



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFBA

FIOCRUZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DE MARCADORES DE PROGNÓSTICO EM CRIANÇAS
COM DOENÇA FALCIFORME E SUA ASSOCIAÇÃO COM
COLONIZAÇÃO DE NASOFARINGE E OROFARINGE**

LARISSA CARNEIRO ROCHA

Salvador-Bahia-Brasil

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

**ESTUDO DE MARCADORES DE PROGNÓSTICO EM CRIANÇAS COM
DOENÇA FALCIFORME E SUA ASSOCIAÇÃO COM COLONIZAÇÃO
DE NASOFARINGE E OROFARINGE**

LARISSA CARNEIRO ROCHA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilda de Souza Gonçalves

**Tese de Dissertação de Mestrado apresentada
ao colegiado do programa de Patologia
para obtenção do título de Mestre em
Patologia Experimental.**

Salvador-Bahia-Brasil

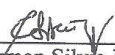
2011

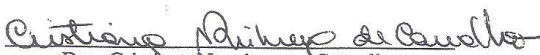
“Estudo de marcadores de prognóstico em crianças com doença falciforme colonizadas na nasofaringe e orofaringe.”

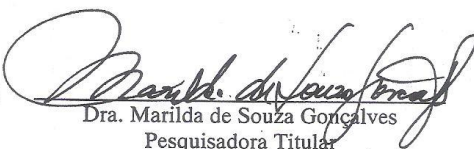
LARISSA CARNEIRO ROCHA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA


Dra. Carmen Silva Bertuzzo
Professora
UNICAMP


Dra. Cristiana Nascimento Carvalho
Professora Associada
UFBA


Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisadora Titular
CPqGM/FIOCRUZ

Vitória

**Vencer os outros
não chega a ser
uma grande vitória.**

**Vitorioso
é aquele que consegue
vencer a si mesmo
combatendo seus vícios
e controlando suas paixões.
A vitória sobre nós mesmos
é muito mais difícil.**

**Ela requer mais coragem
mais disciplina e mais decisão.**

**Se você
não conseguir na primeira vez
tente de novo.**

**O simples fato de tentar de novo
já será sua primeira vitória.**

(Autor desconhecido)

“AGRADECIMENTOS”

A Deus pela presença constante em minha vida, e por dar-me força e perseverança para não fraquejar frente aos obstáculos.

A minha família, razão maior da minha vida.

A minha orientadora, Dra Marilda de Souza Gonçalves, pela confiança, paciência, e sabedoria.

A Magda e Joelma, parceiras no desenvolvimento do projeto, e palavras de carinho.

Aos colegas de Mestrado pelos agradáveis momentos compartilhados e amizades construídas.

Aos funcionários da HEMOBA pelo carinho e auxílio nas coletas.

A todos aqueles que estiveram ao meu lado e acreditaram que este dia (defesa) iria chegar.

A cada uma das crianças pelo sorriso de esperança, por acreditarem em mim.

RESUMO

ESTUDO DE MARCADORES DE PROGNÓSTICO EM CRIANÇAS COM DOENÇA FALCIFORME E SUA ASSOCIAÇÃO COM COLONIZAÇÃO DE NASOFARINGE E OROFARINGE. **LARISSA CARNEIRO ROCHA**

A doença falciforme (DF) possui prevalência mundial elevada e manifestação clinicamente variável, sendo que as infecções constituem risco elevado e causa de óbito nas crianças diagnosticadas com anemia falciforme (HbSS). A colonização da nasofaringe pode ser fator importante para a ocorrência de doença local ou sistêmica. O *Streptococcus pneumoniae* é um patógeno de importância epidemiológica mundial e causador de infecções entre os pacientes com DF. A prevalência da colonização pelo pneumococo em nasofaringe varia de acordo com a população estudada e condições ambientais. O *Staphylococcus aureus* também pode colonizar a nasofaringe, além de causar infecção de pele e tecidos moles, pneumonia, septicemia e infecções ósteo-articulares. Diferentes biomarcadores têm sido associados à modulação clínica na DF e eles são comumente associados à hemólise e inflamação. O presente estudo teve como objetivo estabelecer o perfil de biomarcadores em indivíduos com DF associando-os ao perfil de colonização nasofaríngea e orofaríngea, com ênfase para os marcadores de infecção e hemólise que possam estar associados ao prognóstico clínico da doença. As análises bioquímicas foram realizadas para a avaliação do perfil lipídico, hepático, inflamatório e hemolítico; marcadores clássicos de biologia molecular, como a talassemia α , os haplótipos ligados aos genes da globina beta e os polimorfismos no gene da *mieloperoxidase* foram também investigados. Desta forma, foi desenvolvido um estudo de corte transversal, com casuística composta por 154 pacientes com DF em idade pediátrica e em estado estável da doença, sendo 68,2% (105/154) HbSS e 31,8% (49/154) com doença SC (HbSC), todos provenientes do estado da Bahia. As crianças HbSS apresentaram diferenças significativas na grande maioria das variáveis laboratoriais analisadas e associadas ao metabolismo lipídico, renal, hepático e à hemólise e inflamação, quando comparadas ao grupo HbSC e ao controle saudável. A colonização em nasofaringe/orofaringe pelo *S. pneumoniae* esteve presente em 14 (9,6%) pacientes e pelo *S. aureus* em 81 (56,6%) pacientes. Quanto ao perfil de sensibilidade dos isolados de pneumococos da população estudada, não foi observado o aumento da resistência pneumocócica à penicilina. A avaliação de modelos de análise multivariada demonstrou que a presença de colonização nasofaríngea e orofaríngea esteve associada à ocorrência de infecção juntamente com a contagem de leucócitos, sendo que o genótipo exibido pelo paciente foi fator de risco para a ocorrência de pneumonia. Os mesmos modelos apontaram o envolvimento dos polimorfonucleares neutrófilos na ocorrência de vaso-oclusão. Os resultados demonstram que os pacientes colonizados em nasofaringe pelo *S. pneumoniae* e pelo *S. aureus* apresentaram elevação dos valores de HCM, VCM, AST, ALT e Ferritina; investigações rotineiras de biomarcadores clássicos associados ao estudo da colonização de nasofaringe e orofaringe podem ter papel importante no acompanhamento da evolução clínica de indivíduos com DF, uma vez que os achados significativos sugerem que a presença de colonização tem papel importante na modulação dos eventos hemolítico, inflamatório e infeccioso presentes na doença.

Palavras-chaves: Doença falciforme, colonização da orofaringe e nasofaringe, Biomarcadores, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, infecção e vaso-oclusão

ABSTRACT

STUDY OF PROGNOSTIC MARKERS IN CHILDREN WITH SICKLE CELL DISEASE AND ITS ASSOCIATION WITH COLONIZATION OF NASOPHARYNGEAL AND OROPHARYNGEAL. **LARISSA CARNEIRO ROCHA.**

The sickle cell disease (SCD) has a high prevalence worldwide and a variable clinical manifestation and infections are considered an event of high risk and cause of death in children diagnosed with sickle cell anemia (HbSS). The colonization of nasopharynx and oropharynx can be an important factor for the occurrence of local or systemic disease. The *Streptococcus pneumoniae* is a pathogen of epidemiological importance worldwide and cause of infection among SCD patients. The *Staphylococcus aureus* may also colonize the nasopharynx and may be cause of infection of skin and soft tissue infections, pneumonia, sepsis and osteo-articular infections. Different biomarkers have been associated with clinical modulation in SCD and they are commonly associated with hemolysis and inflammation. This study aimed to establish a profile of biomarkers in individuals with SCD in association with the profile of oropharyngeal and nasopharyngeal colonization, with emphasis on infection and hemolysis markers that may be associated with clinical prognosis. Biochemical analysis were performed to evaluate the lipid profile, liver, hemolytic and inflammatory markers and classical molecular biology, such as α -thalassemia, the haplotypes linked to the beta globin genes and polymorphisms in the *myeloperoxidase* gene were also investigated. Thus, it was developed a cross-sectional study and the casuistic was composed of 154 children with SCD in a steady-state, with 68.2% (105/154) HbSS and 31.8% (49/154) with SC disease (HbSC), all from the state of Bahia. HbSS children showed significant differences in almost every mean values analyzed for variables associated with lipid metabolism, kidney, liver and hemolysis and inflammation when compared to HbSC and control group. In the present study there was colonization in the nasopharynx / oropharynx by *S. pneumoniae* in 14 (9.6%) patients and by *S. aureus* in 81 (56.6%) patients. The profile of sensitivity of pneumococcal isolated from the studied population did not show an increase in pneumococcal resistance to penicillin. The evaluation of models of multivariate analysis showed that the presence of oropharyngeal and nasopharyngeal colonization was associated with the occurrence of infection and white blood cell count, and the patient genotype was a risk factor for the occurrence of pneumonia. The same models indicated the involvement of polymorphonuclear neutrophils in the occurrence of vaso-occlusion. The results presented in this study demonstrate that patients colonized in the nasopharynx by *S. pneumoniae* and *S. aureus* have elevated values of MCH, MCV, AST, ALT and ferritin, suggesting that a routine investigation of biomarkers associated with the classic study of the colonization of the nasopharynx and oropharynx may play a role in monitoring the clinical course of patients with SCD, once that significant findings described here suggest that the presence of colonization plays an important role in modulation of hemolytic events, inflammatory state, and infectious presented by patients.

Keywords: Sickle cell disease, colonization of oropharynx and nasopharynx, Biomarkers, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, infection and vascular occlusion.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** - Demonstração gráfica da análise de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com DF com valores de ferritina maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (320,16ng/mL). A e B: análises com variáveis hematológicas e em C: análises com variáveis bioquímicas e de HbF **45**
- Figura 02** - Demonstração gráfica da análise de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com DF com valores de desidrogenase láctica maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (856,41 U/L). A, B e C: análises com variáveis hematológicas.....**47**
- Figura 03** - Demonstração gráfica da análise de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com DF com valores de desidrogenase láctica maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (856,41 U/L). A: análises do número de reticulócitos e colesterol HDL e em B,C e D com outras variáveis bioquímicas.....**48**
- Figura 04** - Demonstração gráfica da análise de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com DF com valores de ferro (122,27 mcg/dL) e de valores de ASLO maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (191 UI/mL). A e B: análises com variáveis valores de ferro e variáveis hematológicas e bioquímicas e em C: análise de ASLO e proteínas totais.....**50**
- Figura 05** - Em A, B e C: Representação gráfica da análise dos valores médios das variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com doença falciforme na presença dos genótipos selvagem e mutante para a talassemia alfa 3,7Kb, no gene da *Mieloperoxidase (MPO)* e na presença dos haplótipos CAR e Benin.....**52**
- Figura 06** - Em A, B e C. Representação gráfica da análise do histórico de internações e sua associação com os valores médios de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.....**56**
- Figura 07** - Em A, B e C. Representação gráfica da análise do histórico de pneumonia e sua associação com os valores médios de variáveis hematológicas em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.....**57**

- Figura 08** - Em A e B: Representação gráfica da análise do histórico de pneumonia e sua associação com os valores médios de variáveis hematológicas e bioquímicas (ferritina). Em C: Análise do histórico de vaso-oclusão e segmentados neutrófilos e de esplenomegalia e PCR em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.....**58**
- Figura 09** - Em A, B e B: Representação gráfica da análise do histórico de AVC com as concentrações de ferritina e do histórico de litíase biliar com as concentrações de colesterol total, colesterol VLDL, triglicérides, ferritina e ASLO em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.....**59**
- Figura 10** - Em A e B. Representação gráfica da análise da colonização da orofaringe pela microbiota normal, pelo *Staphylococcus aureus* e pelo *Streptococcus pneumoniae* e sua associação com valores de ferritina (ng/mL). ANOVA e Kruskal-Wallis.....**64**
- Figura 11** - Em A, B e C. Representação gráfica da análise da colonização da nasofaringe pela microbiota normal, pelo *Staphylococcus aureus* e pelo *Streptococcus pneumoniae* e sua associação com variáveis bioquímicas. ANOVA e KruskalWallis.....**65**
- Figura 12** - Em A e B. Representação gráfica da análise da colonização da nasofaringe pela microbiota normal, pelo *Staphylococcus aureus* e pelo *Streptococcus pneumoniae* e sua associação com variáveis hematológicas. ANOVA e Kruskal-Wallis.....**66**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Distribuição das variáveis associadas ao metabolismo lipídico, renal, hepático e à hemólise e inflamação em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.....	41
Tabela 02 - Análise dos valores médios apresentados pelas variáveis associadas ao metabolismo lipídico, renal, hepático e à hemólise e inflamação em pacientes com anemia falciforme e doença SC de Salvador-Bahia.....	42
Tabela 03 - Análise dos valores médios apresentados pelas variáveis hematológicas e bioquímicas na presença de valores de ferritina maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (320,16ng/mL) em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.....	44
Tabela 04 - Análise dos valores médios apresentados pelas variáveis hematológicas e bioquímicas na presença de valores de desidrogenase láctica maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (856,41 U/L) em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.....	46
Tabela 05 - Análise dos valores médios apresentados pelas variáveis hematológicas e bioquímicas na presença de valores de ferro maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (122,27 mcg/dL) e de valores de ASLO maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (191 UI/mL) em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.....	49
Tabela 06 - Análise dos valores médios das variáveis hematológicas e bioquímicas na presença dos genótipos selvagem e mutante para a talassemia alfa 3,7Kb, no gene da <i>Mieloperoxidase</i> (<i>MPO</i>) e na presença dos haplótipos CAR e Benin em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.....	51
Tabela 07 - Características clínicas apresentadas pelos pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.....	54
Tabela 08 - Análise das principais características clínicas e sua associação com os valores médios de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.....	55
Tabela 09 - Perfil de microorganismos encontrados na análise das secreções de nasofaringe e orofaringe dos pacientes com doença falciforme.....	60

Tabela 10 - Perfil de antibiograma e sorotipos encontrados nas amostras de secreção de nasofaringe e orofaringe colonizadas pelo <i>Streptococcus pneumoniae</i> nos pacientes com doença falciforme.....	61
Tabela 11 - Modelos de análise multivariada no grupo de pacientes com doença falciforme com a inclusão de infecção como variável dependente.....	68
Tabela 12 - Continuação da tabela 11.....	69
Tabela 13 - Modelos de análise multivariada no grupo de pacientes com doença falciforme com a inclusão de pneumonia como variável dependente.....	70
Tabela 14 - Tabela 14. Modelos de análise multivariada em pacientes com doença falciforme com a inclusão de vaso-oclusão como variável dependente.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Genótipo homozigoto para a hemoglobina normal do adulto
A1AT	Alfa 1 Antitripsina
AC	Heterozigoto para hemoglobina C
AF	Anemia falciforme (<i>SCA – Sickle cell anemia</i>)
ALT	Alanina aminotransferase
APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
AS	Heterozigoto para hemoglobina S
ASLO	Anti-estreptolisina O
AST	Aspartato aminotransferase
AVC	Acidente vascular cerebral
BA	Bahia
Bil D	Bilirrubina Direta
Bil I	Bilirrubina Indireta
Bil Tot	Bilirrubina Total
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
Col HDL	Colesterol - Lipoproteína de alta densidade (<i>High density lipoprotein</i>)
Col LDL	Colesterol - Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low density lipoprotein</i>)
Col Tot	Colesterol Total
Col VLDL	Colesterol - Lipoproteína de muito baixa densidade (<i>Very low density lipoprotein</i>)
DF	Doença falciforme (<i>SCD – Sickle cell disease</i>)
EDTA	Acido etilenodiamino tetra-acético
Hb	Hemoglobina
HbA1	Hemoglobina 1 do adulto
HbA2	Hemoglobina 2 do adulto
HbC	Hemoglobina C
HbD	Hemoglobina D
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S

HCM	Hemoglobina corpuscular média
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
Hm	Hemácias
Ht	Hematócrito
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho (<i>High performance liquid chromatography</i>)
IC	Intervalo de confiança
ICAM	Molécula de adesão intracelular
K+	Ion potássio
Kb	Kilobases
LDH	Desidrogenase láctica
Leuco	Leucócitos
Mono	Monócitos
MPO	Mieloperoxidase
NO	Oxido nítrico
PHHF	Persistência hereditária de hemoglobina fetal
PCR	Reação da polimerase em cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCRe	Proteína C reativa
Plaq	Plaquetas
PT	Proteínas Totais
Ret	Reticulócitos
RPFL	Restrição de polimorfismo por endonuclease de restrição (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)
SC	Heterozigoto duplo para hemoglobinas S e C
SD	Heterozigoto duplo para hemoglobinas S e D
SE	Seqüestro Esplênico
Segm	Segmentado Neutrófilo
SS	Homozigoto para a hemoglobina S
STA	Síndrome Torácica Aguda
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Triglic.	Triglicérides
VCAM	Molécula de adesão a célula vascular

VCM Volume corpuscular médio
VR Valor de referência

LISTA DE SÍMBOLOS

α : Alfa

β : Beta

δ : Delta

ϵ : Epsilon

γ : Gama

χ^2 : Quiquadrado (*chi square*)

ξ : Zeta

SUMÁRIO (ÍNDICE)

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
LISTA DE SÍMBOLOS.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. A HEMOGLOBINA S.....	18
1.2. DOENÇA FALCIFORME.....	18
1.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	19
1.4. INFECÇÕES E DOENÇA FALCIFORME.....	19
1.5 PNEUMOCOCO.....	21
1.6 VACINA ANTI-PNEUMOCOCO.....	23
1.7 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DO <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	24
1.8 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	24
1.9. FATORES MODULADORES DA DOENÇA FALCIFORME.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. OBJETIVO GERAL.....	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	32
4.1. CASUÍSTICA.....	32
4.2. MÉTODOS.....	32
4.2.1.COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	34
4.2.2.ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E DE HEMOGLOBINAS	34
4.2.3.ANÁLISES BIOQUÍMICAS	34
4.2.4.ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	34
4.2.5.ANALISE MOLECULAR.....	35
4.2.6.DETERMINAÇÃO DE TALASSEMIA ALFA.....	36

4.2.7.DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS LIGADOS AOS GENES DA GLOBINA BETA.....	36
4.2.8. DETERMINAÇÃO DA MUTAÇÃO -463G NO GENE DA MIELOPEROXIDASE.....	37
5. ANALISE ESTATISTICA.....	38
6. RESULTADOS.....	39
7. DISCUSSÃO.....	72
8.CONCLUSÕES.....	81
9. PERSPECTIVAS.....	83
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
11. APÊNDICE.....	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hemoglobina S

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 5% da população mundial apresenta alteração em genes associados diretamente à ocorrência de distúrbios da hemoglobina (WHEATHERALL *et al.*, 1989).

A hemoglobina S (HbS) é a mais prevalente e, conseqüentemente, a mais importante das variantes estruturais da hemoglobina A (HbA) e está presente em populações de diferentes regiões geográficas (SERJEANT, 1981; ZAGO, 2002). A hemoglobina S é uma hemoglobina variante resultante da mutação pontual $GAG > GTG$ no sexto códon do gene beta (*HBB*) da globina, que leva a substituição do ácido glutâmico pela valina na cadeia polipeptídica beta (STEINBERG, 2001). Essa mutação é resultado da evolução de seleção positiva em humanos, pois indivíduos com uma cópia do *beta S* (β^S) e alelo β normal, ou seja, indivíduos heterozigotos ou AS apresentam vantagem relacionada à sobrevivência em regiões endêmicas da malária (SAUNTHARARAJAH & VICHINSKY, 2008).

A hemoglobina S é encontrada principalmente na África Equatorial, bem como na Arábia Saudita, regiões do Mediterrâneo e nas Américas (SERJEANT, 1997). A frequência elevada da HbS nas Américas e, particularmente, no Brasil, deve-se ao processo de colonização relacionado ao tráfico de escravos (ZAGO, 2002).

1.2. Doença falciforme

A doença falciforme (DF) refere-se a um grupo de desordens genéticas de herança autossômica recessiva caracterizado pela presença da hemoglobina S (HbS) (NATHAN & OSKITS, 1998; GLADWIN & VICHINSKY, 2008).

A denominação anemia falciforme (HbSS) refere-se à forma homocigótica da doença; além disso, o alelo β^S pode existir em associação com outras anormalidades hereditárias da hemoglobina, como a hemoglobina C (HbC), hemoglobina D (HbD), beta talassemia (β^{tal}), gerando as hemoglobinopatias HbSC, HbSD, HbS β^{tal} , respectivamente.

No conjunto, todas essas formas heterozigóticas duplas são classificadas como DF, uma vez que possuem a HbS e apresentam quadro clínico semelhante ao encontrado na HbSS (ZAGO, 2002; QUINN *et al.*, 2004).

A doença falciforme apresenta grande importância epidemiológica devido a sua prevalência e morbimortalidade mundialmente elevadas (NATHAN & OSKITS, 1998; QUINN *et al.*, 2004). No Brasil, país onde o alelo *beta S* (β^S) está distribuído de forma heterogênea, estima-se o nascimento de 700 a 1000 casos novos de DF/ano, sendo que a região nordeste é a que apresenta a incidência brasileira mais elevada, uma vez que a população possui miscigenação racial elevada, com predomínio da raça negra. Dessa forma, estima-se a existência de mais de 2 milhões de portadores do alelo β^S e mais de 8.000 homozigotos, o que torna a DF um problema de saúde pública no Brasil (ZAGO, 2002).

A hemoglobina S polimeriza quando presente em concentrações elevadas no interior das hemácias e em condições de concentrações baixas de oxigênio (STEINBERG *et al.*, 2001). A polimerização da HbS contribui para a ocorrência de alterações na morfologia dos eritrócitos, onde a forma habitualmente bicôncava é substituída pela forma alongada, semelhante a uma foice, devido à presença de fibras de HbS, acompanhada por perda de água e cátions (BUNN & FORGET, 1986; SERJEANT, 1992; STEINBERG *et al.*, 2001). A falcização das hemácias é um fenômeno reversível após nova oxigenação. No entanto, após episódios repetidos de falcização, a hemácia torna-se irreversivelmente falcizada (STEINBERG *et al.*, 2001). O processo de falcização do glóbulo vermelho resulta em hemólise, rigidez celular e adesão aumentada da hemácia ao endotélio vascular, com ativação da cascata de coagulação e desencadeamento de reação inflamatória (PLATT *et al.*, 1994).

1.3 - Manifestações clínicas

As principais manifestações clínicas da DF são anemia hemolítica crônica, episódios dolorosos recorrentes, e lesão crônica de órgãos e tecidos (SAUNTHARARAJAH & VICHINSKY, 2008). No entanto, infecções, sequestro esplênico, acidente vascular cerebral (AVC) e Síndrome Torácica Aguda (STA) são causas importantes de morbimortalidade em qualquer faixa etária. (NATHAN & OSKITS, 1998; POWARS *et al.*, 2005).

Os indivíduos com DF apresentam espectro amplo de variabilidade clínica, o que corresponde a quadros clínicos que variam de leves, intermediários a graves. Apesar do fenômeno de falcização eritrocitária ser um dos principais aspectos fisiopatológicos da DF, outros fenômenos, geralmente condicionados ao efeito epistático de outros genes, desempenham papel importante no aparecimento das manifestações clínicas presentes na doença (FABRY & KAUL, 1991; NAGEL, 1991), sendo que fatores ambientais podem também ter papel fundamental na expressão fenotípica da DF (BRAGA, 2002).

Atualmente, sabe-se que a gênese do episódio vasclusivo é decorrente não apenas da alteração morfológica eritrocitária, mas de um conjunto de fatores cientificamente comprovados, tais como o aumento da agregação plaquetária, aumento do número e da ativação de leucócitos, de plaquetas e de células endoteliais, bem como da liberação de fatores plasmáticos que apresentam uma ativação em cascata contribuem para (EMBURY *et al.*, 1994).

1.4. Infecções e Doença Falciforme

As infecções constituem o risco imediato e a causa principal de óbito nas crianças diagnosticadas com HbSS (WILLIAMS *et al.*, 2009). Isso ocorre devido à atividade de opsonização diminuída (ZARKOWSKY, 1986; ASHLEY-KOCH *et al.*, 2000; STEINBERG, 2001; COSTA *et al.*, 2005;) e ao desenvolvimento da asplenia funcional (PEARSON *et al.*, 1985). Essa alteração promove o comprometimento imunológico, permitindo que os pacientes com DF fiquem mais susceptíveis a adquirir infecções, principalmente bacterianas, por microorganismos encapsulados, como o *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* e *Haemophilus* (GILL *et al.*, 1995; WRIGHT *et al.*, 1997; SAUNTHARARAJAH & VICHINSKY, 2008). Dentre as infecções causadas por germes não capsulados que acometem os pacientes com DF, e que são relacionadas ao *Mycoplasma pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* também devem ser consideradas (GILL *et al.*, 1995).

A resposta imune comprometida no paciente com AF torna obrigatória a utilização de estratégias preventivas para diminuir o risco de infecção. A extensão do calendário vacinal deve incluir a imunização contra o pneumococo (conjugada 10-valente em associação com a polissacarídica 23-valente), vacinação anual contra Influenza, e contra o

meningococo (MEHTA, 2006). O uso profilático da penicilina, principalmente nos primeiros 5 anos de vida também é essencial na redução da incidência de infecções e mortalidade associada à septicemia (GASTON, 1986; MEHTA, 2006).

1.5 - Pneumococo

O *Streptococcus pneumoniae* ou ‘pneumococo’ é uma bactéria gram positiva, capsulada (WHO, 2007), que habita a mucosa do trato respiratório superior do homem, coexistindo com a microbiota normal, estabelecendo um estado de colonização assintomática (AUSTRIAN, 1986; FERREIRA *et al.*, 2001; CARDOZO, 2006). É um patógeno de importância epidemiológica mundial na distribuição das doenças invasivas (pneumonias bacterêmicas, meningite, sepsis e artrite) e não-invasivas (sinusite, otite média aguda, conjuntivite, bronquite e pneumonia) (LIÑARES, 2010; WHO, 2010).

Os pneumococos colonizam o nariz e faringe, particularmente em crianças pequenas, e são facilmente transmitidos, geralmente por meio de gotículas de secreções. (O’BIEN, 2003; CARDOZO, 2006). A aquisição do pneumococo da nasofaringe ocorre cedo na vida, e a doença invasiva é mais provável de ocorrer logo após a colonização (GRAY, 1980; FERREIRA, 2001). Dessa maneira, a colonização do trato respiratório superior pode ser um fator importante para a ocorrência de doença local ou sistêmica (FERREIRA *et al.*, 2001).

Estudos que avaliam a prevalência da colonização do pneumococo em nasofaringe demonstram que diversos fatores podem exercer influência para a sua presença, a exemplo da idade, população estudada, área geográfica e condições ambientais (DAGAN *et al.*, 1998; FERREIRA *et al.*, 2001).

Estudos realizados por Kournhof e colaboradores (1992) na África do Sul, Mastro e colaboradores (1993) no Paquistão, e Kellner e colaboradores (1998) no Canadá têm confirmado que a colonização nasofaríngea pelo *S. pneumoniae*, em crianças pequenas, pode refletir a distribuição de sorotipos, o perfil e a tendência de sensibilidade antimicrobiana da bactéria proveniente de doença invasiva (FERREIRA *et al.*, 2001).

O Instituto Adolfo Lutz- IAL, referência nacional do Sistema Regional de Vacinas (SIREVA-VIGIA) compõe a rede de vigilância laboratorial do *S. pneumoniae* para os países da América Latina. No período de 2000 a 2008, o IAL analisou 4.376 cepas de pneumococo, sendo 62% isolada de pacientes com meningite, 28% de pacientes com pneumonia e 2% de pacientes com bacteremia. Os sorotipos mais freqüentemente identificados foram: o 14 (27,9%); 6B (9,7%); 19F (5,4%); 23F (5,4%); 18C (5,1%); 6A (4,3%); 1 (3,8%); 3 (4,5%); 5 (3,5%); 19A (3,3%); 9V (3,2%); 4 (2,8%); 7F(2,1%); e outros (19,1%) (Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, 2010).

No Brasil, no período de 1977 a 2000, os sorotipos 1, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F foram identificados, sendo os mais freqüentes associados às doenças invasivas,. Das cepas isoladas 76,5% foram encontradas em crianças menores de 5 anos de idade com meningite (BRANDILEONE, 2003).

Barret-Connor (1971) constatou que crianças com doença falciforme apresentam risco aumentado de desenvolver doença invasiva por germes encapsulados, particularmente o *S.pneumoniae*. O risco relativo da freqüência de meningite bacteriana foi 300 vezes maior na DF ao se comparar à população geral, principalmente em crianças menores de 3 anos de idade.

As infecções causadas pelo *Streptococcus pneumoniae* são significantes e associadas a morbidade e mortalidade descritas em crianças com DF, atingindo aproximadamente 25% de todos os óbitos (GASTON *et al.*, 1986). Power e colaboradores (1981) observaram tendência à septicemia para meningite e óbito em crianças com AF não imunizadas e sem uso de penicilina profilática.

Diversos estudos confirmam a relação entre a colonização nasofaríngea e o risco de se desenvolver infecção invasiva pelo *Streptococcus pneumoniae*. Nos EUA, estudos realizados por Zenni e colaboradores (1995) observaram a taxa de colonização de 44% em crianças de até 6 anos de idade, chegando a 80% (BOKEN, 1996) em crianças que freqüentam creches. Ferreira e colaboradores (2001) identificaram a taxa de colonização de 30-50% em crianças brasileiras. No entanto, existem poucos estudos avaliando a porcentagem de colonização de nasofaringe em crianças com DF. Esses resultados não podem ser extrapolados para populações diferentes, por peculiaridades específicas de cada

grupo estudado (ANGLIN, 1984; NORRIS, 1996; BLUM, 2005). Blum e colaboradores (2005) avaliaram 98 crianças com DF provenientes do estado de São Paulo - Brasil e observaram que o pneumococo foi isolado da nasofaringe de 13,3% crianças avaliadas. No entanto, não existem outros estudos brasileiros que avaliem a colonização nasofaríngea/orofaríngea em crianças com DF, apesar de vários estudos terem associado a presença de colonização bacteriana em crianças brasileiras. Nos Estados Unidos (EUA) a taxa de colonização nasofaríngea nesses pacientes varia de 5 a 17% (ANGLIN, 1984).

1.6 – Vacinas anti-pneumocócica

Muitas proteínas pneumocócicas diferentes têm sido implicadas na colonização (revisado por Weiser, 2004), embora o papel do polissacarídeo capsular (CPS) ainda seja controverso (DOMENECH, 2009). A cápsula polissacarídica é uma estrutura muito variável, e suas diferenças químicas e antigênicas permitem subdividir esta bactéria em mais de 90 sorotipos imunologicamente distintos. No entanto, estima-se que em torno de 11 sorotipos sejam responsáveis por 75% das infecções pneumocócicas em todo o mundo, sendo a maioria colonizante (DOMENECH, 2009). São estes sorotipos que definem a composição das vacinas existentes nos diversos países onde ela é utilizada (WHO, 2007). As vacinas polissacárides capsulares pneumocócicas estão licenciadas no mundo desde 1977 (Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, 2010). A vacina anti-pneumocócica polissacarídica composta de 23 sorotipos foi produto de isolados em adultos dos Estados Unidos e Europa (HAUSDORFF, 2000). Esta vacina foi eficaz contra doença pneumocócica bacterêmica em adultos (SISK *et al.*, 1997), no entanto, parece não produzir imunogenicidade suficiente em crianças menores (KLEIN, 1989; WHO, 2007). No Brasil, a vacina pneumocócica 23-valente foi incorporada pelo Programa Nacional de Imunizações no ano de 1992 e está disponível nos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIE) para grupos com quadros clínicos específicos, dentre eles, a DF (Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, 2010).

A vacina contendo 7 sorotipos (4, 14, 6B, 9V, 23F, 18C, 19F) conjugados com mutante da proteína do bacilo diftérico CRM197 mostrou, em estudos populacionais, boa imunogenicidade e proteção contra infecções invasivas pneumocócicas na infância

(BLACK *et al.*, 2000), sendo incorporada pelo Ministério da Saúde em 2001, também para grupos com condições clínicas especiais nos CRIE.

Atualmente, recomenda-se a utilização da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada). Ela contém todos os sorotipos presentes na VPC-7 mais os sorotipos 1, 5, e 7F. É uma vacina conjugada de polissacarídeos pneumocócicos que conjugada com a proteína D de *Haemophilus influenzae* para oito de seus sorotipos (1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F) e carreadores de toxóide diftérico (DT) para o sorotipo 19F e de toxóide tetânico (TT ou T) para o sorotipo 18C (Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, 2010). No Brasil, essa última foi incorporada a partir do ano 2010 no Calendário Básico de Vacinação da Criança, para imunizar crianças a partir dos 02 meses de idade, sendo disponibilizada na rotina de vacinação em todo país.

1.7 – Resistência antimicrobiana do *Streptococcus pneumoniae*

A resistência à penicilina pelo *Streptococcus pneumoniae* tem se tornado cada vez mais freqüente na população geral, e tem sido um problema em todo o mundo (DENNO, 2002).

Os estudos realizados com a finalidade de avaliar a resistência do pneumococo à penicilina em crianças com DF em uso regular de penicilina apresentaram resultados controversos. Anglin e colaboradores (1984) descreveram 2,9% de resistência intermediária em cepas isoladas da nasofaringe; Norris e colaboradores (1996) obtiveram 33% de resistência à penicilina, sendo que 36% dessas cepas apresentaram resistência elevada. Em ambos os estudos, não se observou aumento na resistência associada ao uso da penicilina. Blum e colaboradores (2005) descreveram a resistência intermediária em 35,7% entre os indivíduos investigados; no entanto, não foi observada nenhuma cepa com resistência plena à penicilina.

1.8 -*Staphylococcus aureus*

Infecções pelo *Staphylococcus aureus* têm apresentado crescimento clínico e representam um problema de saúde pública nos EUA. (FRIDKIN *et al.*, 2005; KUEHN *et al.*, 2006; GORWITZ *et al.*, 2008). A presença de microorganismos multi-resistentes tem sido relatada, na etiologia de infecções em diversos países, inclusive no Brasil (Fortaleza et

al., 2009) *S. aureus* pode causar infecção de pele e tecidos moles, pneumonia, septicemia e infecções ósteo-articulares tanto em crianças como em adultos (MORAN *et al.*, 2005; GONZALEZ *et al.*, 2005). Um grande problema tem sido o crescimento de infecções causadas pelo *S. aureus* meticilino-resistentes, provenientes da comunidade, em criança e adultos saudáveis (FRIDKIN *et al.*, 2005).

Fatores do hospedeiro ou bacteriano podem aumentar o risco de infecção no indivíduo colonizado, uma vez que um número elevado de pessoas colonizadas tornam-se infectadas (ELLIS *et al.*, 2004).

A identificação e isolamento de indivíduos infectados pelo *S. aureus* meticilino-resistentes, mesmo quando assintomáticos, contribuem para a redução da circulação deste patógeno. Uma prática comum utilizada para identificar indivíduos colonizados é a realização de culturas periódicas de secreção de nasofaringe utilizando swabs (McGinagle *et al.*, 2008).

1.9. Fatores Moduladores da Doença Falciforme

A interação de diferentes marcadores pode contribuir para que os pacientes com DF apresentem heterogeneidade clínica. Desta forma, inúmeros aspectos têm sido associados a esta variação clínica que experimentam estes pacientes, mesmo em alguns de uma mesma família. Entre a mais variada gama de fatores, têm sido constantemente referidos os hematológicos, bioquímicos, genéticos, ambientais e socioeconômicos (ADORNO *et al.*, 2008).

Entre os marcadores hematológicos classicamente associados à modulação clínica da DF estão a concentração de hemoglobina fetal (HbF), cujo aumento tem sido atribuído a diminuição de diversos eventos clínicos presentes na doença, tais como o número de internações e de crises de dor (LYRA *et al.*, 2005). A formação de um híbrido ($\alpha_2\beta_2\gamma$) com as cadeias polipeptídicas da Hb S é a maneira pela qual a Hb F atua inibindo a polimerização da Hb S (STUART & NAGEL, 2004). A manipulação gênica da HbF também tem sido exaustivamente estudada, uma vez que se acredita que o seu aumento possa induzir melhoras consideráveis na evolução clínica de pacientes com DF, o que tem sido confirmado pela utilização de drogas citotóxicas indutoras da síntese de HbF, como a hidroxiuréia e a 5-azacitidina. (STEINBERG *et al.*, 2001).

Entre os marcadores hematológicos podemos ainda mencionar a importância do número de leucócitos, concentração de hemoglobina, concentração de HbS e do número de reticulócitos, que têm sido considerados na avaliação de risco dos pacientes com DF, inclusive quando se avalia o risco de óbito (LYRA *et al.*, 2005).

A importância da participação dos leucócitos na fisiopatologia da DF está cada vez mais clara, sendo que o número elevado de leucócitos está associado a gravidade da doença, ocorrência de STA e infartos cerebrais silenciosos (ASLAN & FREEMAN, 2007). Dados experimentais revelam o papel importante dos leucócitos nos eventos vasclusivos da DF, evidenciando a interação dos mesmos com os eritrócitos e endotélio vascular (TURHAN *et al.*, 2002). As crises vasclusivas recorrentes nos indivíduos com DF, assim como a isquemia tecidual, levam a resposta inflamatória constante, sendo que a característica importante da inflamação é a migração dos leucócitos na circulação sanguínea pelo endotélio para as áreas onde ocorre o dano tecidual (HEBBEL *et al.*, 2004).

Quanto aos marcadores genéticos classicamente associados à modulação clínica da DF podemos mencionar os haplótipos ligados grupo de genes da globina beta, que compreendem sítios para enzimas de restrição localizados na sequência de nucleotídeos do grupo de genes da globina beta e que são associados a sua origem geográfica e aos níveis de HbF. Os portadores do haplótipo CAR (Republica Central Africana), em geral, apresentam níveis diminuídos de HbF e estão associados a apresentação clínica mais grave; os pacientes com o haplótipo Ben (BENIN) apresentam níveis intermediários de HbF e têm sido associado a gravidade moderada da doença; os haplótipos Sen (SENEGAL) e Saudi (ARABIA SAUDITA) têm sido associados a níveis elevados de HbF e ao curso clínico menos grave da DF (POWARS, 1991; STEINBERG *et al.*, 2001).

De acordo com os diferentes estudos relacionados ao grupo de haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta, os estados brasileiros apresentam distribuição heterogênea destes haplótipos, sendo que na maioria ocorre o predomínio do haplótipo CAR (ZAGO *et al.*, 1992; COSTA *et al.*, 1994; GONÇALVES *et al.* 1994). Na Bahia, diferentes estudos relacionados ao tema têm descrito o predomínio do haplótipo BEN e do genótipo CAR/BEN (GONÇALVES *et al.*, 2003; ADORNO *et al.*, 2004; LYRA *et al.*, 2005; ADORNO *et al.*, 2008).

A talassemia alfa (α) é outro marcador que tem sido associado à modulação clínica da DF, sendo que pode envolver alterações nos genes α^1 e α^2 , com ocorrência de deleções ou mutações pontuais, com predomínio das primeiras. A talassemia α^2 ou α^+ pode envolver deleções pequenas, sendo as mais comuns as que apresentam perda de um dos genes α em um dos cromossomos, caracterizando a heterozigose ($-\alpha/\alpha\alpha$) ou a perda dos genes α em ambos os cromossomos, caracterizando a homozigose ($-\alpha/-\alpha$). A talassemia α^1 ou α^0 é aquela caracterizada pela perda de dois genes α no mesmo cromossomo ($---/\alpha\alpha$). Ambas as talassemias são mais prevalentes no Sudeste da Ásia, China, África e na região do Mediterrâneo (ADAMS *et al.*, 1994; FOGLIETTA *et al.*, 1996).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular tem possibilitado o estudo de marcadores genéticos e a sua correlação com o desenvolvimento de infecções. Alguns polimorfismos gênicos têm sido associados à expressão gênica desregulada ou a origem de produtos gênicos específicos, predispondo indivíduos à infecção. Marcadores novos têm sido associados à modulação da gravidade clínica na DF; entre eles destacam-se os níveis séricos de desidrogenase láctica (LDH), comumente associada à hemólise (TAYLOR VI *et al.*, 2008).

As enzimas hepáticas estão frequentemente aumentadas na presença de dano hepático, sendo que as alterações hepáticas são observadas na DF, principalmente em indivíduos com AF e podem ser agudas ou crônicas. As alterações vasculares secundárias à falcização podem levar a alterações hepáticas secundárias (TRAINA & SAAD, 2007).

As alterações no metabolismo dos lipídios, como hiperlipidemia, hipertensão e obesidade têm sido associadas ao aumento do estresse oxidativo e da produção de radicais livres de oxigênio (KUMAR *et al.*, 2008). Uma vez que indivíduos com DF apresentam o estresse oxidativo e a produção de radicais livres aumentadas, espera-se que ocorra o aumento do dano à membrana eritrocitária (KUYPERS, 2007). A lipoproteína de alta densidade (HDL) exerce papel importante também no endotélio vascular, interferindo na interação entre monócitos e moléculas de adesão expressas pelo endotélio, como a molécula de adesão a célula vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão inter-celular 1 (ICAM-1) e Selectina-E (NOFER *et al.*, 2002).

TAYLOR e colaboradores (1979) relacionaram a presença da DF aos níveis diminuídos de colesterol tanto em homens quanto em mulheres. Rahimi e colaboradores

(2006) investigaram os níveis de colesterol total, colesterol HDL, triglicérides e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em indivíduos com DF e a associação do estresse hemolítico à redução dos níveis plasmáticos de lipídios em indivíduos com AF quando comparados a indivíduos controles. Milhares de eritrócitos senis são destruídos, por hora, no organismo humano e este processo se inicia no sistema monocítico fagocitário do fígado, baço e medula óssea. A degradação da hemoglobina (Hb) leva a liberação da parte protéica (globina) e do grupo prostético heme. O processo de degradação da heme favorece, pela ocorrência de reações de oxi-redução, a produção de bilirrubina. O aumento do nível de bilirrubina pode ser decorrente do aumento da degradação dos eritrócitos (hemólise) e dano hepatocelular (KOOLMAN, 2005).

As proteínas plasmáticas constituem a parte mais importante dos constituintes solúveis do sangue, sendo a albumina a mais freqüente destas proteínas, com papel na manutenção da osmolaridade e transporte de moléculas, como as bilirrubinas, vitaminas, hormônios esteróides e algumas drogas. As globulinas por sua vez são divididas em α_1 , α_2 , β e γ e participam do transporte de lipídios, hormônios, vitaminas e íons metálicos (KOOLMAN, 2005). As proteínas plasmáticas, em sua grande maioria, apresentam produção hepática. A ocorrência de doenças que levam a danos nos órgãos envolvidos na síntese de proteínas pode contribuir para a ocorrência de alterações nas concentrações séricas das mesmas (KOOLMAN, 2005).

Os níveis elevados de desidrogenase láctica (LDH) estão associados a ocorrência de hemólise e, mais recentemente, a ocorrência de hipertensão pulmonar, que é uma complicação grave da DF e de outras anemias hemolíticas adquiridas ou hereditárias (KATO, 2006).

Os polimorfismos no gene da *mieloperoxidase* (*MPO*) têm sido associados à susceptibilidade aumentada a infecções (COSTA *et al.*, 2005). A mieloperoxidase é uma enzima localizada no lisossomo e está presente em neutrófilos e monócitos, cuja deficiência tem sido associada ao aumento de processos inflamatórios graves (LONDON, 1997; COSTA *et al.*, 2005).

A ocorrência do polimorfismo *MPO* -463G>A está associado à diminuição da transcrição do gene, com associação da presença de uma ou mais infecções bacterianas

graves, sugerindo que a presença do alelo mutante A está associada a susceptibilidade elevada a infecções em indivíduos com AF (COSTA *et al.*, 2005).

Com base no exposto, julgou-se de importância a investigação de marcadores considerados como fatores de prognóstico na DF, de maneira a associá-los com a ocorrência de colonização bacteriana da nasofaringe e orofaringe.

2. JUSTIFICATIVA

A doença falciforme acomete mundialmente milhões de pessoas (OMS, 2008). Estima-se que aproximadamente 5,2 % da população mundial é composta por indivíduos portadores de hemoglobinas variantes, sendo a Hb S a mais comum entre elas (OMS, 2008). No Brasil, aproximadamente 2 milhões de indivíduos são portadores do gene da HbS, sendo 8.000 portadores de anemia falciforme, estimando-se 700 a 1000 casos novos por ano (BRASIL, 2002). Na Bahia a heterozigose para a HbS (AS) ocorre em frequência de 4,5 a 14,0%, quando diferentes grupos da população foram investigados (AZEVEDO *et al.*, 1980). Atualmente, a triagem neonatal do Estado, é realizada pela APAE, e tem demonstrado a incidência aproximada de 1 caso de DF para cada 645 nascimentos, o que coloca a Bahia como o estado que apresenta a prevalência maior no Brasil da doença. (SILVA *et al.*, 2006).

A variabilidade fenotípica da DF vem sendo associada à presença de fatores moduladores da clínica, como os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β S e os níveis de HbF (NAGEL & STEINBERG, 2001). Novos marcadores vêm sendo investigados como possíveis moduladores clínicos da DF, entre eles destaca-se a LDH e ferritina que são associadas ao quadro de hiper-hemólise, complicações vasculares e mortalidade em indivíduos com AF (TAYLOR VI *et al.*, 2008).

Os indivíduos com DF apresentam susceptibilidade aumentada a infecções, com possibilidades de desenvolver doença invasiva (WILLIAMS *et al.*, 2009). As infecções são prevalentes em crianças com DF até os 5 anos de idades, quando são registrados índices elevados de mortalidade (HAUSDORFF *et al.*, 2000).

Dessa forma, torna-se fundamental o conhecimento da flora colonizadora desses pacientes e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, visando proporcionar medidas de controle de infecções. A investigação de biomarcadores em indivíduos com DF também exerce papel relevante, pois visa o encontro de moléculas que possam estar associadas à modulação do quadro clínico desses indivíduos e que possam identificar bases novas para o acompanhamento e o entendimento da diversidade clínica da doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar associação entre marcadores prognósticos de pacientes com DF e colonização bacteriana na nasofaringe e orofaringe.

3.2. Específicos

1. Investigar marcadores hematológicos e bioquímicos e de biologia molecular em pacientes com DF (hemograma, perfil lipídico, hepático, renal, hemólise, inflamatório);
2. Identificar a presença de colonização na orofaringe em pacientes com DF;
3. Identificar a presença de colonização de nasofaringe em pacientes com DF;
4. Identificar os sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* isolados de nasofaringe/orofaringe das crianças com DF;
5. Associar os marcadores identificados com o histórico de infecção, internação e vasoclusão nos pacientes estudados;

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foi realizado um estudo de corte transversal seguido por estudo caso-controle desenvolvido durante o período de março a dezembro de 2007, cuja casuística foi composta por 154 pacientes com DF, com idade que variou entre 6 meses a 17 anos. O estudo foi desenvolvido na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA), sendo que os pacientes eram acompanhados no ambulatório de hematologia pediátrica.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz- Fundação Oswaldo Cruz – Bahia. Os indivíduos tinham o diagnóstico de DF e os responsáveis concordaram com a coleta do material, após leitura e assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Todos os pacientes residiam no estado da Bahia, sendo que a maioria morava em Salvador e região metropolitana.

Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM / FIOCRUZ) e de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, onde se realizaram todas as análises laboratoriais.

Foram incluídos no estudo pacientes portadores de DF na faixa etária pediátrica (até 17anos e 11 meses); estar em fase estável da doença e ter o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 1) assinado pelo responsável, com a aceitação do menor.

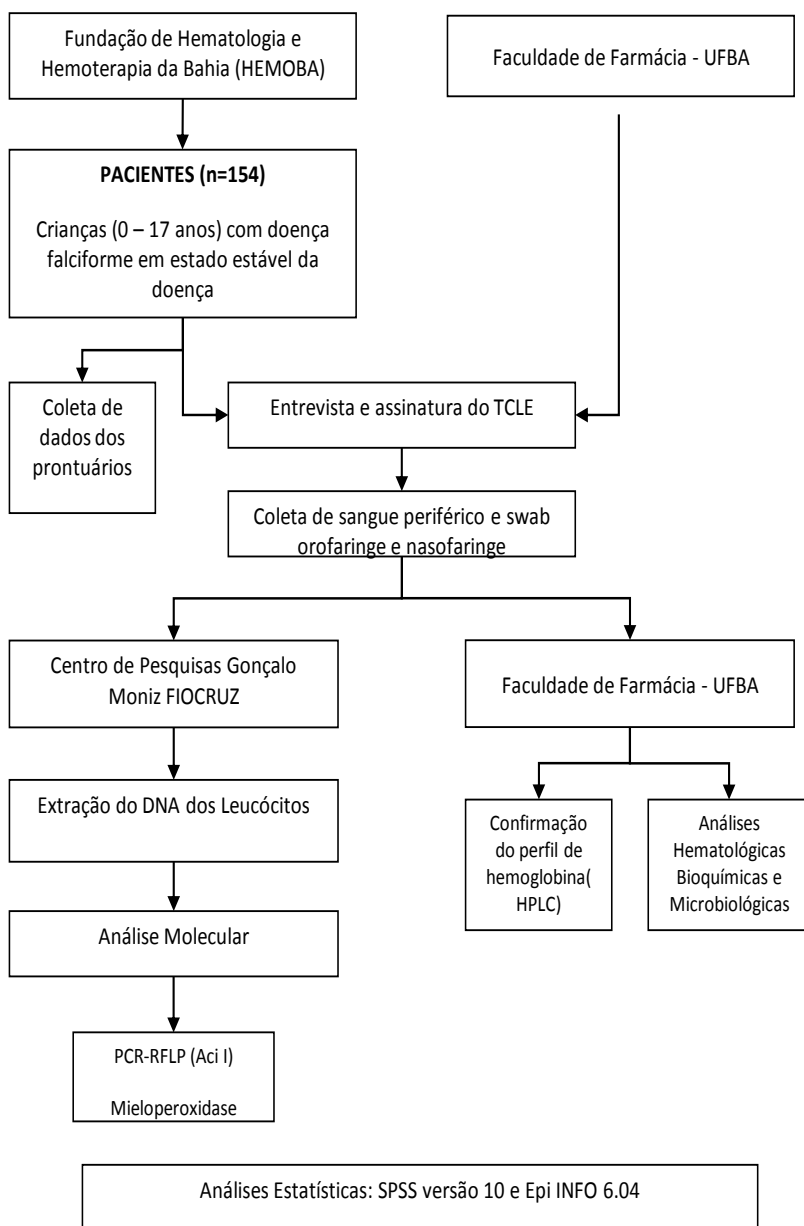
4.2. MÉTODOS

Casuística e Métodos

Esquema do desenho experimental realizado

Aprovado pelo
CEP-CPqGM

CEP CPqGM-306
SISNEP – 131
CAAE – 00160225000-09



4.2.1. Coleta das amostras de sangue

Foram coletados 10 mL de sangue total de cada paciente, sendo 5 mL em EDTA (sal di-sódico do ácido etilenodiaminotetracético) para realização das análises hematológicas, de hemoglobinas e de biologia molecular, e 5 mL sem aditivos para as análises bioquímicas.

4.2.2. Análises Hematológicas e de Hemoglobinas

As análises hematológicas foram realizadas por método automatizado no equipamento ABX Pentra 80 (HORIBA DIAGNOSTICS, Montpellier, FR) e os esfregaço sanguíneo foram corados pelo corante Wright e examinados por microscopia óptica. Os reticulócitos foram contados após coloração com o corante supravital azul de cresil brilhante (DACIE & LEWIS, 1984).

O perfil de hemoglobinas foi confirmado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Bio-Rad VARIANT-I; BIO-RAD, CA, USA).

4.2.3. Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas (perfil hepático, renal, lipídico, inflamatório, hemólise, ferritina) foram realizadas por método automatizado nos equipamentos A25 (BIOSYSTEMS SA, Barcelona, Spain); Access 2 (BECKMAN COULTER Inc, CA, USA) e no Image (BECKMAN COULTER Inc, CA, USA).

4.2.4. Análises microbiológicas

A coleta da secreção da nasofaringe e orofaringe foi realizada em *swab* pelo pesquisador, no dia agendado para a consulta. Além disso, foram obtidas informações sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos com aplicação de questionário, que foram preenchidos após entrevista aos pais e complementados com informações do prontuário médico. Nesse questionário constavam informações sobre os dados demográficos, a exemplo de idade, sexo e raça, uso de profilaxia, vacinação e dados relacionados a ocorrência de infecções atuais ou no último mês precedendo a coleta do material da nasofaringe e orofaringe.

O material de nasofaringe e orofaringe foi colhido durante as visitas ao ambulatório com a utilização de *swab* estéril de haste flexível, que era introduzido cuidadosamente pelo pesquisador na narina direita e outro na esquerda da criança, até uma profundidade correspondente a dois terços da distância entre o nariz e o lóbulo da orelha. Depois foi utilizado outro *swab* para coletar secreção da orofaringe. Em seguida, cada *swab* era imerso nos respectivos meios de transporte e encaminhados após 1 a 2 horas da coleta, em temperatura ambiente, para o setor de bacteriologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia.

O material era semeado em placa de ágar sangue contendo sangue de carneiro a 5%. Em seguida, as placas eram incubadas a $35\pm 1^\circ\text{C}$, com tensão de 5 a 10% de CO_2 , por 24 horas. A presença de zona cinza esverdeada ao redor das colônias (alfa-hemólise) era presuntiva de *Streptococcus pneumoniae*. A confirmação do agente foi realizada pelo teste de aglutinação rápida de partículas de látex e pela avaliação do halo de inibição em torno do disco de optoquina e, quando necessário, era feito também o teste da bilesolubilidade.

A presença de outros microorganismos foi também investigada e a avaliação da suscetibilidade à penicilina foi realizada pelo método da difusão em disco de oxacilina (1 μg), sendo o halo de inibição $> 20\text{mm}$ considerado suscetível à penicilina e o halo $< 19\text{mm}$, resistente à penicilina. A concentração inibitória mínima (CIM) para penicilina foi determinada pelo método do *E-test* em todas as cepas de pneumococo resistentes à oxacilina (halo $< 19\text{ mm}$). A CIM para penicilina foi interpretada como suscetível se $< 0,06\ \mu\text{g/ml}$, intermediária de 0,1 a 1 $\mu\text{g/ml}$ e como resistente se $> 2,0\ \mu\text{g/ml}$ ¹⁸. A resistência bacteriana também foi determinada para eritromicina, trimetropim-sulfametoxazol, clindamicina, e cefotaxima.

A sorotipagem das cepas de pneumococo isoladas foi realizada no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz Bahia, pela reação de Neufeld-Quellung, realizada com anti-soros produzidos no *Statem Serum Institute* (Copenhagem, Dinamarca).

4.2.5. Análise Molecular

O DNA genômico foi extraído em 200 μl de sangue periférico, utilizando-se o Kit *GFXTM Genomic Blood DNA Purification KIT* (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo-

se as recomendações do fabricante. A concentração do DNA foi avaliada utilizando o NanoDrop ND-1000 (ISOGEN LIFE SCIENCE, De Meem, The Netherlands).

A análise molecular foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), através do estudo do DNA extraído de leucócitos utilizando-se seqüência de oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) específicos para os genes a serem estudados.

4.2.6.Determinação da Talassemia Alfa

A caracterização molecular da talassemia alfa 2^{3.7kb} foi realizada por PCR utilizando-se *primers* contendo as seqüências normal (A + C) e mutante (A + B). A reação foi realizada em tampão contendo 50mM de solução de Tris-HCl; 1,7mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 200mM de dCTP + dGTP e 100mM de dATP + dTTP de mistura de desoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs); 13% de glicerol; 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase recombinante (GIBCO, Invitrogen, CA) e 0,5 µg de DNA, em volume final de 50µL. A reação compreendeu uma etapa inicial de desnaturação do DNA de 3 minutos a 98°C e 30 ciclos a 96°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, com uma etapa final de 72°C por 15 minutos (FOGLIETTA et al., 1996).

DNA do Fago Lambda (λ) digerido com a enzima de restrição *Hind III* (GIBCO, Invitrogen, CA) (SAIKI, et al., 1988) foi utilizado como marcador de pares de bases (pb) para a análise de tamanho de fragmento. As reações realizadas com os *primers* A + B e A + C amplificaram fragmentos de 1.700 pb (1,7 kb) para a presença da deleção e genes normais, respectivamente.

4.2.7.Determinação dos Haplótipos Ligados aos Genes da Globina Beta

Os haplótipos ligados ao grupo de genes da *globina beta* foram investigados pela técnica de PCR-RFLP. Sete regiões foram seletivamente amplificadas por PCR e posteriormente digeridas por enzimas de restrição, identificando os seguintes sítios polimórficos (Figura 1B): *XmnI*, localizado na posição 5' do gene *HBG2*; *Hind III*, na região *IVSII* do gene *HBG2* e *HBG1*; *Hinc II*, a 3' e dentro do pseudogene *beta*; *Hinf I* e *Hpa I* nas regiões 5' e 3' do gene *beta*, respectivamente (SUTTON et al., 1989).

4.2.8.Determinação do polimorfismo – 463 G >A no gene da Mieloperoxidase (MPO)

O polimorfismo *MPO* -463G>A foi investigado pela técnica de PCR-RFLP, com a realização de corte com a com a enzima de restrição *Aci* I.

Após a amplificação dos fragmentos desejados, os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (SIGMA, USA) em tampão TAE 1X (Tris–Acetato 0,04M, EDTA 0,001M e, o produto foi posteriormente digerido com enzima de restrição *Aci* I. Os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% (SIGMA, USA) durante 120 minutos a 60 volts e corados com brometo de etídio a 0,002% e visualizado sob luz ultra-violeta. O corante azul-de-bromofenol/xilenocianol/sacarose (0,25%/0,25%/40%) foi utilizado na proporção de 1:6 para acompanhamento visual das amostras durante a eletroforese. Para cada reação foram utilizados controles positivos e negativos visando testar a presença de contaminantes e confirmar a fidelidade dos resultados.

5. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas nos programas EPI INFO versão 6.04, SPSS versão 18.0 e o GraphPad versão 5.0. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos para as análises realizadas.

A análise de normalidade da distribuição das variáveis quantitativas foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A partir desta informação foram utilizados testes paramétricos ANOVA ou não-paramétrico de Kruskal-Wallis. O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para a análise da distribuição de médias de variáveis quantitativas ou numéricas, com distribuição normal dentro de categorias. Além disso, verificando se é provável haver uma diferença entre as médias dos valores, buscou-se dentre as médias apresentadas diferenças significativas conduzidas de múltiplas comparações de médias através do teste de Bonferroni (ou post-hoc). O teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para as distribuições fora do normal.

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (χ^2), devidamente corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Nas análises de valores inferiores a 4, estas foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis.

Os testes de Mann-Whitney e o teste T independente foram utilizados para a análise de duas variáveis numéricas, na comparação de dois grupos de valores dentro de uma mesma variável, levando-se em consideração a distribuição de cada variável.

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISE DOS DADOS DEMOGRÁFICOS E DO PERFIL DE HEMOGLOBINAS NOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

O presente estudo investigou 154 pacientes com doença falciforme (DF), sendo 49/154 (31,8%) com doença SC (DSC) e 105/154 (68,2%) com anemia falciforme (AF). A distribuição quanto ao sexo foi de 71/154 (46,1%) pacientes do sexo feminino e 83/154 (53,9%) do sexo masculino. Quando se avaliou a distribuição do sexo e o tipo de DF, 25/71 (35,2%) pacientes com a DSC e 46/71 (64,8%) com a AF eram do sexo feminino; com relação ao sexo masculino, 24/83 (28,9) apresentaram a DSC e 59/83 (71,1%) a AF.

A análise da distribuição de idade demonstrou que a idade média dos pacientes era de $9,25 \pm 4,06$ anos, sendo que 44/154 (28,6%) apresentaram idade menor ou igual a 5 anos e 110/154 (71,4%) idade maior de 5 anos. Quando se investigou a distribuição dos sexos nessas categorias de idade, 18/44 (49,9%) pacientes com idade menor de 5 anos eram do sexo feminino e 26/44 (59,1) eram do sexo masculino. Já no grupo de pacientes com idade maior de 5 anos, 53/110 (48,2%) eram do sexo feminino e 57/110 (51,8%) eram do sexo masculino.

6.2. ANÁLISE DAS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS NOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

O grupo de pacientes que compôs a casuística deste estudo foi avaliado quanto ao perfil de variáveis hematológicas e de moléculas relacionadas a vias metabólicas importantes no curso clínico da DF, tais como aquelas associadas ao metabolismo lipídico, renal, hepático, à hemólise e inflamação. Desta forma, os dados referentes as variáveis investigadas no total de pacientes com DF estão enumerados na **Tabela 1**. Os valores relativos às variáveis enumeradas na **Tabela 1** e sua distribuição por genótipo de DF estão mostradas na **Tabela 2**, onde se pode notar significância estatística para as variáveis associadas à anemia e hemólise, exceto para o CHCM; para a contagem de leucócitos global, bem como para os tipos específicos de leucócitos.

A análise de variáveis associadas à hemólise e comprometimento hepático mostrou significância estatística, exceto para os valores de AST; para as variáveis associadas ao comprometimento hepático não foi encontrada significância estatística para os valores de proteínas e frações; entre as variáveis associadas à função renal os valores de uréia não foram significativos entre os dois tipos de doença DF. A análise de variáveis associadas ao perfil lipídico demonstrou significância estatística, com exceção dos níveis de colesterol total, que foram semelhantes entre os dois grupos de DF. A análise de moléculas relacionadas ao metabolismo do ferro foi significativa para os valores de ferritina e, para os marcadores de inflamação foi encontrada significância para os níveis de alfa-1 antitripsina, com valores mais elevados para os indivíduos com AF.

Tabela 1. Distribuição das variáveis associadas ao metabolismo lipídico, renal, hepático e à hemólise e inflamação em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.

Marcadores	Pacientes DF (N)	Média ± DP	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
Hemólise					
Hemácias, milhões/mL	154	3,23 ± 0,97	2,47	2,95	3,99
Hemoglobina, g/dL	154	8,92 ± 2,00	7,40	8,50	10,50
Hematócrito, %	154	27,60 ± 6,20	22,80	26,35	32,92
VCM, fL	154	87,52 ± 10,81	79,17	87,80	94,93
HCM, pg	154	28,35 ± 3,75	25,47	28,70	31,00
CHCM, %	154	32,36 ± 0,99	31,70	32,30	32,90
Reticulócitos, %	142	7,62 ± 4,84	3,15	6,95	11,22
Eritroblastos	153	1,61 ± 2,38	0,00	1,00	2,00
Hemoglobinas					
Hemoglobina S, %	154	75,23 ± 17,23	56,25	83,10	90,30
Hemoglobina Fetal, %	154	7,49 ± 6,19	2,70	5,60	10,93
Leucócitos					
Leucócitos, X 10 ⁹ /L	154	13081,82 ± 5744,83	9475,00	12400,00	15650,00
Segmentados, X 10 ⁹ /L	154	6128,33 ± 3801,37	3720,00	5171,00	7648,50
Monócitos, X 10 ⁹ /L	154	811,23 ± 483,58	433,50	752,00	1034,25
Eosinófilos, X 10 ⁹ /L	154	839,02 ± 777,93	321,75	619,00	1148,50
Linfócitos, X 10 ⁹ /L	154	5063,21 ± 2353,83	3319,25	4776,00	6292,25
Plaquetas					
Plaquetas, X 10 ⁹ /L	154	405,54 ± 158,25	286,00	385,00	502,75
Hemólise e Comprometimento Hepático					
LDH, U/L	153	856,41 ± 501,60	444,50	721,00	1256,00
AST, U/L	154	28,25 ± 21,20	15,00	24,00	32,00
Bilirrubina total, g/dL	154	2,75 ± 1,77	1,40	2,40	3,70
Bilirrubina direta, g/dL	154	0,67 ± 0,48	0,35	0,60	0,90
Bilirrubina indireta, /dL	154	2,08 ± 1,58	0,90	1,70	2,85
Hepático					
ALT, U/L	154	48,43 ± 25,31	30,75	24,00	32,00
Proteínas totais, g/dL	154	7,33 ± 0,84	6,80	7,30	7,90
Albumina, g/dL	154	4,06 ± 0,68	3,60	4,20	4,40
Globulina, g/dL	154	3,27 ± 0,78	2,75	3,30	3,80
Relação Albumina/ Globulina	154	1,34 ± 0,46	1,00	1,30	1,5
Renal					
Uréia, mg/dL	152	17,73 ± 6,40	14,00	16,50	20,00
Creatinina, mg/dL	153	0,47 ± 0,18	0,40	0,50	0,55
Metabolismo lipídico					
Colesterol Total, mg/dL	153	121,27 ± 26,04	103,00	119,00	135,00
Colesterol HDL, mg/dL	153	35,55 ± 12,39	27,00	33,00	43,00
Colesterol LDL, mg/dL	153	64,80 ± 22,13	50,50	61,00	78,00
Colesterol VLDL, g/dL	153	20,83 ± 10,02	14,00	18,00	24,00
Triglicérides, g/dL	152	104,05 ± 50,10	71,75	91,00	118,00
Metabolismo Fe					
Ferritina, ng/mL	154	320,16 ± 374,86	94,90	182,35	399,37
Ferro sérico, mcg/dL	154	122,27 ± 119,39	71,00	10,00	137,75
Inflamação					
Anti-estreptolisina O, UI/mL	153	191,25 ± 282,86	29,15	94,00	200,00
Proteína C reativa, mg/L	153	6,98 ± 11,80	1,33	3,73	7,35
Alfa-1 antitripsina, mg/dL	153	152,36 ± 46,01	124,00	156,00	186,00

Tabela 2. Análise dos valores médios apresentados pelas variáveis associadas ao metabolismo lipídico, renal, hepático e à hemólise e inflamação em pacientes com anemia falciforme e doença SC de Salvador-Bahia

Marcadores	Pacientes N AF/DSC	Média ± DP Anemia Falciforme	Média ± DP Doença SC	Valor de P
Hemólise				
Hemácias, milhões/mL	105/49	2,72 ± 0,59	4,33 ± 0,65	<0,001
Hemoglobina, g/dL	105/49	7,89 ± 1,27	11,16 ± 1,34	<0,001
Hematócrito, %	105/49	24,32 ± 3,89	34,63 ± 4,00	<0,001
VCM, fL	105/49	90,86 ± 10,23	80,37 ± 8,34	<0,001
HCM, pg	105/49	29,49 ± 3,60	25,91 ± 2,81	<0,001
CHCM, %	105/49	32,43 ± 0,99	32,21 ± 0,95	0,23
Reticulócitos, %	105/49	9,31 ± 4,66	3,73 ± 2,42	<0,001
Eritroblastos	104/49	2,15 ± 2,53	0,47 ± 1,47	<0,001
Hemoglobinas				
Hemoglobina Fetal, %	105/49	9,65 ± 6,06	2,93 ± 3,34	<0,001
Leucócitos				
Leucócitos, X 10 ⁹ /L	105/49	14712,38 ± 4914,36	9587,75 ± 5881,45	<0,001
Segmentados, X 10 ⁹ /L	105/49	6677,97 ± 3468,10	4950,53 ± 4233,63	0,008
Monócitos, X 10 ⁹ /L	105/49	938,97 ± 445,66	537,53 ± 450,46	0,002
Eosinófilos, X 10 ⁹ /L	105/49	971,20 ± 854,52	555,77 ± 476,19	<0,001
Linfócitos, X 10 ⁹ /L	105/49	5862,69 ± 2076,22	3350,02 ± 1981,47	<0,001
Plaquetas				
Plaquetas, X 10 ⁹ /L	105/49	444,49 ± 129,38	322,06 ± 181,99	<0,001
Hemólise e Comprometimento Hepático				
LDH, U/L	105/49	1024,11 ± 499,02	500,450 ± 268,56	<0,001
AST, U/L	105/49	30,26 ± 23,93	23,96 ± 12,83	0,086
Bilirrubina total, g/dL	104/49	3,27 ± 1,79	1,64 ± 1,06	<0,001
Bilirrubina direta, g/dL	105/49	0,76 ± 0,53	0,46 ± 0,27	<0,001
Bilirrubina indireta, /dL	105/49	2,50 ± 1,64	1,17 ± 1,06	<0,001
Hepático				
ALT, U/L	105/49	55,03 ± 26,55	34,29 ± 14,65	<0,001
Proteínas totais, g/dL	105/49	7,35 ± 0,93	7,28 ± 0,64	0,647
Albumina, g/dL	105/49	4,02 ± 0,73	4,14 ± 0,57	0,298
Globulina, g/dL	105/49	3,33 ± 0,84	3,14 ± 0,64	0,158
Relação Albumina/ Globulina	105/49	1,30 ± 0,47	1,40 ± 0,44	0,222
Renal				
Uréia, mg/dL	103/49	17,29 ± 6,47	18,69 ± 6,22	0,214
Creatinina, mg/dL	104/49	0,45 ± 0,18	0,45 ± 0,18	0,004
Metabolismo lipídico				
Colesterol Total, mg/dL	104/49	121,61 ± 26,15	120,53 ± 26,07	0,811
Colesterol HDL, mg/dL	104/49	32,66 ± 10,17	41,69 ± 14,41	<0,001
Colesterol LDL, mg/dL	104/49	67,42 ± 22,27	59,24 ± 20,99	0,032
Colesterol VLDL, g/dL	104/49	22,44 ± 11,00	17,41 ± 6,36	<0,001
Triglicérides, g/dL	103/49	111,92 ± 55,11	87,51 ± 32,06	<0,001
Metabolismo Fe				
Ferritina, ng/mL	105/49	401,33 ± 425,59	146,23 ± 100,84	<0,001
Ferro sérico, mcg/dL	105/49	133,82 ± 124,73	98,62 ± 105,11	0,118
Inflamação				
Anti-estreptolisina O, UI/mL	104/49	201,82 ± 292,48	168,14 ± 262,04	0,496
Proteína C reativa, mg/L	104/49	7,57 ± 13,05	5,67 ± 8,41	0,356
Alfa-1 antitripsina, mg/dL	104/49	159,49 ± 45,84	136,77 ± 42,82	0,004

Teste T independente e teste de Mann-Whitney U

6.3. ANÁLISE DE VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS ASSOCIADAS À INFLAMAÇÃO E HEMÓLISE NOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

Ao analisarmos as variáveis associadas à inflamação e hemólise, foram encontradas associações significativas para a dosagem de ferritina nos pacientes com DF que possuíam os valores para este parâmetro maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (320,16ng/mL), respectivamente, demonstraram valores significativos para a contagem de leucócitos, eritroblastos, linfócitos, monócitos, plaquetas, reticulócitos, creatinina, ferro e hemoglobina fetal. Os resultados das análises estão enumerados na **tabela 3** e na **figura 1**.

As análises realizadas de acordo com os valores \geq e $<$ que a média (856,41U/L) para a concentração da desidrogenase láctica, respectivamente, demonstraram valores significativos para a contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, leucócitos, eosinófilos, linfócitos, plaquetas, reticulócitos, colesterol HDL, uréia, ALT, bilirrubina total, bilirrubina direta, bilirrubina indireta e hemoglobina fetal. Os resultados das análises estão enumerados na **tabela 4** e nas **figuras 2 e 3**.

Tabela 3. Análise dos valores médios apresentados pelas variáveis hematológicas e bioquímicas na presença de valores de ferritina maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (320,16ng/mL) em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.

	Ferritina	Ferritina	P
	$\geq 320,16$ ng/mL	$< 320,16$ ng/mL	
	(N=42)	(N= 112)	
Leucócitos, X $10^9/L$	14.820 \pm 789,2	12.430 \pm 553,1	0,021
Eritroblastos, X $10^9/L$	2,341 \pm 0,49	1,348 \pm 0,19	0,0217
Linfócitos, X $10^9/L$	5.910 \pm 367,1	4.746 \pm 214,9	0,006
Monócitos, X $10^9/L$	938,6 \pm 71,87	175,1 \pm 86,63	0,045
Plaquetas, X $10^9/L$	463,9 \pm 27,25	383,7 \pm 13,77	0,0047
Reticulócitos, %	9,371 \pm 0,83	6,979 \pm 0,4515	0,0087
Creatinina, mg/dL	0,4095 \pm 0,019	0,4991 \pm 0,018	0,0048
Ferro, mcg/dL	177,7 \pm 35,00	104,6 \pm 7,655	0,003
Hemoglobina fetal, %	14.820 \pm 789,2	12.430 \pm 553,1	0,003

Teste T independente; Teste de Mann-Whitney U

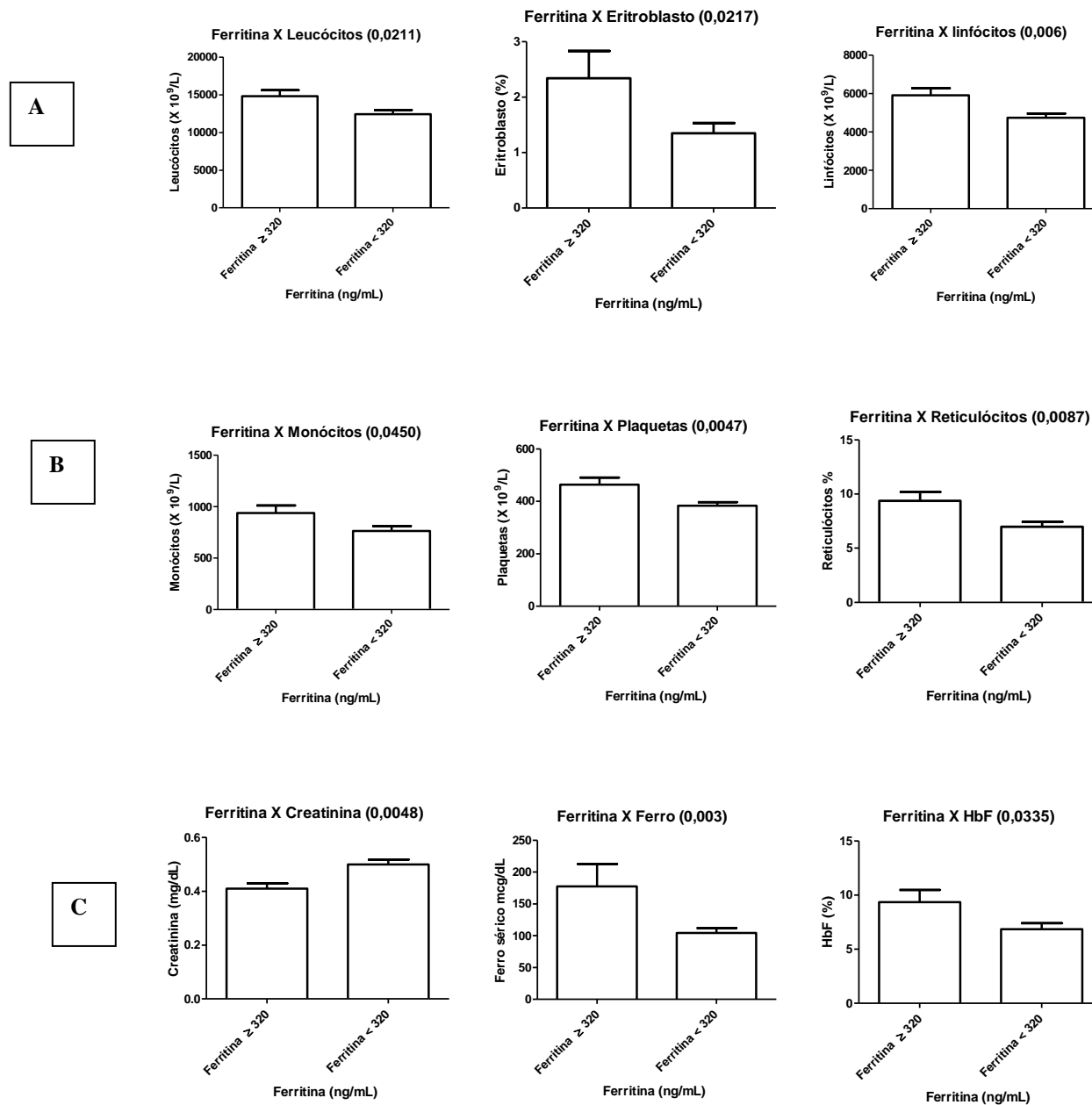


Figura 1. Demonstração gráfica da análise de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com DF com valores de ferritina maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (320,16ng/mL). A e B: análises com variáveis hematológicas e em C: análises com variáveis bioquímicas e de HbF.

Tabela 4. Análise dos valores médios apresentados pelas variáveis hematológicas e bioquímicas na presença de valores de desidrogenase láctica maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (856,41 U/L) em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.

	Desidrogenase Láctica $\geq 856,41$ U/L (N=70)	Desidrogenase Láctica $< 856,41$ U/L (N=84)	P
Hemácias, milhões /mL	2,722 \pm 0,08	3,650 \pm 0,18	<0,0001
Hemoglobina, g/dL	7,89 \pm 0,16	9,79 \pm 0,22	<0,0001
Hematócrito, %	24,30 \pm 0,50	30,36 \pm 0,70	<0,0001
VCM, fL	90,60 \pm 1,05	84,96 \pm 1,28	0,0011
HCM, pg	29,48 \pm 0,38	27,41 \pm 0,43	0,0006
Leucócitos, X 10 ⁹ /L	14.380 \pm 580,4	12.000 \pm 678,3	0,0103
Eosinófilos, X 10 ⁹ /L	1.061 \pm 116,5	645,3 \pm 54,59	0,001
Linfócitos, X 10 ⁹ /L	5.815 \pm 230,4	4.437 \pm 272,8	0,0002
Plaquetas, X 10 ⁹ /L	443,9 \pm 17,42	373,5 \pm 17,67	0,0056
Reticulócitos, %	9,746 \pm 0,54	5,463 \pm 0,48	<0,0001
ALT, U/L	54,44 \pm 2,58	43,42 \pm 2,66	0,007
Bilirrubina Total, mg/dL	3,53 \pm 0,21	2,09 \pm 0,16	<0,0001
Bilirrubina Direta, mg/dL	0,79 \pm 0,05	0,57 \pm 0,06	0,004
Bilirrubina Indireta, mg/dL	2,74 \pm 0,20	1,52 \pm 0,13	<0,0001
Colesterol HDL, mg/dL	31,30 \pm 1,141	30,14 \pm 1,47	<0,0001
Uréia, mg/dL	16,10 \pm 0,60	19,10 \pm 0,78	0,004
Hemoglobina Fetal, %	9,19 \pm 0,77	6,00 \pm 0,67	0,002

Teste T independente; teste de Mann-Whitney U

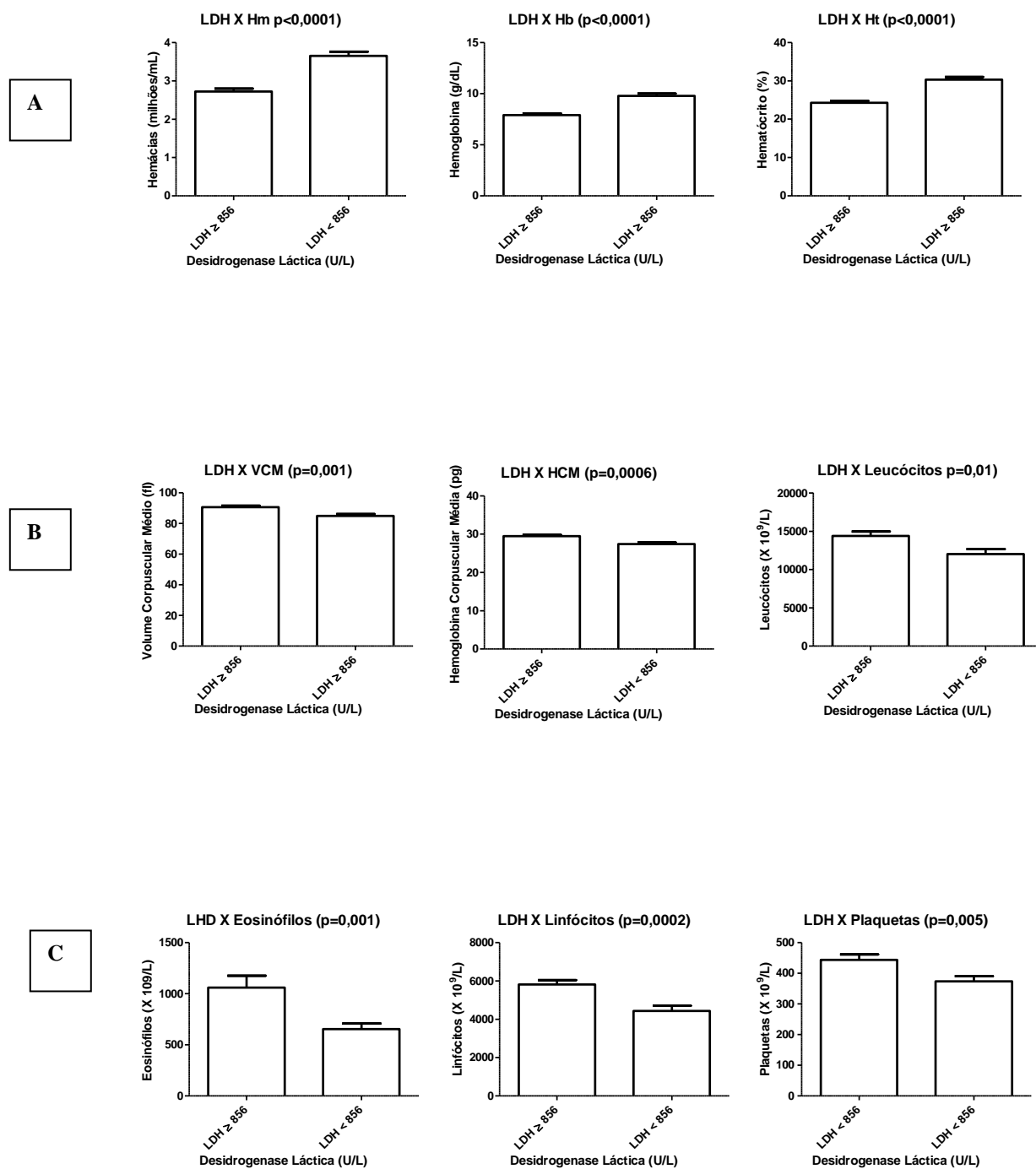


Figura 2. Demonstração gráfica da análise de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com DF com valores de desidrogenase láctica maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (856,41 U/L). A, B e C: análises com variáveis hematológicas.

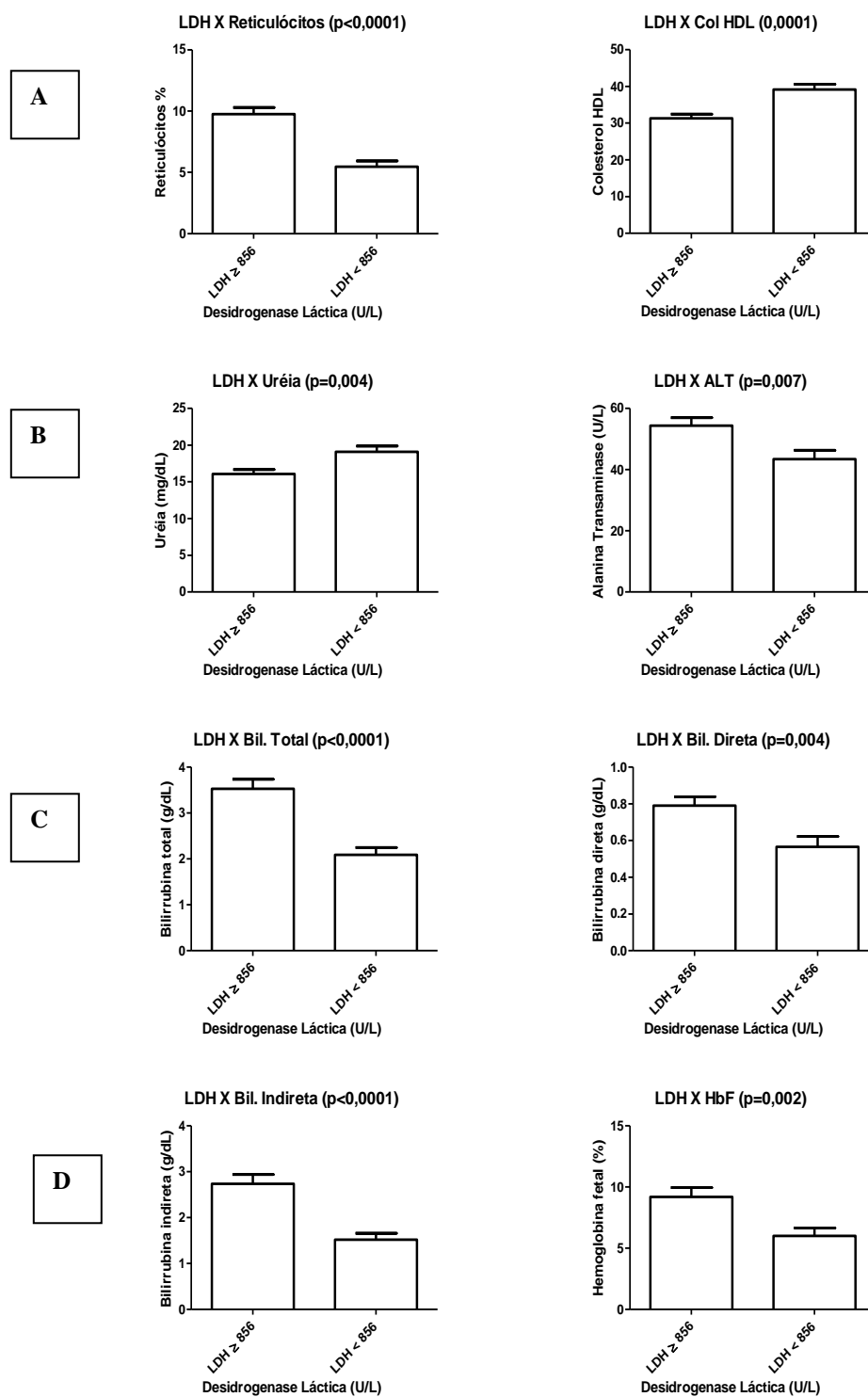


Figura 3. Demonstração gráfica da análise de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com DF com valores de desidrogenase láctica maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (856,41 U/L). A: análises do número de reticulócitos e colesterol HDL e em B,C e D com outras variáveis bioquímicas.

As análises realizadas de acordo com os valores \geq e $<$ que média (122,27 mcg/dL) para a concentração da desidrogenase láctica demonstraram valores significativos para o HCM, reticulócitos, ferro, eritroblastos, linfócitos, bilirrubina total, bilirrubina direta e PCR. Para os valores médios de ASLO (191UI/mL) só foi encontrada significância para os valores de proteínas totais. Os resultados das análises estão enumerados na **tabela 5** e na **figura 4**.

Tabela 5. Análise dos valores médios apresentados pelas variáveis hematológicas e bioquímicas na presença de valores de ferro maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (122,27 mcg/dL) e de valores de ASLO maiores e iguais (\geq) e abaixo ($<$) da média (191 UI/mL) em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.

	Ferro \geq 122,27 mcg/dL (N=40)	Ferro $<$ 122,27 mcg/dL (N=113)	P
HCM, pg	29,48 \pm 0,38	27,41 \pm 0,43	0,0006
Reticulócitos, %	9,746 \pm 0,54	5,463 \pm 0,48	$<$ 0,0001
Eritroblastos, %	2,341 \pm 0,49	1,348 \pm 0,19	0,0117
Linfócitos, X 10 ⁹ /L	5.815 \pm 230,4	4.437 \pm 272,8	0,0002
Bilirrubina Direta, mg/dL	0,79 \pm 0,05	0,57 \pm 0,06	$<$ 0,0001
PCR, mg/mL	0,79 \pm 0,05	0,57 \pm 0,06	0,002
	ASLO \geq 191 UI/mL (N=45)	ASLO $<$ 191 UI/mL (N=108)	P
Proteínas totais	0,79 \pm 0,05	0,57 \pm 0,06	0,0037

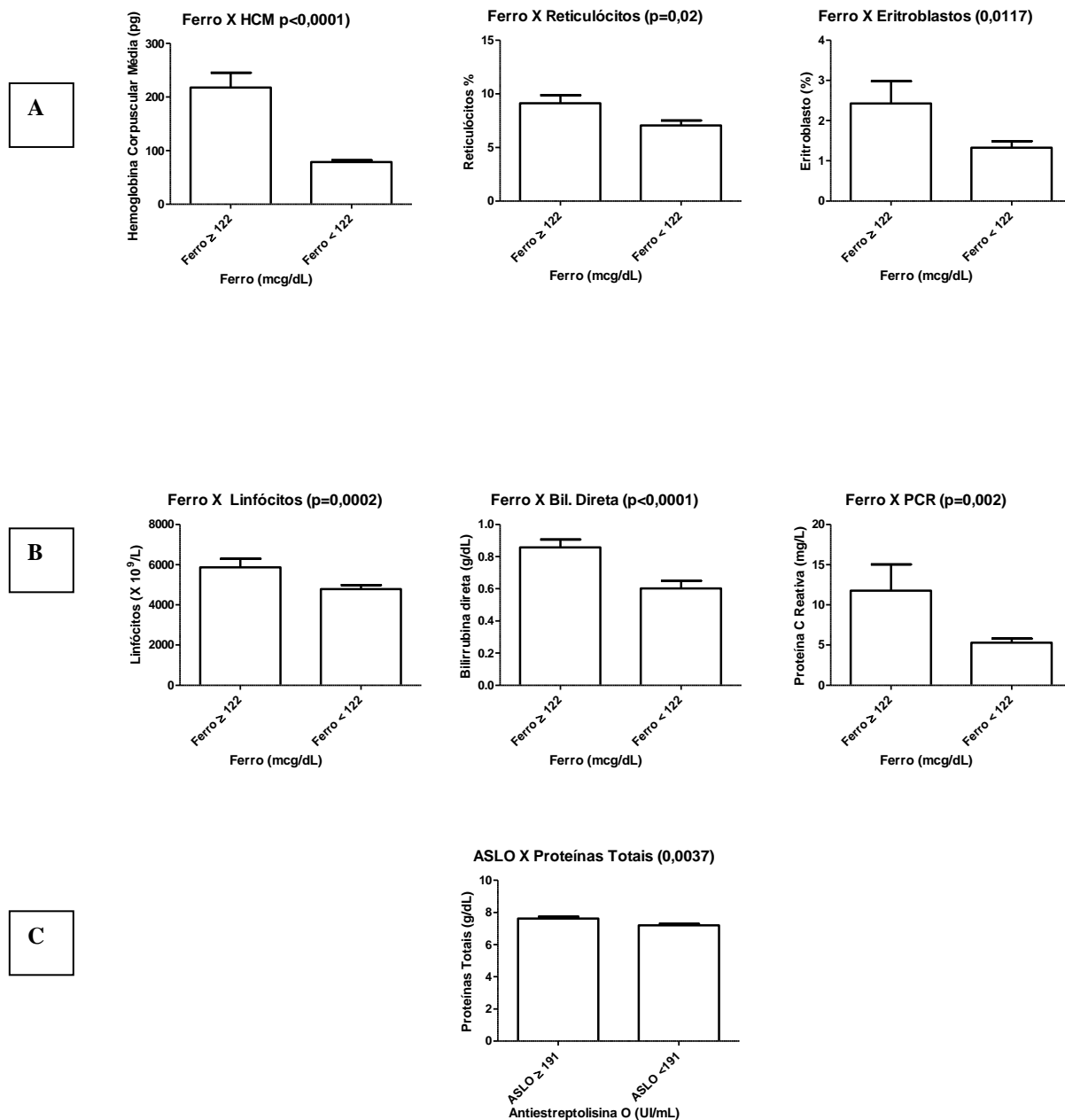


Figura 4. Demonstração gráfica da análise de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com DF com valores de ferro (122,27 mcg/dL) e de valores de ASLO maiores e iguais (\geq) e abaixo (<) da média (191 UI/mL). A e B: análises com variáveis valores de ferro e variáveis hematológicas e bioquímicas e em C: análise de ASLO e proteínas totais.

6.4. ANÁLISE DE VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS ASSOCIADAS AOS MARCADORES GENÉTICOS APRESENTADOS PELOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

Os resultados das análises relacionadas aos haplótipos ligados aos genes da globina beta e dos genótipos selvagens e mutantes para a talassemia alfa e para o gene da *mieloperoxidase (MPO)* estão mostrados na **tabela 6** e na **figura 5**. Quando se investigou a talassemia alfa foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes portadores dos genótipos selvagens e mutantes para o índice de HCM, para os valores de colesterol VLDL, triglicérides, ALT e AST. Com relação aos haplótipos ligados aos genes da globina beta, os pacientes com o haplótipo BEN apresentaram os níveis mais elevados de hemoglobina fetal. Os pacientes mutantes para o gene da *MPO* foram aqueles que apresentaram as concentrações mais elevadas de bilirrubina total, bilirrubina indireta e LDH.

Tabela 6. Análise dos valores médios das variáveis hematológicas e bioquímicas na presença dos genótipos selvagem e mutante para a talassemia alfa 3,7Kb, no gene da *Mieloperoxidase (MPO)* e na presença dos haplótipos CAR e Benin em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.

	Talassemia alfa 3,7Kb Selvagem	Talassemia alfa 3,7Kb Mutante	P
HCM, pg	28,41 ± 0,43	6,98 ± 0,65	0,04
Colesterol VLDL, mg/dL	20,05 ± 0,79	24,80 ± 2,80	0,03
Triglicérides, mg/dL	100,6 ± 3,95	122,5 ± 14,48	0,048
ALT, U/L	46,47 ± 18,8	58,56 ± 7,80	0,0283
AST,U/L	25,87 ± 1,21	40,56 ± 8,17	0,001
	Haplótipo CAR	Haplótipo BEN	
Hemoglobina fetal, %	5,31 ± 0,87	8,16 ± 0,62	0,016
	MPO selvagem	MPO mutante	P
Bilirrubina total, mg/dL	2,32 ± 0,16 (75)	3,155 ± 0,22 (78)	0,0033
Bilirrubina indireta, mg/dL	0,74 ± 0,25 (75)	2,44 ± 0,21 (78)	0,0034
LDH, U/L	718,8 ± 58,38 (67)	971,6 ± 54,07 (78)	0,002

Teste de Kruskal- Wallis

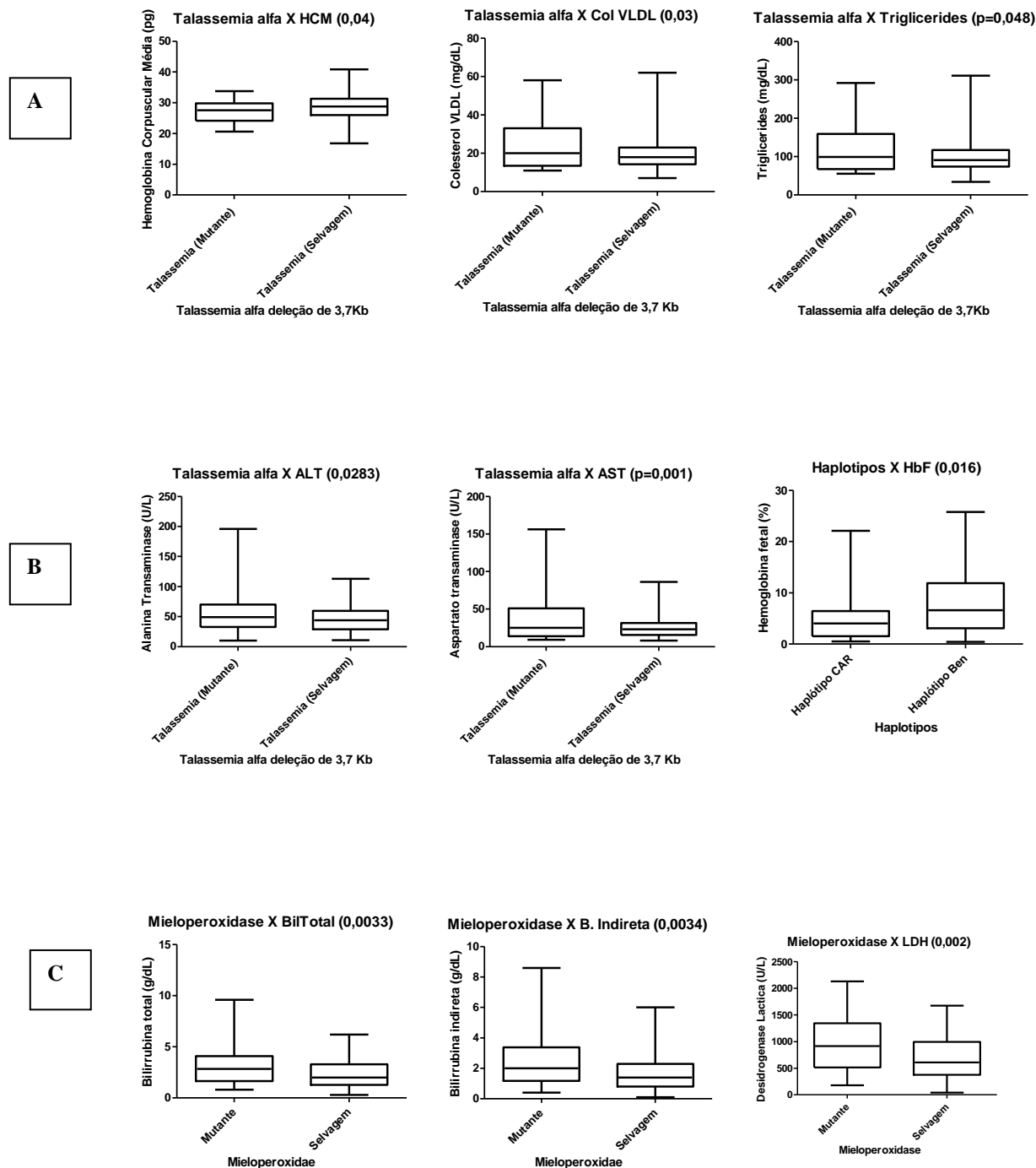


Figura 5. Em A, B e C: Representação gráfica da análise dos valores médios das variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com doença falciforme na presença dos genótipos selvagem e mutante para a talassemia alfa 3,7Kb, no gene da *Mieloperoxidase* (*MPO*) e na presença dos haplótipos CAR e Benin.

6.5. HISTÓRIA CLÍNICA E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS MARCADORES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

A **Tabela 7** mostra as características apresentadas na história clínica dos pacientes com doença falciforme, sendo as prevalentes a vaso-occlusão, infecções no geral, pneumonia e internações.

Quando se avaliou o número de internações, 107/114 pacientes com DF apresentaram mais de 01 internação.

A avaliação entre o histórico de internações e os marcadores hematológicos e bioquímicos mostrou alterações significativas para as contagens de leucócitos, linfócitos, monócitos, reticulócitos e concentrações séricas de ferritina (**Figura 6**).

A análise do número de eventos de pneumonia por pacientes com DF registrou que no total destes pacientes 51/76 apresentaram mais de 1 evento de pneumonia, sendo mais frequentes entre os indivíduos com AF.

A avaliação entre o histórico de pneumonia e os marcadores hematológicos e bioquímicos mostrou alterações significativas para as contagens de hemácias, leucócitos, eosinófilos, linfócitos, monócitos, reticulócitos e eritroblastos; para as concentrações de hemoglobina, hematócrito e concentrações séricas de ferritina (**Figuras 7 e 8**).

Com relação a vaso-occlusão ficou evidenciada a associação com o número de segmentados neutrófilos; a esplenomegalia com as concentrações de PCR; o AVC com as concentrações de ferritina e o histórico de litíase biliar com as concentrações de colesterol total, colesterol VLDL, triglicérides, ferritina e ASLO (**Figuras 8 e 9**).

Tabela 7. Características clínicas apresentadas pelos pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.

Evento Clínico	Pacientes Doença Falciforme N (%)	Pacientes Anemia Falciforme N (%)	Pacientes Doença SC N (%)	Valor de P
Internação				
Sim	117/144 (81,3)	85/98 (86,7)	32/46 (69,6)	0,014*
Não	27/144 (81,3)	13/ 98 (12,3)	14/ 46 (30,4)	
Pneumonia				
Sim	77/144 (53,5)	65/98 (66,3)	12/46 (26,1)	<0,001*
Não	67/144 (46,5)	33/98 (33,7)	34/46 (73,9)	
Esplenomegalia				
Sim	21/143 (14,7)	16/97 (16,5)	5/46 (10,9)	0,68*
Não	122/143 (85,3)	81/97 (83,5)	41/46 (89,1)	
Sequestro Esplênico				
Sim	18/143 (12,6)	17/98 (17,4)	1/45 (2,2)	0,007**
Não	125/143 (87,4)	81/98 (82,6)	44/45 (97,8)	
Acidente Vascular Cerebral				
Sim	8/144 (5,6)	7/98 (7,1)	1/46 (2,2)	0,21**
Não	136/144 (94,4)	91/98 (92,9)	45/46 (97,8)	
Vaso-oclusão				
Sim	119/152 (82,1)	83/99 (83,8)	36/46 (78,3)	0,28*
Não	26/152 (17,9)	17/99 (16,2)	10/46 (21,7)	
Infecção				
Sim	66/119 (55,5)	48/81 (59,3)	18/38 (47,4)	0,15*
Não	56/119 (44,5)	33/81 (40,7)	20/38 (52,6)	
Litíase Biliar				
Sim	8/144 (5,6)	7/98 (7,1)	1/46 (2,2)	0,21**
Não	136/144 (94,4)	91/98 (92,3)	45/46 (97,8)	

* Qui-quadrado ** Teste de Fisher

Tabela 8. Análise das principais características clínicas e sua associação com os valores médios de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.

	Internação SIM	Internação Não	P
Leucócitos, X 10 ⁹ /L	13.785 ± 554,9	10.857 ± 678,2	0,0065
Linfócitos, X 10 ⁹ /L	5.282 ± 554,9	4.373 ± 380,2	0,04
Monócitos, X 10 ⁹ /L	862 ± 46,57	650,8 ± 61,87	0,02
Reticulócitos, %	8,25 ± 0,47	5,55 ± 0,69	0,005
Ferritina, ng/mL	360,2 ± 37,92	193,5 ± 30,00	0,02
CHCM, %	27.18 ± 0,188	32.69 ± 0,162	<0,0001
	Pneumonia Sim	Pneumonia Não	P
Hemácias, milhões /mL	3,022 ± 0,097	3,44 ± 0,12	0,0067
Hemoglobina, g/dL	8,46 ± 0,32	9,39 ± 0,21	0,0039
Hematócrito, %	26,22 ± 0,68	28,98 ± 0,70	0,0054
Eritroblastos, %	2,118 ± 0,32	1,13 ± 0,21	0,0102
Leucócitos, X 10 ⁹ /L	14.421 ± 681,6	11.743 ± 592,6	0,0035
Linfócitos, X 10 ⁹ /L	5.683 ± 278,0	4.444 ± 239,7	0,0009
Eosinófilos, X 10 ⁹ /L	979,9 ± 99,4	698,2 ± 73,63	0,0242
Monócitos, X 10 ⁹ /L	901,9 ± 53,22	720,6 ± 55,37	0,0195
Reticulócitos, %	9,02 ± 0,61	6,21 ± 0,49	0,0004
Ferritina, ng/mL	388,2 ± 47,71	252,1 ± 35,72	0,0238
	Vaso-oclusão (Sim)	Vaso-oclusão (Não)	
Segmentados neutrófilos, X 10 ⁹ /L	6.575 ± 3272,8	4.608 ± 361,0	0,0067
	Esplenomegalia (Sim)	Esplenomegalia (Não)	
PCR, mg/L	11,78 ± 5,2	6,219 ± 0,73	0,0444
	AVC (Sim)	AVC (Não)	
Ferritina, ng/mL	649,8 ± 263,2	302,1 ± 28,72	0,0102
	Litíase Biliar (Sim)	AVC (Não)	
Colesterol total, mg/dL	141,1 ± 5,13	120,2 ± 2,17	0,0263
Colesterol VLDL, g/dL	30,50 ± 5,08	20,30 ± 0,79	0,0047
Triglicérides, mg/dL	153,0 ± 25,4	101,3 ± 3,96	0,0042
Ferritina, ng/mL	701,8 ± 187,6	299,3 ± 29,43	0,0028
ASLO, UI/mL	451,9 ± 189,0	176,9 ± 21,43	0,0070

Teste de Kruskal- Wallis

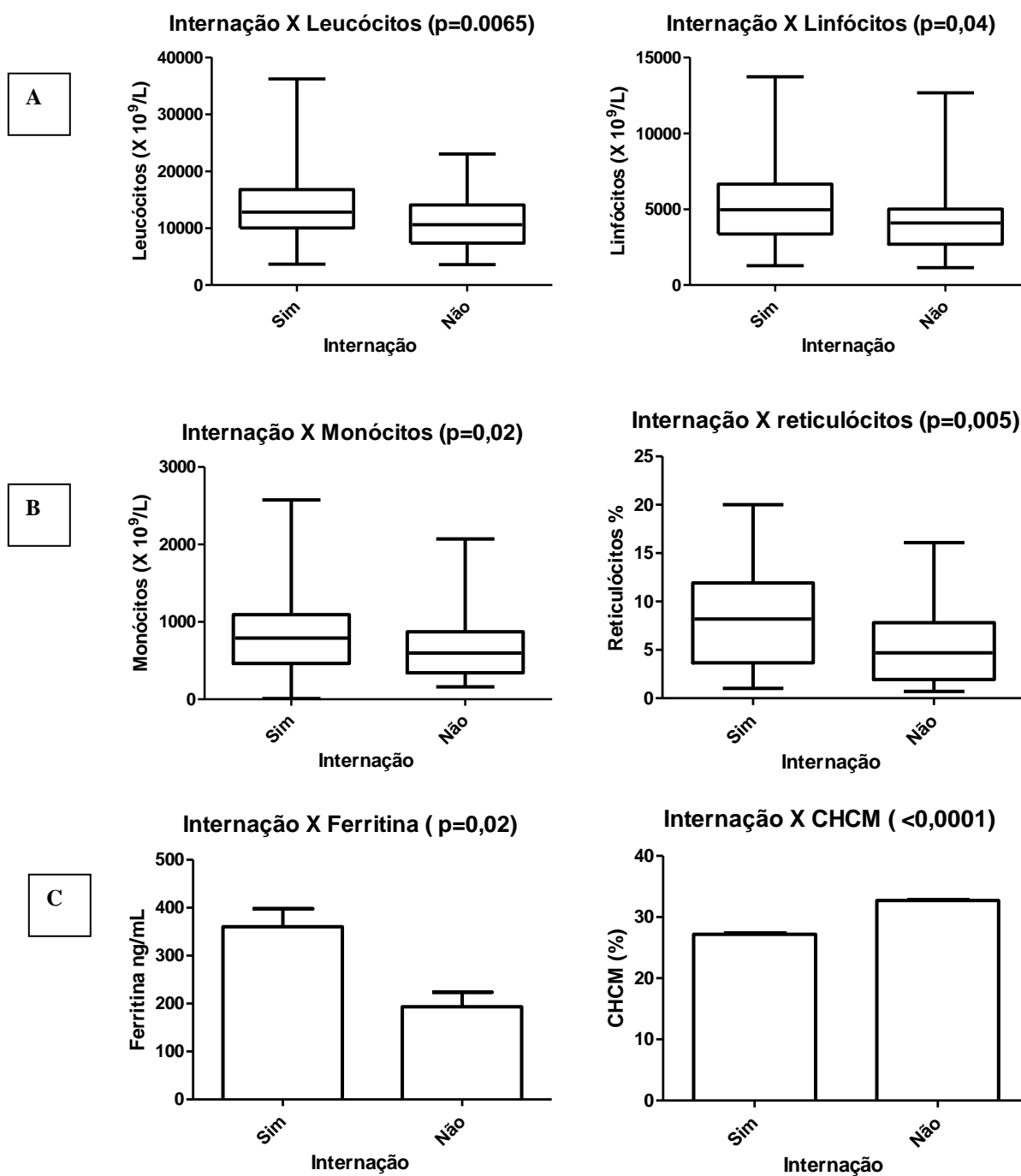


Figura 6. Em A, B e C. Representação gráfica da análise do histórico de internações e sua associação com os valores médios de variáveis hematológicas e bioquímicas em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.

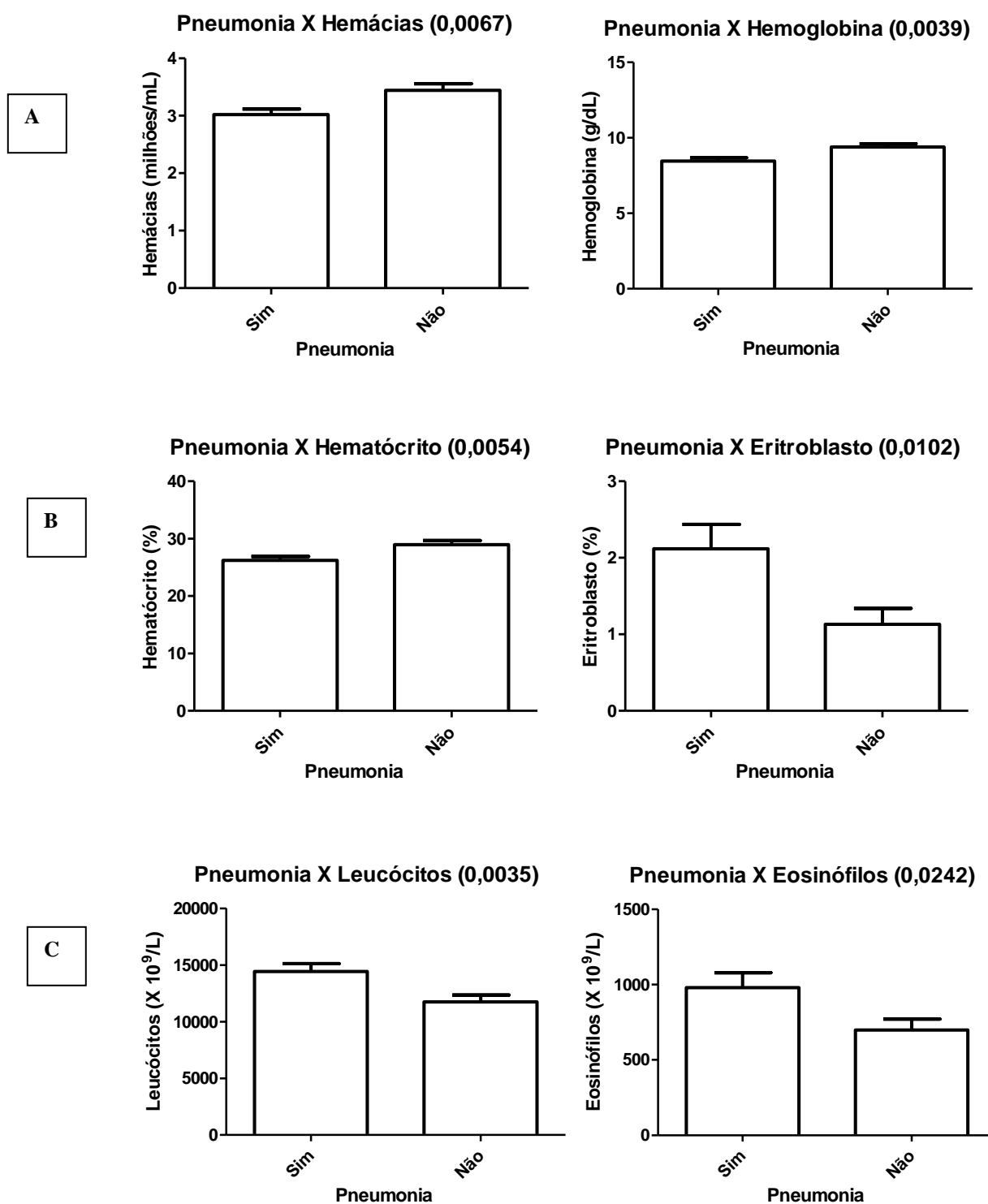
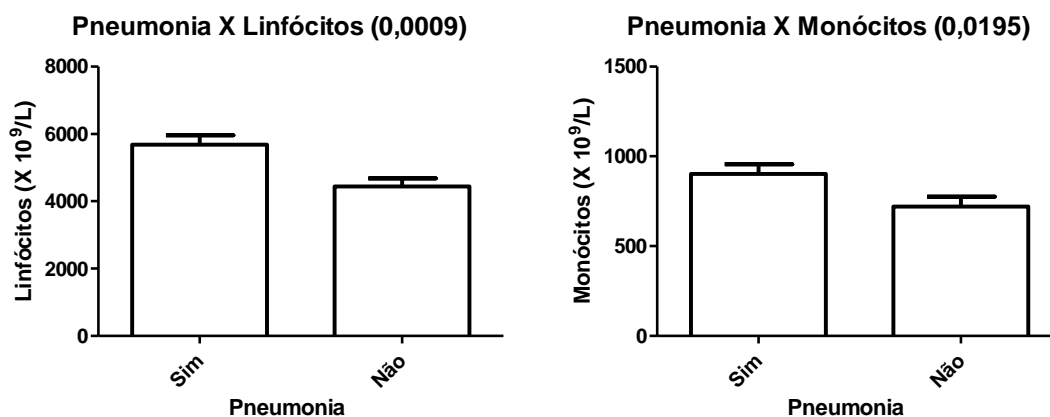
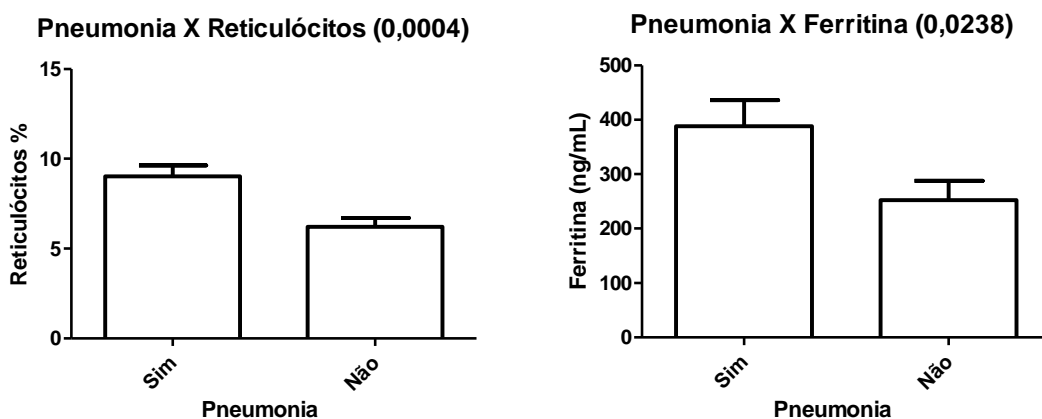


Figura 7. Em A, B e C. Representação gráfica da análise do histórico de pneumonia e sua associação com os valores médios de variáveis hematológicas em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.

A



B



C

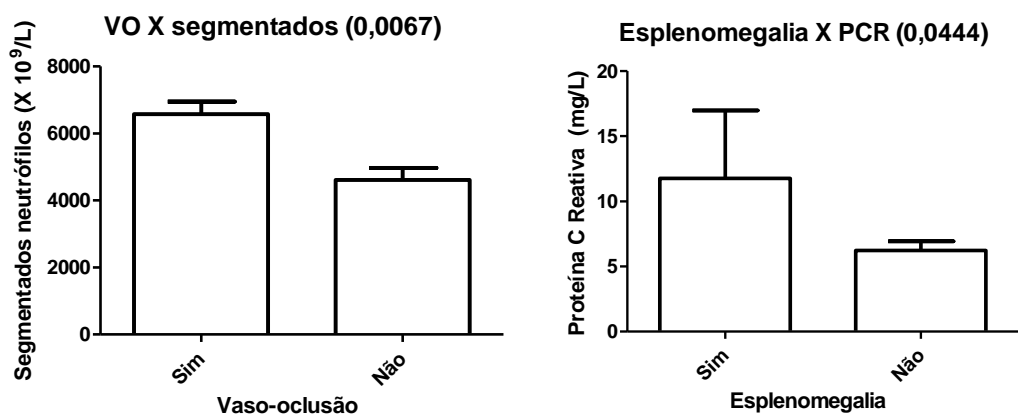


Figura 8. Em A e B: Representação gráfica da análise do histórico de pneumonia e sua associação com os valores médios de variáveis hematológicas e bioquímicas (ferritina). Em C: Análise do histórico de vaso-oclusão e segmentados neutrófilos e de esplenomegalia e PCR em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.

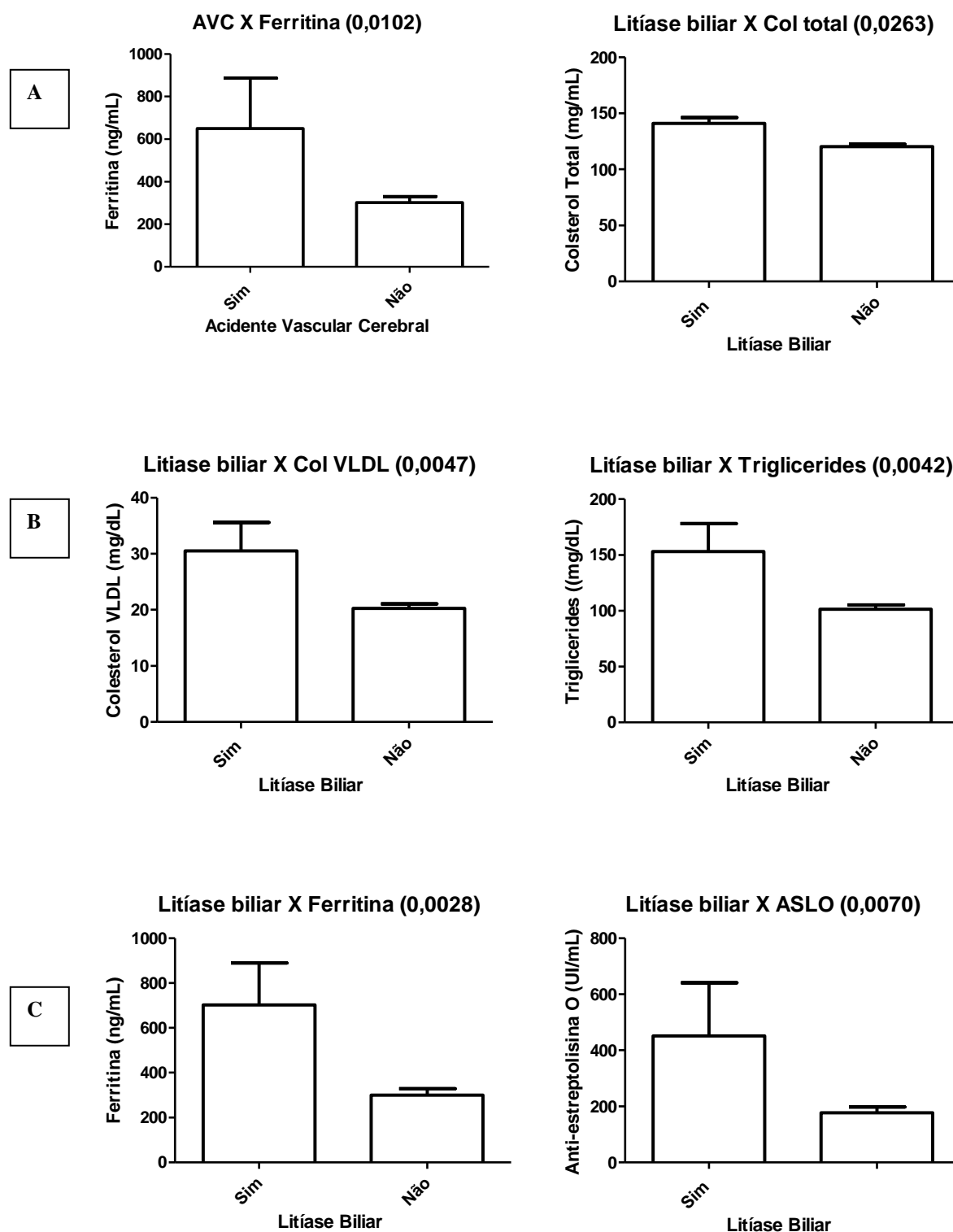


Figura 9. Em A, B e B: Representação gráfica da análise do histórico de AVC com as concentrações de ferritina e do histórico de litíase biliar com as concentrações de colesterol total, colesterol VLDL, triglicérides, ferritina e ASLO em pacientes com doença falciforme de Salvador-Bahia.

6.6. DISTRIBUIÇÃO DOS MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS NA CULTURA DE OROFARINGE E DE NASOFARINGE E OS TESTES DE SENSIBILIDADE MICROBIANA NOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

A cultura da orofaringe e da nasofaringe permitiu o encontro de vários microorganismos, entre eles o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus pneumoniae* (Tabela 9).

Na tabela estão mostrados os resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos das com *Streptococcus pneumoniae* e os seus respectivos sorotipos (Tabela 10).

Tabela 9. Perfil de microorganismos encontrados na análise das secreções de nasofaringe e orofaringe dos pacientes com doença falciforme

	Pacientes Doença Falciforme N (%)	Pacientes Anemia Falciforme N (%)	Pacientes Doença SC N (%)
Microorganismo/ Cultura da Secreção da nasofaringe			
0- Flora Normal	73 (51)	47 (47,5)	26 (59,1)
1- <i>Staphylococcus aureus</i>	64 (44,8)	46 (46,5)	18 (40,9)
2- <i>Streptococcus pneumoniae</i>	4 (2,8)	4 (4)	0 (0)
3- <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	1 (0,7)	1 (1)	0 (0)
4- <i>Streptococcus pyogenes</i>	1 (0,7)	1 (1)	0 (0)
Total	143 (100)	99 (100)	44 (100)
Microorganismo/ Cultura da Secreção da orofaringe			
0- Flora Normal	89 (62,2)	63 (64)	26 (59,1)
1- <i>Streptococcus pyogenes</i>	20 (14)	13 (13)	7 (15,9)
2- <i>Streptococcus pneumoniae</i>	10 (7,0)	7 (7)	3 (6,8)
3- <i>Enterobacter gergoviae</i>	1 (0,7)	1 (1)	0 (0)
4- <i>Staphylococcus aureus</i>	17 (11,9)	11 (11)	6 (13,6)
5- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 (1,4)	1 (1)	1 (2,3)
6- <i>Enterobacter aerogenes</i>	1 (0,7)	1 (1)	0 (0)
7- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 (2,1)	2 (2)	1 (2,3)
Total	143 (100)	99 (100)	44 (100)

Tabela 10. Perfil de antibiograma e sorotipos encontrados nas amostras de secreção de nasofaringe e orofaringe colonizadas pelo *Streptococcus pneumoniae* nos pacientes com doença falciforme

Paciente	Origem da amostra	Penicilina (E-test)	Cefaloxina (E-test)	TMP/SMX	Eritromicina	Clindamicina	Sorotipo
1	Naso	S	S	R* * *	S* *	S	NT*
2	Naso	S	S	R	S	S	19F
3	Oro	S	S	R	S	S	19F
4	Oro	S	S	S	S	S	23F
5	Naso	S	S	S	S	S	4
6	Naso	S	S	R	S	S	19A
7	Naso	S	S	R	S	S	14
8	Naso	S	S	R	S	S	14
9	Naso	S	S	R	S	S	14
10	Oro	S	S	R	S	S	12F
11	Oro	S	S	R	S	S	9V
12-1#	Oro col 1	S	S	R	S	S	23F
12-2#	Oro col 2	S	S	R	S	S	3
13	Naso	S	S	R	S	S	19F
14	Oro	S	S	R	S	S	23F
15	Oro	S	S	S	S	S	23F
16	Oro	S	S	S	S	S	23A

*NT= Não tipável; * * S= Sensível; * * * R= Resistente; # Paciente colonizado com dois sorotipos

TMP/SMX= Trimetopim/ Sulfametoxazona

9.7. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS E MARCADORES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

A análise da associação dos dados hematológicos e bioquímicos com a colonização da nasofaringe e da orofaringe mostrou diferenças estatisticamente significativas para algumas variáveis estudadas.

A colonização da orofaringe pelo *Staphylococcus aureus* e pelo *Streptococcus pneumoniae* apresentou associação significativa para os valores de ferritina (ng/mL), com média e desvio padrão de $245,1 \pm 240,8$ para os indivíduos que apresentaram a microbiota normal (89/116); de $627,6 \pm 624,4$ para os indivíduos colonizados pelo *Streptococcus pneumoniae* (10/116) e de $460,6 \pm 613,7$ para aqueles que apresentaram colonização pelo *Staphylococcus aureus* (17/116), com $p=0,0016$. A análise foi também significativa quando se analisou os valores de ferritina nos indivíduos com microbiota normal e colonização pelo *Staphylococcus aureus* ($p=0,0144$) e na microbiota normal e colonização pelo *Streptococcus pneumoniae* ($p<0,0001$) (**Figura 10**).

A análise estatística entre os marcadores bioquímicos e a presença de colonização na nasofaringe pelo *Staphylococcus aureus* e pelo *Streptococcus pneumoniae* mostrou significância para os valores de ferritina, com média e desvio padrão de $265,0 \pm 325,0$ para os indivíduos que apresentaram a microbiota normal (73/141); de $336,8 \pm 383,1$ para os indivíduos colonizados pelo *Staphylococcus aureus* (64/141) e de $1.144 \pm 641,8$ para aqueles que apresentaram colonização pelo *Streptococcus pneumoniae* (4/141), com $p<0,0001$. A análise foi também significativa quando se comparou os valores de ferritina na presença da microbiota normal e da colonização da nasofaringe pelo *Streptococcus pneumoniae*, com $p<0,0001$ (**Figura 11**).

A análise estatística para os valores de ALT (U/L) mostrou significância estatística, com média e desvio padrão de $48,42 \pm 22,19$ para os indivíduos que apresentaram a microbiota normal (73/141); de $48,38 \pm 28,55$ para os indivíduos colonizados pelo *Staphylococcus aureus* (64/141) e de $85,50 \pm 29,22$ para aqueles com colonização pelo *Streptococcus pneumoniae* (4/141), com $p=0,02$. A análise foi também significativa quando

se comparou os valores de ALT na presença da microbiota normal e da colonização da nasofaringe pelo *Streptococcus pneumoniae*, com $p=0,002$ (**Figura 11**).

A análise estatística para os valores de AST (U/L) mostrou significância estatística, com média e desvio padrão de $26,21 \pm 16,76$ para os indivíduos que apresentaram a microbiota normal (73/141); de $28,02 \pm 21,87$ para os indivíduos colonizados pelo *Staphylococcus aureus* (64/141) e de $79,25 \pm 43,15$ para aqueles com colonização pelo *Streptococcus pneumoniae* (4/141), com $p<0,0001$. A análise foi também significativa quando se comparou os valores de AST na presença da microbiota normal e da colonização da nasofaringe pelo *Streptococcus pneumoniae*, com $p<0,0001$ (**Figura 11**).

A análise estatística para os valores de VCM (fl) mostrou significância estatística, com média e desvio padrão de $85,49 \pm 9,561$ para os indivíduos que apresentaram a microbiota normal (73/141); de $90,10 \pm 11,94$ para os indivíduos colonizados pelo *Staphylococcus aureus* (64/141) e de $80,90 \pm 76,21$ para aqueles com colonização pelo *Streptococcus pneumoniae* (4/141), com $p<0,0214$. A análise foi também significativa quando se comparou os valores de VCM na presença da microbiota normal e da colonização da nasofaringe pelo *Staphylococcus aureus*, com $p<0,0133$ (**Figura 11**).

A análise estatística para os valores de HCM (pg) mostrou significância estatística, com média e desvio padrão de $27,67 \pm 3,407$ para os indivíduos que apresentaram a microbiota normal (73/141); de $29,18 \pm 4,028$ para os indivíduos colonizados pelo *Staphylococcus aureus* (64/141) e de $25,790 \pm 2,478$ para aqueles com colonização pelo *Streptococcus pneumoniae* (4/141), com $p<0,0232$. A análise foi também significativa quando se comparou os valores de HCM na presença da microbiota normal e da colonização da nasofaringe pelo *Staphylococcus aureus*, com $p<0,0191$ (**Figura 12**).

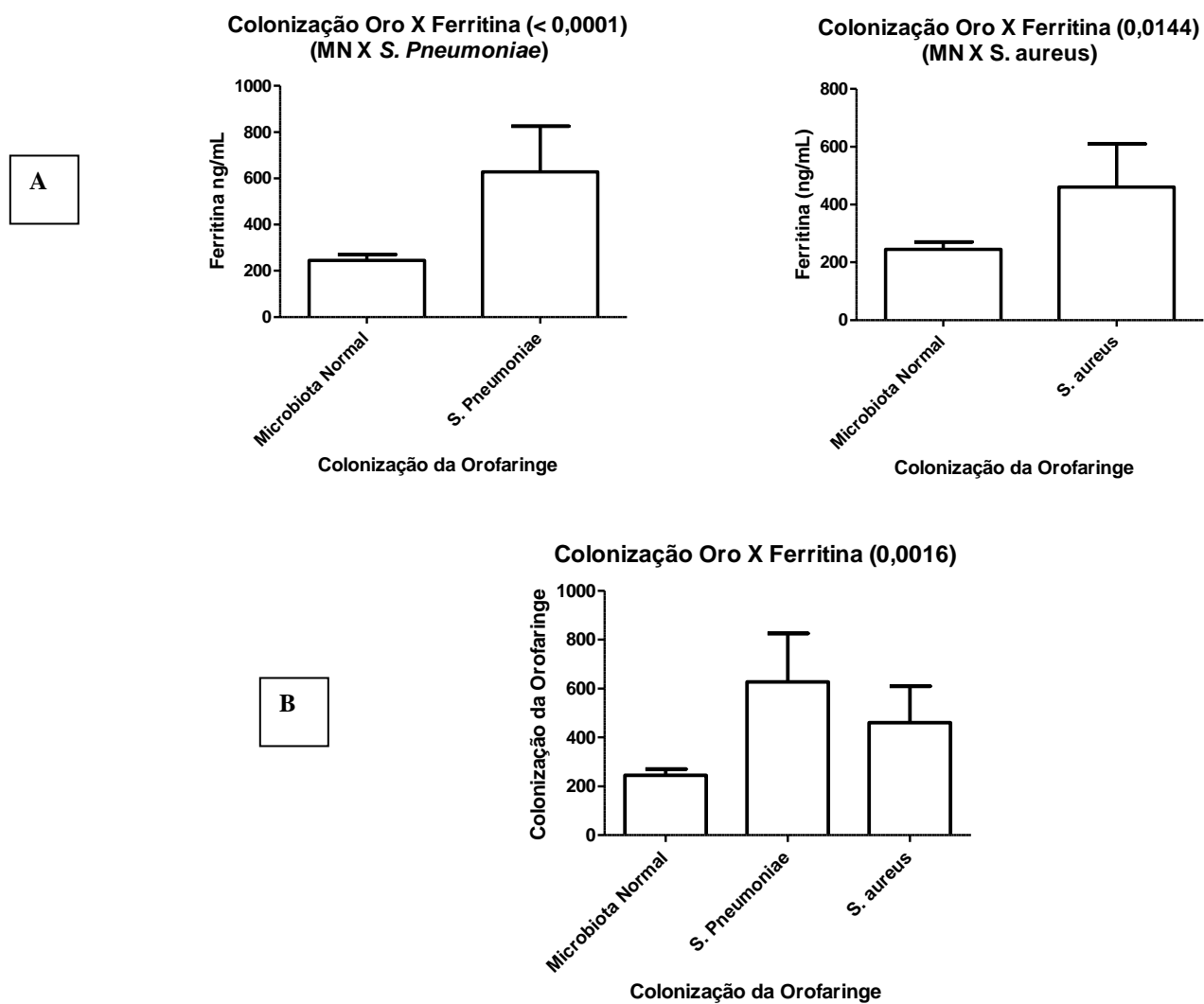


Figura 10. Em A e B. Representação gráfica da análise da colonização da orofaringe pela microbiota normal, pelo *Staphylococcus aureus* e pelo *Streptococcus pneumoniae* e sua associação com valores de ferritina (ng/mL). ANOVA e Kruskal-Wallis.

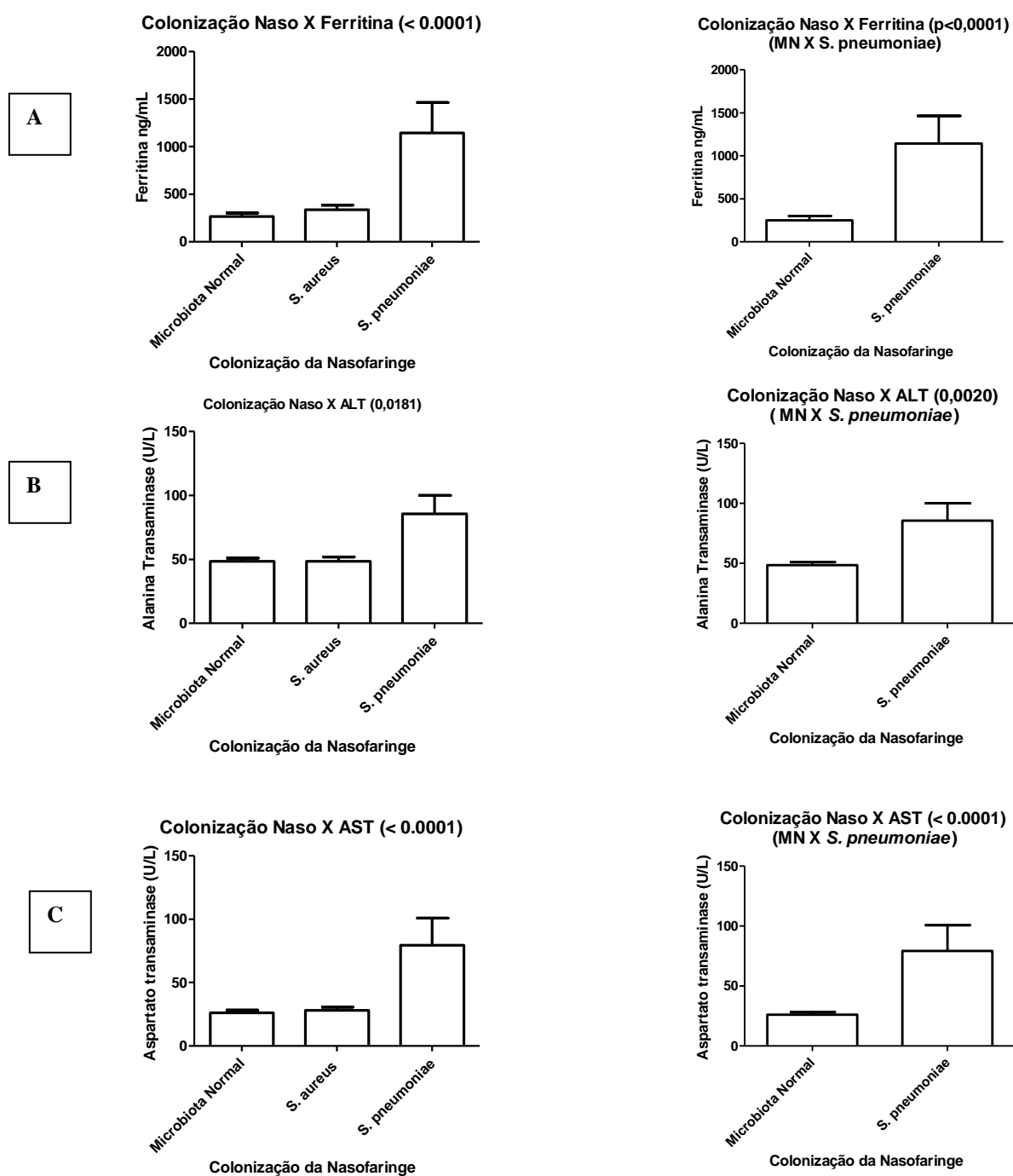


Figura 11. Em A, B e C. Representação gráfica da análise da colonização da nasofaringe pela microbiota normal, pelo *Staphylococcus aureus* e pelo *Streptococcus pneumoniae* e sua associação com variáveis bioquímicas. ANOVA e Kruskal-Wallis.

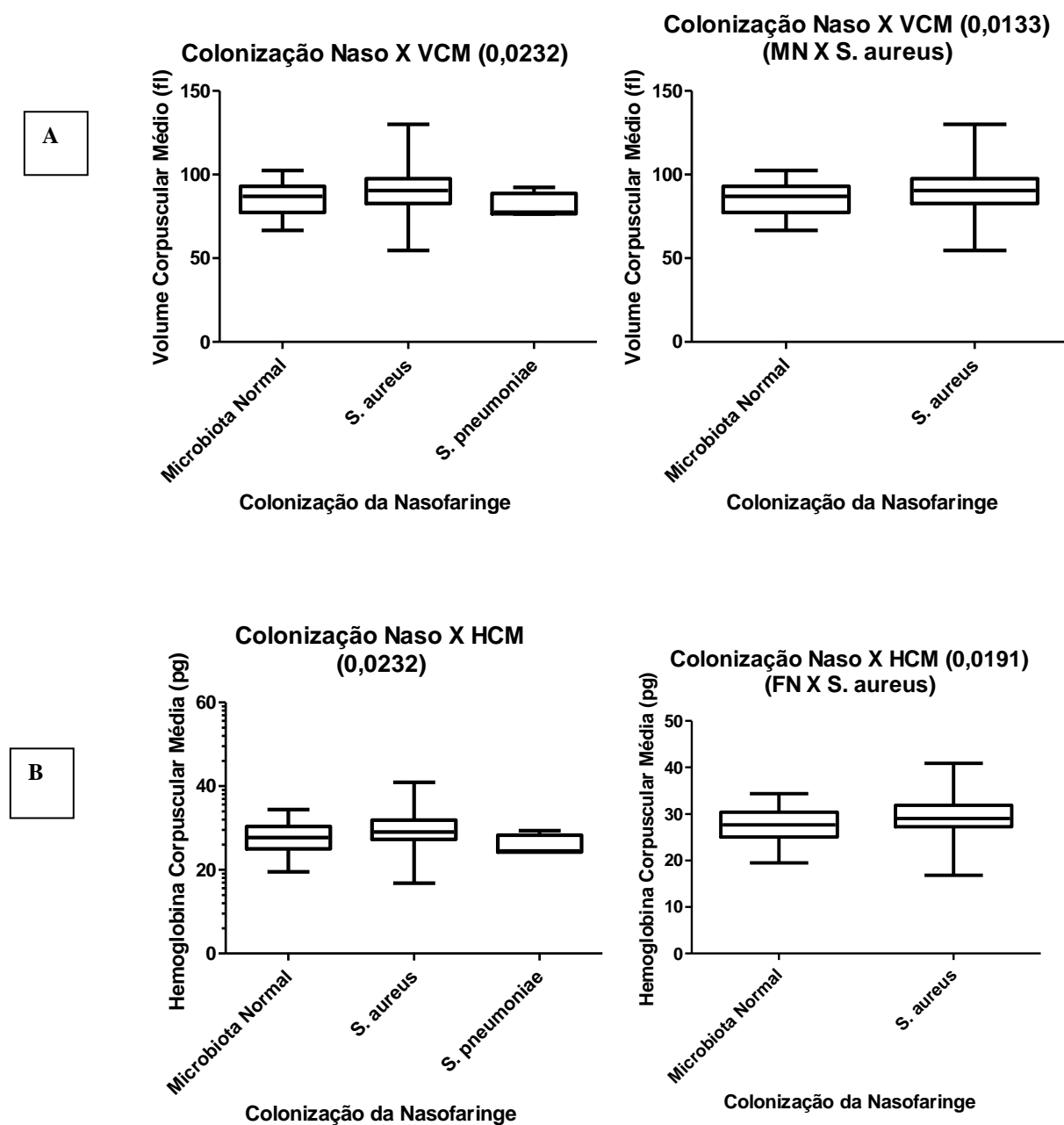


Figura 12. Em A e B. Representação gráfica da análise da colonização da nasofaringe pela microbiota normal, pelo *Staphylococcus aureus* e pelo *Streptococcus pneumoniae* e sua associação com variáveis hematológicas. ANOVA e Kruskal-Wallis.

9.8. MODELOS DE ANÁLISE MULTIVARIADA COM AS VARIÁVEIS DEPENDENTES DE INFECÇÃO, PNEUMONIA E VASO-OCCLUSÃO

Os modelos de análise multivariada foram aplicados e avaliados por regressão logística, colocando a ocorrência de infecção, pneumonia e vaso-oclusão como variáveis dependentes. As variáveis de colonização por microorganismos na orofaringe e nasofaringe foram também incorporadas aos modelos, que foram construídos com a incorporação de variáveis significativas e não significativas.

As análises que tiveram a ocorrência de infecção como variável dependente abrangeram 11 modelos, que demonstraram a influência do número de leucócitos e da colonização da orofaringe como fatores de risco para a infecção (**Tabelas 11 e 12**).

As análises que tiveram a ocorrência de pneumonia como variável dependente abrangeram 4 modelos, que demonstraram a influência do genótipo do padrão de hemoglobina como fator de risco para a ocorrência de pneumonia (**Tabelas 13**).

As análises que tiveram a ocorrência de vaso-oclusão como variável dependente abrangeram 7 modelos, que demonstraram a influência do número de segmentados neutrófilos como fator de risco para a ocorrência de vaso-oclusão (**Tabelas 14**).

Tabela 11. Modelos de análise multivariada no grupo de pacientes com doença falciforme com a inclusão de infecção como variável dependente.

Infecção= ter histórico de infecção

INFECCÃO

<i>Variáveis</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Wald teste</i>	<i>Valor de P</i>	<i>Razão de Prevalência</i>	<i>Intervalo de Confiança 95%</i>
Modelo 1						
NASO	-0,3052	0,4490	0,4619	0,4968	0,7370	0,3057-1,7770
AIATS	0,2461	0,3585	0,4714	0,4923	1,2791	0,6335-2,5825
MPO	-0,1288	0,5224	0,0804	0,7768	0,8792	0,3609-2,1417
LEUCO	1,2277	0,4716	6,7781	0,0092	3,4134	1,3545-8,6017
ASLO	0,2908	0,5225	0,3099	0,5778	1,3376	0,4804-3,7243
Modelo 2						
ORO	0,9466	0,4767	3,9424	0,0471	2,5769	1,0123- 6,5600
FERRI	-0,0509	0,5033	0,0102	0,9195	0,9504	0,3544- 2,5489
PCR	0,633	0,5037	0,0158	0,9000	1,0653	0,3969- 2,8592
AIATS	0,3841	0,4437	0,7492	0,3867	1,4683	0,6153- 3,5037
MPO	-0,1945	0,4422	0,1935	0,6600	0,8233	0,3461- 1,9584
Modelo 3						
ORO	1,4453	0,5414	7,1252	0,0076	4,2430	1,4682- 12,2615
MPO	-0,2705	0,4863	0,3093	0,5781	0,7630	0,2942- 1,9792
ASLO	0,9953	0,5819	2,9261	0,872	2,7057	0,8649- 8,4638
PCR	-0,2831	0,5447	0,2701	0,6032	0,7535	0,2591- 2,1912
AIATS	0,2519	0,4874	0,2671	0,6053	1,2865	0,4949- 2,9790
RET	0,1226	0,4944	0,0615	0,8041	1,1304	0,4290- 2,9790
Modelo 4						
ORO	1,1747	0,5154	5,1950	0,0227	3,2373	1,1789- 8,8901
FERRI	-0,3107	0,5285	0,3456	0,5566	0,7330	0,2602- 2,0650
LEUCO	1,3491	0,4812	7,8585	0,0051	3,8538	1,5006- 9,8973
LDH	0,4502	0,4665	0,9314	0,3345	1,5687	0,6287- 3,9140
MPO	-0,3538	0,4826	0,5373	0,4635	0,7020	0,2726- 1,8079
ASLO	0,4459	0,5538	0,6484	0,4207	1,5619	0,5275- 4,6246
Modelo 5						
ORO	1,5880	0,5676	7,8284	0,0051	4,8941	1,6090- 14,8864
NASO	-0,3988	0,4904	0,6611	0,4162	0,6711	0,2567- 1,7550
MPO	-0,3064	0,5008	0,3743	0,5407	0,7361	0,2759- 1,9643
AIATS	0,3537	0,3665	0,9313	0,3345	1,4244	0,6944- 2,9215
RET	0,0679	0,5021	0,0183	0,8925	1,0702	0,4001- 2,8631
ASLO	0,9943	0,5916	2,8247	0,0928	2,7027	0,8477- 8,6169
PCR	-0,2094	0,5557	0,1420	0,7063	0,8111	0,2729- 2,4103
TAL	-0,3400	0,5966	0,3247	0,2211	0,7118	0,2211- 2,2918
Modelo 6						
SEG	-0,9771	0,8333	1,3752	0,2409	0,3464	0,0735- 1,9271
PLAQ	0,1599	0,4480	0,1274	0,7211	1,1734	0,4877- 2,8236
RET	-0,3847	0,4754	0,6547	0,4185	0,6807	0,2681- 1,7283
LEUCO	1,8107	0,8390	4,6573	0,0309	6,1145	1,1808- 31,6621
IDADE	0,0624	0,4128	0,228	0,8799	1,0644	0,4740- 2,3903
EHB	0,1499	0,5222	0,824	0,7741	0,1617	0,4174- 3,2332

NASO=positivo para colonização

AIATS \geq a média (191 UI/mL)

MPO= mutante

LEUCO \geq a média (13.081 X 10⁹/L)

ASLO \geq a média (191,25 UI/mL)

ORO= positivo para colonização

FERRI \geq a média (320,16ng/mL)

LDH \geq a média (856,41U/L)

EHB= perfil eletroforético SS

TAL= mutante (homozigoto + heterozigotos)

RET \geq a média (7,62%)

Tabela 12. Continuação da tabela 11.

INFECCÃO

<i>Variáveis</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Wald teste</i>	<i>Valor de P</i>	<i>Razão de Prevalência</i>	<i>Intervalo de Confiança 95%</i>
Modelo 7						
LEUCO	1,2179	0,4808	6,4173	0,0113	3,3800	1,3173- 8,6723
ORO	1,1322	0,5110	4,9093	0,0267	3,1025	1,1396- 8,4462
ASLO	0,5821	0,5546	1,1013	0,2940	1,7897	0,6035- 5,3075
AIATS	0,3427	0,4118	0,6925	0,4053	1,4087	0,6285- 3,1576
MPO	-0,2507	0,4745	0,2791	0,5973	0,7783	0,3071- 1,9726
Modelo 8						
ORO	1,2528	0,5001	6,2743	0,0123	3,5000	1,3133- 9,3279
SEG	-1,4221	0,8767	2,6312	0,1048	0,2412	0,433- 1,3447
RET	-0,6209	0,5125	1,4679	0,2257	0,5375	0,1969- 1,4674
LEUCO	2,2564	0,8752	6,6469	0,0099	9,5491	1,7178- 53,0824
IDADE	0,2835	0,4676	0,3676	0,5443	1,3278	0,5310- 3,3204
PLAQ	0,0694	0,5219	0,0177	0,8942	1,0719	0,3854- 2,9813
EHB	0,1396	0,5951	0,0551	0,8145	1,1499	0,3581- 3,6917
Modelo 9						
ORO	1,5902	0,5374	8,7557	0,0031	4,9048	1,7107- 14,0628
SEG	-1,5627	0,7895	3,9177	0,478	0,2096	0,446- 0,9848
LEUCO	2,1797	0,7687	8,0398	0,0046	8,8439	1,9602- 39,9025
PLAQ	0,0416	0,5254	0,0063	0,9369	1,0425	0,1554- 1,2470
EHB	0,6092	0,6239	0,9532	0,3289	1,8389	0,5413- 6,2467
IDADE	0,4699	0,5334	0,7763	0,3783	1,5999	0,5625- 4,5507
SEXO	0,6091	0,4652	1,7142	0,1904	1,8388	0,7388- 4,5764
RET	-0,8204	0,5312	2,3854	0,1225	0,4402	0,1554-1,2470
Modelo 10						
ORO	1,4077	0,5104	7,6077	0,0058	4,0866	1,5029- 11,1122
SEG	-1,4629	0,7733	3,5789	0,0585	0,2316	0,0509- 1,0541
LEUCO	2,1023	0,7556	7,7415	0,0054	8,1846	1,8615- 35,9860
PLAQ	0,0701	0,5176	0,0184	0,8922	1,0727	0,3889- 2,9584
RET	-0,6887	0,5111	1,8154	0,1779	0,5022	0,1844-1,3677]
EHB	0,4559	0,6065	0,5650	0,4523	1,5776	0,4805- 5,1795
IDADE	0,4294	0,5261	0,6664	0,4143	1,5364	0,5479- 4,3080
Modelo 11						
ORO	1,3540	0,5090	7,0751	0,0078	3,8729	1,4280- 10,5036
LEUCO	2,3153	0,8389	7,6178	0,0058	10,1279	10,1279- 52,4275
SEG	-1,6667	0,8542	3,8073	0,0510	0,1889	0,0354- 1,0075
PLAQ	0,0256	0,5149	0,9603	0,9603	1,0260	0,3740- 2,8148
EHB	0,3974	0,3974	0,4248	0,5145	1,4879	0,4504- 4,9156
RET	-0,6752	0,5194	1,6897	0,1036	0,5091	0,1839- 1,4090

SEG \geq a média (13.081 X 10⁹/L)
SEXO = feminino

Tabela 13. Modelos de análise multivariada no grupo de pacientes com doença falciforme com a inclusão de pneumonia como variável dependente.

<i>PNEUMONIA</i>						
<i>Variáveis</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Wald teste</i>	<i>Valor de P</i>	<i>Razão de Prevalência</i>	<i>Intervalo de Confiança 95%</i>
Modelo 1						
SEG	-0,1696	0,5890	0,8293	0,7733	0,8440	0,2661- 2,6772
PLAQ	0,5888	0,4361	1,8229	0,1770	1,8017	0,7665- 4,2351
RET	0,1406	0,4469	0,0990	0,7531	1,1510	0,4793- 2,7637
LEUCO	0,3156	0,6099	0,2677	0,6048	1,3711	0,4149- 4,5310
EHB	1,4699	0,5403	7,4010	0,0065	4,3489	1,5082- 12,5398
ORO	0,3235	0,4269	0,5741	0,4486	1,3819	0,5985- 3,1906
Modelo 2						
SEG	-0,1310	0,5862	0,0500	0,8231	0,8772	0,2781- 2,7671
PLAQ	0,5964	0,4360	1,8713	0,1713	1,8156	0,7725- 4,2670
RET	0,1431	0,4450	0,1034	0,7478	1,1538	0,4823- 2,7603
LEUCO	0,3091	0,6092	0,2574	0,6119	1,3622	0,4127- 4,4961
	1,4423	0,4116	7,0774	0,0078	4,2303	1,4618- 12,2418
EHB	-0,0240	0,4528	0,0034	0,9535	0,9763	0,4357- 2,1875
NASO						
Modelo 3						
SEG	-0,2111	0,6010	0,1234	0,7254	0,8097	0,2493- 2,6294
PLAQ	0,5581	0,4406	1,6046	0,2053	1,7474	0,7368- 4,1440
RET	0,1157	0,4490	0,0665	0,7966	1,1227	0,4657- 2,7066
LEUCO	0,3821	0,6221	0,3773	0,5390	1,4654	0,4329- 4,9601
EHB	1,4872	0,5487	7,3451	0,0067	4,4245	1,5093- 12,9704
NASO	-0,0241	0,4116	0,0034	0,9533	0,9762	0,4357- 2,1870
IDADE	0,2689	0,4286	0,3037	0,5304	1,3086	0,5649- 3,0312
Modelo 4						
SEG	-0,2519	0,6052	0,1732	0,6773	0,7773	0,2374- 2,5455
PLAQ	0,5487	0,4412	1,5463	0,2137	1,7309	0,7290- 4,1101
RET	0,1130	0,4509	0,0627	0,8022	1,1196	0,4626- 2,7094
LEUCO	0,3921	0,6243	0,3945	0,5300	1,4801	0,4354- 5,0311
EHB	1,5152	0,5475	7,6594	0,0056	4,5502	1,5560- 13,3059
ORO	0,3232	0,4274	0,5720	0,4495	1,3816	0,5978- 3,1927
IDADE	0,2695	0,4307	0,3914	0,5316	1,3093	0,5978- 3,1927

Pneumonia= ter histórico de pneumonia

Tabela 14. Modelos de análise multivariada em pacientes com doença falciforme com a inclusão de vaso-oclusão como variável dependente

VASO-OCCLUSÃO						
<i>Variáveis</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Wald teste</i>	<i>Valor de P</i>	<i>Razão de Prevalência</i>	<i>Intervalo de Confiança 95%</i>
Modelo 1						
SEG	2,5988	0,8571	9,1936	0,0024	13,4480	2,5066- 72,1492
PLAQ	-1,1477	0,5838	3,8649	0,0493	0,3174	0,1011- 0,9965
RET	-0,0483	0,6041	0,0064	0,9362	0,9528	0,2916- 3,1131
LEUCO	-0,9288	0,7514	1,5277	0,2165	0,3950	0,0906- 1,7229
SEXO	0,1817	0,4864	0,1395	0,7087	1,1992	0,4623- 3,1110
IDADE	0,2562	0,5110	0,2514	0,6161	1,2920	0,4746- 3,5177
EHB	0,9934	0,6560	2,2932	0,1299	2,7003	0,7465- 9,7672
Modelo 2						
SEG	2,6090	0,8556	9,2993	0,0023	13,5860	2,5400- 72,6700
PLAQ	1,1662	0,5826	4,0068	0,0453	0,3115	0,0994- 0,9760
RET	-0,0126	0,5938	0,0005	0,9830	0,9874	0,3084- 3,1619
LEUCO	-0,9573	0,7460	1,6470	0,1994	0,3839	0,0890- 1,6565
IDADE	0,2499	0,5104	0,2397	0,6244	1,2839	0,4721- 3,4912
EHB	0,9771	0,6545	2,2285	0,1355	2,6567	0,7366- 9,5822
Modelo 3						
SEG	-0,1696	0,5890	0,0829	0,7733	0,8440	0,2661- 2,6772
PLAQ	0,5888	0,4361	1,8229	0,1770	1,8017	0,7665- 4,2351
RET	0,1406	0,4469	0,0990	0,7531	1,1510	0,4793- 2,7637
LEUCO	0,3156	0,6099	0,2677	0,6048	1,3711	0,4149- 4,5310
EHB	1,4699	0,5403	7,4010	0,0065	4,3489	1,5082- 12,5398
ORO	0,3235	0,4269	0,5741	0,4486	1,3819	0,5985- 3,1906
Modelo 4						
LEUCO	-0,7748	0,6685	1,3433	0,2465	0,4608	0,1243- 1,7082
SEG	2,4801	0,8166	9,2239	0,0024	11,9424	2,4099- 59,1814
PLAQ	-0,8292	0,5106	2,6368	0,1044	0,4364	0,1604- 1,1873
RET	0,2910	0,5437	0,2866	0,5924	1,3378	0,4609- 3,8828
Modelo 5						
SEG	2,4636	0,8257	8,9017	0,0028	11,7472	2,3285- 59,2649
PLAQ	-0,8229	0,5162	2,5407	0,1109	0,4392	0,1597- 1,2080
RET	0,2748	0,5485	0,2509	0,6164	1,3162	0,4492- 3,8569
LEUCO	-0,7455	0,6903	1,1664	0,2801	0,4745	0,1226- 1,8357
SEXO	0,1044	0,4757	0,0482	0,8263	1,1100	0,4369- 2,8203
IDADE	0,0504	0,4961	0,0103	0,9191	1,0516	0,3978- 2,7804
Modelo 6						
LEUCO	-0,9802	0,7045	1,9357	0,1641	0,3752	0,0943- 1,4928
LDH	0,2422	0,5299	0,2089	0,6476	1,2741	0,4509- 3,5998
FERRI	0,4052	0,6040	0,4500	0,5023	1,4996	0,4590- 4,8988
SEG	2,5602	0,8474	9,1289	0,0025	12,9384	2,4582- 68,0998
PLAQ	0,8683	0,5297	2,6869	0,1012	0,4197	0,1486- 1,1852
RET	0,3048	0,5832	0,2732	0,6012	1,3564	0,4325- 4,2542
Modelo 7						
SEG	1,9309	0,6562	8,6576	0,0033	6,8956	1,9054- 24,9552
PLAQ	-0,7166	0,4985	2,0661	0,1506	0,4884	0,1838- 1,2976
RET	0,0638	0,5038	0,160	0,8993	1,0659	0,3970- 2,8613

Vaso-oclusão= ter histórico de vaso-oclusão

7. DISCUSSÃO

A doença falciforme apresenta importância epidemiológica devido a sua prevalência e morbimortalidade mundialmente elevada (NATHAN & OSKITS, 1998; QUINN *et al.*, 2004). A variabilidade clínica e os diversos fatores que modulam a expressão da doença são fundamentais para o conhecimento das características populacionais de cada região no que se refere à melhoria da assistência aos pacientes, possibilitando modificar a história natural da doença (ADORNO *et al.*, 2008; WILLIAMS *et al.*, 2009).

O presente estudo avaliou 154 crianças com DF, sendo que 28,6% destas apresentaram idade menor ou igual a 5 anos. A proporção menor de crianças como menores de 5 anos já era esperada, uma vez que o Instituição responsável oficial pela triagem neonatal no Estado da Bahia, a APAE, também acompanha crianças até a idade próxima a 3 anos, que são em seguida encaminhadas para seguimento clínico a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA).

As determinações bioquímicas são importantes para o acompanhamento da evolução clínica do paciente com DF. Neste estudo foram realizadas análises de moléculas relacionadas ao perfil lipídico, hepático, renal, inflamatório e de marcadores de hemólise nesses pacientes. As crianças com AF apresentaram diferenças significativas em praticamente todas as análises quando comparadas àquelas do grupo HbSC, corroborando com os resultados de Seixas e colaboradores (2010) que estudaram crianças com DF do mesmo grupo populacional, mas também confirmando dados já existentes na literatura e relativos a gravidade clínica da AF quando comparada com outras doenças falciformes (STEINBERG, 2001).

Dentre os marcadores bioquímicos analisados foram destacados aqueles associados à inflamação, hemólise, infecção e estresse oxidativo, com ênfase para o grupo de pacientes que apresentaram concentrações séricas de ferritina acima do valor médio estabelecido para o grupo ($\geq 320,16$), por ser uma proteína que aumenta em processos inflamatórios e infecciosos e por representar um alerta quanto ao acúmulo de ferro nesses pacientes (ROGERS *et al.*, 1996; KALANTAR-ZADEH, 2001; KALENDER *et al.*, 2002). A doença falciforme já é considerada como situação em que está presente o estado “pró-inflamatório” e a ativação endotelial anormal (HEBBEL, 2004). Em condições basais, a

ferritina é uma proteína importante para a manutenção das reservas de ferro no organismo. Entretanto, durante processos inflamatórios, a ferritina está associada à regulação exercida pela hepcidina e pelos níveis de interleucina-6 (IL-6), além da influência de outras citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) (BARTON JC et al., 2010.) As citocinas também induzem, indiretamente, a síntese de ferritina, uma vez que aumentam a incorporação de ferro pelos hepatócitos (BAYNES *et al.*, 1986; JURADO, 1997). A associação do estado inflamatório crônico ao processo hemolítico crônico (HEBBEL, 2008) sustenta a tendência de valores de ferritina elevados nos pacientes com DF, como marcador de gravidade clínica.

A enzima LDH vem sendo descrita como marcador da modulação clínica da DF, principalmente devido a sua associação ao quadro clínico de hiper-hemólise e hipertensão pulmonar (STEINBERG, 2005; KATO *et al.*, 2007, TAYLOR VI *et al.*, 2008). A desidrogenase láctica é geralmente utilizada como marcador de hemólise, devido a sua abundância nos eritrócitos. Akinola e colaboradores (1992) avaliaram indivíduos com DF no Reino Unido e observaram o aumento nos níveis séricos de PCR e da LDH em indivíduos em estado estável da doença. No presente estudo também foi evidenciado o aumento relevante da LDH pela sua associação a fatores de gravidade clínica na DF, tais como concentrações diminuídas de hemoglobina, contagem diminuída de eritrócitos e aumento de leucócitos, corroborando com estudos anteriores (MULLER, 2001; STEINBERG, 2001; OKPALA, 2004)

A média da LDH sérica nos indivíduos com DF do nosso estudo foi de 856,41 U/L (VR = 207 a 414 U/L), sendo que está associada de maneira significativa ao aumento de marcadores relacionados à hemólise. Esse fato corrobora com Taylor VI e colaboradores (2008) que estudaram 700 pacientes com DF nos Estados Unidos e sugeriram que a hiper-hemólise crônica associada aos níveis de LDH surge como um novo sub-fenótipo clínico da doença. Os dados apresentados neste estudo corroboram com estudos anteriores que também revelaram correlação positiva entre a LDH e marcadores de função hepática, renal e metabolismo de lipídios, sugerindo que esta enzima, além de ser um marcador de hemólise, também pode ser marcador do comprometimento múltiplo de órgãos na DF (TAYLOR IV et al., 2008; Seixas *et al.*, 2010).

Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram a associação positiva entre níveis elevados de ferro sérico ($\geq 122,27$ mcg/dL) e marcadores de hemólise. O aumento de agentes oxidantes decorrentes do metabolismo do ferro e do aumento da hemólise intravascular, dentre outros fatores foi correlacionado ao aumento do consumo de óxido nítrico (NO) (ASLAN *et al.*, 2001; REITER *et al.*, 2002). Esse fato pode reduzir ainda mais a capacidade antioxidante nos indivíduos com DF (GLADWIM *et al.*, 2003).

A mieloperoxidase é uma enzima encontrada nos lisossomos de neutrófilos e monócitos e sua deficiência está associada à susceptibilidade a processos inflamatórios crônicos (LONDON, 1997). A associação do polimorfismo -463G>A no gene da *MPO* e a ocorrência de infecções bacterianas graves em pacientes com AF foi descrita por Costa e colaboradores (2005), que associaram o alelo mutante (A) a ocorrência elevada de infecções em indivíduos com DF. A análise dos resultados do presente estudo não encontrou a associação entre o alelo mutante para a *MPO* e infecções, corroborando com estudo de Seixas e colaboradores (2010). No entanto, observou-se que os indivíduos com o alelo mutante foram os que apresentaram níveis elevados de LDH, sugerindo a participação de alterações no gene da *MPO* no processo de hemólise no grupo de pacientes com DF estudado. Os resultados relacionados ao alelo mutante e aos valores alterados dos marcadores de hemólise e do metabolismo do ferro sugerem o possível papel do gene da *MPO* no aumento do estresse oxidativo e, conseqüentemente, a sua importância no estresse oxidativo gerado pela hemólise, o que justifica a associação também descrita entre os níveis séricos elevados da PCR e a presença de alterações no gene da *MPO* (STEINBERG, 2001; MEUWESE *et al.*, 2007; SEIXAS, 2010).

A talassemia alfa constitui um grupo de doenças hereditárias, de ampla distribuição mundial, causada pela deficiência de síntese de uma ou mais cadeias alfa da hemoglobina. As diferentes formas de talassemia alfa estão relacionadas à deficiência, na maioria das vezes, devido à deleção, de um, dois, três ou dos quatro genes alfa (WEATHERALL, 2004).

Assim como na maioria das populações estudadas, a expressiva maioria dos casos relatados na população brasileira refere-se à talassemia α^+ , que resulta da deleção de um gene α , especificamente a deleção - $\alpha 3,7$ Kb (SONATI & COSTA, 2006). Estima-se que a prevalência do portador silencioso na população brasileira seja de 10% a 20% e do traço

alfa talassêmico seja de 1% a 3%. Entretanto, se considerarmos os indivíduos afro-descendentes, essa frequência pode alcançar 20% a 25%. Esses dados refletem a influência significativa dos indivíduos de origem africana DNA composição da brasileira. A probabilidade de associação entre esse tipo de talassemia e outras hemoglobinas variantes, sobretudo da HbS, que é elevada em nosso país, em razão da miscigenação racial elevada (SONATI *et al.*, 1986; SONATI & COSTA, 2006).

A interação da AF com a talassemia alfa promove a melhoria do quadro clínico apresentado pelo paciente (SILVA-LIMA, 1997). HIGGS e colaboradores. (1982) descreveram que em pacientes portadores desta interação (Hb SS/ α tal.) ocorre a diminuição da anemia hemolítica e inibição da polimerização intracelular da HbS. Ohene-Frempong e colaboradores (1998) acompanharam 4.082 crianças em um estudo que avaliou fatores de risco e frequência de AVC em indivíduos com DF, sendo observado frequência menor de AVC nas crianças que apresentavam a interação Hb SS/ α , comparando-se com indivíduos com o genótipo HbSS sem a talassemia. Adorno e colaboradores (2005), em estudo realizado em Salvador-Bahia, realizaram a análise do sangue do cordão umbilical de 590 recém-nascidos e observaram a presença de talassemia alfa (-3,7Kb) em 114 recém-nascidos (22,2%; todos com a deleção $-\alpha$ 3,7Kb).

No presente estudo foram descritos valores aumentados do perfil lipídico (VLDL, Triglicérides) e hepático (AST e ALT) nos pacientes sem a associação HbSS/ α tal. As alterações no metabolismo dos lipídios, como hiperlipidemia, têm sido associadas ao aumento do estresse oxidativo e da produção de radicais livres de oxigênio (KUMAR *et al.*, 2008). Considerando-se que os indivíduos com DF aumentam o estresse oxidativo e, conseqüentemente, possuem produção mais elevada de radicais livres, espera-se que nesses indivíduos o dano à membrana eritrocitária seja maior (KUYPERS, 2007).

As enzimas hepáticas (AST e ALT), embora não sejam órgão específicas, estão comumente aumentadas na presença de dano hepático. As alterações hepáticas são observadas na DF, principalmente em indivíduos com AF, e podem ser agudas ou crônicas (TRAINA & SAAD, 2007). Os resultados do presente estudo corroboram com estudos prévios que descreveram nos pacientes com DF a relação do perfil lipídico alterado e a intensidade maior de hemólise e de comprometimento múltiplo de órgãos (STEINBERG, 2001; SEIXAS, 2010).

A doença falciforme tem um quadro clínico heterogêneo, apresentando manifestações clínicas caracterizadas por crises dolorosas e vaso-oclusivas, infecções recorrentes e lesão a múltiplos órgãos (GASTON *et al.*, 1986; STEINBERG *et al.*, 2001). As infecções são freqüentes na DF, sendo que em indivíduos com AF em idade menor que 5 anos é a principal causa de óbito (WILLIAMS *et al.*, 2009), com estimativa de risco infeccioso trinta vezes maior que em crianças da população geral (LOGGETO *et al.*, 1999). No presente estudo observou-se que 53,5% dos indivíduos com DF apresentaram pelo menos um evento de pneumonia, sendo que destes 66,3% possuíam AF. Esses dados reforçam a hipótese que pacientes com AF apresentam gravidade clínica maior quando comparados a indivíduos com outros tipos de DF, como a HbSC e HbS β . Outros achados do presente estudo que evidenciam a gravidade do indivíduo com AF são a freqüência de internações hospitalares, seqüestro esplênico e acidente vascular cerebral. Esses resultados corroboram com Gaston e colaboradores (1986) e Redding-Lallinger & Knoll (2006) que descreveram a prevalência elevada de infecções bacterianas na infância, sendo que entre estas se destacava a pneumonia, osteomielite e meningite. QUINN e colaboradores (2004) defendem que o uso profilático de penicilina oral está associado à diminuição da incidência de infecções a partir dos 4 meses até os 5 anos de idade, com diminuição da morbidade e a mortalidade em crianças com DF (QUINN *et al.*, 2004). Entretanto, De Montalebert (2003) e Seixas e colaboradores (2009) descreveram a ocorrência de infecções graves em crianças com AF em idade superior a cinco anos em uso de profilaxia, o que corrobora com os achados do nosso trabalho.

Os pacientes que apresentaram número maior de hospitalizações, principalmente por pneumonia, foram também aqueles que apresentaram valores elevados de leucócitos, ferritina e reticulócitos, ao serem comparados aos pacientes com o histórico de número menor de internações. A importância da participação dos leucócitos na fisiopatologia da DF esta cada vez mais clara, sendo que a contagem elevada de leucócitos tem sido associada a gravidade maior da doença, incluindo a ocorrência de STA e infartos cerebrais silenciosos (ASLAN & FREEMAN, 2007).

As crises vaso-oclusivas dolorosas foram relatadas em 82,1% dos pacientes desse estudo, sendo a manifestação clínica mais freqüente. A vaso-oclusão leva à obstrução dos

vasos sanguíneos no qual participam eritrócitos, leucócitos, plaquetas, células endoteliais e moléculas de adesão (STEINBERG, 2001; JOHNSON & TELEN, 2008).

De acordo com dados da literatura, os leucócitos desempenham papel importante nas manifestações clínicas relacionadas à DF, sendo de relevância a participação dos mesmos no processo vaso-oclusivo com o aumento da adesão ao endotélio vascular que, juntamente com os eritrócitos levam à obstrução vascular (CANALLI *et al.*, 2004; OKPALA, 2004). No entanto, no presente estudo a elevação de leucócitos isoladamente pareceu não desempenhar ação relevante relacionada à presença de evento vaso-oclusivo, mas sim quando houve elevação dos neutrófilos segmentados. Esta informação levanta a hipótese de que estas células sejam fundamentais na produção de citocinas e mediadores que atuem no processo vasoclusivo e no estresse oxidativo presente na doença.

A litíase biliar e a coledocolitíase são alterações hepáticas secundárias à hemólise crônica e, em alguns casos, transfusões múltiplas. A excreção elevada e constante de bilirrubinas proporciona a formação de cálculos biliares. A colelitíase aumenta sua prevalência com a idade, sendo mais comum nos indivíduos com AF quando comparados a outras hemoglobinopatias (TRAINA & SAAD, 2007). No presente estudo foi observado que níveis séricos de colesterol total, colesterol LDL, colesterol VLDL e triglicérides estiveram associados à presença de litíase biliar. Desta maneira, sugere-se que indivíduos com DF sejam acompanhados quanto aos níveis séricos de colesterol total e frações e triglicérides, uma vez que estes podem estar participando da gênese da litíase biliar juntamente com as bilirrubinas.

O *Streptococcus pneumoniae* habita a mucosa do trato respiratório superior do homem, coexistindo com a microbiota normal, contribuindo para um estado de colonização assintomática (AUSTRIAN, 1986; FERREIRA *et al.*, 2001; CARDOZO, 2004). Infecções causadas pelo *S. pneumoniae* constituem a maior causa de morbidade e mortalidade em crianças de todo o mundo, particularmente nas menores de cinco anos, além de serem frequentes em indivíduos com doenças cardiopulmonares crônicas, idosos e imunocomprometidos (HAUSDORF, 2000).

As infecções por *Staphylococcus aureus* têm apresentado crescimento clínico e são consideradas problema de saúde pública nos EUA. (FRIDKIN *et al.*, 2005; KUEHN *et al.*, 2006; GORWITZ *et al.*, 2008). O *Staphylococcus aureus* pode causar infecção de pele e de

tecidos moles, pneumonia, septicemia e infecções ósteo-articulares tanto em crianças como em adultos (MORAN *et al.*, 2005; GONZALEZ *et al.*, 2005). Atualmente, o crescimento de infecções causadas pelo *S. aureus* meticilino-resistentes isolados de comunidades, em crianças e adultos saudáveis tem levantado um alerta relativo ao perigo de disseminação de bactérias resistentes (FRIDKIN *et al.*, 2005). A colonização da nasofaringe por *S. aureus* tem sido relacionada a infecção subsequente nos indivíduos colonizados (VON EIFF *et al.*, 2001).

Fortaleza e colaboradores (2009) descreveram a colonização nasofaríngea por *S. aureus* meticilino-resistentes e sua correlação com óbito em pacientes de unidade de terapia intensiva do Brasil, chamando a atenção para a importância de pesquisas epidemiológica em Microbiologia, apesar de não ter havido impacto da colonização nasofaríngea pelo *S. aureus* no prognóstico clínico dos pacientes avaliados. Lee e colaboradores (2009) estudaram a epidemiologia e fatores de risco para colonização pelo *S. aureus* em crianças na “Era pós-vacina pneumocócica 7-valente”, em Massachusetts (EUA) e concluíram que a colonização pelo *S. aureus* meticilino-resistentes permaneceu estável de 2003 a 2004 e de 2006 a 2007 entre as crianças, apesar do uso difundido da vacina pneumocócica conjugada. A colonização nasal variou com a idade, sendo inversamente proporcional ao uso recente de antibiótico.

Apesar da maioria dos estudos relacionados à colonização nasofaríngea em indivíduos com DF ser voltada para a pesquisa do pneumococo, no presente estudo foi encontrado número significativo de indivíduos colonizados pelo *S. aureus*. Entretanto, não foi encontrado na literatura descrição da colonização nasofaríngea pelo *S. aureus* em indivíduos com DF.

No presente estudo observou-se a colonização em nasofaringe/orofaringe pelo *S. pneumoniae* em 9,6% pacientes e pelo *S. aureus* em 56,6% dos pacientes com DF investigados. Steele e colaboradores (1996) observaram 33% de colonização nasofaríngea pelo *S. pneumoniae* ao estudarem crianças com DF menores de 2 anos de idade; 10% em crianças com idade entre 2 e 5 anos e 6% em crianças com idade acima de 5 anos. Esses resultados foram semelhantes aos descritos por Norris e colaboradores (1996). Blum e colaboradores (2005) encontraram a prevalência de 13,3% para a colonização nasofaríngea pelo *S. pneumoniae* ao estudarem crianças com DF do estado de São Paulo. Ressaltamos

que em nenhum dos estudos acima citados houve descrição de colonização por outros patógenos.

Os resultados alcançados com o desenvolvimento do presente estudo permitem levantar a hipótese de redução na colonização nasofaríngea secundária ao uso adequado de vacinas anti-pneumocócicas, sugerindo a provável eficácia da cobertura vacinal pelos sorotipos causadores de doença invasiva. Além disso, o encontro do *Staphylococcus aureus* sugere uma possível participação deste microrganismo na colonização nasofaríngea das crianças com DF investigadas no presente estudo, a exemplo do sugerido por LEE e colaboradores (2009) na população geral.

O perfil de sensibilidade dos isolados de pneumococos estudados não apresentou resistência aumentada à penicilina quando se comparou estes dados aos obtidos em estudos previamente realizados no Brasil, que envolveram cepas invasivas e colonizadoras (FERREIRA *et al.*, 2001; BEREZIN *et al.*, 2002; MANTESE *et al.*, 2003). No entanto, os resultados quanto à sensibilidade do pneumococo à penicilina apresentados neste estudo, corroboram com os de Blum e colaboradores (2005) que analisaram 98 crianças com DF de São Paulo. Isso sugere que a penicilina ainda é uma forma segura tanto de profilaxia quanto de tratamento nas crianças com DF.

Blum e colaboradores (2005) observaram resistência elevada do pneumococo ao clotrimoxazol (64%), corroborando com os dados apresentados no presente estudo, que testou o sulfametoxazol/trimetropim (SMX/TRP), pertencente à mesma classe deste antimicrobiano. Esses resultados sugerem a necessidade do uso com cautela desse antibiótico, no tratamento dos pacientes com DF deste estudo, no que se refere a infecções pelo *S. pneumoniae*.

A maioria das cepas de *S. pneumoniae* encontradas estava entre os principais sorotipos que causam doença invasiva no Brasil. Em relação aos sorotipos isolados no presente estudo foi observada a presença daqueles que predominam nas infecções mundialmente descritas em crianças (6, 14, 19 e 23) (SNIADACK *et al.*, 1985.), com exceção do sorotipo 6. Marchese e colaboradores (2011) avaliaram hemoculturas de crianças com até cinco anos, na Itália, hospitalizadas por pneumonia adquirida na comunidade, sendo os sorotipos 19A e 14 identificados em maior frequência, corroborando com o presente estudo.

Brandileone e colaboradores (1998) descreveram que infecções causadas pelos sorotipos 1 e 5 são frequentes em nosso país; no entanto, no presente estudo estes sorotipos não foram isolados, corroborando com Blum e colaboradores (2005) e com as observações realizadas por Berezin e colaboradores (2003) que consideraram os referidos sorotipos pouco expressivos quando se trata de colonização nasofaríngea.

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que os pacientes colonizados em nasofaringe pelo *S. pneumoniae* e pelo *S. aureus* apresentam valores elevados de HCM, VCM, AST, ALT e Ferritina. Essas associações mostram que avaliações bioquímicas de rotina e de colonização da nasofaringe podem ser de relevância no acompanhamento da evolução clínica de indivíduos com DF, uma vez que os achados significativos sugerem a participação dos microorganismos colonizados na modulação dos eventos hemolíticos, inflamatórios e infecciosos na DF, apesar de estudos semelhantes não terem sido realizados. Os estudos de colonização de microorganismos na nasofaringe e na orofaringe em pacientes com DF podem trazer dados epidemiológicos necessários ao controle e a implantação de estratégias de prevenção. Além disso, torna-se importante esclarecer os mecanismos pelos quais os biomarcadores participam nos processos vasoclusivos, infecciosos e inflamatórios presentes na DF, de maneira que possamos entender a correlação entre eles e o prognóstico clínico dos indivíduos com esta doença.

8. CONCLUSÕES

A dosagem elevada de ferritina ($\geq 320,16$ ng/mL) foi diretamente correlacionada a determinações bioquímicas associadas à hemólise e inflamação, sugerindo que esse biomarcador possui papel importante nos eventos de hemólise e aumento de estresse oxidativo;

As concentração elevada de LDH foi diretamente correlacionada a marcadores de hemólise, hepáticos, renais e inflamatórios e hematológicos sugerindo que esse biomarcador seja incluído na rotina de exames realizados, para avaliação de hemólise e de dano a múltiplos órgãos em crianças com DF;

A associação HbSS/ α -talassemia demonstrou ter efeito benéfico, ao comparar indivíduos portadores dos genótipos selvagens e mutantes para o índice de HCM, para os valores de colesterol VLDL, triglicérides, ALT e AST;

Os pacientes mutantes para o gene da *MPO* apresentaram ao aumento dos valores de marcadores de hemólise, tais como LDH, bilirrubina total e indireta, sugerindo que a presença desse alelo possa ter influencia nos eventos de hemólise apresentados por este grupo de pacientes;

Ficou evidenciada que a vasclusão apresenta associação com o número de segmentados neutrófilos; a esplenomegalia com as concentrações de PCR_e; o AVC com as concentrações de ferritina, e o histórico de litíase biliar com as concentrações de colesterol total, colesterol VLDL, triglicérides, ferritina e ASLO, sugerindo que esses biomarcadores sejam efetivos na avaliação dos respectivos eventos correlacionados.

Valores elevados do perfil lipídico apresentaram correlação negativa com marcadores de hemólise, de inflamação, de comprometimento hepático, leucócitos, plaquetas e

hemoglobina S; sugerindo que o colesterol HDL seja um biomarcador útil para auxiliar no acompanhamento clínico das crianças com doença falciforme.

A colonização nasofaríngea/orofaríngea pelo *S.pneumoniae* não apresentou sorotipos resistentes à penicilina na população estudada, sugerindo segurança da sua utilização para a profilaxia quanto para o tratamento de infecções nas crianças com DF.

A presença de *S. aureus* nos isolados de nasofaringe/orofaringe em parte das crianças com DF colonizadas, levanta a hipótese do surgimento de outro patógeno assumir importância na colonização, visto que as crianças recebem imunização específica, ainda em idade precoce, contra os principais sorotipos causadores de doença invasiva, atestando a eficácia desta medida de profilaxia.

Os modelos de análises multivariadas demonstraram forte correlação entre níveis de ferritina elevados e colonização de nasofaringe/orofaringe, entre frequência de pneumonia e o genótipo HbSS, e entre evento vasclusivo com elevação da contagem de neutrófilo segmentado.

Estudos adicionais de colonização de nasofaringe/orofaringe são necessários, devido o risco de infecção associado à colonização neste grupo de pacientes, para permitir um melhor entendimento da epidemiologia, e para determinar um melhor controle e estratégias de prevenção.

9. Perspectivas

Identificar o perfil de colonização nasofaríngea pelo *S. pneumoniae* na população de crianças com DF no estado da Bahia e correlacionar com sorotipos presentes nas vacinas anti-pneumocócicas 10-valente e 23-valente;

Avaliar prevalência do *S. aureus* e outros patógenos na colonização da nasofaringe/orofaringe, que possam causar doenças invasivas;

Identificar marcadores bioquímicos que possam confirmar a associação entre estado de portador do *S pneumoniae* e quadro clínico mais grave;

Compreender a correlação entre fenômeno vasoclusivo e neutrófilos;

Compreender os mecanismos pelos quais o LDH e a elevação de ferritina estão associados aos fenômenos vasoclusivos e estados inflamatórios e infecciosos em pacientes com doença falciforme, bem como a sua possível utilização como biomarcadores de prognóstico da doença;

Desta forma será ampliado o “N” do trabalho, através da realização de um estudo de coorte, incluindo avaliações microbiológicas, hematológicas e de biologia celular, visando compreender o papel da interação celular, mediadores inflamatórios, colonização de nasofaringe e prognóstico clínico.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adorno, Elisângela Vitoria ; Zanette, A. ; Lyra, I. ; Souza, C. C. ; Santos, L. F. ; Menezes, Joelma Figueiredo ; Deputit, M. F. ; Almeida, M. N. T. ; Reis, M. G. ; Gonçalves MS . The - Globin Gene Cluster Haplotypes in Sickle Cell Anemia Patients from Northeastern of Brazil: a Clinical and Molecular View. *Hemoglobin*, USA, v. 28, n. 3, p. 267-271, 2004

Adorno, Elisângela Vitória ; Zanette, Ângela ; Lyra, Isa ; Seixas, Magda Oliveira ; Reis, Mitermayer Galvão ; Gonçalves, Marilda Souza . Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. *Genetics and Molecular Biology* (Impresso), v. 31, p. 621-625, 2008.

Akinola, N.O.; Stevens, S.M.E.; Franklin, I.M.; Nash, G.B.; Stuart, J. Subclinical ischaemic episodes during the steady state of sickle cell anaemia. *J. Clin. Pathol.*, v.45: p.902-906, 1992.

Anglin DL, Siegel JD, Pacini DL, Smith SJ, Adams G, Buchanan GR. Effect of penicillin prophylaxis on nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell anemia. *J Pediatr* 104:18-22, 1984.

Ashley-koch A, Yang Q, Olney R S – Sickle Hemoglobin (HbS) Allele and Sickle Cell Disease : A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 151:9, 2000.

Aslan, M.; Freeman, B. A.; Redox-Dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free. Radic. Biol. Med.*, v.43 n.11: p.1469-1483, 2007.

Austrian R. Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J Antimicrob Chemother* 18:3, 1986.

Azevedo, E.S.; Alves, A.F.P.; Silva, M.C.B.O.; Souza, M.G.F.; Lima, A.M.V.M.D.; Azevedo, W.C. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate

dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. *Am. J. Phys. Anthropol.*, v.53: p.509-512, 1980.

Banerjee, S.; Owen, C.; Chopra, S. Sick cell hepatopathy. *Hepatology*, v.33: p.1021-1028, 2001

Barton JC, Edwards CQ, Phatak PD, Britton RS, Bacon BR. Handbook of Iron Overload Disorders. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 375 p

Baynes R, Bezwoda W, Bothwell T, Khan Q, Mansoor N. The nonimmune inflammatory response: serial changes in plasma iron, ironbinding capacity, lactoferrin, ferritin and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest* 46: 695-704, 1986.

Berezin EN, Carvalho LH, Lopes CR et al. Meningite pneumocócica na infância: características clínicas, sorotipos mais prevalentes e prognóstico. *J Pediatr (Rio J)* 78(1):19-23, 2002.

Berezin EN, Cardenuto MD, Otsuka M, Ferreira LL, Guerra ML, Brandileone MC, et al. MT. Avaliação do uso de isolados de *Streptococcus pneumoniae* (SP) de swab de nasofaringe para avaliar resistência bacteriana em crianças de São Paulo. *Rev Paul Pediatr.* 21:179-85, 2003.

Black S, Shimefield H, Fireman B, Lewis E, and the Northern California Kaiser Permanent Vaccine Study Center Group. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J* 19:187-95, 2000.

Blum PBF, Braga JAP, Machado AMO, Brandileone MCC, Farhat CK. Colonização nasofaríngea pelo *Streptococcus pneumoniae* em crianças com doença falciforme usando penicilina profilática. *J Pediatr (Rio J)* 81(2):149-54, 2005.

Boken DJ, Chartrand et al. Colonization with penicillin- nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in urban and rural child care centers. *Pediatr Infect Dis J* 15:667-72, 1996.

Brandileone MC, Di Fabio JL, Vieira VS, Zanella RC, Casagrande ST, Pignatari AC, et al. Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. *Microb Drug Resist.* 4:209-17, 1998.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Brasília (DF): ANVISA, p10 – 11, 2002.

Bricks e Eithan, *J Ped* 82 (3) S67-74, 2007.

Brueggemann AB, Peto TEA, Crook DW et al. Temporal and Geographic Stability of the Serogroup-Specific Invasive Disease Potential of *Streptococcus pneumoniae* in Children. *J Infect Dis.* 190(7):1203, 2004

Bunn, HF & Forget, BG – Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. W.B. Saunders Company, Primeira edição, 1986, pg 690. *Sickle Cell Disease Guideline Panel.*

Canalli, A.A.; Conran, N.; Fattori, A.; Saad, S.T.; Costa, F.F. Increased adhesive properties of eosinophil in sickle cell disease. *Exp. Hematol.*, v.32, n.8, p 728- 34, 2004.

Cançado R - *Rev. bras. Hematol. Hemoter.* 28(2):81-87, 2006.

Cardozo DM., Nascimento-Carvalho C M. et al. Nasopharyngeal Colonization and Penicillin Resistance Among Pneumococcal Strains: A Worldwide 2004 Update. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 10(4):293-303, 2006.

Centers for Disease Control and Prevention. Preventing pneumococcal disease among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 49(RR9), 2000.

Centers for Disease Control and Prevention. Limited supply of pneumococcal conjugate vaccine. *MMWR* 52:1234, 2003.

Costa, R.N.P; Albuquerque, D.M. et al. Association of the G-463^a myeloperoxidase polymorphism with infection in sickle cell anemia. *Haematologica*, v.90, n.7: p.977, 2005.

Dagan R, Leibovitz E, Greenberg D, Yagupsky P, Fliss DM, Leiberman A. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal colonization during the first days of antibiotic treatment in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J*. Oct;17(10):880-5, 1998.

Denno D.M., Frimpong E., Gregory M., Steele R.W. Nasopharyngeal carriage and susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae* in Kumasi, Ghana. *West Afr J Med*;21:233-6, 2002.

Domenech M, García E and Moscoso M. Versatility of the capsular genes during biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. *Environmental Microbiology* **11**(10), 2542–2555, 2009.

Ellis MW, Hospenthal DR, Dooley DP, Gray PJ, Murray CK: Natural history of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers. *Clin Infect Dis* 39(7):971-979, 2004.

Embury SH, Hebbel RP, Steinberg MH, et al: Sickle Cell Disease: Basic Principles and Clinical Practice, New York, Raven Press, 1994.

Ferreira LLF, Carvalho, ES et al., Colonização e resistência antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* isolado em nasofaringa de crianças com rinofaringite aguda. *J Pediatr (Rio J)* 77:227-34, 2001.

Fixler J, Styles L – Sickle cell disease. *Pediatr Clin N Am*,49:1193, 2002.

Fortaleza C R, Melo EC, Fortaleza CMCB. Nasopharyngeal colonization with methicillin-resistant staphylococcus aureus and mortality among patients in an intensive care unit. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* vol.17 no.5 Ribeirão Preto Sept./Oct. 2009 doi: 10.1590/S0104-11692009000500013

Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, Harriman K, Harrison LH, Lynfield R, Farley MM: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med* 352(14):1436-1444, 2005.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340 (6): 448-54, 1999.

Gaston MH, Verter JJ, Woods G et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. A randomized trial. *N Engl J Med*.314:1593-1599, 1986.

Gill FM, Sleeper LA, Weisner SJ et al. – Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. *Blood* 86:776, 1995.

Gladwin MT and Vichinsky E,2008 – Pulmonary Complications of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*.359;21:2254-2265,2008.

Gonçalves MS ; Bomfim, G. C. ; Maciel, E. ; Siqueira, I. ; Queiroz, I. L. ; Bomfim, G. ; Adorno, Elisangela Vitoria ; Albuquerque, A. B. L. ; France, M. D. ; Fernandes, G. B. ; Reis, Mitermayer Galvão dos . Beta S- Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (Impresso), Brasil, v. 36, n. 10, p. 1284-1288, 2003

Gonzalez BE, Hulten KG, Dishop MK, Lamberth LB, Hammerman WA, Mason EO Jr, Kaplan SL: Pulmonary manifestations in children with invasive community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 41(5):583-590, 2005.

Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, Jensen BJ, Killgore G, Tenover FC, Kuehnert MJ: Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. *J Infect Dis* 197(9):1226-1234, 2008.

Grace M Lee Epidemiology and risk factors for *Staphylococcus aureus* colonization in children in the post-PCV7 era *BMC Infectious Diseases* 9:110 doi:10.1186/1471-2334-9-110, 2009.

Gray B.M., Converse G.M., Dillon H.C. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis* 142:923-33, 1980.

Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which Pneumococcal Serogroups cause the Most Invasive Disease : Implications for Conjugate Vaccine Formulation and Use, Part I. *Clin Infect Dis* 30:100-21, 2000

Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D: The endothelial biology of sickle cell disease: Inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation* 11:129, 2004.

Hebbel, RP. Pathobiology of Sickle cell. In: Hematology basi principles and practice, 5th ed, 565-76, 2008.

Higgs, D.R.; Aldridge, B.E.; Lamb, J.; Clegg, J.B.; Weatherall, D.J.; Mayes, R.J.; Grandison, Y.; Lowrie, Y.; Mason, K.P.; Serjeant, B.E.; Serjeant, G.R. The interaction of alphathalassemia and homozigous sickle cell disease. *New Engl. J. Med.* v. 1306 p. 1441-1446, 1982.

Isichei, U. Liver function and the diagnostic significance of biochemical changes in the blood od African children with sickle cell disease. *J. Clin. Pathol.*, v.33, p.626- 630, 1980.

Johnson C, Telen MJ. Adhesion molecules and hydroxiurea in the pathophysiology of sickle cell disease. *Haematologica* v. 93 n. 4 p. 481-486, 2008.

Jurado RL. Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin infect Dis* 25: 888-95, 1997.

Kalantar-Zadeh K, Don BR, Rodriguez RA, Humphreys MH.c Serum ferritin is a marker of morbidity and mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 37: 564–572, 2001

Kalender B, Mutlu B, Ersoz M, Kalkan A, Yilmaz A. The effects of acute phase proteins on serum albumin, transferrin and haemoglobin in haemodialysis patients. *Int J Clin Pract* 56: 505–508, 2002

Kellner JD, McGeer A, Cetron MS et al. The use of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal isolates from healthy children to predict features of invasive disease. *Pediatr Infect Dis J.* Apr;17(4):279-86, 1998.

Klein JO. Pneumococcal otitis media vaccine trials. *Pediatr Infect Dis J* 8:S82-3, 1989.

Koornhof HJ, Wasas A, Klugman K. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: a South African perspective. *Clin Infect Dis.* Jul;15(1):84-94, 1992.

Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, McDougal LK, Chaitram J, Jensen B, Fridkin SK, *et al.*: Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001–2002. *J Infect Dis* 93(2):172-179, 2006.

Kumar, V.; Khan, M. M.; Khanna, A. K.; Singh, R. Lipid lowering activity of Anthocephalus indicus Root in hiperlipidemic Rats. eCAM, february, 2008.

Kuypers, F. A. Membrane Lipid Alterations in Hemoglobinopathies. *Am. Soc. Hematol.*, p.68-73, 2007.

Liñares J, Ardanuy C, Pallares R and Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect* 16: 402–410, 2010.

Loggetto, S.R.; Pelegrini-Braga, J.A.; Costa-Carvalho, B.T.; Sole, D. Alterações imunológicas em pacientes com anemia falciforme. *Rev. Bras. Alerg.Imunopatol.*, v.22, p.77-82, 1999.

Lyra, IM ; Gonçalves, MS ; Braga, JAP ; Gesteira, MF ; Carvalho, MH ; Saad, STO ; Figueiredo, MS ; Costa, FF. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* (ENSP. Impresso), v. 21, n. 4, p. 001-0010, 2005.

Mantese OC, Paula A, Moraes AB, Moreira TA, Guerra MLLS, Brandileone MCC. Prevalência de sorotipos e resistência antimicrobiana de cepas invasivas do *Streptococcus pneumoniae*. *J Pediatr* (Rio J) 79:537-42, 2003.

Marchese A, Esposito S, Coppo E *et al.* Detection of *Streptococcus pneumoniae* and Identification of Pneumococcal Serotypes by Real-Time Polymerase Chain Reaction Using

Blood Samples from Italian Children \leq 5 Years of Age With Community-Acquired Pneumonia. *Microbial Drug Resistance* v. XX, n. XX, 2011. DOI: 10.1089/mdr.2011.0031

Mastro TD, Nomani NK, Ishaq Z, et al. Use of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from children in Pakistan for surveillance for antimicrobial resistance. *Pediatr Infect Dis J.* 12(10):824-30, 1993.

McGinagle KL, Gourlay ML, Buchanan IB. The use of active surveillance cultures in adult intensive care units to reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-related morbidity, mortality, and costs: a systematic review. *Clin Infect Dis* 46(11):1717-25, 2008.

Mehta, S.R.; Afenyi-Annan a.; Byrns P.J.; Lottenberg, R. Opportunities to improve outcomes in sickle cell disease. *Am. Fam. Physician.*, v.74, n.2, p.303-10, 2006.

Meuwese MC, Stroes ESG, Hazen SL et al. Serum Myeloperoxidase levels are Associated With The Future Risk of Coronary Artery Disease in Apparently Healthy Individuals. The Epic-Norfolk Prospective Population Study. *Journal of the American College of Cardiology* 50:2, 159-65, 2007

Moran GJ, Amii RN, Abrahamian FM, Talan DA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired skin infections. *Emerg Infect Dis* 11(6):928-930, 2005.

Nathan DG, Orkin SH - Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood 5^a ed. Pg762.

Norris CF, Mahannah SR, Smith-Withley K, Frempong, KO, Mc Gowan KL. Pneumococcal colonization in children with sickle cell disease. *J Pediatr* 129;821-7, 1996.

O'Brien KL, Swift AJ et al. Safety and Immunogenicity of Heptavalent Pneumococcal Vaccine Conjugated to CRM₁₉₇ Among Infants With Sickle Cell Disease. *Pediatrics* 106:965-972, 2000.

O'Brien K.L., Nohynek H., and the WHO. Pneumococcal Vaccine Trials Carriage Working Group. Report from a WHO Working Group: standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J* 22:133-40, 2003.

Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA et al. Cerebrovascular Accidents in Sickle Cell Disease: Rates and Risk Factors. *Blood* 91:288-294, 1998.

Okpala, I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red cell disorder. *Blood*, v.18, p. 65-73, 2004.

Pearson OHA, Gallagher D, Chilcote R et al. – Developmental pattern of splenic dysfunction in sickle cell disorders. *Pediatrics* 76:392, 1985.

Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF et al. - Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 330:1639,1994.

Potin M, Valencia MA. Vaccination in premature infants: an issue many times forgotten. *Rev. Chilena Infectol* 22(4):339-44, 2005.

Powars D, Overturf G, Weiss J, Lee S and Chan L. Pneumococcal septicemia in children with sickle cell anemia. Changing trend of survival. *JAMA* 245 (18):1835, 1981.

Quataert SA, Kirch CS, Wiedl LJ, et al. Assignment of weight-based antibody units to a human anti-pneumococcal standard reference serum Lot 89-S. *Clin Diag Lab Immunol* 2:590-7, 1995.

Quinn CT, Rogers ZR, Buchanan GR. – Survival of children with sickle cell disease. *Blood* 103:11, 2004.

Redding-Lallinger, R.; Knoll, C. Sickle cell disease--pathophysiology and treatment. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care*, v. 36, n. 10, p. 346-76, 2006.

Rogers JT. Ferritin translation by interleukin-1 and interleukin-6: the role of sequences upstream of the start codons of the heavy and light subunit genes. *Blood* 87: 2525–2537, 1996.

Saari TN. Immunization of preterm and low birth weight infants. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. *Pediatrics* 112:193-8, 2003.

Sauntharajah Y and Vichinsky EP, Hematology Basic principles and Practice. 5th ed., 2008.

Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, Subsecretaria de Vigilância à Saúde. In: Introdução da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário básico de vacinação da criança, 2010.

Seixas M O. Investigação de biomarcadores associados ao prognóstico em pacientes pediátricos com doença falciforme. Salvador -Bahia, 2009. Tese (Mestrado em Patologia, Área de concentração em Patologia Experimental. Universidade Federal da Bahia - Faculdade de Medicina Fundação / Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz).

Serjeant GR – Sickle cell disease. *Lancet* 350:725, 1997

Silva-Lima, J.C. Interação de anemia falciforme e alfa talassemia. Aspectos moleculares, clínicos, hematológicos e bioquímicos – um estudo na população brasileira. Rio de Janeiro, 1997. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Silva WS; Lastra A; Oliveira SF; Klutau-Guimaraes N; Grisolia CK. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Bahiano, Brasil. *Cad. Saúde. Publica.*, v. 22, p. 2561-2566, 2006.

Sisk JE, Moskowitz AJ, Whang W et al. Cost-effectiveness of vaccination against pneumococcal bacteremia among elderly people. *JAMA* 278:1333-9, 1997.

Shinefield H, Black S, Ray P, Fireman B, Schwalbe J, Lewis E. Efficacy, immunogenicity and safety of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in low birth weight and preterm infants. *Pediatr Infect Dis J* 21: 182-6, 2002.

Sniadack DH, Schwartz B, Lipman H, Bogaerts J, Butler JC, Dagan R, et al. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children . implications for vaccine strategies. *Pediatr Infect Dis J*. 14:503-10, 1995.

Sonati MF, Costa FF. Talassemias alfa. In: Tratado de Clínica Médica. Lopes AC. Ed Roca, p1.932-1.938, 2006.

Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, et al. High prevalence of alphas-thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin* 15:309-311, 1991.

Steele RW, Warriar R, Unkel PJ, Foch BJ, Howes RF, Shah S, et al. Colonization with antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease. *J Pediatr*. 128:531-5, 1996.

Steinberg, M.H.; Rodgers, G. P. Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. *Semin. Hematol.*, v. 38, n. 4, p.299-306, 2001.

Traina, F.; Saad, S.T.O. Hepatic complications in sickle cell disease. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* , v. 29, n. 3, pp. 299-303, 2007.

Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G: Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 344(1):11-16, 2001.

Weatherall DJ, Clegg JB; Blankson J et al. – A new sickling disorder resulting from the interaction of the genes for haemoglobin S and α -thalassemia. *Br.J. of Haematol* 17:517, 1969.

Weatherall DJ. Thalassemia: the long road from bedside to genome. *Nat Rev Genet* 5(8):625-631, 2004.

Williams TN, Uyoga S et al. Bacteraemia in Kenyan children with sickle-cell anaemia: a retrospective cohort and case-control study. *Lancet* 374:1364-70, 2009.

World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization - WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*, 82 (12):93-104, 2007.

Wright J, Thomas P, Serjeant GR – Septicemia caused by *Salmonella* infection: a overlooked complication of sickle cell disease. *J Pediatr* 130:394, 1997.

Zago MA – Considerações gerais. In: Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA, 2002.

Zarkowsky HS, Gallagher D, Gill FM, et al: Bacteremia in sickle hemoglobinopathies. *J Pediatr* 109(4):579, 1986.

Zenni MK, Cheatham SH, Thompson JM et al. Streptococcus pneumoniae colonization in the Young child: association with otitis media and resistance to penicillin. *J Pediatr* 127:533-7, 1995.

11. APÊNDICE

I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

II – Questionário aplicado aos pacientes.

III – Aprovação do Projeto no Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ

IV – Valores de referencia das determinações hematológicas e bioquímicas



UFBA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE 18 ANOS



FIOCRUZ

Você esta sendo convidado a consentir com a participação do menor: _____, em pesquisas realizadas no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ - BA, cujo titulo esta especificado a seguir, uma vez que oficialmente e o seu representante legal.

“ESTUDO DE MARCADORES DE PROGNÓSTICO EM CRIANÇAS COM DOENÇA FALCIFORME COLONIZADAS NA NASOFARINGE E OROFARINGE”.

A participação do menor é totalmente voluntária e pode ser retirada a qualquer momento, não resultando em punições.

O objetivo deste trabalho é investigar aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da população atendida na fundação HEMOBA.

Os registros da participação do menor no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento apenas da equipe participante do projeto e do medico que o acompanha. As amostras coletadas serão identificadas por código, bem como os dados individuais dos exames e testes, que serão do conhecimento somente dos pesquisadores envolvidos na pesquisa. Desta forma, a sua identidade será mantida em segredo e nenhum outro grupo terá acesso as informações coletadas, tais como seguradoras, empregadores ou superiores, de acordo com a resolucao CNS 340/2004, item V.1.e.

A permissão para que o menor participe deste estudo não implicara na retirada de sangue adicional, de modo que será utilizada uma quantidade remanescente da mesma amostra coletada para a realização dos exames solicitados pelo médico. Também queremos que você concorde que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em estudos futuros, desde que estes estudos adicionais sejam analisados por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde.

Comunicamos que o sangue será colhido do braço e poderá acarretar em riscos e desconfortos, como sangramento e dor. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoal habilitado e especializado, visando diminuir esses riscos. A realização de coletas adicionais dependerá do médico e estará relacionada, simplesmente, ao acompanhamento clínico e avaliação periódica do menor.

A participação do menor no estudo não trará benefícios, mas possibilitará a obtenção de dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento de indivíduos que apresentam alguma doença conhecida e na implantação de políticas de saúde.

Assinatura do responsável:

Data ___/___/___ RG: _____

Nome do responsável (letra de forma) _____

Endereço _____

Testemunha 1

Nome: _____

RG: _____

Testemunha 2

Nome: _____

RG: _____

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos:

Dra Marilda de Souza Goncalves - Coordenadora do projeto - Laboratório de Pesquisa em Anemias da Faculdade de Farmácia/UFBA e Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2226.

Larissa Carneiro Rocha – Mestranda responsável pelo desenvolvimento do projeto – Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2265.



INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS
AO PROGNÓSTICO EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM DOENÇA FALCIFORME.



UFBA

FIOCRUZ

QUESTIONARIO PARA PACIENTES

Nome: {NOME} _____ Sigla: {sig} _____

Telefone: () _____

Endereco: _____

Registro: {REG} _____ No Pront. HEMOBA: {PRON} _____

Data de Nasc.: ____/____/____

Idade: {I} _____ Genero: {GENER} () Masculino [0] () Feminino [1]

01. Qual a sua cor? {cor} () Branca[0] () Negra[1] () Parda[2] () Amarela[3] () Indigena[4]

02. Voce estuda? {EST} () NAO [0] () SIM [1]

03. Nivel de escolaridade: {NESC} () Alfabetiz.[0] () Ate 4 FM[1] () Ate 8 FM[2] () Ate 3 MD[3]

04. Numero de irmaos:{NIRM} () 0 [0] () 1 [1] () 2 [2] () 3 [3] () 4 ou + [4]

05. Familiares com DF? {DFALC} () Nenhum[0] () Pai [1] () Mae [2] () Irmao [3]

06. Idade primeira menstruacao: {IPM} () Nao menst.[0] () 09-11[1] () 12-14 [2] () 15-17 [3]

07. Ja engravidou? {ENGRA} () NAO [0] () SIM [1]

08. Esta gravida? {GRA} () NAO [0] () SIM [1]

09. Usa anticoncepcional? {ANTICO} () NAO [0] () SIM [1]

10. Menstruacao e regular? {MREG} () NAO [0] () SIM [1]

() <6 m [0] () 6m - 4anos [1] (11. Idade do 1° diagnostico de Doenca) 5 - 9anos [2]

Falciforme: {ID} () 10 - 14anos [3] () 15 - 17anos [4]

12. Eletroforese de Hb {EHB} () AA[0] () SS[1] () SC[2] () SB+[3] () SB₀[4] () SD[5]

13. Haplotipo {HAPL} ()

() Sen[0] () Car[1] () Ben[2] () Cam[3] () Sau-Ara [4] () Atip[5] () I[6] () II[7] () III[8]

14. Talassemia {TAL}

()Negativo[0] ()Hetero 3.7[1] ()Homo 3.7[2] ()Hetero 4.2[3] () Homo 4.2[4]

Mieloperoxidase {MPO} () GG[0] () AG[1] () AA[2]

Alelo mutante Mieloperoxidase ? {MUTMPO} () NAO [0] () SIM [1]

Alfa 1 antitripsina {A1ATP}

() MM[0] () MZ[1] () MS[2] () SZ[3] () SS[4] () ZZ[5]

15. Já esteve internado? {INTER} () NAO [0] () SIM [1]

Se SIM, quantas vezes? {QINTER} () 1 [0] () 2-5 [1] () 6-10 [2] () 11 ou + [3]

Qual especialidade? {ESPEC} () Cardiologia [0] () Oftalmologia [1] () Neurologia [2]

() Infectologia [3] () Pneumologia [4] () Cirurgia [5]

() Angiologia [6] () Nefrologia [7] () Clinica da Dor [8]

() Outras [9]

16. Ja teve pneumonia? {PNEU} () NAO [0] () SIM [1]

Se SIM, quantas vezes? {QPNEU} () 1[0] () 2-3[1] () 4-6[2] () 7 ou + [3]

Se SIM, teve febre? {FEBRE} () NAO [0] () SIM [1]

Anormalidade no RX? {ARX} () NAO [0] () SIM [1]

Quando internado, usou medicacao? {MPNEU} () NAO [0] () SIM [1]

Quais? {DESCMPNEU} _____

17. Teve ou tem esplenomegalia? {ESPLE} () NAO [0] () SIM [1]

Em que periodo? {PERIOESPLE} () <6m[0] () 6m-1ano [1] () 2-3a [2] () 4-5a [3] () >6a [4]

Teve crise de sequestro esplenico? {SEQESPLE} () NAO [0] () SIM [1]

Se SIM, quantas vezes? {QSEQESPLE} _____

18. Faz uso profilatico de Penicilina? {PROP} () NAO[0] () SIM [1]

Se SIM, qual? {QPEN} () Penicilina V oral [0] () Penicilina benzatina [1]

Se Sim, ha quanto tempo? {QTPEN} () ate 1 ano [0] () + de 1 ano a 3 anos [1]

() + 3 anos a 5 anos [2] () + 5 anos a 7 anos [3]

() + de 7 anos [4]

19. Ja teve AVC? {AVC} () NAO [0] () SIM [1]

Se SIM, quantas vezes? {QAVC} () 1 [0] () 2 [1] () 3 [2] () 4 ou + [3]

Se SIM, sequelas do AVC? {SEQAVC} () NAO [0] () SIM [1]

Ja fez ressonancia magnetica? {RESSOMAG} () NAO [0] () SIM [1]

Alguma alteracao? {ALTRESSOMAG} () NAO [0] () SIM [1]

20. Esplectomizado? {ESPECTO} () NAO [0] () SIM [1]

Esplenectomia: {TIPOESPECTO} () Total [0] () Parcial [1]

21. Apresenta asma? {ASMA} () NAO [0] () SIM [1]

Se SIM, quantas crises nos ultimos 06 meses? {QASMA} () 0[0] () 1-3[1] () 4-7[2] () 8ou+[3]

Faz uso regular de nebulizacao?{NEBU} () [0] NAO () SIM [1]

22. Tem crises de dor? {CRISDOR} () [0] NAO () SIM [1]

Se SIM, quantas crises nos ultimos 06 meses? {QCRISDOR} () 0[0] () 1-3[1] () 4-7[2] () 8ou+[3]

Quando foi a ultima crise? {ULTCRISDOR} () <1mes [0] () 1-3m [1] () 4m ou+[2]

Usa medicacao para a dor? {MDOR} () NAO [0] () SIM [1]

Prescrita por um medico? {PRESMDOR} () NAO [0] () SIM [1]

Assistido por especialista em dor? {ESPECMDOR} () NAO [0] () SIM [1]

Faz tratamento com hidroxiureia? {HIDROXI} () NAO [0] () SIM [1]

23. Faz uso de alguma medicacao? {MEDIC} () NAO [0] () SIM [1]

- Se SIM, qual? {DESCMEDIC} _____
- Com que frequencia? {FREQMEDIC} () Diario [0] () Dias alternados[1] () Semanal[2]
() Quinzenal[3] () Mensal [4] () Bimestral[5] () Semestral [6]
24. Vaso-Ocusao: {VO} () NAO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QVO} _____
- Fez uso de alguma medicacao? {MVO} () NAO [0] () SIM [1]
25. Retinopatia: {RETIN} () NAO [1] () SIM [2]
- Se SIM, fez uso de alguma medicacao? {MRETIN} () NAO [0] () SIM [1]
- Faz consultas periodicas com oftalmo? {CONSOFTAL} () NAO [0] () SIM [1]
26. Infecoes: {INFEC} () NAO [0] () SIM [1]
- Quais? {DESCINFEC} () Rinite [0] () Sinusite [1] () Otite [2]
() Faringite [3] () Amigdalite [4] () Outros [5]
- Fez uso de alguma medicacao? {MINFEC} () SIM [0] () NAO [1]
27. Priapismo: {PRIAP} () NAO [0] () SIM [1]
- Nº de vezes: {QPRIAP} () Ate 4 [0] () 05-09 [1] () 10 ou +[2]
- Fez uso de alguma medicacao? {MPRIAP} () NAO [0] () SIM [1]
28. Ulcera maleolar: {ULCMALEO} () NAO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QULCMALEO} _____
- Idade da primeira ulcera: {IDULC} () Ate 4 anos [0] () 5-9 [1] () 10 ou + [2]
- Tratou a ulcera? {TRATULC} () NAO [0] () SIM [1]
- Qual tratamento? {QUALTRAT} _____
29. Sindrome toraxica aguda: {SDTOR} () NAO [0] () SIM [1]
- Quantas vezes? {QSDTOR} () Ate 2 [0] () 03-05 [1] () 06 ou + [2]
30. Alteracoes osseas: {ALTOSSEA} () NAO [0] () SIM [1]
- Quais? {DESCALTOSSEA} _____
31. Insuficiencia Renal Aguda: {INSRENAG} () NAO [0] () SIM [1]
- Quantas vezes? {QINSRENAG} () Ate 2 [0] () 03-05 [1] () 06 ou + [2]
32. Insuficiencia Renal Cronica: {INSRENCRO} () NAO [0] () SIM [1]
- Idade diagnostico: {IDINSRENCRO} () Ate 5 anos [0] () 06-11 [1] () 12 ou + [2]
33. Alteracoes cardiacas: {INSCARD} () NAO [0] () SIM [1]
- Qual alteracao? {QUALALTCA} _____
- Idade diagnostico: {DINSCARD} () Ate 5 anos [0] () 06-11 [1] () 12 ou + [2]
- Fez eletrocardiograma? {ELETRO} () NAO [0] () SIM [1]
- Fez ecocardiograma? {ECOCARD} () NAO [0] () SIM [1]
34. Sequestro hepatico: {SEQHEP} () NAO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QSEQHEP} _____
35. Insuficiencia respiratoria: {INSRESP} () NAO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QINSRESP} _____
36. Disturbio do sono? {DISTSONO} () NAO [0] () SIM [1]
37. Litiase biliar: {LITIBILI} () NAO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QLITIBILI} _____
38. Cirurgia: {CIRURG} () NAO [0] () SIM [1]

- Quais? {QUALCIRURG} _____
39. Se SIM, fez uso de profilaxia antibiotica? {PROFANTIB} () NAO [0] () SIM [1]
40. Completou o calendario vacinal? {CALVAC} () NAO [0] () SIM [1]
- Fez uso das seguintes vacinas? {USOVAC} () 7 valente [0] () 23 valente [1]
- () Meningo [2] () Haemophilus [3]
41. Faz uso de hemoderivados? {HEMODER} () NAO [0] () SIM [1]
- Se SIM, quantas vezes ao ano? {QHEMODER} _____
42. Possui outra patologia? {PATOLOG} () NAO [0] () SIM [1]
- Quais? {DESCPATOLOG} () Hipertensao [0] () Diabetes [1] () Obesidade [2] () Outras [3]
43. Voce trabalha? {TRAB} () NAO [0] () SIM [1]
- Tipo de profissao: {QTRAB} _____
- Se SIM, manipula alguma substancia quimica? {SUBQUIM} () NAO [0] () SIM [1]
- Qual? {QSUBQUIM} _____ Frequncia ? {FREQSUBQUI} _____
- Manipula diretamente esta subst? {MANIDIRE} () NAO [0] () SIM [1]
44. Pratica esportes? {ESPOR} () NAO [0] () SIM [1]
45. Faz uso de bebida alcoolica? {BEBE} () NAO [0] () SIM [1]
- Se SIM, que frequencia? {FREQBEBE} _____
46. Voce fuma? {FUMA} () NAO [0] () SIM [1]
- Se SIM, que frequencia? {FREQFUMA} _____
47. Faz uso de alguma droga? {DROGA} () NAO [0] () SIM [1]
- Em caso de SIM, que frequencia? {FREQDROGA} _____
48. Alem dos seus pais quantos membros da familia ou parentes sao apegados a vc? {APEG}
- () 01[0] () 02 – 03 [1] () 04 – 06[2] () 07 – 10[3] () nenhum[4]
49. Quantos amigos vc tem aproximadamente? {AMIGO}
- () 01[0] () 02 – 03 [1] () 04 – 06[2] () 07 – 10[3] () nenhum[4]
50. Com que frequencia vc se reúne com seus parentes, amigos ou vizinhos? {REUNI}
- () Diariamente ou quase todos os dias [0] () Varias vezes na semana [1]
- () Varias vezes no mes [2] () Varias vezes por ano [3] () Quase nunca [4]
- Data da proxima consulta no HEMOBA: ____/____/____

**VALORES DE REFERÊNCIA PARA DETERMINAÇÕES
HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS**

Hematologia

	Homens	Mulheres
Hemácias (milhões/mL) -----	4,5 - 6,1	4,0 - 5,4
Hemoglobina (g/dL)-----	12,8 – 17,8	11,3 – 16,3
Hematocrito (%)-----	40,0 -54,0	35,0 – 49,0
VGM (fL)-----	80,0 – 98,0	80,0 – 98,0
HCM (pg)-----	27,0 – 32,0	27,0 – 32,0
CHCM (%)-----	31,0 – 35,0	31,0 – 35,00
Leucócitos-----	4.500 – 11.000	
Neutrófilos-----	1.500 – 8000	
Bastonetes-----	40 - 500	
Segmentados-----	1600 – 7500	
Eosinófilos -----	400 – 600	
Basófilos-----	0 – 300	
Linfócitos típicos-----	1000 – 6500	
Linfócitos atípicos-----	0 – 300	
Monócitos-----	120 – 1000	
Plaquetas-----	150.000 – 450.000	
Reticulócitos-----	0,5 – 2,0%	

Bioquímica

	Desejável	Limítrofe	Aumentado
Colesterol total----- 2 a 19anos	< 170 mg/dL	170 a 199 mg/dL	≥ 200 mg/dL
20 ou mais	<200 mg/dL	200 a 239mg/dL	≥ 240 mg/dL
Colesterol HDL----- ate 10 anos	≥ 40 mg/dL		
11 ou mais	≥ 35 mg/dL		
Colesterol – LDL----- 2 a 19 anos	< 110 mg/dL	110 – 129 mg/dL	≥ 130 mg/dL
Colesterol – VLDL-----	< 40 mg/dL		
	Desejável	Aumentado	
Triglicerídeos---- < 10 anos	ate 100 mg/dL	> 100 mg/dL	
10 a 19 anos	ate 130 mg/dL	>240 mg/dL	
> 20 anos	ate 199 mg/dL	>200mg/dL	
Uréia-----	15 a 40 mg/dL		
Creatinina-----	0,4 a 1,3 mg/dL		
Ferro sérico-----	Homem 65 a 175 mcg/dL		
	Mulher 50 a 170 mcg/dL		
	Crianças (2 a 12anos) 22 a 135 mcg/dL		
TGO-----	ate 42 U/L		
TGP-----	ate 41 U/L		
Bilirrubina total-----	- ate 1,3 mg/dL		
Bilirrubina direta-----	- ate 0,4 mg/dL		
Bilirrubina indireta-----	- ate 0,9 mg/dL		
Proteínas totais-----	- 6,0 – 8,0 g/dL		
Albumina-----	3,5 – 5,5 g/dL		
Globulinas-----	- 2,3 – 3,5 g/dL		
RE Albu/Glob-----	- 1,0 – 2,5		
LDH -----	- 207 – 414 U/L (37oC)		
Ferritina-----	- Homens 23,9 a 335,2 ng/mL		
	Mulheres 11,0 a 305,8 ng/mL		
ASLO-----	<200 UI/mL		
PCR-----	<6,0 mg/L		
Alfa 1 antitripsina-----	80 a 200 mg/dL		