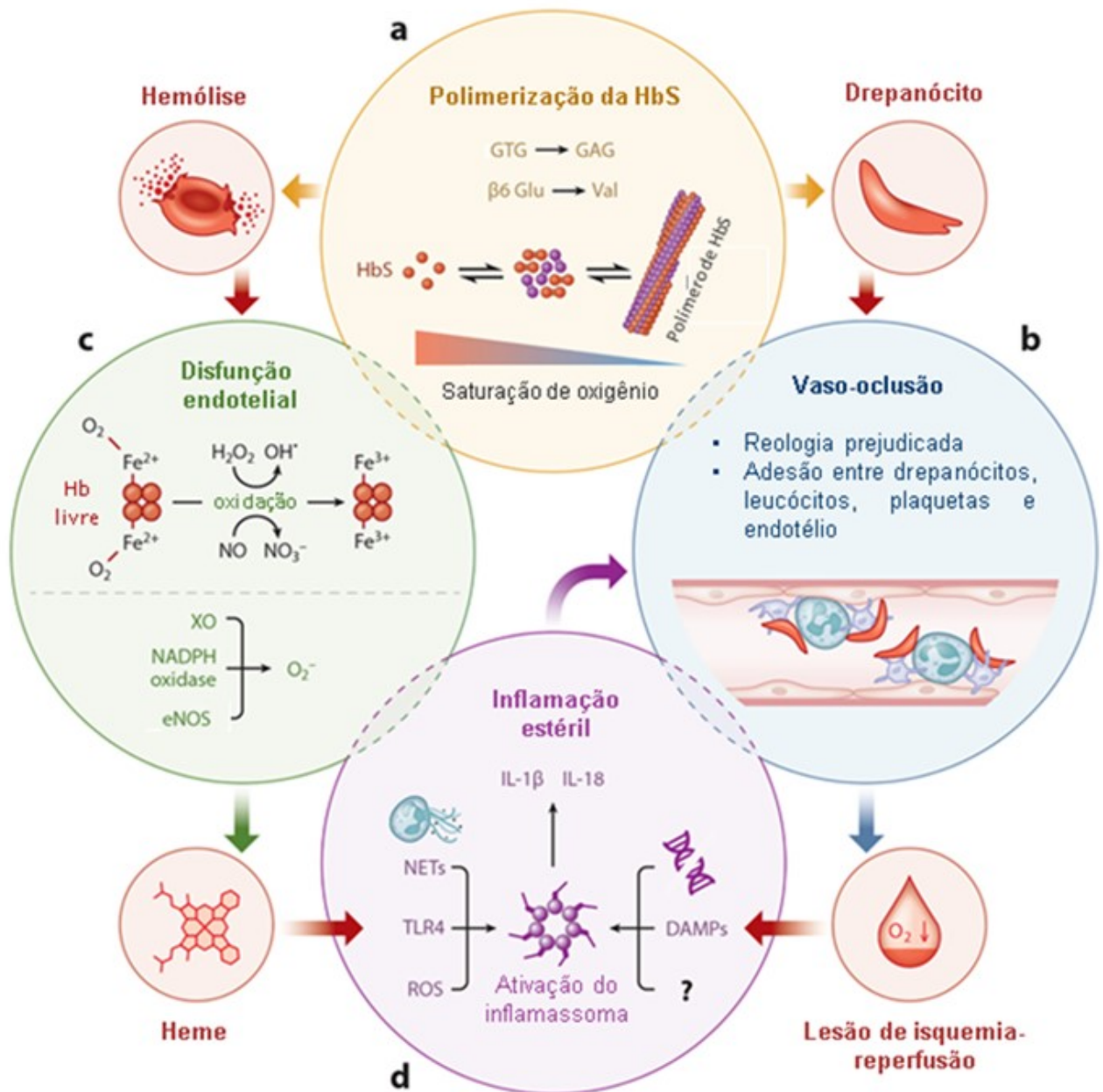


Figura 2: Fisiopatologia molecular da doença falciforme. IR: Isquemia-reperfusão, Hb: hemoglobina, NO: óxido nítrico, NO_3^- : nitrato, O_2 : Fe^{2+} : Ferroso, Fe^{3+} : metemoglobina, $\text{OH}^\cdot$: hidroxila, XO: xantina oxidase, eNOS: NO sintase endotelial desacoplada, DAMP: padrão molecular associado a danos, ROS: espécies reativas de oxigênio, TLR4: receptor Toll-like 4, NET: armadilha extracelular de neutrófilos, Glu: glutamina, Val: valina, HbS: hemoglobina S, $\text{IL-1}\beta$: interleucina-1 beta, IL-18 : interleucina 18. Fonte: adaptada de Sundd P, *et al.*, 2019.

Em condições normais, as hemácias possuem uma capacidade de deformabilidade que lhes permite circular através de vasos estreitos, carregando o

O₂ para todos os tecidos do corpo. Entretanto, a hemácia falcizada sofre uma perda dessa deformabilidade, podendo provocar obstrução vascular e isquemia (Ballas, Samir K *et al.*, 2004). Além disso, as hemácias alteradas sofrem hemólise extravascular pelo reconhecimento do sistema retículo endotelial e hemólise intravascular devido à acentuada rigidez com fragilidade membranar (Kato *et al.*, 2009).

A hemólise é um gatilho inflamatório primário na AF. A vida útil das hemácias falciformes pode ser tão curta quanto 7 a 14 dias, em comparação com a vida útil de aproximadamente 120 dias para as hemácias normais (Steinberg MH, *et al.*, 2016). Após a lise das hemácias, ocorre a liberação de hemoglobina livre de células na circulação. Se não for sequestrada imediatamente por proteínas de ligação à hemoglobina plasmática, como a haptoglobina, essa hemoglobina livre de células provoca o consumo imediato de óxido nítrico (NO) (Reiter CD, *et al.*, 2002; Schaer DJ, *et al.*, 2014). Além de suas propriedades vasodilatadoras, o NO derivado do endotélio tem efeitos anti-inflamatórios significativos, reduzindo a ativação leucocitária e as interações leucócitos-endoteliais e a emigração de leucócitos dos vasos sanguíneos para os tecidos (Arndt H *et al.*, 1993; Walley KR *et al.*, 1999; Wallace JL, 2005; Hossain M *et al.*, 2012; Tsoumani ME *et al.*, 2012).

2.1.2 Complicações Clínicas

Embora seja uma doença monogênica, os pacientes com AF apresentam uma grande heterogeneidade fenotípica. Seu quadro clínico pode variar desde uma forma leve, que pode ser clinicamente inaparente, até uma grave, com lesões em órgãos, podendo ocasionar morte em idades relativamente jovens (Lettre, 2012).

A nível da microvasculatura, esta anormalidade morfológica dá origem a fenômenos vaso-oclusivos e anemia hemolítica, em que o estado inflamatório crônico leva os indivíduos com AF a apresentarem diversas complicações clínicas, que acometem vários órgãos e tecidos, podendo ser mais ou menos incapacitantes.

As principais complicações agudas e crônicas desta doença em pacientes pediátricos com AF são: crises vaso oclusivas (CVO), dactilite, sequestro esplênico agudo (SEA), acidente vascular cerebral (AVC), síndrome torácica aguda (STA) e priapismo (Steinberg, 2008; Ballas *et al.*, 2010; Patricia Reparaz, *et al.*, 2022).

2.1.2.1 Crises vaso oclusivas

Dentre as complicações, a mais comum apresentada pelos indivíduos com AF é a vaso-oclusão, razão prevalente para visitas ao pronto-socorro e internações hospitalares entre pacientes pediátricos (Fosdal, Marian B, 2015). As CVOs são descritas pela obstrução principalmente na microcirculação de pequenos vasos sanguíneos em várias partes do corpo, reduzindo a oxigenação tecidual e podem culminar em dano tecidual e fisiologia de isquemia-reperfusão, o que resulta em dor intensa. Os locais mais comuns de oclusão incluem ossos, causados por lesões ósseas intensas, bem como outros órgãos e tecidos, o que pode levar a uma variedade de sintomas e complicações (Ballas, 2018; Y. Wang *et al.*, 2022; Williams & Thein, 2018). Por ser considerada uma das causas mais comuns de hospitalização e sua incidência ser relativamente alta, torna-se um fator consistente de risco para avaliação dos parâmetros desencadeantes da crise.

2.1.2.2 Dactilite

A dactilite é uma manifestação de crises vaso-oclusivas aguda de mãos ou pés, ou ambos simultaneamente, correspondendo a extensas áreas de infarto ósseo. Em crianças com idade escolar, a dor é principalmente nos ossos longos e, quando mais velhos, costumam ter crises dolorosas na coluna (Howard e Davies, 2007). A ocorrência de dactilite antes dos 12 meses de idade é um fator preditivo da gravidade da doença e de um resultado adverso, devido a isso pode comprometer consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes com AF (L. Foucan, 2006; IV Silva, 2015; A. Solé-Ribalta, 2015). Embora as sequelas imediatas sejam raras, a dactilite tem sido implicada como um fator de risco para doença grave (Miller S *et al.*, 2000). Devido a isso, a demonstração da maior frequência nesses pacientes é útil na análise do desenvolvimento dessa complicação clínica.

2.1.2.3 Sequestro esplênico agudo

O sequestro esplênico agudo (SEA) é uma complicação da AF de grande frequência, que na maioria dos casos, é a primeira complicação a se manifestar na infância (Emond *et al.*, 1985). O SEA é definido como um rápido aumento do

tamanho do baço, devido ao aprisionamento das hemácias e outros componentes do sangue no baço. Os sintomas podem incluir dor abdominal intensa, e, em casos graves, até choque. O tratamento imediato é necessário para restaurar o volume sanguíneo circulante e aliviar os sintomas, isso geralmente envolve transfusões de sangue para aumentar a quantidade de sangue disponível e reduzir o acúmulo no baço. Em casos graves, pode ser necessária uma esplenectomia, remoção do baço, para prevenir recorrências futuras. Portanto, a identificação dessa complicação é essencial para avaliar o comprometimento da qualidade de vida dos pacientes.

2.1.2.4 Acidente vascular cerebral

Acidente vascular cerebral (AVC) é definido como um evento neurológico agudo secundário à oclusão de uma artéria com consequente isquemia cerebral, podendo ser também um evento de caráter hemorrágico. Ocorre quando o fornecimento de sangue para uma parte do cérebro é interrompido ou limitado, causando danos ou morte das células devido à falta de oxigênio e nutrientes. De forma geral, o aumento da adesividade eritrocitária, ativação endotelial e aumento da produção de mediadores da inflamação e diminuição da biodisponibilidade do NO colaboram para o seu desenvolvimento (Aggeli *et al.*, 2021; Ghafuri *et al.*, 2022; Kwiatkowski *et al.*, 2019).

Em pacientes com AF, complicações de caráter neurológico estão relacionadas com um alto índice de mortalidade. O AVC em especial é a manifestação neurológica mais comum entre esses pacientes, principalmente os pediátricos. Sendo considerado de maior risco durante a primeira década, apresentando maior significância na idade de dois a cinco anos (Ohene-Frempong K *et al.*, 1998; Makani J, 2007). Aproximadamente 11% dos pacientes com AF apresentam AVC clinicamente aparente antes dos 20 anos de idade (Ohene-Frempong K, *et al.*, 1998).

Atualmente, o uso do Doppler transcraniano (DTC), método ultrassonográfico não invasivo que determina a velocidade do fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais, é considerado uma ferramenta sensível para detecção precoce do risco de AVC (CL Lobo, *et al.*, 2011).

O risco de AVC é diretamente proporcional ao aumento da média da velocidade máxima de fluxo (VMMF) sanguíneo nas artérias. Após a realização do DTC e a

obtenção do seu resultado, os pacientes podem ser estratificados em três grupos distintos: normal, condicionante e alto risco. A VMMF é considerada normal até 170 cm/s, condicionante quando a VMMF é igual ou superior a 170 cm/s até 199 cm/s, e alto risco, quando em duas avaliações seguidas e independentes, as VMMF são iguais ou superiores a 200 cm/s (Adams *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2004; Debaun *et al.*, 2020).

Em 1997, foi realizado um estudo em que 315 crianças com AF, sem histórico de AVC, que foram submetidas a exames neurológicos e concluiu-se que o risco de desenvolvimento de AVC aumentava significativamente com o aumento da velocidade sanguínea nas artérias carótida e cerebral média (Adams *et al.*, 1997). Um estudo multicêntrico também realizado por Adams, propôs o uso do DTC como uma ferramenta de triagem e estratificação clínica como forma de prevenção primária do AVC em crianças com AF (Adams *et al.*, 1998).

Tendo em vista que o AVC é um evento multifatorial, e a sua fisiopatologia na AF relaciona-se com diversos mecanismos, como o aumento de expressão de moléculas de adesão endotelial, que irão contribuir para a maior aderência das células levando a um estado mais suscetível à oclusão do vaso, torna-se essencial utilizar ferramentas que possam prever o AVC no prognóstico da AF.

Dessa forma, o uso do DTC tornou-se um instrumento em que ocasionou uma redução significativa na incidência de AVC em crianças, por promover o diagnóstico e intervenção precoce nos pacientes em maior risco ou com alteração no fluxo vascular (Adams *et al.*, 2003; Ballas *et al.*, 2012).

2.1.2.5 Síndrome torácica aguda

A síndrome torácica aguda (STA) é tida como a segunda maior causa de hospitalização para pacientes com AF, perdendo apenas para crises dolorosas, e episódios recorrentes podem causar doença pulmonar crônica debilitante (Vichinsky *et al.* 1997; Powars D, *et al.*, 1988; Vichinsky *et al.* 2000). Além de que, uma causa muito comum de mortalidade em pacientes falciformes, se não for identificada em estágios iniciais e tratada de forma agressiva (Annadatha A, *et al.*, 2021).

É definida como a presença radiológica de infiltrados pulmonares com febre ou sintomas respiratórios como dor torácica, falta de ar e tosse em um paciente. A doença assemelha-se clínica e radiograficamente à pneumonia bacteriana, com

febre, leucocitose, dor torácica pleurítica, derrame pleural e tosse (Vichinsky EP, *et al.*, 2000).

Sendo consequente à lesão multifatorial pulmonar e estar relacionada a processos de vaso-oclusão, embolia de medula óssea e infecções, portadores da AF podem apresentar manifestações clínicas como cianose, dor torácica, hipoxemia e dispneia (Zago MA, *et al.*, 2007; Kato GJ, *et al.*, 2018). Dessa forma, podem evoluir rapidamente para falência respiratória e morte (Vichinsky *et al.*, 1997; Ballas *et al.*, 2010). Assim, é essencial o entendimento da heterogeneidade clínica da doença em pacientes pediátricos com AF.

2.1.2.6 Priapismo

Além dessas complicações, o priapismo é comum nos indivíduos do sexo masculino, definido pela ereção peniana prolongada e dolorosa não acompanhada de desejo ou estímulo sexual, usualmente persistente por mais de quatro horas. Esta condição é considerada uma emergência urológica e, infelizmente, a disfunção erétil é sequela comum no tratamento inadequado (Keoghane SR, *et al.*, 2002).

Na infância se apresenta como um sintoma comum de AF, especialmente após a puberdade, principalmente como baixo fluxo ou complicação de trauma peniano. Essa manifestação fenotípica da AF pode causar sequelas graves em relação à vida sexual futura do paciente, impotência persistente, disfunção erétil e problemas comportamentais no âmbito sexual, uma vez que os indivíduos afetados temem a ocorrência de um episódio de ereção dolorosa no curso da atividade sexual normal, que é a causa mais comum de episódios de priapismo após a puberdade (Adeyolu AB, *et al.*, 2002; Lisieux Eyer de Jesus, *et al.*, 2009).

2.2 Moduladores Genéticos da Anemia Falciforme

Apesar de ser uma patologia monogênica, a influência de indicadores moleculares foram descritos como possíveis moduladores no desenvolvimento de complicações na AF, refletindo em uma notável heterogeneidade fenotípica na clínica dos pacientes (Rampersaud *et al.*, 2021).

Alguns moduladores já são bem discutidos na literatura como os haplótipos da globina β s, que são padrões de sítios polimórficos ligados ao cluster da β -globina e

que influenciam na concentração da HbF a qual está relacionada com a evolução clínica de pacientes com AF por atuar justamente na diminuição da polimerização da HbS.

Outro modulador bem estabelecido é a coexistência com alfa talassemia (α -tal), a qual tem sido associada com uma menor taxa hemolítica, redução da HbS e por consequência a diminuição da polimerização, amenizando assim os eventos vaso-oclusivos, que acabam por exercer um efeito protetor contra complicações clínicas como o AVC (Steinberg; States, 2021).

2.2.1 Haplótipos do Gene da Globina β s

Os haplótipos são determinantes genéticos localizados em um mesmo cromossomo, caracterizados pelo padrão de combinação de diferentes sítios polimórficos (Lima da Silva, 2006). Padrões de sítios polimórficos do DNA ligados ao complexo da β -globina definem os chamados haplótipos da AF (Alsultan *et al.*, 2014). Na década de 90, foi observado que a gravidade das manifestações clínicas da HbSS estava relacionada ao tipo de haplótipo do gene da globina beta (Powars & Hiti, 1993).

Os haplótipos β s estão associados com o prognóstico dos pacientes com AF, por apresentarem correlação com os níveis de HbF, visto que, pesquisas mostraram que a presença da HbF diminui a capacidade de polimerização da HbS (Steinberg *et al.*, 1995). Estudos de diferentes grupos étnicos com AF, com características hematológicas distintas, sugerem que o haplótipo da globina β pode ser utilizado com um marcador de gravidade da doença, onde trabalhos em pacientes de mesmo haplótipo podem ajudar a elucidar a real contribuição de outras variáveis genéticas (Domingos, 2014; Steinberg, 2005).

O agrupamento de genes da β -globina na AF foram descritos em diferentes regiões e estão ligados a grupos populacionais específicos, recebendo a denominação de acordo com os locais de origem, chamados Bantu ou CAR (República Centro-Africano), predominante na África Central, Benin no ocidente centroafricano, Camarões, menos frequente, se restringe ao grupo étnico Eton na costa ocidental Africana, e Sudão e Senegal prevalece no Litoral Atlântico Africano.

As concentrações médias de HbF diferem entre esses haplótipos. Os haplótipos Senegal e Árabe-Indiano possuem o polimorfismo HBG2-Xmnl e

apresentam níveis elevados de HbF (>15%), há evidências de que estes haplótipos estejam relacionados ao curso clínico menos grave da doença (Nagel & Steinberg, 2001; Adekile, 2005). Enquanto que os haplótipos Bantu, Benin e Camarões não apresentam o polimorfismo HBG2-Xmnl e cursam com níveis baixos de HbF. Os pacientes que possuem o haplótipo Bantu tendem a apresentar um curso clínico mais grave, iniciando crises vaso-oclusivas mais precocemente. Por estar relacionado com menores níveis de HbF, este haplótipo é considerado o de pior prognóstico para a AF. Os haplótipos Benin e Camarões, aparentemente, apresentam fenótipos intermediários (Powars & Hiti, 1993; Quinn & Miller, 2004; Steinberg, 2009).

A HbS foi introduzida no Brasil durante o tráfico de escravos africanos, que ocorreu com maior intensidade entre os séculos 16 e 19. A trajetória dos negros africanos para o Brasil foi heterogênea, uma vez que esse movimento se desenvolveu ao longo de 300 anos, levando escravos de quase toda a costa 29 ocidental da África (Haltzhofer, 2017). Nesse período entraram pelos portos da Bahia e Rio de Janeiro, pelo menos 3,6 milhões de negros africanos (Naoum, 2000; Filho ILS *et al.*, 2010). Grande parte dos escravos aportados veio da Angola, Congo e Moçambique, onde o haplótipo Bantu predomina, e cerca de 30% dos escravos vieram da região Benin e Senega. Estes últimos foram destinados quase exclusivamente à Bahia (Zago, Figueiredo & Ogo, 1992; Salas *et al.*, 2004).

No Brasil, estudos mostraram que o haplótipo CAR é o mais comum nas regiões Nordeste e Sudeste, exceto na Bahia, onde há elevada prevalência do haplótipo BEN (Adorno *et al.* 2004; Bezerra *et al.* 2007). Em Pernambuco, o trabalho de Bezerra *et al.* (2007), ao caracterizar a composição haplotípica de 74 indivíduos com doença falciforme, encontrou prevalência de 81% para o haplótipo CAR (Bezerra *et al.*, 2007). Tais achados são condizentes com a origem geográfica dos escravos trazidos ao Brasil no período colonial, uma vez que os negros oriundos do golfo do Benin foram, em sua maioria, encaminhados para a Bahia e os oriundos do Congo e Angola, para as demais regiões brasileiras (Figura 3) (Batista, 2017).

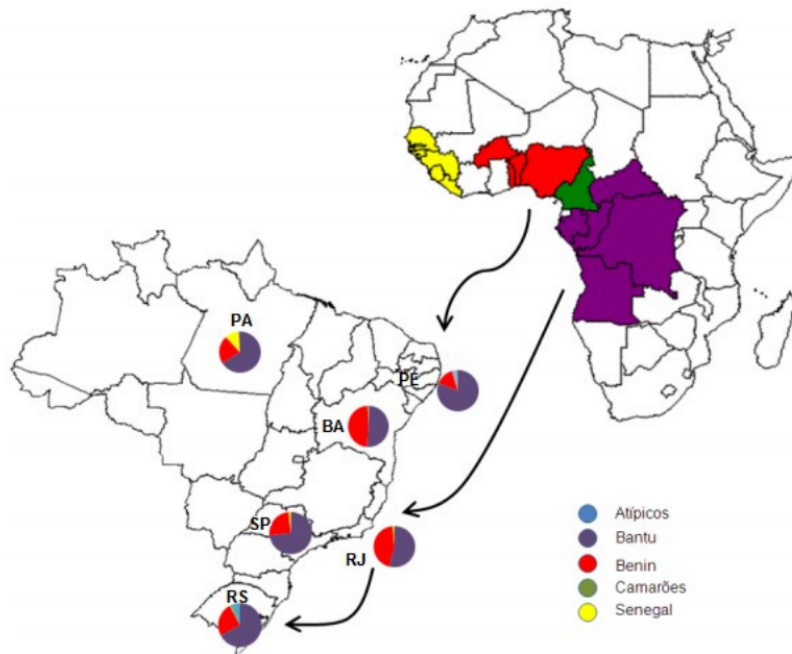


Figura 3 - Padrões de distribuição dos haplótipos β s na África e sua herança no Brasil. Fonte: Lindenau (2009).

2.2.2 Alfa Talassemia

A α -tal é uma doença hereditária, autossômica recessiva, caracterizada por uma anemia hipocrômica microcítica. É uma das doenças genéticas monogênicas mais comuns na população mundial. A gravidade clínica varia de quase assintomática a um quadro hemolítico letal, denominado Síndrome de Hidropsia Fetal de Hb Bart.

A base molecular geralmente são deleções e, menos frequentemente, mutações pontuais afetando a expressão de um ou mais genes α duplicados (Figura 4). A variação clínica e o aumento da gravidade da doença estão diretamente relacionados à diminuição da expressão de uma, duas, três ou quatro cópias dos genes da α -globina (Samaneh Farashi, *et al.*, 2018).

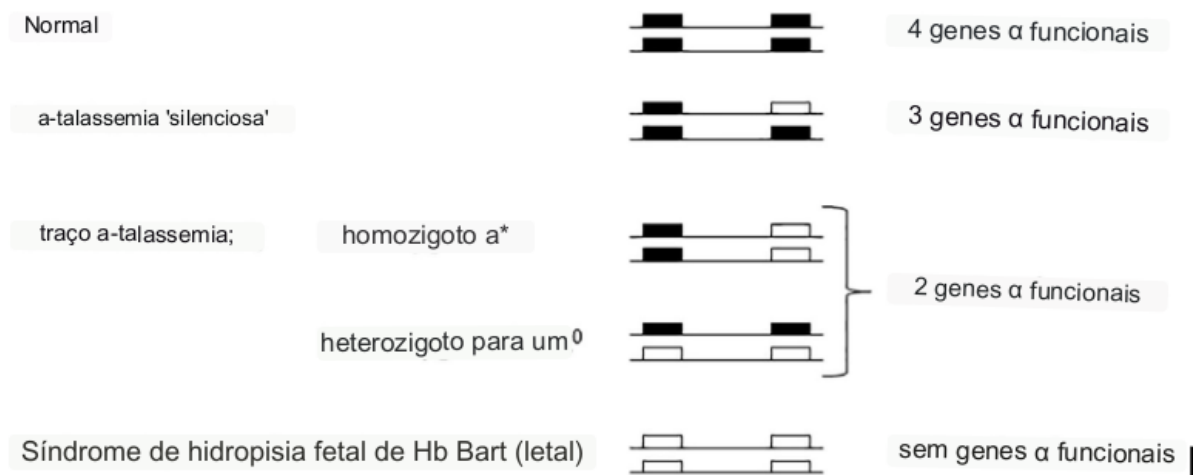


Figura 4.- Classificação dos defeitos da α -talassemia e expressão fenotípica. Fonte: adaptado Samaneh Farash, 2018.

Com essa diminuição de cadeias α , há o desbalanço de síntese entre as cadeias α e β , e consequente diminuição da produção de HbS. Com menos HbS, há menor taxa hemolítica, e consequente diminuição de frequência de algumas complicações da doença (Steinberg; Embury 1986; Fertrin, Costa, 2010; Belisário, Viana 2011; Hassan *et al.*, 2014).

Deste modo, por diminuir a hemólise, a associação da α -talassemia com a AF protege contra os fenótipos associados com processos hemolíticos, como as úlceras de perna, priapismo e AVC (Domingos, 2014; Silva, 2015). Entretanto, alguns estudos apontam para uma maior frequência de episódios dolorosos, decorrente de um aumento da viscosidade sanguínea, devido uma elevação no percentual de eritrócitos circulantes, como uma compensação fisiológica inerente a esta condição (Kato *et al.*, 2007; Sankaran & Weiss, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência dos haplótipos β s e da alfa talassemia nas manifestações clínicas de pacientes pediátricos com anemia falciforme.

3.2 Objetivos Específicos

- Coletar os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes pediátricos com anemia falciforme acompanhados na Fundação HEMOPE;
- Determinar as frequências da variante deletional de $-\alpha^{3,7}$ Kb da talassemia alfa nos pacientes estudados;
- Realizar a caracterização molecular dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina S;
- Correlacionar os dados clínicos e laboratoriais com os haplótipos beta S e a presença de alfa talassemia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Este projeto trata-se de um subprojeto de uma pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/HEMOPE) (Parecer número: 035/2010), de acordo com o previsto na resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (Anexo A).

4.2 Grupo de estudo

Foram selecionados 276 pacientes pediátricos com até 18 anos de idade, de ambos os sexos portadores do genótipo HbSS, em acompanhamento na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE).

4.3 Dados Clínicos e Laboratoriais

Os dados clínicos e laboratoriais, foram coletados através da análise dos prontuários médicos dos pacientes que compareceram regularmente ao ambulatório de Hematologia da Fundação HEMOPE. Foram avaliados critérios de frequência, importância clínica e melhor possibilidade de caracterização, para selecionarmos as manifestações clínicas do estudo. As complicações clínicas estudadas foram: crises vaso-oclusivas, dactilite, sequestro esplênico, acidente vascular cerebral, doppler transcraniano, síndrome torácica aguda e priapismo.

4.4 Análise Molecular

4.4.1 Coleta de sangue

Para a realização dos experimentos foram coletados cerca de 5 ml de sangue periférico, em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As amostras coletadas foram conduzidas ao laboratório do Núcleo de Hematologia Clínico Laboratorial (NHCL) do Laboratório Central do Centro de Biociências (LabCen) da Universidade Federal de Pernambuco para a realização da análise molecular.

4.4.2 Extração do DNA genômico

A extração de DNA genômico é um processo fundamental na biologia molecular que envolve o isolamento e purificação do material genético. Nesse estudo foi extraído o DNA, a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio modificado (Davis *et al.*, 1986). Esse método consiste em promover a extração de DNA de sangue periférico utilizando fenol/clorofórmio e precipitação com etanol. Neste procedimento, as proteínas contaminantes sofrem desnaturação e são mantidas na fase orgânica ou na interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto que os ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. A adição de etanol faz com que os sais e outros solutos, como os resíduos da extração com fenol/clorofórmio, permaneçam em solução, enquanto os ácidos nucleicos precipitam e podem ser separados facilmente por centrifugação (Batista, 2017).

4.4.3 Determinação dos haplótipos β s

As análises de determinação dos haplótipos β s foram realizadas em 251 amostras pela amplificação de cada região do DNA, por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Essa reação permite a amplificação de regiões específicas do DNA, incluindo os haplótipos, que são padrões de variações genéticas em sequências específicas do DNA.

Uma identificação de haplótipos envolve a identidade dos padrões específicos de variações genéticas em sequências de DNA que são transmitidas em conjunto em uma população. Neste estudo foram utilizados as endonucleases de restrição Xmn I, Hind III, Hinc II e Hinf I para análise de 6 sítios polimórficos do cluster beta. A composição das reações e condições de amplificação variaram dependendo da região polimórfica (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Reação de PCR para haplótipos β s.

Endonucleases de restrição	Xmn I	Hind III	Hinc III	Hinc II	Hinc II	Hinf I
Sítios polimórficos	5'γG	γG	γA	Ψβ	3'Ψβ	5'β
Primers	H0 H1	H2 H3	H3 H4	H5 H6	H7 H8	H9 H10
Componentes	Volumes (μL)					
Tampão (10x)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
MgCl ₂ (50mM)	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5
dNTP (10 mM)		1,5	1,5	1,5	1,5	
dNTP (2 mM)	5,0					5,0
Primer 5' (10 M)	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer 3' (10 M)	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Taq DNA Polimerase (5U/I)	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
DNA (200 ng)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
dH ₂ O	35,25	38,0	38,0	38,0	38,0	34,25
Volume Final (ul)	50	50	50	50	50	50

Fonte: Autor, 2023.

Tabela 2: ciclagem de temperatura para reação dos haplótipos β s.

Região	Desnaturação inicial		Desnaturação				Anelamento		Extensão		Extensão Final	
			35 ciclos									
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
5'yG	94	5'	94	45"	60	45"	72	1'30"	72	7'	72	7'
yG	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'	72	7'
yA	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'	72	7'
$\psi\beta$	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'	72	7'
3' $\psi\beta$	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'	72	7'
5'B	94	5'	94	45"	57	45"	72	1'	72	7'	72	7'

Fonte: Autor, 2023.

Para confirmação da amplificação, o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, verificando a presença ou ausência dos produtos amplificados, usando corantes fluorescentes de DNA. Após a verificação da presença do resultado, foi realizada análise de restrição, em que o produto da PCR é digerido a 37°C durante 24 horas, com endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico. Após as 24 horas, é realizada uma nova eletroforese em gel de agarose 1,5%, para a observação dos fragmentos de DNA e identificação dos padrões de restrição, que determinam os haplótipos, e dependendo do padrão de fragmentos resultante da digestão enzimática, obtêm-se os resultados sobre a presença ou ausência para cada sítio polimórfico (Figuras 5 e 6).

<i>Primers</i>	<i>Enzima</i>	<i>Região</i>	<i>Tamanho fragmento</i>	<i>Fragmentos após clivagem</i>
H0 e H1	<i>XmnI</i>	5' γ^G	650 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>HindIII</i>	γ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>HindIII</i>	γ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>HincII</i>	$\psi\beta$	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>HincII</i>	3' $\psi\beta$	590 pb	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>HinfI</i>	5' β	380 pb	240 pb + 140 pb

Figura 5: Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição. Fonte: Haltzhofer, 2017

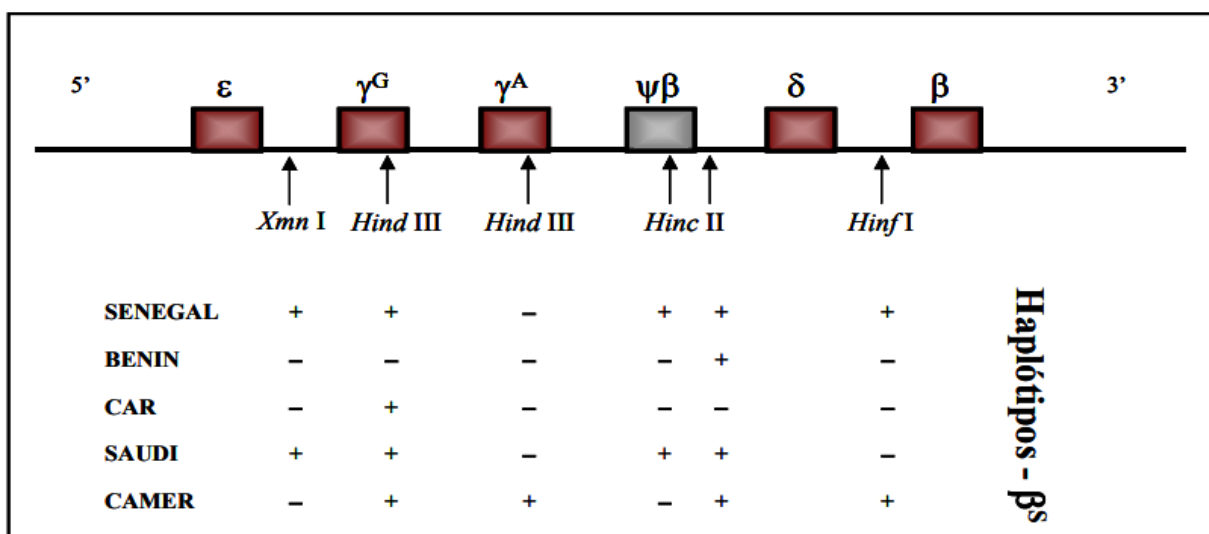


Figura 6: Identificação dos padrões de restrição que determinam os haplótipos β^s . Fonte: Sutton *et al.*, 1989; Haltzhofer, 2017.

4.4.4 Pesquisa do genótipo α

No contexto da pesquisa genética da alfa talassemia, a PCR pode ser usada para identificar mutações específicas que estão associadas à doença (Tabela 3). A pesquisa da mutação $-\alpha^{3,7}$ Kb foi investigada através da utilização dos iniciadores C2 e C10, onde os oligonucleotídeos iniciadores se ligam na região que compreende a possível deleção (Tabela 4). Cada ciclo consiste em três etapas: desnaturação (94°C), onde as fitas de DNA se separam; anelamento (56°C), onde os primers se ligam às sequências alvo; e extensão (72°C), onde a DNA polimerase adiciona novos nucleotídeos à fita de DNA, gerando padrões distintos de produtos de

amplificação (Tabela 5).

Tabela 3: Reação de PCR para pesquisa da deleção - $\alpha^{3,7}$ Kb.

Componentes	Volumes (μ l)
H ₂ O	25,0
Tampão α	2,5
DMSO	2,5
dNTP	0,75
Primer C2	0,5
Primer C10	0,5
Taq polimerase	0,25
DNA	1,0

Legenda: Tampão α = soluções estoque 3,35 ml de Tris-HCl 2M (pH 8,6); 1,66 ml de (NH₄)₂SO₄ 1M; 250 l de MgCl₂ 1M; 33,5 l de Na₂EDTA 0,2M; 85 l de BSA-20 mg/ml; 70 l de mercaptoetanol 14,3M, para um volume final de 10 ml com dH₂O. Todas as soluções estoque foram autoclavadas, exceto MgCl₂ que é filtrada. Fonte: Autor, 2023.

Tabela 4: Sequência dos primers para pesquisa da deleção - $\alpha^{3,7}$ Kb.

Primers	Sequência do Primer (5'-3')	Direção	Posição
C2	CCATGCTGGCACGTTTCTGA	R	11365
C10	GATGCACCCACTGGACTCCT	D	5641

Legenda: R= reverso D= direto. Fonte: Autor, 2023.

Tabela 5: Condições de ciclagem para a pesquisa da deleção - $\alpha^{3,7}$ Kb.

Desnaturação inicial		Desnaturação				Anelamento		Extensão		Extensão Final	
		30 ciclos									
T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
94	10'	94	45"	56	1'	72	1'	72	1'	72	7'

Fonte: Autor, 2023.

O produto da amplificação foi analisado por eletroforese em gel, técnica relacionada através da separação de moléculas de acordo com seu tamanho e carga elétrica, e por meio da visualização das bandas de DNA sob luz ultravioleta, é

realizada a análise de interpretação dos resultados.

Na pesquisa da deleção ($-\alpha^{3,7}$ Kb), o produto amplificado gera um fragmento de 2,1kb para o haplótipo normal ($\alpha\alpha$) e de 1,9kb para o haplótipo mutante ($-\alpha^{3,7}$ Kb) (Figura 7).

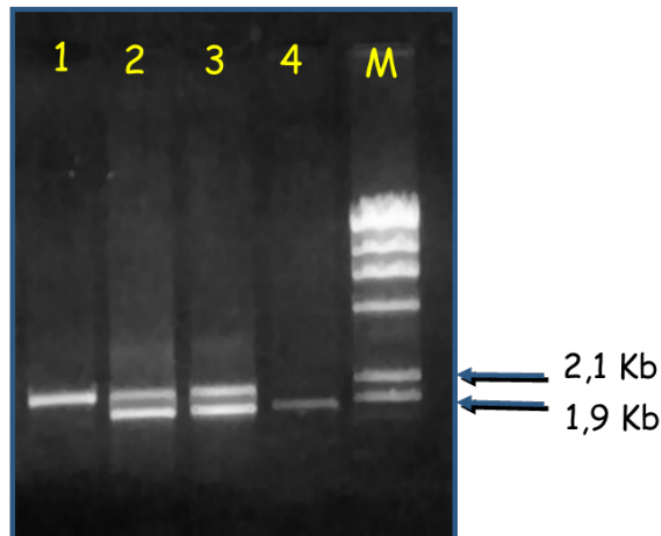


Figura 7: Produto dos fragmentos amplificados diferenciados por gel de agarose. Os genótipos descritos na figura são: 1 ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$); 2 ($-\alpha^{3,7}$ Kb)/ $\alpha\alpha$); 3 ($-\alpha^{3,7}$ Kb)/ $\alpha\alpha$); 4 ($-\alpha^{3,7}$ Kb)/($-\alpha^{3,7}$ Kb). Fonte: modificado de (Dodé *et al.*, 1993; Haltzhofer, 2017).

4.5 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada com o auxílio do software SPSS Statistics 19.0. Para as diferenças entre as variáveis contínuas recorreu ao teste de Kruskal-Wallis. As variáveis categóricas foram comparadas entre os grupos utilizando-se o teste Chi-quadrado e o teste exato de Fisher. Foi considerado o nível de significância de 0,05 e intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da coorte

Foram incluídos 276 pacientes pediátricos portadores de AF com acompanhamento regular no HEMOPE, sendo 131 do sexo feminino (47,5%) e 145 do sexo masculino (52,5%). A mediana da idade dos pacientes foi de 12 anos

(intervalo de 4-18 anos). Do grupo analisado, 159 (62,6%) desenvolveram pelo menos uma das manifestações clínicas: crises vaso oclusivas, dactilite, sequestro esplênico agudo, acidente vascular cerebral, síndrome torácica aguda e priapismo.

As manifestações clínicas de maior prevalência foram dactilite com 34,7%, seguido por sequestro esplênico agudo 21,9%, síndrome torácica aguda 7,5%, acidente vascular cerebral 5,2% e priapismo em indivíduos do sexo masculino 5,1%.

Em relação aos resultados da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral avaliado pelo DTC, 161 (70,9%) pacientes foram classificados como DTC normal, 47 (20,7%) como DTC condicionante e 19 (8,4%) como DTC de alto risco. Com relação às análises do DTC, 6 pacientes apresentaram DTC inadequado (isto é, velocidade de fluxo não detectada pelo exame devido à limitação técnica), 3 que apresentaram o exame inconclusivo (isto é, resultados de DTC que não puderam ser interpretados) e outros 31 que nunca realizaram o DTC. Devido a isso, esses 40 pacientes foram excluídos da análise. Os dados da caracterização clínica da população geral com AF constam na tabela 6.

Tabela 6: Características clínicas dos pacientes pediátricos portadores de AF.

Características clínicas	n (%) (n total= 276)
Sexo	
Feminino	131 (47,5%)
Masculino	145 (52,5%)
Idade	
Intervalo (anos), (mediana - anos)	4-18, (12)
Crises vaso oclusivas	254
<2	159 (62,6%)
2-5	58 (22,8%)
>5	37 (14,6%)
Dactilite	93 (34,7%)
Intervalo (anos), (mediana - anos)	0,1-4,4 (2,4)
Sequestro esplênico agudo	59 (21,9%)
Intervalo (anos), (mediana - anos)	0,2-8,6 (4,1)
Acidente vascular cerebral	14 (5,2%)
Intervalo (anos), (mediana - anos)	1,5-12,7 (6,6)
DTC	227 (82,2%)
Normal	161 (70,9%)
Condicionante	47 (20,7%)
Alto risco	19 (8,4%)
Síndrome torácica aguda	20 (7,5%)
Intervalo (anos), (mediana - anos)	2,5-12 (7)
Priapismo	14 (5,1%)
Intervalo (anos), (mediana - anos)	2,7-13,9 (10,1)

DTC: Doppler transcraniano. Fonte: Autor, 2023.

5.2 Caracterização molecular dos moduladores genéticos

Os haplótipos β s de 251 pacientes foram analisados, e diferentes associações haplotípicas foram encontradas. Com maior frequência encontra-se o haplótipo CAR/CAR (56,2%) na população, seguida da associação CAR/BEN (23,5%). Os demais haplótipos apresentaram uma baixa frequência na população.

A deleção $-\alpha^{3,7}$ Kb foi avaliada em 276 pacientes, em que obteve como resultado, homozigose ($-\alpha/-\alpha$) esteve presente em (1,5%) dos pacientes, enquanto pacientes heterozigotos ($-\alpha/\alpha\alpha$) tiveram como frequência (18,5%) (Tabela 7).

Tabela 7: Frequência dos haplótipos β s e da alfa talassemia (deleção $-\alpha^{3,7}$ Kb) em pacientes pediátricos portadores de anemia falciforme.

Características Moleculares	N	(%)
Haplótipos β s (n=251)		
CAR/CAR	141	56,2
CAR/BEN	59	23,5
CAR/ATP	31	12,4
CAR/CAM	2	0,8
CAR/ARB	2	0,8
ATP/ATP	1	0,4
BEN/BEN	6	2,4
BEN/CAM	1	0,4
BEN/ARB	1	0,4
BEN/ATP	7	2,8
Deleção $-\alpha^{3,7}$ Kb (n=276)		
$-\alpha/-\alpha$	4	1,5
$-\alpha/\alpha\alpha$	51	18,5
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	220	80,0

CAR (República Central Africana); BEN (Benin); ATP (Atípico); CAM (Camarões); ARB (Árabe-Indiano). Fonte: Autor, 2023.

5.3 Associação dos moduladores com as variáveis clínico-laboratoriais

Foi observado que a presença da deleção $-\alpha^{3,7}$ Kb foi associada com parâmetros laboratoriais, apresentando maiores níveis de contagem de hemácias ($p= 0,001$), hemoglobina ($p= 0,001$) e hematócrito ($p= 0,007$). No entanto, foi observado que, a associação com volume corpuscular médio ($p < 0,0001$), hemoglobina corpuscular média ($p < 0,0001$) apresentavam-se com menores níveis.

Além disso, em relação às variáveis clínicas analisadas foi associada com menor frequência de DTC de alto risco ($p=0,034$). Os dados da caracterização clínica dos pacientes pediátricos com AF portadores da mutação alfa talassemia $-\alpha^{3,7}$ Kb incluídos no estudo constam na tabela 8.

Tabela 8: Análise de associação entre as características clínicas e laboratoriais dos pacientes pediátricos em relação à alfa talassemia.

Características	α Talassemia		p-valor
	-α ^{3,7} Kb negativo	-α ^{3,7} Kb positivo	
Sexo			
Feminino	101 (45,9%)	30 (53,6%)	0,305
Masculino	119 (54,1%)	26 (46,4%)	
RBC(x10 ¹² células/μ, mediana	2,65	3	0,001*
Intervalo	1,66 - 4,98	1,86-4,05	
Hb (g/dL), mediana	7,70	8,3	0,001*
Intervalo	5,10-10,60	6,20-9,90	
HbF (%), mediana	9,2	7,2	0,295
Intervalo	0,8-23,40	1,60-12,10	
Ht (%), mediana	22,90	24,65	0,007*
Intervalo	16-31	19-29	
VCM (fL), mediana	86,50	80,10	<0,0001*
Intervalo	53-100	64-86	
HCM (g/dL), mediana	29,30	26,40	<0,0001*
Intervalo	17-33	20-31	
Reticulócitos (%), mediana	10,60	8,9	0,126
Intervalo	1,50-26,30	3,10-19,00	
Leucócitos (x10 ⁶ /L), mediana	14600	15500	0,420
Intervalo	2800-37900	2800-24220	
Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	465000	425000	0,403
Intervalo			

Intervalo	1310000-9810000	230000-7210000	
BT (mg/dL), mediana	1,62	1,4	0,084
Intervalo	0,38-8,92	0,38-7,46	
BI (mg/dL), mediana	1,23	0,96	0,057
Intervalo	0,24-8,52	0,24-7,28	
LDH (U/L), mediana	708	589	0,485
Intervalo	211-1762	272-1188	
AVC			
Sim	12 (5,6%)	2 (3,7%)	0,570
Não	201 (94,4%)	52 (96,3%)	
STA			
Sim	14 (6,6%)	6 (10,9%)	0,275
Não	199 (93,4%)	49 (89,1%)	
DTC			
Normal	122 (67%)	39 (86,7%)	0,034*
Condicionante	43 (23,7%)	4 (8,9%)	
Alto risco	17 (9,3%)	2 (4,4%)	
CVO			
<2	130 (64,4%)	29 (55,8%)	0,450
2-5	45 (22,2%)	13 (25%)	
>5	27 (13,4%)	10 (19,2%)	
Sequestro Esplênico			
Sim	47 (22%)	12 (21,8%)	0,982
Não	167 (78%)	43 (78,2%)	
Priapismo			
Sim	13 (6,1%)	1 (1,8%)	0,203
Não	200 (93,9%)	54 (98,2%)	
Dactilite			
Sim	75 (35,2%)	18 (32,7%)	0,730
Não	138 (64,8%)	37 (67,3%)	

RBC: Hemácias, Hb: Hemoglobina, HbF: Hemoglobina fetal, Ht: Hematócrito, VCM: Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, WBC: Leucócitos, PLT: Plaquetas, BT: Bilirrubina total, BI: Bilirrubina indireta, SEA: Sequestro esplênico agudo, STA: Síndrome torácica aguda, DTC: Doppler transcraniano, CVO: Crises vaso oclusivas. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$). Fonte: Autor, 2023.

Com relação aos haplótipos βs foi observado que a presença do haplótipo CAR/CAR foi associada com parâmetros laboratoriais, apresentando maiores níveis de leucócitos ($p = 0,028$). Em relação às variáveis clínicas analisadas foi associada com maior frequência para AVC ($p = 0,035$), e menor frequência para priapismo ($p = 0,031$). Os dados da caracterização clínica dos pacientes pediátricos em relação a haplótipos βs constam na tabela 9.

Tabela 9: Análise de associação entre as características clínicas e laboratoriais dos pacientes pediátricos em relação aos haplótipos βs .

Características	Haplótipos βs		p-valor
	CAR/CAR	Não CAR/CAR	
Sexo			
Feminino	71 (50,4%)	50 (45,5%)	0,441
Masculino	70 (49,6%)	60 (54,5%)	
RBC(x10 ¹² células/μ, mediana	2,68	2,61	0,622
Intervalo	1,66-3,70	1,93-4,98	
Hb (g/dL), mediana	7,75	7,70	0,331
Intervalo	5,20-10,30	5,10-10,60	
HbF (%), mediana	10,6	7	0,486
Intervalo	0,80-21,70	1,60-23,40	
Ht (%), mediana	23,40	22,90	0,375
Intervalo	16-30	17-31	
VCM (fL), mediana	85,95	87,10	0,595
Intervalo	64-100	53-98	
HCM (g/dL), mediana	29,30	28,80	0,283
Intervalo	21-33	17-33	
Reticulócitos (%), mediana	10,90	9,90	0,450
Intervalo	4,20-26,30	1,50-24,90	
Leucócitos (x10 ⁶ /L), mediana	15150	13800	0,028*
Intervalo	5040-25400	2800-37900	
Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	458000	455000	0,680
Intervalo	1790000-780000	114000-981000	
BT (mg/dL), mediana	1,82	1,52	0,263
Intervalo	0,42-8,92	0,38-3,61	
BI (mg/dL), mediana	1,30	1,12	0,156
Intervalo	0,30-8,52	0,24-2,88	
LDH (U/L), mediana	663	791	0,467

	Intervalo	211-1415	443-1762	
AVC				
	Sim	4 (2,8%)	2 (1,9%)	0,035*
	Não	126 (92%)	104 (98,1%)	
STA				
	Sim	9 (6,6%)	10 (9,4%)	0,409
	Não	128 (93,4 %)	96 (90,6%)	
DTC				
	Normal	81 (66,9%)	68 (74,7%)	0,396
	Condicionante	29 (24%)	15 (16,5%)	
	Alto risco	11 (7,8%)	8 (8,8%)	
CVO				
	<2	72 (57,6%)	64 (62,7%)	0,403
	2-5	34 (24,1%)	20 (19,6%)	
	>5	19 (15,2%)	18 (17,6%)	
Sequestro Esplênico				
	Sim	38 (27,7%)	20 (18,7%)	0,100
	Não	99 (72,3%)	87 (81,3%)	
Priapismo				
	Sim	4 (2,9%)	10 (9,4%)	0,031*
	Não	133 (97,1%)	96 (90,6%)	
Dactilite				
	Sim	50 (36,5%)	43 (40,6%)	0,517
	Não	87 (63,5%)	63 (59,4%)	

RBC: Hemácias, Hb: Hemoglobina, HbF: Hemoglobina fetal, Ht: Hematócrito, VCM: Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, WBC: Leucócitos, PLT: Plaquetas, BT: Bilirrubina total, BI: Bilirrubina indireta, SEA: Sequestro esplênico agudo, STA: Síndrome torácica aguda, DTC: Doppler transcraniano, CVO: Crises vaso oclusivas. *Diferença estatisticamente significativa (p < 0.05). Fonte: Autor, 2023.

6. DISCUSSÃO

A fisiopatologia da AF pode ser influenciada por modificadores genéticos, entre eles, os genes que codificam as cadeias de globina, como a co-herança da alfa talassemia e o haplótipo β s, devido ao seu impacto na formação da hemoglobina e níveis de HbF, respectivamente, e à sua subsequente contribuição para a heterogeneidade clínica desses pacientes (Hatzlhofer *et al.*, 2021). Diante disso, neste trabalho foram avaliadas características clínicas e laboratoriais de pacientes pediátricos com AF acompanhados na Fundação HEMOPE, tal como sua associação com alfa talassemia e haplótipos β s, e assim sua contribuição na heterogeneidade clínica desses pacientes.

Diversos estudos têm demonstrado o papel benéfico da alfa talassemia no perfil clínico da AF, particularmente em sub-fenótipos hemolíticos, incluindo o acidente vascular cerebral. A presença da alfa talassemia esteve associada como fator de proteção para o desenvolvimento de AVC na AF, descrito previamente e confirmado em diferentes populações (Adams *et al.*, 1994; Ohene-Frempong *et al.*, 1998; Neonato *et al.*, 2000; Belisario *et al.*, 2010b; Domingos *et al.*, 2014). Embora o efeito protetor da alfa talassemia ainda não esteja claro, supõe-se que os pacientes portadores da mutação da α -tal apresentam um risco reduzido de hemólise e uma densidade celular reduzida de hemácias (Fertrin KY *et al.*, 2010; Belisario AR *et al.*, 2010; Flanagan JM *et al.*, 2011; Adams GT *et al.*, 2005; Steinberg MH *et al.*, 2001).

No presente estudo, foram selecionados 276 pacientes, com até 18 anos de idade, em que observamos que a frequência da deleção $-\alpha^{3,7}$ Kb foi associada com maiores níveis de RBC ($p= 0,001$), Hb ($p= 0,001$) e Ht ($p= 0,007$), como pode ser visto na tabela 8. No entanto, foi observado que, a associação com VCM ($p= <0,001$), HCM ($p= <0,001$) apresentava com menores níveis em comparação ao outro grupo do estudo.

Nas análises realizadas neste estudo as manifestações clínicas em relação à alfa talassemia mostraram a associação com menores níveis de DTC de alto risco ($p=0,034$). Crianças com AF e com DTC de alto risco apresentam um risco 44 vezes maior de desenvolver AVC que pacientes com AF e DTC normal (Adams *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 2019). Por promover o diagnóstico e intervenção precoce nos pacientes, o uso do DTC leva a uma redução significativa na incidência de AVC em

crianças (Adams *et al.*, 2003; Ballas *et al.*, 2012). Assim, mecanismos adicionais que possam prever o AVC seriam de grande utilidade no prognóstico da AF (Adams *et al.*, 1998; Sebastiani *et al.*, 2005; Sheehan *et al.*, 2013).

Em concordância com nossos resultados, o estudo de Hatzlhofer e colaboradores apresentou o efeito protetor da alfa talassemia no desenvolvimento de acidente vascular cerebral na AF (Hatzlhofer, 2021). Sendo considerado de extrema importância, o AVC representa uma das principais complicações da AF, considerada como uma das principais causas de morte em crianças com AF (Ohene-Frempong, Kwaku, *et al.*, 1998).

Em relação aos haplótipos β s, nosso estudo descreveu a presença do haplótipo CAR/CAR como sendo mais frequente em pacientes pediátricos, demonstrando a alta prevalência desse haplótipo no Estado de Pernambuco, com (frequência total de 56,2%), em concordância com o estudo realizado por Bezerra e colaboradores, em que demonstrou a alta prevalência desse haplótipo em Pernambuco com frequência de (81,1%) nos pacientes analisados (Bezerra *et al.*, 2007).

Quanto às análises laboratoriais, o haplótipo β s CAR/CAR, apresentou-se como associado com maiores níveis de WBC ($p=0,028$). Enquanto nas manifestações clínicas, a associação foi com AVC ($p=0,035$) e priapismo ($p=0,031$), como pode ser visto na tabela 9. Em concordância com nossos resultados, Domingos e colaboradores, em trabalho realizado em Pernambuco, indicam que a combinação CAR/CAR aumenta o risco para o desenvolvimento do AVC (Domingos, *et al.*, 2014). Em comum resultado com estudos anteriores em que mostraram que os haplótipos do agrupamento do gene β s-globina estão associados a um aumento do risco de acidente vascular cerebral (Powars DR, 1991; Sarnaik SA, Ballas SK, 2001; Rusanova I *et al.*, 2011; Filho ILDS, *et al.*, 2012).

No que se refere ao priapismo, a mediana apresentada para o desenvolvimento da doença em nosso estudo foi de aproximadamente 10 anos. Em concordância com esse resultado, um estudo internacional observacional multicêntrico, identificou a média de idade de episódios de priapismo foi 11 anos, com 25% dos casos de priapismo isquêmico apresentados durante os anos de pré-puberdade (Nardoza Junior A *et al.*, 2010). O priapismo em pacientes com AF é uma emergência urológica que requer intervenção imediata (Furtado PS *et al.*, 2012; Anele UA *et al.*,

2014; Silberman M *et al.*, 2020). Diante disso, a prevenção de priapismo é o modo mais efetivo de evitar degeneração a longo prazo da função erétil. Atualmente, a hidroxiureia é a proposta de tratamento profilático para priapismo em pacientes com AF, devido à consequente elevação de hemoglobina fetal, à redução de neutrófilos e reticulócitos, e à diminuição da adesão celular ao endotélio vascular (Adeyolu AB *et al.*, 2002; Vicari P *et al.*, 2010; Anele UA *et al.*, 2014).

Por fim, os achados deste estudo consolidam a hipótese da influência dos haplótipos βs e da alfa talassemia em manifestações clínicas de pacientes pediátricos com AF. Entretanto, novos estudos da investigação de moduladores genéticos se fazem necessários, para obter maiores esclarecimentos acerca dessa associação. São essenciais para que a hipótese do nosso estudo seja validada, e utilizada para uma condução clínica favorável dos pacientes com AF.

7. CONCLUSÃO

- Observou-se associação entre a deleção $-\alpha^{3,7}$ Kb da alfa talassemia com parâmetros laboratoriais, como RBC, Hb, Ht, VCM e HCM;
- A deleção $-\alpha^{3,7}$ Kb da alfa talassemia em relação esteve associada com menor frequência de DTC de alto risco;
- O haplótipo β_s CAR/CAR foi descrito como sendo mais frequente em pacientes pediátricos;
- O haplótipo β_s CAR/CAR demonstrou associação com maiores níveis de leucócitos, e desenvolvimento de acidente vascular cerebral e priapismo.

REFERÊNCIAS

ADAMS GT, Snieder H, McKie VC, Clair B, Brambilla D, Adams RJ, Kutlar F and Kutlar A. Genetic risk factors for cerebrovascular disease in children with sickle cell disease: design of a case-control association study and genome wide screen. **BMC Med Genet**, p. 4-6, 2003.

ADAMS, R. J. et al. Transcranial Doppler correlation with cerebral angiography in sickle cell disease. **Stroke**, v. 23, n. 8, p. 1073–1077, 1992.

ADAMS RJ, Kutlar A, McKie V, Carl E, Nichols FT, Liu JC, McKie K and Clary A. Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. **Am J Hematol**, v. 45, p. 279–282, 1994.

ADAMS, R. J. et al. Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler. **Annals of Neurology**, v. 42, n. 5, p. 699–704, 1997.

ADAMS, R. J. et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 1, p. 5–11, 1998.

ADAMS, R. J.; OHENE-FREMPONG, K.; WANG, W. Sickle cell and the brain. **Hematology**, p. 31–46, 2001.

ADAMS, R. et al. Stroke and conversion to high risk in children screened with transcranial Doppler ultrasound during the STOP study. **Blood**, v. 103, n. 10, p. 3689– 3694, 2004.

ADAMS, R. J.; BRAMBILLA, D.; OPTIMIZING PRIMARY STROKE PREVENTION IN SICKLE CELL ANEMIA TRIAL, I. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 353, n. 26, p. 2769–2778, 2005.

ADEKILE, A.D. mild-phenotype sickle cell disease: molecular basis, clinical presentation and management recommendations. **Current Paediatrics**, v. 15, p. 57–61, 2005.

ADEYOJU AB, Olujohungbe AB, Morris J, Yardumian A, Bareford D, Akenova A, *et al.* Priapism in sickle-cell disease; incidence, risk factors and complications an international multicenter study. **BJU Int.** v. 90, n. 898-902, 2002.

ADORNO, E.V., Zanette, A., Lyra, I., Souza, C.C., Santos, L.F., Menezes, J.F., Dupuit, M.F., Almeida, M.N.T., Reis, M.G. & Gonçalves, M.S. The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. **Hemoglobin**, v. 28, p. 267–271, 2004.

AGGELI, C. *et al.* Stroke and presence of patent foramen ovale in sickle cell disease. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 52, n. 3, p. 889–897, 2021.

A. Habibi, D. Bachir, B. Godeau. Complicações agudas na doença falciforme. **Rev Prat**, v. 54, p. 1548-1556, 2004.

A. Hamard, R. Burns, A. Miquel, J.M. Sverzut, V. Chicheportiche, M. Wybier, V. Bousson. Dactylitis: A pictorial review of key symptoms. **Diagnostic and Interventional Imaging**, v. 101, n. 4, p. 193-207, 2020.

ALSULTAN, A., Alabdulaali, MK, Griffin, PJ, AlSuliman, AM, Ghabbour, HA, Sebastiani, P., Albuali, WH, Al-Ali, AK, Chui, DHK e Steinberg, MH, Doença falciforme na Arábia Saudita: o fenótipo em adultos com o haplótipo árabe-indiano não é benigno. **Ir J Haematol**, v. 164: p. 597-604, 2014.

AMLIE LEFOND, C. Flanagan J, Kanter J, Dobyns WB. The Genetic Landscape of Cerebral Steno-Occlusive Arteriopathy and Stroke in Sickle Cell Anemia. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 27, n. 11, p. 2897–2904, 2018.

ANNADATHA A, Talwar D, Acharya S, Kumar S, Lahane V. Acute Chest Syndrome,

Avascular Necrosis of Femur, and Pulmonary Embolism All at Once: An Unexpected Encounter in the First-Ever Admission of a Sickle Cell Patient. **Cureus**. v, 13, n. 9, 2021.

ANELE UA, Marck AK, Resar LM, Burnett AL. Hydroxyurea therapy for priapism prevention and erectile function recovery in sickle cell disease: a case report and review of the literature. **Int Urol Nephrol**, v. 46, n. 9, p. 1733-6, 2014.

ARAÚJO MCPE de, Serafim ÉSS, Jr WAP de C and Medeiros. TMD de Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. **Cad Saude Publica**, v. 20, p.123–128, 2004.

ARNDT H, Russell JB, Kurose I, Kubes P, Granger DN. Mediadores da adesão de leucócitos em vênulas mesentéricas de ratos induzidas pela inibição da síntese de óxido nítrico. **Gastroenterologia**, v. 105, n. 3, p. 675–80, 1993.

A. Solé-Ribalta, M. Vilà-de-Muga, A. Català-Temprano, C. Luaces-Cubells. Dactilite, início precoce de drepanocitose e preditor de mau prognóstico. **An Pediatr Barc Espanha**, v. 82, p. 267 - 268, 2015.

AZAR S, Wong TE. Sickel Cell Disease: A Brief Update. **Med Clin North Am**, v. 101, n. 2, p. 375–93, 2017.

BALLAS, Samir K.; MOHANDAS, Narla. Microreologia falciforme dos glóbulos vermelhos e reologia falciforme do sangue. **Microcirculação**, v. 11, n. 2, p. 209-225, 2004.

BALLAS, S. K. *et al.* Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 1, p. 6–13, 2010.

BALLAS SK, Kesen MR, Goldberg MF, Luty G a, Dampier C, Osunkwo I, Wang WC, Hoppe C, Hagar W, Darbari DS *et al.* Beyond the Definitions of the Phenotypic Complications of Sickel Cell Disease: An Update on Management. **Sci World J**, p. 1–55, 2012.

BALLAS, S. K. Sick cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 68, n. 2–3, p. 105–128, 2018.

BANDEIRA IC, Rocha LB, Barbosa MC, Elias DB, Querioz JA, Freitas MV, Gonçalves RP. Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB(*)S haplotype. **Cytokine**. v. 65, n.2, p. 217-21, 2014.

BATISTA, Jéssica Vitória Gadelha de Freitas. Avaliação do impacto de polimorfismos e da expressão do gene KLOTHO nas complicações clínicas da anemia falciforme. **Tese de doutorado**, 2017.

BELISARIO, A.R., Martins, M.L., Brito, A.M.S., Rodrigues, C.V., Silva, C.M. & Viana, M.B. B-Globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or Sb-thalassemia and their association with clinical and hematological features. **Acta Haematologica**, v. 124, p. 162–170, 2010.

BELISARIO, A.R., Rodrigues, C.V., Martins, M.L., Silva, C.M. & Viana, M.B. Coinheritance of α -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. **Hemoglobin**, v. 34, p. 516–29, 2010b.

BELISÁRIO, André Rolim; VIANA, Marcos Borato. Efeitos da Talassemia Alfa nas manifestações clínicas e hematológicas da Anemia Falciforme : uma revisão sistemática. **Rev Med Minas Gerais**, v. 21, n. 3, p. 319–330, 2011.

BERNAUDIN Françoise, Cécile Arnaud, Annie Kamdem, Isabelle Hau, Françoise Lelong, Ralph Epaud, Corinne Pondarré, Serge Pissard. Impacto biológico dos genes α , haplótipos β e atividade da G6PD na anemia falciforme no início do estudo e com hidroxiureia. **Sangue Adv**, 2018.

BEZERRA, MAC, Santos, MN, Araújo, AS, Gomes, YM, Abath, FG, & Bandeira, FM. Variações moleculares ligadas ao agrupamento dos genes da β e α -globina em pacientes neonatais com doença falciforme no estado de Pernambuco, Brasil.

Hemoglobina , v. 31, n. 1, p. 83-88, 2007.

BORHADE, Mahesh B.; KONDAMUDI, Noah P. **Sickle cell crisis**, 2018.

BORHADE MB, Kondamudi NP. Crise Falciforme. **Stats Pearls Publishing**, 2023.

CL Lobo, RD Cançado, AC Leite, AC Anjos, AC Pinto, AP Matta, *et al.* Diretrizes brasileiras para Doppler transcraniano em crianças e adolescentes com doença falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 33, p. 43-48, 2011.

CONRAN N, Belcher JD. Inflammation in sickle cell disease. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 68, n. 2-3, p. 263-299, 2018.

DANIELA O.W. Rodrigues, Luiz C. Ribeiro, Lysla C. Sudário, Maria T.B. Teixeira, Marina L. Martins, Anuska M.O.L. Pittella, Irtis de O. Fernandes Junior. Determinantes genéticos e acidente vascular cerebral em crianças com doença falciforme. **Jornal de Pediatria**. v. 92, n. 6, p. 602-608, 2016.

DAVIS, L.G., Dibner, M.D., Battey, J.F. Basic Method in Molecular Biology. **Elsevier**, p. 388, 1986.

DEBAUN, M. R. et al. American Society of Hematology 2020 guidelines for sickle cell disease: Prevention, diagnosis, and treatment of cerebrovascular disease in children and adults. **Blood Advances**, v. 4, n. 8, p. 1554–1588, 2020.

DIAZ-MATALLANA, Marcela *et al.* Anemia falciforme: uma revisão sobre o genótipo da doença, haplótipos, diagnóstico e estudos associados. **Rev. média Chile**, Santiago, v. 149, n. 9, p. 1322-1329, 2021.

DIMITROGLOU Y, Anagnostopoulos F, Aggeli C, Delicou S, Xydaki A, Patsourakos D, *et al.* Gravidade da Insuficiência Cardíaca e Qualidade de Vida Relacionada à Saúde em Pacientes com Beta-talassemia: Um Estudo Transversal. **Ana Hematol**, v. 99, n. 9, p. 2037–2046, 2020.

DRISS, A. *et al.* Sick Cell Disease in the Post Genomic Era : A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. **Genomics Insights**, v. 2, p. 23-48, 2009.

DODÉ C, Krishnamoorthy R, Lamb J and Rochette J. Rapid analysis of - α 3.7 thalassaemia and $\alpha\alpha$ anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. **Br J Haematol**, v. 83, p. 105–111, 1993.

DOMINGOS, I. F., D. A. Falcao, B. L. Hatzlhofer, A. F. Cunha, M. N. Santos *et al.* Influence of the betas haplotype and alpha-thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. **Ann.Hematol.** v. 93, p. 1123-1129, 2014.

EMOND, A. M. *et al.* Acute splenic sequestration in homozygous sickle cell disease: Natural history and management. **The Journal of Pediatrics**, v. 107, n. 2, p. 201–206, 1985.

EZEKEKWU, C. A., Kotila, T. R., Akingbola, T. S., Lettre, G., Gordeuk, V. R., Cooper, R. S., DeBaun, M. R., Inusa, B., & Tayo, B. O. . Sickle Cell Disease Clinical Trials and Phenotypes. **Journal of Tropical Diseases**, v. 06n. 02, p. 1–12, 2018.

FERNANDES APPC, Januário JN, Cangussu CB, Macedo DL De, Viana MB. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. **J Pediatr (Rio J)**, v. 86, n. 4, p. 279–84, 2010..

FERTRIN KY and Costa FF. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Rev Hematol**, v. 3, p. 443–458, 2010.

FILHO ILS, Ribeiro GS, Pimenta-Bueno LM and Serpa MJA. The frequency of β -globin gene haplotypes, α -thalassemia and genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase, factor V leiden and prothrombin genes in children with sickle cell disease in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, p. 76–78, 2010.

FILHO ILDS, Ribeiro GS, Moura PG, Vechi ML, Cavalcante AC and Andrada-Serpa MJ De. Sick cell disease: acute clinical manifestations in early childhood and molecular characteristics in a group of children in Rio de Janeiro. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 34, p. 196–201, 2012.

FLANAGAN, J.M., Frohlich, D.M., Howard, T. a, Schultz, W.H., Driscoll, C., Nagasubramanian, R., Mortier, N. a, Kimble, A.C., Aygun, B., Adams, R.J., Helms, R.W. & Ware, R.E. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 117, p. 6681–4, 2011.

FRELINGER III, Andrew L. et al. Platelet activation and inhibition in sickle cell disease (pains) study. **Platelets**, v. 25, n. 1, p. 27-35, 2014.

FOSDAL MB. Perception of pain among pediatric patients with sickle cell pain crisis. **J Pediatr Oncol Nurs**, v. 32, n. 1, p. 5-20, 2015.

FOUCAN L, Ekouevi, Etienne-Julan M, Salmi LR, Diara JP. Early onset dactylitis associated with the occurrence of severe events in children with sickle cell anaemia. The Paediatric Cohort of Guadeloupe (1984-99). **Paediatric Perinatal Epid**, v. 20, p. 59-66, 2006.

FURTADO PS, Costa MP, Ribeiro do Prado Valladares F, Oliveira da Silva L, Lordêlo M, Lyra I, et al. The prevalence of priapism in children and adolescents with sickle cell disease in Brazil. **Int J Hematol**, v. 95, n. 6, p. 648-51, 2012.

GB da Silva Junior, EDF Daher , FAC da Rocha. Envolvimento osteoarticular na doença falciforme. **Rev Bras Hematol E Hemoter**, v. 34, p. 156 - 164, 2012.

GHAURI, D. L. et al. Establishing Sickle Cell Disease Stroke Prevention Teams in Africa is Feasible: Program Evaluation Using the RE-AIM Framework. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 44, n. 1, p. E56–E61, 2022.

GLADWINI MT. Complicações Cardiovasculares e Risco de Morte na Doença Falciforme. **Lanceta**. v. 387, n. 10037, p. 2565–2574, 2016.

GUILLIAMS, K. P.; FIELDS, M. E.; DOWLING, M. M. Advances in Understanding Ischemic Stroke Physiology and the Impact of Vasculopathy in Children With Sickle Cell Disease. **Stroke**, p. 1–8, 2019.

HABARA, A.; Steinberg, M.H. *et al.* Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 7, p. 689-696, 2016.

HAMMOUDI N, Lionnet F, Redheuil A, Montalescot G. Manifestações Cardiovasculares da Doença Falciforme. **Eur Coração J.** v. 41, n. 13, p. 1365–1373, 2020.

HASSAN, S. M., M. M. Al, R. M. Al, E. Bakker, C. L. Harteveld *et al.* Sickle cell anemia and alpha-thalassemia: a modulating factor in homozygous HbS/S patients in Oman. **Eur.J.Med.Genet**, v. 57, p. 603-606, 2014.

HATZLHOFFER, Betânia Lucena Domingues. Influência dos haplótipos β s e da alfa talassemia no perfil clínico da anemia falciforme em Pernambuco. **Tese de doutorado**, 2017.

HATZLHOFFER, B.L.D., Pereira-Martins, D.A., de Farias Domingos, I. *et al.* Alpha thalassemia, but not β S-globin haplotypes, influence sickle cell anemia clinical outcome in a large, single-center Brazilian cohort. **Ann Hematol**, v. 100, n. 4, p. 921–931, 2021.

HEBBEL, Robert P. *et al.* O papel multifacetado da isquemia/reperfusão na anemia falciforme. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 3, p. 1062-1072, 2020.

HIGGS DR. The Molecular Basis of α -Thalassemia. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v.3, p. 1–15, 2013.

HOPPE, Carolyn C. Inflammatory mediators of endothelial injury in sickle cell disease. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 28, n. 2, p. 265-286, 2014.

HOSSAIN M, Qadri SM, Liu L. A inibição da síntese de óxido nítrico aumenta a rolagem e adesão de leucócitos na microvasculatura humana. **J Inflamm** (Londres), v. 9, n. 1, p. 28, 2012.

HOWARD J and Davies SC. Haemoglobinopathies. **Paediatr Child Health (Oxford)**, v. 17, p. 311–316, 2007.

I. Olivieri, E. Scarano, A. Padula, V. Giasi, F. Priolo. Dactilite, um termo para diferentes doenças dos dedos. **Scand J Rheumatol**, v.35, p. 333 - 340, 2006.

KALOGERIS T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Biologia celular da lesão de isquemia/reperfusão. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 298, p. 229–317, 2012.

KATO GJ, Gladwin MT and Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Rev**, v. 21, p. 37–47, 2007.

KATO, Gregory J. et al. Vasculopatia na doença falciforme: Biologia, fisiopatologia, genética, medicina translacional e novas direções de pesquisa. **Revista Americana de Hematologia** , v. 84, n. 9, p. 618, 2009.

KATO, G. J. *et al.* Sickle cell disease. **Nat. Rev. Dis. Primers**, v. 4, n. 18010, p. 1–22, 2018.

KEOGHANE SR, Sullivan ME, Miller MAW. The aetiology, pathogenesis and management of priapism. **BJU International**, v. 90, n. 149-54, 2002.

KURANTSIN-Mills J, Klug PP, Lessin LS. Vaso-oclusão na doença falciforme: fisiopatologia da circulação microvascular. **Am J Pediatr Hematol Oncol**, v.10, n. 4, p. 357–72, 1988.

KWIATKOWSKI, J. L. et al. Ischemic stroke in children and young adults with sickle cell disease in the post-STOP era. **American Journal of Hematology**, v. 94, n. 12, p. 1335–1343, 2019.

LETTRE, Guillaume. A busca por modificadores genéticos da gravidade da doença nas β -hemoglobinopatias. **Perspectivas de Cold Spring Harbor na medicina**, v. 2, p. 10, 2012.

L. Foucan , D. Ekouevi , M. Etienne-Julan , LR Salmi , J.-P. Diara. Coorte Pediátrica de Guadalupe. Dactilite de início precoce associada à ocorrência de eventos graves em crianças com anemia falciforme. A coorte pediátrica de Guadalupe (1984-99). **Paediatr Perinat Epidemiol**, v. 20, p. 59-66, 2006.

LINDENAU JD. Frequência de mutações nos genes das cadeias alfa e beta da hemoglobina no Rio Grande do Sul. **Tese de doutorado**. p. 1-19, 2009.

LISIEUX Eyer de Jesus, Samuel Dekermacher. Priapismo em crianças: revisão de fisiopatologia e tratamento. **Jornal de Pediatria**, v. 85. n.3 p. 194-200, 2009.

LOBO, Clarisse Lopes de Castro *et al.* Diretrizes Brasileiras de Doppler Transcraniano em Crianças e Adolescentes com Doença Falciforme. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia** , v. 33, p. 43-48, 2011.

LOPES A, Dantas MT, Ladeia AMT. Prevalence of Cardiovascular Complications in Individuals with Sickle Cell Anemia and Other Hemoglobinopathies: A Systematic Review. Prevalência das Complicações Cardiovasculares nos Indivíduos com Anemia Falciforme e Outras Hemoglobinopatias: Uma Revisão Sistemática. **Arq Bras Cardiol**, v. 119, n.6, p. 893-899, 2022.

LU ZH, Steinberg MH. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: relation to regulatory sequences cis to the beta-globin gene. Multicenter Study of Hydroxyurea. **Blood**, v.87,n.4., p.1604-11, feb 1996.

MAKANI, J.; WILLIAMS, TN; MARSH, K. Doença falciforme em África: carga e

prioridades de investigação. **Anais de Medicina Tropical & Parasitologia**, v. 101, n. 1, p. 3-14, 2007.

MILLER S, Sleeper L, Charles P et al. Previsão de resultados adversos em crianças com doença falciforme. **N Engl J Med** v. 342, p. 1612–1613, 2000.

N. Conran, CF Franco-Penteado, FF Costa. Novos aspectos da fisiopatologia da vaso-oclusão da doença falciforme. **Hemoglobina**, v. 33, p. 1 - 16, 2009.

NAGEL RL and Steinberg MH. Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. **Pediatr Pathol Mol Med**, v. 20, p. 123–136, 2001.

NAOUM PC. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 22, p.5–22, 2000.

Nardozza Júnior A, Zerati Filho M, Reis RB. Urologia Fundamental. **São Paulo: Planmark**, 2010.

SARNAIK, Sharada A.; BALLAS, Samir K. Molecular characteristics of pediatric patients with sickle cell anemia and stroke. **American journal of hematology**, v. 67, n. 3, p. 179-182, 2001.

NEMBAWARE, V. et al. The Sickle Cell Disease Ontology: Enabling Collaborative Research and Co-Designing of New Planetary Health Applications. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 24, n. 10, p. 559–567, 2020.

NEONATO MG, Guilloud-Bataille M, Beauvais P, Begue P, Belloy M, Benkerrou M, Ducrocq R, Maier-Redelsperger M, de Montalembert M, Quinet B et al. Acute clinical events in 299 homozygous sickle cell patients living in France. French Study Group on Sickle Cell Disease. **Eur J Haematol**, v. 65, p. 155–164, 2000.

OHENE-FREMPONG, Kwaku et al. Acidentes cerebrovasculares na doença falciforme: taxas e fatores de risco. **Sangue, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 1, p. 288-294, 1998.

PATRICIA Reparaz, Idoia Serrano, Rosa Adan-Pedroso, Itziar Astigarraga, Jimena de Pedro Olabarri, Aizpea Echebarria-Barona, Miguel Garcia-Ariza, Ricardo Lopez-Almaraz, Rafael A. del Orbe-Barreto, Miriam Vara-Pampliega, Paula Gonzalez-Urdiales. Clinical management of the acute complications of sickle cell anemia: 11 years of experience in a tertiary hospital. **Anales de Pediatría (English Edition)**, v. 97, n. 1, p. 4-11, 2022.

PAVLAKIS, Steven G.; LEVINSON, Kim. Arterial ischemic stroke: common risk factors in newborns and children. **Stroke**, v. 40, n. 3, p. S79-S81, 2009.

PIEL, F. B., Patil, A. P., Howes, R. E., Nyangiri, O. A., Gething, P. W., Dewi, M., Temperley, W. H., Williams, T. N., Weatherall, D. J., & Hay, S. I. (2013). Global epidemiology of Sickle haemoglobin in neonates: A contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **The Lancet**, v. 381, n. 9861, p.142–151.

POILLON WN, Kim BC, Rodgers GP, *et al.* Sparing effect of hemoglobin F and hemoglobin A2 on the polymerization of hemoglobin S at physiologic ligand saturations. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, n. 11, p. 5039–5043, 1993.

POWARS D, Weidman JA, Odom-Maryon T, Niland JC, Johnson C. Sickle cell chronic lung disease: prior morbidity and the risk of pulmonary failure. **Medicine (Baltimore)**, v. 67, n.1, p.66-76, 1988.

POWARS DR. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 5, p. 475–93, 1991.

POWARS D and Hiti A. Sickle Cell Anemia. BS gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. **Am J Dis Child**, v. 147, p. 1197–1202, 1993.

QUINN, C.T. & Miller, S.T. Risk factors and prediction of outcomes in children and adolescents who have sickle cell anemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 18, p. 1339–1354, 2004.

RABINDRA N. Paul, Oswaldo L. Castro, Anita Aggarwal, Patrícia A. Oneal. Síndrome torácica aguda: doença falciforme. *European Journal of Hematology*, v.87, n. 3, p. 191-207, 2011.

RAMPERSAUD, E., Kang, G., Palmer, L. E., Rashkin, S. R., Wang, S., Bi, W., Alberts, N. M., Anghelescu, D., Barton, M., Birch, K., Boulos, N., Brandow, A. M., Brooke, R. J., Chang, T. C., Chen, W., Cheng, Y., Ding, J., Easton, J., Hodges, J. R., Weiss, M. J. A polygenic score for acute vaso-occlusive pain in pediatric sickle cell disease. **Blood Advances**, v. 5, n.14, p. 2839–2851, 2021.

REES, D.C., Williams, T.N. and Gladwin, M.T. Sickle Cell Disease. **Lancet**, v. 376, p. 2018-2031, 2010.

REITER, Christopher D. et al. A hemoglobina livre de células limita a biodisponibilidade do óxido nítrico na doença falciforme. **Medicina da natureza**, v. 8, n. 12, p. 1383-1389, 2002.

REZENDE P V., Viana MB, Murao M, Chaves ACL, Ribeiro ACF. Acute splenic sequestration in a cohort of children with sickle cell anemia. **J Pediatr (Rio J)**, v. 85, n. 2, p. 163–9, 2009.

RODRÍGUEZ Romero WE, Sáenz Renauld GF, Chaves Villalobos MA. Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica [Hemoglobin S haplotypes: their epidemiologic, anthropologic and clinical importance]. **Rev Panam Salud Publica**, Spanish, v.3, n.1, p 1-8, jan 1998.

RUSANOVA, Iryna et al. Haplótipos de agrupamentos de genes da β -globina em pacientes falciformes do Panamá. **American Journal of Human Biology**, v. 3, pág. 377-380, 2011.

SALAS A, Richards M, Lareu M-V, Scozzari R, Coppa A, Torroni A, Macaulay V and Carracedo A. The African diaspora: mitochondrial DNA and the Atlantic slave trade. **Am J Hum Genet**, v. 74, p. 454–465, 2004.

SAMANEH Farashi, Cornelis L. Harteveld. Molecular basis of α -thalassemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v.70, p. 43-53, 2018.

SANKARAN, V. G., and M. J. Weiss, Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. **Nat.Med**, v.21, p. 221-230, 2015.

SAIKI, R.K. *et al.* The design and optimization of the PCR. In: Erlich, H.A. **PCR technology - Principles and applications for DNA amplification**, v.1, p. 7-16, 1989.

SCHAER, Dominik J. *et al.* Haptoglobina, hemopexina e vias de defesa relacionadas – ciência básica, perspectivas clínicas e desenvolvimento de medicamentos. **Fronteiras na fisiologia** , v. 5, p. 415, 2014.

SEBASTIANI P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT and Steinberg MH. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. **Nat Genet**, v. 37, p. 435–40, 2005.

SERJEANT GR, Serjeant BE, Mohan JS and Clare A. Leg ulceration in sickle cell disease: Medieval medicine in a modern world. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 19, p. 943–956, 2005.

SERJEANT, G. R. *et al.* Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v.70 p. 66-77, 2018.

SILBERMAN M, Hu EW. Priapism.Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2020

SILVA, Maria Aparecida Lima da. Estudo de identificação de haplótipos e a relação

com as manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme, 2006.

SILVA IV, AF Reis, MJ Palaré, A. Ferrão, T. Rodrigues, A. Morais. Doença falciforme em crianças: complicações crônicas e busca de fatores preditivos para desfechos adversos. **Eur J Haematol**, v. 94, p. 157 - 161, 2015.

SINGHAL, R. *et al.* Development of pro-inflammatory phenotype in monocytes after engulfing Hb activated platelets in hemolytic disorders. **Clinical Immunology**, v.175, p. 133-142, 2016.

STEINBERG M, Hayken G, Steinberg D. Um sistema quantitativo para o estadiamento da necrose avascular. **J Bone Joint Surg Br**, v. 77-B, n. 1, p. 34-41, 1995.

STEINBERG MH, Nagel RL, Lawrence C, Swaminathan V, Lu ZH, Plonczynski M, Harrell A. γ -Globina haplótipo do gene na doença Hb SC. **Am J Hematol**, v. 52, n. 3, p. 189–191, 1996.

STEINBERG, M.H. & Embury, S.H. Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **Blood**, v. 68, p. 985–90, 1986.

STEINBERG MH and Rodgers GP. Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. **Semin Hematol**, v. 38, p. 299–306, 2001.

STEINBERG MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol**, v. 129, p. 465–481, 2005.

STEINBERG MH and Adewoye AH (2006) Modifier genes and sickle cell anemia. **Curr Opin Hematol**, v. 13, p. 131–6, 2006.

STEINBERG, Martin H. *et al.* Anemia falciforme, a primeira doença molecular: visão geral da etiologia molecular, fisiopatologia e abordagens terapêuticas. **The Scientific World Journal**, v. 8, p. 1295-1324, 2008.

STEINBERG MH and Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **Am J Hematol.** v. 87, p. 795–803, 2012.

STEINBERG, Martin H., David HK Chui , George J. Dover , Paola Sebastiani , Abdulrahman Alsultan. Hemoglobina fetal na anemia falciforme: copo meio cheio?. **Sangue**, v. 123, n. 4, p. 481–485, 2014.

STEINBERG MH.t. Visão geral da fisiopatologia da anemia falciforme In: Costa FF, Conran N, editores. Anemia falciforme: da ciência básica à prática clínica. Suíça: **Springer International**, p. 49–75, 2016.

STEINBERG, M.; STATES, U. Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia From the Department of Medicine, Division of Hematology / Oncology, Center of Excellence for Sickle Cell Disease, Center for Regenerative Medicine, Genome Science Institute, Boston University School of Medicine. 2021.

STEVENS, M. C. G.; PADWICK, M.; SERJEANT, G. R. Observations on the natural history of dactylitis in homozygous sickle cell disease. **Clinical pediatrics**, v. 20, n. 5, p. 311-317, 1981.

SUNDD, P., Gladwin, M. T., & Novelli, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annual review of pathology**, v. 14, p. 263–292, 2019.

OKUMURA, J. V.; LOBO, C. L. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, p. 71 - 72, 2013.

OLANTUYA, O. S. *et al.* Influence of alpha thalassemia on clinical and laboratory parameters among nigerian children with sickle cell anemia. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 33, n. 2, p. 10–12, 2019.

TOPLEY, Janet M. *et al.* Sequestro esplênico agudo e hiperesplenismo nos primeiros

cinco anos na doença falciforme homozigótica. **Arquivos de Doenças na Infância**, v. 56, n. 10, p. 765-769, 1981.

TSOUMANI ME, Kalantzi KI, Goudevenos IA, Tselepis AD. Inflamação mediada por plaquetas em doenças cardiovasculares. Papel potencial das interações plaquetas-endotélio. **Farmacologia Vascular Atual**, v.10, n. 5, p. 539–49, 2012.

VICARI P, Figueiredo MS. Priapismo na doença falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 29, n.3, p. 275-8, 2007.

VICHINSKY EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B. Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease: Clinical Presentation and Course. **Blood**, v. 89, p. 1787-1792, 1997.

VICHINSKY EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, Nickerson B, Orringer E, McKie V, Bellevue R, Daeschner C, Mancini EA. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. **N Engl J Med**, v. 342, n. 25, p. 1855-65, 2000.

ZAGO, M.A.; Pinto, A.C.S. *et al.* Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

ZAGO MA, Figueiredo MS and Ogo SH. Bantu BS Cluster Haplotype Predominates Among Brazilian Blacks. **Am J Phys Anthropol**, v. 298, p. 295–298, 1992.

WALLACE JL. Óxido nítrico como regulador de processos inflamatórios. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, p. 5–9, 2005.

WALLEY KR, McDonald TE, Higashimoto Y, Hayashi S. Modulação de citocinas pró-inflamatórias por óxido nítrico em lesão pulmonar aguda murina. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, n. 2, p. 698–704, 1999.

WANDERSEE NJ, Hillery CA. Glóbulos vermelhos e o processo vaso-oclusivo In:

Costa FF, Conran N, editores. Anemia falciforme: da ciência básica à prática clínica. **Nova York: Springer Int.** p. 49–74, 2016.

WANG, Y., Hardy, S. J., Ichesco, E., Zhang, P., Harris, R. E., & Darbari, D. S. Alteration of grey matter volume is associated with pain and quality of life in children with sickle cell disease. **Translational Research**, v. 240, p. 17–25, 2022.

WILLIAMS, T. N., & Thein, S. L. Sickle cell anemia and its phenotypes. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 19, p. 113–147, 2018.

ANEXO A

Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Rua. Joaquim Nabuco, 171 - Graças Recife-PE CEP: 52011-000 Tel.: 81-3182-4771 Fax: 81-3182-4660 E-mail: cep.hemope@gmail.com	 Governo do Estado de PE Secretaria de Saúde do Estado de PE
---	--	---

1 - DADOS SOBRE O PROJETO**PARECER FINAL: Nº. 035/2010**

Título do Projeto: Moduladores genéticos das manifestações clínicas da anemia falciforme
Instituição Solicitante: Universidade Federal de Pernambuco-UFPE
Pesquisador: Marcos André Cavalcanti Benerra, Ph.D.
Identidade: 5867375 CPF: 987.061.525-20 **Telefone:** 81 - 3182-4751
Endereço: Rua. Antonio Celso Uchôa Cavalcanti- Graças- Recife - PE - CEP: 52050-002
Local de Desenvolvimento do Projeto: Hospital de Hematologia da Fundação Hemope- UNILABE
Finalidade: Auxílio a projetos de pesquisa Edital FACEPE 10/010.

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Objetivo Geral: Determinar as bases moleculares que possam influenciar na variabilidade clínica da anemia falciforme.
Objetivos Específicos: Determinar a co-herança de α_2^{+20} talassemia e da triplicação do α ($\alpha\alpha$) influenciando nas manifestações clínicas do acidente vascular cerebral e priapismo na anemia falciforme; Relacionar os níveis de HbFetal e genótipos das Haplótipos β^E com o episódio de priapismo e acidente vascular cerebral; Investigar a associação do polimorfismo na região promotora do gene da cVOS (T-786C) no desenvolvimento do priapismo em pacientes com anemia falciforme; Investigar se a associação de SNPs no gene Klotho podem ser um fator de risco nas complicações vasculares, como priapismo, em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do polimorfismo na região promotora do gene TNF- α (-308) no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do SNPs rs2238088 (T->G), localizado na região codificadora do gene TNF- α no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do SNPs rs3093655 (C->A), localizado na região 3' não transcrita do gene TNF- α no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Comparar e relacionar os níveis de hemoglobina total, Hb S, Hb F e reticulócitos entre pacientes portadores de anemia falciforme com e sem priapismo; Comparar e relacionar os níveis de hemoglobina total, Hb S, Hb F e reticulócitos entre os pacientes portadores de anemia falciforme com e sem AVC; Compreender melhor a heterogeneidade clínica da doença falciforme nas complicações do sistema nervoso central e Compreender melhor a heterogeneidade da doença falciforme nas complicações clínicas do priapismo.

3 - PARECER DO RELATOR: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer nº. 035/2010, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética - a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 - Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delimitada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.x), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido - mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentadas anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.c).
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Homologado na Reunião do CEP de 20/10/2010


 Ana Lúcia de Sena
 Coordenadora - Comitê de Ética em Pesquisa -HEMOPE