

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Ambientais e Saúde

AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA EM UMA POPULAÇÃO COM ANEMIA MICROCÍTICA E HIPOCRÔMICA.

MAURO MEIRA DE MESQUITA

Goiânia – Goiás
Dezembro de 2006

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Ambientais e Saúde

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA EM
UMA POPULAÇÃO COM ANEMIA MICROCÍTICA E
HIPOCRÔMICA.**

MAURO MEIRA DE MESQUITA

ORIENTADOR: PROF. DR. DAVID BARQUETI JENDIROBA

CO-ORIENTADOR: PROF. MS. PAULO ROBERTO DE MELO REIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais & Saúde, da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais & Saúde.

Goiânia – Goiás

Dezembro de 2006

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof.Dr. David Barqueti Jendiroba, pela paciência, dedicação e orientação sábia.

Ao colega e sempre amigo Prof. Ms. Paulo Roberto de Melo Reis, co-orientador deste trabalho e Diretor do Departamento de Biomedicina (CBB-UCG) pela amizade, apoio e participação conjunta.

À colega e amiga Prof^a. Ms. Karlla Greick Batista Dias Penna, pela colaboração, incentivo e grande apoio.

Ao Psi. Claudio Braz da Silva e aos acadêmicos de Biomedicina Guilherme Alves Mesquita e João Paulo dos Santos Oliveira, pelo trabalho em equipe, pela dedicação, e pelo apoio constante.

A todos os alunos que participaram desse trabalho, tanto pelo envolvimento direto quanto indireto.

Aos colegas e funcionários do Laboratório da Área de Saúde (LAS-CBB).

Aos colegas e funcionários do Laboratório da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia

E, a Deus, pela força, inspiração e pela perseverança para conseguir realizar esse trabalho.

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais,

Braulino Mequita de Lima e Maria Francisca de Mesquita (*in memoriam*)

Aos meus irmãos,

Francisco, José Antônio, Donizete, Dalila, Rita, Tereza, Claret e Carlos Rogério.

A minha esposa,

Jullyene, pelo incentivo, pela dedicação, pela abdicação e pelo amor.

Aos meus filhos,

Mauro Junior e Brunno.

Presentes de Deus e frutos de um amor verdadeiro.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Sumário

AGRADECIMENTOS	iii
DEDICATÓRIA.....	iv
LISTA DE GRÁFICOS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Anemia	1
1.2 Hemoglobina	4
2 OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo Geral	8
2.2 Objetivos Específicos	8
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1 Materiais.....	9
3.1.1 <i>Crterios para incluso dos participantes no trabalho</i>	9
3.1.2 <i>Identificao do participante</i>	9
3.1.3 <i>Coleta do Material</i>	10
3.2 Mtodos.....	10
3.2.1 <i>Eritrograma</i>	11
3.2.3 <i>Teste de falcizao com soluo de metabissulfito de sdio a 2%</i>	13
3.2.5 <i>Eletroforese de hemoglobina</i>	15
3.2.5.1 <i>Eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino</i>	15
3.2.5.2 <i>Eletroforese em agar, pH cido</i>	17
3.2.7 <i>Cromatografia lquida de alta performance (HPLC)</i>	20
4 RESULTADOS	23
4.1 Perfil Hematolgico das Talassemias.....	26
4.1.1 <i>Talassemia alfa</i>	26
4.1.2 <i>Talassemia beta</i>	31

4.2 – Perfil Hematológico das Hemoglobinas Variantes.....	35
4.2.1 – <i>Hemoglobina S</i>	35
4.2.2 – <i>Hemoglobina C</i>	38
4.2.3 – <i>Interação talassemia alfa/Hb AS, Perfil Hb ASH</i>	40
5. DISCUSSÃO	41
5.1 Prevalência das Hemoglobinas Variantes e Talassemias	41
5.2 Importância social e epidemiológica.....	46
6. REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS	53
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	54
ANEXO B - Consentimento da participação da Pessoa como Sujeito	55
ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisas que Envolvam Crianças e Dependentes	56
ANEXO D - Consentimento da participação da Criança como Sujeito	57
ANEXO E - Ficha cadastral de Participantes da Pesquisa.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição do Perfil Hemoglobínico das 201 Amostras Analisadas	23
Gráfico 2 - Distribuição das hemoglobinas normais e anormais por sexo	25
Gráfico 3 - Comparação de talassemia alfa com microcitose e hipocromia	28
Gráfico 4 - Distribuição das frações hemoglobinas em pacientes com talassemia alfa.....	29
Gráfico 5 - Distribuição por idade dos indivíduos com talassemia alfa.....	30
Gráfico 6 - Distribuição por sexo dos indivíduos com talassemia alfa.....	30
Gráfico 7 - Comparação de talassemia beta com microcitose e hipocromia.....	32
Gráfico 8 - Distribuição percentual das frações hemoglobinas em indivíduos com talassemia beta	33
Gráfico 9 - Distribuição por idade dos indivíduos com talassemia beta	34
Gráfico 10 - Distribuição por sexo dos indivíduos com talassemia beta.....	34
Gráfico 11 - Distribuição percentual das frações hemoglobínicas em indivíduos com hemoglobinopatia S.....	36
Gráfico 12 - Distribuição dos indivíduos com Hb S por sexo e idade	37
Gráfico 13 - Distribuição dos indivíduos com Hb C por concentração das frações hemoglobínicas	39
Gráfico 14 - Distribuição dos indivíduos com Hb C por idade	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Teste de resistência globular a salina 0,36%.....	12
Figura 2 - Teste de falcização.	13
Figura 3 - Agregados de hemoglobina H.....	15
Figura 4 - Traçado eletroforético em pH alcalino das principais hemoglobinas variantes.....	16
Figura 5 - Eletroforese de hemoglobina pH=8,6.....	17
Figura 6 - Eletroforese em ágar-fosfato.....	18
Figura 7 - Hemoglobina H, eletroforese em pH=7,0. Após 8 minutos de corrida.	19
Figura 8 - Cromatograma.	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores referenciais para o eritrograma e índices hematimétricos de adultos.....	2
Tabela 2 - Distribuição dos resultados por faixa etária e sexo de acordo com o perfil hemoglobínico	24
Tabela 3 - Dados do eritrograma, índices hematimétricos e valores percentuais das frações hemoglobínicas nos indivíduos com talassemia alfa.	27
Tabela 4 - Dados do eritrograma, índices hematimétricos e valores percentuais das frações hemoglobínicas nos indivíduos com beta talassemia.	31
Tabela 5 - Dados do eritrograma, índices hematimétricos e valores percentuais das frações hemoglobínicas em indivíduos heterozigotos para Hb S.	35
Tabela 6 - Dados do eritrograma, índices hematimétricos e valores percentuais das frações hemoglobínicas em indivíduos heterozigotos para Hb C.	38
Tabela 7 - Dados do eritrograma, índices hematimétricos e valores percentuais das frações hemoglobínicas em indivíduo com associação de alfa talassemia e heterozigoto para HbS.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA : Perfil eletroforético AA - normal

AC : Perfil eletroforético AC - heterozigoto para hemoglobinopatia C

AH : Perfil eletroforético AH - alfa talassemia mínima

AS : Perfil eletroforético AS - heterozigoto para anemia falciforme

ASH : Perfil eletroforético ASH - heterozigoto para anemia falciforme com associação talassemia alfa

Asn : Asparagina

CBB : Departamento de Biomedicina

CC : Perfil eletroforético CC - homozigoto para hemoglobinopatia C

CHCM : Concentração da Hemoglobina Celular Média

D.O. : Densidade Óptica

dL : Decilitro

DP: Desvio Padrão

EDTA : Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

fL : Fentolitro

g : Grama

Gln : Glutamina

Glu : Ácido Glutâmico

H₂O : Água

Hb : Hemoglobina

Hb A : Hemoglobina A

Hb A₂ : Hemoglobina A₂

Hb C : Hemoglobina C

Hb D : Hemoglobina D

Hb E : Hemoglobina E

Hb F : Hemoglobina F

Hb H : Hemoglobina H

Hb S : Hemoglobina S

HCM : Hemoglobina Celular Média

Hm : Hemácias

HPLC : Cromatografia Líquida de Alta Performance

Ht : Hematócrito

L : Litro

LAS : Laboratório da Área de Saúde

LEPAH : Laboratório de Estudo e Pesquisa de Anemias Hereditárias

Lis : Lisina

Na₂ HPO₄ : Fosfato Dissódico

Na₂ HPO₄.H₂O : Fosfato Dissódico Hidratado

Na₂ S₂O₅ : Metabissulfito de Sódio

NaCl : Cloreto de Sódio

nm : Nanômetro

pg : Picograma

Qsp : Quantidade suficiente para

RDW : Red Cell Distribution – índice de anisocitose

SC : Perfil eletroforético SC - duplo heterozigoto para hemoglobinopatias S e C

SS : Perfil eletroforético SS – homozigoto para anemia falciforme

TEB : Tris, EDTA, Borato

Tris : Hidroximetil-aminometano

UCG : Universidade Católica de Goiás

Val : Valina

VCM : Volume Celular Médio

VR : Valor de Referência

WHO : World Health Organization – Organização Mundial de Saúde

α : Alfa

β : Beta

RESUMO

As anemias hereditárias são as mais comuns das doenças determinadas geneticamente e são freqüentes na população brasileira (WHO, 1982). A razão para isso se deve ao processo de miscigenação ocorrido desde o início do povoamento e colonização do Brasil, e conseqüentemente da dispersão dos genes anormais que determinam doenças como as hemoglobinopatias (Naoum, 1997b).

A talassemia alfa é uma doença hereditária resultante da síntese deficiente de cadeias alfa, provocando um excesso relativo de cadeias beta, que formam tetrâmeros identificados como hemoglobina H (Bonini-Domingos *et al*, 2003). Apesar das formas graves das talassemias serem diagnosticadas facilmente, as formas com pequena deleção gênica podem ser interpretadas e tratadas como anemia ferropriva. As talassemias não respondem ao tratamento medicamentoso por sua etiologia ser de origem genética (Cunningham & Rising, 1977).

Por meio de resultados de testes laboratoriais obtidos, avaliamos indivíduos que apresentaram hematimetria compatível com anemia microcítica e hipocrômica, no intuito de demonstrar que esta situação pode ter variadas causas. Foram avaliadas 201 amostras de pacientes entre 1 e 65 anos, sendo 141 do sexo feminino e 60 do sexo masculino. Os testes laboratoriais aplicados foram: eletroforese de hemoglobina ácida e alcalina; teste de resistência osmótica à solução salina 0,36%; pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H; teste de falcização das hemácias e cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Os resultados mostraram que 145 indivíduos (72%), apresentaram perfil hemoglobínico normal, enquanto 56 indivíduos (27,9%) apresentaram algum tipo de hemoglobina anormal. Destes, 27 indivíduos (13,4%) são compatíveis com talassemia alfa, 9 (4,5%) com talassemia beta, 13 (6,5%) positivos para traço falciforme, 6 pacientes (3%) com descrição de hemoglobinopatia C e apenas 1 apresentou interação entre talassemia alfa e heterozigose para falcemia.

As hemoglobinopatias são alterações genéticas com ampla distribuição mundial, e a Organização Mundial de Saúde, desde 1982, alerta para a mobilização dos setores de saúde na detecção de formas mais graves dos indivíduos com anemia hereditária. Também é recomendado o levantamento populacional da prevalência das hemoglobinopatias para identificar portadores, na intenção de esclarecer e conscientizá-los (WHO, 1982). O resultado destas ações implica na melhoria da qualidade de vida dos afetados e também lhes dá subsídios para decidir a respeito de sua prole, evitando problemas de saúde a seus descendentes. (Naoum, 1987b).

Com isso fica evidente que as anemias hereditárias são um problema para a saúde pública, e o aconselhamento genético desta população deve ser feito de maneira responsável e por pessoas preparadas, para que o efeito destes trabalhos traga melhoria na vida dos portadores e de suas famílias.

ABSTRACT

Among genetically determined diseases, hereditary anemias are the most common, and are frequent among the Brazilian population (WHO, 1982). This is because of the mixing of races that occurred since the beginning of the Brazilian set up, disseminating genes that determine hemoglobin disorders (Naoum, 1997b). Alpha-thalassemia is a hereditary disease due to the deficient synthesis of the alpha chains, causing an excess of beta chains, which then form tetramers known as hemoglobin H (Bonini-Domingos et al, 2003). Major thalassemias can be ruled out easily, however minor thalassemias can be easily confused with anemia due to iron deficiency. Minor thalassemias do not respond to iron supplements because their cause is genetic (Cunningham & Rising, 1977).

We have evaluated individuals with hypochromic microcytic anemia by using specific lab tests, in order to identify the possible hemoglobin disorders associated. We have evaluated 201 samples from 141 female and 60 male individuals, ranging from 1 to 65 years of age. We have applied the following lab tests: acid and alkaline hemoglobin electrophoresis, serum protein electrophoresis, osmotic resistance test to 0,36% saline, detection of hemoglobin H, sickling cell test and High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Our results showed that 145 individuals (72%) had normal hemoglobin profile, while 56 individuals (27,9%) showed some hemoglobin abnormality. Twenty-seven out of 56 individuals (13,4%) showed alpha-thalassemia, 9 (4,5%) showed beta-thalassemia, 13 (6,6%) had sickle cell trait, 6 (3%) had hemoglobin C and only 1 had mixed features combining alpha-thalassemia and sickle cell trait.

Hemoglobin diseases are of genetic causes and are universally distributed, and the World Health Organization (WHO), since 1982, is calling the attention so that the detection of the major forms of these diseases are diagnosed and treated. It is also recommended a demographic survey in order to determine the prevalence of hemoglobin disorders to identify sick individuals, as well as is to illustrate them about their problem (WHO, 1982). The results of these actions implicate in better quality of life and also provide enough knowledge so that individuals harboring hemoglobin disorders may plan their lives and avoid transmitting their phenotypes to their descendants (Naoum, 1987b).

Therefore it becomes clear that hereditary anemias are a problem to public health and the genetic counseling must be done responsibly and by trained professionals to ensure that the final goal of a better quality of life to the patients and their relatives will be achieved.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anemia

A anemia é a redução da taxa de hemoglobina nos eritrócitos a níveis abaixo dos valores fisiológicos. Como conseqüência, há uma diminuição da capacidade de oxigenação dos tecidos do organismo, promovendo alterações na homeostase do indivíduo, levando a disfunções orgânicas generalizadas (Bernard *et al.*, 2000).

As causas de anemias são numerosas, sendo a por deficiência de ferro, a mais freqüente na população brasileira. Neste caso, o tratamento consiste na correção da dieta, juntamente com o uso de medicamentos, que contenham suporte vitamínico e ferro (Silva & Hashimoto, 1999).

Entretanto, pode haver alterações do conteúdo hemoglobínico por diminuição da síntese de uma das cadeias da globina, ou por alterações na sua estrutura, conhecidas por talassemias e hemoglobinas variantes, respectivamente. Essas alterações são provenientes de um defeito genético, e podem levar a alterações de gravidade variada (Silva & Hashimoto, 1999).

Apesar das formas graves das talassemias serem diagnosticadas facilmente, formas mais leves podem ser interpretadas e tratadas como anemia ferropriva. As talassemias não respondem ao tratamento medicamentoso devido sua etiologia ser de origem genética (Cunningham & Rising, 1977; Pearson *et. Al.*, 1973).

A classificação morfológica das anemias é baseada nos valores dos índices hematimétricos e na variação de tamanho (anisocitose) e cor (anisocromia) dos eritrócitos. Em 1929 Wintrobe descreveu os índices hematimétricos com a finalidade de calcular e permitir uma interpretação útil das anemias. Assim, foram determinados os

seguintes índices: Volume Celular Médio – (VCM), Hemoglobina Celular Média – (HCM) e Concentração da Hemoglobina Celular Média – (CHCM).

a) VCM.

Esse parâmetro é calculado através da razão entre o hematócrito (Ht) e o número de hemácias (Hm). $VCM = \{Ht (\%) / HM (10^{12}L)\} \times 10$. O resultado é expresso em fentolitros (fL; equivalente a 10^{-15} L).

b) HCM

Índice calculado a partir da razão de hemoglobina (Hb), em relação à quantidade de hemácias. $HCM = \{Hb (g/dL) / Hm(10^{12}L)\} \times 10$. O resultado é expresso em picogramas (pg; equivalente a 10^{-12} g).

c) CHCM

Esse índice é calculado a partir da razão de hemoglobina contida num determinado volume de sangue. $CHCM = \{Hb (g/dL) / Ht (\%)\} \times 10$, e é expresso em gramas de hemoglobina por decilitro de glóbulos vermelhos (g/dl ou %) (Silva & Hashimoto, 1999; Lee *et al.*, 1997; Kjeldsberg, 1998).

Com estes dados, é possível definir os valores hematimétricos que orientarão cada parâmetro dentro da referência. A tabela 1 mostra esses valores.

Tabela 1 - Valores referenciais para o eritograma e índices hematimétricos de adultos

	Mulheres	Homens
Hemácias Milhões / L	4,0 – 5,5	4,3 – 5,9
Hematócrito %	36 – 46	39 – 52
Hemoglobina g/dL	11,5 – 16,0	12,8 – 17,0
VCM fL	82 – 92	82 – 92
HCM pg	28 – 32	28 – 32
CHCM g/dL	32 – 36	32 – 36
RDW %	12 – 14,5	12 – 14,5

Fonte: Failace, 1995.

Assim, o VCM é o índice que avalia o tamanho dos eritrócitos, sendo que os valores que estão abaixo de 82 fL caracterizam microcitose. Da mesma forma valores entre 82 fL a 92 fL indicam normocitose, e valores superiores a 92 fL macrocitose. O HCM e CHCM avaliam o conteúdo hemoglobínico dos eritrócitos, dentre os quais, o mais importante é o HCM, quando está abaixo de 28 pg, temos hipocromia, valores entre 28 pg e 32 pg, normocromia, e valores maiores que 32 pg, hipercromia relativa. Já o CHCM é um valor relativo e mede a concentração da hemoglobina celular média e pode não ser correlacionado com a intensidade da hipocromia (Lorenzi, 1999; Lee *et al.*, 1997).

Morfologicamente, as talassemias são classificadas como anemias microcíticas e hipocrômicas. Os valores dos índices hematimétricos dessas anomalias, principalmente o VCM e HCM, apresentam-se diminuídos. Considera-se também o *red cell distribution width* (RDW), ou seja, o índice de anisocitose, que é definido como sendo a variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos (Silva & Hashimoto, 1999). Esse índice se deve a evolução tecnológica ocorrida nas metodologias laboratoriais para a quantificação da variação das medidas das hemácias (Naoum, 1997).

O índice de anisocitose (RDW) é um parâmetro útil na diferenciação das anemias microcíticas e hipocrômicas. Neste aspecto, nas anemias ferropriva o RDW é alto enquanto que nas talassemias é baixo. No primeiro caso, o RDW indica heterogeneidade dos eritrócitos, enquanto no segundo homogeneidade da população eritrocitária (Failace, 1995; Melo *et al.*, 2002; Melo-Reis, 2006).

As talassemias, principalmente alfa e beta, estão distribuídas em quase todo o globo terrestre. A freqüência de talassemia beta é maior na Europa, em especial na Itália, e é causa de anemia microcítica e hipocrômica. Um detalhe relevante é que essa

anemia só é menor que a frequência da anemia ferropriva. Em outras partes do mundo, Ásia e África, é alta a prevalência de talassemia alfa e hemoglobinas variantes (S e C) (Bonini-Domingos, 2003; Naoum, 1999).

1.2 Hemoglobina

A hemoglobina é a proteína responsável pelo transporte dos gases sanguíneos por todo o organismo e está contida no interior dos eritrócitos. Para que a hemoglobina possa desempenhar sua função, são necessários cerca de 300 milhões de moléculas por eritrócitos (Silva & Hashimoto, 1999; Bernard *et al.*, 2000).

A hemoglobina é formada por quatro subunidades, composta de dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas, conhecidas por cadeias alfa e beta. As informações para a síntese dessa proteína estão contidas nos genes dos cromossomos 16 e 11, respectivamente. No adulto, os genes do cromossomo 11 são responsáveis pela síntese das cadeias beta, delta e gama. Já os genes do cromossomo 16 são responsáveis pela síntese das cadeias alfa, que possuem uma seqüência de 141 aminoácidos, enquanto que as cadeias beta possuem 146. As combinações entre as diversas cadeias de proteínas dão origem às diferentes hemoglobinas presentes nos eritrócitos. (Naoum, 1982a; Dacie & Lemis, 1995; Bernard *et al.*, 2000).

A produção das cadeias alfa e beta requer um rígido controle genético, de forma que a quantidade de cadeias alfa produzida é igual às de cadeias beta (Naoum & Naoum, 2004; Silva & Hashimoto, 1999).

A partir do sexto mês após o nascimento são encontradas normalmente as hemoglobinas: **A** formada por duas cadeias alfa e duas beta (95% a 98 %), **A₂** formada

por duas cadeias alfa e duas delta (2,0% a 4,0 %) e a **F** (fetal) formada por duas cadeias alfa e duas gama (até 1,0 %) (Naoum & Naoum, 2004).

As hemoglobinas diferentes das três acima citadas, causam as hemoglobinopatias e são constituídas por hemoglobinas variantes e talassemias. Nas primeiras, ocorre troca de aminoácidos na seqüência das cadeias globínicas da hemoglobina; nas segundas, há alteração quantitativa das cadeias alfa ou beta de globinas, que são sintetizadas em quantidade inferior às da hemácia normal.

As hemoglobinopatias são designações destinadas às hemoglobinas variantes e talassemias que causam hemólise, policitemia, cianose, anemia ou falcização. São exemplos de hemoglobinopatias: anemia falciforme, hemoglobinopatias C, D, E e associações entre hemoglobinas S e C (Bertholo & Moreira, 2006; Lorenzi, 1999).

A primeira observação sobre a natureza da alteração molecular da hemoglobina falcêmica (Hb S) foi obtida por Linnus Pauling e colaboradores, que em 1949, usaram eletroforese para comparar Hb S com a hemoglobina de adulto normal (Hb A). Em 1956, Vernon Ingram estabeleceu uma nova técnica para a detecção de substituição de aminoácidos em proteínas, e esta análise indicou que este peptídeo na Hb S diferia daquele da Hb A por um único aminoácido (Naoum, 1997).

Segundo Naoum (1997a) as hemoglobinas variantes mais freqüentes no mundo são S e C. Na anemia falciforme há mutação no sexto aminoácido da cadeia beta, onde a base nitrogenada timina (**T**) é substituída por adenina (**A**), ocasionando a substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina. Esta substituição altera a carga elétrica da hemoglobina, além de alterar a morfologia dos eritrócitos quando em baixas tensões de oxigênio. Já na hemoglobinopatia C há mutação também no sexto códon da cadeia beta, onde a base nitrogenada guanina(**G**) é substituída por adenina (**A**), com isso o

ácido glutâmico é substituído pela lisina (Globin Gene Server; Neto & Pitombeira, 2003).

As talassemias constituem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias caracterizadas pela deficiência total ou parcial da síntese de globina. As talassemias são classificadas de acordo com a globina afetada. Quando a expressão afetada é a globina de cadeias do tipo alfa, têm-se as talassemias alfa, quando ocorre nas cadeias do tipo beta, têm-se as talassemias beta (Naoum, 1983; Silva & Hashimoto 1999).

Na talassemia alfa há uma mutação nos genes da globina alfa no cromossomo 16, afetando parcial ou totalmente a síntese de cadeias alfa, resultando em carência de cadeias alfa e excesso de cadeias beta. As cadeias alfa são importantes na estabilidade da molécula de hemoglobina, sendo sua deficiência responsável pela produção diminuída de hemoglobinas fisiológicas resultando no aparecimento de tetrâmeros de cadeias beta (Hb H). Os tetrâmeros de cadeias beta possuem instabilidade molecular, tornando-se metaemoglobina, esta tem a capacidade de combinar-se com o oxigênio de maneira irreversível, impedindo sua função fisiológica (Castilho *et al.*, 1987; Ribeiro & Araújo, 1992; Naoum & Domingos, 1997b).

As talassemias beta são mais heterogêneas do que as do tipo alfa, caracterizam-se pela mutação nos genes da globina β no cromossomo 11, afetando a expressão e regulação dos genes, que alteram quantitativamente a síntese de globinas beta. A consequência disso é uma produção anormal de globinas tipo alfa, que se acumulam nas hemácias, causando agregação e precipitação durante a eritropoiese. Os precipitados danificam a membrana e destroem prematuramente as hemácias, provocando anemia (Naoum 1999; Papassotiriou *et al.*, 1998; Silva & Hashimoto, 1999).

As anemias hereditárias são causas comuns de morbidade e de mortalidade na população e são consideradas um problema de saúde pública (WHO Working Group 1982; Silva & Ramalho 1997).

Com o advento das técnicas de Biologia Molecular, o número de hemoglobinas variantes descritas na literatura tem aumentado significativamente. Até o momento, mais de novecentos já foram catalogados no Hemoglobin Variant Database desenvolvida na World Wide Web. Entretanto, 12% a 15% da população humana é portadora assintomática de uma ou mais formas de anemias hereditárias, notadamente as falcemias e talassemias (Chinelato-Fernandes & Bonini-Domingos, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho é determinar a prevalência de hemoglobinopatias (talassemias e hemoglobinas variantes) em pacientes com anemia microcítica e hipocrômica.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Determinar a prevalência de talassemias em pacientes com anemia microcítica e hipocrômica.

2.2.2 Evidenciar a importância do diagnóstico precoce para a saúde do portador com anemia hereditária.

2.2.3 Correlacionar as hemoglobinopatias com faixa etária e sexo.

2.2.4 Orientar, informar e esclarecer os portadores a respeito da condição da alteração da hemoglobina.

2.2.5 Encaminhar os afetados aos profissionais especializados para ações preventivas de aconselhamento genético.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 *Critérios para inclusão dos participantes no trabalho*

- a) Ser portador de anemia microcítica e hipocrômica.
- b) Não ter feito parte de outra pesquisa dessa natureza.
- c) Não ter sido diagnosticado previamente.

O presente trabalho foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia (protocolo N° 120536). A participação no estudo foi voluntária e teve consentimento livre e esclarecido por escrito do paciente, conforme termo de consentimento em anexo.

3.1.2 *Identificação do participante*

A identificação do participante foi realizada mediante a obtenção dos seguintes dados: nome completo, data de nascimento, idade, sexo, naturalidade, endereço completo, telefone, filiação e uso de medicamento. Além dessa identificação, todos os participantes receberam número de registro de acordo com a numeração de rotina do Laboratório da Área de Saúde do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás (ficha de cadastro, modelo n° 1 em anexo).

As informações coletadas dos indivíduos bem como os dados obtidos das amostras destes foram mantidas sob sigilo.

3.1.3 Coleta do Material

No período de maio de 2005 a agosto de 2006, 3663 pacientes compareceram ao LAS para realização do exame hemograma, (entre outros). Destes, 1084 consentiram em participar deste trabalho, das quais, 413 amostras apresentaram anemia microcítica e hipocrômica, sendo que apenas 201 (das 413) amostras proporcionaram dados completos, obedecendo aos padrões de inclusão da pesquisa. Portanto 883, dos pacientes que deram consentimento, foram rejeitadas por não se enquadrarem nestes critérios.

O sangue total foi obtido por punção venosa do paciente e coletado diretamente em tubo a vácuo contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) a 10 g/dl, distribuído pela Doles Reagentes, Goiânia, Goiás. Cada amostra foi identificada de acordo com a ficha cadastral modelo 1.

3.2 Métodos

As amostras de sangue foram submetidas inicialmente aos seguintes procedimentos: eritrograma, teste de resistência osmótica à solução salina 0,36%, eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose em pH alcalino. A partir desses resultados foram realizados outros ensaios para exclusão ou mesmo identificação da hemoglobina em estudo. Os itens 3.2.1 até 3.2.7 explicam cada um dos procedimentos laboratoriais utilizados para a triagem e confirmação. Os procedimentos laboratoriais descritos abaixo estão de acordo com as indicações de Naoum (1997) para a identificação das hemoglobinas normais e anormais.

Todas as amostras foram analisadas e estudadas no Laboratório de Estudo e Pesquisa de Anemias Hereditárias – Prof. Paulo César Naoum – LEPAH-CBB-UCG, no período de agosto de 2005 a março de 2006.

3.2.1 Eritrograma

Realizado em aparelho automatizado Pentra-Roche®,(Rio de Janeiro, RJ). Neste exame, foram determinados: o número de hemácias, dosagem de hemoglobina, valor do hematócrito e o índice de anisocitose (RDW). Foram calculados os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina celular média (HCM) e concentração da hemoglobina celular média (CHCM). Os resultados da hematimetria associados à análise da morfologia eritrocitária são importantes para compor as informações técnicas necessárias para se chegar ao diagnóstico laboratorial das anemias microcíticas e hipocrômicas (Naoum, 1997).

3.2.2 Teste de resistência osmótica a salina 0,36% (Silvestroni & Bianco, 1975)

Técnica utilizada para detectar talassemias do tipo beta principalmente na forma heterozigota, pois nesses casos os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise nesta solução. A resistência globular não é específica para talassemia beta heterozigota, já que resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e outras hemoglobinopatias, como nos heterozigotos para hemoglobina C. No entanto cerca de 97% dos portadores de talassemia beta heterozigótica apresentam positividade para esse teste.

Reagentes:

Solução estoque – NaCl a 10% - pH 7,4

NaCl	9,0 g
Na ₂ HPO ₄	1,36g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,28g
Água destilada q.s.p	100ml

Solução de trabalho:

NaCl 10%	36 ml
Água destilada q.s.p	100ml

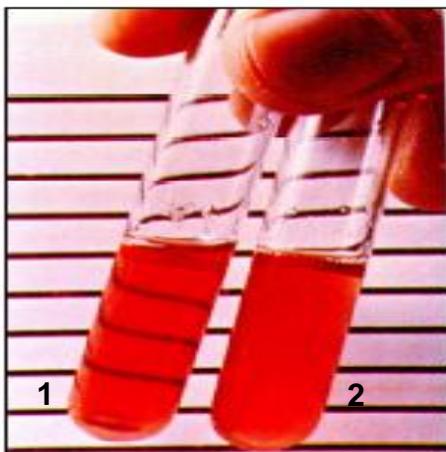
Procedimento:

Em tubo de hemólise colocar 2,0 ml de solução de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total. Agitar por inversão, suavemente e aguardar 10 minutos para leitura.

Interpretação:

Colocar o tubo de hemólise com a amostra na solução de NaCl a 0,36% a 2,0 cm de uma folha branca com linhas negras. A resistência aumentada à hemólise do eritrócito torna a amostra opaca e não se visualiza as linhas negras. Em amostras com resistência normal à hemólise visualizam-se facilmente as linhas através da solução. A figura 1 demonstra o teste negativo e positivo.

Figura 1 - Teste de resistência globular a salina 0,36%.

**Interpretação:**

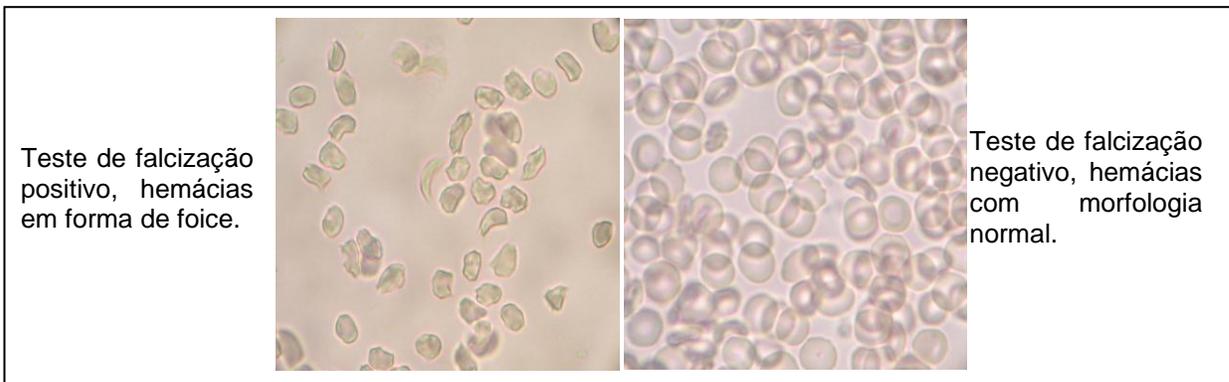
- 1) Teste negativo: Solução transparente. Vêm-se os traços no fundo. Eritrócitos hemolisados.
- 2) Teste positivo: Solução turva. Não se vê os traços no fundo. Eritrócitos resistentes.

3.2.3 Teste de falcização com solução de metabissulfito de sódio a 2% (Método de Daland & Castle, 1948)

Esse teste tem por princípio promover a desoxigenação da hemoglobina por meio de substâncias redutoras, no caso, o metabissulfito de sódio, fazendo com que o eritrócito que contenha a Hb S se deforme. É um teste citológico, e os resultados podem ser vistos na figura 2.

Reagentes:	
Na ₂ S ₂ O ₅ (metabissulfito de sódio)	
H ₂ O	
Solução trabalho (metabissulfito de sódio 2%)	
Metabissulfito de sódio	0,2 g
Água destilada q.s.p	10mL
Procedimento:	
Colocar em tubo de hemólise 100 µL do reagente e 50 µL do sangue, homogeneizar, colocar 50 µl do preparo entre lâmina e lamínula, deixar em câmara úmida, realizar leitura em 24 h.	
Interpretação:	
Teste de falcização positivo, hemácias em forma de foice. Teste de falcização negativo,	

Figura 2 - Teste de falcização.



Fonte: LEPAH - aumento 40x.

3.2.4 Pesquisa intra-eritrocitária de Hb H (Naoum, 1997).

Os corpúsculos de inclusão de hemoglobina H são formados por cadeias beta oriundas da desnaturação do tetrâmero. Após coloração esses corpúsculos apresentam-se dispostos homoganeamente no interior dos eritrócitos como pequenos pontos azulados.

Reagentes:

Azul de cresil brilhante. Laborclin, São Paulo, SP (pronto para uso).

Procedimento:

Colocar 50 µl de sangue total em tubo de ensaio e adicionar 50 µl de solução de azul Cresil brilhante. Agitar o tubo suavemente.

Incubar o material a 37°C por 60 minutos.

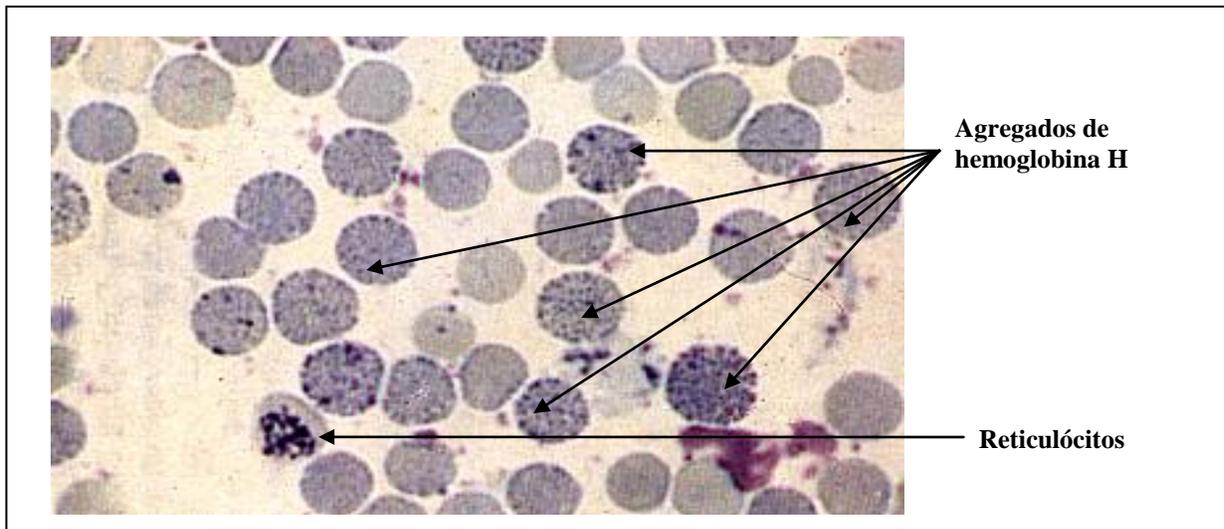
Fazer esfregaços finos e examinar ao microscópio em objetiva de imersão.

Interpretação:

A presença de Hb H nos eritrócitos aparece como fina granulação distribuída homoganeamente, caracterizando um portador de talassemia alfa. Agregados de Hb H são mostrados na figura 3.

Uma alternativa para melhorar a visualização dos corpos de inclusão é colocar uma gota da solução de sangue com azul cresil brilhante, após incubação, no centro da lâmina e cobrir com uma lamínula, pressionando suavemente para retirar o excesso. Examinar ao microscópio com objetiva de imersão. Este procedimento melhora a qualidade da lâmina, pois reduz a quantidade de corante precipitado entre as células, facilitando a identificação dos corpos de inclusão.

Figura 3 - Agregados de hemoglobina H.



Fonte: LEPAH - aumento 100 x.

3.2.5 Eletroforese de hemoglobina

3.2.5.1 Eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino. (Marengo & Rowe, 1965, com modificações).

Técnica utilizada para qualificação e quantificação de hemoglobinas normais e grande parte das anormais. As diferentes mobilidades eletroforéticas das hemoglobinas anormais são originadas por alteração de carga elétrica, causada por substituições de aminoácidos diferentes nas cadeias formadoras das moléculas. As hemoglobinas anormais que se originam de mutações onde não ocorre mudança de carga elétrica, migram na posição de Hb A. Nestes casos para a caracterização dessas hemoglobinas, usam-se outros processos eletroforéticos.

Preparo do hemolisado:

O hemolisado foi preparado com solução de saponina a 1%, colocando-se 50 µl de sangue total e 100 µl da saponina em um dos compartimentos da placa de kline, e homogeneizando-se.

Tampão usado:

O tampão utilizado foi o TEB, composto por: Tris (hidroximetil-aminometano), EDTA e Borato, com pH final de 8,5.

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB) pH 8,6

Tris hidroximetil aminometano.	10,2 g
Ácido etilenodiamino tetracético	0,6 g
Ácido Bórico	3,2 g
Água destilada q.s.p	1000 mL
Conservar em geladeira	

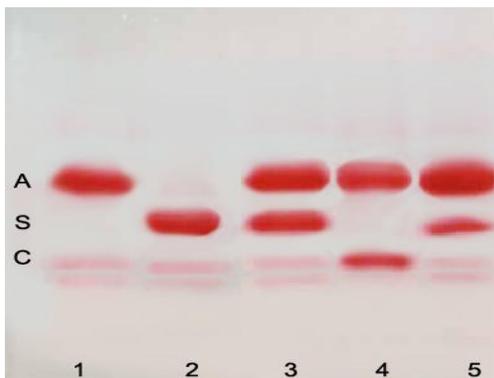
Procedimento:

Embeber as fitas de acetato de celulose por 15 minutos no mínimo e no máximo por 6 horas, em tampão TEB, secar as fitas entre duas folhas de papel absorvente e colocá-las na cuba de eletroforese, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos através de tiras de papel filtro.

Aplicar as amostras de solução de hemoglobinas a 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo. Deixar correr por 30 minutos a 300 volts.

Analisar as frações. A identificação segue mapa de migração de hemoglobinopatias.

Figura 4 – Eletroforese em fita de Acetato de celulose.

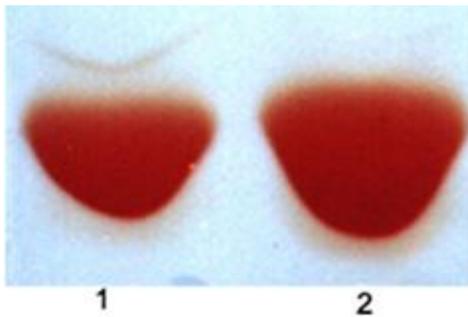


- 1) Perfil AA – hemoglobina normal.
- 2) Perfil SS – homozigoto para Hb S.
- 3) Perfil AS – heterozigoto para Hb S.
- 4) Perfil AC – heterozigoto para Hb C.
- 5) Perfil AS – heterozigoto para Hb S.

Fonte: LEPAH. -UCG - Corrida eletroforética demonstrativa com pacientes pré-selecionados.

As fitas de acetato de celulose foram conservadas no próprio tampão TEB. Para a identificação da hemoglobina H, que é instável e se desnatura facilmente, toda a atenção foi dada no início da migração das frações, pois, ela apresenta-se mais rápida que a hemoglobina A e desaparece por volta de 10 a 15 minutos após o início do procedimento. A seguir a figura 5 mostra a fração de Hb H e controle normal em 8 minutos de corrida.

Figura 5 - Eletroforese de hemoglobina pH=8,6.



- 1) Hemoglobina H.
- 2) Controle Normal.

Fonte: LEPAH.-UCG - Corrida eletroforética demonstrativa com pacientes pré-selecionados.

3.2.5.2 Eletroforese em ágar, pH ácido

Método utilizado para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas mais lentas do que a Hb A, como Hb S da Hb D e Hb C da Hb E, que migram em posições similares em eletroforeses alcalinas. Por esta técnica as hemoglobinas S e C separam-se da Hb A, enquanto as hemoglobinas D e E migram na mesma posição da Hb A.

Preparo do hemolisado:

O hemolisado também foi preparado com solução de saponina a 1%, colocando-se 50 μ l de sangue total e 100 μ l da saponina em um dos compartimentos da placa de kline, e homogeneizando.

Tampão usado:

O tampão utilizado foi o tampão fosfato pH=6,2. (Celm, Barueri, SP)

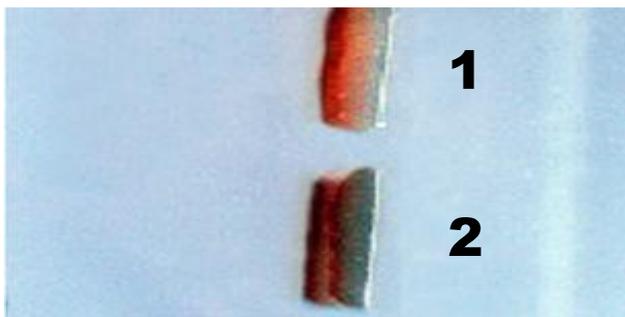
Lâmina com ágar-fosfato (Celm, Barueri, SP)

Procedimento:

Aplicar a solução de hemoglobina na cavidade reservada na porção média da lâmina com ágar-fosfato, utilizando um aplicador próprio; colocar a lâmina na cuba de eletroforese, e conectar suas extremidades com os respectivos compartimentos eletrolíticos por meio de "pontes" realizadas com duplo papel de filtro; passar 100 a 150 volts por 20 a 15 minutos respectivamente; analisar o fracionamento seguindo os padrões descritos acima.

A figura 6 mostra uma eletroforese em ágar-fosfato, onde a Hb se difunde pelo ágar e algumas frações como a Hb S, migram separadamente da Hb A, enquanto que as hemoglobinas normais A e A₂ têm mobilidade semelhante.

Figura 6 - Eletroforese em ágar-fosfato.



(1) Padrão normal perfil AA

(2) Perfil AS representado pela separação das bandas.

Fonte:: LEPAH. -UCG - Corrida eletroforética demonstrativa com pacientes pré-selecionados.

3.2.6 Dosagem de hemoglobina H (Marengo & Rowe, 1965, com modificações)

Reagentes:

São os mesmos utilizados na eletroforese em acetato de celulose pH 7,0. Utilizado como método auxiliar na identificação das formas alfa talassemias.

Procedimento:

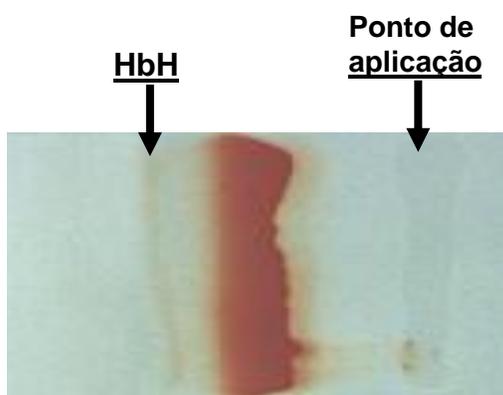
Aplicar 10 µl de solução do hemolisado em fita de acetato de celulose com 5,7 cm de largura. Realizar o método de eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino por 10 minutos. Após a separação das frações de hemoglobina H e A, recortá-las e eluí-las em tubos de ensaio contendo 3 ml de água destilada para hemoglobina H, e 15 ml de água destilada para Hb A, deixar eluir de duas a seis horas com agitação periódica ler as densidades ópticas (D.O.) em 415 nm, usando água destilada como branco.

Cálculo:

$$= \frac{\text{D.O. Hb H} \times 100}{\text{D.O. Hb H} + (\text{D.O. Hb A} \times 5)}$$

Interpretação: Valor normal de Hb H é 0%.

Figura 7 - Hb H, eletroforese em pH=7,0. Após 8 minutos de corrida.



Fonte: LEPAH. -UCG - Corrida eletroforética com paciente participante da pesquisa.

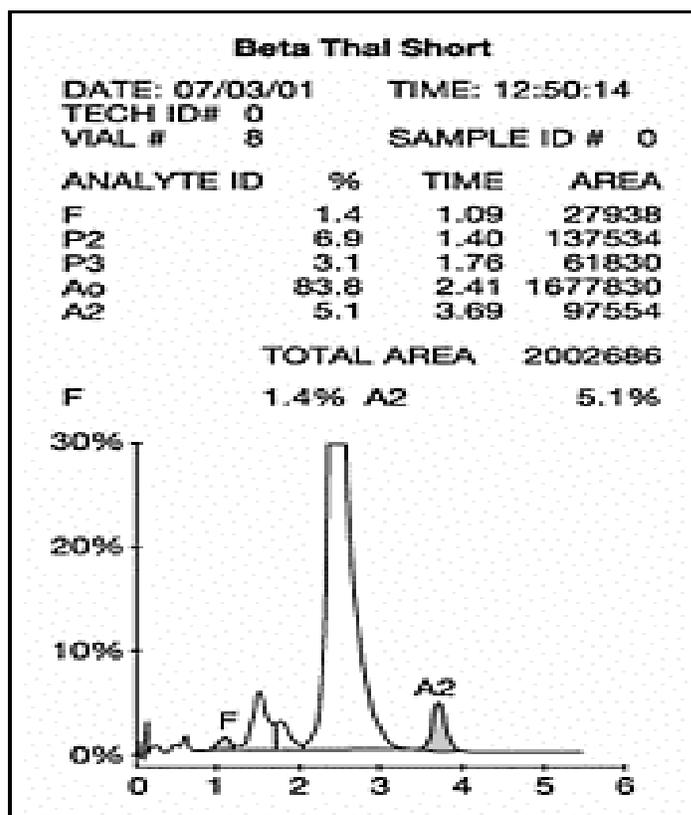
3.2.7 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Para este estudo foi usado o kit Beta-tal e o equipamento Variant (Bio-Rad[®], São Paulo, SP). A cromatografia líquida de alta performance é um método de separação de substâncias e se baseia na propriedade química da molécula a ser analisada. O kit para diagnóstico da talassemia beta Heterozigótica além de ser utilizado para esse fim, quantificando as hemoglobinas A, A2 e F, permite a caracterização através de janelas específicas para as hemoglobinas S, C, D Los Angeles e outras hemoglobinas variantes pelo padrão cromatográfico, tempos de retenção e porcentagem dos diferentes picos. Entretanto, com esse método não é possível detectar a Hb H.

A amostra de sangue é diluída 200 vezes em um eppendorf volume de 1,5 mL (fornecido pela Bio-Rad[®]), com líquido hemolisante, fornecida no kit de análise do mesmo fabricante, seguindo as normas de procedimentos da técnica. Utiliza-se 5 microlitros de sangue para 1 mL de hemolisante. Após hemólise total, acondicionar as amostras nos compartimentos adequados do equipamento Variant 1, previamente ligado para atingir temperatura ideal e fazer calibrações, digitar os dados necessários para identificação do paciente, tipo de procedimento escolhido e solicitar ao equipamento que inicie a operação e aguardar a realização dos procedimentos automatizados pré-programados. Segundo técnica (kit Beta-tal - Bio-Rad). Após o término da execução da técnica retirar o impresso do cromatograma liberado pelo Variant e analisar os resultados.

O cromatograma da figura 8 é um modelo de resultado emitido pelo equipamento Variant 1, onde podemos identificar as frações da Hb com o percentual, tempo de retenção e a área de cada banda, além do gráfico que nos permite analisar cada uma das frações liberadas pelo cromatógrafo. A Hb F é a primeira banda liberada, representada pelo pico F no cromatograma, o pico maior é a Hb A e em seguida temos a Hb A₂. Também pode ser visto os valores em percentual de cada fração com seu respectivo tempo de retenção, e destaque abaixo para os valores das Hb F e Hb A₂. Com este conjunto de dados podemos identificar o perfil hemoglobínico de cada indivíduo.

Figura 8 - Cromatograma.



Fonte: LEPAH. -UCG - Imagem escaneada de resultado emitido pelo Variant 1- Bio-Rad®.

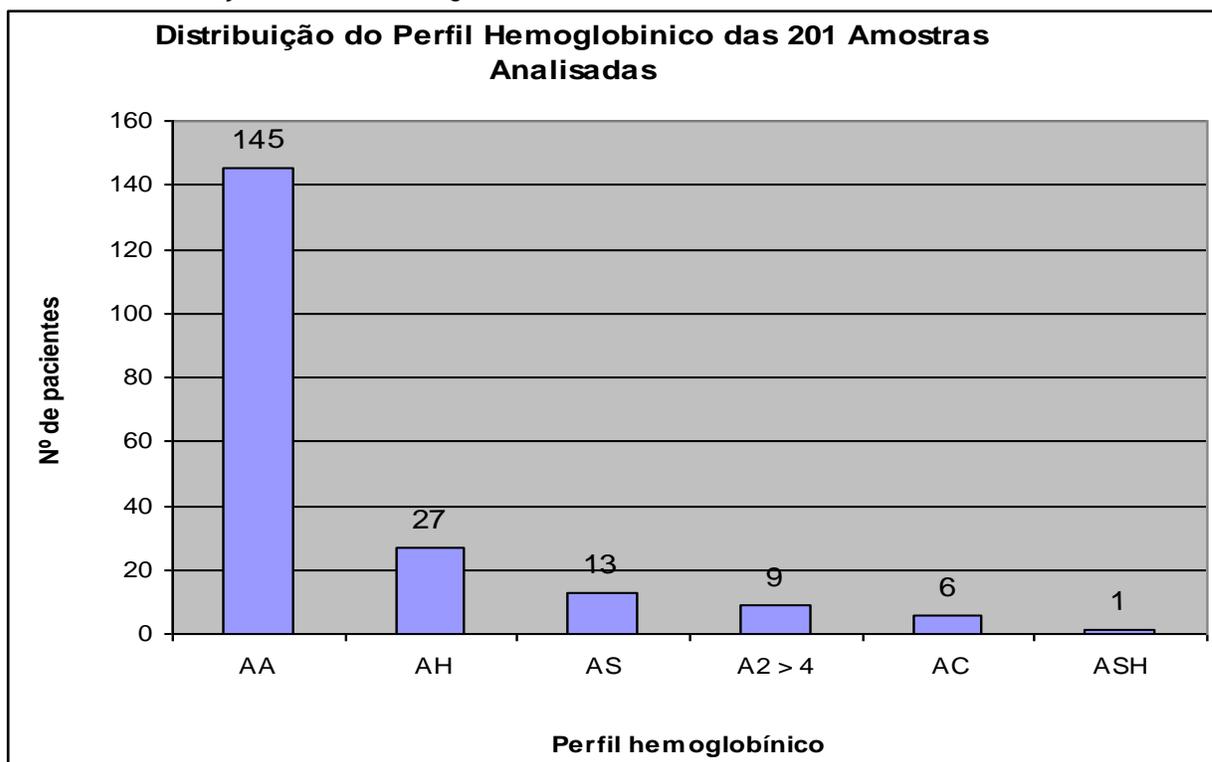
3.3 Análise de Dados

Todos os dados obtidos foram, primeiramente, anotados na ficha de resultado com os procedimentos acima descritos. Posteriormente, transcritos para a planilha de cálculo do Microsoft-Excel®, e analisados através de cálculos de médias aritméticas, percentagens, desvios-padrões e foram construídas tabelas e gráficos correspondentes a cada hemoglobina variante e talassemias encontradas. Foi demonstrada através de tabelas a correlação entre as alterações das hemoglobinas com os índices hematimétricos, idade, sexo e perfil hemoglobínico, com as respectivas médias e desvios-padrões. Foram construídos gráficos correlacionando cada alteração com idade e sexo e gráficos com os percentuais das frações hemoglobínicas encontradas.

4 RESULTADOS

O gráfico 1 mostra a variação encontrada nas hemoglobinas, das 201 amostras analisadas 145 (72,1%) apresentaram perfil hemoglobínico AA, 56 (27,9%) apresentaram algum tipo de alteração, sendo 27 (13,4%) com perfil AH, talassemia alfa, 9 (4,5%) perfil AA, mas com Hb A₂ aumentada, o que caracteriza talassemia beta, 13 (6,5%) com perfil AS, heterozigoto para Hb S e 6(3%) apresentou perfil AC, heterozigoto para Hb C. Apenas 1 (0,5%) apresentou interação entre talassemia alfa e heterozigose para Hb S.

Gráfico 1 - Distribuição do Perfil Hemoglobínico das 201 Amostras Analisadas



A idade da população em estudo variou de 1 a 65 anos e foi dividida em diversas faixas etárias, onde a maior delas se enquadra no grupo entre 15 e 30 anos, totalizando 65 indivíduos (32%). O menor percentual está contido na faixa etária compreendida entre 7 e 14 anos, com 22 indivíduos (11%). A distribuição dos resultados do perfil hemoglobínico por faixa etária mostra que a população em estudo foi composta em sua maioria por adultos (74%), conseqüentemente dos 56 casos de alteração da Hb, 73,2% tinham mais de 14 anos.

Do universo das 201 amostras analisadas, 141 amostras eram de pacientes do sexo feminino, representando 70% e 60 do sexo masculino, equivalente a 30%. A tabela 2 mostra em detalhe a distribuição por faixa etária, sexo e perfil hemoglobínico.

Tabela 2 - Distribuição dos resultados por faixa etária e sexo de acordo com o perfil hemoglobínico

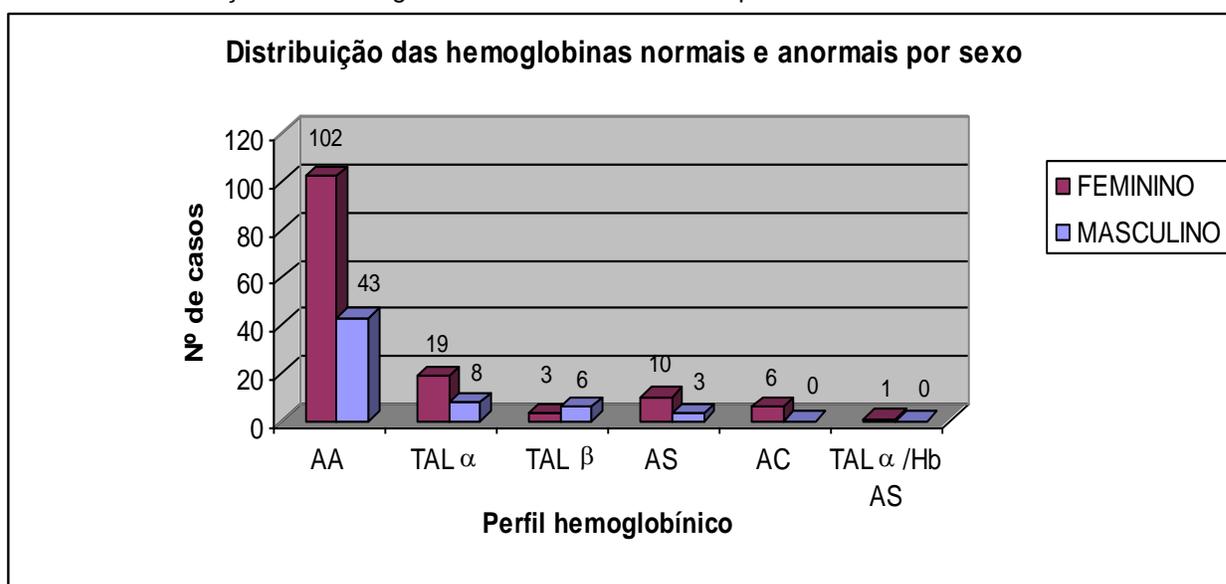
Faixa etária (anos)	Hb AA		Tal α		Tal β		Hb AS		Hb AC		Tal α /Hb AS		TOTAL
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	
0 a 6	9	12	3	3	0	0	1	1	1	0	0	0	30 15%
7 a 14	6	10	2	3	0	1	0	0	0	0	0	0	22 11%
15 a 30	39	10	1	1	1	3	6	1	2	0	1	0	65 32%
31 a 45	31	4	7	0	1	2	2	1	2	0	0	0	50 25%
46 a 65	17	7	6	1	1	0	1	0	1	0	0	0	34 17%
Subtotal	102 51,0%	43 21,1%	19 9,4%	8 4,0%	3 1,5%	6 3,0%	10 5,0%	3 1,5%	6 3,0%	0 0,0%	1 1,5%	0 0,0%	201 100,0%
Total	145 72,1%		27 13,4%		9 4,5%		13 6,5%		6 3,0%		1 5,0%		

Todas as amostras testadas apresentaram anemia microcítica e hipocrômica, sendo que 56 pacientes (27,9%) apresentaram hemoglobinas com alterações

qualitativas ou quantitativas. Dessas, 39 eram do sexo feminino (19,4%) e 17 do sexo masculino (8,5%). Portanto, a prevalência de hemoglobinas anormais na população foi de 56 casos o que equivale a 27,9%.

O gráfico 2 deixa clara a predominância do sexo feminino tanto nas hemoglobinas normais quanto nas anormais, onde em apenas um parâmetro, talassemia beta, há predomínio do sexo masculino.

Gráfico 2 - Distribuição das hemoglobinas normais e anormais por sexo



Os métodos empregados neste trabalho permitiram a identificação de vários genótipos heterozigotos das hemoglobinas variantes. Entretanto, não se encontrou homozigoto para essas hemoglobinas.

A talassemia alfa (perfil AH) foi a mais prevalente de todas, sendo que os 27 casos encontrados foram detectados por eletroforese de hemoglobina em pH alcalino e posteriormente realizada a pesquisa intra-eritrocitária de agregados de Hb H. Foi

determinado o valor das frações e todos os indivíduos encontrados são portadores de talassemia alfa mínima.

Heterozigotos para o genótipo AC e AS foram encontrados em 6 e 13 pacientes, gerando uma proporção de 1: 2,2. Na análise morfológica em esfregaço corado, esses pacientes apresentaram alterações na forma, tamanho e cor das hemácias. Essas alterações não são esperadas para esse genótipo.

Um caso de associação foi encontrado, entre, talassemia alfa e heterozigoto para Hb S. Para a detecção dessa associação foi realizada, além da eletroforese alcalina, a eletroforese em pH ácido, teste de falcização e a pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H.

4.1 Perfil Hematológico das Talassemias

4.1.1 *Talassemia alfa*

A tabela 3 mostra pacientes com índices hematimétricos, eritogramas e todos os pacientes com concentrações de Hb H compatíveis com talassemia alfa mínima, uma média de 1,7 % ($\pm 0,8$). As médias de todos os parâmetros estão de acordo com o esperado, ou seja, VCM e HCM diminuídos (valores de referência 87 ± 5 fL e 30 ± 2 pg, respectivamente) números de eritrócitos com média de 4,7 milhões ($\pm 0,8$).elevados em relação ao hematócrito com média de 34,3% ($\pm 6,7$), caracterizando microcitose e hipocromia e o principal dado, a presença de Hb H em todos os pacientes.

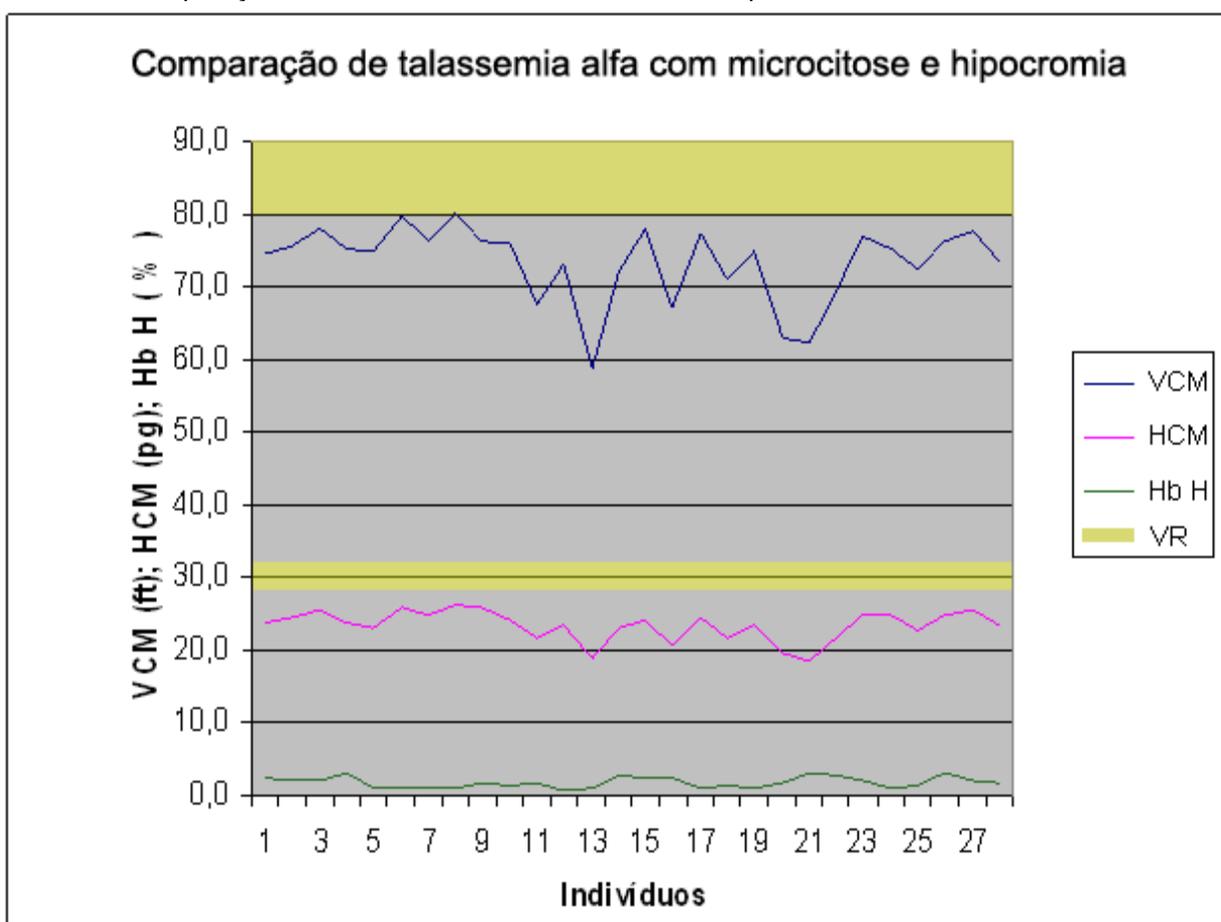
A média de Hb H obtida de 1,7% ($\pm 0,8$) é compatível com talassemia alfa mínima, e os valores dos índices hematimétricos demonstraram microcitose e hipocromia com médias do VCM de 73,4 ($\pm 5,4$) e HCM de 23,2 ($\pm 2,1$).

Tabela 3 - Dados do eritrograma, índices hematimétricos e valores percentuais das frações hemoglobínicas nos indivíduos com talassemia alfa.

ORDEM	IDADE (anos)	HM (10 ⁶ /L)	HT (%)	HB (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW (%)	Hb A (%)	HbA2 (%)	Hb F (%)	Hb H (%)
1	1	4,9	36,3	11,6	74,7	23,9	32,0	16,2	92,7	2,3	1,6	2,4
2	3	4,9	36,9	12,0	75,6	24,5	32,4	13,1	94,9	3,1	0,0	2,0
3	5	5,0	38,9	12,6	78,1	25,4	32,4	11,8	94,7	3,2	0,0	2,1
4	6	5,4	40,5	12,8	75,4	23,8	31,6	13,7	94,0	3,0	0,0	3,0
5	6	4,6	34,4	10,6	74,9	23,1	30,8	13,8	95,4	3,0	0,5	1,1
6	9	4,9	39,4	12,7	79,9	25,8	32,2	11,6	95,8	3,1	0,1	1,0
7	10	5,3	40,2	13,0	76,4	24,7	32,3	13,8	96,9	2,1	0,0	1,0
8	11	5,4	43,0	14,2	80,1	26,4	33,0	12,4	96,2	2,9	0,0	0,9
9	12	5,2	40,0	13,5	76,3	25,8	33,8	13,5	95,9	2,3	0,0	1,8
10	14	5,4	41,3	13,2	75,9	24,3	32,1	13,3	96,4	2,3	0,0	1,3
11	17	4,6	31,1	10,0	67,6	21,7	32,1	16,8	95,3	2,7	0,3	1,7
12	24	4,5	32,9	10,5	73,1	23,3	31,8	17,0	97,3	2,0	0,0	0,7
13	31	4,4	26,0	8,4	58,8	19,0	32,3	15,8	96,8	2,3	0,0	0,9
14	31	5,1	36,8	11,7	72,3	23,0	31,8	15,0	95,7	1,3	0,3	2,7
15	32	3,5	27,7	8,5	78,2	24,0	30,7	20,6	94,7	2,8	0,0	2,5
16	33	4,8	32,1	9,8	67,3	20,6	30,7	17,8	96,1	1,4	0,2	2,3
17	36	4,7	36,2	11,5	77,5	24,5	33,0	13,0	95,1	2,8	1,0	1,1
18	38	4,9	34,7	10,6	71,0	21,7	30,6	21,5	94,8	3,9	0,0	1,3
19	38	4,7	34,9	10,9	75,1	23,5	31,4	14,7	95,1	3,0	0,8	1,1
20	44	4,1	25,6	8,0	63,2	19,7	31,3	13,8	95,3	3,0	0,0	1,7
21	45	4,0	25,2	7,4	62,4	18,4	29,4	17,6	94,3	2,4	0,0	3,3
22	45	4,1	28,6	8,9	69,4	21,6	31,1	17,0	95,4	1,2	0,6	2,8
23	47	1,7	13,1	4,3	77,1	24,7	33,2	17,4	95,5	2,5	0,0	2,0
24	48	5,2	39,1	12,9	75,2	24,8	33,0	13,7	82,8	4,7	11,6	0,9
25	50	5,5	39,8	12,4	72,4	22,6	31,2	15,5	95,8	2,5	0,2	1,5
26	55	5,3	40,2	13,1	76,4	24,9	32,6	14,1	92,6	3,7	0,7	3,0
27	65	3,9	30,6	10,0	77,9	25,5	32,8	11,8	95,2	2,8	0,0	2,0
Médias	28	4,7	34,3	10,9	73,4	23,2	31,8	15,2	94,9	2,7	0,7	1,7
DP	18,5	0,8	6,7	2,3	5,4	2,1	0,9	2,6	1,2	0,8	0,5	0,8

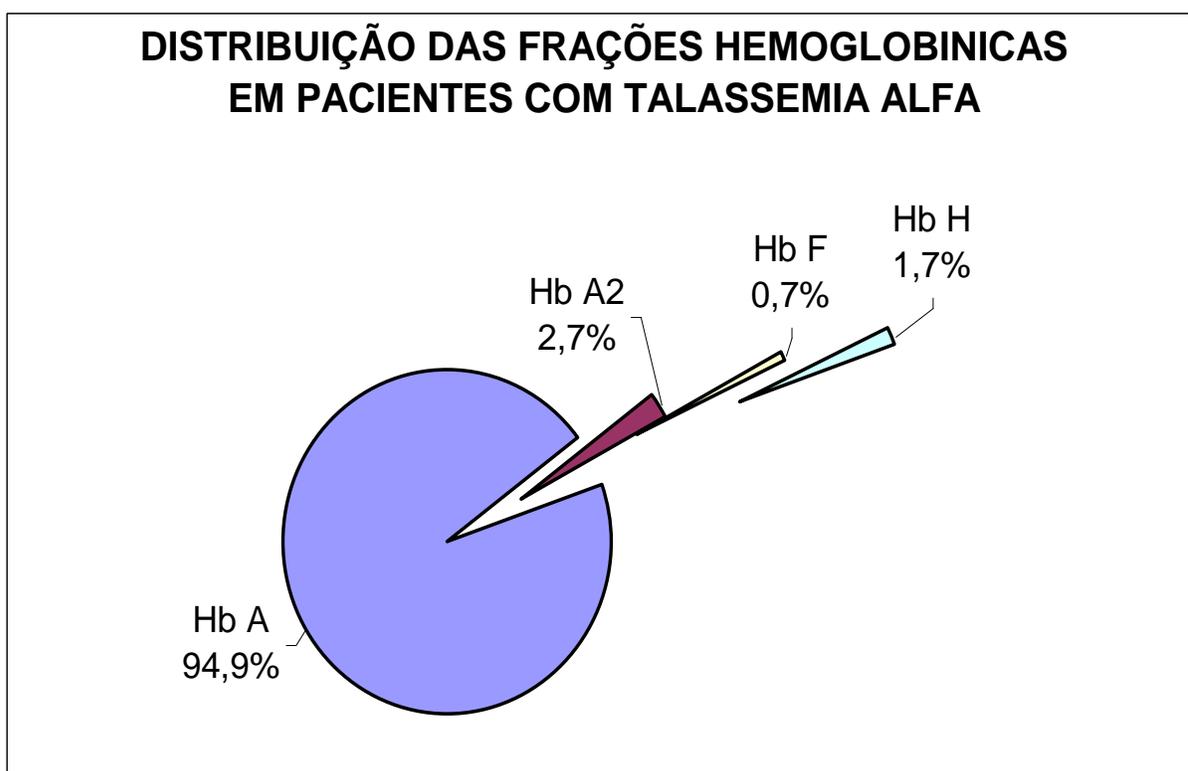
O gráfico 3 compara os valores das concentrações de Hb H com os valores dos índices VCM e HCM, onde o VCM mesmo com média de 73,4 fL ($\pm 5,4$) e não apresentando valores acima de 80 fL, mostra uma variação mais heterogênea que o HCM, que tem média de 23,2 pg ($\pm 2,1$), mas a variação de seus resultados é menor, como mostra o gráfico através da linha central de cor rosa.

Gráfico 3 - Comparação de talassemia alfa com microcitose e hipocromia



O gráfico 4 representa os percentuais das hemoglobinas encontradas nos pacientes com talassemia alfa. A média de Hb H foi de 1,7% ($\pm 0,8$), que é compatível com talassemia alfa mínima, a média de Hb A₂ foi de 2,7% ($\pm 0,8$), enquanto que a média de Hb A foi de 94,4% ($\pm 1,2$). 13 dos 27 indivíduos apresentaram baixa concentração de Hb F, e os demais, ausência desta Hb. Sendo a média destes de 0,7% ($\pm 0,5$).

Gráfico 4 - Distribuição das frações hemoglobínicas em pacientes com talassemia alfa



Os gráficos 5 e 6 mostram respectivamente a distribuição dos indivíduos com talassemia alfa por idade e sexo. A faixa etária com maior incidência foi de 31 a 45 anos, com 10 casos relatados, e predominância do sexo feminino com 19 casos (70%) contra 8 (30%) do sexo masculino.

Gráfico 5 - Distribuição por idade dos indivíduos com talassemia alfa

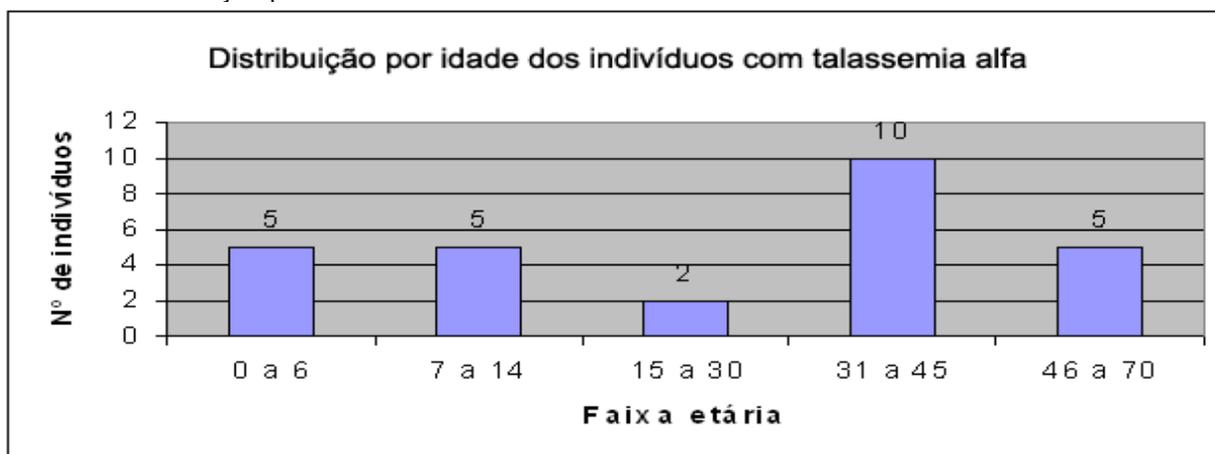
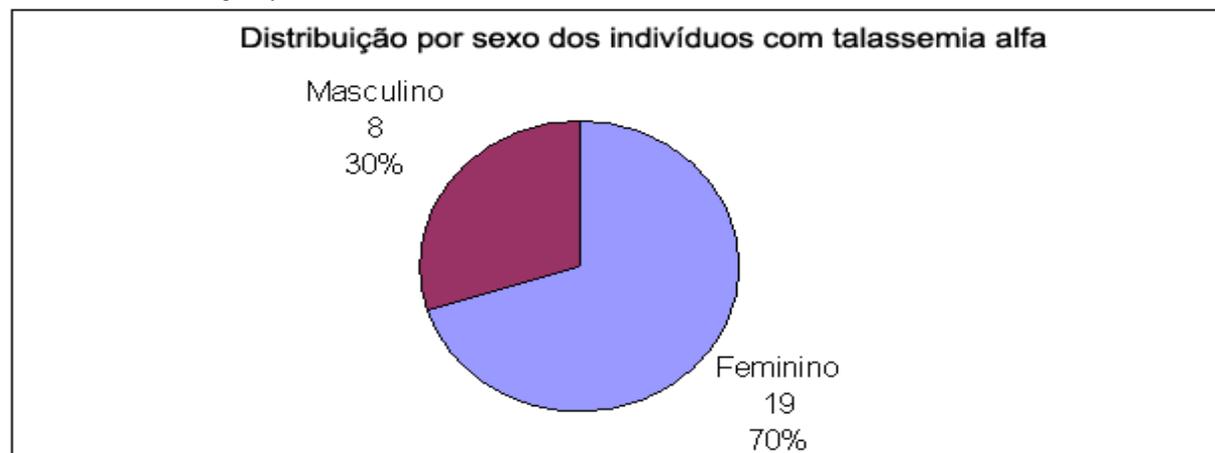


Gráfico 6 - Distribuição por sexo dos indivíduos com talassemia alfa



4.1.2 *Talassemia beta*

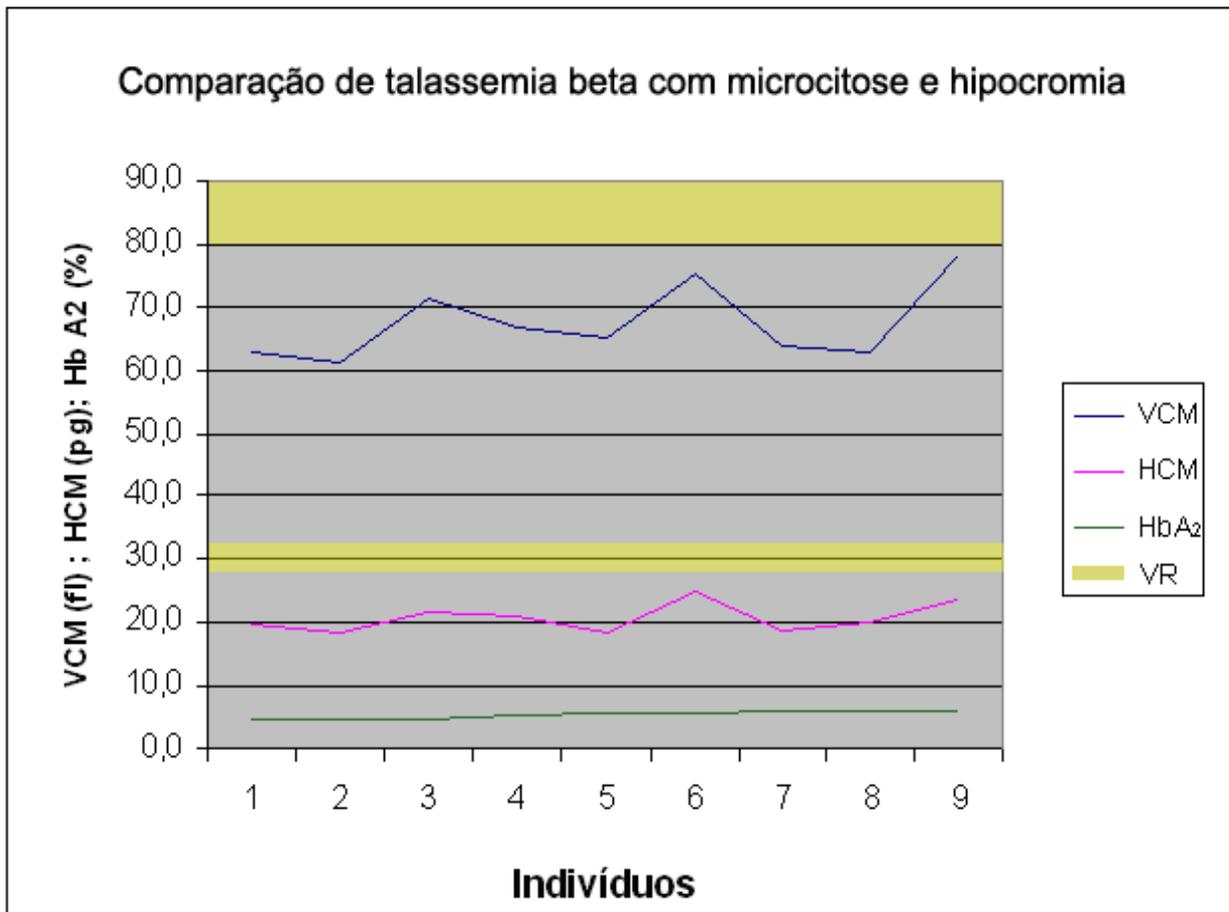
A tabela 4 mostra um quadro clássico de pacientes portadores de talassemia beta, onde todas as alterações esperadas estão de acordo com a literatura. Estes pacientes apresentaram uma concentração média de Hb A₂ de 5,5% ($\pm 0,6$), acima dos níveis normais que variam de 2% a 4%, e ainda confirmaram diminuição de índices como VCM e HCM. O número de hemácias em média é de 5,9 milhões ($\pm 0,5$) e está aumentado em relação ao hematócrito que tem média dentro da normalidade em torno de 40,2% ($\pm 4,7$). O RDW mesmo com média de 14,3% ($\pm 1,9$), na maioria dos casos está acima dos valores de referência.

Tabela 4 - Dados do eritrograma, índices hematimétricos e valores percentuais das frações hemoglobínicas nos indivíduos com beta talassemia.

ORDEM	IDADE (anos)	HM (10 ⁶ /L)	HT (%)	HB (g/dL)	VCM (fg)	HCM (pL)	CHCM (g/dL)	RDW (%)	Hb A (%)	HbA2 (%)	Hb F (%)
1	12	5,6	35,6	11	63,0	19,5	30,9	16,0	94,4	4,6	1
2	15	6,1	41,2	12,9	67,0	21,1	31,3	13,5	94,4	5,2	0,4
3	20	5,7	34,9	10,5	61,2	18,4	30,1	15,7	94,1	4,8	1,1
4	26	6,7	42,2	13,4	63,0	19,9	31,7	13,8	94,0	6,0	0
5	27	6,1	47,3	14,3	78,0	23,4	30,1	11,1	93,7	6,3	0
6	32	5,9	37,9	11,2	64,0	19,0	29,6	14,8	94,1	5,9	0
7	35	5,0	35,7	11	71,0	21,9	30,8	16,1	94,9	4,8	0,3
8	39	6,3	47,2	15,6	75,3	24,9	33,1	12,9	94,2	5,8	0
9	78	6,1	39,4	11,2	64,9	18,5	28,4	16,5	94,3	5,7	0
Médias	31,6	5,9	40,2	12,3	67,5	21,0	30,7	14,3	94,2	5,5	0,4
DP	19,6	0,5	4,7	1,8	5,9	2,3	1,4	1,9	0,3	0,6	0,3

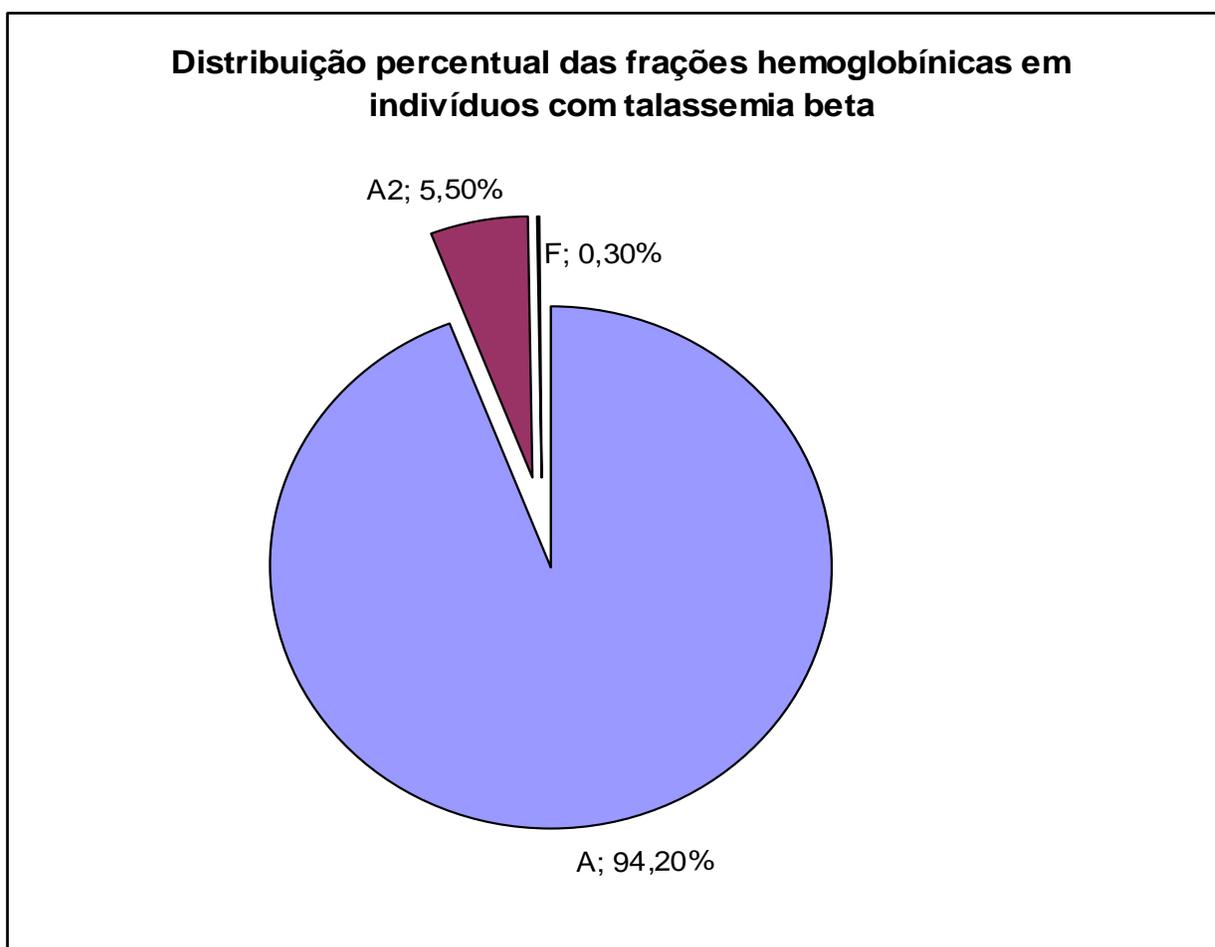
O gráfico 7 compara os valores das concentrações de Hb A₂ com os índices hematimétricos VCM e HCM. Os índices hematimétricos estão diminuídos, o que caracteriza anemia microcítica e hipocrômica, onde a média do VCM é de 67,5 fL (\pm 5,9), e o HCM tem a média de 21,0 pg (\pm 2,3). A Hb A₂ está aumentada em todos os pacientes caracterizando talassemia beta, onde apresenta média de 5,5% (\pm 0,6).

Gráfico 7 - Comparação de talassemia beta com microcitose e hipocromia



O gráfico 8 mostra a distribuição das frações da hemoglobina em indivíduos que apresentaram talassemia beta, onde a Hb A tem percentual médio de 94,2% ($\pm 0,3$), a Hb A₂ tem média de 5,5% ($\pm 0,6$) e a Hb F com média de 0,4% ($\pm 0,3$).

Gráfico 8 - Distribuição percentual das frações hemoglobinas em indivíduos com talassemia beta

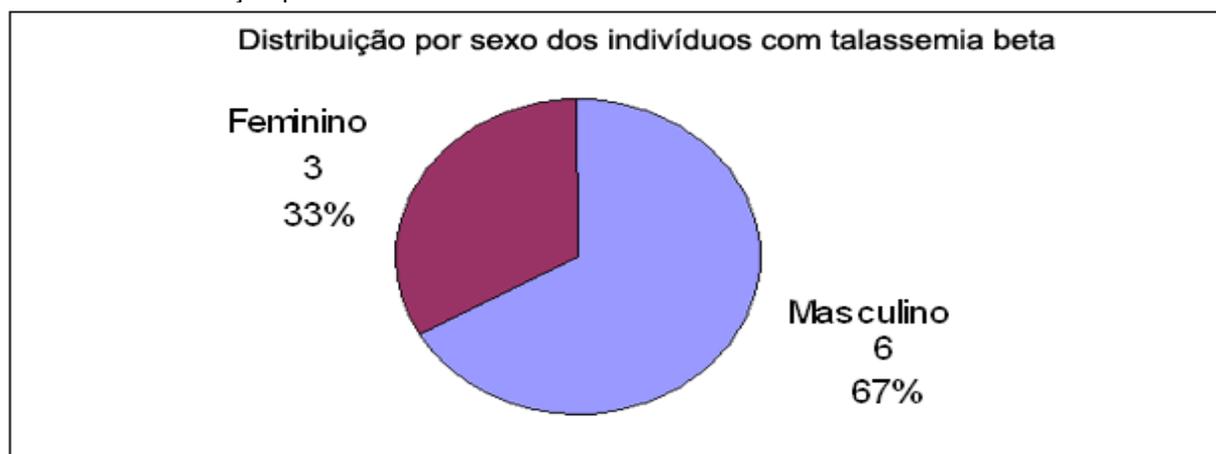


Os gráficos 9 e 10 mostram respectivamente a distribuição dos indivíduos com talassemia beta por idade e sexo. A faixa etária com maior incidência neste grupo foi de 15 a 30 anos, com 4 casos relatados. Houve predominância do sexo masculino com 6 casos (67%), contra 3 (33%) do sexo feminino.

Gráfico 9 - Distribuição por idade dos indivíduos com talassemia beta



Gráfico 10 - Distribuição por sexo dos indivíduos com talassemia beta



4.2 – Perfil Hematológico das Hemoglobinas Variantes

4.2.1 – Hemoglobina S.

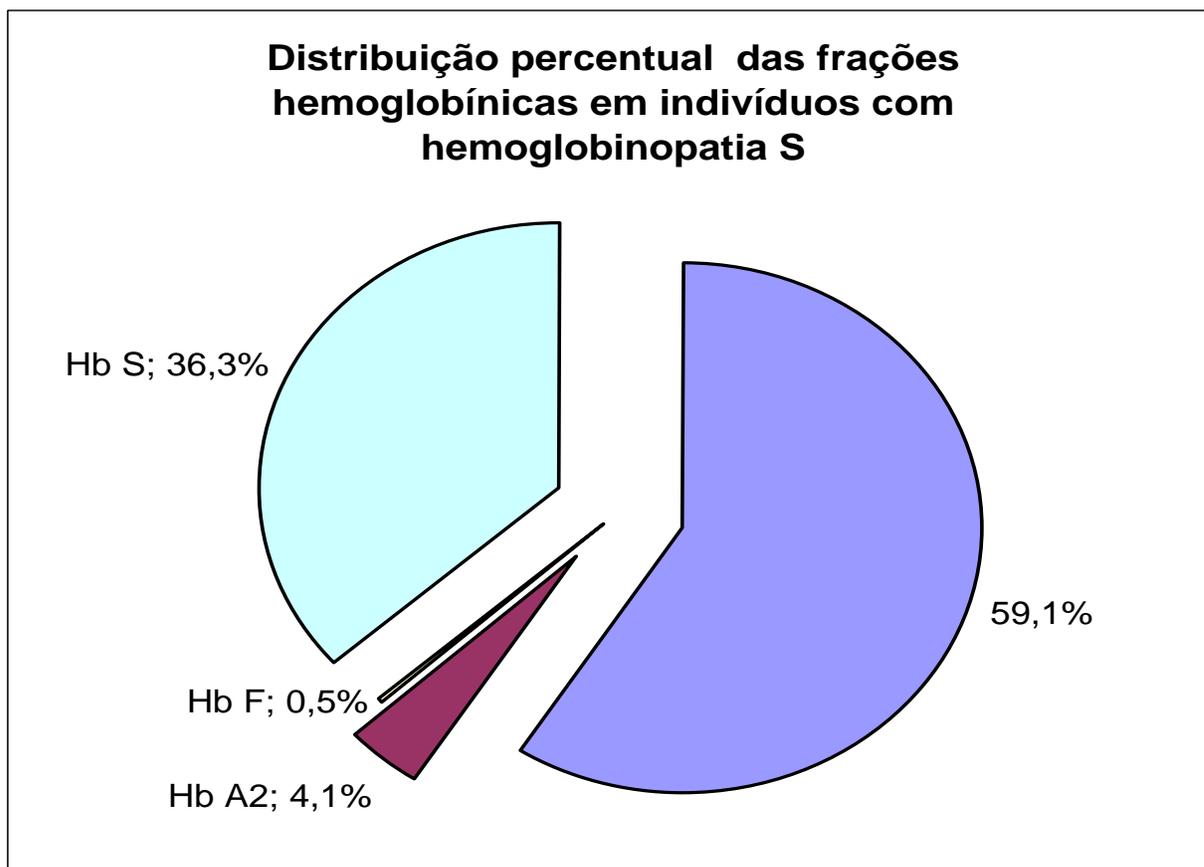
A Tabela 5 mostra um grupo de indivíduos heterozigotos para Hb S, com percentual médio de 59,1% (\pm 4,4) de Hb A e 36,3% (\pm 4,3) da fração S. Todos apresentaram hemácias aumentadas em relação ao hematócrito, uma média de 5,1 (\pm 0,6) milhões de hemácias, para uma média de hematócrito de 38,4% (\pm 4,7), o que causa a diminuição do VCM e HCM, e leva conseqüentemente à condição de microcitose e hipocromia, apesar desta situação não ser comum para este perfil (AS).

Tabela 5 - Dados do eritrograma, índices hematimétricos e valores percentuais das frações hemoglobínicas em indivíduos heterozigotos para Hb S.

ORDEM	IDADE (anos)	HM (10 ⁶ /L)	HT (%)	HB (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW (%)	Hb A (%)	HbA2 (%)	Hb F (%)	Hb S (%)
1	1	4,8	37,2	11,7	77,0	24,2	31,5	15,2	54,1	4,1	1,1	40,7
2	1	5,0	31,4	9,7	63,2	19,5	30,9	17,5	55,4	4,6	1,7	38,3
3	29	4,9	34,7	11,9	71,3	24,4	34,3	13,3	60,9	4,6	0,0	34,5
4	23	5,4	39,7	12,7	73,1	23,4	32,0	23,9	59,7	4,2	0,7	35,4
5	23	6,5	46,9	16,0	72,3	24,7	34,1	13,3	64,6	3,4	0,0	32,0
6	25	4,4	33,6	11,7	77,2	26,9	34,8	13,2	59,1	3,3	0,0	37,6
7	26	4,4	33,2	10,8	75,3	24,6	32,7	14,6	61,9	4,5	0,9	32,7
8	26	5,0	39,1	12,9	78,4	25,9	33,1	11,4	61,8	4,2	0,0	34,0
9	27	5,1	39,0	12,9	76,0	25,0	32,8	12,9	63,3	3,7	0,0	33,0
10	32	4,7	37,3	12,1	79,7	25,8	32,4	14,7	55,5	3,3	0,3	40,9
11	40	5,8	43,7	14,2	75,5	24,5	32,4	13,8	63,8	3,5	0,9	31,8
12	41	4,9	38,1	12,4	77,9	25,4	32,5	13,5	55,1	3,5	0,4	40,0
13	68	5,9	45,5	14,5	77,4	24,6	31,7	12,7	60,0	6,1	0,0	33,9
Média	27,8	5,1	38,4	12,6	74,9	24,5	32,7	14,8	59,1	4,1	0,5	36,3
DP	17,0	0,6	4,7	1,6	4,3	1,8	1,2	3,2	4,4	0,8	0,6	4,3

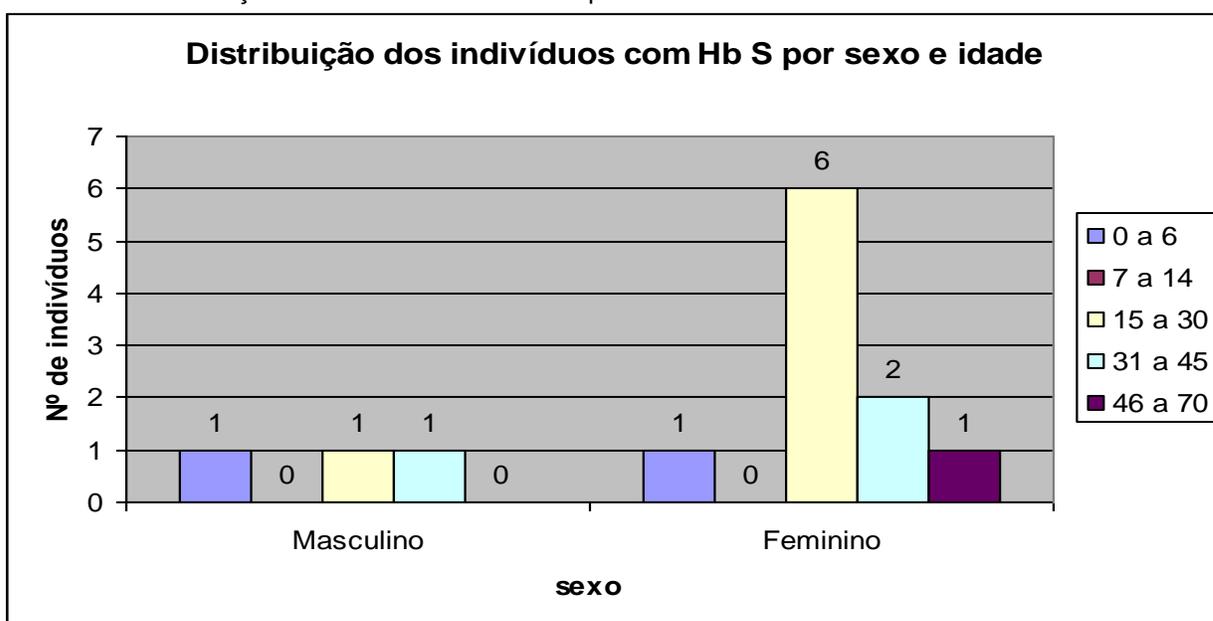
O gráfico 11 mostra o percentual das frações da hemoglobina dos indivíduos com heterozigose para hemoglobinopatia S, onde o maior percentual médio foi de Hb A com 59,1% ($\pm 4,4$), a Hb S apresentou média de 36,6% ($\pm 4,3$), a Hb A₂ com média de 4,1% ($\pm 0,8$) e Hb F com média de 0,5% ($\pm 0,6$).

Gráfico 11 - Distribuição percentual das frações hemoglobínicas em indivíduos com hemoglobinopatia S



O gráfico 12 correlaciona a distribuição dos indivíduos deste grupo por idade e sexo, onde predomina o sexo feminino com 10 casos contra 3 casos do sexo masculino. A faixa etária predominante foi entre 15 e 30 anos, representada pela coluna amarela no gráfico, com 7 casos, não houve nenhum caso na faixa etária compreendida 7 e 14 anos..

Gráfico 12 - Distribuição dos indivíduos com Hb S por sexo e idade



4.2.2 – Hemoglobina C

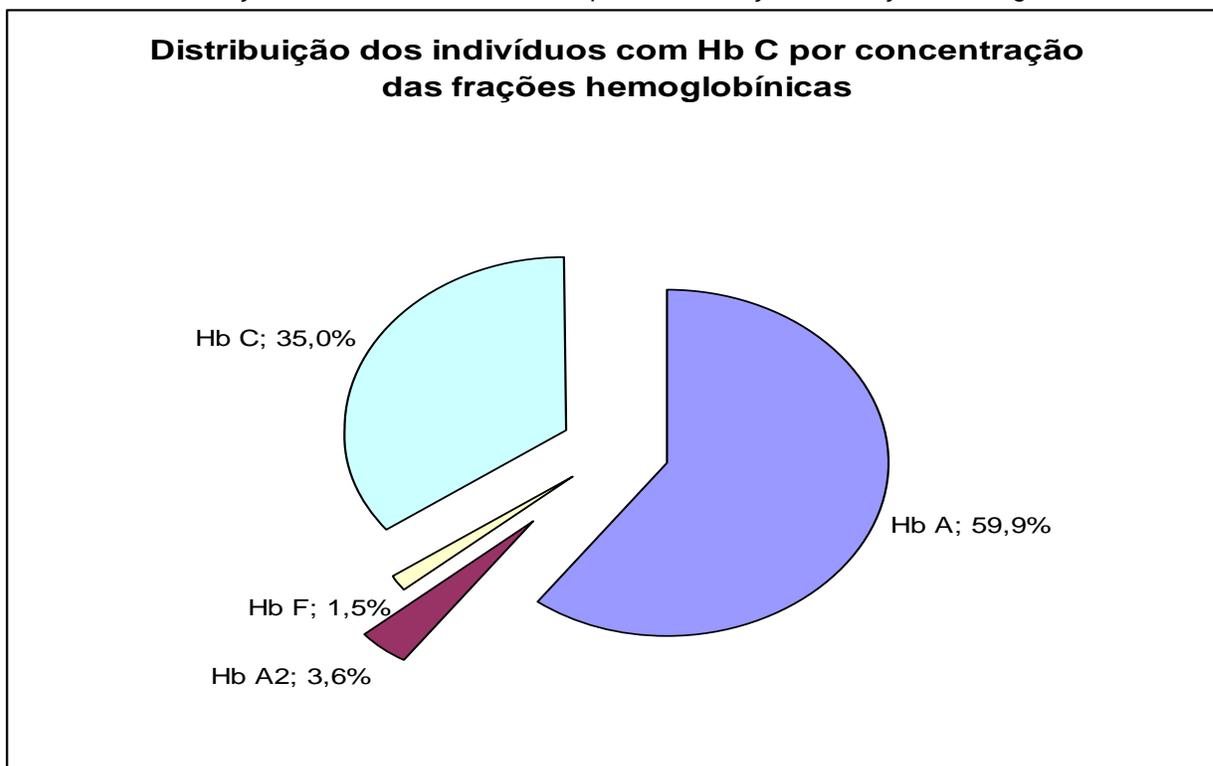
A Tabela 6 mostra um grupo de indivíduos portadores de heterozigose para Hb C, com percentual médio de 59,2% ($\pm 5,8$) de Hb A e 35,0% ($\pm 5,2$) da fração C. Também apresentaram o mesmo perfil hematimétrico dos pacientes descritos para portadores de Hb S, com média de hemácias de 5,3 milhões ($\pm 0,8$) e hematócrito com valor médio de 38,7% ($\pm 3,4$), situação que caracteriza microcitose e hipocromia, o VCM e o HCM se mostraram diminuídos com médias respectivas de 73,1% ($\pm 4,5$) e 24% ($\pm 2,7$).

Tabela 6 - Dados do eritrograma, índices hematimétricos e valores percentuais das frações hemoglobínicas em indivíduos heterozigotos para Hb C.

ORDEM	IDADE (anos)	HM ($10^6/L$)	HT (%)	HB (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW (%)	Hb A (%)	HbA2 (%)	Hb F (%)	Hb C (%)
1	2	5,1	37,2	11,9	72,7	23,2	32,0	13,0	54,5	3,8	4,5	37,2
2	16	5,3	39,8	13,3	75,0	25,0	33,4	13,7	56,2	3,5	0,3	38,6
3	27	7,0	45,0	15,3	64,6	21,9	34,0	14,6	69,1	4,4	0,0	26,5
4	43	4,8	36,7	12,6	76,6	26,3	34,4	14,3	56,8	3,5	0,7	37,7
5	45	4,8	35,5	11,4	73,3	23,6	32,1	21,2	63,4	3,0	2,9	30,7
6	56	5,0	38,1	13,4	76,7	27,0	35,2	13,9	55,3	3,4	0,5	39,4
Média	31,5	5,3	38,7	13,0	73,1	24,0	33,7	13,8	59,2	3,6	1,5	35,0
DP	20,2	0,8	3,4	1,4	4,5	2,7	1,6	0,8	5,8	0,5	1,8	5,2

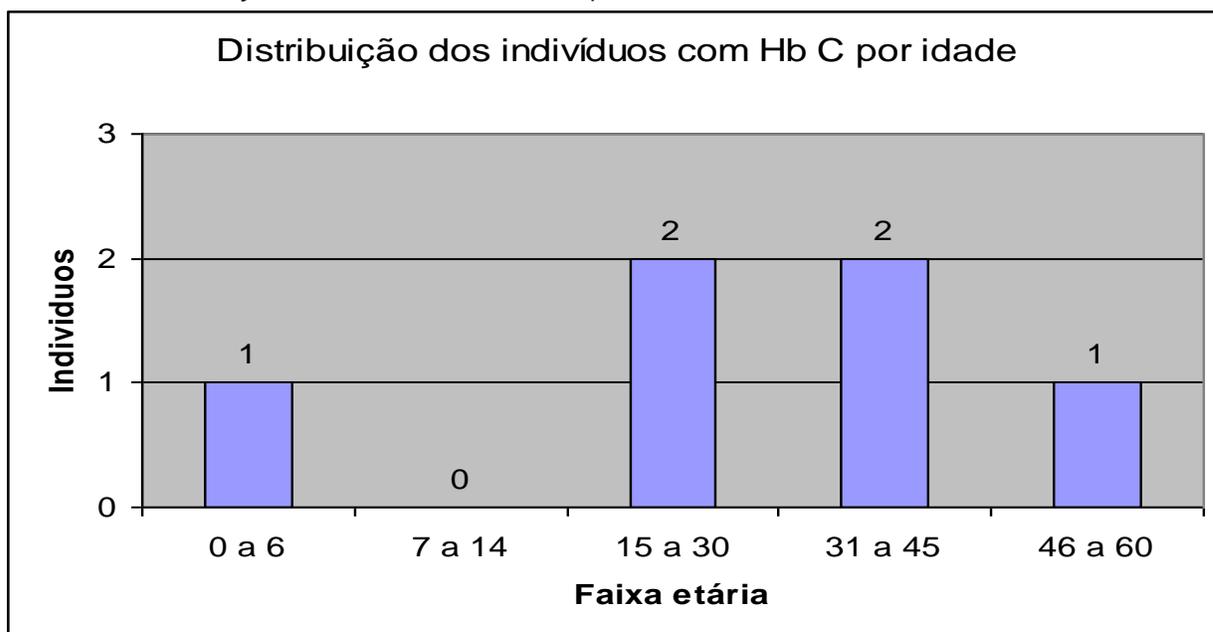
O gráfico 13 mostra o percentual das frações da hemoglobina dos indivíduos com heterozigose para Hb C, onde o maior percentual médio foi de Hb A com 59,2% ($\pm 5,8$), a Hb C apresentou média de 35,0% ($\pm 5,2$), a Hb A₂ com média de 3,6% ($\pm 0,5$) e Hb F com média de 1,5% ($\pm 1,8$).

Gráfico 13 - Distribuição dos indivíduos com Hb C por concentração das frações hemoglobínicas



O gráfico 14 representa a distribuição dos indivíduos com Hb C, por faixa etária, todos os indivíduos deste grupo são do sexo feminino.

Gráfico 14 - Distribuição dos indivíduos com Hb C por idade



4.2.3 – Interação talassemia alfa/Hb AS, Perfil Hb ASH

Tabela 7 mostrando um único indivíduo portador da associação talassemia alfa e heterozigoto para Hb S, neste caso justificam as alterações de índices hematimétricos e de eritrograma causados pela presença da hemoglobina H.

Tabela 7 - Dados do eritrograma, índices hematimétricos e valores percentuais das frações hemoglobínicas em indivíduo com associação de alfa talassemia e heterozigoto para HbS

IDADE (anos)	HM (10 ⁶ /L)	HT (%)	HB (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW (%)	HbA (%)	HbA2 (%)	Hb F (%)	Hb S (%)	HbH (%)
29	4,4	27,7	8,9	63,0	20,2	32,0	17,1	62,5	3,3	0,5	32,8	0,9

5. DISCUSSÃO

5.1 Prevalência das Hemoglobinas Variantes e Talassemias

A heterogeneidade genética da população brasileira está associada à diversidade dos grupos étnicos formadores de cada região. Dessa forma, as hemoglobinopatias se distribuem de maneira também heterogênea na população brasileira.

A literatura médica faz referência a algumas doenças que podem ser mais prevalentes em determinadas populações ou grupos étnicos. Dentre as enfermidades sobre as quais há evidências importantes de um componente genético, destacam-se as anemias hereditárias e em especial as hemoglobinas variantes e as talassemias. Essas enfermidades constituem um grupo das anemias hemolíticas que apresentam prevalência significativa na população brasileira (Naoum 1982 b; Viana-Baracioli, 2001; Cunha, 2001). Naoum (1997b) e Pinto-Junior (2002) mencionam que a anemia falciforme é de origem dos povos da África, enquanto que as talassemias alfa, dos povos asiáticos e as talassemias beta, dos povos do mediterrâneo, em especial, os italianos e gregos.

Naoum (1997b) refere à heterogeneidade genética da população brasileira e dos diferentes graus com que se entrecruzam nas várias regiões do país, como sendo o fator da composição plural desta nação. Segundo Brito (1997), o Brasil é o país de maior população negra fora da África. Assim, é importante analisar a miscigenação do povo brasileiro sob o ponto de vista de distribuição geográfica.

Ainda sobre os fatores genéticos que estariam influenciando a saúde da população negra e dos descendentes de italianos e de gregos, faz-se necessário identificar os riscos diferenciais, especialmente aqueles relacionados com a

mortalidade fetal e perinatal, visto que as mulheres portadoras tanto de anemia falciforme quanto de talassemia beta apresentam maior incidência de aborto espontâneo, menor tempo gestacional e maior prevalência de partos prematuros (Naoum 1997b, Oliveira *et al.*, 2006; Pinto Junior 2002). Portanto, as mulheres com anemias hereditárias, dependendo do comprometimento fisiológico causado pela anemia, poderão ter aumento da morbidade e mortalidade materna, assim como para o feto (Naoum, 1997b; Costa *et al.*, 2002).

Neste estudo a prevalência de $27,9\% \pm 1,5\%$, das hemoglobinas variantes e talassemias encontradas em 56 indivíduos, previamente selecionados por serem portadores de anemia microcítica e hipocrômica difere significativamente dos valores encontrados em outros estudos que trabalharam com a população em geral. Entretanto, em um grupo de gestantes, Viana-Baracioli *et al.* (2001) encontraram uma prevalência de 10,7% em gestantes em São Paulo, enquanto que Naoum *et al.* (1986) encontraram um valor de 10%, analisando 61.000 casos da população geral. Valores próximos a esses também foram encontrados por Reis (2004), que trabalhando com população aleatória de estudantes no estado de Goiás, encontrou 10,1% de alterações hemoglobínicas na população estudada. Entretanto, apesar da proximidade das prevalências entre esses autores, o nosso trabalho partiu da análise de um grupo previamente selecionado por parâmetros hematológicos. Não encontramos homozigotos para nenhuma das hemoglobinas variantes, o que caracteriza esta população em estudo como portadora e não como indivíduos doentes.

Como assinalam Naoum & Domingos (1997a), as talassemias alfa constituem-se como as alterações hereditárias mais comuns e prevalentes do homem. Entretanto, seu

diagnóstico exige procedimentos de execução atenciosa e cuidadosa que são recomendados por Naoum (1997a) e Ribeiro & Araújo (1992). Isso exigiu uma preparação prévia da equipe que participou desse trabalho, lembrando que essa forma de talassemia é diagnosticada pelo encontro de Hb H que, por sua vez, é instável e se desnatura com facilidade, necessitando de atenção e procedimentos especiais, como por exemplo: o preparo do hemolisado com saponina. Foram encontrados 27 casos de talassemia alfa, o que corresponde a 13,4%, da população estudada. Este dado diverge de Viana-Baracioli *et al.* (2001) que encontrou 6,75%, e está próximo do estudo de Oliveira *et al.* (2006) que relatou pelo menos 10% da população do sudoeste do estado de São Paulo.

Possivelmente a população em estudo neste trabalho está um pouco aumentada pelo fato de serem previamente selecionadas com anemias características da situação de talassemias, ou ainda, seria uma população mais susceptível às miscigenações oriundas das grandes migrações do passado? Foram constatadas alterações na morfologia em tamanho e forma dos eritrócitos, microcitose e hipocromia, respectivamente, e também alterações na hematimetria, compatíveis com as observações em esfregaço corado, sendo que estas observações foram também citadas por Tomé-Alves *et al.* (2000).

A dosagem de Hb H foi realizada pelo método de eluição e, dessa forma, todos os pacientes foram agrupados como portadores de talassemia alfa mínima. Importante ressaltar que neste trabalho foram empregados métodos não moleculares. No entanto, estes métodos, isoladamente, não são específicos para quaisquer hemoglobinopatias, mas em combinações, podem diagnosticar a alteração e direcionar os procedimentos

subseqüentes, auxiliando no entendimento dos processos fisiopatológicos associados ao distúrbio genético em questão (Chinelato-Fernandes, e Domingos, 2006).

A associação entre o heterozigoto da Hb S e a talassemia alfa (genótipo ASH) foi constatada em 1 amostra o que corresponde a 0,5% da população estudada. Observou-se neste paciente, que havia alterações na morfologia, no tamanho e na cor dos eritrócitos, microcitose e hipocromia, respectivamente, detectados nos índices hematimétricos e no teste de resistência osmótica à solução salina 0,36% positivo. Estes dados não são esperados para os portadores de Hb AS, mas esta condição se explica pela presença de Hb H, que tem como conseqüência a diminuição dos índices hematimétricos, o que também está de acordo com Tomé-Alves *et al.* (2000).

Os heterozigotos para a Hb C (genótipo AC) foram detectados em 6 pacientes correspondendo a 3,0%, enquanto para Hb S (genótipo AS) foram detectados em 13 pacientes, correspondendo 6,5%. Esses dados divergem de Naoum (1982a), Viana-Baracioli *et al.* (2001) e Reis (2004), que encontraram em seus estudos cerca de 1% de pacientes com hemoglobinopatia C, e 2,2% de heterozigotos para Hb S. Geralmente, os heterozigotos para as hemoglobinas C e S são pacientes assintomáticos e que não apresentam qualquer queixa clínica ou alteração no eritrograma.

Na avaliação rotineira do esfregaço sangüíneo corado desses pacientes não se encontram alterações na morfologia dos eritrócitos (Silva & Hashimoto, 1999). Entretanto, exceção se faz apenas para alguns pacientes portadores de Hb C que poderão apresentar hemácias em alvo, ou “target cell” (Bonini-Domingos *et al.*, 2003).

Como foi demonstrado na tabela 5, onde estão representados os dados dos pacientes com presença de Hb S, os valores para Hb A2 destes indivíduos mostraram-se elevados, o que também demonstraram os trabalhos de Cotton (1999) e Sub (1996),

pois esta metodologia (HPLC) utilizada para as dosagens de Hb A2 não é recomendada para pacientes heterozigotos para Hb S. Entretanto os resultados de Hb A2 nos pacientes heterozigotos para Hb C não sofreram alteração pelo método da HPLC.

A identificação de talassemia beta menor neste trabalho foi possível utilizando a automação, tanto no eritrograma quanto na HPLC. Por esta última metodologia, os valores percentuais das hemoglobinas já são determinados, principalmente das hemoglobinas A, A2 e Fetal que juntamente com os índices hematimétricos são importantes para tal diagnóstico (Naoum & Naoum, 2004). Foram encontradas aumento de Hb A2 em 9 amostras, sendo 3 de pacientes do sexo feminino e 6 do sexo masculino, correspondendo a 4,5% da população estudada. Observou-se nestes pacientes que havia alterações na morfologia no tamanho, na cor e forma dos eritrócitos (microcitose, hipocromia e presença de dacriócitos, respectivamente).

Os índices hematimétricos estavam todos abaixo dos valores de referência, segundo a Tabela 1 indicando microcitose e hipocromia. As médias aritméticas dos VCM, HCM e CHCM foram de 67,5 fL, 21,0 pg e 30,7 g/dl, respectivamente. O teste de resistência osmótica a salina 0,36% foi positivo. Estes dados são esperados para os portadores de talassemia beta menor, fatos estes encontrados por Tomé-Alves *et al.* (2000).

Os valores encontrados para a concentração da hemoglobina S variaram de 31,8% a 40,9%, os quais estão de acordo com Naoum (1997b) que prevê um intervalo de 30% a 40 % para essa hemoglobina. A média foi de 36,3%, ($\pm 4,3$). Já as concentrações médias das hemoglobinas A, A2 e fetal foram de 59,1% ($\pm 4,4$); 4,1% (\pm

0,8) e 0,5 % ($\pm 0,6$), respectivamente. Para os índices hematimétricos os valores de VCM, HCM e CHCM foram 74,9 ($\pm 4,3$) fL, 24,5 ($\pm 1,8$) pg e 32,7 ($\pm 1,2$) g/dl respectivamente, caracterizando a anemia microcítica e hipocrômica nesses indivíduos.

5.2 Importância social e epidemiológica.

As hemoglobinopatias são alterações genéticas com ampla distribuição mundial, e a Organização Mundial de Saúde, alerta para a mobilização dos setores de saúde na detecção e prevenção dos indivíduos com anemias hereditárias.

Estudos preventivos de hemoglobinopatias têm sido realizados em países onde a alta incidência constitui um fator de risco para saúde pública, cada qual enfocando da melhor maneira a sua população e o tipo de hemoglobinopatia que acomete.

Achados de estudos brasileiros já publicados confirmam que as hemoglobinopatias são consideradas um problema de saúde pública no Brasil e enfatizam a importância dos programas de triagem neonatal e aconselhamento genético, e da investigação da talassemia alfa em nosso país (Beiguelman, 1995; Cançado, 2006).

As hemoglobinopatias e as talassemias são doenças de difícil tratamento e, portanto, a única forma de evitá-la é através de ações preventivas. Nesse aspecto, o aconselhamento genético pode contribuir para reduzir a sua incidência, desde que seja orientado como forma de educação. O esclarecimento a respeito da anemia hereditária dará também ao afetado consciência de sua condição, principalmente do heterozigoto, nos aspectos educacionais e nos reprodutivos, sem, contudo, decidir pelo casal a respeito de sua prole (Naoum, 1997, Siqueira *et al.*, 2002).

Segundo a WHO Working Group (1982), é recomendado o levantamento populacional da prevalência das hemoglobinopatias e talassemias, pois o mesmo permite identificar os heterozigotos e os homozigotos. Além disso, esses programas têm também a responsabilidade de esclarecer e conscientizar os doentes. O resultado dessas ações implica na melhoria da qualidade de vida do portador e também lhe dará subsídios para decidir a respeito de sua prole (Viana-Baracioli *et al.*, 2001).

A prevalência de hemoglobinas anormais em 27,9% da população estudada reflete uma preocupação e um problema para a saúde pública. O aconselhamento genético desta população apresenta, no entanto, importantes implicações psicológicas, sociais e jurídicas, acarretando um alto grau de responsabilidade às instituições e aos profissionais que o oferecem. Assim sendo, é imprescindível que ele seja fornecido por profissionais habilitados e com experiência, dentro dos mais rigorosos padrões éticos e científicos.

6. REFERÊNCIAS

Beiguelman, B. 1995. Dinâmica dos Genes nas Famílias e nas Populações. 2^a Sociedade Brasileira de Genética. São Paulo, 460 p.

Bertholo, L. C. & Moreira, H. W. 2006. Amplicação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre elas e talassemias beta. J Bras Patol Méd Lab. 42(4):245-251.

Bernard, J., J. P. Lévy, B. Varet. J. P. Clauvel. J. D. Rain & Y. Sultan. 2000. Hematologia. 9^a Ed. Medsi. Rio de Janeiro, RJ. 368 p.

Bonini-Domingos, C. R., Bonini-Domingos, A. C., Chinelato, A. R., Zamaro, P. J. A. e Calderan, P. H. O. 2003. Interação entre Hb C [beta6(A3) Glu>Lys] e IVS II-654 (C>T) beta-talassemis no Brasil. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 25 (2): 115-121.

Brito, B. R. P. 1997. Mulher, negra e pobre. A tripla discriminação. Revista Teoria e Debate. Fundação Perseu Abramo. Ano 10 n^o. 36, out/nov/dez, p19-23. Disponível em: http://www.fpabramo.org.br/td/nova_td/td36/td36_sociedade.htm. Acessado em 28.01.2006.

Cançado R. D. 2006. Talassemia alfa (título verificar). Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 28 (2): 81-87.

Castilho, E. M., P. C. Naoum, R. A . S. Graciano & R. A . Silva. 1987. Prevalência de Talassemia alfa em pacientes com anemia e em pessoas sem anemia. Rev. Bras. Pat. Clín., 23 (5):131-34.

Chinelato-Fernandes, A. C., G. G. Leonel, P. O. Calderan, R. B. Oliveira, Silva Jr., W. A., Hidalgo, C. A. & C. R., Bonini-Domingos, 2003. Avaliação eletroforética, cromatografia e molecular da Hb D Los Angeles no Brasil. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 25 (3): 161-168.

Costa, V. A, Acedo, M. J., Polimeno, N. C. & Bertuzzo, C. S. 2002. Contribuição para a estimativa da freqüência populacional da Persistência Hereditária da Hemoglobina

Fetal no Brasil. *Cad. Saúde Pública*. [online]. 18 (5): 1469-1471. Disponível <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102311X2002000500040&lng=en&nrm=-iso>. Acessado em 02 de junho de 2005.

Cotton, F. *et al.* 1999. Interference of Hemoglobin D in hemoglobin A2 measurement by cation-exchange HPLC. *Clinical Chemistry* 45(8): 1317-1318.

Cunha, E. M. G. P. 2001. Mortalidade Infantil e Raça: as diferenças da desigualdade, *Jornal da Rede Feminista de Saúde*. 23 (03) Disponível em: http://www.redesaude.org.br/jornal/html/body_jr23-estela.html. Acessado em 11.03.2006.

Cunningham L.O., Rising, J.A. 1977. Erythrocytic microcytosis: clinical implications in 100 patients. *Am J Med Sci*, 273:149-55.

Dacie, J. V. & S. M. Lemis. 1995. *Practical Haematology*. 8^a Ed. Churchill Livingstone. London. 609 p.

DALAND, G. A.; CASTLE, W.B. A simple and rapid method for demonstrating sickling of the red blood cells: the use of reducing agents. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 33, p. 1082-8, 1948.

Failace, R. Hemograma. *Manual de Interpretação*. 1995. Artes médicas. 3^a ed. Porto Alegre-RS. 198 p.

Globin Gene Server, <http://globin.cse.psu.edu/>. Acessado em 26.06.2006

Kjeldsberg, C. R. 1998. Princípios do Exame Hematológico. In: Lee, G.R., Bithell, T. C. *et al.* *Winrobe: Hematologia Clínica*, São Paulo, Manole, Cap. 2, p. 7-41.

Lee. G. R. *et al.* *Winrobe Hematologia Clínica*. 1997. Editora Manole. V. I e II.

Lorenzi, T. F. 1999. *Manual de Hematologia. Propedêutica e Clínica*. 2^a Ed. Medsi. São Paulo, SP. 641 p.

Melo, M. R.; Purini, M. A. *Et. al.*, 2002. Uso de índices hematimétricos no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas: uma abordagem a ser adotada? *Rev. Assoc. Med. Bras*, 48(3): 222-224

Melo-Reis, P. R. Araújo, L. M. M *et. al.* 2006. A importância do diagnóstico precoce na prevenção das anemias hereditárias. *Rev. bras. hematol. hemoter.*, 28(2): 149-152.

Naoum, P. C. 1982a. Diagnóstico Laboratorial das Hemoglobinopatias. *Rev. Bras. Pat. Clín.* 18(1): 18-20.

Naoum, P. C. 1982b. Hemoglobinopatias no Estado de São Paulo. Métodos de Estudos, Prevalência, Distribuição Geográfica, e Relações Históricas e Antropológicas. São José do Rio Preto - SP. Tese de Livre-Docência. Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 279 p.

Naoum, P. C. 1983. Critérios para o diagnóstico laboratorial de alfa e beta talassemia. *Rev. Bras. Pat. Clín.* 19(1): 33-40.

Naoum, P. C., C. R. B. Domingos, P. A. Mazziere, E. M. Castilho & C. T. Gomes. 1986. "Hemoglobinas no Brasil". *Boletim*, 141: 180-8.

Naoum, P. C. 1997. Hemoglobinopatias e Talassemias. Sarvier Ed. Livros Médicos. São Paulo, SP. 171 p.

Naoum, P. C. & C. R. B. Domingos 1997a. Talassemias Alfa. *Laes & Haes*, XVIII (107): 70-98.

Naoum, P. C. & C. R. B. Domingos 1997b. Doença falciforme no Brasil. Origem, genótipos, haplótipos e distribuição geográfica. *J, Brás. Patol.* 33(3): 145-153.

Naoum, P.C. 1999. Eletroforese. Técnicas e Diagnósticos. 2ª Ed. Livraria Santos Editora. São Paulo, SP. 154 p.

Naoum, P. C. & Naoum, F. A. 2004 – Doença das Células Falciformes. Sarvier – São Paulo-SP. 224 p.

Neto, G. C. G. & M. S. Pitombeira. 2003. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39 (1): 51-56.

Oliveira, G. L. V. *et al.* 2006. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 28(2): 105-109.

Papassotiriou, I., J. Traeger-Synodinos, E. Kanavakis, M. Karagiorga, A. Stamoulakatou & C. Kattamis. 1998. Erythroid Marrow Activity and Hemoglobin H Levels in Hemoglobin H Disease. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 20(6): 539-44.

Pearson, H.A., O'Brien, R.T., MacIntosh. S. 1973, Screening for thalassemia trait by electronic measurement of mean corpuscular volume. *N Engl J Med*, 288:351-3.

Pinto Junior W., 2002. Diagnóstico pré-natal. *Ciência e Saúde coletiva*, 7(1), 1-27, São Paulo.

Reis, P. R. M., 2004. Avaliação da prevalência de hemoglobinopatias e talassemias em Goiás: Métodos de identificação laboratorial e distribuição geográfica.

Ribeiro, V. S. & J. T. Araújo. 1992. Hemoglobina H. Identificação Laboratorial. *Res. Hosp. Clin. Fac. Med.*, 47 (4): 176-79.

Silva, P. H. & Y. Hashimoto. 1999. Interpretação Laboratorial do Eritrograma. Lovise. São Paulo, SP. 197 p.

Silva, R. B. P. & A. S. Ramalho. 1997. Riscos e benefícios da triagem genética: o traço falciforme como modelo de estudo em uma população brasileira. *Cad. Saúde Pública*. [online]. abr./jun. 1997, vol.13, no.2 [citado 01 Maio 2003], p.285-294. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102311X1997000-200018&lng=pt&nrm=iso>. Acessado em 05 de maio de 2006.

Silvestroni, E. & Bianco, I. Screening for Microcytemia in Italy: analysis of collected in the past 30 years. *Am. J. Hum. Genet.* 27:198-212, 1975.

Siqueira, A. M. F., A. C. Fett-Conte, L. N. B. Borin & C. R. Bonini-Domingos. 2002. Diagnóstico de hemoglobinopatias em recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto –SP. *Revista Bras. hematol. hemoter.*, 24 (4):302-05.

Sub, D. D. *et al.* 1996. Influence of Hemoglobin S Adducts on Hemoglobin A2 quantification by HPLC. *Clinical Chemistry* 42(7): 1113-1114.

Tomé-Alves, R., D. P. Marchi-Salvador, G.M. Orlando, L.A. Palbarini, R. E. Imperial, P. C. Naoum & C.R. Bonine-Domingos. 2000. Hemoglobinas AS/Alfa talassemia – importância diagnóstica. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, 22(3); 388-394.

Viana-Baracioli, L. M. S., Bonini-Domingos C.R., Pagliusi, R.A. e Naoum, P.C. 2001. Prevenção de hemoglobinopatias a partir do estudo em gestantes. *Rev. bras. hematol. hemoter.*, 23 (1): 31-39.

Vieira, S. 1942-V718i. *Introdução á bioestatística* 3ª ed. Revista e ampliada. Rio de Janeiro: Campos, 1998. ISBN 85-0529-5.

WHO Working Group. 1982. Hereditary anemia: genetics basic, clinical features, diagnosis and treatment. *WHO*, 60: 643-60.

Wintrobe, M. M. 1929. A simple and accurate hematocrit. *J. Lab Clin Med.*15:287.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA LABORATÓRIO DA ÁREA DA SAÚDE****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você poder procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás pelos telefones 3227-1071.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Linha de Pesquisa: ANEMIAS HEREDITÁRIAS

Projeto: Avaliação da prevalência de talassemia alfa em uma população com anemia microcítica e hipocrômica.

Pesquisador Responsável: Mauro Meira de Mesquita

Telefone para contato: (62)39461532 - 99735028

Pesquisadores participantes: Professores, funcionários e alunos do curso de Biomedicina.

Telefones para contato: (62) 3946 1088

- Será colhida a sua amostra de sangue para a realização dos exames solicitados pelo seu médico. Depois de realizar todos os exames, mediante o seu consentimento, a mesma amostra será utilizada para fazer exames específicos para o diagnóstico das ANEMIAS HEREDITÁRIAS tais como: hemograma, eletroforese de hemoglobina, prova de resistência à salina 0,36%, pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H, cromatografia líquida de alta performance e teste de falcização.
- O objetivo da pesquisa é saber a prevalência desta doença na nossa população. Não existe nenhum risco, nem desconforto ou lesões que possam ser provocados pela pesquisa e você receberá o resultado no final da pesquisa, prevista para dezembro de 2006.
- Todos os dados são sigilosos e você tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo.

- Nome do pesquisador: Mauro Meira de Mesquita

- Assinatura do pesquisador: _____

Data: / /

ANEXO B - Consentimento da participação da Pessoa como Sujeito

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA LABORATÓRIO DA ÁREA DA SAÚDE

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____ RG

Nº _____, N° de registro no LAS/CBB _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo em Avaliação da prevalência de talassemia alfa em uma população com anemia microcítica e hipocrômica, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador: Mauro Meira de Mesquita, sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu atendimento.

Local e data _____

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Observações complementares:

Data de nascimento: ___/___/_____ Idade: _____

Sexo: () se for do sexo feminino D.U.M: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Naturalidade do paciente: _____ Estado: _____

Naturalidade do pai: _____ Estado: _____

Naturalidade da mãe: _____ Estado: _____

Você já teve anemia? Não () Sim ()

Já fez tratamento para anemia? Não () Sim ()

Qual medicamento você usou? _____

Houve melhora com o uso do medicamento? Não () Sim ()

Atualmente você está em uso de algum Medicamento: _____

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisas que Envolvam Crianças e Dependentes

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA LABORATÓRIO DA ÁREA DA SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISAS QUE ENVOLVAM CRIANÇAS OU DEPENDENTES

Seu (sua) filho (a) está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você poder procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás pelos telefones 3227-1071.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Linha de Pesquisa: ANEMIAS HEREDITÁRIAS

Projeto:

Avaliação da Prevalência de Talassemias alfa em uma população com anemia microcítica e hipocrômica.

Pesquisador Responsável: Mauro meira de Mesquita

Telefone para contato: (62)39461532 - 99735028

Pesquisadores participantes: Professores, funcionários e alunos do curso de Biomedicina.

Telefones para contato: (62) 3946 1088

- Será colhida a sua amostra de sangue para a realização dos exames solicitados pelo seu médico. Depois de realizar todos os exames, mediante o seu consentimento, a mesma amostra será utilizada para fazer exames específicos para o diagnóstico das ANEMIAS HEREDITÁRIAS tais como: hemograma, eletroforese de hemoglobina, prova de resistência à salina 0,36%, pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H, cromatografia líquida de alta performance e teste de falcização.
- O objetivo da pesquisa é saber a prevalência desta doença na nossa população. Não existe nenhum risco, nem desconforto ou lesões que possam ser provocados pela pesquisa e você receberá o resultado no final da pesquisa, prevista para dezembro de 2006.
- Todos os dados são sigilosos e você tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo.

- Nome do pesquisador: Paulo Roberto de Melo Reis

- Assinatura do pesquisador: _____

Data:

ANEXO D - Consentimento da participação da Criança como Sujeito

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA LABORATÓRIO DA ÁREA DA SAÚDE

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA CRIANÇA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG nº _____ nº de registro no LAS/CBB ou SCMG _____, abaixo assinado, autorizo _____ a participar do estudo em Avaliação da prevalência de talassemias alfa em uma população com anemia microcítica e hipocrômica, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador: Mauro Meira de mesquita, sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu atendimento .

Local e data _____

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Observações complementares:

Data de nascimento: ___/___/_____ Idade: _____

Sexo: () se for do sexo feminino D.U.M: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Naturalidade do paciente: _____ Estado: _____

Naturalidade do pai: _____ Estado: _____

Naturalidade da mãe: _____ Estado: _____

Você já teve anemia? Não () Sim ()

Já fez tratamento para anemia? Não () Sim ()

Qual medicamento você usou? _____

Houve melhora com o uso do medicamento? Não () Sim ()

Atualmente você está em uso de algum Medicamento: _____

ANEXO E - Ficha cadastral de Participantes da Pesquisa

FICHA CADASTRAL DE PARTICIPANTES DA PESQUISA

“Talassemia alfa Como Causa de Anemias Microcíticas e Hipocrômicas”

Responsáveis:

Prof. Mauro de Meira Mesquita

Prof. Paulo Roberto de Melo Reis

Pf^oa Karla Greyck

Funcionário: Claudio Braz da Silva

Acadêmico: Guilherme Alves de Mesquita

Registro no LAS/CBB – UCG: _____ Data da coleta: ___/___/___

Nome: _____ Idade: ___/___/___

Data de nascimento: ___/___/___ Sexo: M () F () Telefone: _____

Medicamento em uso: Sim () Não () _____

1) Eritrograma:

	Resultados	Valor de Referência
Hemácias	mm ³	
Hematócrito	%	
Hemoglobina	g/dl	
VCM	fl	
HCM	pg	
CHCM	%	
RDW	%	

2) Análise morfológica das hemácias: _____

3) Teste de resistência osmótica: Resistente () Não Resistente ()

4) Pesquisa intraeritrocitária de hemoglobina H: Presente () Ausente ()

5) Pesquisa de corpos de Heinz: Presente () Ausente ()

6) Eletroforese de Hemoglobina:

➤ pH alcalino – Perfil: _____

7) HPLC: