

SOBREVIDA E TAXA DE MORTALIDADE EM CRIANÇAS COM DOENÇA FALCIFORME: UM ESTUDO PROSPECTIVO

SURVIVAL AND MORTALITY RATE IN CHILDREN WITH SICKLE CELL DISEASE: A PROSPECTIVE STUDY

Autores

¹OKUMURA, Jéssika Viviani; ²TORRES, Lidiane de Souza; ³SILVA, Danilo Grunig Humberto da; ⁴BELINI-JÚNIOR, Edis; ³SALVARANI, Mariana; ³SYBUIA, Letícia Sayuri; ³CHAVES, Nayara Alves; ³NASCIMENTO, Patrícia Pereira do; ⁵LOBO, Clarisse Lopes de Castro; ³BONINI-DOMINGOS, Claudia Regina.

RESUMO

A Doença Falciforme (DF) é considerada um problema de saúde pública no Brasil e no mundo, pois a alteração genética que acomete as hemoglobinas (Hb) normais causa complicações clínicas variadas da doença. Crianças com Anemia Falciforme (AF), a forma mais grave da DF que apresenta a Hb S em homozigose, apresentam logo após a troca das cadeias globínicas (por volta do 6º ou 7º mês de idade) dores nos ossículos das mãos e pés (dactilite), sequestro esplênico, várias infecções das vias aéreas superiores, síndrome torácica aguda (STA) podendo evoluir para óbito precoce. O presente trabalho apresenta a sobrevivência e a taxa de mortalidade em uma população pediátrica com DF. Para isso, foi avaliado 59 crianças com DF, provenientes do HEMORIO com média de idade de 40,5±4,5 meses (cerca de quatro anos de idade). O estudo foi prospectivo com início no nascimento das crianças a partir de maio de 2012 e finalização em abril de 2016. Todas as crianças foram genotipadas para a DF por PCR-RFLP ou AE, e também foram genotipadas para os haplótipos da beta-S globina. O levantamento do óbito ocorreu por análise de prontuários e informação médica. Os dados foram analisados por meio da curva de *Kaplan-Meier*. A maioria das crianças (71,2%) apresentavam a AF, e as restantes, Hb SC e S/Beta-talassemia. Das 59 crianças, três evoluíram para óbito, sendo a taxa de mortalidade de 5%. Duas eram meninas uma com sete meses de idade (óbito por broncoaspiração) e outra com 15 meses (óbito por PNM e inflamação); e um menino com 10 meses de idade (óbito por causa desconhecida). As três crianças apresentavam AF e duas eram homozigotas para o haplótipo Bantu. Com a análise da curva de sobrevivência, pode-se observar que a taxa maior de óbito nas crianças foi em torno dos 15 meses de idade. Isso pode ser explicado em partes pela ontogenia das cadeias globínicas, sendo que a cadeia gama responsável pela produção de Hb Fetal, começa a ser substituída

¹Profa. Dra. do Centro Universitário de Jales (UNIJALES), Jales/SP

² Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas/SP

³ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências, letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE), São José do Rio Preto/SP

⁴ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Três Lagoas (UFMS/CPTL), Três Lagoas/MS

⁵ Instituto de Hematologia “Arthur de Siqueira Cavalcante” (HEMORIO), Rio de Janeiro/RJ

E-mail para contato: jessika_okumura@hotmail.com

Recebido: 05 de julho de 2018; Aceito: 14 de setembro de 2018



pela cadeia beta alterada que formará a Hb S causando complicações nas crianças. Outras causas podem ser fatores externos, que não foram investigados. A mortalidade do grupo de estudo foi semelhante a estudos de Minas Gerais, porém é muito elevada quando comparada com a mortalidade infantil do Brasil. Mesmo com o diagnóstico precoce permitido pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal e os avanços nos tratamentos, o índice de óbito em crianças com DF é alto. Faz-se necessário um melhor acompanhamento e mais estudos a cerca da epidemiologia e genética para entender a morte precoce nos pacientes pediátricos com DF.

Palavras-chave: Anemia Falciforme. Mortalidade infantil. Pacientes pediátricos.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is considered a public health problem in Brazil and in the world, because the genetic alteration that affects normal hemoglobins (Hb) causes different clinical complications of the disease. Children with sickle cell anemia (SCA), the most severe form of SCD presenting homozygous Hb S, present soon after the exchange of the globin chains (around the 6th or 7th month of age) pain in the ossicles of the hands and feet (dactylitis), splenic sequestration, various upper airways infections, acute thoracic syndrome (ATS) and may progress to early death. The present study presents the survival and the mortality rate in a pediatric population with SCD. For this, 59 children with SCD, from HEMORIO with an average age of 40.5 ± 4.5 months (about four years of age) were evaluated. The study was prospective with onset of children from May 2012 and finalization in April 2016. All children were genotyped for SCD by PCR-RFLP or specific allele, and were also genotyped for the beta-S globin haplotypes. The death survey was performed by analyzing medical records and medical information. Data were analyzed using the Kaplan-Meier curve. Most of the children (71.2%) had SCA, and the remaining ones had Hb SC and S/Beta thalassemia. Of the 59 children, three died, with a mortality rate of 5%. Two were girls one at 7 months of age (death from bronchoaspiration) and one at 15 months (death from PNM and inflammation); and a 10-month-old boy (death due to unknown cause). The three children had SCA and two were homozygous for the Bantu haplotype. With the analysis of the survival curve, it can be observed that the highest death rate in children was around 15 months of age. This can be explained in parts by ontogeny of the globin chains, and the gamma chain responsible for the production of fetal Hb, begins to be replaced by the altered beta chain that will form Hb S causing complications in children. Other causes may be external factors that have not been investigated. Mortality in the study group was similar to that in Minas Gerais, but it is very high when compared to infant mortality in Brazil. Even with the early diagnosis allowed by the National Neonatal Screening Program and advances in treatments, the death rate in children with DF is high. Further monitoring and further epidemiological and genetic studies are needed to understand early death in pediatric SCD patients.

Keywords: Sickle cell anemia. Child mortality. Pediatrics patients.

INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias hereditárias caracterizam o grupo de doenças monogênicas, mais comuns no mundo, que alteram a função das hemoglobinas (Hb) como resultado de



mutações, geralmente pontuais, nos genes que compõem a família beta e alfa globina. São divididas em dois principais grupos: as Hb variantes e as talassemias (FORGET; BUNN, 2013; WEATHERALL; CLEGG, 2001). As hemoglobinas variantes resultam em Hb com estrutura alterada, e com características bioquímicas diferentes. As variantes mais frequentes são a Hb S, Hb C e Hb D (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

A Doença falciforme (DF) é um termo utilizado para determinar o grupo de hemoglobinopatias caracterizadas pela presença da Hb S, seja em homozigose (Hb SS), denominada de anemia falciforme (AF), ou associada a outras alterações de hemoglobinas, formando heterozigotos compostos como Hb SC e Hb SD, e as formas interativas com talassemias como Hb S/ β^0 talassemia, Hb S/ β^+ talassemia dentre outros (MARCUS et al., 1997; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; SERJEANT, 2013). A AF é a forma clínica mais grave da DF (FRENETTE; ATWEH, 2007) e a mais comum em todo o mundo.

A diversidade clínica e a frequência elevada a coloca como um problema de saúde pública em vários países. A outra alteração genética que se assemelha em gravidade clínica com a Hb SS, é a herança de Hb S/ β^0 talassemia (SERJEANT, 2013), pois um gene β^0 não sintetiza cadeia beta, sendo expresso somente o gene β^S . As Hb SC e Hb SD conferem manifestações clínicas mais brandas, devido a produção de Hb C e Hb D as quais diminuem a polimerização da Hb S. Porém há relatos que descrevem pacientes com Hb SC e Hb SD semelhantes ou piores clinicamente quando comparados com Hb SS (SERJEANT, 2013; TORRES et al., 2014, 2016).

Dois processos fisiopatológicos decorrentes da polimerização da Hb S estão presentes na AF, sendo eles: a vaso-oclusão, com ciclos de isquemia e reperfusão, e a anemia hemolítica (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; STEINBERG, 2008). A fisiopatologia da AF desencadeia processos inflamatórios e, conseqüentemente, subfenótipos clínicos. Os episódios de dor aguda são os eventos clínicos de maior ocorrência nesses pacientes e a principal razão para a admissão hospitalar, seguida pela Síndrome Torácica Aguda (STA). Certas complicações são predominantes em diferentes estágios da vida. Por exemplo, nos dez primeiros anos, os mais comuns são: episódios de dor, iniciados com a síndrome mão-pé (dactilite), em consequência da inflamação da região do metacarpo e metatarso; STA e Acidente Vascular Encefálico (AVE). No entanto, não estão restritas a essa faixa etária, podendo ocorrer por toda a vida do indivíduo com AF (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; STEINBERG, 2008).



Por se tratar de uma alteração que ocorre no gene responsável por produzir a cadeia beta-globina, os primeiros sintomas em crianças com a presença da Hb S em homozigose ou em associação com outra Hb alterada, começam a aparecer após o sexto mês de vida, quando há a troca na expressão da cadeia gama pela beta, e conseqüentemente, a diminuição da hemoglobina fetal (Hb F) e aumento na produção da Hb alterada (Hb S)(SANKARAN; XU; ORKIN, 2010). Outra ocorrência genética que pode agravar a clínica das pessoas com DF, são os haplótipos da beta-S globina (haplótipos β^S). Os haplótipos β^S são fundamentados na análise de um conjunto de polimorfismos, localizados na família gênica da beta globina, no cromossomo 11, reconhecidos por endonucleases específicas (ORKIN et al., 1982). Cinco haplótipos têm sido associados a diferentes grupos étnicos, de acordo com a região de origem e predomínio geográfico: o haplótipo Benin à África Ocidental; o Bantu à África Oriental Centro-Sul; o Senegal à África Atlântico Ocidental; o Índia-Arábia Saudita (Saudi) à Índia e Península Arábica Oriental e, o Camarões, restrito à África, mais especificamente, ao grupo étnico Eton na Costa Ocidental Africana (NAGEL, 1984). A análise dos haplótipos β^S e a correlação com achados clínicos revelaram que os pacientes com haplótipo Senegal apresentam curso clínico mais brando, os com Benin têm clínica intermediária, e os Bantu, curso clínico mais grave (POWARS; HITI, 1993; POWARS, 1991).

Devido a necessidade de diminuir as complicações clínicas, a morbidade em crianças com DF e melhorar o diagnóstico e acompanhamento clínico, em 2001, o Ministério da Saúde incluiu no Programa Nacional de Triagem Neonatal, por meio da portaria nº 822/01 (Acesso em 04/07/2018 > http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2001/prt0822_06_06_2001.html), a pesquisa para as hemoglobinopatias em recém-nascidos de todo o país. Mesmo com esse avanço no diagnóstico e com novos tratamentos, a mortalidade infantil em crianças com DF é alta. Com isso, o presente trabalho apresenta a sobrevivência e a mortalidade de crianças com até quatro anos de idade que apresentam DF em um estudo prospectivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

Fazem parte do estudo 59 crianças, com média de idade de $40,5 \pm 4,5$ meses (mediana 41 meses, mínimo de 32 e máximo de 47 meses de idade), provenientes do Instituto Estadual de Hematologia “Arthur de Siqueira Cavalcanti”- HEMORIO, Rio de Janeiro-RJ. Essas crianças foram identificadas pelo Programa de Triagem Neonatal, como portadores de DF em



2012 e foram acompanhadas pelo grupo de pesquisadores até 2016, fazendo parte de um estudo prospectivo. Todos os pais ou responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), conforme normas da Resolução CNS 466/12. O termo de consentimento foi obtido pela médica pediatra que acompanha as crianças e/ou pesquisadora responsável pelo projeto, e somente após treinamento específico.

Amostra sanguínea

A amostra sanguínea foi coletada por punção venosa, sendo um total de 2 a 4 mL por criança. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), sediada na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas Campus de São José do Rio Preto para a realização da confirmação do genótipo da DF. A coleta de amostras foi realizada por profissionais da área específica, no Hospital do HEMORIO.

Genótipos da DF e haplótipos da beta-S globina

Todas as amostras passaram pela Cromatografia Líquida de Alta performance (HPLC) (Trinity Biotech) para a quantificação das frações globínicas e verificação da Hb alterada. Posterior a isso, foi extraído o DNA leucocitário (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi utilizada a PCR seguida de polimorfismo de restrição de fragmento único (RFLP) para o diagnóstico de Hb S (*HBB*:c.20A>T – rs334), Hb C (*HBB*:c.19G>A – rs33930165) e Hb D-Los Angeles (*HBB*:c.364G>C – rs33946267); e PCR alelo específico (AE) para o diagnóstico de beta-talassemia, sendo as mutações: CD 39 (*HBB*:c. 118C>T – rs11549407), IVSI-110 (*HBB*:c.93-21G>A – rs35004220), IVSI-6 (*HBB*:c.92+6T>C – rs35724775) e IVSI-1 (*HBB*:c.92+1G>A – rs33971440). A caracterização dos haplótipos da globina beta-S foi realizada por PCR-RFLP investigando seis sítios polimórficos sendo: 5' *HBG2* (*Xmn*I) *HBG2* (*Hind*III), *HBG1* (*Hind*III), *HBBP* (*Hinc*II), 3' *HBBP* (*Hinc*II) e 5' *HBB* (*Hinf*I) (SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989).

Levantamento dos dados clínicos

O levantamento clínico ocorreu de maio de 2012 a abril de 2016 e se baseou na investigação de cada consulta médica por meio da verificação dos prontuários, do banco de dados do HEMORIO (Sistema de Gestão para Hematologia - SASH), sob supervisão da



pediatra responsável. Por meio do levantamento clínico foi possível verificar o óbito nas crianças.

Análises estatísticas

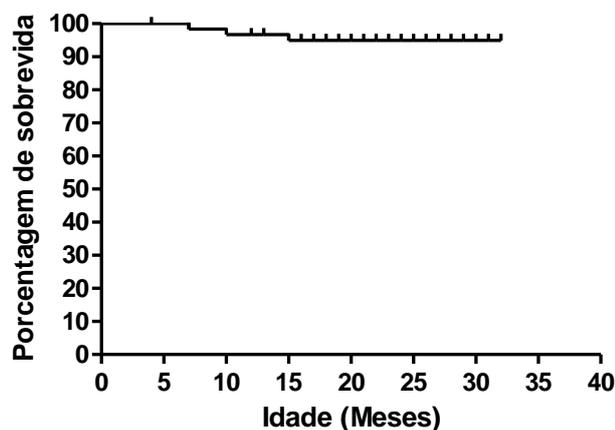
A análise de sobrevida foi realizada pelo teste de *Kaplan-Meier* no *software GraphPad Prism 5*. Esse teste é não paramétrico e permite a observação do tempo de sobrevivência de determinado grupo de estudo por meio da interpretação de sujeitos que não atingiram o evento (sobreviveram) e os que atingiram o evento (vieram à óbito).

RESULTADOS

Das 59 crianças com DF, 42 (71,2%) apresentam a Hb SS, 13 (22,0%) Hb SC, 4 (6,8%) a interação Hb S e Beta-talassemia, e não foi verificado nenhuma criança com a Hb SD. Durante o período de acompanhamento dos indivíduos crianças vieram a óbito, sendo duas meninas, uma com sete meses de idade (óbito por broncoaspiração) e outra com 15 meses (óbito por PNM e inflamação); e um menino com 10 meses de idade (óbito por causa desconhecida).

A ocorrência de óbito no grupo amostral foi de 5,0%, mostrando que a sobrevida destas crianças está na faixa de 95,0% (Figura 1). As três crianças apresentavam AF e duas eram homozigotas para o haplótipo Bantu. O perfil genotípico dessas crianças está apresentado na tabela 1. Analisando a curva de sobrevida, o risco de óbito nas crianças com DF é maior até os 15 meses de idade.

Figura 1. Análise de sobrevida de crianças com Doença Falciforme





Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1. Informações genotípicas das crianças que evoluíram para óbito

Criança	Gênero	Idade (meses)	DF	Haplótipo
1	F	7	SS	Bantu/Benin
2	M	10	SS	Bantu/Bantu
3	F	15	SS	Bantu/Bantu

F: feminino; M: masculino; DF: Doença Falciforme. Fonte: elaborado pelo autor.

DISCUSSÃO

Aproximadamente, 3.500 crianças nascem por ano no Brasil com AF, sendo que a taxa de nascidos vivos no Rio de Janeiro é de 1:1.200 (CANÇADO; JESUS, 2007). No presente estudo, três crianças vieram a óbito durante as investigações, sendo uma por broncoaspiração, uma por PNM e inflamação e uma por causa desconhecida. Devido ao número amostral reduzido, não foi possível verificar qual a principal causa de óbito no grupo de estudo, mas foi verificado que as complicações respiratórias e as infecções podem explicar pelo menos duas das mortes. Além disso, é interessante ressaltar que, mesmo a crianças realizando acompanhamento por uma equipe de saúde, ainda é comum atestados de óbitos concluindo óbitos por causa desconhecida. Isso porque, os familiares geralmente moram longe da clínica de referência, e quando percebem que a criança está muito mal, infelizmente essa perde a vida em casa.

As infecções em crianças com DF são as principais causas de morte no estado de Minas Gerais (FERNANDES; AVENDANHA; VIANA, 2016; SABARENSE et al., 2015), e no Rio de Janeiro, a principal causa de morte até os cinco anos de idade é por STA (LOBO et al., 2014). A ocorrência de óbito nesse grupo foi de 5% e de sobrevivida 95%. Um estudo com uma coorte de recém-nascidos de Dallas estimou que 95% das crianças com AF sobrevivem até a primeira década de vida (QUINN; ROGERS; BUCHANAN, 2004). No *clinical trials* de 2010 (QUINN et al., 2010) os autores acompanharam a mesma coorte de 2004 e verificaram a incidência de morte de 5.2%, sendo a causa mais comum a STA. Além disso, afirmaram que o risco de morte aumenta quando ocorre a mudança no tratamento pediátrico para o adulto.

Segundo o IBGE (levantamento realizado em 2016), a taxa de mortalidade infantil em no Brasil foi de 13,3 a cada 1000 nascidos vivos, cerca de 1,3% de óbitos. Esse número



diminui quando é avaliado as crianças abaixo de quatro anos de idade, sendo de 2,2 para cada 1000 nascidos vivos (cerca de 0,22%) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017). Com isso, pode-se observar que a ocorrência de óbito em crianças com DF até os quatro anos de idade é muito elevada quando comparado com a mortalidade infantil no Brasil, chegando a cerca de 22 vezes a mais.

Vários são os fatores que podem contribuir para uma melhora ou piora na sobrevida de crianças e adultos com DF, sendo fatores externos como os tratamentos, o estilo e cuidados com a vida, e fatores internos como a genética. É bem caracterizado que a pessoa com AF, que apresenta a homozigose para a Hb S, cursa uma vida com várias complicações decorrentes da fisiopatologia que essa Hb alterada causa nas hemácias, consequentemente na circulação sanguínea (FRENETTE; ATWEH, 2007). A maioria dos óbitos em crianças com DF são com o genótipo SS, como pode ser observado nos óbitos do grupo de estudo.

Desde a descoberta da DF em 1910 (HERRICK, 2001), a expectativa de vida desses pacientes vem aumentando. Na década de 80, com o início da penicilina profilática, a expectativa de vida era de aproximadamente 25 anos de idade. Na década de 90 a hidroxiureia (HU) foi aprovada para o uso no tratamento da DF e a expectativa de vida passou a ser de 35 anos. No final da década de 90, a terapia com transfusão sanguínea foi utilizada na prevenção de AVE, e a média de idade aumentou para 45 anos. No século 21, o transplante de células tronco foi um sucesso para a cura do indivíduo, e também iniciou os estudos com a terapia gênica (THEIN; IGBINEWEKA; THEIN, 2017). Adultos com DF com sete décadas de vida foram relatados em 1995 (STEINBERG et al., 1995) e alguns podem ser observados no banco de dados do nosso grupo de pesquisa (dados não apresentados). Devido a várias intervenções como diagnóstico precoce, educação dos pacientes e terapia moderna (MCKERRELL; COHEN; BILLET, 2004), muitos indivíduos com DF estão chegando a idade adulta e passando a ser idosos. Mesmo assim, faz-se necessário estudos nesses indivíduos para melhorar a gestão e encontrar terapias mais eficazes para esses pacientes (THEIN; IGBINEWEKA; THEIN, 2017).

CONCLUSÃO

A sobrevida de crianças com DF no estado do Rio de Janeiro é baixa até os 15 meses de idade, sendo a taxa de mortalidade de 5%. Mesmo com os avanços nos tratamentos e os acompanhamentos clínicos, muitas crianças falecem precocemente. A atenção aos pacientes



pediátricos com DF precisa ser redobrada a fim de diminuir esses índices e proporcionar uma vida melhor.

Agradecimentos

À equipe do HEMORIO por auxiliar na pesquisa. À FAPESP processo nº 2016/18449-2 e FAPERP processo nº 147/2014 pelo auxílio financeira à pesquisa; e ao CNPq pela bolsa de doutorado.

REFERÊNCIAS

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 204–206, 2007.

FERNANDES, A. P. P. C.; AVENDANHA, F. A.; VIANA, M. B. Hospitalizations of children with sickle-cell disease in the Brazilian Unified Health System in the state of Minas Gerais. **Jornal de Pediatria**, n. xx, 2016.

FORGET, B. G.; BUNN, H. F. Classification of the disorders of hemoglobin. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 2, p. 1–12, 2013.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease : old discoveries , new concepts , and future promise. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 850–58
doi:10.1172/JCI30920, 2007.

HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 74, n. 3, p. 179–184, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Tábua Completa de Mortalidade para o Brasil - 2016: Breve análise da evolução da mortalidade no Brasil** *ibge*. [s.l: s.n.]. Disponível em:
<ftp://ftp.ibge.gov.br/Tabuas_Completas_de_Mortalidade/Tabuas_Completas_de_Mortalidade_2016/tabua_de_mortalidade_2016_analise.pdf>.

LOBO, C. L. DE C. et al. Newborn screening program for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. **Pediatric blood & cancer**, v. 61, n. 1, p. 34–39, jan. 2014.

MARCUS, S. J. et al. Quantitative analysis of erythrocytes containing fetal hemoglobin (F cells) in children with sickle cell disease. **American journal of hematology**, v. 54, n. 1, p. 40–46, jan. 1997.

MCKERRELL, T. D. H.; COHEN, H. W.; BILLET, H. H. The older sickle cell patient. **American Journal of Hematology**, v. 76, n. 2, p. 101–106, 2004.



NAGEL, R. L. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. **Einstein Quarterly Journal of Biology and Medicine**, v. 2, p. 53–62, 1984.

ORKIN, S. H. et al. Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. **Nature**, v. 296, p. 627–631, 1982.

POWARS, D.; HITI, A. Sickle cell anemia. Beta s gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. **American Journal of Diseases of Children**, v. 147, n. 11, p. 1197–1202, nov. 1993.

POWARS, D. R. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 5, n. 3, p. 475–493, jun. 1991.

QUINN, C. T. et al. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. **Blood Journal**, v. 115, n. 17, p. 3447–3452, 2010.

QUINN, C. T.; ROGERS, Z. R.; BUCHANAN, G. R. Survival of children with sickle cell disease. **Blood**, v. 103, n. 11, p. 4023–4027, 2004.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, p. 2018–2031, 2010.

SABARENSE, A. P. et al. Characterization of mortality in children with sickle cell disease diagnosed through the Newborn Screening Program. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 3, p. 242–247, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Disponível em: <<http://www.molecularcloning.com/>>. Acesso em: 4 mar. 2015.

SANKARAN, V. G.; XU, J.; ORKIN, S. H. Advances in the Understanding of haemoglobin switching. **British Journal of Haematology**, v. 149, n. 2, p. 181–194, 2010.

SERJEANT, G. R. The Natural History of Sickle Cell Disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, p. 1–12, 2013.

STEINBERG, M. H. et al. Sickle cell anemia in septuagenarians. **Blood**, v. 86, n. 10, p. 3997–3998, 1995.

STEINBERG, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **TheScientificWorldJournal**, v. 8, p. 1295–1324, 2008.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R. L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. **American Journal of Hematology**, v. 32, n. 1, p. 66–69, set. 1989.

THEIN, M. S.; IGBINWEKA, N. E.; THEIN, S. L. Sickle cell disease in the older adult. **Pathology**, v. 49, n. January, p. 1–9, 2017.



TORRES, L. DE S. et al. Hemoglobin D-Punjab: Origin, distribution and laboratory diagnosis. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 37, n. 2, p. 120–126, 2014.

TORRES, L. S. et al. Phenotypic Diversity of Sickle Cell Disease in Patients with a Double Heterozygosity for Hb S and Hb D-Punjab. **Hemoglobin**, v. 40, n. 5, p. 356–358, 2016.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 704–712, 2001.