

## Manifestações clínicas agudas na primeira e segunda infâncias e características moleculares da doença falciforme em um grupo de crianças do Rio de Janeiro

Isaac Lima da Silva Filho<sup>1</sup>  
 Georgina Severo Ribeiro<sup>2</sup>  
 Patrícia Gomes Moura<sup>3</sup>  
 Monica Longo Vecchi<sup>3</sup>  
 Andréa Cony Cavalcante<sup>3</sup>  
 Maria José de Andrada-Serpa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, IPEC, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói, RJ, Brasil

<sup>3</sup> Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti, HEMORIO, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**Objetivo:** Avaliar a expressão clínica da anemia falciforme (AF) e sua relação com os haplótipos da globina beta e talassemia alfa (Tal) em crianças na primeira e segunda infâncias.

**Métodos:** Foi realizado um estudo descritivo e retrospectivo de série de casos em crianças na primeira e segunda infâncias provenientes da triagem neonatal do Rio de Janeiro. Um total de 96 crianças, 79 com AF e 17 com HbSC, 48 homens e 48 mulheres, média de idade de 29,9 (DP+/-20,9) meses, sendo 62 (16,2+/-8,6) na primeira e 34 (54,9+/-11,3) na segunda infância. Foram avaliados: crises dolorosas (CD), de sequestro esplênico (SE) e hemolítica (CH), síndromes mão-pé (SMP) e torácica aguda (STA) e infecções.

**Resultados:** Os eventos foram mais frequentes na primeira infância; 94% das crianças apresentaram ao menos um episódio. Infecção foi o evento mais frequente, acometendo 88,5% das crianças, SE ocorreu mais na primeira infância, enquanto CD e STA mais na segunda. A Tal alfa 3.7 foi observada em 20,9% dos casos. O haplótipo mais frequente foi o Bantu (73,7%), seguido de Benin (23,0%). Não foi observada associação entre eventos clínicos e haplótipos da globina. Crianças com AF e Tal apresentaram menos eventos infecciosos.

Não foi possível associar os polimorfismos com a expressão clínica, porém, a maioria das crianças Bantu/Bantu e sem Tal apresentou mais eventos clínicos.

**Descritores:** Anemia falciforme; Talassemia alfa; Haplótipos; Triagem neonatal; Evolução clínica

### Introdução

No Brasil, estima-se o nascimento de 3.500 crianças com anemia falciforme (AF) por ano, uma em cada mil recém-nascidos vivos<sup>(1)</sup>. No Rio de Janeiro, um em cada 21 nascimentos é de crianças portadoras do traço falciforme, assim como uma em cada 1.200 é portadora de doença falciforme (DF)<sup>(1)</sup>. A frequência da AF tem distribuição heterogênea na nossa população, sendo maior nas regiões que mantinham rotas comerciais com países africanos, como alguns estados da Zona da Mata Nordestina e do Sudeste do Brasil<sup>(2)</sup>. A partir da descoberta de ouro nas Minas Gerais e da proibição do comércio de escravos acima da linha do Equador, o Rio de Janeiro passou a ter destaque no cenário do tráfico, passando a ser o principal porto de comércio e centro distribuidor para o resto do país<sup>(2)</sup>, justificando deste modo sua posição como um dos estados brasileiros onde se verifica uma das maiores frequências de AF no país.

Em 2001, com a inclusão das hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), foi possível o diagnóstico precoce e consequentemente um melhor acompanhamento dos casos, fato que acarretou um inegável benefício às crianças triadas quando comparadas com aquelas em que o diagnóstico só foi realizado após as primeiras manifestações da doença.

O diagnóstico ao nascimento possibilitou entender melhor o comportamento e a evolução da DF na nossa população, considerando que, apesar dos avanços terapêuticos obtidos nos últimos anos, a DF continua a causar significativa morbidade<sup>(3)</sup>. Com o objetivo de estudar os eventos clínicos agudos mais prevalentes na primeira e segunda infâncias em crianças portadoras de DF foi realizado um estudo retrospectivo em pacientes provenientes da triagem neonatal e acompanhadas no Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO).

### Métodos

Trata-se de um estudo retrospectivo, de série de casos, realizado em crianças portadoras de DF identificadas pelo PNTN para Hemoglobinopatias do estado do Rio de Janeiro e acompanhadas clinicamente no HEMORIO. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HEMORIO e os pais das crianças participantes assinaram um termo de consentimento.

As crianças foram incluídas no estudo, de forma aleatória, no período de outubro de 2006 a dezembro de 2007. Os dados clínicos e as variáveis demográficas foram coletados dos prontuários médicos e inseridos em um banco de dados. Todos os eventos clínicos agudos registrados adequadamente nos prontuários, desde o nascimento até a data da avaliação final

Conflito de interesse:

Os autores declaram não haver conflito de interesse

Submissão: 7/11/2011

Aceito: 12/28/2011

**Autor correspondente:**

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, IPEC, Fundação Oswaldo Cruz FIOCRUZ

Isaac Lima da Silva Filho  
 Av. Brasil, 4365, Bairro Maguinhos  
 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
 isaac.filho@ipec.fiocruz.br

www.rbhh.org or www.scielo.br/rbhh

DOI: 10.5581/1516-8484.20120049

(07/2008), foram computados. Os seguintes eventos foram considerados: doença cerebrovascular (DCV), crises dolorosas, crises hemolíticas, crises de sequestro esplênico, síndrome mão-pé, infecções e síndrome torácica aguda. Os critérios utilizados para a definição dos eventos clínicos foram os seguintes: a) doença cerebrovascular: expressa clinicamente, ou seja, déficit neurológico de súbita instalação com comprovação de imagem (tomografia computadorizada do crânio ou angiografia por ressonância magnética) ou DCV subclínica, expressa por alteração da velocidade do *doppler* transcraniano em conformidade com o protocolo STOP<sup>(4)</sup>, no segmento distal das artérias cerebrais médias (direita e esquerda), bifurcações e carótidas internas; b) crises dolorosas: por evento doloroso em que foi necessário tratamento hospitalar com analgésicos; c) crise hemolítica: pela diminuição dos níveis basais de hemoglobina e hematócrito; d) crise de sequestro esplênico: pela presença de esplenomegalia acompanhada de redução importante do nível de hemoglobina considerado basal para o paciente; e) síndrome mão-pé: edema de mãos e de pés com dor e/ou calor local, podendo estar associado à queda do hematócrito; f) infecção: febre e prostração acompanhadas de leucocitose, associadas ou não à outros exames laboratoriais e de imagem; g) síndrome torácica aguda: radiografia de tórax com infiltrado pulmonar recente acompanhado de sintomas respiratórios graves, com baixa saturação de oxigênio, sendo necessária transfusão de sangue para melhora clínica e radiológica.

Todos os índices hematológicos dos hemogramas e as dosagens de hemoglobina fetal que constavam nos prontuários foram registrados; as médias destes resultados foram consideradas nas análises dos dados. O diagnóstico da doença falciforme e a dosagem da hemoglobina fetal foram realizados por cromatografia líquida de alta pressão-HPLC no equipamento Variant II (BioRad). Os hemogramas foram realizados no equipamento Cell Dyn 3700 (Abbott).

Dois a cinco mililitros de sangue total em ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) foram coletados na ocasião da consulta médica de rotina das crianças. A extração de DNA foi realizada segundo as instruções do *kit* comercial (Puregene<sup>a</sup> DNA Purification System From Whole Blood, Gentra).

Os haplótipos da betaglobina (Bantu ou CAR [Central African Republic], Benin, Senegal, Árabe-Indiano, CI, CII, CIII e Atípico) foram determinados por reação em cadeia de polimerase (PCR), seguida de análise dos polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP).

Foram identificados seis sítios polimórficos de restrição (5'γ<sup>G</sup>, γ<sup>G</sup>, γ<sup>A</sup>, ψβ, 3'ψβ, 5'β) dentro do complexo dos genes da betaglobina. Resumidamente, foram realizadas as amplificações dos seis sítios, cada reação de PCR com volume final de 50 µl contendo 100 ng de DNA; 1,5 µl de dNTPs a 10 mM; 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,5 µl (2,5 U) de Taq DNA polimerase (Qiagen), 5,0 µl de tampão 10x contendo 200 mM de Tris-HCl (pH8.4); 500 mM KCl e 2,0 µl a 50 mM de MgCl<sub>2</sub>. A amplificação foi realizada utilizando o termociclador da Eppendorf - Mastercycler Gradient. A desnaturação inicial foi realizada através de um ciclo de duração de 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos e quinze segundos, incluindo um ciclo adicional de extensão a 72 °C por 5 minutos. Dez microlitros dos produtos obtidos foram digeridos com endonucleases de restrição para identificação dos

polimorfismos (*Xmn*I [5'γ<sup>G</sup>], *Hind*III [γ<sup>G</sup>, γ<sup>A</sup>], *Hinc*II [ψβ, 3'ψβ], e *Hinf*I [5'β]) de acordo com Sutton et al.<sup>(47)</sup>

A identificação das deleções 3.7<sup>kb</sup> e 4.2<sup>kb</sup> na cadeia alfa da globina foi realizada por PCR-multiplex de acordo com Chong et al.<sup>(5)</sup>. A estratégia da técnica permitiu a identificação do alelo normal (gene α<sub>2</sub>) e das deleções -a<sup>3.7</sup> e -a<sup>4.2</sup> em uma mesma reação. Na presença do alelo normal os oligonucleotídeos α<sub>2</sub>/3.7F e α<sub>2</sub>R geram um fragmento de 1800 pb, enquanto na presença do alelo mutado -a<sup>3.7</sup> e -a<sup>4.2</sup> os oligonucleotídeos α<sub>2</sub>/3.7F, 3.7/20.5R e 4.2F, 4.2R geram um fragmento de 2022 pb (-a<sup>3.7</sup>) e 1628 pb (-a<sup>4.2</sup>), respectivamente. Resumidamente, cada reação de PCR com volume final de 25 µl contendo 100 ng de DNA; 1,25 µl de dNTPs a 10 mM; 1,5 µl de cada oligonucleotídeo a 10 mM, 5 µl de Q-Solution-5x (Qiagen), 0,5 µl (2,5 U) de Taq DNA polimerase (Qiagen), 2,5 µl de tampão 10x contendo 200 mM de Tris-HCl (pH8.4); 500 mM KCl e 1,0 µl a 50 mM de MgCl<sub>2</sub>. A amplificação foi realizada utilizando o termociclador da Eppendorf - Mastercycler Gradient. A desnaturação inicial foi realizada através de um ciclo de duração de 3 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos a 98 °C por 45 segundos, 63 °C por 1 minuto e trinta segundos e 72 °C por 2 minutos e quinze segundos, incluindo um ciclo adicional de extensão a 72 °C por 5 minutos.

Noventa e seis crianças foram incluídas no estudo, sendo 79 portadoras de AF e 17 com hemoglobina SC; 48 eram do sexo masculino e 48 do feminino.

As diferenças das variáveis quantitativas entre os grupos foram analisadas por teste *t*-Student ou por análise de variância. Em relação às variáveis qualitativas foi utilizado teste qui-quadrado. Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

## Resultados

A idade das crianças variou de 1 a 80 meses, sendo a média de 29,9 meses (DP ± 20,9) e mediana de 24 meses. 62 (64,6%) crianças estavam na primeira infância com idade de 0 a 3 anos completos e 34 (35,4%) na segunda infância com mais de 3 e menos de 7 anos.

Dentre as crianças estudadas foi verificado que 90 (94%) apresentaram pelo menos um evento clínico. O intervalo de ocorrência dos eventos variou de 2 a 79 meses, sendo mais frequente na primeira infância.

A tabela 1 mostra a distribuição das frequências dos eventos clínicos por faixa etária e de acordo com o tipo de hemoglobina (SS ou SC). Durante o período de acompanhamento, dois óbitos foram registrados, um causado por crise de sequestro esplênico em uma criança com anemia falciforme com 13 meses de idade e outro de causa indeterminada em um paciente portador de hemoglobina SC com 67 meses de idade. Duas crianças com anemia falciforme apresentaram um episódio de acidente vascular encefálico e um de priapismo aos 34 e 43 meses de idade, respectivamente.

A infecção foi o evento mais frequente nas duas faixas etárias, acometendo 88,5% do total de crianças. Considerando apenas as crianças portadoras de anemia falciforme, a presença de episódios dolorosos e de síndrome torácica aguda foi significativamente mais frequente na segunda infância, enquanto a ocorrência de sequestro esplênico prevaleceu na primeira infância (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos eventos de acordo com a faixa etária e o tipo de hemoglobina das crianças

Evento	Crianças de 0 a 3 anos Nº de pacientes n (%)	Crianças de 3 a 6 anos Nº de pacientes n (%)	Total	χ <sup>2</sup>	valor de p
<b>Episódios dolorosos</b>	18/62 (29,0)	19/34 (55,9)	37/96 (38,5)	4,412	0,03
Hb SS*	16/49 (32,7)	17/30 (56,7)	33/79 (41,8)		
Hb SC**	2/13 (15,4)	2/4 (50,0)	4/17 (23,5)		
<b>Sequestro esplênico</b>	36/62 (58,1)	10/34 (29,4)	46/96 (47,9)	12,943	0,0001
Hb SS	35/49 (71,4)	9/30 (30,0)	44/79 (55,7)		
Hb SC	1/13 (7,7)	1/4 (25,0)	2/17 (11,8)		
<b>Crise hemolítica</b>	37/62 (59,8)	23/34 (67,6)	60/96 (62,5)	0,034	0,85
Hb SS	35/49 (71,4)	22/30 (73,3)	57/79 (72,2)		
Hb SC	2/13 (15,4)	1/4 (25,0)	3/17 (17,6)		
<b>Síndrome mão-pé</b>	21/62 (33,9)	14/34 (41,2)	35/96 (36,4)	0,476	0,49
Hb SS	19/49 (38,8)	14/30 (46,7)	33/79 (41,8)		
Hb SC	2/13 (15,4)	0/4 (0)	2/17 (11,8)		
<b>Infecção</b>	53/62 (85,5)	32/34 (94,1)	85/96 (88,5)	1,070	0,47
Hb SS	42/49 (85,7)	28/30 (93,3)	70/79 (88,6)		
Hb SC	11/13 (84,6)	4/4 (100)	15/17 (88,2)		
<b>Síndrome torácica aguda</b>	2/62 (3,2)	8/34 (23,5)	10/96 (10,4)	8,585	0,005
Hb SS	2/49 (4,1)	8/30 (26,7)	10/79 (12,6)		
Hb SC	0/13 (0)	0/4 (0)	0/17 (0)		

\*Hb SS = anemia falciforme; \*\*Hb SC = Hemoglobina SC; # Qui-quadrado calculado somente para eventos nas crianças com HbSS

Tabela 2 - Dados laboratoriais de acordo com gênero, idade, presença de talassemia e haplótipo do gene da betaglobina

	N	Hb* (g/dl) Média ± DP [IC 95%]	valor de p	VCM* (fl) Média ± DP [IC 95%]	valor de p	HbFetal* (%) Média ± DP [IC 95%]	valor de p
<b>Gênero</b>							
Masculino	48	8,2 ± 1,2 [7,9-8,6]	< 0,05	80,8 ± 12,3 [77,3-84,4]	> 0,05	12,0 ± 8,3 [9,5-14,5]	> 0,05
Feminino	48	8,9 ± 1,3 [8,5-9,2]		81,2 ± 9,4 [78,4-83,9]		12,3 ± 5,9 [10,4-14,2]	
<b>Faixa etária</b>							
Crianças de 0 a 3 anos	62	8,7 ± 1,4 [8,3-9,0]	> 0,05	78,4 ± 10,3 [75,8-81,0]	< 0,05	13,1 ± 7,6 [10,9-15,2]	> 0,05
Crianças de 3 a 6 anos	34	8,3 ± 1,2 [7,8-8,7]		85,7 ± 10,6 [82,0-89,4]		10,7 ± 6,3 [8,5-12,9]	
<b>Talassemia</b>							
aa/aa	72	8,5 ± 1,2 [8,2-8,8]	> 0,05	83,7 ± 9,0 [81,6-88,5]	< 0,05	12,5 ± 7,1 [10,7-14,2]	> 0,05
-a/aa ou -a/-a	19	8,9 ± 1,7 [8,1-9,7]		71,7 ± 11,9 [66,0-77,4]		12,5 ± 8,0 [8,1-16,9]	
<b>Haplótipo Betaglobina</b>							
Bantu/Bantu	39	8,0 <sup>#</sup> ± 1,0 [7,6-8,3] <sup>#</sup>	< 0,05	84,8 <sup>#</sup> ± 9,7 [81,7-87,9] <sup>#</sup>	> 0,05	11,9 <sup>#</sup> ± 5,3 [10,2-13,8] <sup>#</sup>	< 0,05
Bantu/Benin	32	8,7 ± 1,2 [8,2-9,1]		83,1 ± 7,3 [80,4-85,7]		16,1 ± 8,1 [12,9-19,2]	
Bantu/Benin	7	10,5 ± 0,5 [10,0-11,0]		71,8 ± 8,6 [63,8-79,9]		4,1 ± 3,4 [0,5-7,8]	
Bantu/IC	9	8,5 ± 1,5 [7,4-9,7]		74,0 ± 10,7 [65,8-82,3]		7,9 ± 3,9 [4,7-11,2]	
Bantu/Atípico	2	7,8 ± 1,5		86,6 ± 14,6		15,9 ± 14,4	
Benin/Benin	2	10,4 ± 0,6		66,2 ± 21,5		-	
Benin/IC	2	9,5 ± 1,2		67,7 ± 15,9		5,3 ± 0,7	
Benin/Atípico	2	8,3 ± 0,6	80,9 ± 4,2	4,2 ± 0,5			

Média da média dos valores de cada determinação de cada caso; # Entre grupos Bantu/Bantu e Bantu/Benin. Análise através do teste t-student;

HB Hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio

Em nosso estudo, a crise de sequestro esplênico foi registrada 89 vezes, afetando quase a metade (47,9%) dos pacientes. Foi o evento clínico mais claramente relacionado a uma faixa etária, acometendo 58,1% das crianças na primeira infância (p = 0,0001), assim como apresentou uma alta frequência de recorrência com 63% dos pacientes apresentando mais de um episódio.

Os eventos clínicos que apresentaram a maior média de ocorrência por criança foram: episódios dolorosos (2,9 eventos/criança), infecção (2,3 eventos/criança) e crise hemolítica (2,1 eventos/criança). Crise de sequestro esplênico apresentou a menor idade média de ocorrência do primeiro evento (12,8 meses), enquanto síndrome torácica aguda (34,1 meses) e episódios dolorosos (29,4 meses) foram aqueles com maior idade média de ocorrência do primeiro evento.

A tabela 2 apresenta as médias dos níveis de hemoglobina, do volume corpuscular médio e da concentração de hemoglobina fetal das crianças de acordo com o sexo, a idade, a presença de

alfa talassemia e o haplótipo da betaglobina.

A presença de alfa talassemia deleção -a<sup>3,7</sup> foi observada em 20,9% (19/91) dos casos, sendo 16 casos heterozigotos e 3 homozigotos. Não se detectou a deleção -a<sup>4,2</sup>; os haplótipos da betaglobina mais frequentes foram Bantu/Bantu (41,0%) e Bantu/Benin (33,7%). Não foi possível realizar o estudo da cadeia alfa em cinco casos devido ao fato de o DNA estar parcialmente degradado, e em um desses casos não se conseguiu amplificar a região da betaglobina para o estudo dos haplótipos.

Em relação aos dados laboratoriais foi verificado que a média da dosagem de hemoglobina foi maior (p < 0,05) em mulheres do que em homens. O volume corpuscular médio (VCM) foi menor (p < 0,05) na primeira infância e nas crianças com talassemia alfa. As médias da hemoglobina e da hemoglobina fetal foram menores (p < 0,05) nas crianças portadoras do haplótipo Bantu/Bantu quando comparadas com aquelas Bantu/Benin (Tabela 2).

Tabela 3 - Distribuição dos eventos clínicos de acordo com os haplótipos e a presença de talassemia alfa

Eventos	Haplótipo betaglobina		Cadeia talassemia alfa	
	Bantu/Bantu n = 39 (%)	Bantu/Benin n = 32 (%)	aa/aa n = 72 (%)	-a/aa e -a/-a n = 19 (%)
Episódios dolorosos	16 (41,0)	12 (37,5)	32 (35,9)	8 (42,1)
Crise sequestro esplênico	21 (53,8)	17 (53,1)	34 (47,2)	9 (47,3)
Crise hemolítica	25 (64,1)	25 (78,1)	46 (63,4)	10 (52,6)
Síndrome mão-pé	16 (41,0)	12 (37,5)	29 (40,2)	4 (21,1)
Infecção	35 (89,7)	27 (84,3)	66 (91,7)	14 (73,6)*
Síndrome Torácica aguda	2 (5,1)	6 (18,7)	6 (8,3)	3 (15,8)

Valor de  $p < 0,05$

Não foi verificada associação entre os haplótipos da betaglobina e a ocorrência de eventos clínicos. O único evento clínico associado à talassemia alfa foi a ocorrência de infecção; nesse caso crianças sem a deleção  $-a^{3,7}$  apresentaram mais eventos infecciosos quando comparadas às crianças com talassemia alfa (Tabela 3). Porém, vale ressaltar que dentre as seis crianças assintomáticas, ou seja, aquelas que não foram afetadas por nenhum evento clínico, quatro apresentavam co-herança com a talassemia alfa e uma tinha microcitose persistente sem deleção  $-a^{3,7}$  ou  $-a^{4,2}$ . Das duas crianças que foram a óbito nenhuma possuía talassemia alfa.

## Discussão

A literatura tem mostrado que é alta a morbidade e a mortalidade da AF, especialmente na infância. Na população americana, a mediana de sobrevida é de 42 anos para homens e 48 anos para as mulheres<sup>(6)</sup>. Segundo Platt et al., o pico de morte entre crianças com AF nos Estados Unidos ocorreu entre 1 e 3 anos de idade, sendo infecção a maior causa em pacientes abaixo de 20 anos<sup>(7)</sup>. Na Jamaica, a sobrevida de homens é 53 anos e de mulheres de 58,3 anos<sup>(7)</sup>. Diferente do observado nos Estados Unidos, a maior taxa de morte na infância ocorre em crianças entre seis meses e um ano de idade<sup>(8)</sup>.

No Brasil, estima-se que até 25% das crianças não atingem os 5 anos de vida, sendo elevada a mortalidade perinatal, variando de 20 a 50%<sup>(9)</sup>.

A infecção foi o evento que afetou um maior número de crianças (88,9%) e que ocorreu com maior frequência. Esse resultado está de acordo com os principais estudos relatados na literatura. Na Jamaica, infecção ocorreu com maior frequência nos três primeiros anos de vida, sendo uma das três principais causas de morte<sup>(10,11)</sup>. No Grupo de Estudo Cooperativo dos Estados Unidos (CSSCD), infecções por *Streptococcus pneumoniae* e *Hemophilus influenza* foram as causas mais comuns de óbito nas crianças<sup>(6,12)</sup>. Isso foi verificado na França, onde infecções foram a segunda causa entre os eventos, sendo mais comum em crianças com até cinco anos de idade<sup>(13)</sup>. No Rio de Janeiro, eventos infecciosos acometeram 100% dos pacientes estudados<sup>(14)</sup>. Após a introdução da profilaxia com penicilina verificou-se uma considerável diminuição na frequência dos episódios infecciosos<sup>(15,16)</sup>. Porém, a infecção continua sendo uma das principais causas de mortalidade na infância em crianças com AF. Apesar da grande

frequência de episódios infecciosos em nosso estudo, não observamos nenhum óbito causado por infecção.

A crise de sequestro esplênico é um evento agudo, sendo responsável por grande morbidade e mortalidade. Instala-se rapidamente e é potencialmente fatal se não for tratado rapidamente<sup>(17)</sup>. Em nosso estudo, a crise de sequestro esplênico ocorreu em quase a metade dos pacientes; foi o evento mais claramente relacionado a uma faixa etária, prevalecendo significativamente na primeira infância. Dados da Jamaica mostram que a crise de sequestro é a principal causa de morte em crianças jovens, sendo a recorrência também frequente. Em estudo de 216 crianças 24% apresentou crise de sequestro; sendo mais frequente entre seis e doze meses de idade e diminuindo progressivamente após esse período<sup>(18,10)</sup>. Por outro lado, os resultados do CSSCD mostram uma menor frequência de episódios de sequestro esplênico quando comparados com os nossos dados, porém concordam com a faixa etária de maior ocorrência, situada entre seis meses e três anos de idade<sup>(12)</sup>. O grupo francês de estudo de AF relatou como principal causa de anemia aguda a crise aplástica (23%), sendo que o sequestro esplênico representou somente 13% dos eventos clínicos descritos<sup>(13)</sup>. Na Inglaterra, em duas séries de estudos realizados na década de 80, as anemias agudas representaram 2,5% e 3,5% dos eventos clínicos relatados<sup>(19,20)</sup>. De acordo com os diversos relatos da literatura parece existir uma variação na prevalência das crises de sequestro; porém, todos os estudos concordam que esses episódios são mais frequentes entre seis meses e três anos de idade.

Episódios dolorosos são os principais responsáveis pela hospitalização nos pacientes com DF e mais frequentes em portadores de AF; estão relacionados aos níveis diminuídos de hemoglobina fetal e ao aumento do hematócrito<sup>(6,12)</sup>. Na Inglaterra, 250 crianças de 0 a 16 anos apresentaram uma maior taxa de crises dolorosas do que qualquer outro evento relatado em todas as faixas etárias, sendo que a maior frequência foi entre 3-6 anos de idade<sup>(16)</sup>. Na Jamaica, foi o evento mais frequente depois dos dois anos de idade<sup>(21)</sup>. As crises dolorosas acometeram mais crianças na segunda infância na amostra estudada; mais da metade apresentou episódios dolorosos nessa faixa etária, sendo as crises mais frequentes a partir de 2 anos com o pico aos 4 anos de idade.

No nosso estudo a síndrome torácica aguda não foi um evento muito frequente, sendo significativamente mais prevalente na segunda infância. A síndrome torácica aguda está entre as causas

mais comuns de óbito na AF, sendo responsável por até 25% das mortes; é a segunda maior causa de internação<sup>(22)</sup>. A frequência da síndrome torácica aguda foi menor no nosso estudo do que as verificadas em outras séries. Nos Estados Unidos, duas séries, a primeira com 694 pacientes e a segunda com 939 crianças, relatam a ocorrência da síndrome torácica aguda em 25% e 50%, respectivamente<sup>(22,12)</sup>. Na série da Jamaica, a síndrome torácica aguda ocorreu em 83% dos pacientes<sup>(23)</sup>, enquanto na França Neonato et al.<sup>(13)</sup> relatam pelo menos um episódio em 44,8% das crianças. Esses dados expressam a grande variação na ocorrência deste evento nas diferentes séries; entretanto, todas relatam uma maior frequência em crianças na segunda infância, conforme verificado em nosso estudo.

Na amostra de crianças analisada o haplótipo mais frequente foi o Bantu ou CAR, seguido do haplótipo Benin. Esses resultados corroboram os achados anteriores encontrados na população do Rio de Janeiro e os registros históricos do fluxo do gene  $\beta^S$  para o Brasil, assim como os resultados das análises do DNA mitocondrial em populações negras do Brasil<sup>(2,24,25)</sup>.

Em grandes coortes de pacientes com AF observa-se o que o nível de hemoglobina fetal é mais elevado nas mulheres que nos homens, fato que pode ser explicado pela ligação do *locus* que regula a produção de hemoglobina fetal (FCP) ao cromossomo X<sup>(13)</sup>. No nosso estudo não observamos diferença nos níveis de hemoglobina fetal entre os sexos, embora a concentração total de hemoglobina tenha sido mais elevada nas mulheres ( $p < 0,05$ ).

A variação nos níveis de hemoglobina fetal tem sido associada a alguns fatores como idade, sexo, ligação do *locus* FCP ao cromossomo X, número de genes  $\alpha$  e haplótipos da betaglobina<sup>(26)</sup>. Relatos na literatura têm confirmado a associação dos haplótipos da betaglobina com variações nos níveis de hemoglobina fetal, mostrando a maior expressão do gene  $g^G$  em indivíduos com haplótipo Senegal e Árabe-indiano. Deste modo, carreadores do haplótipo Senegal e Árabe-indiano normalmente apresentariam maiores níveis de hemoglobina fetal. Indivíduos com o haplótipo Bantu teriam menores níveis, enquanto aqueles com o haplótipo Benin apresentariam uma posição intermediária entre os haplótipos Senegal e Bantu<sup>(27)</sup>. Em nosso estudo, crianças com o haplótipo Bantu homocigoto apresentaram menores níveis de hemoglobina e hemoglobina fetal quando comparadas àquelas com haplótipo Bantu/Benin, mostrando que carreadores de dois cromossomos Bantu apresentam menores índices de hemoglobina fetal do que aqueles com apenas um cromossomo, confirmando em parte relatos anteriores e reiterando estudos realizados na população brasileira<sup>(14,28)</sup>.

Em nosso estudo não foi possível correlacionar os haplótipos da betaglobina com os eventos clínicos observados. O número da amostra, bem como a presença de uma grande quantidade de indivíduos heterocigotos, a forte miscigenação da população brasileira e a complexidade da expressão clínica na AF podem explicar a falta de correlação.

A frequência da deleção  $-a^{3,7}$  na amostra analisada foi elevada; 20,9% das crianças foram positivas para talassemia alfa; esse resultado confirma os dados previamente descritos que relatam uma frequência variando de 20% a 25% em afro-descendentes brasileiros<sup>(29)</sup>. A talassemia alfa é, provavelmente, a alteração genética mais comum em humanos<sup>(30)</sup>, sendo a mutação  $-a^{3,7}$  mais

frequente no mundo, alcançando prevalência muito elevada nas regiões tropicais e subtropicais, no continente africano e em alguns países da América, sua frequência pode atingir 40%<sup>(1)</sup>. Numerosos estudos têm mostrado a clara influência da talassemia alfa em alguns parâmetros hematológicos, como a diminuição do VCM, da hemoglobina globular média, da hemoglobina fetal, dos reticulócitos, o aumento do hematócrito, da concentração de hemoglobina, da hemoglobina  $A_2$  e do número de hemácias<sup>(31-34)</sup>. Contudo, o efeito desta co-herança nas manifestações clínicas dos pacientes com DF é variável. A última revisão realizada sobre a influência da talassemia alfa na expressão clínica da AF concluiu que eventos vasoclusivos, tais como acidente vascular encefálico, úlceras de perna e infartos esplênicos, parecem se beneficiar da co-herança da talassemia alfa. Porém, eventos mais dependentes da viscosidade do sangue, como episódios dolorosos, síndrome torácica aguda e osteonecrose, são minimamente afetados<sup>(27)</sup>.

No Rio de Janeiro, não foi possível demonstrar claramente a influência da talassemia alfa em um grupo de pacientes estudados; porém, foi verificado que crianças com AF sem talassemia alfa apresentaram mais eventos de dor óssea quando comparadas com as crianças sem talassemia alfa<sup>(35)</sup>. Nossos resultados não relacionam a talassemia alfa a nenhum episódio clínico específico, exceto a ocorrência de infecção no grupo total (HbSS e HbSC) que apresentou mais episódios em crianças sem talassemia alfa. Porém, quando consideramos somente as crianças com AF não verificamos diferença na ocorrência de episódios infecciosos. Contudo, foi verificado que a maioria das crianças assintomáticas apresentava talassemia alfa e que a ocorrência de episódios dolorosos, crises de sequestro esplênico, síndrome mão-pé e síndrome torácica aguda foi menos frequente em crianças com talassemia alfa, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa.

Não foi possível associar os polimorfismos genéticos com a expressão clínica na amostra estudada, porém, a maioria das crianças Bantu/Bantu e sem talassemia alfa apresentou mais eventos clínicos.

A doença falciforme apresenta uma morbidade elevada mesmo nos primeiros anos de vida, pois a maioria dos eventos clínicos agudos ocorreu na primeira infância. Episódios infecciosos foram o principal evento clínico observado. Sequestro esplênico foi mais frequente na primeira infância, assim como síndrome torácica aguda e episódios dolorosos ocorreram mais na segunda infância.

O haplótipo Bantu, seguido do Benin, foram os mais frequentes, confirmando registros históricos do fluxo do gene beta S para o Brasil, estudos anteriores para a população do Rio de Janeiro, bem como os resultados das análises do DNA mitocondrial em populações negras brasileiras. A deleção  $-a_2^{3,7kb}$  confirmou a elevada frequência da co-herança com a hemoglobina S no Rio de Janeiro.

A expressão clínica da DF é muito variável no Brasil; são poucos os estudos que tentam caracterizar os eventos clínicos na infância. Somente com a introdução da triagem neonatal para as hemoglobinopatias foi possível o diagnóstico precoce de forma sistemática. Fatores genéticos são, provavelmente, um dos responsáveis pela grande variação na apresentação clínica dos eventos e somente estudos de coorte acompanhados da caracterização molecular poderão traçar um perfil clínico e genético, por faixa etária, dos nossos pacientes.

## Referências

- Cançado RD, Jesus JA. Doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):203-6.
- Fleury MK. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais. *Rev Bras Anal Clin.* 2007;39(2):89-93.
- Hagar W, Vichinsky E. Advances in clinical research in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2008;141(3):346-56.
- Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin cluster haplotypes. *Am J Hematol.* 1989;32(1):66-9.
- Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of  $\alpha$ -thalassemia. *Blood.* 2000;95(1):360-2.
- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. Mortality in sickle cell disease – Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med.* 1994;330(23):1639-44. Comment in: *N Engl J Med.* 1994;331(15):1022-3.
- Wiarenga KJ, Hambleton IR, Lewis NA. Survival estimates for patients with homozygous sickle-cell disease in Jamaica: a clinic-based population study. *Lancet.* 2001;357(9257): 680-3
- Thomas AN, Pattison C, Serjeant GR. Causes of death in sickle cell disease in Jamaica. *Br Med J.* 1982;285(6342):633-5.
- Simões BP, Arelli JC . [Brazilian consensus meeting on stem cell transplantation: hemoglobinopathies committee]. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(Supl.1):46-53. Portuguese Serjeant GR, Serjeant BE. Management of sickle cell disease; lessons from the Jamaican Cohorte Study. *Blood Rev.* 1993;7(3):137-45.
- Lee A, Thomas P, Cupidore L, Serjeant B, Serjeant G. Improved survival in homozygous sickle cell disease: lessons from a cohort study. *BMJ.* 1995;311(7020):1600-2.
- Serjeant GR, Serjeant BE. Management of sickle cell disease; lessons from the Jamaican Cohort Study. *Blood Rev.* 1993;7(3):137-45.
- Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, Pegelow CH, Vichinsky E. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood.* 1995;86(2):776-83. Comment in: *Blood.* 1995;86(11):4382.
- Neonato MG, Guilloud-Bataille M, Beauvais P, Bégué P, Belloy M, Benkerrou M, Ducrocq R, Maier-Redelsperger M, de Montalembert M, Quinet B, Elion J, Feingold J, Girot R. Acute clinical events in 299 homozygous sickle cell patients living in France. French Study Group on Sickle Cell Disease. *Eur J Haematol.* 2000;65(3):155-64.
- Fleury, MK. Determinação dos haplótipos do grupamento do gene da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro [tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2000. 82p.
- Quinn CT, Rogers ZR, Buchanan GR. Survival of children with sickle cell disease. *Blood.* 2004;103(11):4023-7.
- Telfer P, Coen P, Chakravorty S, Wilkey O, Evans J, Newell H, et al. Clinical outcomes in children with sickle cell disease living in England: a neonatal cohort in East London. *Hematologica.* 2007;92(7):905-12. Comment in: *Haematologica.* 2007;92(7):865-71.
- Bruniera P. [Splenic sequestration crisis in sickle cell disease]. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):259-61. Portuguese.
- Stevens MC, Hayes RJ, Vaidya S, Serjeant GR. Fetal hemoglobin and clinical severity of homozygous sickle cell disease in early childhood. *J Pediatr.* 1981;98(1):37-41.
- Brozovic M, Davies SC, Brownell AI. Acute admissions of patients with sickle cell disease who live in Britain. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1987;294(9):1206-8.
- Kehinde MO, Marsh JC, Marsh GW. Sickle cell disease in North London. *Br J Haematol.* 1987;66(4):543-7.
- Bainbridge R, Higgs DR, Maude GH, Serjeant GR. Clinical presentation of homozygous sickle cell disease. *J Pediatr.* 1985;106(6):881-5.
- Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B. Acute chest syndrome in sickle cell disease: clinical presentation and course. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood.* 1997;89(5):1787-92.
- Bailey K, Morris JS, Thomas P, Serjeant GR. Fetal haemoglobin and early manifestations of homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child.* 1992;67(4):517-20.
- Klein HS. As origens africanas dos escravos brasileiros. In: Pena SD, editor. *Homo brasilis. Aspectos genéticos, linguísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro.* Ribeirão Preto: FUNPEC; 2002. p.93-112.
- Hünemeier T, Carvalho C, Marrero AR, Salzano FM, Junho Pena SD, Bortolini MC. Niger-Congo speaking populations and the formation of the Brazilian gene pool: mtDNA and Y-chromosome data. *Am J Phys Anthropol.* 2007;133(2):854-67.
- Chang YC, Smith KD, Moore RD, Serjeant GR, Dover GJ. An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, beta-globin haplotypes, alpha-globin gene number, gender, and age. *Blood.* 1995;85(4):1111-7.
- Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2005;129(4):465-81.
- Gonçalves MS, Bomfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A, et al.  $\alpha$ s-Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(10):1283-8.
- Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, Costa FF. High prevalence of  $\alpha$ -thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin.* 1991;15(4):309-11.
- Borges E, Wenning MR, Kimura EM, Gervásio SA, Costa FF, Sonati MF. High prevalence of  $\alpha$ -thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34(6):759-62.
- Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Hayes RJ, et al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle cell disease. *N Engl J Med.* 1982;306:1441-6.
- Embury SH, Dozy AM, Miller J, Davis JR Jr, Kleman KM, Preisler H, et al. Concurrent sickle-cell anemia and alpha-thalassemia: effect on severity of anemia. *N Engl J Med.* 1982;306(5):270-4.
- Steinberg MH, Rosenstock W, Coleman MB, Adams JG, Platica O, Cedeno M, et al. Effects of thalassemia and microcytosis on the hematologic and vasoocclusive severity of sickle cell anemia. *Blood.* 1984;63(6):1353-60.
- Stevens MC, Maude GH, Beckford M, Grandison Y, Mason K, Taylor B, et al. Alpha thalassemia and hematology of homozygous sickle cell disease in childhood. *Blood.* 1986;67(2):411-4.
- Lima JC. Interação de anemia falciforme e alfa talassemia. Aspectos moleculares, clínicos, hematológicos e bioquímicos – Um estudo na população brasileira [tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1997. 170p.