

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDO WAGNER DA SILVA RAMOS

**RELAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES DA MTHFR C677T E DA
ENOS T786C, A VELOCIDADE DO FLUXO SANGUÍNEO ENCEFÁLICO E O
RISCO DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO EM PACIENTES
FALCIFORMES**

MACEIÓ

2017

FERNANDO WAGNER DA SILVA RAMOS

**RELAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES DA MTHFR C677T E DA
ENOS T786C, A VELOCIDADE DO FLUXO SANGUÍNEO ENCEFÁLICO E O
RISCO DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO EM PACIENTES
FALCIFORMES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues.

MACEIÓ

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante – CRB:1664

R175r Ramos, Fernando Wagner da Silva.
Relação entre os polimorfismos dos genes da MTHFR C677T e da ENOS T786C, a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e o risco de acidente vascular encefálico em pacientes falciformes / Fernando Wagner da Silva Ramos. – 2018.
97 f.: il. color, graf., tabs.

Orientador: Célio Fernando de Sousa Rodrigues.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 89-97.

1. Doença falciforme. 2. Acidente vascular encefálico. 3. Doppler transcraniano. 4. Polimorfismo. 5. Ciências da saúde- MTHFR e eNOS.
I. Título.

CDU: 616.15



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Fernando Wagner da Silva Ramos

Relação entre os polimorfismos dos genes MTHFR C677T e eNOS T786C, velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e o risco de acidente vascular encefálico em pacientes falciformes

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 11 de dezembro de 2017.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva (UFAL)

Prof. Dr. Carlos Arthur Cardoso Almeida (UFAL)

Prof. Dr. Luiz Arthur Calheiros Leite – (UNINASSAU)

DEDICATÓRIA

Aos pacientes portadores dos diversos tipos de hemoglobinopatias, sobretudo a doença falciforme, que foram os verdadeiros colaboradores para o sucesso de todas as minhas conquistas nessa pesquisa e aos familiares destes. Sem vocês, nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** que, com sua misericórdia infinita, sabe perdoar meus defeitos e minhas omissões, guiando meus passos e conduzindo-me a uma vida reta, mesmo que obstáculos surjam a cada dia; e a **Nossa Senhora**, grande serva por amor, que intercede por mim e pelos meus familiares, cuja misericórdia nunca nos faltará, ainda que não mereçamos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues**, simplesmente, por confiar em mim. Talvez ele nunca tenha a real noção do quanto aprendi nas reuniões semanais; nas discussões em grupo; nos conselhos que me dava até durante a madrugada; ou mesmo pelo fato de dizer que confiava, fazendo com que a responsabilidade de entregar uma tese que atendesse a critérios metodológicos e científicos aumentasse. Minha vida científica não será mais a mesma desde o dia em que ele me disse sim, aceitando-me como orientador. Desejo que Deus continue abençoando sua família. Soube ser um pai científico, quando preciso foi!

A minha esposa **Elísia Ramos**, que soube ter paciência e amor na medida certa para compreender a minha ausência quando precisei me dedicar à tese, mas também por ser um ser humano brilhante, que me acompanha ao longo de 17 anos, pela qual tenho um amor imensurável. Obrigado por ser tão dócil e amável.

Aos meus familiares, aqui representados pela minha querida mãe, **Maria Rosário da Silva** - ser humano inigualável, que possui impressa a sua genética em mim, sendo pai e mãe ao mesmo tempo, ensinando-me a ser uma pessoa melhor, dona de um coração maior que o mundo - e meu saudoso pai, **Dario Ramos Barbosa** (*in memorian*) – que não teve a oportunidade de se fazer presente em minha vida acadêmica, mas está torcendo de um lugar especial no céu. A minha avó querida **Áurea Nogueira** (*in memorian*), que me ensinou a ter confiança através do

Salmo 91 e pelos seus ensinamentos diários. Aos irmãos (**Carlos Alberto, Carmen Vânia, Dario Ramos e Dária Ramos** (*in memoriam*) – cada um com sua particularidade: **Beto**, com sua tranquilidade e profissionalismo exemplares; **Vânia**, com seu amor de mãe, carinho eterno e muita fé em Deus; **Liu**, com sua forma pacata de amar e torcer, além de me apoiar sempre que necessário. As cunhadas **Fátima e Patrícia**, pela amizade. Aos meus tios (**Claudemir, Valdemir** e, em especial, a minha tia-mãe **Helena Macêdo**, que sempre dedicou seu amor de mãe a mim). Aos meus sobrinhos **Carlos Alberto, Eduardo, Darinho, Darlann, Esthefany e Júlia**, por serem motivos de alegria em minha vida. Aos meus sogros (**José Machado e Célia Almeida**), por saberem entender quando fui ausente em vários momentos da vida, sempre compreendendo que isso fazia parte do processo.

Aos meus amigos do **Grupo de Pesquisa e Laboratório de Arteriosclerose Humana e Experimental da UFAL**, por todas as contribuições ao longo dos anos, em especial aos **Prof. Me. Ailton Mota do Nascimento Galvão, Prof. Dr. Fernando Camello de Lima, Profa. Ma. Livia Carolina Dantas** e ao acadêmico **Olavo Barbosa**. Ainda, agradeço a **Prof. Dra. Amanda Barros de Sousa Rodrigues**, por ter feito parte da minha caminhada acadêmica ao longo da Pós, galgando das mesmas ansiedades e alegrias.

Ao **Hemocentro de Alagoas (HEMOAL)**, em nome da gerente da Hemorrede **Dra. Verônica Lima**, por abrir as portas para a execução das análises inerentes à tese.

Ao **Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva**, por permitir que realizássemos as análises genéticas no Laboratório de Genética Forense da UFAL, mas também pela atenção e hombridade; bem como ao **Prof. Dr. Dalmo Azevedo, Profa. Mestra Iede Ferreira e Prof. Me. Gustavo Reis**, pela presteza e colaboração.

Ao **Prof. Dr. Zenaldo Porfírio**, que permitiu a realização de análises iniciais no **Centro de Patologia e Medicina Laboratorial (CPML)**.

Ao **Prof. Dr. Fabiano Timbó Barbosa** e a sua família querida (**Tati, Rosinha e Rafa**), pelo auxílio na realização da revisão sistemática, mas também pela amizade apoio no delineamento da pesquisa, estatística e direcionamento científico.

Ao **Prof. Dr. Edis Belini Júnior**, da Universidade do Mato Grosso do Sul, grande conhecedor dos assuntos relacionados às hemoglobinopatias, que não mediu esforços em colaborar com seu conhecimento quando era solicitado.

Aos professores do **Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da UFAL**, por difundirem conhecimento aos discentes do Programa.

Ao **Laboratório de Saúde Pública de Alagoas (LACEN/AL)/SESAU** e aos servidores que torceram e conviveram comigo, acompanhando a minha trajetória.

À **Maternidade Escola Santa Mônica (MESM)/UNCISAL** e todos os servidores que deram forças e entenderam as dificuldades e adaptações necessárias, em especial à amiga e enfermeira **Lourdes Ramires**.

Ao **Centro Universitário CESMAC**, pelos ajustes que foram realizados para que eu pudesse concluir essa etapa, aos docentes do Núcleo Docente Estruturante (NDE), coordenações de curso (em especial à **Chiara Rachel**, amigos e aos meus alunos, que viveram comigo essa fase tão importante.

À **Associação dos Pacientes com Hemoglobinopatias de Alagoas (APHAL)**, representada pelo seu Presidente, **Sidney Santos**, portador de amplo conhecimento sobre hemoglobinopatias e sempre acessível quando o objetivo era realizar algo que pudesse melhorar a

qualidade de vida dos pacientes. Sua força de vontade nos faz querer aprender cada vez mais sobre a doença.

À **Ana Zilma**, que foi o elo de ligação com os pacientes com hemoglobinopatias e por ter se mostrado sempre disposta a colaborar com a pesquisa.

Aos meus **alunos de iniciação científica**, em especial à **Monique Alves, Raul Ribeiro e Vítor Dantas**, e aos demais integrantes do meu **Grupo de Pesquisa em Doença Falciforme (GPDF)**, por compartilharem momentos de discussões científicas em que todos nós aprendemos, a cada encontro, sobre essa afecção.

Aos adolescentes que fizeram parte do **grupo controle**, bem como seus pais e/ou responsáveis, na certeza de estarem contribuindo para o avanço da ciência. Sem muitas vezes conhecer a doença, deram o sim, sem titubear.

A minha orientadora do mestrado em Ciências da Saúde, **Profa. Dra. Salete Smaniotto**, que colaborou bastante na minha formação acadêmica.

Aos meus **verdadeiros amigos**, dentre eles: **Prof. Dr. Luiz Arthur, Prof. Fábio Pacheco e Fernando Minervo**, pelas contribuições hematológicas e pelo respeito. Aos amigos que ouviam falar sobre os assuntos relacionados à tese, muitas vezes sem entender do que se tratava, mas que faziam questão de perguntar e ouvir pacientemente quando eu respondia, sempre torcendo para que eu obtivesse a vitória final.

A **todos**, os meus sinceros agradecimentos.

“Doutor, sinto que a qualquer momento eu vou perder meus filhos por causa dessa doença miserável. Às vezes, acordo querendo fazer besteira comigo mesma, por não saber como aliviar a dor dos meus filhos”.

(Mensagem enviada por uma das mães durante o período em que seus filhos ficaram sem medicamentos, na crise sofrida pelo Brasil durante o Impeachment da Presidenta Dilma Rousseff).

RESUMO

A doença falciforme é uma desordem genética que ocorre principalmente em negros e acomete mais de 6 milhões de nascimentos por ano em todo o mundo. O termo doença falciforme (DF) inclui a anemia falciforme (AF) e outras hemoglobinopatias. A AF pode apresentar uma série de complicações nesses pacientes, incluindo o acidente vascular encefálico (AVE). A base fisiopatológica para o AVE isquêmico ainda não está totalmente elucidada, em virtude de haver múltiplos fatores envolvidos nesse processo. A fim de se avaliar o risco primário de AVE em crianças e adolescentes falciformes, a ultrassonografia por Doppler Transcraniano (DTC) é considerada a ferramenta prognóstica mais adequada clinicamente disponível, capaz de prever o risco aumentado de AVE. Vários polimorfismos têm sido estudados atualmente nesses pacientes, dentre eles o da metilenoetetraidrofolato redutase (MTHFR) e da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), ainda que muitos sejam controversos, porém esse estudo é inédito ao apresentar a relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico (VFSE) e esses polimorfismos, além de determinantes bioquímicos e hematológicos. O objetivo desse estudo foi investigar se existe relação entre esses dois polimorfismos, a VFSE e o risco de acidente vascular encefálico em pacientes falciformes. Trata-se de um estudo observacional descritivo, de caráter transversal, realizado no Hemocentro de Alagoas (HEMOAL) com a participação de 151 pacientes, entre 2 a 16 anos de idade, de ambos os sexos, diagnosticados com DF, e uma população controle de 64 pessoas sem a doença. Observou-se que existe relação entre os polimorfismos dos genes da MTHFR C677T e eNOS T786C com a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e o risco de acidente vascular encefálico em pacientes com doença falciforme. O tipo de hemoglobinopatia mais acometido com aumento da velocidade do fluxo sanguíneo encefálico é a HBSS (anemia falciforme). Não há relação entre a velocidade de fluxo sanguíneo encefálico aumentada com a idade ou sexo nos pacientes falciformes. O risco de acidente vascular encefálico nos pacientes falciformes está classificado respectivamente nos seguintes extratos: a) intermediário baixo; b) iminente; c) aumentado; e d) variável com valor reduzido. Há correlação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a concentração de hemoglobina corpuscular média, bilirrubina indireta e bilirrubina direta em pacientes falciformes. Os polimorfismos mais prevalentes para os genes MTHFR C677T e os gene eNOS T786C são os genótipos do tipo CC. Os pacientes que apresentam polimorfismo mutante (TT) apresentam maior risco de desenvolver acidente vascular encefálico.

PALAVRAS-CHAVE: Doença falciforme. Acidente vascular encefálico. Doppler transcraniano. Polimorfismos. MTHFR. eNOS.

ABSTRACT

Sickle cell disease is a genetic disorder that occurs primarily in blacks and affects more than 6 million births a year around the world. Sickle cell disease (SCD) includes sickle cell anemia (SCA) and other hemoglobinopathies. SCA can present a number of complications in these patients, including cerebrovascular accident. The pathophysiological basis for ischemic stroke has not yet been fully elucidated, since there are multiple factors involved in this process. In order to assess the primary risk of stroke in sickle children and adolescents, Transcranial Doppler ultrasonography (DTC) is considered to be the most appropriate prognostic tool clinically available, capable of predicting the increased risk of stroke. Several polymorphisms have now been studied in these patients, including methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS), although many are controversial, but this study is unprecedented in the relation between the velocity of the encefálico blood flow and these polymorphisms, as well as biochemical and hematological determinants. The aim of this study was to investigate whether there is a relationship between these two polymorphisms, VFSE and the risk of stroke in sickle cell patients. This is a cross-sectional observational study, carried out at the Hemocentro de Alagoas (HEMOAL) with the participation of 151 patients, between 2 and 16 years of age, of both sexes, diagnosed with SCD, and a control population of 64 people without the disease. It has been observed that there is a relationship between the polymorphisms of the MTHFR genes C677T and eNOS T786C with the velocity of encefalic blood flow and the risk of stroke in patients with SCD. The type of hemoglobinopathy most affected with increased blood flow velocity is HBSS (sickle cell anemia). There is no relation between increased encephalic blood flow velocity with age or sex in sickle cell patients. The risk of stroke in sickle cell patients is classified, respectively, in the following extracts: a) low intermediate; b) imminent; c) increased; and d) variable with reduced value. There is a correlation between encefálico blood flow velocity and mean corpuscular hemoglobin concentration, indirect bilirubin and direct bilirubin in sickle cell patients. The most prevalent polymorphisms for the MTHFR C677T genes and the eNOS T786C gene are the CC type genotypes. Patients with mutant polymorphism (TT) are at increased risk of stroke.

KEYWORDS: Sickle cell anemia. Stroke. Transcranial Doppler. Polymorphisms. MTHFR. ENOS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Modelo da molécula de hemoglobina de um indivíduo normal e de um indivíduo com anemia falciforme.....	25
Figura 2	Esquema da mutação que resulta na substituição de uma base purínica por uma pirimídica na posição 6 da cadeia beta da hemoglobina.....	26
Figura 3	Frequência do alelo S em diferentes populações mundial.....	27
Figura 4	Distribuição do gene S no Brasil.....	28
Figura 5	Distribuição do gene S em Alagoas, de acordo com as regiões de saúde.....	29
Figura 6	Estimativa de beneficiados pelas ações da Política Nacional de Doença Falciforme no Brasil, no ano de 2010.....	30
Figura 7	Campo microscópico evidenciando o afoiçamento dos eritrócitos em paciente com anemia falciforme.....	31
Figura 8	Ponto de referência para insonação dos segmentos arteriais do círculo arterial do cérebro, de acordo com o estudo STOP.....	38
Figura 9	Ilustração do metabolismo da homocisteína.....	42
Figura 10	Redução da disponibilidade do óxido nítrico devido à hemólise intravascular.....	45
Figura 11	Procedimentos utilizados na extração de DNA.....	51
Figura 12	Distensão sanguínea de sangue periférico de um paciente falciforme com reticulocitose.....	62
Figura 13	Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a idade, considerando-se ambos os sexos (n=151).....	64
Figura 14	Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a idade, considerando-se o sexo feminino (n=151).....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de referência para a contagem de reticulócitos.....	49
Tabela 2	Sequências dos primers para pesquisa do polimorfismo da MTHFR C677T.....	51
Tabela 3	Tamanho dos produtos amplificados após a clivagem com as endonucleases de restrição para o MTHFR C677T.....	52
Tabela 4	Tamanho dos produtos amplificados após a clivagem com as endonucleases de restrição para o estudo do polimorfismo da eNOS (T-786C).....	53
Tabela 5	Sequências dos primers para pesquisa do polimorfismo da eNOS T786C.....	53
Tabela 6	Características gerais dos pacientes.....	57
Tabela 7	Frequência de pacientes falciformes submetidos ao Doppler transcraniano, a partir da velocidade do fluxo sanguíneo encefálico, em cm/s.....	58
Tabela 8	Medidas descritivas e teste Mann-Whitney para a comparação das variáveis hematológicas entre os grupos controle e pacientes falciformes.....	61
Tabela 9	Medidas descritivas e teste Mann-Whitney para a comparação das variáveis bioquímicas entre os grupos controle e pacientes falciformes.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA	Artéria Cerebral Anterior
ACI	Artéria Carótida Interna
ACIE	Artéria Carótida Interna Esquerda
ALB	Albumina
Mili-Q	Água Mili-Q
ACM	Artéria Cerebral Média
ACOMP	Artéria Comunicante Posterior
ACP	Artéria Cerebral Posterior
AF	Anemia Falciforme
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
APHAL	Associação de Pessoas com Hemoglobinopatias de Alagoas
AV	Artéria Vertebral
AO	Artéria Oftálmica
AB	Artéria Basilar
AVE	Acidente Vascular Encefálico
VMM	Velocidade Média Máxima
AVN	Necrose Avascular
BASO	Basófilo
BD	Bilirrubina Direta
BI	Bilirrubina Indireta
BTF	Bilirrubina Total e Frações
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
cm/s	Centímetro por Segundo
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CSSCD	Cooperative Study of Sickle Cell Disease
CT	Tomografia Computadorizada
CV	Coefficiente de Variação
DF	Doença falciforme
DNA	Ácido Desoxirribonucleico

dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DTC	Doppler Transcraniano
EDTA	Ácido Etildiaminotetracético
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EO	Eosinófilo
et al	E outros
FAL	Fosfatase Alcalina
FFT	Transformada Rápida de Fourier
fL	Fentolitro
HbA2	Hemoglobina A2
HbC	Hemoglobina C
HbAS	Hemoglobina AS / Traço Falciforme
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HbSC	Hemoglobina SC
HbSD	Hemoglobina SD
HbSS	Hemoglobina SS
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HCT	Hematócrito
HCY	Homocisteína
HEMOAL	Hemocentro de Alagoas
HGB	Hemoglobina
IR	Índice Reticulocítico
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
LDH	Desidrogenase Láctica
LIN	Linfócito
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHz	Mega Hertz
mM	Mili Molar
mm ³	Milímetros Cúbicos
MONO	Monócito
MRI	Imagem por Ressonância Magnética
MS	Ministério da Saúde

MTHFR	Metilenotetrahidrofolato Redutase
NEUT	Neutrófilo
NIH	National Institutes of Health
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NRBC	Flag que indica a presença de Eritroblastos
NCBI	National Center for Biotechnology
NHLBi	National Heart, Lung, and Blood Institute
VMFSC	Velocidade Média do Fluxo Sanguíneo Encefálico
OMS	Organização Mundial de Saúde
VR	Valor de Referência
p	Valor de p
pb	Pares de base
PT	Proteína Total
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PDW	Amplitude de Distribuição das Plaquetas
PHHF	Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal
PLT	Plaquetas
r	Coeficiente Rho de Pearson
RBC	Contagem de Eritrócitos
RDW	Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos
RETIC PC	Reticulócitos Primeira Correção
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por Minuto
RFLP	Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição
S/ β^+	Hemoglobinopatia S associada a Beta Talassemia +
S/ β^0	Hemoglobinopatia S associada a Beta Talassemia 0
SC	Hemoglobinopatia SC
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Simples
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

β	Beta
β ^s	Globina beta S
STA	Síndrome Torácica Aguda
STOP	Stroke Prevention in Sickle Cell Anemia
TC	Tomografia Computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
U/μL	Unidades por Microlitro
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
VCM	Volume Corpuscular Médio
VFSE	Velocidade do Fluxo Sanguíneo Encefálico
VPM	Volume Plaquetário Médio
WBC	Contagem de Leucócitos
α-TAL	Alfa-Talassemia
μL	Microlitro
pg	Picograma
#	Absoluto
%	Percentual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivo Geral.....	23
2.2	Objetivos Específicos.....	23
3	LITERATURA.....	24
3.1	Descrição da doença falciforme.....	24
3.1.1	Considerações gerais sobre a doença falciforme.	24
3.1.2	Aspectos históricos e epidemiológicos.....	26
3.1.3	Características clínicas.....	30
3.1.4	Diagnóstico laboratorial.....	32
3.2	Acidente vascular encefálico.....	32
3.3	Doppler transcraniano.....	35
3.3.1	Considerações gerais sobre o Doppler transcraniano.....	35
3.4	Determinantes genéticos que apresentam influência sobre a doença falciforme.....	39
3.4.1	Gene da metilenotetrahidrofolato redutase.....	39
3.4.2	Gene da óxido nítrico sintase endotelial.....	43
4	MATERIAL E MÉTODO.....	46
4.1	Considerações éticas.....	46
4.2	Delineamento do estudo.....	46
4.3	Amostra.....	46
4.3.1	Critérios de inclusão.....	47
4.3.2	Critérios de exclusão.....	47
4.3.3	Recrutamento dos sujeitos e aquisição do consentimento livre e esclarecido.....	47
4.3.4	Coleta de sangue.....	48
4.4	Variáveis.....	48
4.4.1	Variável primária.....	48
4.4.2	Variáveis secundárias.....	49
4.5	Obtenção dos dados sobre idade e ocorrência de AVE isquêmico.....	50

4.6	Parâmetros da velocidade do fluxo sanguíneo encefálico.....	50
4.7	Análise molecular.....	50
4.7.1	Extração do DNA.....	50
4.7.2	Detecção do polimorfismo C677T no gene da MTHFR	51
4.7.3	Detecção do polimorfismo T786C no gene da eNOS	52
4.8	Método estatístico.....	53
5	RESULTADOS.....	56
5.1	Frequência de pacientes submetidos ao Doppler transcraniano, de acordo com os critérios de classificação a partir do sexo, idade e tipo de hemoglobinopatia.....	56
5.2	Estratificação do risco de desenvolvimento de acidente vascular encefálico através da velocidade do fluxo sanguíneo encefálico em pacientes falciformes com resultados alterados.....	58
5.3	Avaliação dos parâmetros hematológicos analisados nos pacientes com risco aumentado para o acidente vascular encefálico.....	59
5.4	Parâmetros bioquímicos analisados nos pacientes com risco aumentado para o acidente vascular encefálico.....	62
5.5	Relação entre idade, parâmetros hematológicos e bioquímicos e a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico.....	63
5.5.1	Relação entre velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a idade.....	63
5.5.2	Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e parâmetros hematológicos.....	66
5.5.3	Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e parâmetros bioquímicos.....	68
5.6	Detecção do polimorfismo do gene MTHFR C677T.....	71
5.7	Detecção do polimorfismo do gene eNOS T786C.....	72
5.8	Relação entre o polimorfismo do gene MTHFR C677T e a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico, de acordo com o resultado do Doppler transcraniano.....	73
5.9	Relação entre o polimorfismo do gene eNOS T786C e a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico, de acordo com o resultado do Doppler transcraniano.....	75
6	DISCUSSÃO.....	78

7	CONCLUSÕES.....	88
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

A doença falciforme (DF) é uma desordem genética que afeta mais de 6 milhões de nascimentos por ano, ocasionando risco de morte a essas pessoas. O termo DF inclui a anemia falciforme (AF) e outras condições patológicas em que o gene da hemoglobina S (HbS) está associado a variantes que caracterizam outras hemoglobinopatias hereditárias (S/β^0 e S/β^+ tal) (GROSSE et al., 2011; LOBO et al., 2011), envolvendo diversos tipos de genótipos que promovem as características clínicas da doença (STUART; NAGEL, 2004; STEINBERG, 2009).

A AF é uma doença multissistêmica associada a episódios de doença aguda e dano orgânico progressivo, em que ocorre a polimerização da molécula de hemoglobina, que leva à rigidez e vaso-occlusão dos eritrócitos, indispensável para a fisiopatologia da doença (REES et al., 2010). Ocorre principalmente em negros, com alta prevalência em todo o mundo, incluindo o Brasil (PIEL et al., 2013). É a forma mais grave pela qual a DF apresenta-se, sendo necessário – para que ela se manifeste – que ocorra em homozigose (HbSS) dos alelos β^s no gene responsável pela síntese da cadeia β da hemoglobina (OKUMURA et al., 2013). A AF é causada por uma mutação no gene da β -globina, onde se substitui o ácido glutâmico pela valina, proporcionando uma diversidade de expressões fenotípicas nos pacientes acometidos (CONRAN et al., 2009). Trata-se de uma desordem hemolítica que resulta em um estado inflamatório crônico (CHIES; NARDI, 2001; WEATHERALL et al., 2005).

Esse tipo de anemia pode apresentar uma série de complicações nesses pacientes, incluindo episódios vaso-oclusivos, provenientes do processo de polimerização, que podem resultar em síndrome torácica aguda (STA) (VICHINSKY et al., 2000), crises algicas (PAIXÃO et al., 2001), úlceras de perna, infecções bacterianas (GILL et al., 1995), hipertensão pulmonar, priapismo, necrose óssea avascular e acidente vascular encefálico (AVE) (ROGERS, 2005; KATO et al., 2006), além de outras complicações intrínsecas à doença (BALLAS, 2007; AKINSHEYE; KLINGS, 2010).

Dentre as complicações apresentadas pelos pacientes com AF, o AVE é uma das mais catastróficas. É uma doença complexa, multifatorial e poligênica resultante da combinação de fatores vasculares, ambientais e genéticos (KIM et al., 2012). Ocorre em aproximadamente 11% dos indivíduos com AF até os 20 anos de idade, com risco mais elevado na primeira década de vida e incidência de 1 a 2% ao ano no período

compreendido entre 2 e 4 anos de idade (SWITZER et al., 2006; LOBO et al., 2011). Nessas crianças, o AVE isquêmico, geralmente, é resultante da estenose ou obstrução de grandes vasos intracranianos, incluindo a artéria carótida interna (ACI) distal, a artéria cerebral média (ACM) proximal e a artéria cerebral anterior (ACA) (STOCKMAN et al., 1972; RUSSEL et al., 1976). A base fisiopatológica para o AVE isquêmico ainda não está totalmente elucidada, em virtude de haver múltiplos fatores envolvidos nesse processo.

A fim de se avaliar o risco primário de AVE nos pacientes acometidos por essa afecção em crianças e adolescentes, a ultrassonografia por Doppler transcraniano (DTC) é considerada a ferramenta prognóstica mais adequada clinicamente disponível. O DTC detecta a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico (VFSE), predizendo o risco aumentado de AVE, permitindo a detecção precoce de alterações arteriais através da utilização de sondas de 2 MHz, pelas janelas cranianas naturais (BERNAUDIN et al., 2005; KWIATKOWSKI, 2006).

A mutação para a HbS não é o bastante para explicar a heterogeneidade fenotípica encontrada nessa população de pacientes com AF. A heterogeneidade entre populações avaliadas previamente; a não-reprodutibilidade entre alguns estudos; e a necessidade de identificar fatores relevantes associados ao AVE, indicam que deve haver uma condução mais apropriada em pesquisas que possam demonstrar a relevância de fatores genéticos ao processo (LETTRE, 2012; RODRIGUES et al., 2016).

As relações entre os genes candidatos que potencialmente afetam a patogênese da AF e os polimorfismos são alvo de diversos estudos da atualidade. Esses polimorfismos de nucleotídeos únicos - single nucleotide polymorfism (SNP) - podem ser detectados por técnicas de genotipagem e modificar os fenótipos de uma doença, contribuindo assim para a identificação de modificadores genéticos em co-herança com a AF capazes de auxiliar no melhor delineamento e compreensão da doença (MILLER et al., 2000; WANG, 2007).

Para contribuir com a caracterização das diferenças genéticas responsáveis pela diversidade encontrada na AF, vários polimorfismos têm sido estudados, dentre eles o polimorfismo no gene da metilenetetraidrofolato redutase (MTHFR) e da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (COUTO; ADÔRNO, MENEZES et al., 2004), que foram alvos desse estudo.

A MTHFR é uma enzima regulatória do metabolismo da homocisteína (HCY), capaz de reduzir seus níveis no sangue, considerada uma enzima chave no

metabolismo do folato, essencial para a síntese de DNA, além de possuir efeito adicional no aumento de riscos para doença vascular (FROSST et al., 1995; FRISO et al., 2002). A variante C677T do gene da MTHFR tem sido correlacionada com 50% da diminuição da atividade chave no metabolismo da HCY e conseqüente aumento em seus níveis plasmáticos, o que pode causar danos às células endoteliais (AL-ABSI et al., 2006).

O polimorfismo T786C da eNOS resulta na redução significativa da atividade da eNOS. Estudos têm sugerido que este polimorfismo pode estar associado à predisposição a hipertensão arterial, doenças coronarianas, aneurisma, diabetes, além do desenvolvimento de estenose da artéria carótida interna (NAKAYAMA et al. 1999).

Existem, porém, resultados contraditórios quanto à importância de mutações no gene da MTHFR e da eNOS como fatores de risco independentes para doenças vasculares. Devido a isto, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de se compreender melhor o envolvimento desses polimorfismos com doenças vasculares nessa população. Em virtude da necessidade de se elucidar pormenorizadamente o envolvimento desses polimorfismos com o AVE em pacientes com AF, buscou-se responder à seguinte pergunta da pesquisa: existe relação entre os polimorfismos dos genes da metilenotetrahydrofolato redutase e da óxido nítrico sintase endotelial, velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e o risco de acidente vascular encefálico em pacientes falciformes?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar se existe relação entre os polimorfismos dos genes da metilenotetrahidrofolato redutase C677T e da óxido nítrico sintase endotelial T786C, a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e o risco de acidente vascular encefálico em pacientes falciformes.

2.2 Objetivos específicos

Verificar a existência de relação entre as variáveis tipo de hemoglobinopatia, sexo e idade e a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico em pacientes falciformes.

Estratificar o risco de desenvolvimento de acidente vascular encefálico em pacientes falciformes, de acordo com os resultados do Doppler Transcraniano.

Correlacionar idade, parâmetros hematológicos e bioquímicos com a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico dos pacientes que apresentaram risco aumentado de desenvolvimento de acidente vascular encefálico.

Relacionar os resultados do polimorfismo rastreado para o gene MTHFR C677T com a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico dos pacientes que apresentaram risco aumentado para o acidente vascular encefálico.

Apresentar a relação entre o polimorfismo rastreado para o gene da eNOS T786C e a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico dos pacientes que apresentaram risco aumentado para o acidente vascular encefálico.

3 LITERATURA

3.1 Descrição da doença Falciforme

3.1.1 Considerações gerais sobre a doença falciforme

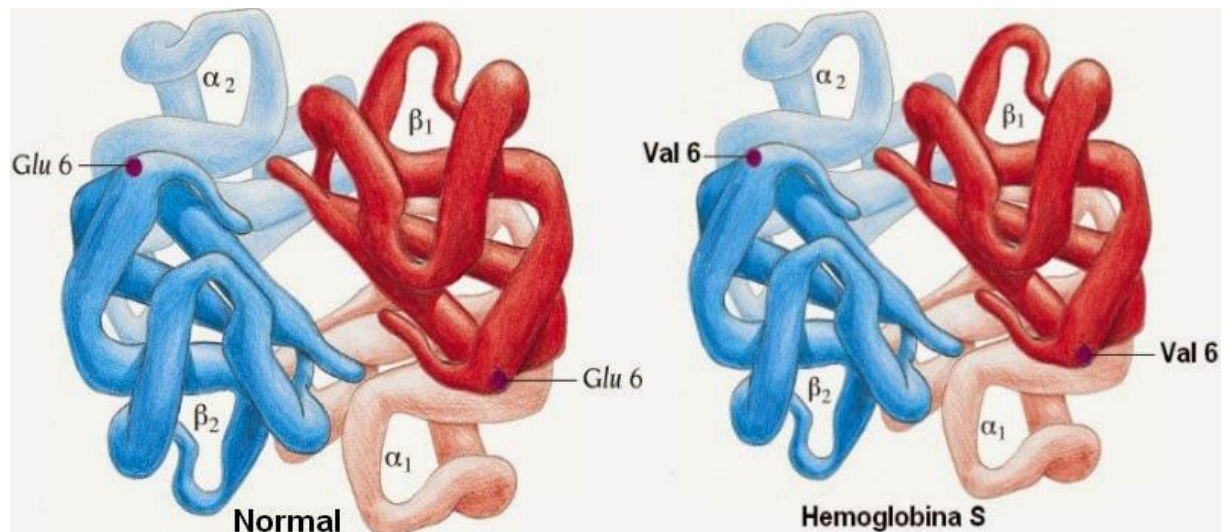
A nomenclatura DF engloba um grupo de anemias hemolíticas hereditárias que apresentam como característica comum a presença de HbS dentro da hemácia e representa a enfermidade hereditária mais prevalente no mundo (YOONG; TUCK, 2002), incluindo condições patológicas em que o gene da HbS está associado a outras hemoglobinopatias hereditárias. Dentre as hemoglobinopatias incluídas nas DF, destaca-se a AF, termo utilizado a partir de 1992 por Manson, que é reafirmada como importante questão de saúde pública, por apresentar relevância clínica, hematológica, genética, bioquímica, epidemiológica e antropológica, apresentando altos índices de mortalidade. Apresenta como importância fisiopatológica a desoxigenação da hemoglobina (LOBO et al., 2011).

A desoxigenação da HbS ocasiona a polimerização dessa molécula, causando a formação de cristais e filamentos que facilitam a distorção da membrana eritrocitária, o que caracteriza o surgimento de drepanócitos, um tipo de poiquilocitose conhecido pela sua característica forma de foice, fenômeno tal que promove alterações físico-químicas na membrana (SERJEANT, 1992). A polimerização da hemoglobina ocasiona a rigidez e vasoconstricção dos eritrócitos, o que é fundamental para a fisiopatologia da doença (RESS et al., 2010). De acordo com Frenette; Atweh (2007), o processo de polimerização da HbS nos eritrócitos apresenta, como consequência, diversas alterações na célula, tais como: aumento da densidade dos eritrócitos, rompimento do citoesqueleto eritrocitário, hemólise, efluxo de íons monovalentes como o potássio e desidratação celular.

A AF é uma doença multissistêmica associada a episódios agudos e danos progressivos aos indivíduos acometidos (RESS et al., 2010), causada por uma mutação no gene da globina β da hemoglobina, originando uma hemoglobina anormal, denominada HbS (STEINBERG; ADEWOYE, 2006; WEATHERALL, 2010), que resulta na troca do ácido glutâmico pela valina (GONÇALVES et al., 2003), devido à troca da base nitrogenada adenina (base purínica) por uma timina (base pirimídica) (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010) na posição 6 da cadeia beta, com consequentes

alterações físico-químicas na molécula da hemoglobina (WEATHERALL, 2010), resultando em uma anemia do tipo hemolítica, com ampla variação, no que concerne a severidade e padrão de morbidade (BEUTLER, 2001). A Figura 1 mostra o modelo de uma molécula de hemoglobina entre um indivíduo normal e outro com AF.

Figura 1 – Modelo da molécula de hemoglobina de um indivíduo normal e de um indivíduo com anemia falciforme.

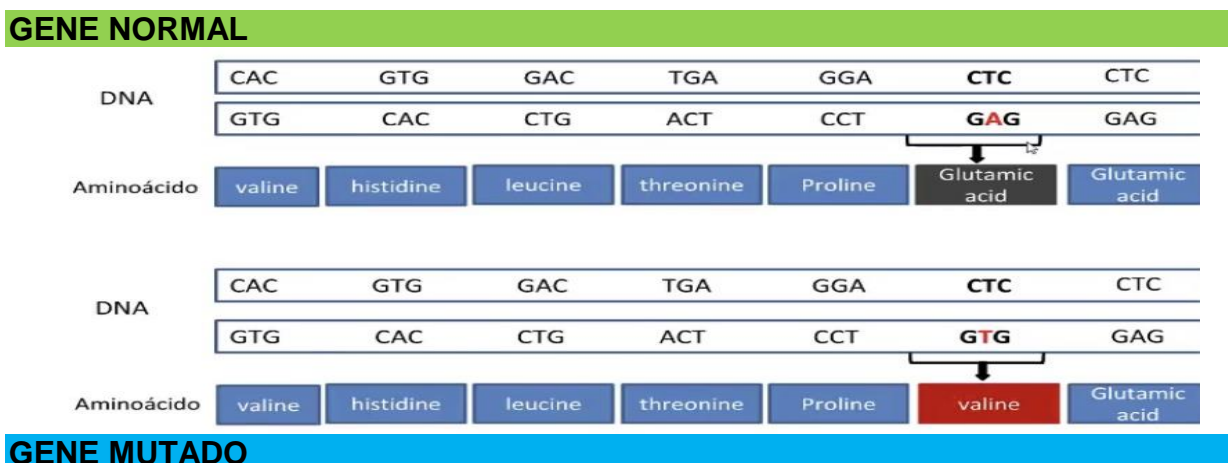


Fonte: Disponível em <http://www.medicinageriatrica.com.br>. A imagem à esquerda mostra a cadeia hemoglobínica de um indivíduo normal, sem a anemia falciforme; enquanto que à direita observa-se a cadeia de um indivíduo com anemia falciforme, com a hemoglobina S.

A base genética da AF é uma transversão A-T no sexto códon do gene da hemoglobina. As complexidades da expressão gênica da globina tornam difícil o desenvolvimento de tratamento para as hemoglobinopatias com base na terapia genética (LAN et al., 1998).

A Figura 2 apresenta um esquema com um gene normal e outro mutado. No gene normal observa-se a presença do aminoácido ácido glutâmico e a base purínica GAG, enquanto que no gene mutado nota-se a substituição da base purínica por uma pirimídica GTG, em virtude da troca da adenina pela timina e, conseqüentemente, pelo aminoácido valina.

Figura 2 – Esquema da mutação que resulta na substituição de uma base purínica por uma pirimídica na posição 6 da cadeia beta da hemoglobina.



Fonte: LOBO, C.; MARRA, V. N.; SILVA, R. M. G. Crises dolorosas na doença falciforme. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 247-258, Set. 2007. Legendas: A – Adenina; C – Citosina; G – Guanina e T – Timina.

3.1.2 Aspectos históricos e epidemiológicos

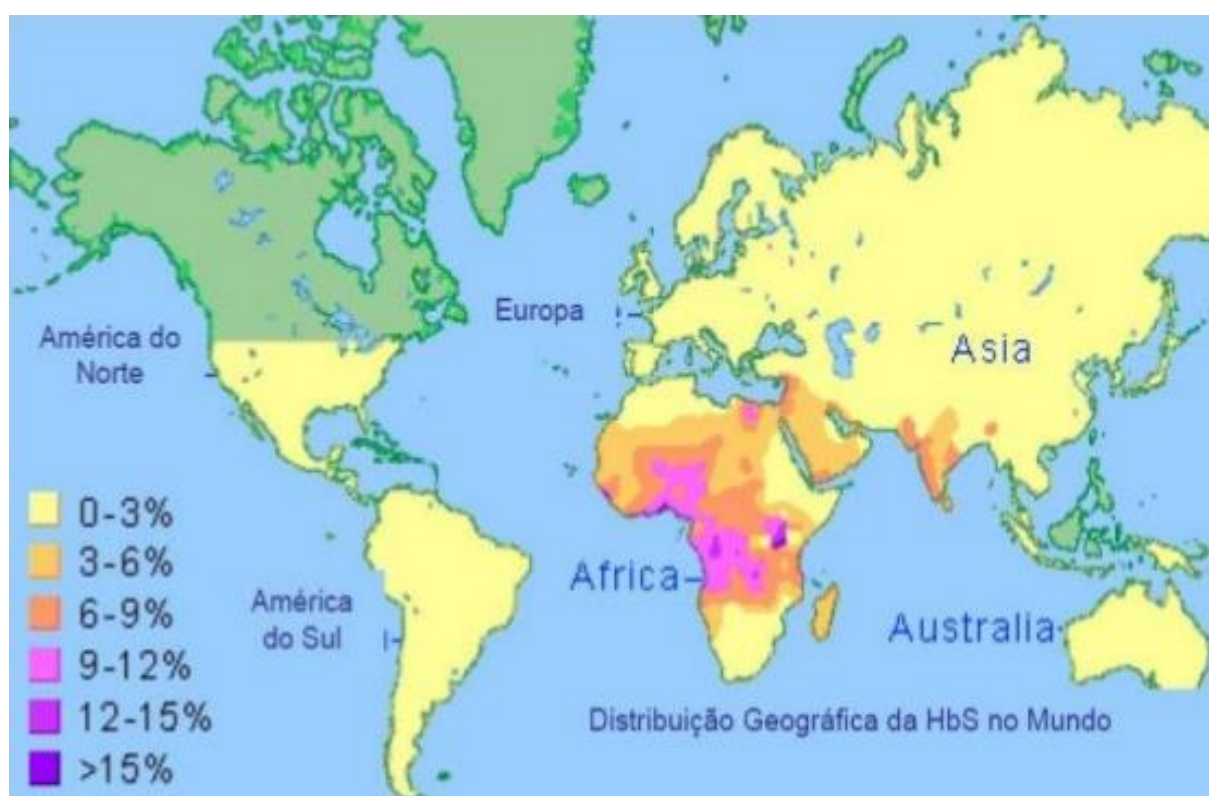
Os estudos sobre AF surgiram a partir do momento em que se observaram hemácias alongadas e em forma de foice em distensões sanguíneas de um jovem negro com anemia, nas Índias Ocidentais. Em 1927, Hanh e Gillepsie descobriram que a falcização dos eritrócitos acontecia como consequência da exposição das células a uma baixa tensão de oxigênio. Em 1947, Accioly, pela primeira vez – no Brasil – sugeriu que se tratava de uma herança autossômica recessiva, o que foi ratificado apenas em 1949, por Neel e Beet, visto que os heterozigotos eram apenas portadores assintomáticos e a doença foi definida somente em estado de homozigose (FIGUEIREDO, 1996).

Após essas descobertas, outros pesquisadores buscaram entender as diferenças entre a hemoglobina de indivíduos normais e pacientes com AF. Ainda em 1949, Linus Pauling et al. demonstraram que havia uma diferença na migração eletroforética desses pacientes com hemácias em foice. A natureza bioquímica dessa doença foi elucidada em 1956, por Ingram, quando a hemoglobina foi fracionada em peptídeos. Em 1978, através dos estudos de Kan e Dozy, iniciaram-se a implementação de técnicas de biologia molecular. Na década de 70, a presença da HbS foi considerada

um problema de saúde pública e o aconselhamento genético uma medida de prevenção eficaz (DIGSS, 1973).

A AF é encontrada principalmente na África e em povos ancestrais africanos, como área principal a zona equatorial, delimitada ao deserto do Saara e maciço das montanhas da Etiópia ao Norte e, ao Sul, aos rios Cunene e Zambeze. Acomete, usualmente, pessoas da África subsaariana, Caribe, Índia, parte do Oriente Médio e Mediterrâneo e seus descendentes, mas também é uma desordem muito comum em locais como o Reino Unido, em se tratando de pessoas com relações familiares com africanos ou caribenhos (CONRAN et al., 2009) (Figura 3).

Figura 3 – Frequência do alelo S em diferentes populações mundiais.



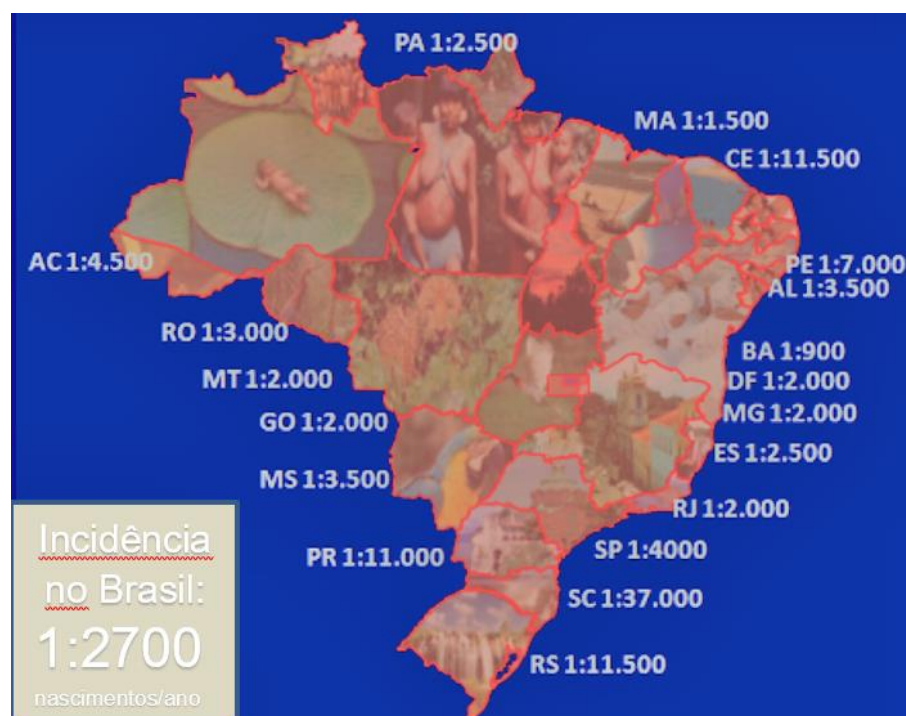
Fonte: PERIN, C. et al. Anemia Falciforme. Porto Alegre, outubro de 2000. Disponível em: <<http://genetica.ufcspa.edu.br/seminarios%20textos/AnemiaFalciforme.pdf>> Acesso em: 13 maio 2012.

No Brasil, há uma estimativa de nascerem 700 a 1000 crianças com DF a cada ano (LYRA et al., 2005; CONRAN et al., 2009) com estimativa da idade média de sobrevivência de 14,3 anos para ambos os sexos. Em 2010, estimava-se que 93,4% dos pacientes com AF iriam sobreviver um período médio de 18 anos. Os avanços na área de hematologia envolvendo esses pacientes no último século vieram para

melhorar a sobrevivência dessa população, o que pôde ser evidenciado em um estudo realizado em 2014, cuja sobrevida passou a ser de 58 anos em ambos os sexos entre os pacientes com AF (PLATT et al., 1994; ELMARIAH et al., 2014).

A distribuição do alelo S no Brasil é caracterizada por ampla heterogeneidade, a depender da composição caucasóide ou negroide da população, apresentando maiores prevalências nas regiões Norte e Nordeste (6% a 10%), enquanto nas regiões Sul e Sudeste a prevalência é menor (2% a 3%) (CANÇADO; JESUS, 2007). Dados PNTN/Ministério da Saúde (2013) passaram a incluir Alagoas na distribuição do gene S no Brasil (Figura 4). No Brasil, nascem aproximadamente 1000 recém-nascidos com DF ao ano. Observa-se que para cada 3500 nascimentos um recém-nascido apresenta DF em Alagoas.

Figura 4 – Distribuição do gene S no Brasil.

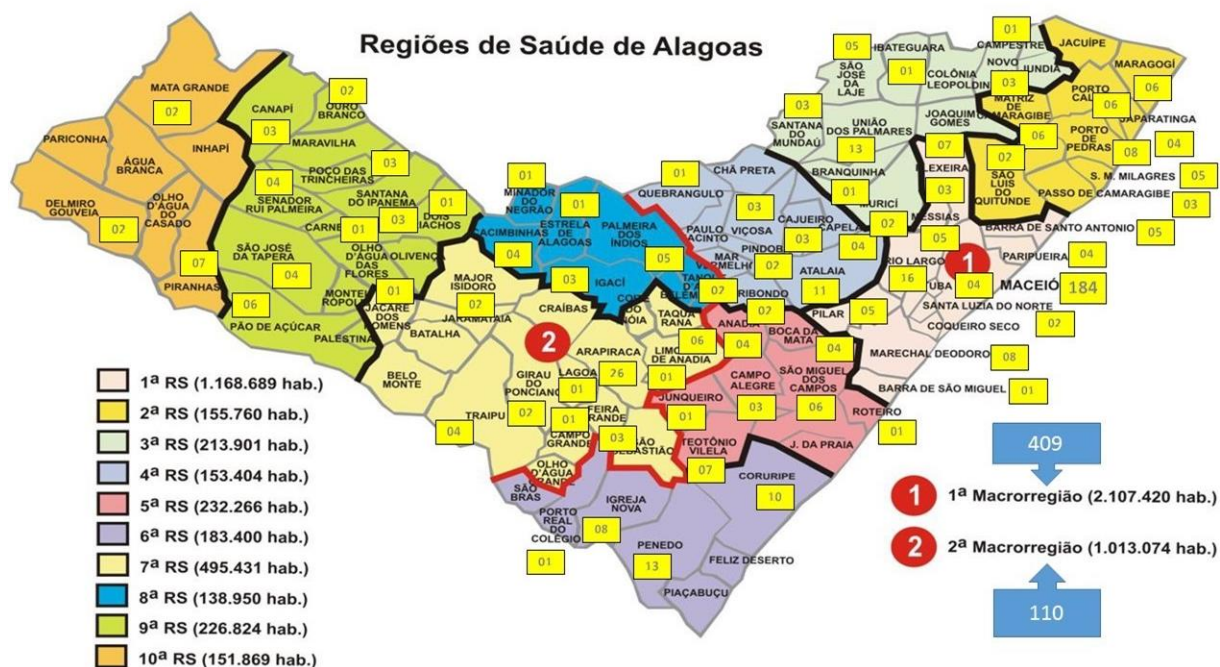


Fonte: PNTN/Ministério da Saúde. Programas Estaduais de Triagem Neonatal/Serviços de Referência em Triagem Neonatal Credenciados, 2013.

Atualmente, em Alagoas, existem 552 pessoas com hemoglobinopatias, de acordo com a Associação de Pessoas com Hemoglobinopatias de Alagoas (APHAL). A Figura 5 ilustra as regiões de saúde de Alagoas, ressaltando-se as macrorregiões com os números de habitantes. O município que apresenta maior número de pessoas com DF é a capital, Maceió (184 pessoas), seguido de Arapiraca (26 pessoas). Percebe-se

que municípios como Pariconha, Água Branca, Olho D'água do Casado, Belo Monte, Jacuípe, Joaquim Gomes e Inhapi não apresentam casos de DF.

Figura 5 – Distribuição do gene S em Alagoas, de acordo com as regiões de saúde.



Fonte: Dados cedidos pela Associação de Pessoas com Hemoglobinopatias de Alagoas (APHAL), 2017. Legendas: RS – Regiões de Saúde; Hab – Habitantes.

Dados do CGHS/DAE/SAS (2010) mostram que 26.998 pessoas foram beneficiadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A Figura 6 informa que as regiões mais beneficiadas são a Sudeste e Nordeste. Em Alagoas, 440 são beneficiadas por essas ações.

Figura 6 – Estimativa de beneficiados pelas ações da Política Nacional de Doença Falciforme no Brasil, no ano de 2010.



Fonte: CGHS/DAE/SAS (2010).

3.1.3 Características clínicas

A natureza multifatorial da AF envolve uma série de mudanças, tais como: afoçamento do eritrócito (Figura 7), ativação de mediadores inflamatórios, hemólise, episódios vaso-oclusivos, estresse oxidativo e disfunção endotelial, aparentemente resultante da instabilidade da HbS. Os avanços moleculares, celulares e clínicos da confirmam que se trata de uma doença inflamatória crônica com efeitos agudos controláveis clinicamente (LETTRE et al., 2008).

Figura 7 – Campo microscópico evidenciando o afoiçamento dos eritrócitos em paciente com anemia falciforme.



Fonte: AUTOR, 2017. As setas mostram três dos diversos drepanócitos apresentados em um campo microscópico. Aumento de 1000X. Corante May Grunwald-Giemsa.

Em um estado de desoxigenação, a molécula de hemoglobina torna-se polimerizada e deforma os eritrócitos - causando danos oxidativos, desidratação celular, assimetria anormal fosfolipídica e aumento da adesão ao endotélio vascular (SERJEANT et al., 2005). De acordo com Kato et al. (2007); Conran et al. (2009); Booth et al. (2010), as manifestações clínicas resultam de dois processos patológicos importantes: hemólise e vaso-oclusão, além de crises álgicas e alterações cardiovasculares (SERJEANT, 1992). Complicações advindas da AF como: insuficiência renal, crise vaso-oclusiva, STA e AVE, demonstraram resultar em redução de 25 a 30 anos da expectativa de vida das pessoas com a doença, em comparação com a população geral sem DF (BRASIL, 2001).

A hemólise é um evento importante na AF, desencadeada pela polimerização da HbS, ocorrendo predominantemente extravascular, por causa da fagocitose de eritrócitos falcizados por células reticuloendoteliais. A hemólise varia amplamente entre os mais diversos tipos de genótipos, sendo bem maior, todavia, em sua forma homozigótica, HbSS. A sobrevivência das hemácias nesses pacientes pode variar entre 2 e 21 dias (KATO et al., 2006; BELISARIO et al., 2015).

Segundo Morris (2008), a disfunção endotelial é um fator bastante importante na fisiopatologia da AF, sendo, para alguns fenótipos, mais importante que a própria

polimerização da hemoglobina eritrocitária. Essa disfunção endotelial é produzida pela hemólise acentuada, déficit de arginina, redução da biodisponibilidade do NO – que pode responder pela vasculopatia presente em alguns subfenótipos em que predominam as manifestações de priapismo, hipertensão pulmonar, úlceras de perna e, provavelmente, o AVE.

A consequência da elevada adesividade do eritrócito falcêmico ao endotélio vascular dos capilares provoca a estase venosa que desencadeia a hipóxia tecidual, fato que leva mais moléculas de HbS ao estado de desoxi-HbS, numa situação circulatória já desfavorável, lesando os tecidos perfundidos por esses capilares, além disso, sabe-se que, eventualmente, pode ocorrer oclusão total dos capilares como no caso da trombose (STEINBERG, 1998).

3.1.4 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da AF é dividido em testes de triagem, que são utilizados para fazer um pré-diagnóstico desta patologia, hemograma, teste de falcização, teste de solubilidade, dosagem de hemoglobina fetal e hemoglobina A2. O diagnóstico confirmatório é realizado pela detecção da HbS e da sua associação com outras frações, assim, a técnica mais eficaz é a eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose ou em agarose, com pH variando de 8 a 9. As técnicas eletroforéticas alcalina e ácida, associadas, são úteis quando se trata de variantes de hemoglobina, como a hemoglobina C (HbC), em virtude dessas técnicas serem decisivas para o diagnóstico correto. Quando o padrão eletroforético da AF é similar ao de algumas associações entre a HbS e outras hemoglobinas, podem ser necessárias quantificações de hemoglobina A2 e fetal. Os valores dos índices hematimétricos são fundamentais na conclusão dos resultados. A hemólise e a presença de crises de falcização também ajudam na elucidação do diagnóstico (BRASIL, 2001).

3.2 Acidente vascular encefálico

De acordo com Ohene-Frempong et al. (1998); Platt et al. (1994); Balkaran et al. (1992); Wang et al. (1998); Leikin et al. (1989), o AVE é a mais catastrófica complicação

da AF, representando 20% das mortalidades ocorridas entre crianças e adultos (STOCKMAN et al., 1972; HOPPE et al., 2007), sendo, dessa forma, uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (MODI et al., 2005). É uma doença complexa, multifatorial e poligênica resultante da combinação de fatores vasculares, ambientais e genéticos (KIM et al., 2012).

O Estudo Cooperativo nos Estados Unidos, do termo inglês Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSCD) mostrou que entre 5 a 10% dos pacientes com AF vão experimentar um AVE clinicamente manifestado durante a infância, enquanto outros 20 a 30% terão infartos silenciosos detectáveis pela ressonância magnética (RM), mas sem correlação clínica. A concentração de hemoglobina baixa é um fator de risco para o AVE isquêmico (OHENE-FREMPONG, et al. 1998). De acordo com Wang et al. (2008), o pico de incidência de AVE em pacientes com AF ocorre entre as idades de 2 a 7 anos, com predomínio de AVE isquêmico, apresentando alta taxa de recorrência em pacientes após o primeiro episódio, tendo como possíveis fatores agravantes a história de STA recente ou recorrentes e a gravidade da anemia.

Um estudo da Jamaica, realizado por Adams (1994), observou uma prevalência de AVE de 7,8% até 14 anos de idade. Powars et al. (1978) constataram 67% de recorrência do episódio, entretanto 80% ocorreu nos três primeiros anos após o evento primário. Segundo Italia et al. (2015), o AVE ocorre em 11% dos pacientes com idade inferior a 20 anos, sendo 300 vezes maior em crianças com DF.

De acordo com Domingues-Montanari et al. (2008), o AVE caracteriza-se por apresentar comprometimento do fluxo sanguíneo ao encéfalo seguido da oclusão ou ruptura do vaso sanguíneo encefálico. Dessa forma, pode ser classificado em evento isquêmico ou hemorrágico, respectivamente.

Dois terços dos AVE ocorrem nos países desenvolvidos e estima-se que em 2020 esta patologia seja a maior causa de incapacidade nesses países (CHRISTOPHER; NAGARAJA; SHANKAR, 2007). Os fatores de risco convencionais para o AVE isquêmico incluem história prévia de doença cerebrovascular (SAWULA et al., 2009), hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade (PEZZINI; DEL ZOTTO; PADOVANI, 2007), dislipidemia e tabagismo (MODI et al., 2005), obrigando os pacientes a serem reabilitados dinamicamente e progressivamente até atingirem a restauração funcional. Contudo, o AVE isquêmico também ocorre em indivíduos sem nenhum dos fatores de risco

tradicionais e apenas dois terços dos AVE podem ser atribuídos a tais fatores (MODI et al., 2005).

Segundo Switzer et al. (2006), ainda não se tem a elucidação pormenorizada da base fisiopatológica para o AVE isquêmico. A vasculopatia com estenose de grandes vasos cerebrais pertencentes ao círculo arterial do encéfalo é responsável pela maioria dos eventos agudos, principalmente no que diz respeito à parte distal da ACI e das regiões próximas às ACM e ACA.

Adams et al. (1998) tornaram públicos os resultados do estudo STOP, do inglês Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Disease, um estudo clínico controlado e multicêntrico, financiado pelo National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBi), com o objetivo principal de verificar a eficácia da prevenção primária do AVE em crianças com AF, por meio de transfusão crônica. Quatorze instituições dos Estados Unidos e Canadá participaram, rastreando-se 1934 crianças entre 2 e 16 anos de idade, sem história de AVE prévio, pelo DTC. Cento e trinta dessas crianças apresentavam fluxo sanguíneo com velocidade média máxima (VMM) igual ou superior a 200 cm/s nas artérias cerebrais, em dois exames, e foram separadas em dois grupos: um recebeu transfusão e outro ficou em tratamento conservador. A detecção da velocidade média com esses valores, nas ACI ou ACM, por meio do DTC, associava-se a elevado risco para desenvolvimento de infarto cerebral isquêmico sintomático.

Ainda, de acordo com Adams et al. (1998), do grupo que recebeu transfusão, apenas um paciente evoluiu com AVE, enquanto que no grupo com tratamento conservador, sem transfusão, onze evoluíram para o AVE, com significância entre eles. Diante dessa evidência, o estudo foi interrompido, sendo oferecido regime crônico de transfusão a todos os pacientes com risco elevado. Esse tratamento levou a uma redução de 90% nas taxas de AVE, ratificando a validação do DTC no rastreamento das crianças com risco elevado para desenvolvimento de AVE. A curva de sobrevivência livre de evento, nesse caso o AVE, após 65 meses de seguimento, mostrou diferença significativa entre os grupos transfundidos e não-transfundidos, com o risco de AVE 93% maior nos não-transfundidos. As transfusões mantiveram a HbS abaixo ou próxima de 30% (LEE et al., 2006).

O estudo STOP II foi iniciado em 2000, com o objetivo de determinar se os pacientes nos quais a VFSE houvesse normalizado poderiam descontinuar o uso das transfusões profiláticas. Os resultados mostraram que as transfusões profiláticas deveriam ser mantidas para prevenção do AVE, por período indeterminado (ADAMS,

2005). De acordo com Fullerton et al. (2004), houve ocorrência de menor número de internações por AVE em crianças com AF em um hospital da Califórnia após o estudo STOP.

3.3 Doppler transcraniano

3.3.1 Considerações gerais sobre o Doppler transcraniano

Diversas técnicas vêm sendo utilizadas para investigar a função cerebrovascular na infância. Dentre essas técnicas, podem ser incluídas: tomografia por emissão de pósitrons, imagens de RM e espectroscopia infravermelha, contudo tais técnicas são caras, além de serem inviáveis para uso em crianças, visto que se faz necessário permanecer sentado ou em pé por prolongado período de tempo (LOHMANN et al., 2006). A angiografia cerebral é considerada o padrão-ouro nesse tipo de investigação, no entanto apresenta riscos de complicações e exige preparo do paciente (ADAMS et al., 1992).

O DTC, descrito pela primeira vez por Aaslid et al. (1982) - embora o princípio Doppler tenha sido primeiramente descrito em 1843, por Christian Johann Doppler (KASSAB et al., 2007) - é um transdutor não-invasivo baseado no uso de ondas sonoras de baixa frequência (≤ 2 MHz) em janelas ósseas finas que permite a monitorização dinâmica da VFSE (MOPPETT; MAHAJAN, 2004). É uma medida bem estabelecida da VFSE, o que permite detectar, clinicamente, pacientes que apresentam alto risco de desenvolver o AVE (ADAMS et al., 1992), todavia o risco é consideravelmente reduzido naqueles pacientes que são submetidos a transfusão de sangue crônica (ADAMS et al., 1998). Atualmente, o DTC vem sendo usado como um método não-invasivo de avaliação da VFSE em artérias cranianas, oferecendo informações em tempo real sobre a hemodinâmica encefálica durante longos períodos de monitoramento (MARTINEZ-SÁNCHEZ et al., 2009; YEO; SHARMA, 2010).

As sondas de frequência mais altas utilizadas em estudos envolvendo o Doppler extracraniano não são aplicáveis às medidas intracranianas, visto que as ondas de frequência mais alta não são capazes de penetrar adequadamente através do crânio. Além de usar sondas de menor frequência, a insonação das artérias cerebrais só é possível através de regiões mais finas do crânio, denominadas janelas acústicas. Logo,

a familiaridade com a localização anatômica das artérias cerebrais em relação às janelas acústicas e as velocidades do fluxo sanguíneo para as diversas artérias é crítica para medições precisas do fluxo sanguíneo (DEWITT; WECHSLER, 1988)

O efeito Doppler é caracterizado como a diferença entre a transmissão e as frequências sonoras refletidas. Quando uma pequena quantidade de corrente elétrica é passada através do cristal piezoelétrico no transdutor, ele vibra para gerar pulsos de ondas de ultrassom de uma frequência específica. As frequências dos ecos emitidos depois de bater em um objeto em movimento são diferentes daqueles emitido pela fonte. Tal efeito permite a detecção de movimento de tecidos e fluxo sanguíneo. Os sinais complexos resultantes das reflexões de mover as células vermelhas do sangue são divididos em velocidades individuais através de um método chamado de Transformação Rápida de Fourier (FFT). O ângulo de insonação (o ângulo entre o feixe de ultrassom e o fluxo de sangue) é presumido ser zero graus (EDELMAN, 2007).

O DTC mede a VMFSC em artérias que fazem parte do círculo arterial do encéfalo, tais como ACI distal e ACM. As crianças que apresentam resultados anormais (definidos como ≥ 200 cm/s) têm um risco muito mais elevado de desenvolver AVE primário que aqueles com resultados normais (<170 cm/s). O limiar de risco de 200 cm/s não é absoluto, porque as crianças que apresentam resultados condicionais (170-199 cm/s) também têm um risco elevado para o desenvolvimento de AVE (ADAMS et al., 1992). Sendo assim, o DTC constitui-se como a ferramenta mais útil, atualmente disponível, para prever a doença cerebrovascular, importante para a prevenção primária do AVE através do rastreamento periódico dessas crianças (ADAMS, 2005).

Segundo Groen et al. (2012) e Bishop et al. (2010), o DTC é uma técnica apropriada para crianças. Diante do conhecimento que se tem sobre o crânio ser relativamente fino na infância (mais notavelmente em torno da janela temporal), os vasos sanguíneos são mais facilmente insonados e a falha na detecção de um sinal é um evento raro, diferentemente do idoso, em que a espessura do crânio pode impedir o procedimento em cerca de 30% dos casos (KEAGE et al., 2012).

Dez anos após a primeira descrição do DTC, em 1992, um grupo de pesquisadores estudou 190 crianças com DF com idade entre 3 e 18 anos e, após 29 meses de seguimento, 23 pacientes apresentaram DTC com alta velocidade média nos grandes vasos cerebrais (170 até 280 cm/s), confrontando com 167 com resultados normais. Dessa forma, sete episódios de AVE foram diagnosticados, sendo um deles em pacientes com DTC normal (ADAMS et al., 1992). Em 1997, o National Institute of

Health (NIH) recomendou o uso do DTC como teste de rastreamento para crianças com DF, além da necessidade de tratamentos preventivos primários com transfusões regulares serem feitos às crianças de risco.

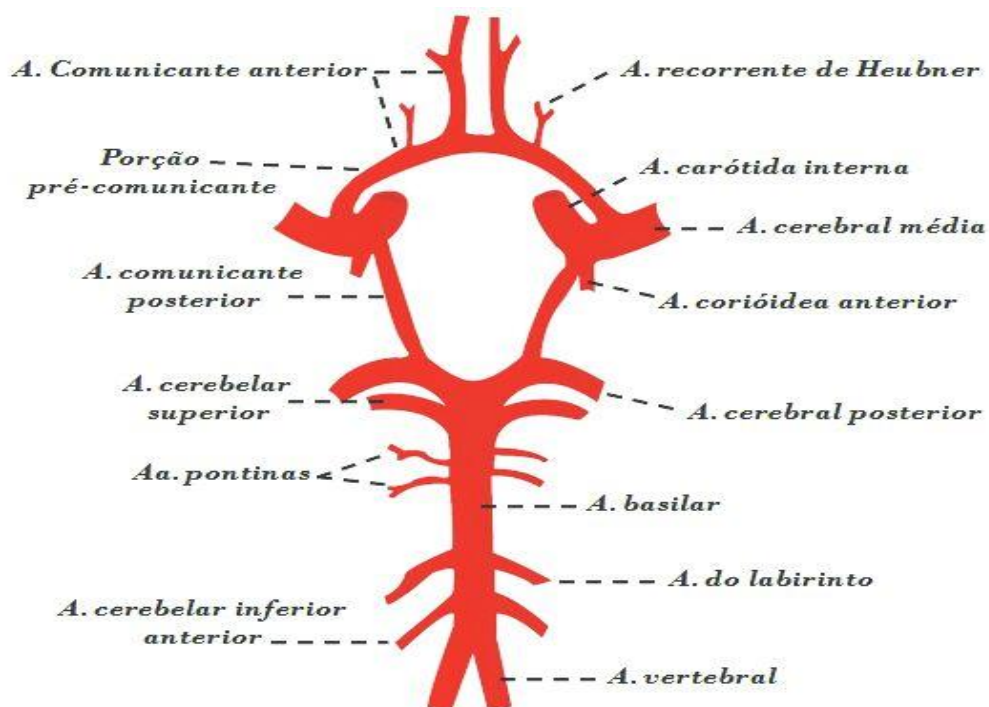
Infartos silenciosos também podem estar associados ao aumento da velocidade do fluxo, o que pode acontecer em outras complicações neurológicas, tais como: convulsões e deficiência neurocognitiva. No que diz respeito à redução da VFSE, podem estar envolvidos com outras doenças cerebrovasculares, tais como oclusões e outros acidentes cerebrovasculares (PRENGLER et al., 2006).

O DTC é restrito a crianças e não identifica com precisão todos os pacientes com AF que irão desenvolver complicações cerebrovasculares. Apresenta boa segurança, custo reduzido, e pode ser realizado em ambulatório, clínicas ou em atividades de campo, devido a sua portabilidade. Possui índices de sensibilidade e especificidade próximos da angiografia cerebral (ADAMS, 2005).

Em algumas áreas no crânio, os ossos são relativamente mais finos e permitem penetração suficiente do ultrassom. Estas áreas são chamadas janelas acústicas. As quatro janelas acústicas comumente empregadas em adultos são: a janela transtemporal, a janela transorbital, a janela submandibular e a janela suboccipital. Embora cada janela tenha vantagens únicas para diferentes artérias e indicações, um exame completo de DTC deve incluir medições de todas as quatro janelas e o curso de fluxo sanguíneo em várias profundidades dentro de cada ramo principal do círculo de Willis deve ser avaliado (ALEXANDROV et al., 2011).

Os pontos de referência para insonação dos segmentos arteriais do círculo arterial encefálico, de acordo com o estudo STOP, são mostrados na Figura 8.

Figura 8 – Ponto de referência para insonação dos segmentos arteriais do círculo arterial do encéfalo, de acordo com o estudo STOP.



Fonte: ADAMS R.J. et al. Prevention of a first stroke in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial doppler ultrasonography. *N Engl J Med* 1998; 339:5-11.

O maior obstáculo para obter informação acústica a partir do espaço intracraniano é o osso do crânio, que atenua cerca de 90% das ondas de ultrassom. Como a atenuação é menor para o ultrassom de baixa frequência, é por essa razão que o DTC emprega um ultrassom de 2 MHz para permitir o teste de desempenho (EDELMAN, 2007).

Segundo Brambilla et al. (2007), faz-se necessário realizar um DTC confirmatório, devido ao fato do mesmo apresentar variações individuais fisiológicas, como o sono, por exemplo e fatores como a febre, que podem elevar o fluxo sanguíneo encefálico. Os pacientes que apresentam fluxo maior que 220 cm/s ao primeiro teste, geralmente terão seus resultados confirmados em 95% dos casos. O estudo STOP reitera que o DTC deve ser realizado quando a criança está livre de eventos clínicos, tais como: febre, anemia acentuada e hipóxia, a fim de evitar a elevação da VFSE. Já a transfusão de concentrado de hemácias pode reduzir a velocidade por várias semanas, até que o nível de hematócrito retorne aos valores usuais.

3.4 Determinantes genéticos que apresentam influência sobre a doença falciforme

Diversos estudos têm identificado associações entre polimorfismos de genes e o desenvolvimento de doenças cerebrovasculares em pacientes com AF (FLANAGAN et al., 2011). Os polimorfismos genéticos podem ser detectados por técnicas modernas de genotipagem. Muitos tipos de SNP estão associados ao grau de anemia, mas também às crises de dor, úlceras de perna, complicações hepatobiliares, priapismo e AVE (FERTRIN; COSTA, 2010).

3.4.1 Gene da metilenotetrahidrofolato redutase

A MTHFR é uma enzima regulatória do metabolismo da HCY, capaz de reduzir seus níveis no sangue, sendo considerada uma enzima chave no metabolismo do folato, essencial para a síntese de DNA. Mutações ocorridas no gene da MTHFR têm sido associadas com a forma enzimática termolábil, de baixa atividade biológica (FROSST et al., 1995). A MTHFR possui efeito adicional no aumento de riscos para doença vascular. A sua atividade enzimática reduzida interrompe a síntese de metionina no ciclo da homocisteína. A diminuição do maior doador do grupo metil provoca uma hipometilação do DNA e expressão do gene anormal, o qual pode ser encontrado em indivíduos com genótipo homozigoto mutante (FRISO et al., 2002). Pacientes falciformes têm mostrado ativação da coagulação sanguínea e sistema fibrinolítico, bem como aumento da atividade plaquetária e consumo dos inibidores da coagulação, especialmente durante as crises vaso-oclusivas. Entre os pacientes com AF, STA e AVE foram identificadas como possíveis causas de óbito, e essas complicações podem ser decorrentes de eventos tromboembólicos (ANDRADE et al. 1998; MOREIRA-NETO et al. 2006).

Alterações na hemostasia são comuns de serem encontradas e as manifestações clínicas observadas incluem tromboembolismo venoso, trombose e AVE, além de um maior risco dessas complicações em pacientes esplenectomizados (STEIN et al. 2006). Complicações vasculares são aspectos importantes no espectro clínico da AF, no entanto existem evidências controversas sobre o papel da trombose nesses casos (MOREIRA-NETO et al. 2006).

Diversas doenças, principalmente neurológicas, vasculares, com presença de homocisteinúria e/ou homocisteinemia, têm sido relacionadas à deficiência de enzimas que atuam na metilação, principalmente a MTHFR. Esse polimorfismo foi investigado em pacientes falciformes, associado ao aumento dos níveis séricos de HCY total, descrito como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, além disso, sabe-se que esses pacientes possuem um risco aumentado de desenvolver a doença vascular arterial e trombose venosa (COUTO; ADÔRNO; MENEZES et al., 2004).

A HCY tem sido considerada um dos fatores de risco não só para doença arterial coronariana, trombose venosa, como também para o AVE. É uma enzima que atua na regulação das reações de metilações celulares, capaz de catalizar a conversão do 5,10 metilenotetrahidrofolato para 5-metiltetrahidrofolato, de forma que o metil é doado para a remetilação da homocisteína para metionina. Esta reação é importante para a síntese de 5-adenosilmetionina (SAM), o mais importante doador de metil para o DNA, proteínas de construção e reações de metilação de lipídios. Uma vez reduzida a atividade da MTHFR, resulta um aumento da necessidade de consumo do ácido fólico para manter normais as remetilações de HCY para metionina. Na ausência de ácido fólico suficiente, a HCY intracelular acumula-se e a ressíntese de metionina é reduzida, comprometendo as principais reações de metilação (FROSST et al., 1995).

O estudo de Friedman (2001) demonstrou que as características das amostras de pacientes com AF estudadas, com predominância de mulheres e com idade acima dos 20 anos, enquadram-se na faixa de maior risco de trombose venosa. Além disso, estudos de meta-análise têm confirmado a associação da hiper-homocisteinemia com eventos tromboembólicos, enfatizando que essa alteração é fator de risco trombogênico. Nos últimos anos tem sido focada grande atenção no papel da HCY como um desses fatores emergentes. Há, portanto, um grande interesse na identificação de novos fatores de risco que possam desempenhar um papel na patogênese da doença cerebrovascular (ALLURI et al., 2005). A adesão de células falciformes ao endotélio representa um importante fator no fenômeno de vaso-oclusão, que é um fator fisiopatológico determinante, causador da maioria dos sinais e sintomas dessa doença (FRENETTE; ATWEH, 2007).

Além de outros componentes, o gene MTHFR está incluído no rol das bases moleculares para trombofilia hereditária, já que mutações genéticas têm sido verificadas como causa de trombofilia em diferentes populações (AL-ABSI et al., 2006).

Por causa da importância dessas complicações vasculares na fisiopatologia da AF, um número de polimorfismos genéticos associados com trombofilia tem sido estudado como potenciais modificadores genéticos (SETTY et al. 2001; HEBBEL, 2001). As bases moleculares da trombofilia herdada incluem: mutações G1691A no gene Fator V de Leiden e G20210A no gene da protrombina, além do polimorfismo C677T no gene MTHFR (ADAMS et al. 2003).

A variante C677T é caracterizada por uma mutação recessiva autossômica pontual, na posição 677 no éxon 4 do gene MTHFR, o qual troca uma citosina por uma timina, resultando na substituição de uma alanina por uma valina no códon 222. Esse polimorfismo tem sido correlacionado com 50% da diminuição da atividade chave no metabolismo da HCY e consequente aumento em seus níveis plasmáticos, o que pode causar danos às células endoteliais (ULRICH, 2003).

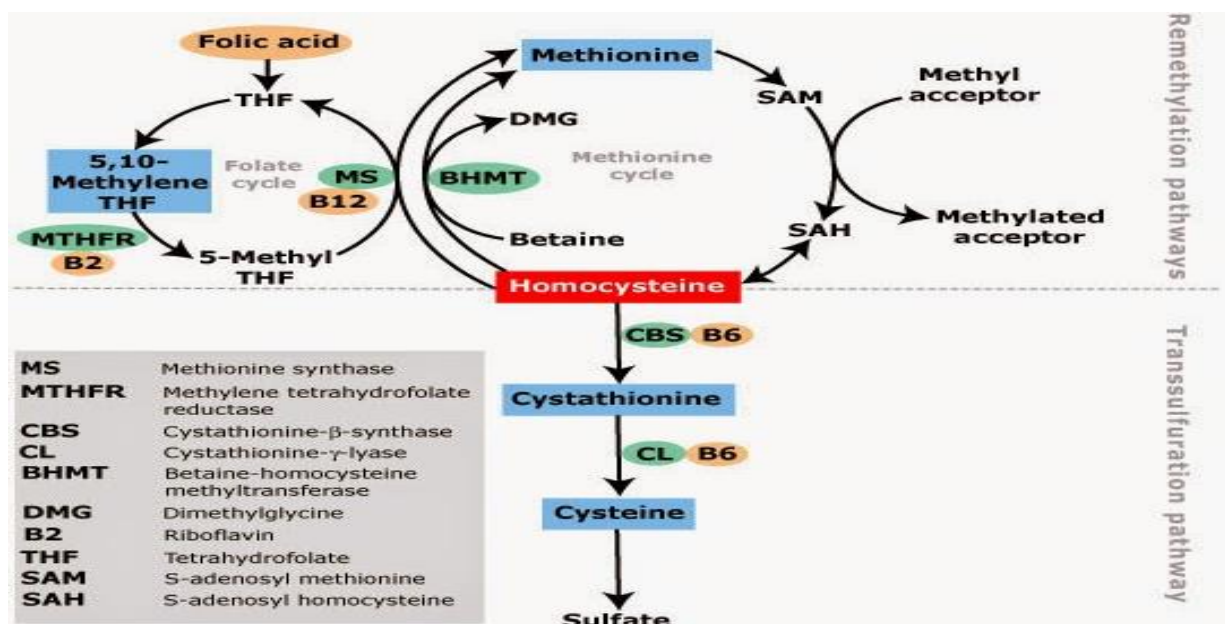
A hiper-homocisteinemia é considerada um fator de risco para diversos eventos trombóticos, incluindo danos cerebrais e periféricos, o que torna relevante avaliar o papel dos variantes genéticos relacionados à trombofilia em complicações vasculares da AF, por causa do aumento da ativação do sistema de coagulação nesses pacientes. A elevação moderada de HCY no plasma como fator causal de doenças vasculares tem motivado muitas discussões. Pacientes que apresentam um estado de homozigose para o polimorfismo MTHFR C677T apresentam níveis elevados de homocisteína. Em pacientes falciformes, altos níveis de homocisteína foram associados com o risco do desenvolvimento do AVE (AL-ABSI et al., 2006; MOREIRA-NETO et al. 2006). Existe uma associação entre a hiper-homocisteinemia e o AVE isquêmico de risco de duas a três vezes maior (CHRISTOPHER; NAGARAJA; SHANKAR, 2007), sendo o nível de HCY plasmática um fator de risco independente para AVE entre idosos e adultos jovens (MODI et al., 2005). Adicionalmente a isso, outros estudos também demonstram que a HCY tem sido considerada um dos fatores de risco para o AVE (SAWULA et al., 2009).

É provável que a co-herança de uma ou mais dessas mutações na AF possa inclinar em direção a um estado de hipercoagulabilidade e agir como um fator de risco no desenvolvimento do AVE (DICHGANS 2007). Sendo assim, é possível que haja uma associação entre polimorfismos do gene MTHFR e o risco de AVE. De acordo com Pezzini et al. (2007), se a HCY é um fator causal para a doença vascular, consequentemente indivíduos com genótipo 677TT, que reduz a atividade enzimática e está relacionado a níveis mais elevados de HCY, apresentem um risco

maior para AVE isquêmico, comparado com aqueles que apresentam o genótipo 677CC, ou seja, que possuem menores níveis de HCY plasmática comparado com o 677TT. No entanto, a relação entre os níveis plasmáticos da HCY e o prognóstico do AVE também permanece controversa. O reconhecimento de indivíduos falciformes com um determinante genético de alto risco para o desenvolvimento de complicações vasculares permitirá uma prevenção primária com o uso de uma terapia antitrombótica (ANDRADE et al. 1998).

A Figura 9 sintetiza o metabolismo da homocisteína, que é metabolizada por duas vias diferentes: a remetilação e a transulfuração. Na remetilação a homocisteína produz metionina, através da reação catalisada pela metionina sintase ou pela betaína-homocisteína metiltransferase, sendo a vitamina B12 um precursor da metilcobalamina, que é um co-fator da metionina sintase. A transulfuração da homocisteína a cisteína é catalisada por uma cistationina beta sintase, por um processo que requer a vitamina B6 como co-fator. A enzima 5,10 – metileno – tetrahydrofolato redutase é responsável pela redução da metileno-tetrahydrofolato (5,10-metileno-THF) a metil-tetrahydrofolato (5-metil-THF). O 5-metil-THF apresenta importante papel na metilação da homocisteína em metionina. A 5,10-metileno-THF e seus derivados são importantes na síntese de timina e purinas para a replicação do DNA (FROSST, 1995).

Figura 9 – Ilustração do metabolismo da homocisteína.



Fonte: Carmel R, Mallidi PV, Vinarskiy S, et al. Hyperhomocysteinemia and cobalamin deficiency in young Asian Indians in the United States. Am J Hematol 2002; 70:107.

3.4.2 Gene da óxido nítrico sintase endotelial

Outro mecanismo importante que pode estar relacionado com o AVE na AF é a biodisponibilidade de óxido nítrico (ON), gás sinalizador com tempo de meia vida de segundos, responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo normal. O ON tem papel importante na fisiopatologia da AF e no tratamento das crises vaso-oclusivas (RUBANYI; VANHOUTTE, 1986; GLADWIN; SCHECHTER, 2001; LOPEZ et al. 2003).

A eNOS promove a formação de ON, que é amplamente conhecido por suas propriedades antitrombóticas, anti-inflamatórias e anti-proliferativas. Desempenha papel crucial na manutenção da homeostase vascular encefálica por meio da inibição da contração e proliferação de músculo liso (GARG; HASSID, 1989), agregação plaquetária (WOLF et al., 1997), adesão de leucócitos (KUBES et al., 1991) e pela redução da permeabilidade ao endotélio (GARG; HASSID, 1989). A desregulação de eNOS pode acelerar a aterosclerose (SPOTO et al., 2005) e potencialmente levar ao AVE por redução da síntese do NO (ELBAZ et al., 2000).

O ON é sintetizado por três isoformas distintas de ON sintase (NOS), nomeadamente NOS neuronal (nNOS ou NOS1), NOS induzida (iNOS ou NOS2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3). Ambos nNOS e eNOS são constitutivamente expressos e suas ações biológicas dependem da sua localização subcelular (SESSA, 2004). O gene eNOS foi clonado em 1993, sendo localizado no cromossomo 7q35-36 (MARSDEN et al., 1993), sendo composto, conforme estudo de Hingorani (2001), por aproximadamente 21 kb de DNA genômico. O gene compreende 26 éxons que codificam uma proteína de 136 kDa e contém 1203 aminoácidos.

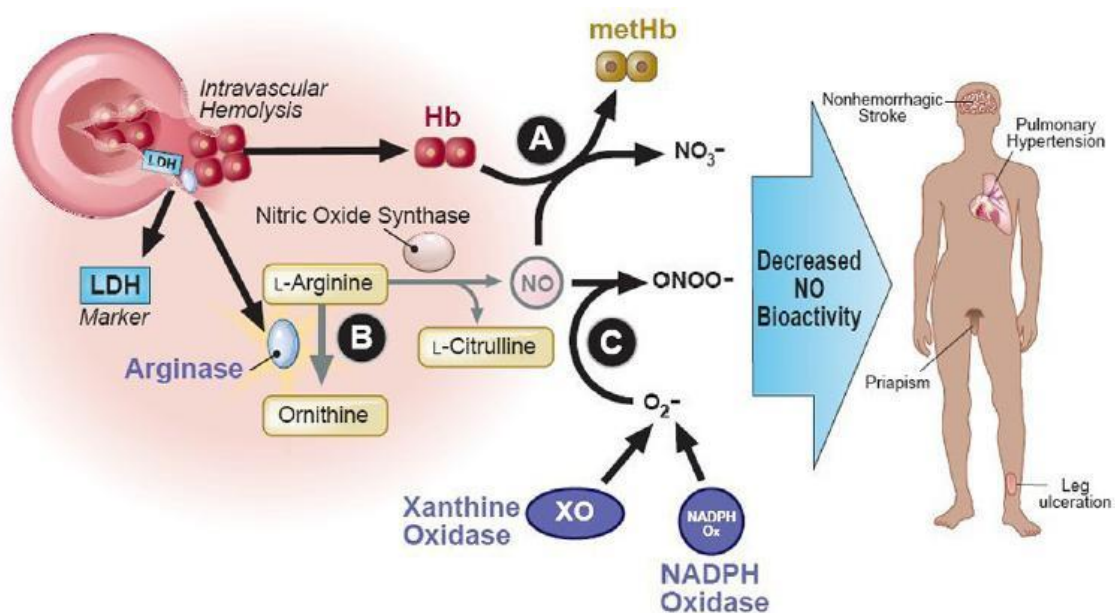
A eNOS é uma enzima expressa especialmente em células endoteliais amplamente responsável pela biodisponibilidade do NO ao nível endotelial. Alterações na produção de ON derivada do endotélio, em seres humanos, têm sido associadas com várias patologias e, em humanos, geneticamente determinada pela presença de diferentes polimorfismos no gene da eNOS. Seus níveis podem variar de acordo com o tipo de resposta aos estímulos mecânicos, citocinas e fatores de crescimento. Diversos polimorfismos genéticos envolvendo o gene eNOS são bem estabelecidos e suas variantes polimórficas continuam sendo extensivamente investigadas (ENDRES et al., 2004; FOSTERMANN; SESSA, 2012, QIAN; FULTON, 2013; WANG; WANG, 2000).

O ON, ao se ligar com a guanilato ciclase, enzima que converte GTP para cGMP, promove o relaxamento do músculo liso vascular, causando uma vasodilatação. Em pacientes portadores de AF, hemoglobina livre proveniente da destruição de hemácias falcizadas consome o ON, produzindo metahemoglobina e nitrato bio-inativo (NOLAN et al., 2006). Um estado de disponibilidade reduzido de ON na AF prejudica as funções vasculares do ON, como inibição da ativação e agregação plaquetária, além da repressão transcricional de moléculas de adesão celular, como VCAM-1 e ICAM-1 (KATO et al., 2007). A deficiência de ON nos pacientes falciformes pode ser agravada pela destruição da L-arginina, principal substrato da síntese de ON pela eNOS, através da liberação de arginases provenientes dos eritrócitos hemolisados (MORRIS et al., 2005). Espécies reativas de oxigênio, gerados em elevadas taxas em portadores de AF, também consomem ON, contribuindo para diminuição da disponibilidade em pacientes falciformes (ASLAN & FREEMAN, 2004; WOOD et al., 2005).

A deficiência de NO tem sido considerada um fator crítico para causar disfunção endotelial e vasculopatia em pacientes com DF (WOOD et al., 2008). A biodisponibilidade de ON prejudicada produz complicações, como: priapismo, úlcera de perna, AVE, insuficiência renal, distúrbios da motilidade esofágica e dor em pacientes com DF (KATO et al., 2005). O papel da depleção de ON pela hemoglobina livre na patogênese da complicação em pacientes com DF ainda parece controverso (BUNN et al., 2010). A diversidade da gravidade dos sintomas da DF continua desafiando pesquisadores a compreenderem melhor os possíveis fatores genéticos que modulam a gravidade da DF. Os polimorfismos do gene eNOS (eNOS 4a/b, eNOS 894G> T e eNOS 786T> C) desempenham um papel central no gene eNOS e, conseqüentemente nos níveis séricos de ON nesses pacientes (NISHANK et al., 2013). Relação entre polimorfismos do gene da ENOS e vasculopatia foi encontrada em várias doenças (EKMEKÇI et al., 2013), evidenciando, ainda, a possível associação dos polimorfismos do gene da eNOS e da gravidade das manifestações da DF em pacientes egípcios com DF, uma vez que os polimorfismos do gene eNOS podem ser considerados modificadores genéticos nessa patogenia.

Com a depleção dos níveis de ON, perde-se o equilíbrio entre a vasoconstrição e vasodilatação, ocorrendo um direcionamento para a vasoconstrição, ativação endotelial e proliferação. Na AF, a diminuição dos níveis de ON tem sido associada com hipertensão pulmonar, priapismo, úlceras de membros inferiores e possivelmente, AVE isquêmico (KATO et al. 2007) (Figura 10).

Figura 10 – Esquema da redução da disponibilidade do óxido nítrico devido à hemólise intravascular.



Fonte: KATO et al. (2007). Hemoglobina plasmática livre consome o ON, produzindo metahemoglobina e nitrato bio-inativo (A). Arginase plasmática consome L-arginase, diminuindo sua disponibilidade para produção de ON (B). Espécies reativas de oxigênio consomem o ON, gerando radicais de oxigênio (C). Na AF, a diminuição da disponibilidade de ON está associada com o desenvolvimento de hipertensão pulmonar, priapismo, úlcera de perna e AVE isquêmico.

Terapias direcionadas para o restabelecimento da homeostase do ON têm se mostrado promissoras em pacientes com AF. Crianças falciformes em crises álgicas agudas, após a inalação de ON, apresentaram uma tendência a menores escores de dor, além da diminuição da necessidade de analgésicos e, conseqüentemente, menor permanência no hospital (WEINER et al. 2003; KATO et al. 2007).

O polimorfismo T786C da eNOS resulta na redução significativa da atividade da eNOS. Estudos têm sugerido que este polimorfismo pode estar associado à predisposição a hipertensão arterial, doenças coronarianas, aneurisma, diabetes, além do desenvolvimento de estenose da artéria carótida interna. Entre os polimorfismos de eNOS conhecidos, os mais examinados e as variáveis mais funcionalmente comuns relacionadas são: o Glu298Asp (894G/T, SNP id rs1799983), o 786T/C (SNP id rs2070744), e o íntron 4 VNTR, que é um número variável de repetição em série (RIPPE et al., 2012). Na AF, a associação do polimorfismo com as manifestações clínicas da doença não estão bem esclarecidos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Considerações éticas

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) via Plataforma Brasil, sob o número de protocolo 49687415.5.0000.0039, em consonância com o estabelecido nas Resoluções 466/12 e 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS)/Ministério da Saúde (MS).

4.2 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo observacional descritivo, de caráter transversal, realizado no Hemocentro de Alagoas (HEMOAL); Departamento de Aterosclerose Humana e Experimental da Universidade Federal de Alagoas (UFAL); e Laboratório de DNA Forense da UFAL.

4.3 Amostra

A amostra foi constituída por pacientes diagnosticados com DF, em acompanhamento clínico no HEMOAL, de acordo com os Protocolos e Diretrizes Terapêuticas para pessoas com DF pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). Os prontuários dos pacientes foram analisados para obtenção de dados relevantes à pesquisa.

A seleção das crianças e adolescentes foi realizada de forma aleatória casual simples através do aplicativo "Igerar", disponível na Apple®Store, no qual foram inseridos os dados necessários, tais como número inicial e o número final do sorteio e o número desejado de participantes, até se atingir o número desejado obtido pelo cálculo amostral, através da seguinte fórmula: $n = (Z_{\alpha/2} / e)^2 \times P(1-P)$, onde " $Z_{\alpha/2}$ " é o valor do escore padronizado (1,96); com nível de significância de 5%; "e" é a estimativa de erro de 5%; e "P" a frequência do evento na população. O cálculo determinou uma

amostra de 151 indivíduos. O grupo controle foi constituído por 64 indivíduos saudáveis, sem a doença.

4.3.1 Critérios de inclusão

Foram elegíveis à pesquisa pacientes, entre 2 a 16 anos de idade, diagnosticados com DF, atendidos no HEMOAL (Maceió-Alagoas, Brasil), que apresentassem em seu prontuário, ao menos, dois resultados de DTC e exames laboratoriais de bioquímica, contagem de reticulócitos, hemograma e exame confirmatório do diagnóstico, no mesmo período de realização do DTC, no período compreendido entre novembro de 2010 a novembro de 2016, além de pessoas saudáveis, sem a doença, que constituíram o grupo controle.

4.3.2 Critérios de exclusão

Para o grupo com a doença, foram excluídos os pacientes que, porventura, faziam uso regular de bebidas alcoólicas e cigarro; gestantes; pacientes febris, com hipóxia e acentuados graus de anemia; pacientes que estivessem em crises álgicas no momento da coleta; pacientes que houvesse sido transfundido nas últimas três semanas; aqueles que não compareceram aos exames agendados; os que retiraram o seu consentimento durante a realização da pesquisa; além daqueles que apresentassem amostra inadequada de DNA após a extração.

Considerando-se o grupo controle, foram excluídos aqueles indivíduos que apresentassem exames bioquímicos ou hematológicos alterados, bem como aqueles que apresentassem diagnóstico de algum tipo de hemoglobinopatia ou alteração hematológica.

4.3.3 Recrutamento dos sujeitos e aquisição do consentimento livre e esclarecido

Os participantes foram recrutados através das reuniões mensais que ocorrem no HEMOAL, promovidas pela Associação de Pessoas com Hemoglobinopatias do

Estado de Alagoas (APHAL). Os responsáveis e as crianças foram comunicados sobre o estudo durante a reunião, através da leitura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e de Assentimento, em linguagem acessível a todos os presentes. A abordagem de recrutamento preservou os cuidados com os princípios éticos e as boas práticas clínicas que regem a pesquisa clínica, em âmbitos nacional e mundial.

4.3.4 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada levando-se em consideração os cuidados e o correto acondicionamento do material coletado, respeitando-se as normas de biossegurança vigentes, no período agendado pelos médicos do HEMOAL, durante suas consultas periódicas, o que justificou a utilização desses grupos vulneráveis, visto que a coleta já foi realizada normalmente nesse período, como protocolo de rotina nesses pacientes, não representando algo novo para os mesmos, nem os expondo a riscos adicionais. Os resultados foram anexados aos prontuários de cada um dos envolvidos, seguindo-se o fluxo periódico normal.

Foram coletadas amostras de sangue periférico, preservadas imediatamente em tubos contendo EDTA para a realização dos testes hematológicos (grupo controle) e da extração do DNA (grupos controle e com DF). Para a realização dos testes bioquímicos (grupo controle), utilizaram-se tubos sem anticoagulantes.

4.4 Variáveis

4.4.1 Variável primária

A variável primária desse estudo foi a VFSE. Nesse estudo, conceituou-se como VFSE a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico baseada na divisão do valor caudal volumétrico total do leito vascular pela área da secção transversal desse leito, refletindo a velocidade das hemácias em função do tempo, medida em cm/s, nas grande artérias do círculo arterial do encéfalo, baseada nos critérios do estudo STOP (LOBO et al., 2011).

4.4.2 Variáveis secundárias

As variáveis secundárias estudadas foram: idade, parâmetros do hemograma, parâmetros reticulocitários, parâmetros bioquímicos e a genotipagem de polimorfismos.

Conceituou-se como idade, o número de anos que uma pessoa conta desde o seu nascimento até à época de que se fala.

Foi considerado como ocorrência de AVE isquêmico, a interrupção brusca do fluxo de sangue em um vaso encefálico, ocasionando a passagem de oxigênio para as células.

Definiram-se como parâmetros do hemograma: eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas. Para o grupo que não tem a doença, definido como grupo controle, os hemogramas foram realizados em equipamento hematológico automatizado, com parâmetros iguais aos que constam no prontuário dos pacientes com DF, da marca Sysmex, modelo XE-2100.

Os parâmetros reticulocitários foram estabelecidos como: percentual não-corrigido de reticulócitos; valor absoluto de reticulócitos, em mm^3 ; percentual corrigido de reticulócitos; e índice reticulocítico (IR). Os valores de referência para os reticulócitos encontram-se na Tabela 1, levando-se em consideração o perfil de idade atribuído à pesquisa.

Tabela 1 – Valores de referência para a contagem de reticulócitos.

Contagem de reticulócitos	Valores de referência
Percentual corrigido	0,5 a 1,5%
Valor absoluto por mm^3	25.000 a 85.000/ mm^3
IR (adultos não-anêmicos)	0,5 a 1,8%
IR (adultos anêmicos por anemia hemolítica)	1,8 a 2,9%

Fonte: Adaptado de Oliveira (2007). Legendas: IR – Índice Reticulocítico; mm^3 – Milímetro Cúbico.

Foram estabelecidos como parâmetros bioquímicos: desidrogenase láctica (LDH), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubinas total e frações (BTF), fosfatase alcalina (FAL), gama glutamil transferase (GGT), ureia (U), creatinina (CR), proteínas total e frações (PTF) e ferritina.

Determinaram-se os seguintes polimorfismos a serem genotipados: metileno tetraidrofolato redutase (MTHFR) C677T e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) T786C.

4.5 Obtenção dos dados sobre idade e ocorrência de AVE isquêmico

Os dados acerca da idade e ocorrência de AVE isquêmico nos pacientes com DF foram obtidos através da avaliação do prontuário.

4.6 Parâmetros da velocidade do fluxo sanguíneo encefálico

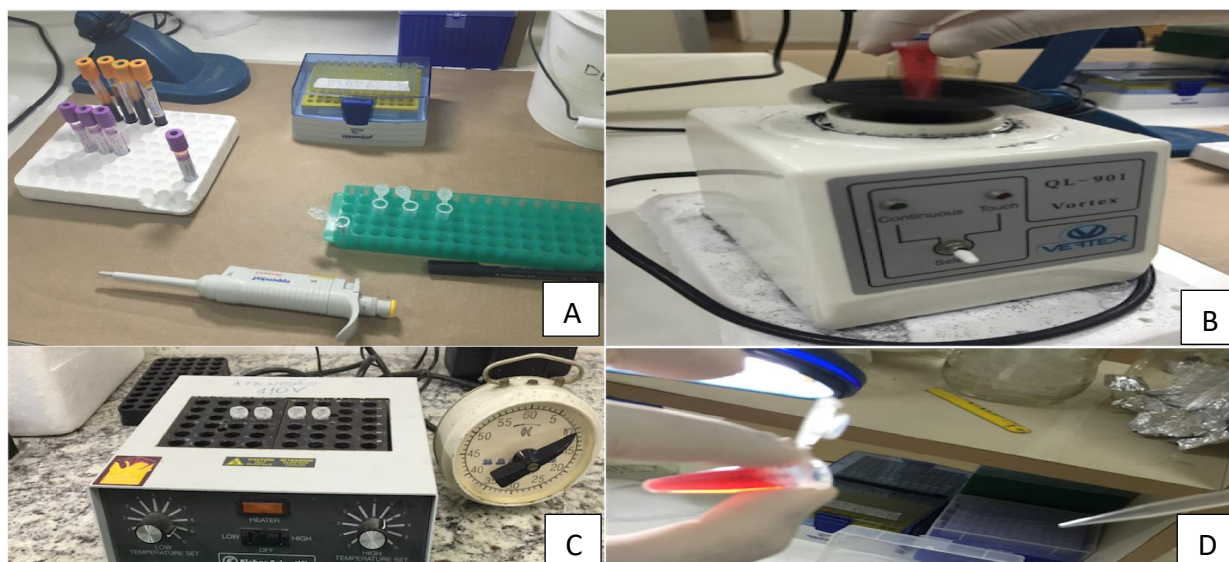
Os parâmetros de VFSE foram obtidos através da análise dos prontuários dos pacientes. Foram definidos alguns parâmetros para os resultados do DTC. Considerou-se ausência de janela quando a VFSE foi igual a 0 cm/s; quando a VFSE era inferior a 70 cm/s, definiu-se como baixa; valores normais foram considerados entre 70 e 169 cm/s; valores entre 170 e 184 cm/s foram considerados como resultados condicionais baixos; valores entre 185 e 199 cm/s foram considerados resultados condicionais altos; quando os valores estavam compreendidos entre 200 e 219 cm/s adotou-se como resultado anormal; resultados superiores a 220 cm/s foram considerados anormais, com risco iminente de AVE (BRASIL, 2013).

4.7 Análise molecular

4.7.1 Extração do DNA

A extração do DNA para o rastreamento de polimorfismos seguiu o protocolo adaptado de Walsh e colaboradores (1991), utilizando-se BT Chelex[®] 100 Resin em cada amostra. A Figura 11 mostra algumas das etapas da extração do DNA.

Figura 11 – Procedimentos utilizados na extração de DNA.



Fonte: AUTOR, 2017. A) Amostras utilizadas para a extração do DNA; B) Agitador do tipo vortex; C) Termobloco. D) Eppendorf contendo sobrenadante e DNA.

4.7.2 Detecção do polimorfismo C677T no gene da MTHFR

O polimorfismo MTHFR C677T foi identificado através da técnica de PCR, seguida por digestão do produto de PCR com endonuclease específica, como descrita por Frosst et al. (1995). A Tabela 2 mostra a sequência dos primers para a pesquisa do polimorfismo.

Tabela 2 – Sequências dos primers para pesquisa do polimorfismo da MTHFR C677T.

Primers	Direção	Sequência do Primer (5'- 3')
MTHFR	Sense	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGG
MTHFR	Anti-sense	AGGACGGTGCGGTGAGAGTG

Fonte: AUTOR, 2017. Legenda: MTHFR – Metilenotetrahidrofolato Redutase.

Foi utilizada a seguinte reação de PCR para amplificação do MTHFR: 0,8 ml de DNA (250ng); 3,0 ml de tampão de PCR 10x; 1,2 ml de MgCl₂ (50mM); 1,0ml de dNTP 10mM; 0,5 ml de cada primer 10mM; 0,3ml de Platinum® Taq DNA polimerase 5U/ml, para um volume final de água 30,0 ml. Condições de ciclagem: desnaturação inicial 94°C - 5'; 35 ciclos: 94°C – 1'; 60°C - 1' e 72°C - 1'; extensão final 72°C - 7', em um

termociclador Techne® TC-412, modelo FTC41H2D, perfazendo-se um total de 35 ciclos.

O produto da PCR foi digerido a 37°C durante 24 horas. O produto foi separado por eletroforese e analisado em gel de agarose a 3,0%, marcado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta.

O polimorfismo do MTHFR, ao utilizar-se a enzima Hinf I, origina fragmentos de 175 e 23 pares de bases (pb) quando a timina está presente na posição 677 (alelo mutado) e de 198 pb quando está presente a citosina (alelo normal), resultando em fragmentos de 175 e 23 pb para os portadores homozigotos e fragmentos de 198, 175 e 23 pb entre os portadores heterozigotos para o polimorfismo. A tabela 3 detalha o tamanho dos produtos amplificados.

Tabela 3 – Tamanho dos produtos amplificados após a clivagem com as endonucleases de restrição para o MTHFR C677T.

Primers	Enzima	Tamanho do fragmento	Fragmentos após clivagem
MTHFR Sense/Anti-sense	Hinf I	198 pb	175 pb + 23 pb

Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: MTHFR – Metilenotetrahidrofolato Redutase; pb – Pares de Base; HINF I – Enzima de Restrição.

4.7.3 Detecção do polimorfismo T786C no gene da eNOS

A pesquisa do polimorfismo T786C no gene da eNOS foi investigada através de PCR seguidos por digestão do produto de amplificação com a enzima *Msp* I, como descrito por Data et al. (2003).

Foi utilizada a seguinte reação de PCR para amplificação da região polimórfica T-786C do gene da eNOS: 1,0 mL de DNA (200ng); 3,0 ml de tampão de PCR 10x; 1,2 ml de MgCl₂ (50mM); 0,5 mL de dNTP 10mM; 0,5 ml de cada primer (sense e anti-sense) 10mM; 0,2ml de Platinum® Taq DNA polimerase 5U/μL, para um volume final de água 30,0 mL. Condições de ciclagem: desnaturação inicial 96°C - 2'; 35 ciclos: 96°C – 30"; 56°C – 30" e 72°C - 1'; extensão final 72°C - 5', em um termociclador Techne® TC-412, modelo FTC41H2D, perfazendo-se um total de 35 ciclos.

O tamanho dos produtos amplificados para a eNOS T786C, após a clivagem, estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Tamanho dos produtos amplificados após a clivagem com as endonucleases de restrição para o estudo do polimorfismo da eNOS T786C.

Primers	Enzima	Tamanho do fragmento	Fragmentos após clivagem
eNOS Sense/Anti-sense	MspI	349 pb	352 pb + 42 pb

Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial; pb – Pares de Base. MspI – Enzima de Restrição.

Para a análise das endonucleases de restrição, foram utilizados: 8,0 µl do produto amplificado, 1,5 µl do tampão da enzima 10x e 2U da enzima correspondente a cada polimorfismo. Água deionizada e estéril foi adicionada para completar o volume de 15,0 µl e a mistura foi conduzida ao banho-maria a 37°C *overnight* (16 horas). O produto foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1000 a 2,5% (*Invitrogen, Carlsbad CA, USA*), corado com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados.

A Tabela 5 mostra a sequência dos primers para a pesquisa do polimorfismo da eNOS T786C.

Tabela 5 - Sequências dos primers para pesquisa do polimorfismo da eNOS T786C.

Primers	Direção	Sequência do Primer (5' - 3')
eNOS	Sense	CTTATCCTCCACTGCTTTTCAGAG
eNOS	Anti-sense	CGCAGGTCAGCAGAGAGACTAG

Fonte: AUTOR, 2017. Legenda: eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial.

4.8 Método estatístico

Para a análise de dados utilizou-se o software Graphpad Prism 6.0 e o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20, com base numa amostra de 151 pacientes, sendo eles crianças de 2 a 16 anos de idade e com a doença. Nesta etapa as variáveis qualitativas foram estudadas através de suas frequências absolutas e

percentuais e as variáveis quantitativas estudadas por meio de suas medidas de dispersão e posição. Através da estatística inferencial foi possível identificar uma estimativa da média da VFSE nos pacientes e seu intervalo de 95% de confiança.

Para verificar a relação entre VFSE e o sexo, o diagrama de médias e as medidas descritivas foram usadas para se obter uma tendência inicial de possíveis diferenças e em seguida procedeu-se com o teste de hipóteses para confirmar se tal diferença foi significativa. Para a escolha do teste de comparação mais adequado, testou-se antes a normalidade dos valores de VFSE nos dois grupos, por meio do teste de *Shapiro-Wilk*, que testa a hipótese nula de que os dados são normais ($p > 0,05$), contra a hipótese alternativa de que há ausência de normalidade dos dados ($< 0,05$). Ocorrendo normalidade (dados paramétricos) o teste mais apropriado para a comparação da VFSE nos dois grupos é o *Teste T para Amostras Independentes*. Por outro lado, no caso de não normalidade (dados não paramétricos) deve-se usar o *Teste U de Mann-Whitney*. Ambos os testes avaliam a hipótese nula de que os dois grupos são semelhantes ($p > 0,05$) contra a hipótese alternativa de que os grupos diferem significativamente ($p < 0,05$) (SIEGEL; CASTELLAN, 2008).

A fim de se verificar a relação entre VFSE com a Idade, também foi aplicado o teste *Shapiro-Wilk*, para testar a normalidade dos valores de VFSE e de Idade. Nos casos de ocorrência de normalidade em ambas as variáveis, o Teste de Correlação Linear de Pearson foi usado para testar a intensidade (correlação muito fraca, fraca, moderada, forte e muito forte), direção (inversamente ou diretamente proporcionais) e a significância da correlação entre a VFSE e Idade.

Por outro lado, não havendo normalidade, usou-se o *Coefficiente Rho de Correlação de Spearman* para o estudo da correlação entre estas duas variáveis. O valor deste coeficiente rho evidencia a intensidade desta correlação, podendo ser muito fraca ($\rho < 0,15$), fraca ($0,15 < \rho < 0,30$), moderada ($0,3 < \rho < 0,6$), forte ($0,6 < \rho < 0,8$) e muito forte ($0,8 < \rho < 1,0$). O sinal deste coeficiente (+ ou -) indica a direção que ocorre esta correlação, ou seja, se é positiva (quando uma variável aumenta a outra também aumenta) ou negativa/inversa (quando uma variável aumenta a outra diminui).

Um teste de significância desta correlação é aplicado para testar a hipótese nula de que a correlação não é significativa ($p > 0,05$) contra a hipótese alternativa de que a VFSE e idade possuem correlação significativa ($p < 0,05$). Além disto, o gráfico de dispersão foi usado para ilustrar graficamente uma possível relação entre ambas as variáveis. Comparou-se os resultados desta correlação nos pacientes dos sexos

masculino e feminino, com o objetivo de verificar se o sexo interferia nesta correlação.

Utilizou-se a *Regressão Linear Múltipla* para analisar a variável dependente (VFSE) e os demais parâmetros bioquímicos e hematológicos, os quais mostravam ausência ou presença de relação significativa entre as variáveis.

Para todos os testes estatísticos utilizou-se o nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Frequência de pacientes submetidos ao Doppler transcraniano, de acordo com os critérios de classificação a partir do sexo, idade e tipo de hemoglobinopatia

A Tabela 6 apresenta a distribuição dos pacientes falciformes de acordo com o sexo e a classificação da VFSE. De um total de 151 pacientes, 50,3% eram do sexo feminino, enquanto que 49,7% eram do sexo masculino. Destes, 72,2% apresentaram VFSE normais, enquanto que 10,6% apresentavam resultados condicionais e 17,2% com resultados anormais. Somando-se os resultados condicionais aos resultados anormais, tem-se 27,8% de resultados alterados, sendo esse o percentual de pacientes com risco aumentado de desenvolvimento de AVE, em virtude de apresentarem VFSE superior a 170 cm/s.

Tabela 6 – Distribuição dos pacientes de acordo com o sexo e a classificação da velocidade do fluxo sanguíneo encefálico (n=151).

Sexo		N	%
Feminino		76	50,3%
Masculino		75	49,7%
Total		151	100%
Classificação da VFSE	Valores de referência		
Normal	70 a 169 cm/s	109	72,2%
Condicional	170 a 199 cm/s	16	10,6%
Anormal	>200 cm/s	26	17,2%
Total		151	100%

Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: VFSE – Velocidade do fluxo sanguíneo encefálico; N – Número de Pacientes.

Na Tabela 7, observa-se que a média de idade dos pacientes falciformes entre 2 e 16 anos de idade foi de $6,84 \pm 3,56$ anos. Os resultados mostram que, com 95% de confiança, a verdadeira idade média dos pacientes estudados é um valor compreendido entre 6,26 e 7,42 anos de idade. O coeficiente de variação de 52,1% mostra uma dispersão moderada nas idades desses pacientes, com uma idade mínima registrada de 2 anos e máxima de 14 anos. A velocidade média do fluxo sanguíneo

encefálico foi de $141,17 \pm 43,95$ cm/s, com uma dispersão fraca a moderada, fato evidenciado pelo coeficiente de variação de 31,1%.

Tabela 7 – Medidas descritivas da idade e velocidade do fluxo sanguíneo encefálico dos pacientes que realizaram o Doppler transcraniano (n=151).

	Média	SD	CV (%)	IC 95%	Mediana	Mínimo	Máximo
Idade	6,84	3,564	52,1%	(6,26; 7,42)	6	2	14
VFSE	141,17	43,958	31,1%	(133,56; 147,5)	127	24	268

Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: DTC – Doppler Transcraniano; SD – Desvio Padrão; CV – Coeficiente de Variação; IC: - Intervalo de Confiança; VFSE – Velocidade do fluxo sanguíneo encefálico.

Dentre os 151 pacientes falciformes, 42 deles apresentaram resultados do DTC alterados. A média de idade entre esses pacientes foi de $9,93 \pm 3,44$ anos, com uma mediana de 10. A tabela 8 mostra a comparação das idades dos pacientes com resultados alterados da VFSE, por faixa etária, onde se pode observar que a maioria dos pacientes que apresentou resultados alterados possuíam idades entre 10 e 16 anos, com uma média de $12,73 \pm 1,98$ anos.

Tabela 8 – Comparação da idade dos pacientes com resultados de Doppler transcraniano alterados, por faixa etária (n=42).

Faixa Etária	Média	Desvio-padrão	Mediana	N	%
2 a 5 anos	4,67	0,58	5,00	3	0,07
6 a 9 anos	7,24	1,25	7,00	17	0,40
10 a 16 anos	12,73	1,98	13,00	22	0,53
Total	9,93	3,45	10,00	42	100

Fonte: AUTOR, 2017. Legenda: N – Número de Pacientes.

A Tabela 9 mostra as características quanto ao tipo de hemoglobinopatia. Observa-se que 92,72% dos pacientes (n=151) apresentam AF, seguidos de 6,62% de hemoglobinopatia SC e 0,66% de S β -tal. Considerando-se os pacientes com resultados anormais, apenas 2,39% dos pacientes apresentam hemoglobinopatia SC e 2,39% apresentam S β -tal, sendo assim a hemoglobinopatia SS é representada com 95,22% dos pacientes com resultados anormais.

Tabela 9 – Características dos pacientes envolvidos no estudo de acordo com o sexo e o tipo de hemoglobinopatia.

	SS	SC	Sβ-tal
Considerando-se os 151 pacientes	140 (92,72%)	10 (6,62%)	1 (0,66 %)
Considerando-se os 42 pacientes com resultados de DTC anormais	40 (95,22%)	1 (2,39%)	1 (2,39%)

Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: SS – Anemia Falciforme (homozigoto); SC – Hemoglobinopatia SC; Sβ-tal – S Beta Talassemia; N – Número de Pacientes; DTC: Doppler Transcraniano.

5.2 Estratificação do risco de desenvolvimento de acidente vascular encefálico através da velocidade do fluxo sanguíneo encefálico em pacientes falciformes com resultados alterados

A estratificação do risco detalha, pormenorizadamente, os pacientes que apresentaram resultados de DTC com ausência de janela; os que apresentaram dificuldade técnica por falta de cooperação; baixa VFSE; resultados normais; condicionais baixo e alto; anormal; e anormal com risco iminente de AVE, de acordo com os critérios de classificação estabelecidos pelo protocolo de uso do DTC, a partir da VFSE, em cm/s, como procedimento ambulatorial na prevenção do AVE em pacientes falciformes.

Após a separação desses pacientes de acordo com o resultado do DTC, foram estratificados apenas os pacientes que apresentaram risco aumentado de AVE, cujos resultados incluíam os pacientes classificados como risco intermediário baixo, com VFSE entre 170 a 184 cm/s; risco intermediário alto, com VFSE entre 185 e 199 cm/s; e risco alto, aqueles cujas velocidades eram maiores ou iguais a 200 cm/s. Nesse último grupo, houve uma dicotomização entre os pacientes classificados como anormais, com VFSE entre 200 e 219 cm/s e risco aumentado; e anormais, com risco iminente de AVE, com VFSE maior ou igual a 220 cm/s (Tabela 10). Observa-se que dos 15,89% dos pacientes apresentaram risco iminente de AVE. A média da VFSE nos pacientes com risco aumentado foi de $243,77 \pm 17,39$ cm/s.

Tabela 10 – Frequência de pacientes falciformes submetidos ao Doppler transcraniano, a partir da velocidade do fluxo sanguíneo encefálico, em cm/s.

Resultado do DTC	Média da VFSE (cm/s)	Número de pacientes (n)	%
Baixa VFSE (variável com valor reduzido)	<70	2	1,32
Normal	70-169	109	72,19
Condiciona l baixo (risco intermediário baixo)	170-184	16	10,60
Condiciona l alto (risco intermediário alto)	185-199	0	0
Anormal (risco aumentado)	200-219	11	7,28
Anormal (risco iminente de AVE)	≥ 220	13	8,61
TOTAL	-----	151	100%

Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: DTC: Doppler Transcraniano; VFSE – Velocidade de Fluxo Sanguíneo Encefálico; N - Número de Pacientes; cm/s – Centímetro por Segundo; AVE – Acidente Vascular Encefálico.

5.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos analisados nos pacientes com risco aumentado para o acidente vascular encefálico

Os principais parâmetros do hemograma analisados incluem uma avaliação das séries vermelha, branca e plaquetária.

Comparando-se o grupo controle, sem a doença, e os pacientes com resultados alterados, observou-se que três pacientes (7%) apresentaram valores normais para a contagem de hemácias, enquanto que 39 (99,93%), a grande maioria, apresentou valores abaixo da referência. Todos os pacientes apresentaram baixos níveis de hemoglobina, caracterizando o estado de anemia do ponto de vista laboratorial, o que foi ratificado com os dados clínicos presentes no prontuário dos pacientes. Quarenta e um pacientes (99,98%) apresentaram valores de hematócrito abaixo da referência e apenas 1 (2%) com valores dentro do padrão normal. Esses parâmetros são

diretamente proporcionais, sendo característica a diminuição dos três parâmetros, na maioria dos pacientes falciformes.

Os índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM foram analisados, evidenciando-se um paciente (2%) com macrocitose, enquanto que 41 (99,98%) apresentaram valores normais, para os quais, a classificação do ponto de vista morfológico é dada como normocítica. Apenas um paciente (2%) apresentou hipocromia, enquanto que 41 (99,98%) apresentaram hemácias normocrômicas.

No intuito de se observar a amplitude de distribuição das hemácias, como principal parâmetro para avaliar anisocitose, analisaram-se os resultados do RDW-CV, cuja média foi de 18,7%, com valores entre 12,9% e 42,3%. Diante de um total de 42 pacientes, 2 (5%) não apresentaram anisocitose, confrontando-se com 40 (99,95%) que possuíram aumento da amplitude de distribuição das hemácias, portanto, anisocitose. A morfologia eritrocitária mostrou a presença de uma dupla população, a qual denominamos dimorfismo eritrocitário, em 40 pacientes (99,95%), às custas de microcitose e macrocitose, com policromasia e poiquilocitose com a presença de drepanócitos em todas lâminas dos pacientes falciformes, independentemente do tipo de hemoglobinopatia presente. Foi realizada a contagem de eritroblastos em cada lâmina, à morfologia eritrocitária, cuja média para a contagem manual foi de 8,33 eritroblastos, com valores mínimo e máximo compreendidos entre 0 e 147.

No intuito de se avaliar a cinética de produção medular, foram utilizados parâmetros relacionados aos reticulócitos, os quais incluíram o percentual não corrigido de reticulócitos; o valor absoluto de reticulócitos por mm^3 (μL), que apresenta não apenas a proporção entre os eritrócitos maduros e os reticulócitos, mas o real valor de reticulócitos por volume de sangue; o percentual corrigido (primeira correção) para os pacientes que apresentaram reticulocitose, que leva em consideração o grau de anemia, que pode ser feita pelo hematócrito ou pela hemoglobina, sendo esta última escolhida nesse estudo devido ao fato de ser o parâmetro mais fiel relacionado à anemia; e a segunda correção, que corresponde ao índice reticulocítico (IR), que estabelece a correção para a saída prematura dos reticulócitos da medula para o sangue, que ocorre em virtude dos altos níveis de eritropoetina circulante.

A Tabela 11 compara as variáveis hematológicas entre os pacientes falciformes e o grupo controle. Os seguintes parâmetros hematológicos apresentaram significância quando comparados ao controle: hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular médio, concentração de hemoglobina

corpúscular média, leucócitos, segmentados, linfócitos, monócitos, basófilos, reticulócitos e eritroblastos.

Dezenove pacientes (45%) apresentaram leucocitose. Não houve nenhum caso de leucopenia dentre os pacientes analisados. Um dos pacientes, com leucócitos normais, apresentou um desvio à esquerda acentuado, registrando-se 38% de neutrófilos bastonetes, com um valor absoluto de 2.876/mm³. Ao analisar-se a morfologia leucocitária, percebeu-se que todos os neutrófilos bastonetes eram do tipo bilobulado, característicos da Anomalia de Pelger-Huet.

Nove pacientes (21%), apresentaram valores acima da referência, caracterizando trombocitose, enquanto que 1 (2%) apresentou trombocitopenia. A média do VPM foi de 7,01fL, com mínimo de 4,68fL e máximo de 16,8fL. Ao analisar-se a morfologia plaquetária de 2 (5%) pacientes, observaram-se macroplaquetas no sangue periférico, nos mesmos pacientes em que o VPM estava com valores aumentados.

Tabela 11 - Medidas descritivas e teste de Mann-Whitney para a comparação das variáveis hematológicas entre os grupos controle e pacientes falciformes.

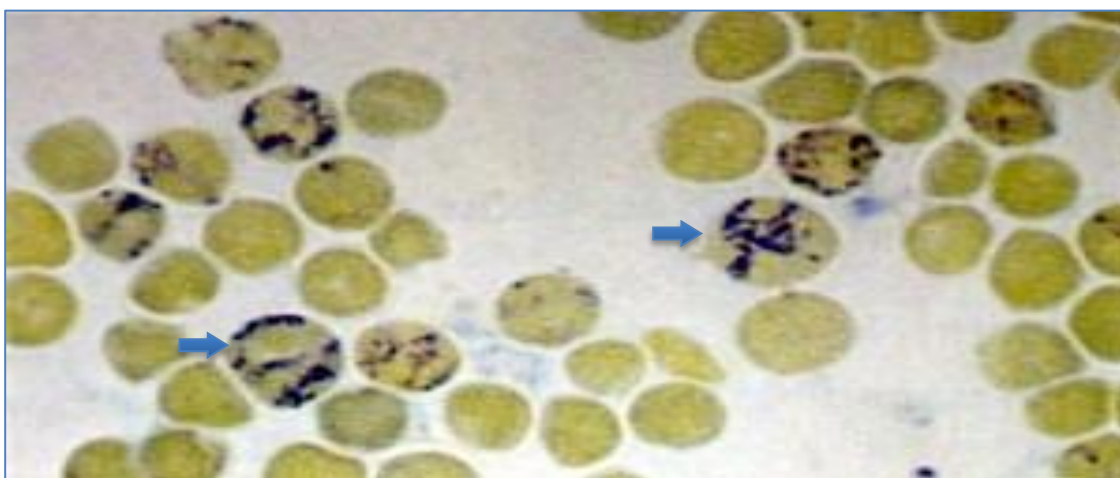
	Grupos						p
	Controle			Pacientes Falciformes			
	Média	SD	Mediana	Média	SD	Mediana	
Idade na coleta	10,27	4,47	10,00	9,93	3,45	10,00	0,539
RBC 10*6/uL	4,77	0,42	4,72	2,73	0,67	2,53	0,001*
HGB	13,04	1,33	13,00	7,91	1,47	7,87	0,001*
HCT	38,54	4,02	38,00	22,85	4,44	21,75	0,001*
VCM	81,42	5,73	81,60	84,46	6,91	84,55	0,014
HCM	27,58	1,97	27,80	29,36	4,38	29,80	0,002
CHCM	33,90	1,47	33,84	34,26	3,97	34,05	0,824
PLT	288,84	75,21	277,00	317,36	122,31	337,50	0,184
WBC	7904,18	1992,65	7400,00	12400,38	5524,42	12000,00	0,001*
SEG	3759,01	1355,70	3550,80	5966,19	3730,70	4981,50	0,001*
BAST	84,48	62,04	84,40	222,93	493,94	84,05	0,509*
LINF	3088,80	1070,80	2763,60	4682,84	3377,27	3710,30	0,035*
MON	558,31	169,06	564,00	886,89	633,85	773,90	0,004*
EOS	444,83	405,22	361,50	618,51	722,82	359,00	0,327
BASO	3,72	15,94	0,00	28,89	67,59	0,00	0,027*
ERITROBLASTOS	0,00	0,00	0,00	8,33	22,46	3,50	0,001*
RETIC %	0,57	0,39	0,50	11,18	5,99	11,00	0,001*
RETIC ABSOLUTO	20480	21460	14040	296629	170993	300096	0,001*
RET PRIMEIRA CORREÇÃO	0,51	0,38	0,45	6,02	3,08	5,45	0,001*

IR	0,28	0,21	0,25	2,97	1,64	2,57	0,001*
-----------	------	------	------	------	------	------	--------

Fonte: AUTOR, 2017. Teste U de Mann-Whitney. *significante. Legendas: SD – Desvio Padrão; RBC – Contagem de hemácias; HGB – Hemoglobina; HCT – Hematócrito; VCM – Volume Corpuscular Médio; HCM – Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW – Amplitude de Distribuição das Hemácias; PLT – Contagem de Plaquetas; WBC – Contagem de Leucócitos; SEG – Segmentados; BAST – Bastonetes; LINF – Linfócitos; MON – Monócitos; EOS – Eosinófilos; BASO – Basófilos; RETIC – Reticulócitos; IR – Índice Reticulocítico; p – Nível de Significância; uL – Microlitros.

A Figura 12 mostra um campo microscópico apresentando reticulocitose, característica de pacientes com hemólise, presentes em anemias classificadas como hiperregenerativas do ponto de vista cinético, como a anemia falciforme.

Figura 12 - Distensão sanguínea de sangue periférico de um paciente falciforme com reticulocitose.



Fonte: AUTOR, 2017. As setas mostram reticulócitos corados com azul brilhante de cresil e contra-corados com corante May-Grunwald Giemsa. Aumento de 1000X.

5.4 Parâmetros bioquímicos analisados nos pacientes com risco aumentado para o acidente vascular encefálico

A Tabela 12 mostra os marcadores bioquímicos dentre os pacientes com risco aumentado para o AVE.

Os seguintes parâmetros apresentaram significância quando comparados ao controle: desidrogenase láctica, aspartato aminotransferase, alanino aminotransferase, bilirrubinas total e frações, gama glutamiltransferase e ureia.

Tabela 12 – Medidas descritivas para a comparação das variáveis bioquímicas entre os grupos controle e pacientes falciformes.

	Grupo						p
	Controle			Pacientes Falciformes			
	Média	SD	Mediana	Média	SD	Mediana	
Idade na coleta	10,27	4,47	10,00	9,93	3,45	10,00	0,539
LDH	209,95	54,45	215,00	476,93	213,14	441,60	0,001*
AST	23,83	7,00	23,00	43,33	17,12	40,00	0,001*
ALT	14,71	6,70	13,00	23,34	11,15	22,00	0,001*
BT	0,48	0,26	0,44	2,91	1,39	2,59	0,001*
BD	0,10	0,07	0,08	0,64	0,35	0,54	0,001*
BI	0,38	0,20	0,36	2,26	1,25	2,00	0,001*
FAL	168,56	75,29	156,00	212,26	121,75	171,00	0,169
GGT	13,56	4,57	13,00	24,94	13,97	23,00	0,001*
UREIA	30,60	7,58	32,12	21,54	6,82	20,70	0,001*
CREAT	0,53	0,16	0,49	0,49	0,22	0,42	0,065
PTOT	7,45	0,45	7,50	7,76	0,85	7,55	0,080
ALB	4,54	0,45	4,40	4,70	0,59	4,61	0,103
GLOB	2,91	0,49	2,96	3,05	0,85	3,04	0,322
FERRITINA							

Fonte: AUTOR, 2017. Teste U de Mann-Whitney. *significante. Legendas: SD – Desvio Padrão; LDH – Desidrogenase Láctica; AST – Aspartato Aminotransferase; ALT – Alanina Aminotransferase; BT – Bilirrubinas Totais; BD – Bilirrubina Direta; BI – Bilirrubina Indireta; FAL – Fosfatase Alcalina; GGT – Gama Glutamiltransferase; PTOT – Proteínas Totais; ALB – Albumina; GLOB – Globulina; p – Nível de Significância.

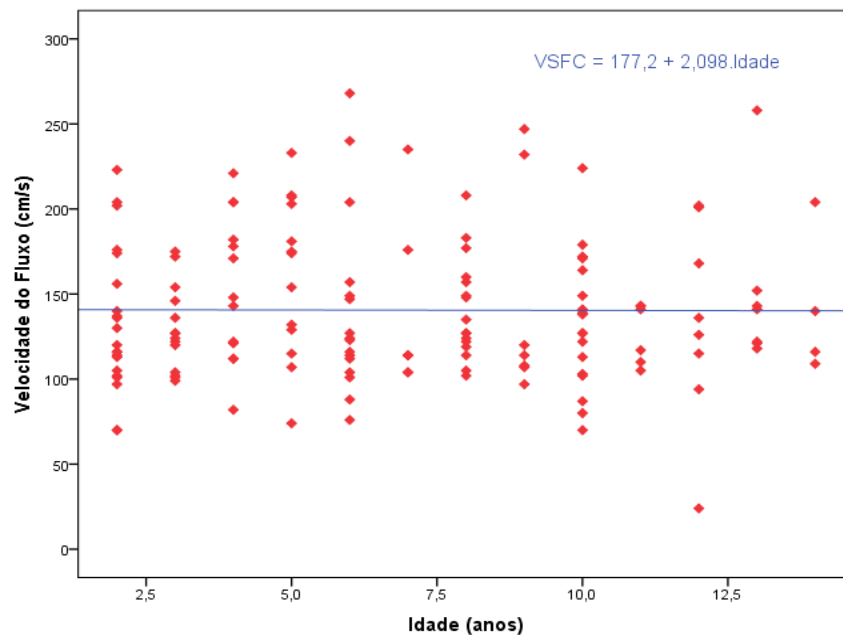
5.5 Relação entre idade, parâmetros hematológicos e bioquímicos e a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico

5.5.1 Relação entre velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a idade

A Figura 13 apresenta a relação entre a VFSE e a idade, incluindo os 151 pacientes falciformes desse estudo. Constatou-se que não houve correlação significativa entre as variáveis, considerando-se ambos os sexos (Rho de Spearman= 0,015; $p= 0,875$). A constante presente na equação da reta indica que,

desconsiderando-se a idade, o valor mais provável para a VFSE de um paciente qualquer, selecionado aleatoriamente é de 177,2 cm/s. O coeficiente angular da reta indica que a cada ano acrescido na idade, a VFSE aumenta em 2,098 cm/s.

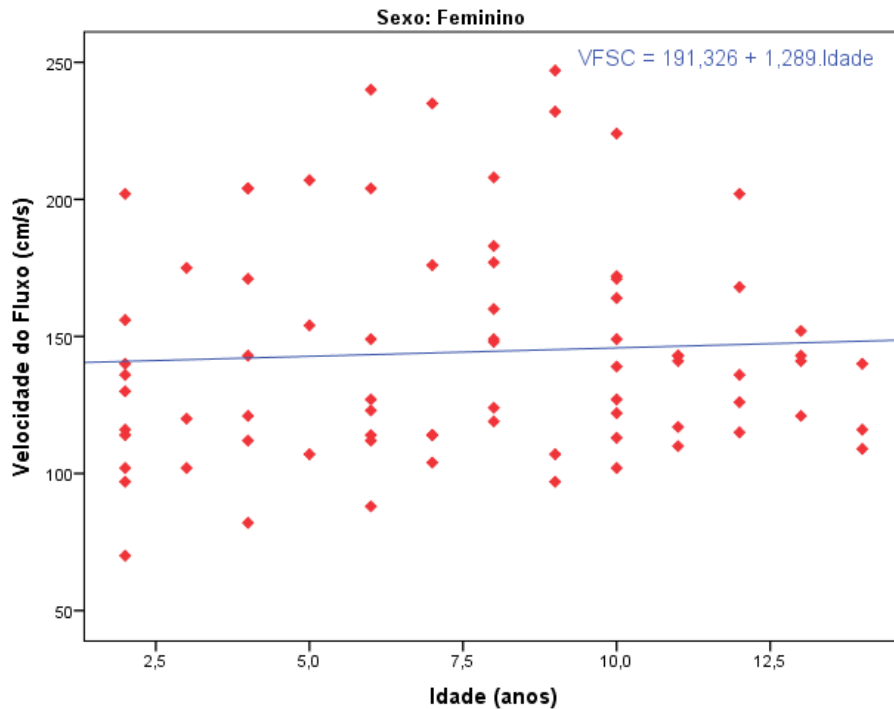
Figura 13 – Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a idade, considerando-se ambos os sexos (n=151).



Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: VFSE – Velocidade do Fluxo Sanguíneo Encefálico; cm/s – Centímetro por Segundo.

A Figura 14 mostra que não houve correlação significativa entre a VFSE e a idade, em comparação com o sexo feminino (Rho de Spearman= 0,09; p= 0,431). A equação da reta apresenta uma constante de 191,32, indicando que, desconsiderando-se a idade, o valor mais provável para a VFSE de um paciente qualquer do sexo feminino, selecionado aleatoriamente, é de 191,32 cm/s. O coeficiente angular da reta significa dizer que a cada ano acrescido na idade, a VFSE nas mulheres aumenta em 1,29 cm/s.

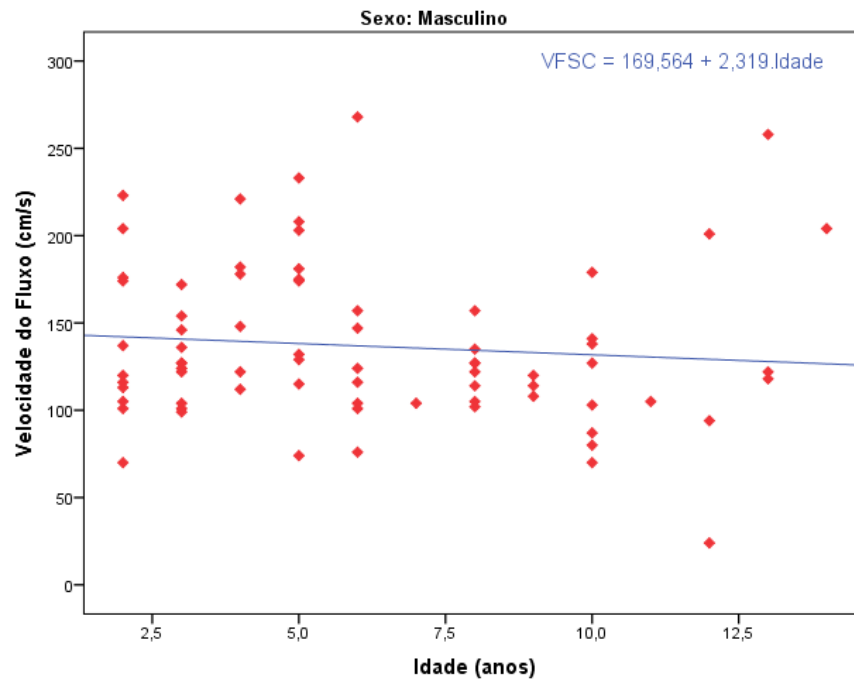
Figura 14 – Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a idade, considerando-se o sexo feminino (n=151).



Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: VFSE – Velocidade do Fluxo Sanguíneo Encefálico; cm/s – Centímetro por Segundo.

A Figura 15 torna claro que não houve correlação significativa entre a VFSE e a idade quando se trata do sexo masculino (Rho de Spearman= -0,13; $p= 0,282$). Interpretando-se a reta, a constante indica que, desconsiderando-se a idade, o valor mais provável para a VFSE de um paciente qualquer do sexo masculino, selecionado aleatoriamente, é de 169,56 cm/s. O coeficiente angular da reta indica que a cada ano acrescido na idade, a VFSE aumenta em 2,32 cm/s.

Figura 15 – Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a idade, considerando-se o sexo masculino.

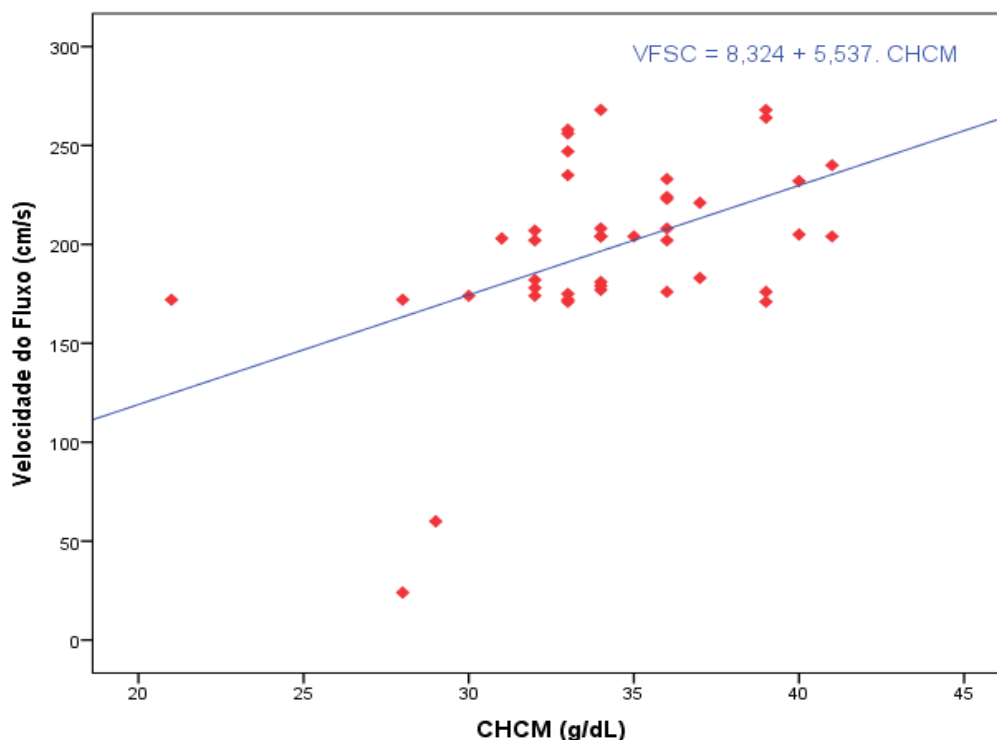


Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: VFSE – Velocidade do Fluxo Sanguíneo Encefálico; cm/s – Centímetro por Segundo.

5.5.2 Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e parâmetros hematológicos

A Figura 16 mostra que houve correlação positiva e significativa entre a VFSE e a CHCM em pacientes de ambos os sexos, analisados em conjunto (Rho de Spearman= 0,455; p= 0,002 – Sig. 2-tailed). Não houve correlação significativa entre hematócrito, hemoglobina, RDW, VCM, HCM, leucócitos totais e plaquetas. O valor da constante da equação da reta diz que, desconsiderando-se a CHCM, o valor mais provável para a VFSE de um paciente qualquer, selecionado aleatoriamente, é de 8,32 cm/s. O coeficiente angular da reta indica que a cada unidade (g/dL) acrescida na CHCM, a VFSE aumenta em 5,54 cm/s.

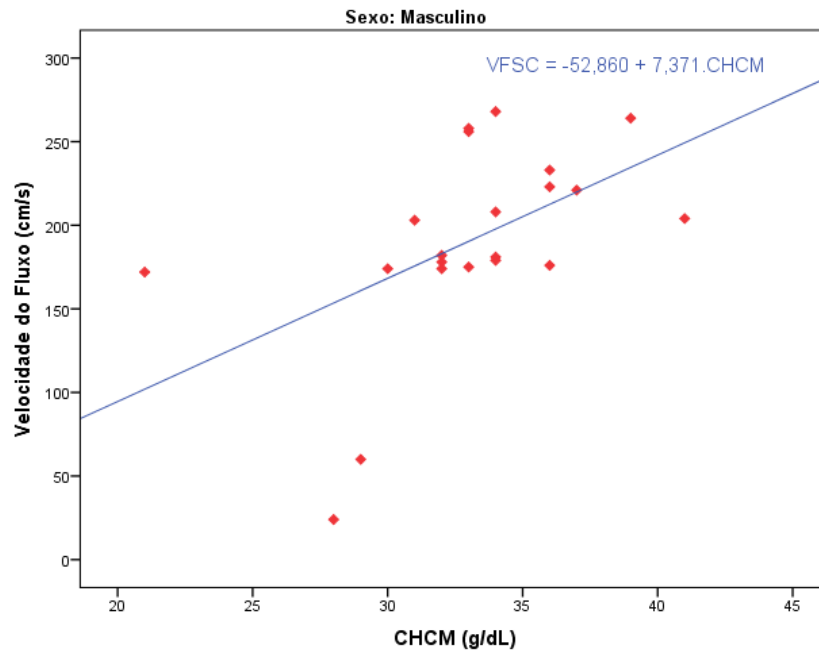
Figura 16 – Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a concentração de hemoglobina corpuscular média, em ambos os sexos, analisados em conjunto (n=42).



Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: VFSE – Velocidade do fluxo sanguíneo encefálico; cm/s – Centímetro por Segundo; CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; g/dL – Gramas por Decilitro.

A Figura 17 apresenta informações sobre a relação entre a VFSE e a CHCM no sexo masculino, onde se percebeu que houve correlação significativa de sentido direto entre as variáveis (Rho de Spearman= 0,667; $p= 0,001$). A constante indica que, desconsiderando-se a CHCM, o valor mais provável para a VFSE de um paciente qualquer do sexo masculino, selecionado aleatoriamente, é um valor negativo de -52,86 cm/s. O coeficiente angular da reta indica que a cada unidade (g/dL) acrescentada na CHCM, em um paciente do sexo masculino, a VFSE aumenta em 7,37 cm/s.

Figura 17 – Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a concentração de hemoglobina corpuscular média em pacientes do sexo masculino (n=21).

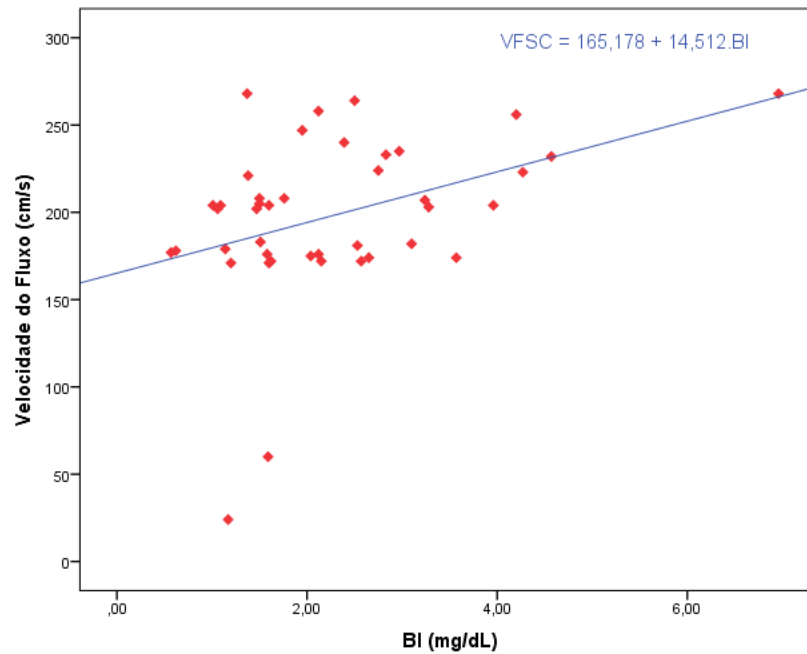


Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: VFSE – Velocidade do Fluxo Sanguíneo Encefálico; cm/s – Centímetro por Segundo; g/dL – Gramas por Decilitro.

5.5.3 Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e parâmetros bioquímicos

A bilirrubina indireta apresentou correlação positiva e significativa com a VFSE (Rho de Spearman= 0,319; p= 0,040), na análise conjunta dos sexos, como mostra a Figura 18. A constante da reta torna evidente que, desconsiderando-se a BI, o valor mais provável para a VFSE de um paciente qualquer, selecionado aleatoriamente, é de 165,18 cm/s. O coeficiente angular da reta mostra que a cada unidade (mg/dL) acrescida na BI, a VFSE aumenta em 14,51 cm/s.

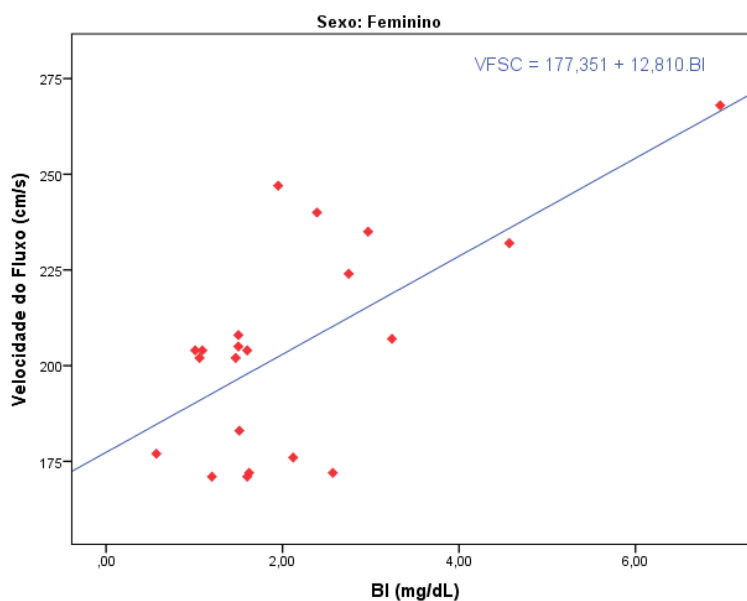
Figura 18 - Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a bilirrubina indireta, para ambos os sexos, em análise conjunta (n=42).



Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: VFSE – Velocidade do fluxo sanguíneo encefálico; cm/s – Centímetros por Segundo; g/dL – Gramas por Decilitro; BI – Bilirrubina Indireta.

A Figura 19 apresenta correlação significativa com a VFSE e a BI para o sexo feminino (Rho de Spearman= 0,489; $p= 0,025$). O valor apresentado pela constante indica que, desconsiderando-se a BI, o valor mais provável para a VFSE de um paciente qualquer do sexo feminino, selecionado aleatoriamente, é de 177,35 cm/s. A VFSE aumenta em 12,81 cm/s a cada unidade acrescida de BI, de acordo com que a equação da reta apresenta.

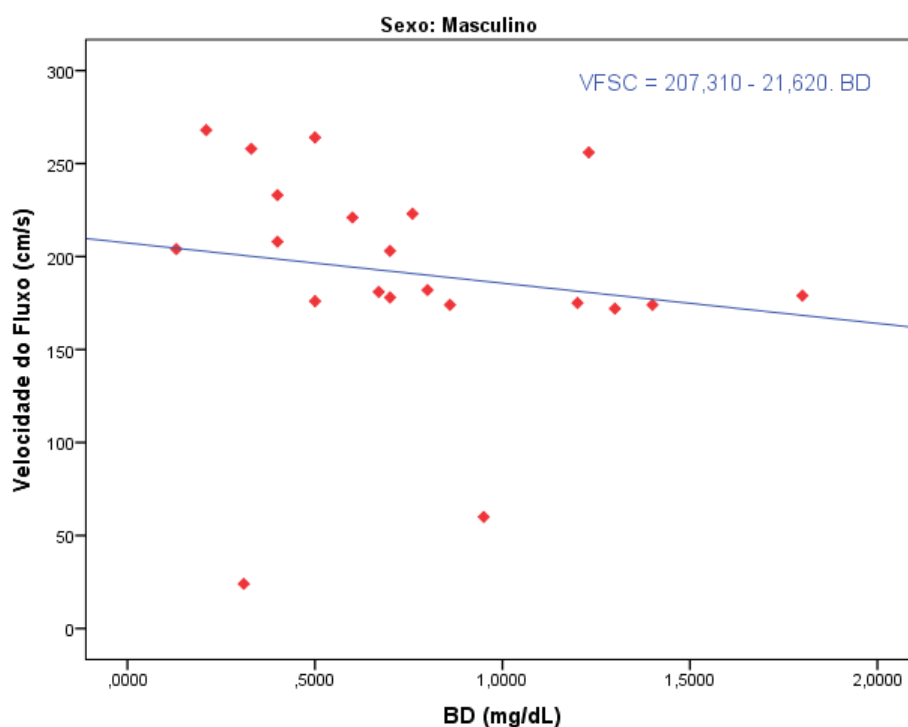
Figura 19 – Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a bilirrubina indireta, para o sexo feminino (n=21).



Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: VFSE – Velocidade do Fluxo Sanguíneo Encefálico; cm/s – Centímetros por Segundo; g/dL – Gramas por Decilitro; BI – Bilirrubina Indireta.

A Figura 20 evidencia que a BD apresentou correlação positiva - em sentido inverso - e significativa quando se comparou com a VFSE e o sexo masculino (Rho de Spearman= -0,449; p= 0,041). O valor da constante mostra que, desconsiderando-se a BD, o valor mais provável para a VFSE de um paciente qualquer do sexo masculino, selecionado aleatoriamente, é de 207,31 cm/s. O coeficiente angular da reta indica que a cada unidade (mg/dL) acrescida na BD, em um paciente do sexo masculino, a VFSE é diminuída em 21,62 cm/s.

Figura 20 – Relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a bilirrubina direta para o sexo masculino (n=21).

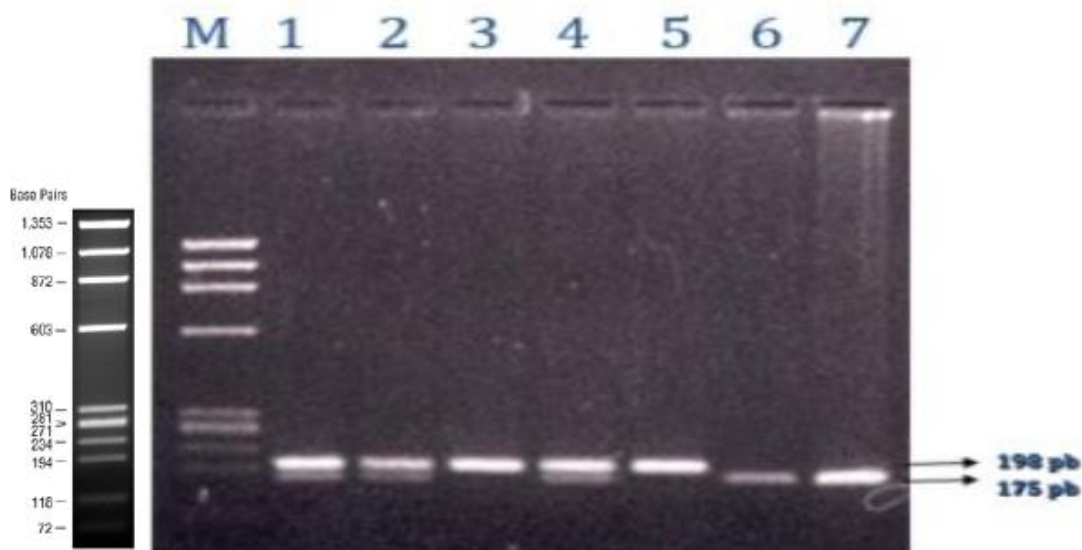


Fonte: AUTOR, 2017. Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: VFSE – Velocidade do Fluxo Sanguíneo Encefálico; cm/s – Centímetros por Segundo; g/dL – Gramas por Decilitro; BD – Bilirrubina Direta.

5.6 Detecção do polimorfismo do gene MTHFR C677T

A Figura 21 evidencia os resultados obtidos para o polimorfismo no gene da MTHFR (C677T) após a digestão com a enzima Hinf I. Observa-se, nesta sequência de amostras, que os pacientes 1, 2, 4 e 6 apresentaram polimorfismo em heterozigose. Os pacientes 6 e 7 apresentaram polimorfismo em homozigose. Os pacientes 3 e 5 não apresentaram polimorfismo. Observa-se, em M, um marcador X174 para o polimorfismo.

Figura 21 – Detecção de polimorfismos no gene da MTHFR C677T.

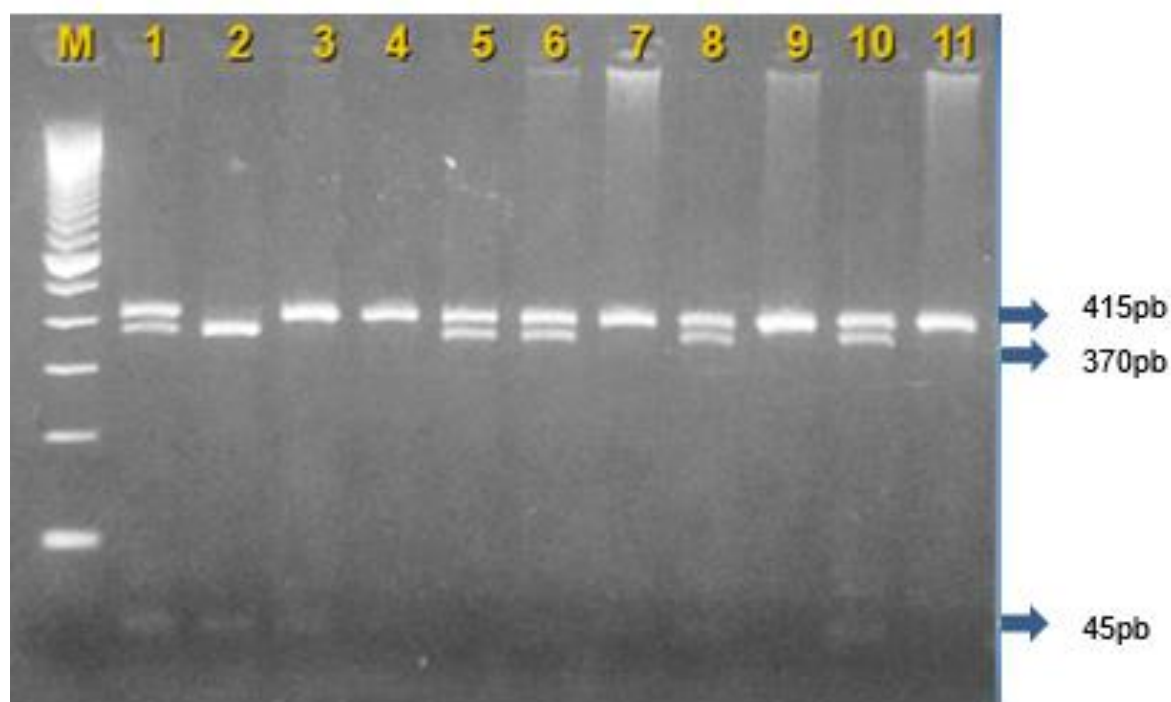


Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: M – Marcador X174; 1 – Heterozigoto; 2 – Heterozigoto; 3 – Normal; 4 – Heterozigoto; 5 – Normal; 6 – Homozigoto; 7 – Homozigoto.

5.7 Detecção do polimorfismo do gene eNOS T786C

A Figura 22 evidencia os resultados obtidos para o polimorfismo no gene da eNOS (T786C) após a digestão com a enzima *MspI*. Observa-se, nesta sequência de amostras, que os pacientes 1, 5, 6 e 8 apresentaram polimorfismo em heterozigose (415pb, 370pb e 45pb). O paciente 2 apresentou polimorfismo em homozigose (370pb e 45pb). Os pacientes 3, 4, 7 e 9 não apresentaram polimorfismo (415pb). Observa-se, na amostra 10, um controle positivo para o polimorfismo, enquanto que na amostra 11, tem-se o produto da PCR não digerido.

Figura 22 – Detecção de polimorfismo no gene da eNOS T786C.



Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: M – Marcador de peso molecular 100pb; 1 – Heterozigoto; 2 – Homozigoto; 3 – Normal; 4 – Normal; 5 – Heterozigoto; 6 – Heterozigoto; 7 – Normal; 8 – Heterozigoto; 9 – Normal; 10 – Controle Positivo para o Polimorfismo; 11 – Produto da PCR não digerido.

5.8 Relação entre o polimorfismo do gene MTHFR C677T e a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico, de acordo com o resultado do Doppler transcraniano

Os resultados obtidos pelo autor dessa tese, ilustrados na Tabela 13, mostram uma prevalência de 45,2% para o genótipo CC (normal), seguido de 40,5% do genótipo CT (heterozigoto) e 14,3% do genótipo TT (mutante), com uma frequência alélica de 0,65 para o alelo 677C e 0,35 para o alelo 677T. Dentre os pacientes com resultados anormais, o genótipo de maior prevalência foi o heterozigoto MTHFR 677CT, com 50%, enquanto aqueles que apresentaram resultados condicionais tiveram maior prevalência do genótipo homozigoto dominante MTHFR 677CC (68%).

Tabela 13 – Relação entre o Doppler transcraniano dos pacientes que apresentaram resultados alterados (anormais, condicionais ou reduzidos) e o polimorfismo do gene MTHFR C677T.

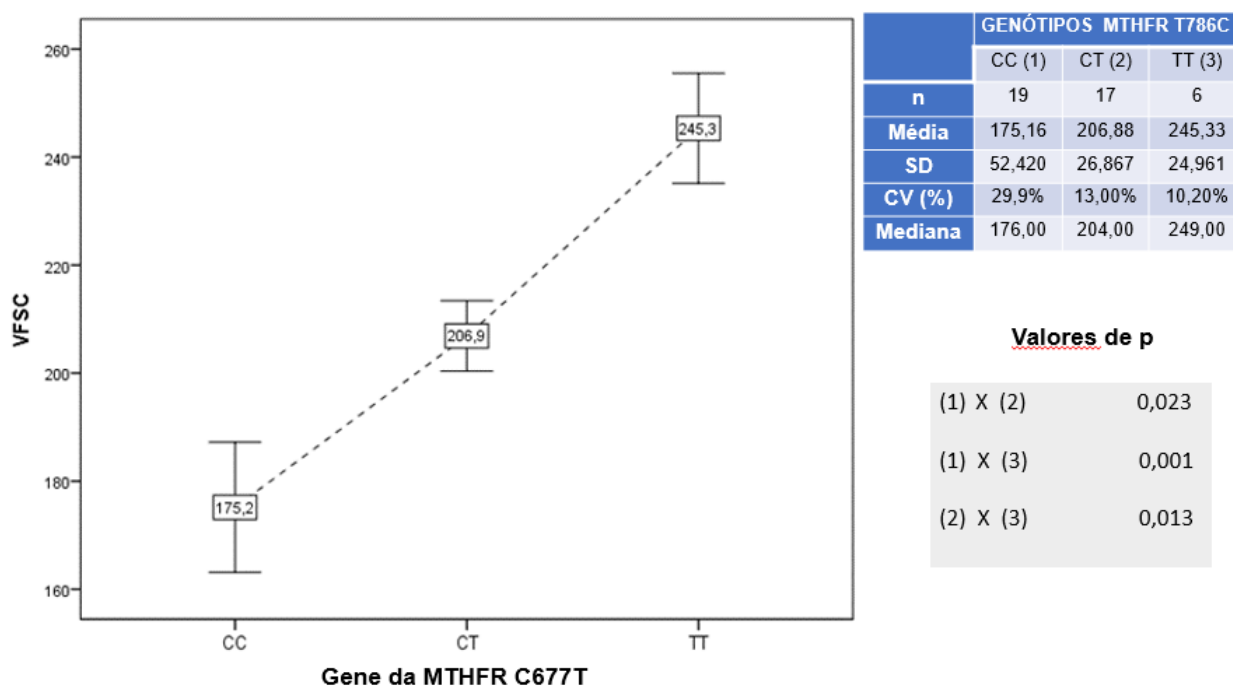
MTHFR C677T		DOPPLER TRANSCRANIANO			Total	p
		ANORMAL	CONDICIONAL	REDUZIDO		
CC	n (%)	6 (31,6%)	11 (57,9%)	2 (10,5%)	19 (100,0%)	0,020
CT	n (%)	12 (70,6%)	5 (29,4%)	0 (0,0%)	17 (100,0%)	
TT	n (%)	6 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6 (100,0%)	
Total	n (%)	24 (57,1%)	16 (38,1%)	2 (4,8%)	42 (100,0%)	

CC	n (%)	6 (25,0%)	11 (68,0%)	2 (100,0%)	19 (45,2%)	0,020
CT	n (%)	12 (50,0%)	5 (31,2%)	0 (0,0%)	17 (40,5%)	
TT	n (%)	6 (25,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6 (14,3%)	
Total		24 (100,0%)	16 (100,0%)	2 (100,0%)	42 (100,0%)	

Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: MTHFR – Metilenotetrahidrofolato Redutase; CC – Homozigoto Normal; CT – Heterozigoto; TT – Homozigoto Mutante; n – Número de Indivíduos; p – Nível de Significância. Teste de Qui-Quadrado de Independência com Nível de Significância de 5%.

A Tabela 14 compara a VFSE, dentre os pacientes com resultados anormais, com os genótipos relacionados ao polimorfismo do gene MTHFR 677. Observa-se que há diferença significativa ($p < 0,05$) quando se comparam a VFSE entre os diferentes tipos de genótipos. O genótipo que apresentou maiores VFSE, logo maior risco de desenvolvimento de AVE, foi o MTHFR 677TT (245,3 cm/s), embora o 677CT também indicou uma velocidade média elevada (206,9 cm/s). Os pacientes com o genótipo 677CC apresentaram um valor médio próximo ao valor da normalidade para a VFSE (175,2 cm/s).

Tabela 14 – Comparação da velocidade do fluxo sanguíneo encefálico de acordo com os diferentes genótipos para o polimorfismo do gene MTHFR C677T.



Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: MTHFR – Metileno tetra-hidrofolato Redutase; CC – Homozigoto Normal; CT – Heterozigoto; TT – Homozigoto Mutante; n – Número de Indivíduos; SD – Desvio Padrão; CV – Coeficiente de Variação; p – Nível de Significância. Teste U de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%.

5.9 Relação entre o polimorfismo do gene eNOS T786C e a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico, de acordo com o resultado do Doppler transcraniano

Nossos resultados apontam uma prevalência de 52,4% para o genótipo 786CC, enquanto 26,2% corresponde ao genótipo 786CT e 21,4% ao genótipo 786TT, com uma frequência alélica de 0,645 para o alelo C e 0,345 para o alelo T. A Tabela 14 informa que, dentre os pacientes com resultados anormais, houve igual distribuição (33,3%) para cada tipo de genótipo, enquanto aqueles que apresentaram resultados condicionais tiveram maior prevalência do genótipo homozigoto 786CC (81,3%) e apenas 6,3% do tipo 786TT.

Tabela 15 – Relação entre o Doppler transcraniano dos pacientes que apresentaram resultados alterados (anormais, condicionais ou reduzidos) e o polimorfismo do gene eNOS T786C.

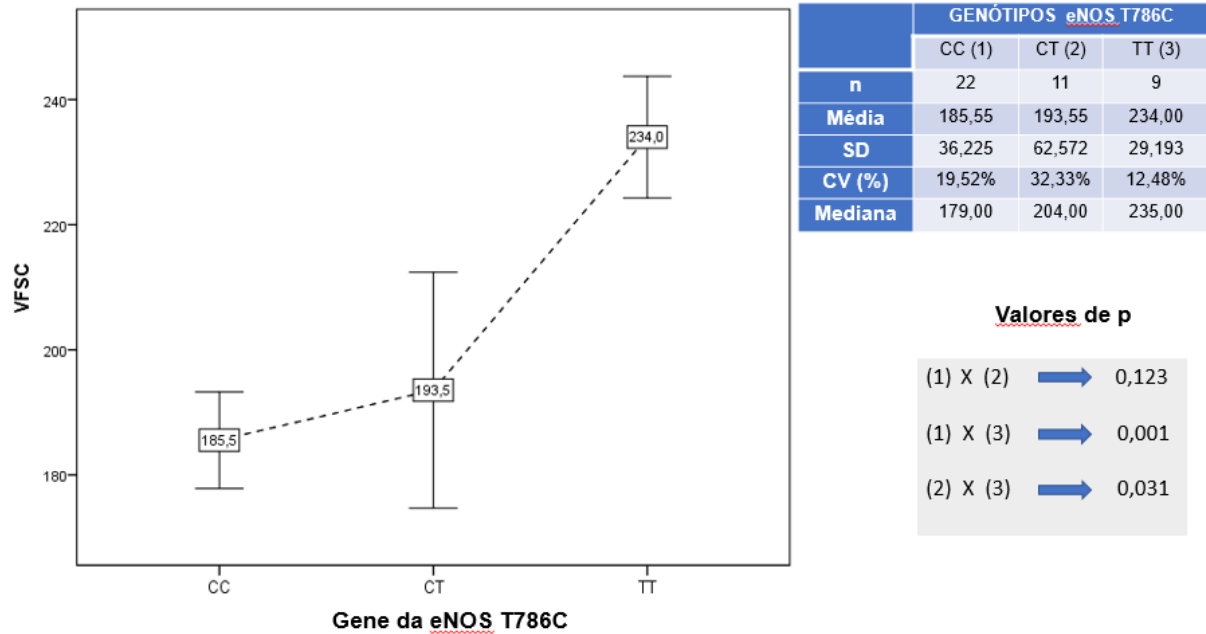
eNOS T786C		DOPPLER TRANSCRANIANO			Total	p
		ANORMAL	CONDICIONAL	REDUZIDO		
CC	n (%)	8 (36,4%)	13 (59,1%)	1 (4,5%)	22 (100,0%)	0,020
CT	n (%)	8 (72,7%)	2 (18,2%)	1 (9,1%)	11 (100,0%)	
TT	n (%)	8 (88,9%)	1 (11,1%)	0 (0,0%)	9 (100,0%)	
Total	n (%)	24 (57,1%)	16 (38,1%)	2 (4,8%)	42 (100,0%)	
CC	n (%)	8 (33,3%)	13 (81,3%)	1 (50,0%)	22 (52,4%)	0,020
CT	n (%)	8 (33,3%)	2 (12,5%)	1 (50,0%)	11 (26,2%)	
TT	n (%)	8 (33,3%)	1 (6,3%)	0 (0,0%)	9 (21,4%)	
Total		24 (100,0%)	16 (100,0%)	2 (100,0%)	42 (100,0%)	

Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial; CC – Homozigoto Normal; CT – Heterozigoto; TT – Homozigoto Mutante; n – Número de Indivíduos; p – Nível de Significância. Teste de Qui-Quadrado de Independência com Nível de Significância de 5%.

A Tabela 16 compara a VFSE, dentre os pacientes com resultados anormais, com os genótipos relacionados ao polimorfismo do gene eNOS T786C.

Observa-se que a velocidade do fluxo sanguíneo nos pacientes com polimorfismos do gene eNOS 786TT diferencia-se significativamente daqueles com genótipo 786CC e 786CT, contudo, entre os dois últimos não houve diferenças significantes na VFSE. O genótipo que apresentou maiores VFSE, logo maior risco de desenvolvimento de AVE, foi o eNOS 786TT (234,0 cm/s), embora o 677CT também indicou uma velocidade média elevada (206,9 cm/s). Os pacientes com o genótipo 786CT apresentaram uma VFSE de 193,5 cm/s e o genótipo 786CC mostraram um valor médio de 185,5 para a VFSE.

Tabela 16 – Comparação da velocidade do fluxo sanguíneo encefálico de acordo com os diferentes genótipos para o polimorfismo do gene eNOS T786C.



Fonte: AUTOR, 2017. Legendas: eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial; CC – Homozigoto Normal; CT – Heterozigoto; TT – Homozigoto Mutante; n – Número de Indivíduos; SD – Desvio Padrão; CV – Coeficiente de Variação; p – Nível de Significância. Teste U de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%.

6 DISCUSSÃO

Essa tese é inédita ao correlacionar a VFSE, parâmetros hematológicos, bioquímicos e genéticos com o risco de AVE em pacientes com AF. Os resultados apresentados pelo autor, mostraram que os pacientes são igualmente distribuídos em relação ao sexo, no que diz respeito a VFSE, diferentemente do estudo de Barbosa et al. (2006), em que o sexo feminino foi predominante, e isso pode ter ocorrido devido ao fato desses autores terem utilizado um número bem superior de pacientes do sexo feminino (n=68), quando comparado com o sexo masculino (n=20). Além disso, esses autores não separaram os dados por faixa etária e sexo porque consideraram essa discrepância muito grande, o que para nós representa um viés para a pesquisa. A ausência de estudos envolvendo a variável sexo deixa-nos a mercê da falta de conhecimento e discussão acerca de fatores individuais dessa doença, logo foi de grande valia realizar essa análise pormenorizada.

O estudo de Detterich et al. (2013) observou diferenças entre os sexos, porém no que diz respeito à hemodinâmica e às respostas hematológicas à transfusão sanguínea em pacientes com AF em regime crônico de transfusão, não relacionados diretamente à VFSE. Pacientes do sexo masculino exibiram redução paradoxal da liberação de oxigênio em resposta à transfusão em virtude de o aumento da resistência vascular ser maior que o aumento da capacidade de oxigênio, o que pode ser proveniente da incapacidade de suprimir adequadamente o percentual de hemoglobina entre os ciclos de transfusão.

Ao considerar-se a idade dos 151 pacientes desse estudo, observou-se que média dos pacientes que se submeteram ao DTC foi de $6,84 \pm 3,56$. A idade mínima de pacientes foi de 2 anos e a máxima de 14 anos. De acordo com Lobo et al. (2011), a primeira década de vida apresenta risco mais elevado de AVE, com incidência de 1 a 2% ao ano entre o período compreendido entre 2 e 4 anos de idade. Nossos dados servem como norteadores sobre qual o período de idade que essa população costuma apresentar VFSE alterada e, em consequência disso, riscos mais elevados de AVE, alertando para maior vigilância nessa fase.

A média de idade dos 42 pacientes com resultados alterados foi de $9,93 \pm 3,44$ anos de idade. O que explica a idade elevada nesses pacientes com resultados alterados é que, possivelmente, esses pacientes já apresentavam resultados alterados

anteriormente, mas nunca tiveram oportunidade de realizar o DTC, já que poucos pacientes em Alagoas têm esse encaminhamento.

A média da VFSE dos pacientes com resultados anormais em nosso estudo foi de $225,83 \pm 23,59$ cm/s e a VFSE dos condicionais foi de $175,81$ cm/s. O estudo de Rodrigues et al. (2016) observou que a média de idade foi de $9,19 \pm 5,92$. A análise dos resultados permitiu-nos mostrar que a faixa etária que mais apresentou resultados alterados foi a de 10 a 16 anos, com valor médio de $12,73 \pm 1,98$ anos de idade. Esses autores não esclareceram o porquê da alteração ter ocorrido nessa faixa etária. Supomos que esses resultados não podem ser inferidos como significantes em todos os grupos populacionais.

Em nossa pesquisa, observou-se uma proporção de 10,6% de pacientes com resultados condicionais e 17,2% de resultados anormais, perfazendo-se um total de 27,8% de resultados alterados. Esses resultados mostram-se bastante superiores aos encontrados no maior estudo da área em pacientes com AF, realizado por Adams (1998), cuja frequência de pacientes com resultados anormais foi de 9,7%. Esse estudo, que orienta e traça diretrizes para o uso do DTC através da VFSE, fornecida em cm/s, considera resultados anormais aqueles acima de 200 cm/s e condicionais aqueles entre 170 e 199 cm/s, o que representa um alerta para que medidas preventivas sejam observadas nesse grupo de pacientes, a fim de se evitar ou minimizar o risco de AVE. Em conjunto, nesse estudo, resultados condicionais e anormais foram padronizados como resultados alterados, com risco aumentado de AVE. Tal estudo possibilitou a identificação de crianças com maior chance de evento encefálico agudo e reduziu a ocorrência de AVE de 10% para menos de 1% ao ano, além da implementação do regime regular de transfusão de hemácias, que foi imprescindível para a redução de 92% do risco de novo evento (ADAMS, 1998).

O estudo de Makani et al. (2009), evidenciou que 3% dos pacientes tinham resultados condicionais, enquanto que apenas 1% possuía resultados anormais. Vale a pena ressaltar que pacientes falciformes quenianos apresentam sequelas neurológicas frequentes, com necessidade de acompanhamento neurológico. As limitações técnicas e econômicas dessas populações, muitas vezes, restringem a implantação de técnicas de biologia molecular na grande maioria dos laboratórios clínicos e hematológicos e um real acompanhamento desses pacientes. Outros fatores que podem justificar esse tipo de resultado são os interferentes ambientais, como: meio

ambiente, deficiência alimentar e qualidade nutricional inadequada, que, certamente, têm influência nas consequências fisiopatológicas da AF.

Bernaudin et al. (2008), em estudo feito envolvendo crianças, observaram que não houve casos de resultados condicionais, mas houve 16% de casos de resultados anormais, o que esteve de acordo com nosso estudo, no que diz respeito à frequência de anormais, mas não nos condicionais. Apesar de países da Europa relatarem raros casos de AF, observa-se alta prevalência como resultado do crescimento da população africano-caribenhas e em consequência da imigração do Norte e África subsaariana de pessoas com esse distúrbio genético, logo os resultados anormais parecem ser condizentes com esse aumento nessa população, o que já acontece no Brasil devido à migração durante o período da escravatura.

O estudo realizado por Adams et al. (2004), nos EUA, mostrou 18% de resultados condicionais e 9% de pacientes com resultados anormais. O número superior de resultados condicionais em relação aos anormais mostra que o uso de técnicas modernas como a implementação de biologia molecular e transplantes nesses pacientes podem ser a explicação para tal redução, o que reduz o número de hospitalizações dos pacientes, mesmo sendo o transplante de alto custo, em virtude de não ser realizado pelo sistema público de saúde.

Comparando-se resultados de estudos em populações brasileiras, 4% apresentaram resultados condicionais e 3% apresentaram resultados anormais, de acordo com Belisario et al. (2010), o que difere bastante dos nossos resultados, ainda que a mesma metodologia tenha sido utilizada. Estudo realizado em Sergipe, por Hyder et al. (2008), mostrou valores bem abaixo dos nossos resultados, 2,9% de resultados anormais, mas também abaixo dos resultados do estudo STOP. De acordo com Hokazono et al. (2011), a proporção de pacientes com resultados anormais foi de 1,6%, já para Park et al. (2006), a proporção de resultados anormais foi de 2,6%. Provavelmente, os resultados dessa tese foram diferentes devido à falta de implementação adequada do Programa Estadual de Atenção à Pessoa com AF em Sergipe. Além disso, a cobertura ofertada pelo SUS de apenas 95 pacientes em Sergipe, diferentemente das 440 assistidas por esse serviço em Alagoas, embora essa assistência não seja plena haja vista que não há cobertura do DTC em todos os pacientes pediátricos, impedindo a equidade no atendimento das necessidades específicas desses usuários. A velocidade média do fluxo sanguíneo encefálico

apresentada em nosso estudo foi de $141,17 \pm 43,95$, que se aproximou dos estudos de Cox et al. (2014), cuja velocidade média foi de 131 cm/s.

De acordo com as características dos pacientes envolvidos, quanto ao genótipo da hemoglobinopatia, em nosso estudo, 92,72% apresentaram o padrão de homozigose HbSS, sendo classificados como AF, embora 6,62% apresentassem HbSC e 0,66% apresentassem S β -tal. Estima-se que, respectivamente, 11%, 15% e 24% dos pacientes com o padrão HbSS e 2%, 4% e 10% dos pacientes com HbSC desenvolvam AVE sintomático até os 20, 30 e 45 anos de idade, a estimativa de prevalência de AVE ajustada pela idade foi de 4,01% em portadores de HbSS; 1,29% para S β -tal; e 2,43% para S/ β^0 Talassemia (OHENE-FREMPONG et al., 1998). Esses fatos justificam a necessidade do acompanhamento regular desses pacientes, bem como a profilaxia do AVE.

Aqueles pacientes com resultados condicionais entre 170 e 184 cm/s (condicionais baixos) precisariam repetir o DTC a cada 3 meses e, no caso de resultados subsequentes normais, poderia adotar-se a conduta para o grupo normal; os pacientes com resultados entre 185 e 199 cm/s (condicionais altos) deveriam repetir o DTC após 1 mês e, em caso de se manterem inalterados, recomenda-se repetir a cada 3 meses, mas isso não vem sendo realizado em Alagoas. Em caso de dois exames alterados, recomenda-se discutir o risco de AVE e considerar regime transfusional crônico, sobretudo naqueles que apresentam valores de VFSE ≥ 220 cm/s, com risco iminente de AVE. Esses fatores, em conjunto, podem contribuir negativamente no prognóstico desses pacientes (BRASIL, 2013).

Os reticulócitos são importantes indicadores da capacidade funcional da medula óssea. A reticulocitose apresentada por todos os pacientes dessa tese indica atividade proliferativa compensatória da medula óssea frente a uma anemia hemolítica. De acordo com Oliveira (2007), a maioria dos estudos não realiza correção na contagem de reticulócitos, assim estabelece-se apenas a proporção entre eritrócitos maduros e reticulócitos, nem tampouco leva-se em consideração a saída prematura de reticulócitos da medula para o sangue, que ocorre devido aos altos níveis de eritropoetina circulante, dessa forma o protocolo utilizado nessa tese garante maior confiabilidade nos resultados dessas contagens. Nossa pesquisa teve o cuidado de realizar as técnicas de forma adequada para que os riscos de vieses fossem cada vez mais minimizados ou não ocorressem. Defendemos que essa análise deve ser

realizada, a fim de avaliar melhor a cinética de produção de hemácias e o grau de hemólise nesses pacientes.

O presente estudo mostra que 45% dos pacientes com DTC alterados apresentaram leucocitose. A leucocitose é uma alteração frequentemente encontrada nesses pacientes. Isso merece uma atenção especial, visto que qualquer infecção bacteriana no indivíduo com AF tem grande potencial de evoluir para sepse, muitas vezes com êxito letal, caso não seja identificada e tratada precocemente. As infecções são as complicações mais frequentes nos indivíduos com AF. É bastante conhecido que há maior susceptibilidade a infecções por organismos encapsulados como consequência da asplenia, que é decorrente do sequestro de eritrócitos falcizados nos cordões esplênicos e sinusoides, com consequente formação de trombose, infartos, atrofia e fibrose do baço (LOGGETTO et al., 1999).

Os dados apresentados pelo autor desta tese estão em consonância com os resultados de Calderan et al (2008), quanto à leucocitose, muitas vezes com desvio à esquerda. Um dos pacientes apresentou elevada quantidade de neutrófilos bastonetes com características de Anomalia de Pelger Huet. Esse tipo de anomalia é uma alteração autossômica dominante que envolve a diferenciação terminal de leucócitos, em que se observa a segmentação incompleta do núcleo dos granulócitos, podendo confundir o manejo terapêutico do paciente, caso seja mal interpretado. Apesar de ser considerada uma alteração sem sintomatologia, quando adquirida, pode estar associada, ocasionalmente, em leucemias granulocíticas, doenças mieloproliferativas e algumas infecções. É bastante relevante elucidar a origem hereditária ou adquirida dessa anomalia, evitando-se assim interpretações errôneas do hemograma e condutas clínicas e terapêuticas desnecessárias.

Nesse estudo, 21% dos pacientes apresentaram trombocitose, com macroplaquetas sendo evidenciadas em 2% deles. Esse achado, segundo Oliveira (2007), é esperado, visto que as plaquetas elevam-se em função da atrofia do baço, que normalmente armazena 1/3 das plaquetas circulantes, podendo estar levemente diminuídas em crianças pequenas com baço aumentado.

No estudo realizado pelo autor da tese, os parâmetros bioquímicos que tiveram significância foram: desidrogenase láctica, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, bilirrubinas total e frações, gama glutamiltransferase e ureia. Tais parâmetros são de grande relevância por permitirem um acompanhamento acerca do grau de hemólise apresentado pelos indivíduos e, muitas vezes, na tomada de decisão

sobre a hospitalização dos mesmos. A avaliação de parâmetros bioquímicos também são de grande valia em pacientes com AF, devido à hemólise ocorrida com frequência, além do estresse oxidativo crônico gerado pelo estado hemolítico crônico e sobrecarga de ferro proveniente da terapia transfusional (SCHECHTER, 1985).

As análises evidenciaram que houve correlação significativa entre a VFSE e os parâmetros CHCM e bilirrubina indireta, considerando-se ambos os sexos. Houve correlação positiva entre eles, o que implica dizer que quanto maior a VFSE, maiores os níveis de CHCM e de BI e vice-versa. Não foram encontrados estudos publicados sobre esse tipo de relação, sendo esse, provavelmente, o primeiro a retratar tal dado. Houve correlação significativa e positiva entre a VFSE e a BI, para o sexo feminino. Isso implica dizer que quanto maior a VFSE, maiores os níveis de BI nesses indivíduos e vice-versa e que esses parâmetros podem ser utilizados no auxílio para o entendimento da influência dos índices hematológicos sobre o AVE. Quanto ao sexo masculino, houve correlação significativa e direta para a CHCM e indireta para a BI. Isso quer dizer que quanto maior a VFSE, maior a CHCM e menores os níveis de BI. Os achados de hiperbilirrubinemia dessa tese, sobretudo na correlação com a VFSE, são de extrema valia, já que, segundo Schechter (1985), a bilirrubina é o principal produto do metabolismo do grupo heme e indica ser útil na monitorização dos pacientes, dados que não constam nas publicações relacionadas a esse tema.

De acordo com Aliyu et al. (2006), os pacientes que fazem uso de hidroxiureia contam com o aumento do conteúdo de água no interior das hemácias, além de aumento da capacidade de deformação e melhora do fluxo microvascular das hemácias falciformes. Isso pode explicar essa relação entre a VFSE e a CHCM. A hiperviscosidade encontrada em quem faz transfusão também é um fator que interfere diretamente na VFSE. Segundo Noguchi; Schechter (1985), a razão para o aumento da CHCM está ligada diretamente com o grau de hemólise, bem como os níveis de bilirrubinas totais. Os níveis de bilirrubina direta diminuem, em relação ao de BI, devido à hemólise intravascular, como um mecanismo compensatório após o aumento da BI.

Os achados dessa tese mostraram que não houve diferença entre os níveis de hemoglobina e hematócrito no que concerne aos sexos masculino e feminino. Esses resultados são similares aos de Detterich et al. (2013) em que a hemoglobina e o hematócrito não apresentaram diferença entre eles quanto ao sexo. Esse mesmo estudo mostrou que o sexo masculino apresenta aumento no percentual de HbS, contagem de reticulócitos e plaquetas e quantidade de hemoglobina livre no plasma,

quando comparado ao sexo feminino. De acordo com Platt et al. (1994) e Gladwin et al. (2003), a diferença no percentual de hemoglobina deve representar um mecanismo que explica o aumento de complicações vasculares previamente observadas em homens com AF, podendo contribuir com o aumento da resistência vascular sistêmica nesse sexo.

Ainda, a idade e os níveis de hemoglobina não apresentaram correlação significativa quando comparadas à VFSE, não apresentando concordância com o que Cox et al. (2014) apresentaram, quando afirmaram que há forte associação inversa entre a idade e os níveis de hemoglobina, quando comparada com a VFSE, logo, quanto maior a idade apresentada pelo paciente, e maiores os níveis de hemoglobina, menor a VFSE, ou vice-versa.

Os resultados adquiridos através da realização dessa pesquisa permitiram entender que a frequência de pacientes com DTC alterado em Alagoas é bastante elevada (27,8%) e isso exige uma tomada de decisão emergencial, a fim de que esses pacientes não venham a desenvolver episódios de AVE, ou que pelo menos os riscos desse agravo sejam minimizados. A grande totalidade dos pacientes estudados apresentam homozigose quanto ao tipo de hemoglobinopatia, mas existem outros que são portadores de outras hemoglobinopatias cujas diretrizes ainda não existem.

Nosso estudo é inédito ao avaliar a relação entre os polimorfismos e a VFSE. Acreditamos que esse dado é de extrema importância por dois aspectos: primeiro, permite avaliar melhor o risco de AVE, em que são identificados os genótipos mutantes. Clinicamente, esses achados permitem um melhor aconselhamento genético nesses pacientes e seus descendentes. Ao se analisar os polimorfismos do nosso estudo, observaram-se prevalência de 45,2% para o genótipo CC (normal), seguido de 40,5% do genótipo CT (heterozigoto) e 14,3% do genótipo TT (mutante), com uma frequência alélica de 0,65 para o alelo 677C e 0,35 para o alelo 677T. Dentre os pacientes com resultados anormais, o genótipo de maior prevalência foi o heterozigoto MTHFR 677CT, com 50%, enquanto aqueles que apresentaram resultados condicionais tiveram maior prevalência do genótipo homozigoto dominante MTHFR 677CC (68%).

O polimorfismo MTHFR C677T tem sido encontrado entre diferentes populações e grupos étnicos, com baixa frequência entre africanos (FLETCHER; KESSLING, 1998). Um estudo realizado por Couto et al. 2004, em recém-nascidos de uma população de Salvador – Bahia, apresentou prevalência de 36,2% para o genótipo CT e 5,3% para o genótipo TT, com frequência alélica de 0,23. Ainda no Brasil, Arruda et al. (1998)

realizaram um estudo de prevalência da mutação C677T entre populações de grupos étnicos distintos, encontrando uma frequência alélica de 0,1 entre descendentes europeus; 0,14 entre negros; e 0,12 entre indianos.

O estudo de Silva Filho et al. (2011) mostrou que o polimorfismo MTHFR C677T foi encontrado em 37,5% de crianças que apresentavam doenças cerebrovasculares. Quinze crianças eram heterozigotas para a mutação e 4 eram homozigotas, sendo que essas últimas não apresentavam doença cerebrovascular, logo não nos oferece dados sobre a VFSE. Acreditamos que os autores não têm condições precisas de prever o risco de AVE, já que não apresenta a correlação com a VFSE. Humberto da Silva et al. (2017), realizaram um estudo com 95 pacientes falciformes e encontraram 69,5% com padrão homozigoto selvagem para MTHFR (677CC), 28,4% heterozigotos (677CT) e 2,1% de homozigotos mutantes (677TT), conduzindo para uma frequência alélica de 0,84 para o alelo ancestral (677C) e 0,16 para o mutante (677T).

Segundo dados levantados por Durand et al. (2001), a prevalência da homozigose do MTHFR (677TT) pode variar entre 1 e 30% na população em geral. Esses dados estão em consonância com os nossos resultados, que apresentaram 14,3% de homozigose, porém não havia sido relacionado com a VFSE, dentre os pacientes com risco aumentado de AVE. Balasa et al. (2002) encontraram uma prevalência entre caucasianos de 10 a 20%. Morelli et al. (2002) relataram uma prevalência de 9% de 677TT e Franco et al. (1999) uma prevalência de 16,6%, apesar de o Brasil apresentar uma ampla miscigenação, com uma grande proporção de caucasianos dentre os indivíduos normais. Isso reforça que, apesar da grande frequência dessa patologia na raça negra, não é característica exclusiva dessa população.

Moreira Neto et al. (2006) detectaram a presença do polimorfismo MTHFR 677TT em 1,8% e a forma heterozigota em 34%, sendo 9 deles do padrão HbSS e 9 HbSC. A presença do alelo 677T foi associada com a ocorrência de doenças cerebrovasculares, todavia esta associação não foi significativa quando as complicações foram avaliadas separadamente em pacientes com necrose avascular, retinopias e síndrome torácica aguda. Hatzlhofer et al. (2012) relataram uma frequência do alelo 677T para MTHFR de 50,8%. A maioria desses estudos foi realizado com um número considerado por vários dos próprios autores como insuficiente para afirmar a relação entre o polimorfismo e o risco de doenças cerebrovasculares.

Além do MTHFR, muitos polimorfismos de nucleotídeos simples em vários *loci* genéticos têm sido relatados no que diz respeito às complicações e prognóstico das doenças falciformes (STEINBERG, 2009). A redução da biodisponibilidade do ON é uma consequência fisiopatológica bem estabelecida da hemólise intravascular nesses pacientes e vêm sendo conectada com a maioria das complicações clínicas dessa patologia, ainda assim, poucos estudos têm estabelecido relação potencial entre o polimorfismo eNOS e a DF (FERDINAND et al., 2015; TANTAWY et al., 2015).

Nossos resultados sobre eNOS, apontam uma prevalência de 52,4% para o genótipo 786CC, enquanto 26,2% corresponde ao genótipo 786CT e 21,4% ao genótipo 786TT, com uma frequência alélica de 0,645 para o alelo C e 0,345 para o alelo T. Dentre os pacientes com resultados anormais, houve igual distribuição (33,3%) para cada tipo de genótipo, enquanto aqueles que apresentaram resultados condicionais tiveram maior prevalência do genótipo homocigoto 786CC (81,3%) e apenas 6,3% do tipo 786TT. Apesar da alta prevalência para o genótipo CC, nossos resultados apontam que a porcentagem do mutante deve ser levada em consideração, a fim de evitar episódios de AVE, nessa população.

O estudo realizado na Grécia por Armenis et al. (2017), envolvendo 79 pacientes adultos, mostrou uma frequência de 21,5% do genótipo TT, 31,6% do genótipo CT e 46,8% do CC. Os controles apresentaram 10,4% do genótipo TT, 41,7% do genótipo CT e 47,9% do CC. Quando se analisaram os alelos, foi registrada uma frequência alélica de 0,373 (T) e 0,627 (C).

Sharan et al. (2004) estudou o polimorfismo T786C em 87 pacientes africanos e americanos, principalmente adultos, e relataram um aumento da prevalência do alelo C786 em mulheres com STA. Baseado nisso, eles sugeriram que T786C deve ser o primeiro polimorfismo modificador de doenças específicas de determinado gênero. Diferentemente, Chaar et al. (2006) encontraram susceptibilidade diminuída para STA em estudo envolvendo 173 crianças com a mutação no alelo C786. No Brasil, Vargas et al. (2005) não encontraram nenhuma relação entre genótipo e distribuição dos genes entre pacientes e controles. Thakur et al. (2014), ao analisar 145 pacientes falciformes na África, não encontraram diferença entre pacientes e controles, quando se usou como referência o genótipo T786C e as frequências gênicas. Nishank et al. (2013) estudaram uma população indiana miscigenada de 150 pacientes e não encontraram aumento da frequência dos alelos C e T para a posição -786 em pacientes falciformes. Um estudo recente (YOUSRY et al., 2016), foi reportada uma distribuição similar dos genótipos

para o polimorfismo T786C entre 100 adultos egípcios com falciforme e um aumento da incidência de crises vaso-oclusivas e STA relacionadas ao genótipo 786CC.

O que pode explicar a inconsistência e a diversidade dos resultados são as diferentes populações, associadas às diferentes idades analisadas e o pequeno tamanho amostral relatado pelos próprios autores. Isto é reforçado por Tanus-Santos et al. (2001) ao mostrarem que as distribuições alélicas diferem significativamente entre populações distintas para o polimorfismo T786C, como é o caso dos caucasianos, que tendem a apresentar a mutação 786C de forma mais prevalente que pessoas de origem asiática e africana.

A maioria dos estudos citados anteriormente englobam, ao mesmo tempo, crianças e adultos, porém, o curso clínico das DF varia entre indivíduos de diferentes idades, o que pode representar falha na interpretação dos resultados. De acordo com Vichinsky et al. (1997), complicações específicas como a STA parecem apresentar diferentes cursos clínicos e etiologia a depender da idade, podendo-se inferir tal fato na forma em que os modificadores genéticos afetam o curso clínico nas diferentes idades.

Nossos resultados permitiram inferir que os genótipos TT, tanto para MTHFR 677 quanto para eNOS apontam para maior risco de desenvolvimento de AVE em pacientes com VFSE anormais.

Este é o primeiro estudo genético realizado em pacientes falciformes em associação com a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e variáveis hematológicas e bioquímicas. Com base em nossos resultados, sugerimos um melhor acompanhamento na propedêutica dos pacientes falciformes, com o seguimento via DTC. Com esse acompanhamento, acreditamos ser possível reduzir o risco de AVE. Da mesma forma, vemos como obrigatório o seguimento do protocolo de avaliação hematológica e bioquímica em todos os casos de pacientes falciformes.

7 CONCLUSÕES

Existe relação entre os polimorfismos dos genes da MTHFR C677T e da eNOS T786C com a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e o risco de acidente vascular encefálico em pacientes com doença falciforme.

O tipo de hemoglobinopatia mais acometido com o aumento da velocidade do fluxo sanguíneo encefálico é a HBSS (anemia falciforme). Não há relação entre a velocidade de fluxo sanguíneo encefálico aumentada com a idade ou sexo nos pacientes falciformes.

O risco de acidente vascular encefálico nos pacientes falciformes em relação ao fluxo sanguíneo encefálico está classificado respectivamente nos seguintes estratos: a) intermediário baixo; b) iminente; c) aumentado; e d) variável com valor reduzido.

Há correlação entre a velocidade do fluxo sanguíneo encefálico e a concentração de hemoglobina corpuscular média, bilirrubina indireta e bilirrubina direta em pacientes falciformes.

O polimorfismo mais prevalente para o gene MTHFR C677T é o genótipo do tipo 677CC. Os pacientes falciformes com o polimorfismo mutante (677TT) da MTHFR associados ao aumento da velocidade do fluxo sanguíneo encefálico, apresentam maior risco de desenvolver acidente vascular encefálico.

Dentre os pacientes falciformes, o polimorfismo que apresentou maior prevalência para o gene eNOS T786C foi o 786CC. Os pacientes com o genótipo mutante (786TT), com velocidade do fluxo sanguíneo encefálico aumentada, apresentam riscos mais elevados de desenvolvimento de AVE.

REFERÊNCIAS

- AASLID, R.; MARKWALDER, T.M.; NORNES, H. Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. **Journal of Neurosurgery**, [S. l.], v. 57, n. 6, p. 769-74, dez. 1982.
- ADAMS, H. P. J. Guidelines for the management of patients with acute ischemic stroke: a synopsis. A Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association. **Heart Disease and Stroke**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. 407-411, set. 1994.
- ADAMS, R. J. et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 339, n. 1, p. 5-11, jul. 1998.
- ADAMS, R.J. et al. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 353, n. 26, p. 2769-2778, dez. 2005.
- ADAMS, R.J. Transcranial Doppler correlation with cerebral angiography in sickle cell disease. **Stroke**, [S. l.], v. 23, n. 8, p. 1073-7, ago. 1992.
- AKINSHEYE, I.; KLINGS, E. S. Sickle cell anemia and vascular dysfunction: the nitric oxide connection. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 224, n. 3, p. 620-625, set. 2010.
- AL-ABSI, I, K. et al. Association of the methylenetetrahydrofolate reductase A1298C but not the C677T single nucleotide polymorphism with sickle cell disease in Bahrain. **Hemoglobin**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 449-453, mar. 2006.
- ALEXANDROV, A.V. et al. Low-Power 2-MHz Pulsed-Wave Transcranial Ultrasound Reduces Ischemic Brain Damage in Rats. **Translational Stroke Research**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 376-81, set. 2011.
- ALIYU, Z.Y.; TUMBLIN, A.R.; KATO, G.J. Current therapy of sickle cell disease. **Haematologica**, [S. l.], v. 91, n. 1, p. 7-10, jan. 2006.
- ALLURI, R.V. et al. MTHFR C677T gene mutation as a risk factor for arterial stroke: a hospital based study. **European Journal of Neurology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 40-44, jan. 2005.
- BALKARAN, B. et al. Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. **The Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 120, n. 3, p. 360-366, mar. 1992.
- BALLAS, S. K. Current issues in sickle cell pain and its management. **Hematology American Society Hematology Education Program**, [S. l.], p. 97-105, 2007.
- BARBOSA, Maurício Fregonesi et al. Doppler transcraniano convencional em voluntários assintomáticos: variabilidade e valores de referência para parâmetros de

fluxo sanguíneo. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, São Paulo , v. 64, n. 3b, p. 829-838, Set. 2006.

BELISÁRIO, A. R. et al. Coinheritance of alpha-thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. **Hemoglobin**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 516-529, mar. 2010.

BELISÁRIO, A.R. et al. Association of alpha-thalassemia, TNF-alpha (-308G>A) and VCAM-1 (c.1238G>C) gene polymorphisms with cerebrovascular disease in a newborn cohort of 411 children with sickle cell anemia. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 44-50, jan. 2015.

BERNAUDIN, F. et al. Long-term follow-up of pediatric sickle cell disease patients with abnormal high velocities on transcranial Doppler. **Pediatric Radiology**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 242-248, 2005.

BERNAUDIN, F.; VERLHAC, S. [Stroke prevention in sickle-cell disease: results, hurdles and future perspectives]. **Bull Acad Natl Med**. [S. l.], v. 192, n. 7, p. 1383-1393, 2008.

BEUTLER, E. Discrepancies between genotype and phenotype in hematology: an important frontier. **Blood**, [S. l.], v. 98, n. 9, p. 2597-2602, nov. 2001.

BISHOP, D.V.; BADCOCK, N.A.; HOLT, G. Assessment of cerebral lateralization in children using functional transcranial Doppler ultrasound (fTCD). **Journal of Visualized Experiments**, [S. l.], v. 27, n. 43, set. 2010.

BRAMBILLA, D.J.; MILLER, S.T.; ADAMS, R.J. Intra-individual variation in blood flow velocities in cerebral arteries of children with sickle cell disease. **Pediatric Blood & Cancer**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 318-322, set. 2007.

BRASIL. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**. Brasília: ANVISA, 2001. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/anvisa/diagnostico.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano Estadual de Saúde (PES), 2006-2019. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 473/GM, de 26 de abril de 2013.

CALDERAN, Patrícia H. O. et al. Estudo da anomalia de Pelger-Huët em núcleo familiar. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 30, n. 1, p. 68-69, Feb. 2008.

CANÇADO, R.D.; JESUS, J.A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 204-206, jul./set. 2007.

CARMEL R, MALLIDI PV, VINARSKIY S, et al. Hyperhomocysteinemia and cobalamin deficiency in young Asian Indians in the United States. **Am J Hematol** 2002; 70:107.

CHIES, J.A.; NARDI, N.B. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. **Medical Hypotheses**, [S. I.], v. 57, n. 1, p. 46-50, jul. 2001.

CHRISTOPHER, R.; NAGARAJA, D.; SHANKAR, S.K. Homocysteine and cerebral stroke in developing countries. **Current Medicinal Chemistry**, [S. I.], v. 14, n. 22, p. 2393-2401, 2007.

CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; COSTA, F.F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin**, [S. I.], v. 33, n. 1, p. 1-16, 2009.

COUTO, F.D. et al. C677T polymorphism of the MTHFR gene and variant hemoglobins: a study in newborns from Salvador, Bahia, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 529-533, mar./abr. 2004.

COX, S.E. et al. Haptoglobin, alpha-thalassaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase polymorphisms and risk of abnormal transcranial Doppler among patients with sickle cell anaemia in Tanzania. **British Journal of Haematology**, [S. I.], v. 165, n. 5, p. 699-706, jun. 2014.

DETTERICH, J.A. et al. et al. Patients with sickle cell anemia on simple chronic transfusion protocol show sex differences for hemodynamic and hematologic responses to transfusion. **Transfusion**, [S. I.], v. 53, n. 5, p. 1059-1068, mai. 2013.

DEWITT, L.D.; WECHSLER, L.R. Transcranial Doppler. **Stroke**, [S. I.], v. 19, n. 7, p. 915-921, jul. 1988.

DIGGS L.M. Anatomic lesions in sickle cell disease. In: Abramson HBJ, Wethers DL, editors. **Sickle Cell Disease: Diagnosis, Management, Education, and Research**. St. Louis: C. V. Mosby; 1973. pp. 189–229.

DOMINGUES-MONTANARI, S. et al. Genetics of stroke: a review of recent advances. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, [S. I.], v. 8, n. 4, p. 495-513, 2008.

EDELMAN, G.M. Learning in and from brain-based devices. **Science**, [S. I.], v. 318, n. 5853, p. 1103-1105, nov. 2007.

ELMARIAH, H. et al. Factors associated with survival in a contemporary adult sickle cell disease cohort. **American Journal of Hematology**, [S. I.], v. 89, n. 5, p. 530-535, mai. 2014.

ENDRES, M. et al. Targeting eNOS for stroke protection. **Trends in Neurosciences**. [S. I.], v. 27, n. 5, p. 283-289, 2004.

FERTRIN, K.Y.; COSTA, F.F. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Review of Hematology**, [S. I.], v. 3, n. 4, p. 443-458, ago. 2010.

FIGUEIREDO, M. S. et al. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. **American Journal of Hematology**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 72-76, out. 1996.

FLANAGAN, J.M. et al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. **Blood**, [S. l.], v. 117, n. 24, p. 6681-4668, jun. 2011.

FRENETTE, P.S.; ATWEH, G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 117, n. 4, p. 850-858, abr. 2007.

FRISO, S. et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States American**, [S. l.], v. 99, n. 8, p. 5606-5511, abr. 2002.

FROSST, P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**. [S. l.], v. 10, n. 1, p. 111-113, mai. 1995.

FULLERTON, H.J. et al. Declining stroke rates in Californian children with sickle cell disease. **Blood**, [S. l.], v. 104, n. 2, p. 336-9, jul. 2004.

GONÇALVES, M.S. et al. Beta S-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirao Preto, v. 36, n. 10, p.1283-1288, out. 2003.

GROEN, M.A. et al. Does cerebral lateralization develop? A study using functional transcranial Doppler ultrasound assessing lateralization for language production and visuospatial memory. **Brain and Behavior**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 256-69, mai. 2012.

GROSSE, S.D. et al. Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. **American Journal of Preventive Medicine**, [S. l.], v. 41, n. 6, p. S398-405, dez. 2011.

HOKAZONO, M. et al. Results from transcranial Doppler examination on children and adolescents with sickle cell disease and correlation between the time-averaged maximum mean velocity and hematological characteristics: a cross-sectional analytical study. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 129, n. 3, p. 134-138, maio 2011.

HOPPE, C. et al. Confirmation of an association between the TNF (-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Stroke**, [S. l.], v. 38, n. 8, p. 2241-2246, ago. 2007.

ITALIA, K. et al. Variable phenotypes of sickle cell disease in India with the Arab-Indian haplotype. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 168, n. 1, p. 156-159, jan. 2015.

KASSAB, M.Y. et al. Transcranial Doppler: an introduction for primary care physicians. **The Journal of American Board Family Medicine**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 65-71, jan./fev. 2007.

KATO, G. J. et al. Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension. **American Journal of Hematology**, [S. l.], v. 81, n. 7, p. 503-510, jul. 2006.

KATO, G. J. et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors in sickle cell disease: abnormal levels and correlations with pulmonary hypertension, desaturation, haemolysis, organ dysfunction and death. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 145, n. 4, p. 506-513, mai. 2009.

KEAGE, H.A. et al. Cerebrovascular function in aging and dementia: a systematic review of transcranial Doppler studies. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 258-270, jan./dez. 2012.

KIM, Y. et al. Anisotropic light scattering of individual sickle red blood cells. **Journal Biomedical Optics**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 040501, abr. 2012.

KWIATKOWSKI, J.L. et al. Transcranial Doppler ultrasonography in siblings with sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 121, n. 6, p. 932-937, jun. 2003.

LEE, M.T. et al. Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia (STOP): extended follow-up and final results. **Blood**, [S. l.], v. 108, n. 3, p. 847-52, ago. 2006.

LEIKIN, S.L. et al. Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Pediatrics**, [S. l.], v. 84, n. 3, p. 500-508, set. 1989.

LETTRE, G. et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States American**, [S. l.], v. 105, n. 33, p. 11869-11874, ago. 2008.

LETTRE, G. The search for genetic modifiers of disease severity in the beta-hemoglobinopathies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 10, out. 2012.

LOBO, C.L. et al. Crises dolorosas na doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 247-258, Set. 2007.

LOBO, C.L. et al. Brazilian Guidelines for transcranial doppler in children and adolescents with sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 43-8, fev. 2011.

LOGGETTO, S.R. et al. Alterações imunológicas em pacientes com anemia falciforme. **Revista Brasileira de Alergologia e Imunopatologia**, v. 22, p.77-82, 1999.

LOHMANN, H.; RINGELSTEIN, E.B.; KNECHT, S. Functional transcranial Doppler sonography. **Front Neurology and Neuroscience**, [S. l.], v. 21, p. 251-60, 2006.

LYRA, I.M. et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 4, p. 1287-90, jul./ago. 2005.

MAKANI, J. et al. Risk factors for high cerebral blood flow velocity and death in Kenyan children with Sickle Cell Anaemia: role of haemoglobin oxygen saturation and febrile illness. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 145, n. 4, p. 529-532, mai. 2009.

MARSDEN, P.A. et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 268, n. 23, p. 17478-88, ago. 1993.

MARTINEZ-SANCHEZ, P. et al. Update on ultrasound techniques for the diagnosis of cerebral ischemia. **Cerebrovascular Diseases**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 9-18, 2009.

MCCARVILLE, M.B. et al. Evaluation of a comprehensive transcranial doppler screening program for children with sickle cell anemia. **Pediatric Blood & Cancer**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 818-821, abr. 2008.

MILLER, S.T. et al. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 342, n. 2, p. 83-9, jan. 2000.

MODI, M. et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for ischemic stroke: an Indian scenario. **Neurology India**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 297-301, set. 2005.

MOPPETT, I.K.; MAHAJAN, R.P. Transcranial Doppler ultrasonography in anaesthesia and intensive care. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 93, n. 5, p. 710-724, jun. 2004.

MORRIS, C. R. Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, [S. l.], p. 177-185, 2008.

NOGUCHI, C.T.; SCHECHTER, A.N. Sickle hemoglobin polymerization in solution and in cells. **Annual Review Biophysics and Biophysical Chemistry**, [S. l.], v. 14, p. 239-263, jun. 1985.

OHENE-FREMPONG, K. et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood**, [S. l.], v. 91, n. 1, p. 288-294, jan. 1998.

OKUMURA, J.V.; LOBO, C.L.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 71-72, 2013.

OLIVEIRA C. C. Avaliação Neuromotora e Funcional de Pacientes em Doenças Falciforme e Acidente Vascular Encefálico. Campinas, SP. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 2007.

PERIN, C. et al. Anemia Falciforme. Porto Alegre, outubro de 2000. Disponível em: <<http://genetica.ufcspa.edu.br/seminarios%20textos/AnemiaFalciforme.pdf>> Acesso em: 13 maio 2012.

PEZZINI, A.; DEL ZOTTO, E.; PADOVANI, A. Homocysteine and cerebral ischemia: pathogenic and therapeutical implications. **Current Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 249-263, 2007.

PIEL, F.B. et al. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010-2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. **PloS Medicine**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. e1001484, 2013.

PLATT, O.S. et al. Hydroxyurea increases fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. **Transactions of the Association of American Physicians**, [S. l.], v. 97, p. 268-74, ago. 1984.

PLATT, O.S. et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 330, n. 23, p. 1639-1644, jun. 1994.

POWARS, D. et al. The natural history of stroke in sickle cell disease. **The American Journal of Medicine**, [S. l.], v. 65, n. 3 p. 461-71, set. 1978.

PRENGLER, M. et al. Sickle cell disease and electroencephalogram hyperventilation. **Annals of Neurology**, [S. l.], v. 59, n. 1, 214-5, jan. 2006.

QIAN, J.; FULTON, D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 4, n. 347, dez. 2013.

REES, D.C.; WILLIAMS, T.N.; GLADWIN, M.T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, [S. l.], v. 376, n. 9757, p. 2018-31, 2010.

RODRIGUES, D. O. et al. Genetic determinants and stroke in children with sickle cell disease. **The Journal of Pediatric**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 6, p. 602-8, nov. 2016.

ROGERS, Z.R. Priapism in sickle cell disease. **Hematology Oncology Clinics of North American**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 917-28, out. 2005.

RUSSELL, M.O. et al. Transfusion therapy for cerebrovascular abnormalities in sickle cell disease. **The Journal of Pediatric**, [S. l.], v. 88, n. 3, p. 382-387, mar. 1976.

SAWULA, W. et al. Homocysteine level and metabolism in ischemic stroke in the population of Northern Poland. **Clinical Biochemistry**, [S. l.], v. 42, n. 6, p. 442-447, abr. 2009.

SERJEANT, G. R. Mortality from sickle cell disease in Africa. **The BMJ**, [S. l.], v. 330, n. 7489, p. 432-433, fev. 2005.

SERJEANT, M.E. Serum thyrotropin levels and adrenotoxicosis. **Archives of Internal Medicine**, [S. l.], v. 152, n. 10, p. 2143-4, out. 1992.

SIEGEL, S. & CASTELLAN Jr, N.J. *Estatística Não. Paramétrica para as Ciências do Comportamento*. Artmed-. Bookman. São Paulo, 2006, reimpre 2008.

STEINBERG, M.H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **ScientificWorldJournal**, [S. l.], v. 9, p. 46-67, jan. 2009.

STEINBERG, M.H. Pathophysiology of sickle cell disease. **Baillière's Clinical Haematology**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 163-184, mar. 1998.

STEINBERG, M.H.; ADEWOYE, A.H. Modifier genes and sickle cell anemia. **Current Opinion Hematology**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 131-6, maio 2006.

STOCKMAN, J. A. et al. Occlusion of large cerebral vessels in sickle-cell anemia. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 287, n. 17, p. 846-9, out. 1972.

STUART, M.J.; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. **The Lancet**, [S. l.], v. 364, n. 9442, p. 1343-60, out. 2004.

SWITZER, J.A. et al. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. **The Lancet Neurology**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 501-512, jun. 2006.

VICHINSKY, E.P. et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 342, n. 25, p. 1855-65, jun. 2000.

WALSH, P. S.; METZGER, D.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10. pp 506-513.

WANG, W. et al. Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 275, n. 22, p. 16899-903, jun. 2000.

WANG, W.C. et al. Abnormalities of the central nervous system in very young children with sickle cell anemia. **Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 132, n. 6, p. 994-998, jun. 1998.

WANG, W.C. The pathophysiology, prevention, and treatment of stroke in sickle cell disease. **Current Opinion in Hematology**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 191-7, maio 2007.

WEATHERALL, D.J. The importance of micromapping the gene frequencies for the common inherited disorders of haemoglobin. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 149, n. 5, p. 635-637, jun. 2010.

WEATHERALL, M.W. et al. Phenotype/genotype relationships in sickle cell disease: a pilot twin study. **Clinical & Laboratory Haematology**, [S. I.], v. 27, n. 6, p. 384-390, dez. 2005.

YEO, L.L.; SHARMA, V.K. Role of transcranial Doppler ultrasonography in cerebrovascular disease. **Recent Patents on CNS Drug Discovery**, [S. I.], v. 5, n. 1, p. 1-13, jan. 2010.

YOONG, W.C.; TUCK, S.M. Menstrual pattern in women with sickle cell anaemia and its association with sickling crises. **Journal of Obstetrics Gynaecology**, [S. I.], v. 22, n. 4, p. 399-401, jul. 2002.