



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Genética

---

**CARLOS FABIÁN MENDIBURU**

***ESTUDO DAS TALASSEMIAS DO TIPO ALFA  
EM DOIS ESTADOS DAS REGIÕES NORDESTE E  
SUDESTE DO BRASIL***

**Dissertação apresentada  
para obtenção do Título  
de Mestre em Genética.**

**Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos**

---

**São José do Rio Preto  
2005**

**Dedico este trabalho:**

**A minha mãe, meu exemplo de vida, por  
todo o amor e apoio.**

**A minha esposa e companheira Luceia,  
pela paciência, amor e carinho.**

**Ao meu filho Lucas, luz da minha vida,  
por aquecer meu coração com cada  
sorriso.**

*Meu mais sincero agradecimento as seguintes pessoas:*

A Dra. **Claudia Bonini Domingos** obrigado pela sua dedicação, paciência; pelas críticas e conselhos, pelo apoio e confiança neste projeto; e por sobre todas as coisas.... obrigado pela liberdade de errar e a oportunidade de crescer ....e, por sobre todo obrigado pela amizade generosa que só uma coração grande como o seu é capaz.

A meus colegas de laboratório, de ontem e de hoje, **Fátima, Paula, Claudia Hidalgo, Ana Regina, Luciane, Vivi, Wanessa e Carol**, pelo companheirismo, pela paciência, por atender minhas inquietudes e, por me ensinar suportando minha infinita ignorância.

Um agradecimento especial a **Gislaine** pela sua dedicação na confecção das tabelas, essenciais na realização deste trabalho. Um agradecimento especial também para **Luciana e Fabrício**, pelas sugestões e auxílio na análise estatística e na impressão deste trabalho.

A minha família... a **Mamá, Jorge, Marcelo, Claudia e Emmanuel**, que apesar das distancias sempre estiveram do meu lado, me deram forças para continuar o caminho empreendido sem importar as dificuldades...A minha mulher Luceia, pelo amor, paciência e compreensão e, a meu filho Lucas, por alegrar meus momentos de repouso.

A meus Amigos, (a ordem é casual a importância es única) **Bicho, Nolo, Andrés, Tono, Waldino, Walter, Calora, Luis (“el negro”), Ñato, Carola, Nidia, Selva, Ulises, Carlos** e a todos aqueles aos quais minha memória tenha traído, obrigado por compartilhar, através das distancias, os momentos mais importantes da minha vida.

..e a todas as pessoas que anonimamente contribuíram para o meu crescimento como profissional e, mais importante, como pessoa.

A todos um infinito **MUCHAS GRACIAS**.

*"Prefiro os erros do entusiasmo a indiferença da sabedoria."*

*Anatole France.*

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b>	<b>11</b>
1. 1 Resenha Histórica	14
1. 2 Localização e Estrutura do Cluster alfa	16
1. 3 Estrutura e Expressão dos Genes de Tipo Alfa	18
1. 4 Base Molecular das Talassemias Alfa	21
1. 5 Fisiopatologia das Talassemias Alfa	26
1. 6 Classificação das Talassemias Alfa	29
1. 6. 1 Portador Silencioso	31
1. 6. 2 Traço de Talassemia Alfa	31
1. 6. 3 Doença de Hb H	32
1. 6. 4 Síndrome de Hidropsia Fetal por Hb Bart's	34
1. 7 Métodos de Estudo	37
1. 7. 1 Índices Eritrocitários	37
1. 7. 2 Eletroforese de Hemoglobinas	38
1. 7. 3 Pesquisa Intraeritrocitária de Hb H	39
1. 7. 4 Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)	40
1. 7. 5 Diagnóstico Molecular das Talassemias Alfa	41
1. 8 Distribuição Geográfica das Talassemias Alfa	43
<b>2 Objetivos</b>	<b>47</b>
<b>3 Material e Métodos</b>	<b>49</b>
3. 1 Casuística	50
3. 2 Detalhamento Técnico	51
3. 2. 1 Preparação de Hemolisados	51
3. 2. 2 Testes de Triagem	52
3. 2. 2. 1 Resistência Globular Osmótica em Solução Cloreto de Sódio a 0,36%	52
3. 2. 2. 2 Análise da Morfologia Eritrocitária	53
3. 2. 2. 3 Eletroforese em Acetato de Celulose pH Alcalino	55
3. 2. 3 Provas Complementares para Talassemia Alfa	56

3. 2. 3. 1	<i>Eletroforese em Acetato de Celulose pH Neutro</i>	56
3. 2. 3. 2	<i>Pesquisa de Corpúsculos de Inclusão de Hb H</i>	59
3. 2. 4	Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)	60
3. 2. 5	Extração de DNA	63
3. 2. 5. 1.	<i>Extração Fenólica por Meio de Sangue Periférico</i>	63
3. 2. 6	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	65
3. 2. 6. 1	<i>PCR Convencional para a Detecção da Deleção -<math>\alpha^{3.7}</math></i>	65
3. 2. 6. 2.	<i>Multiplex-PCR para a Identificação da Deleção -<math>\alpha^{3.7}</math></i>	68
3. 2. 7	Análise Estatística	70
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>71</b>
4. 1	Resultados das Análises Eletroforéticas e Citológicas	72
4. 2	HPLC	72
4. 3	Resultados da Análise Molecular	74
4. 4	Correlação dos Achados Moleculares com os Laboratoriais	77
<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>Apêndices</b>	<b>112</b>
<b>9</b>	<b>Resumo</b>	<b>121</b>
<b>10</b>	<b>Abstract</b>	<b>123</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Molécula de Hemoglobina.....	13
<b>Figura 2.</b> Localização e estrutura do cluster de globina alfa ; e estrutura de um gene alfa.....	17
<b>Figura 3.</b> Ontogenia das cadeias globínicas. Síntese das cadeias globínicas ao longo do desenvolvimento.....	20
<b>Figura 4.</b> A) Representação simplificada do cluster alfa. Representação esquemática da recombinação homóloga desigual proposta para origem da deleção $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ ..	24
<b>Figura 5.</b> Representação das principais deleções que provocam a perda de dois genes alfa ligados ou do cluster alfa completo.....	24
<b>Figura 6.</b> Esquema representando os efeitos fisiopatológicos e eritropatológicos causados pela diminuição na síntese de cadeias de globina alfa na Doença de Hb H. ....	28
<b>Figura 7.</b> Fisiopatologia produzida pela ausência dos genes de globina alfa.....	36
<b>Figura 8.</b> Distribuição Mundial de $\alpha^+$ Talassemia.....	45
<b>Figura 9.</b> Resistência globular osmótica em solução de cloreto de sódio a 0,36%....	54
<b>Figura 10.</b> Esfregaço sangüíneo apresentando discretas alterações dos eritrócitos....	54
<b>Figura 11.</b> Mapa de interpretação dos padrões eletroforéticos em pH alcalino.....	58
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática do padrão de migração de hemoglobinas humanas em pH neutro.....	58
<b>Figura 13.</b> Corpúsculos de inclusão de Hb H (seta) observados após coloração vital com Azul de Cresil brilhante.....	62
<b>Figura 14.</b> Cromatograma de um indivíduo normal e; de um com talassemia alfa...	62
<b>Figura 15.</b> Localização dos <i>primers</i> A, B e C para a detecção da deleção $-\alpha^{3.7}$ .....	67
<b>Figura 16.</b> Localizações dos <i>primers</i> específicos para a identificação da deleção $-\alpha^{3.7}$ por multiplex-PCR.....	69

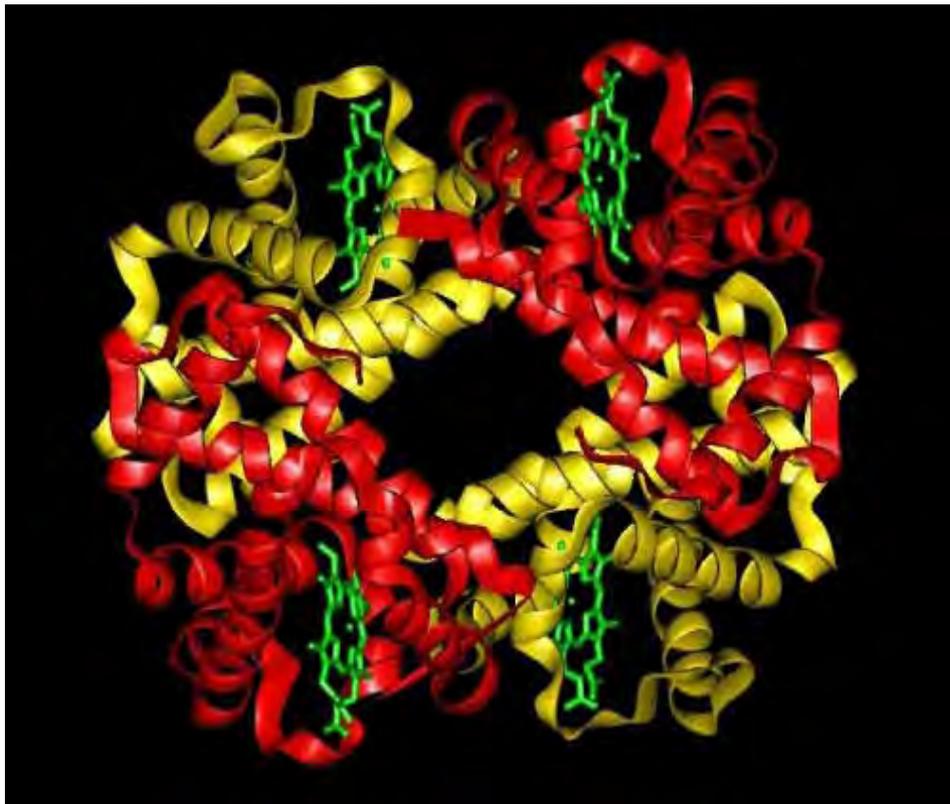
<b>Figura 17.</b> Identificação de Hb H na eletroforese alcalina.....	73
<b>Figura 18.</b> Identificação de Hb H na eletroforese neutra.....	73
<b>Figura 19.</b> Corpúsculos de inclusão de Hb H, após coloração com ACB.....	73
<b>Figura 20.</b> Amostras amplificadas com PCR convencional.....	75
<b>Figura 21.</b> Amostras amplificadas com Multiplex-PCR.....	75
<b>Figura 22.</b> Comparação dos níveis de VCM entre os grupos genotípicos.....	81
<b>Figura 23.</b> Comparação dos níveis de VCM entre os grupos genotípicos.....	81
<b>Figura 24.</b> Comparação dos níveis de Hb A <sub>2</sub> entre os grupos genotípicos.....	84

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1.</b> Constituição de hemoglobinas normais de acordo com o período de desenvolvimento.....	19
<b>Tabela 2.</b> Resultados possíveis da amplificação utilizando os <i>primers</i> A, B e C....	67
<b>Tabela 3.</b> Distribuição dos diferentes genótipos nas duas regiões estudadas.....	76
<b>Tabela 4.</b> Freqüências genotípicas.....	76
<b>Tabela 5.</b> Valores médios de VCM e HCM para cada genótipo das regiões estudadas.....	78
<b>Tabela 6.</b> Comparação dos valores médios de VCM e HCM de cada grupo genotípico pertencentes às duas regiões estudadas.....	78
<b>Tabela 7.</b> Valores médios de VCM e HCM para cada genótipo.....	78
<b>Tabela 8.</b> Valores médios de VCM e HCM.....	80
<b>Tabela 9.</b> Comparação dos valores médios de HCM e VCM entre o grupo $\alpha\alpha/?$ e os grupos heterozigoto e homozigoto.....	80
<b>Tabela 10.</b> Comparação dos valores médios de HCM e VCM entre os grupos genotípicos... ..	80
<b>Tabela 11.</b> Resultado de pesquisa de corpúsculos de inclusão de Hb H.....	83
<b>Tabela 12.</b> Valores médios de Hb A <sub>2</sub> e F para cada grupo genotípico.....	84
<b>Tabela 13.</b> Resultados laboratoriais de homens e mulheres do nordeste normais para a deleção.....	114
<b>Tabela 14.</b> Resultados laboratoriais de homens e mulheres do nordeste heterozigotos para a deleção.....	116
<b>Tabela 15.</b> Resultados laboratoriais de homens e mulheres do nordeste homozigotos para a deleção.....	116
<b>Tabela 16.</b> Resultados laboratoriais de homens e mulheres do sudeste normais para a deleção.....	117
<b>Tabela 17.</b> Resultados laboratoriais de homens e mulheres do sudeste heterozigotas para a deleção.....	121
<b>Tabela 18.</b> Resultados laboratoriais de homens e mulheres do sudeste homozigotas para a deleção.....	121
<b>Quadro 1.</b> Alterações laboratoriais dos diferentes fenótipos de talassemias alfa comparadas com o fenótipo normal.....	30

A função principal dos eritrócitos é o transporte de oxigênio desde os pulmões aos tecidos periféricos. Esta função depende da hemoglobina a qual constitui mais do 90% da proteína solúvel nos glóbulos vermelhos. A molécula de hemoglobina (Hb) é formada por duas cadeias de tipos alfa ( $\alpha$  ou  $\zeta$ ) e duas cadeias de tipo beta ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ou  $\beta$ ), cada uma contendo um grupo prostético heme-(Fe<sup>++</sup>) que pode-se ligar forma reversível ao oxigênio (Figura 1). Portanto, a função do eritrócito depende da síntese balanceada das cadeias globínicas  $\alpha$  e  $\beta$  e, de seu arranjo em um tetrâmero de hemoglobina funcional (LIEBHABER, 1989). O desequilíbrio na síntese destas cadeias globínicas origina as talassemias alfa ou talassemias beta, dependendo da diminuição na síntese de cadeias globínicas alfa ou beta, respectivamente (HONIG; ADAMS, 1986).

Uma definição ampla para as talassemias alfa foi dada por Liebhaber (1989): “A *talassemia alfa* é uma anemia hereditária que resulta da síntese deficiente de globina alfa. A falta de globinas alfa decorre na produção insuficiente de hemoglobina normal, e ao acúmulo de tetrâmeros instáveis  $\gamma_4$  (Hb Bart's) ou  $\beta_4$  (Hb H) com a conseqüente destruição acelerada de glóbulos vermelhos. A *talassemia alfa* pode ser herdada ou adquirida e, pode ser originada por defeitos em um ou mais dos quatro genes de globina alfa”.



**Figura 1.** Molécula de Hemoglobina; vermelho: cadeias beta; amarelo: cadeias alfa; verde: grupos heme (PUTKEY, 2000).

### **1.1 Resenha Histórica.**

Os primeiros relatos científicos das formas mais graves de talassemia alfa (Doenças de Hb H e Hidropsia Fetal por Hb Bart's), foram realizados em meados de 1950 e início de 1960, a partir da associação entre hemoglobinas anormais (Hb H e Hb Bart's) com anemia microcítica hipocrômica em ausência de deficiência de ferro<sup>1</sup>. Nessa época, a introdução da eletroforese nos laboratórios de pesquisa de hemoglobinopatias permitiu identificar uma hemoglobina mais rápida que a Hb A, posteriormente denominada Hb H. No mesmo paciente, foram observados precipitados intra-eritrocitários nos esfregaços de sangue corados com Azul Cresil Brilhante, coloração utilizada rotineiramente na contagem de reticulócitos. Associou-se, portanto, a Hb H presente na eletroforese com os precipitados intra-eritrocitários. Estudos posteriores mostraram que a Hb H era um tetrâmero instável, formado por cadeias globínicas beta ( $\beta_4$ ), com uma afinidade pelo oxigênio dez vezes maior que a Hb A (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998).

Mais tarde, em estudos com sangue de cordão umbilical, identificou-se uma nova Hb anormal, eletroforéticamente mais rápida que a Hb A e mais lenta que a Hb H. Esta nova hemoglobina foi chamada de Hb Bart's por ter sido descoberta no Hospital São Bartolomeu de Londres. A Hb Bart's, formada unicamente por cadeias gama ( $\gamma_4$ ), apresentava problemas fisiológicos similares aos da Hb H (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998).

A identificação dos tetrâmeros formados pelas cadeias de tipo beta (Hb H e Hb Bart's), nas formas mais graves de talassemia alfa, proporcionaram a primeira evidência de que esta condição era provocada pela síntese deficiente de cadeias globínicas alfa<sup>2</sup>. Sugerindo que se tratava de uma doença

---

<sup>1</sup> MINNICH et al., 1954; RIGAS et al., 1955; GOUTTAS et al., 1955; LIE-INJO et al., 1960 apud HIGGS, 1989.

<sup>2</sup> JONES et al., 1959; KEKWICK; LEHMANN, 1960; HUEHNS et al., 1960; RAMOT et al., 1959; DANCE et al., 1963 apud HIGGS et al., 1989.

causada por defeitos nos genes alfa. No entanto, foi mais complicado entender a base genética desta doença que das outras hemoglobinopatias, principalmente devido ao fato de que, os parentes de indivíduos com Doença de Hb H e Hidropsia Fetal por Hb Bart's, também portadores de talassemias alfa, apresentavam uma expressão fenotípica variável. Isto levou a diferenciar os portadores nos tipos moderado ( $\alpha$ -talassemia 2) e grave ( $\alpha$ -talassemia 1), segundo o nível de Hb Bart's presente ao nascimento ou ao grau de anormalidade nos índices hematológicos (HIGGS et al., 1989).

Em 1965, foi possível medir a taxa de síntese das cadeias alfa e beta, observando-se uma progressiva diminuição das cadeias alfa nos indivíduos portadores de Doença de Hb H e Hidropsia Fetal por Hb Bart's, respectivamente<sup>3</sup>.

A análise molecular das talassemias alfa foi inicialmente difícil de ser realizada, pelo desconhecimento do número de genes alfa. Baseados na observação de mutantes estruturais sugeriu-se que o indivíduo normal possuía quatro genes alfa<sup>4</sup>. Estudos moleculares confirmaram efetivamente a presença de quatro genes alfa no indivíduo normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), dois em cada um dos cromossomos 16, e a falta de um ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ), dois ( $-\alpha/-\alpha$  ou  $--/\alpha\alpha$ ), três ( $-\alpha/--$ ) ou quatro ( $--/--$ ) genes alfa nas formas talassêmicas<sup>5</sup>.

---

<sup>3</sup> KAN et al., 1968; POOTRAKUL et al., 1975; WEATHERALL et al., 1965; WEATHERALL et al., 1970 apud HIGGS et al., 1989.

<sup>4</sup> HOLLAN et al., 1972; MELONI et al., 1980 apud HIGGS et al., 1989.

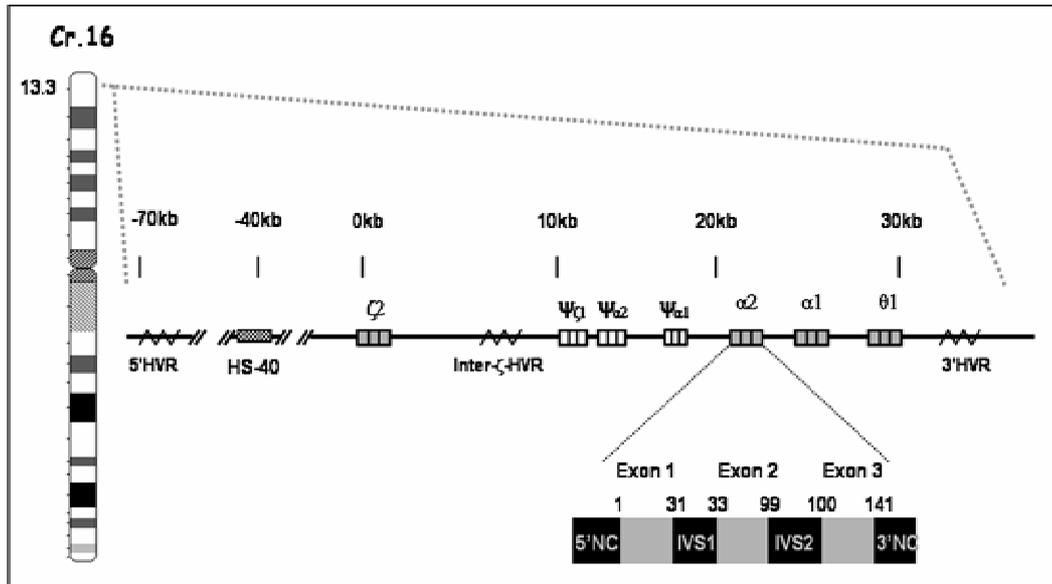
<sup>5</sup> OLTTOLENGHI et al., 1974; TAYLOR et al., 1974; KAN et al., 1975; OLD et al., 1983 apud HIGGS et al., 1989.

## 1. 2 Localização e estrutura do *Cluster alfa*

O agrupamento dos genes globínicos do tipo alfa ou “*Cluster alfa*”, com aproximadamente 29 Kb, localiza-se na porção distal (13p13.3) do braço curto do cromossomo 16. Este inclui um gene de expressão embrionária ( $\zeta$ ), três pseudogenes ( $\psi\zeta$ ,  $\psi\alpha_1$ ,  $\psi\alpha_2$ ), dois genes idênticos de expressão fetal e adulta ( $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ ), e um gene ( $\theta_1$ ) de função desconhecida; arranjados na seqüência 5'  $\zeta_2$ - $\psi\zeta_1$ - $\psi\alpha_2$ - $\psi\alpha_1$ - $\alpha_2$ - $\alpha_1$ - $\theta_1$  3' (Figura 2) (HONIG; ADAMS, 1986; SHAW et al., 1987; HIGGS, 1989).

Vários segmentos de DNA repetidos em *tandem* (minisatélites) encontram-se distribuídos dentro e adjacentes ao *cluster* alfa. Estes foram inicialmente identificados como regiões hiper-variáveis (HVRs: *Hypervariable regions*), localizadas no extremo 3' do *cluster* ( $\alpha$ -globina 3'HVR); entre o gene  $\zeta_2$  e pseudogene  $\psi\zeta_1$  (interzeta-HVR); dentro dos introns (IVS1 e IVS2) dos genes de tipo  $\zeta$  e a 70 Kb acima do gene  $\zeta$  (5'HVR) (Figura 2) (HIGGS et al., 1981; JARMAN et al., 1986; JARMAN; HIGGS, 1988; HIGGS, 1990).

Aproximadamente a 40 Kb acima do *cluster* alfa existe uma região conhecida como HS-40, contendo vários sítios hipersensíveis a ação da enzima DNase (HS: *Hight Sensibility*) e de ligação a fatores de transcrição (Figura 2). Deleções naturais nesta região silenciam a expressão dos genes alfa, demonstrando que sua integridade é essencial para a expressão regulada dos genes do *cluster*. Os indivíduos portadores destas mutações apresentam um fenótipo alfa talassêmico (HIGGS et al., 1990; JARMAN et al., 1991; WAYE; CHUI, 2001).



**Figura 2.** Localização e estrutura do cluster de globina alfa (parte superior da figura); e estrutura de um gene alfa (parte inferior direita) (Adaptado de VOGEL; MOTULSKY, 1997).

### 1. 3 Estrutura e expressão dos genes de tipo alfa

Os genes tipo alfa possuem a mesma estrutura, comum a todos os genes globínicos, de três exons separados por dois introns. Nos genes alfa, o exon 1 codifica os primeiros 31 aminoácidos, enquanto que o exon 2 codifica os seguintes 67 aminoácidos e o exon 3 os 42 aminoácidos finais da cadeia polipeptídica de 141 aminoácidos (LAUER; SHEN; MANIATIS, 1980).

Os genes de tipo alfa evoluíram por meio de duplicações e divergência de sequência e, apesar de, os genes  $\alpha$  e  $\zeta$  mostrarem uma homologia de só 58%, os genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  são altamente homólogos. As divergências entre os genes alfa limitam-se as regiões não codificantes (IVS I e região 3' não codificante), como consequência produzem cadeias polipeptídicas idênticas. Um mecanismo de “evolução concertada”, por meio da qual, genes alfa seriam trocados de um cromossomo para outro por um processo de conversão gênica ou recombinação homóloga desigual, tem sido proposto como o responsável pela manutenção da homologia entre os genes alfa (LIEBHABER; GOOSSENS; KAN, 1981; HIGGS et al., 1984; HONIG; ADAMS, 1986).

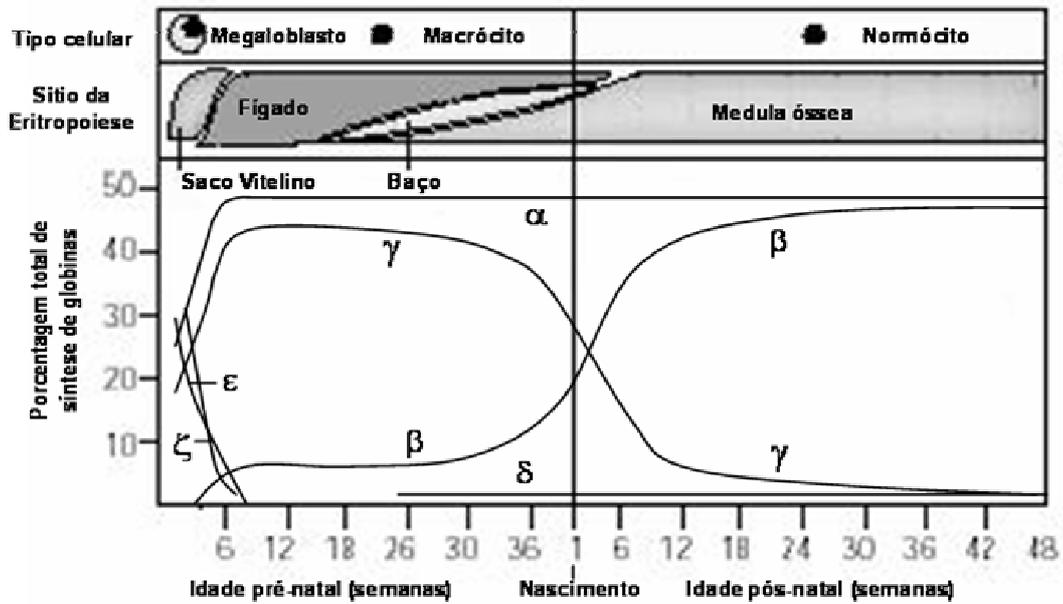
Apesar dos genes alfa produzirem polipeptídeos idênticos, estudos com os transcritos, demonstraram que o gene  $\alpha_2$  codifica de duas a três vezes mais proteína que o gene  $\alpha_1$ . Conseqüentemente, mutações no gene  $\alpha_2$  estão associadas a fenótipos mais graves de talassemia alfa (ORKIN; GOFF, 1981; LIEBHABER; KAN, 1981; LIEBHABER; CASH; BALLAS, 1986).

Durante a ontogenia das hemoglobinas, os genes do tipo alfa são expressos na mesma sequência em que estão localizados ao longo do *cluster*. O gene  $\zeta$  se expressa nas primeiras cinco semanas de desenvolvimento embrionário, nos eritroblastos primitivos do saco vitelino. As globinas  $\zeta$  associam-se com as globinas de tipo beta épsilon ( $\epsilon$ ) para formar a Hb Gower-I ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), primeiro tetramero de hemoglobina detectado no embrião. Em seguida forma-se a Hb

Portland-I ( $\zeta_2\gamma_2$ ) ao aumentar a síntese das cadeias globínicas  $\gamma$  (LIEBHABER, 1989). A partir da sexta semana de desenvolvimento, a eritropoese começa a ter lugar principalmente no fígado fetal. A transcrição dos genes  $\zeta$  decresce, ao mesmo tempo em que a transcrição dos genes alfa ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) é ativada, funcionando desde a vida fetal até adulta. As globinas alfa combinam-se com as globinas do tipo beta e dão origem a Hb Gower-II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) ainda no período embrionário, a Hb Fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ) no período com o mesmo nome, e as hemoglobinas A e A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\beta_2$  e  $\alpha_2\delta_2$ ) características do período adulto (WEATHERALL; CLEGG, 1981). Na Tabela 1, detalha-se as hemoglobinas presentes nos diferentes períodos do desenvolvimento e suas respectivas porcentagens e, a Figura 3 ilustra a ontogenia das cadeias globínicas em cada uma das fases do desenvolvimento

**Tabela 1-** Constituição de hemoglobinas normais de acordo com o período de desenvolvimento (HONIG; ADAMS, 1986).

<b>Embrionário</b>	<b>Fetal</b>	<b>Adulto</b>
Gower I ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ) 20-40 %	Fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ) 90-100 %	A ( $\alpha_2\beta_2$ ) 96-98 %
Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) 5-20 %	A ( $\alpha_2\beta_2$ ) 5-10 %	A <sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) 2,5-3,5 %
Gower II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) 10-20 %	A <sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) 0	Fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ) 0-1,0 %



**Figura 3.** Ontogenia das cadeias globínicas. Síntese das cadeias globínicas ao longo do desenvolvimento (FUCHAROEN; WINICHAGOON, 2002)

#### 1. 4 Base Molecular das Talassemias alfa

As lesões moleculares, responsáveis pelas talassemias alfa, podem ser caracterizadas como defeitos  $\alpha^+$  ou  $\alpha^0$ , se afetam parcial ou completamente a produção de cadeias alfa, respectivamente <sup>6</sup>.

Mais de 95% dos fenótipos de talassemia alfa são resultado de grandes deleções (3-100Kb), as quais removem de um a quatro genes alfa. Porém, ao menos 48 mutações não delecionais, a maioria localizada no gene  $\alpha_2$ , têm sido relatadas causando talassemia  $\alpha^+$  (ORON-KARNI et al., 2000) <sup>7</sup>.

Entre as deleções podemos distinguir três grupos, aquelas que eliminam um único gene alfa ( $\alpha$ -talassemia-2 ou  $\alpha^+$ -talassemia), aquelas que eliminam os dois genes alfa ou até o *cluster* por completo ( $\alpha$ -talassemia-1 ou  $\alpha^0$ -talassemia) e as deleções afetando o HS-40 (KATTAMIS et al., 1996). As deleções  $\alpha$ -talassemia-2 ( $\alpha^+$ ) são as mais comuns das  $\alpha$ -talassemias, com duas formas predominantes ( $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ ) distribuídas ao redor do mundo (EMBURY et al., 1980; KATTAMIS et al., 1996; BAYSAL; HUISMAN, 1994).

Os genes  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  estão localizados dentro de dois segmentos duplicados altamente homólogos, de 4 Kb de longitude, cuja identidade de seqüência foi mantida ao longo da evolução por eventos de conversão gênica e recombinação homóloga desigual. Estes segmentos foram subdivididos em três sub-segmentos homólogos (X, Y e Z) separados por regiões não homólogas (I, II e III). Estando as regiões duplicadas Z separadas por 3.7 Kb e, as regiões duplicadas X por 4.2 Kb (Figura 4, A) (LAUER; SHEN; MANIATIS, 1980; ZIMMER et al., 1980; HIGGS et al., 1984; HESS; SCHIMID; CHEN, 1984).

---

<sup>6</sup> KATTAMIS et al, 1996; PROVAN; GRIBBEN; 2000 apud NEISHABURY et al., 2001.

<sup>7</sup> <http://.globin.cse.psu.edu>

A deleção de 3.7 Kb, conhecida como deleção direita (*rightward deletion*), é causada pelo pareamento errôneo e recombinação homóloga desigual entre regiões homólogas Z não correspondentes. Como resultado deste evento, gera-se um cromossomo com um gene alfa a menos ( $-\alpha$ ), responsável pela talassemia, e outro com três genes alfa ( $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$ ) (Figura 4, B, i) (HIGGS et al., 1980; GOOSSENS et al., 1980; HIGGS et al., 1984). Existem três tipos de rearranjos  $-\alpha^{3.7}$  ( $-\alpha^{3.7I}$ ,  $-\alpha^{3.7II}$  e  $-\alpha^{3.7III}$ ) dependendo do ponto exato do segmento Z onde ocorre à recombinação (LIEBHABER, 1989). Esta deleção é comum em todas as áreas talassêmicas do mundo, sendo mais prevalente entre indivíduos africanos, mediterrâneos e asiáticos (EMBURY, 1980; FOGLIETTA, 1996; OLD 2003).

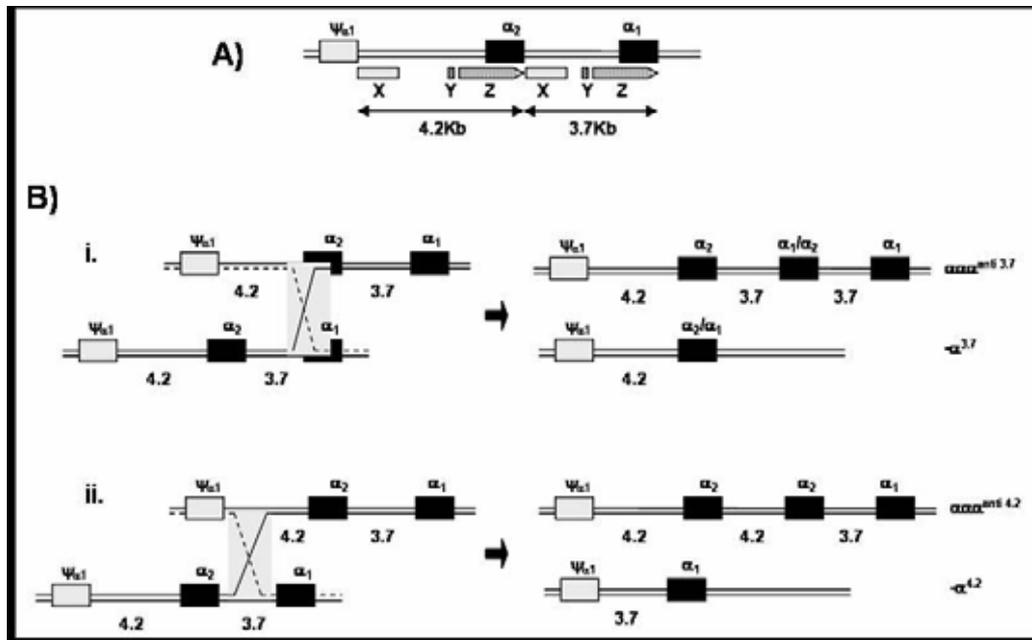
O alinhamento errôneo e, a recombinação homóloga desigual entre as regiões homólogas X, separadas por 4.2 Kb, dá origem ao alelo  $-\alpha^{4.2}$ . Esta deleção, também conhecida como deleção esquerda (*leftward deletion*), origina um cromossomo portando a deleção de um gene alfa ( $-\alpha^{4.2}$ ) e outro com três genes alfa ( $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 4.2}$ ) (Figura 4, B, ii) (HIGGS et al., 1984). A deleção  $-\alpha^{4.2}$  é encontrada principalmente no Sudoeste da Ásia, mas também foi relatada em outras populações como nas ilhas do pacífico, em negros, mediterrâneos, dentre outros (EMBURY, 1980; LIEBHABER 1989; OLD, 2003)

Além das deleções  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ , uma variedade mais extensa, porém menos freqüente de deleções, ocorre dentro do *cluster* alfa, afetando adversamente a expressão dos genes. Algumas deleções provocam a perda de ambos dos genes  $\alpha$  deixando o gene  $\zeta$  intacto (Ex.  $--^{5.2}$ ,  $--^{\text{SEA}}$ ,  $-(\alpha)^{20.5}$ ,  $--^{\text{MED}}$ ), enquanto que outras deleções maiores, eliminam o cluster alfa por inteiro (Ex.  $--^{\text{FIL}}$ ,  $--^{\text{THAI}}$ ,  $--^{\text{HW}}$ ) (WINICHAGOON et al., 1984; FISCHER-GHODSTAN et al., 1988; FORTINA et al., 1988). Na Figura 5 estão representadas estas e outras deleções. As responsáveis pela  $\alpha$ -talassemia-1 são de limitada distribuição geográfica e, excetuando  $--^{\text{SEA}}$  de origem asiática,  $-(\alpha)^{20.5}$  e  $--^{\text{MED}}$  encontradas no Mediterrâneo, esporádicas e identificadas em famílias isoladas (WINICHAGOON et al., 1984;

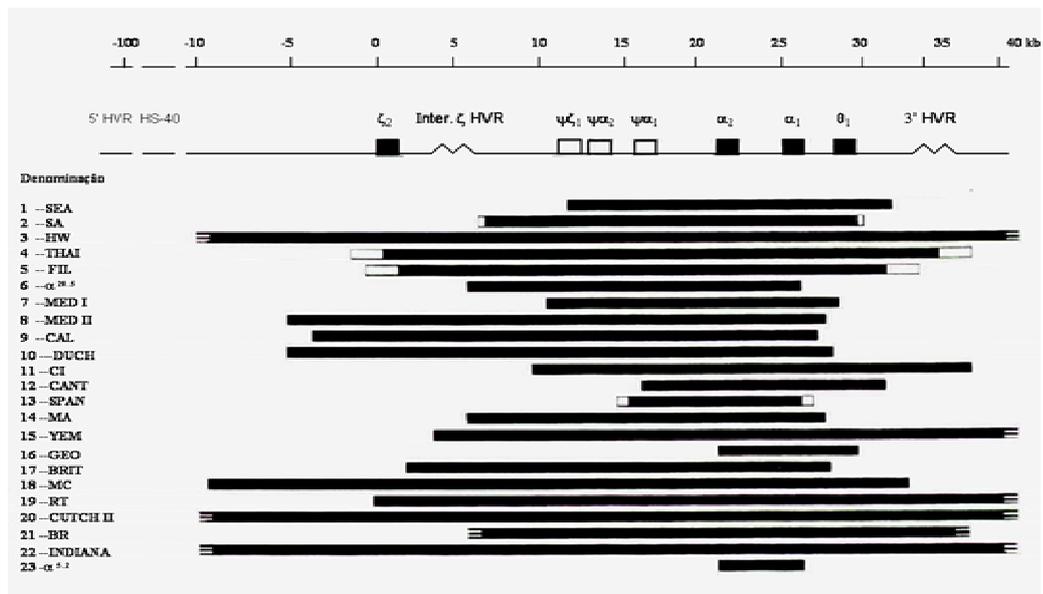
FISCHEL-GHODSIAN et al., 1988; FORTINA et al., 1988, KATTAMIS et al., 1996).

Os mecanismos responsáveis pelas grandes deleções não estão claramente definidos. Análises realizadas nos pontos de ruptura sugerem que algumas destas deleções podem ser produzidas por recombinação entre regiões curtas de seqüências homólogas dentro e ao redor do *cluster* (NICHOLLS et al. 1985; NICHOLLS; FISCHEL-GHODSIAN; HIGGS, 1987). Análises de seqüências mostraram que membros da família de repetições *Alu* estão presentes dentro ou próximos aos pontos de quebra (W.H.O., 1987).

Além das deleções que afetam diretamente os genes do tipo alfa, foram descritas quatro deleções (RA, TI, IJ e MM) que removem a região reguladora HS-40, deixando os genes estruturalmente intactos (HATTON et al., 1990; LIEBHABER et al., 1990; WILKIE et al., 1990; ROMAO et al., 1991). Os portadores destas deleções possuem um fenótipo similar ao dos portadores de  $\alpha^0$  – talassemia, sugerindo que ambos os genes alfa, no mesmo cromossomo, estão sub-regulados ou completamente inativos, confirmando a importância crítica desta região na expressão dos genes do tipo alfa *in vivo* (SILVESTRONI-BIANCO, 1998; WAYE; CHUI, 2001).



**Figura 4.** A) Representação simplificada do cluster alfa, destacando com barras os segmentos homólogos X, Y e Z. B). Representação esquemática da recombinação homóloga desigual proposta para origem da deleção  $-\alpha^{3.7}$  (i) e  $-\alpha^{4.2}$  (ii) (Adaptado de KAZAZIAN,1990)



**Figura 5.** Representação das principais deleções que provocam a perda de dois genes alfa ligados ou do cluster alfa completo (SILVESTRONI-BIANCO, 1998).

As formas não deletoriais de talassemias alfa envolvem mutações de ponto e pequenas deleções ou inserções, e são indicadas genericamente como  $\alpha^T$ . Mais de 30 destas mutações são citadas na base de dados de mutações no gene de globina humano (<http://globin.cse.psu.edu>). As mutações afetam principalmente o gene alfa 2. Essa distribuição diferencial pode ser explicada pelo fato de que, mutações neste gene são fenotipicamente mais graves que mutações no gene alfa 1, permitindo seu rápido reconhecimento e estudo (LIEBHABER, 1989; CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003).

A maioria das mutações não deletoriais afetam etapas críticas da expressão gênica, como o processamento e tradução do RNA mensageiro, levando, em alguns casos, como na Hb Constant Spring (transição T>C no códon 142 TAA>CAA do gene  $\alpha_2$ ) e Hb Pakse (transversão A>T no códon 142 TAA>TAT do gene  $\alpha_2$ ) à produção de cadeias alfa anormalmente alongadas. A mutação Constant Spring é a forma não deletorial mais freqüente, com prevalência no sudeste da Ásia. Outras mutações produzem hemoglobinas ou cadeias alfa altamente instáveis, tais como Hb Arginio, Hb Suan-Dok, Hb Quong Sze, e Hb Pak Num Pó, e levam a um fenótipo alfa talassêmico (LIEBHABER, 1989; KANAVAKIS, 2000; CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003).

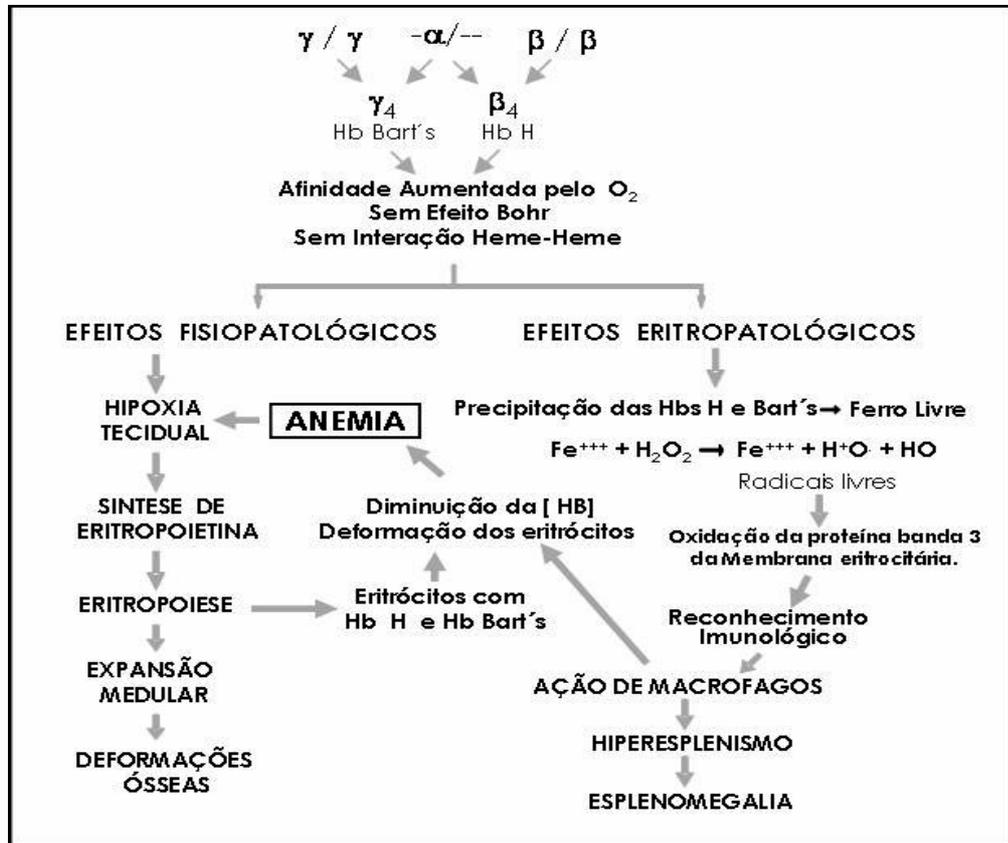
### 1. 5 Fisiopatologia das Talassemias Alfa

A síntese balanceada de cadeias do tipo alfa e beta é essencial para a formação dos diferentes tipos de hemoglobinas em cada período do desenvolvimento. Com a diminuição da síntese de globinas alfa, as cadeias de tipo beta, que deveriam parear com estas para formar o tetrâmero de hemoglobina, ficam em excesso. Neste estado, as cadeias do tipo beta pareiam-se formando homo-tetrâmeros. Durante o desenvolvimento fetal, as cadeias de globina  $\gamma$  formam tetrâmeros  $\gamma_4$  (Hb Bart's), enquanto que, nos adultos, as cadeias  $\beta$  excedentes formam tetrâmeros  $\beta_4$  (Hb H). Estas hemoglobinas possuem uma elevada afinidade pelo oxigênio, carecem de interação heme-heme e de efeito Bohr, sendo incapazes de liberar eficientemente oxigênio nos tecidos, provocando hipóxia (CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003).

Além da elevada afinidade pelo oxigênio, estas hemoglobinas são relativamente instáveis, podendo precipitar na membrana celular eritrocitária. A presença de subunidades hemoglobínicas dispara uma reação oxidativa em cadeia que gera espécies reativas de oxigênio, assim como radicais superóxido e hidroxila. Os radicais livres provocam danos nos componentes da membrana celular, principalmente em proteínas do citoesqueleto, essenciais para a sustentação da membrana, e nos fosfolipídios (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998; RUND; RACHMILEWITZ, 2001). A proteína *banda 3* é a principal afetada. Lesões nesta proteína, que funciona como bomba aniônica e sítio de ancoragem para proteínas do esqueleto celular, afetam a estrutura do citoesqueleto tornando os eritrócitos mais rígidos que os normais, o que dificulta sua passagem através da microvasculatura (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998; DONDORP et al., 1999). Em algumas situações, as lesões também podem afetar a função de bomba aniônica desta proteína, levando a uma hiperhidratação e conseqüente aumento do volume eritrocitário (BUNYARATVEJ et al., 1994; KANAVAKIS et al., 2000).

O estresse oxidativo, produzido pelos radicais livres na membrana celular, pode afetar a distribuição dos fosfolipídios na membrana (KUYPERS et al., 1998). A perda da assimetria normal da membrana citoplasmática, particularmente a exposição de fosfatidilserina na superfície externa das células talassêmicas, provavelmente media a apoptose eritroblástica intramedular e a fagocitose dos eritrócitos anormais ou envelhecidos pelos macrófagos do Sistema Reticulo Endotelial, provocando a destruição precoce dos eritrócitos e hiperesplenismo (CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003).

A diminuição da concentração de hemoglobina, produzida pela síntese deficiente de globina alfa, a incapacidade de liberar oxigênio no tecidos das hemoglobinas H e Bart's, e a destruição prematura dos eritrócitos (hemólise) provocada pela formação dos tetrâmeros instáveis (Hb H e Bart's) levam a anemia. A hipóxia tecidual provocada pela anemia induz a síntese de eritropoetina com o objetivo de estimular a produção de novos eritrócitos e sanar a anemia. Porém, como a talassemia alfa é uma desordem genética, os novos eritrócitos produzidos carregam os mesmos problemas que os anteriores. A medula óssea, sob o estímulo constante da eritropoetina pode, nos casos mais graves de talassemia alfa, levar a expansão medular e deformidades ósseas (CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003). Na Figura 6 representa-se a fisiopatologia das talassemias alfa, tomando como exemplo a Doença de Hb H.



**Figura 6.** Esquema representando os efeitos fisiopatológicos e eritropatológicos causados pela diminuição na síntese de cadeias de globina alfa na Doença de Hb H. (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998).

## **1. 6 Classificação das Talassemias Alfa**

É possível dividir as talassemias alfa em quatro categorias fenotípicas: Portador silencioso (três genes alfa funcionais); Traços de talassemia alfa (dois genes alfa funcionais); Doença de Hb H (um gene alfa funcional) e Hidropisia fetal por Hb Bart's (nenhum gene alfa funcional). No entanto, pode existir superposição entre estes grupos, devido a gama de expressão clínica de cada grupo, decorrente da variabilidade genética. A expressão clínica pode variar de mudanças sutis, apenas distinguíveis do normal, a formas graves e incompatíveis com a vida como, no caso da Síndrome de Hidropsia fetal por Hb Bart's (W.H.O., 1987; HIGGS et al., 1989; KAZAZIAN, 1990).

A expressão fenotípica das talassemias alfa está diretamente relacionada ao grau de redução da síntese de globina alfa, sendo que três grandes fatores estão envolvidos na determinação do fenótipo: 1) número de genes afetados, 2) grau de diminuição na expressão (parcial o total) e, 3) quanto o gene afetado contribui para a síntese de globina alfa. Como a expressão do gene alfa 2 é maior que a do gene alfa 1, alterações neste gene produzirão um efeito fenotípico mais grave. De forma geral, a perda de um único gene pode resultar em, uma diminuição leve, moderada ou grave, da síntese de globina alfa, dependendo de como ocorre esta perda (deleção ou não deleção) e que loci está envolvido (alfa 1 ou. alfa 2) (LIEBHABER, 1989; HIGGS et al., 1989; KAZAZIAN, 1990). No Quadro 1, encontram-se resumidas as alterações laboratoriais da cada categoria fenotípica em comparação ao normal.

**Quadro 1.** Alterações laboratoriais dos diferentes fenótipos de talassemias alfa comparadas com o fenótipo normal (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998)

FENÓTIPO	HbAA	Portador Silencioso	Traço Talassêmico	Doença de Hb H	Hidropsia Fetal
<b>Genes Alfa Funcionais</b>	4 ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ )	3 ( $-\alpha/\alpha\alpha$ )	2 ( $--/\alpha\alpha$ )	1 ( $---/\alpha$ )	0 ( $---/--$ )
<b>Hb Bart's ao nascimento (%)</b>	Zero	0-2	2-10	10-40	80-100
<b>Hb H (%)</b>	Zero	traços	2-5	5-20	0-20
<b>Inclusões de Hb H nos eritrócitos</b>	Zero	1-3/5000	1-10/5000	20-100/5000	1000/5000
<b>VCM (fl)</b>	76-95	74-85	72-80	60-72	80-100
<b>HCM (pg)</b>	27-33	25-30	23-28	18-23	<18
<b>Hb (g/dl)</b>	12-16	11-15	10-13	8-10	<7
<b>Microcitose</b>	0	0/+	+	++/+++	+++
<b>Hipocromia</b>	0	0/+	+	++/+++	+++
<b>Poiquilocitose</b>	0	0	0/+	++/+++	+++
<b>Eritroblastos</b>	0	0	0	0/+	++/+++

0: ausente; +: presente em grau discreto; ++: moderado; +++: acentuado.

### ***1. 6. 1 Portador Silencioso***

É originado pela perda de um único gene alfa ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ), sendo a deleção  $-\alpha^{3.7}$  a principal responsável por esta condição. O portador silencioso é assintomático e, apesar dos parâmetros hematológicos, tais como a concentração de hemoglobina, índices eritrocitários e número de glóbulos vermelhos estarem dentro dos limites de normalidade, é possível observar uma discreta microcitose e hipocromia (LIEBHABER, 1989).

Na eletroforese de hemoglobinas, podem ser observados traços de Hb H nos indivíduos adultos e de Hb Bart's nos recém-nascidos. A pesquisa intraeritrocitária dos corpúsculos de inclusão de Hb H, após incubação com Azul Cresil Brillhante pode revelar em média 1 a 3 células positivas para cada cinco mil células avaliadas (LIEBHABER, 1989, NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998). Porém, nem sempre é possível detectar um número de células tão baixo (CLARKE; HIGGINS, 2000).

### ***1. 6. 2 Traço de Talassemia Alfa***

Esta condição resulta da heterozigose para um determinante de alfa talassemia<sup>0</sup> ( $-/\alpha\alpha$ ) ou, como homozigoto ( $-\alpha/-\alpha$ ) ou duplo heterozigoto ( $-\alpha/\alpha-$ ) para determinantes de alfa talassemia<sup>+</sup>, originados por deleção ou não. O homozigoto para a deleção de 3.7 Kb ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ) é a forma mais freqüente para este tipo de alteração (W.H.O., 1987; LIEBHABER, 1989).

Os indivíduos com traço talassêmico são freqüentemente normais do ponto de vista clínico. No entanto, podem apresentar discretas alterações hematológicas e clínicas, como modificação na morfologia eritrocitária, leve grau de anemia e microcitose (VCM entre 72-80fl) (LIEBHABER,

1989). Alguns indivíduos com traço talassêmico, especialmente crianças, apresentam anemia moderada, que junto com uma microcitose moderada, podem levar a um diagnóstico errôneo de anemia por deficiência de ferro (KAZAZIAN, 1990).

Na eletroforese de hemoglobinas, a Hb H pode ser observada em concentrações baixas, de 2 a 5 %, ou estar ausente nos indivíduos adultos, enquanto que a Hb Bart's pode estar presente em concentrações de 2 a 10% nas amostras de recém-nascidos (EMBURY, 1980 apud LIEBHABER, 1989; NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998).

Em aproximadamente 60% dos indivíduos com traço de talassemia alfa pode-se observar, em número bastante reduzido (1-10 em cada 5000 células analisadas), células contendo corpúsculos de inclusão de Hb H (GALANELLO et al, 1984; HIGGS et al, 1989). Os portadores de traço talassêmico, apesar de serem normais do ponto de vista clínico, podem apresentar: fraqueza, cansaço, dores nas pernas e palidez. (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998).

### **1. 6. 3 Doença de Hb H**

A doença de Hb H é a forma mais grave de talassemia alfa compatível com a vida. As Doenças de Hb H produzidas por duas deleções, uma  $\alpha^+$  e outra  $\alpha^0$  (ex,  $-\alpha^{3.7}/--^{MED}$  ou  $-\alpha^{4.2}/--^{SEA}$ ) são conhecidas como Doenças de Hb H delecionais, enquanto que, aquelas produzidas pela combinação de uma deleção  $\alpha^0$  e uma mutação não delecional (ex.  $--^{MED}/\alpha^{CS}\alpha$ ), são conhecidas como Doenças de Hb H não delecionais (KANAVAKIS et al., 2000; WAYE et al., 2001).

A gravidade da doença está diretamente relacionada com o nível de supressão da síntese de cadeias de globina alfa, que varia com as diferentes combinações de mutantes. Tem-se observado que, em geral, pacientes com defeitos não delecionais, afetando predominantemente o gene alfa 2,

interagindo com um determinante de talassemia  $\alpha^0$  ( $--/\alpha\alpha^T$  ou  $--/\alpha^{CS}\alpha$ ) possuem maior nível de Hb H, com hemoglobinas totais diminuídas e um quadro clínico mais grave que os pacientes com genótipo  $--/\alpha$  (W.H.O., 1987; LIEBABHER, 1989). Em alguns casos, indivíduos com a mesma base molecular podem ter diferente curso clínico, indicando que outros fatores genéticos e mesmo ambientais podem ser importantes na variação clínica e hematológica (MIRABILE et al., 2000; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

O quadro clínico dos pacientes com Doença de Hb H varia de uma anemia moderada até uma anemia dependente de transfusões. Porém o quadro mais comum é de uma talassemia intermédia, com anemia microcítica hipocrômica, icterícia e hepato-esplenomegalia. Uma vez que o principal mecanismo da anemia é a hemólise, muito mais que a eritropoese ineficaz, unicamente 35% dos pacientes apresentam marcada expansão medular (W.H.O., 1987).

Nas análises eletroforéticas de sangue de indivíduos adultos, a Hb H pode ser observada em concentrações que chegam a até 20%. Entretanto, em amostras de recém-nascidos, a Hb Bart's está presente em concentrações que variam de 10 a 40%. Os precipitados intra-eritrocitários de Hb H são facilmente visíveis, podendo-se observar várias células com precipitado em um mesmo campo microscópico (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998). Pode haver uma redução nos níveis de hemoglobina total, hemoglobina corpuscular média (HCM) e volume corpuscular médio (VCM); acompanhados, em alguns casos, de reticulocitose, policromasia e moderada anisopoiquilocitose (W.H.O., 1987; KATTAMIS et al., 1988; HIGGS et al., 1989, NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998).

Algumas complicações que podem ocorrer nos portadores desta doença são: esplenomegalia grave com hiperesplenismo; anemia aguda devido a episódios hemolíticos, em resposta a drogas, infecções, febre ou

ingestão de componentes oxidativos; presença de úlcera nas pernas; cálculos biliares; deficiência de folatos; alterações ósseas ou de crescimento; retinopatias; tumores hematopoéticos extramedulares; risco de processos tromboembólicos <sup>8</sup> (W.H.O., 1987; HIGGS et al., 1989).

Na gravidez usualmente há um aumento na intensidade da anemia, possivelmente relacionado ao aumento do volume sangüíneo. Em determinadas ocasiões, o nível de Hb pode diminuir consideravelmente fazendo necessário o uso de transfusões para manter a saúde da mãe e do feto em desenvolvimento. Outras complicações como pré-eclampsia, falha cardíaca congestiva, aborto e morte perinatal em prematuros têm sido observadas (VAEUSORN; FUCHAROEN; WASI, 1988; GALANELLO et al., 1992).

#### ***1. 6. 4 Síndrome de Hidropisia Fetal por Hb Bart's***

A forma mais grave de talassemia alfa é a Síndrome de Hidropisia Fetal por Hb Bart's. O feto afetado herdado deleções que removem todos os genes alfa (--/--). Nestes indivíduos, as cadeias de globina  $\gamma$  formam homo-tetrâmeros  $\gamma_4$  (Hb Bart's) incapazes de liberar oxigênio nos tecidos. Os fetos homozigotos para deleções que eliminam o gene embrionário  $\zeta$  junto com os genes alfa (ex.  $^{-FIL}/^{-FIL}$ ) são incapazes de produzir qualquer tipo de hemoglobina funcional e, portanto sucumbem por hipóxia grave ainda no início da gestação. Por outro lado, os fetos portando ao menos um gene embrionário  $\zeta$  (ex.  $^{-SEA}/^{-FIL}$  ou  $^{-EA}/^{-SEA}$ ) sintetizam pequenas quantidades de Hb Portland 1, a qual é suficiente para mantê-los vivos ao longo do segundo e terceiro trimestre de gestação. Porém, a quantidade desta hemoglobina é insuficiente para acompanhar o rápido crescimento e desenvolvimento do feto, especialmente no terceiro trimestre. Finalmente, os fetos

---

<sup>8</sup> DANESHMEND, 1978; DANESHMEND; PEACHEY, 1979 apud CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003.

afetados falecem por hipóxia e falha cardíaca no útero ou logo após o nascimento (CHUI; WAYE, 1998).

Como consequência dos danos provocados pela hipóxia durante a embriogênese e da eritropoese extramedular, os fetos afetados freqüentemente apresentam problemas de desenvolvimento em vários sistemas e órgãos, incluindo o sistema nervoso central (CHEN et al., 2000). A eritropoese extramedular é amplamente observada em muitos órgãos, sendo a causa da extensa hepatomegalia (CHUI; WAYE, 1998). Ao nascimento, os fetos apresentam-se pálidos, grandes e edematosos, com sinais de problemas cardíacos, tais como cardiomegalia, efusão pericárdica, efusão pleural e ascite e, de anemia intra-uterina prolongada (LIANG et al., 1985).

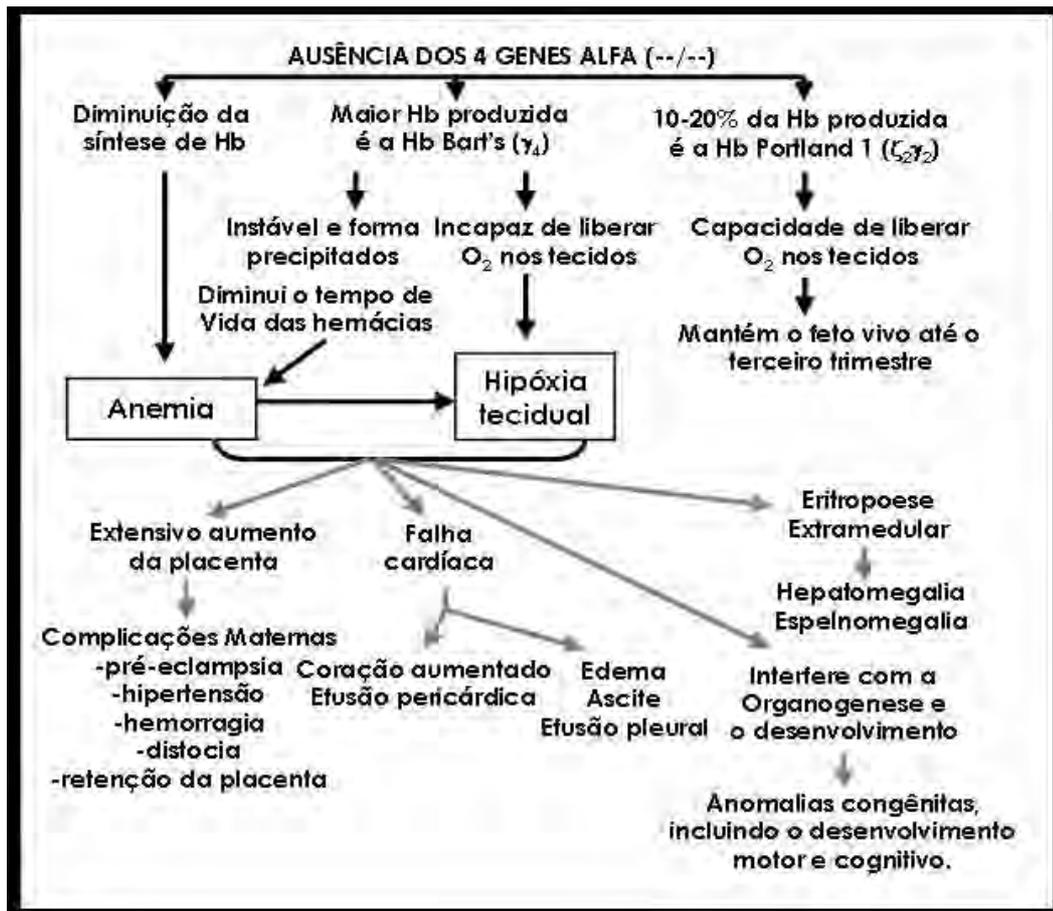
Além dos problemas observados nos fetos, existe um aumento das complicações maternas, tais como hipertensão, pré-eclampsia, eclampsia e hemorragias. Outras complicações menos freqüentes incluem, coagulação intravascular disseminada, falha renal, e efusão pleural. Também foram relatados: diminuição no líquido amniótico, trabalho de parto prematuro e falha cardíaca (GUY et al, 1985; ABUELO; FORMAN; RUBIN, 1997)<sup>9</sup>.

No pós-parto foram relatados: retenção da placenta, hemorragia, hipertensão, piroxia puerperia e anemia (GUY et al., 1985; BOWMAN et al, 1987)<sup>10</sup>. Na figura 7, resume-se a fisiopatologia da Síndrome de Hidropsia Fetal por Hb Bart's.

---

<sup>9</sup> KAKAYAMA et al., 1986 apud CHUI; WAYE, 1998.

<sup>10</sup> TAN et al., 1989 apud CHUI; WAYE, 1998



**Figura 7.** Fisiopatologia produzida pela ausência dos genes de globina alfa (CHUI; WAYE, 1998).

## **1. 7 Métodos de estudo**

### ***1. 7. 1. Índices eritrocitários***

As talassemias alfa são caracterizadas por uma redução no conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos, a qual se manifesta nos dados laboratoriais como uma redução nos índices eritrocitários (SKOGERBOE et al., 1992). A microcitose (Volume Corpuscular Médio: VCM<80fl) ou a hipocromia (Hemoglobina Corpuscular Média: HCM<27pg) são os critérios de diagnóstico mais importantes para detectar portadores de talassemias (CHUI; WAYE, 1998).

A redução dos índices eritrocitários pode ser produzida por defeitos na síntese do grupo heme, por deficiência de ferro ou por alterações na síntese de globina, nas talassemias alfa e beta (STEIN et al., 1984).

O HCM e VCM variam muito pouco entre indivíduos normais e heterozigotos para talassemia alfa 2 ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ), portanto não podem ser utilizados para o diagnóstico deste genótipo talassêmico. Para os genótipos mais graves existe uma correlação entre o número de genes de globina alfa afetados e a microcitose, fazendo do VCM e HCM indicadores úteis do provável genótipo (WILLIAMS et al.,1996). No entanto, existe uma considerável superposição dos índices eritrocitários entre os vários genótipos, que não permite sua utilização como único parâmetro para sugerir um determinado genótipo (SKOGERBOE et al., 1992; SONATI; KIMURA; FERREIRA, 1992; WILLIAMS et al., 1996).

Lafferty (1996) considera o uso de um VCM < 72fl, como um critério laboratorial para a seleção de amostras para testes de talassemia, com sensibilidade e especificidade similar, independente da população. Estratégias de triagem atuais se baseiam unicamente em VCM< 80fl ou HCM < 27pg como critérios para identificar indivíduos com mutações clinicamente relevantes (CHAN et al., 2001).

### *1. 7. 2. Eletroforese de hemoglobinas*

Além da utilização dos índices eritrocitários na avaliação da anemia, metodologias destinadas a identificação das hemoglobinas H e Bart's, têm sido amplamente difundidas como ferramentas de diagnóstico das talassemias alfa. Tradicionalmente a eletroforese em acetato de celulose pH alcalino (pH 8.6) tem sido o método de eleição para a identificação e quantificação de hemoglobinas variantes. Este método é rápido, reprodutível e capaz de separar as hemoglobinas variantes mais comuns (CLARKE; HIGGINS, 2000; Ou; ROGNERUD, 2001). Na eletroforese em pH alcalino a Hb Bart's migra mais rápido que a Hb A, e a Hb H migra ainda mais rápido, acima da Hb Bart's (NAOUM, 1997).

Quando identificadas inicialmente na eletroforese alcalina, as hemoglobinas H e Bart's podem ser confirmadas em eletroforese em pH neutro. Este pH corresponde ao ponto isoelétrico da maioria das hemoglobinas, as quais não migram nestas condições, permitindo a separação das hemoglobinas H e Bart's que migram em direção ao pólo positivo (WEATHERALL; CLEGG, 1981; DACIE; LEWIS, 1995).

Como para os índices eritrocitários, existe uma relação direta entre o número de genes inativos e os níveis de hemoglobinas H e Bart's, os níveis destas hemoglobinas podem ser utilizados para sugerir o possível genótipo (Quadro 1). No entanto, como a eletroforese pH 8.6 é a metodologia mais utilizadas na análise de hemoglobinas, diagnósticos incorretos ou inconclusos podem ocorrer devido à sua limitada resolução, especialmente na detecção de baixas concentrações de Hb H e Bart's presentes quando 1 ou 2 genes alfa estão afetados (JONES et al., 1981; STEINBERG, 1991; HIGGS, 1993; CLARKE; HIGGINS, 2000; Ou; ROGNERUD, 2001). Por essas hemoglobinas serem altamente instáveis, as amostras de sangue utilizadas devem ser o mais frescas possíveis, dado que em poucos dias a concentração de Hb H diminui significativamente (RIBEIRO; ARAÚJO, 1992).

### ***1. 7. 3 Pesquisa Intraeritrocitária de Hb H***

Um método, simples fácil e econômico de triagem e diagnóstico de talassemias alfa é a coloração com Azul Cresil Brillhante (ACB). Após a coloração supravital dos eritrócitos com o corante ACB, a Hb H, altamente instável, precipita e agrega, formando inclusões intracelulares, dando aos eritrócitos um aspecto de bola de golfe (CLARKE; HIGGINS, 2000; PAN et al., 2005). O número de células com inclusões de Hb H é influenciado pelo genótipo talassêmico, aumentando nas formas mais graves de talassemias alfa, onde existe maior número de cadeias beta em excesso (Quadro 1) (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998, WINICHAGOON; ADIROJNANON; WASI, 1980, SKOGERBOE et al, 1992).

Este método é muito sensível e específico para a detecção de portadores de genótipos de risco ( $--/\alpha\alpha$  ou  $--/-\alpha$ ), capazes de gerar descendência com Síndrome de Hidropisia Fetal por Hb Bart's (THOMPSON et al., 1989; SKOGERBOE et al., 1992; SABATH et al., 2003; PAN et al., 2005). Vários trabalhos relatam melhoras na técnica que aumentam sua eficiência na identificação dos corpúsculos de inclusão de Hb H (JONES et al., 1981; LIN et al., 1990; LIN et al, 1991; SABATH et al., 2003; PAN et al., 2005). No entanto, não deve ser utilizado no diagnóstico de portadores dos genótipos  $-\alpha/\alpha\alpha$  ou  $-\alpha/-\alpha$  (THOMPSON et al., 1989). Nestes pacientes, o número de células contendo inclusões de Hb H é muito baixo, sendo difíceis de detectar. Por esse motivo, a ausência de inclusões de Hb H não é um critério de exclusão (CLARKE; HIGGINS, 2000).

#### 1. 7. 4 Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

A HPLC de troca iônica tem emergido como um método de eleição para o rastreamento inicial de hemoglobinas variantes e quantificação das hemoglobinas A, A<sub>2</sub> e Fetal (EASTMAN et al., 1996). Vários estudos demonstraram a utilidade deste sistema na triagem pré-natal e pós-natal de hemoglobinopatias e talassemias (VAN DER DIJS et al., 1992; LOREY et al., 1994; EASTMAN et al., 1996; WINICHAGOON et al., 2002). Adicionalmente, estudos realizados no Colégio de Patologia Americano, mostraram uma equivalência ou superioridade da HPLC sobre os métodos eletroforéticos (CLARKE; HIGGINS, 2000).

O sistema automatizado de HPLC *VARIANT* (Bio-Rad), com o programa BTS (*Beta Thalassemia Short*), foi desenvolvido inicialmente para a separação e quantificação das hemoglobinas F e A<sub>2</sub>, que auxiliam no diagnóstico de talassemia beta, e na detecção de outras hemoglobinas anormais (JONES; CLARK, 1994). No entanto, mesmo este sistema sendo incapaz de quantificar as hemoglobinas H e Bart's, ele pode identificar qualitativamente estas hemoglobinas auxiliando no diagnóstico das talassemias alfa (FUCHAROEN et al., 1998). Papassotiriou (1999), realizando modificações no programa BTS, conseguiu quantificar as hemoglobinas H e Bart's e, obter uma correlação entre os genótipos e o nível destas hemoglobinas em indivíduos com Doença de Hb H.

Dada a incapacidade do BTS em quantificar as hemoglobinas H e Bart's, foi desenvolvido o programa ATS (*Alpha Thalassemia Short*) para identificar e quantificar a Hb Bart's nas talassemias alfa. Este sistema permite o diagnóstico neonatal de Doença de Hb H (FUCHAROEN et al., 1998), porem não comercializado no Brasil.

### 1. 7. 5 Diagnostico molecular das talassemia alfa

Mesmo com a utilização das metodologias, anteriormente descritas, como testes de triagem, e a correlação dos achados laboratoriais aos possíveis genótipos, um diagnóstico definitivo só será possível por meio da identificação molecular do defeito genético.

Uma ampla revisão e uma breve descrição das metodologias utilizadas na detecção dos mutantes responsáveis pelas talassemias alfa, foram realizadas por Kattamis et al (1996) e Old (2003), respectivamente.

A caracterização dos defeitos moleculares, nas talassemias alfa foi realizada por muitos anos usando as análises de restrição enzimática do DNA genômico, seguida por *Southern blotting* e hibridação com sondas radioativas para os genes alfa. O advento da reação em cadeia da polimerase (PCR) revolucionou a biologia molecular, e simplificou a detecção das mutações mais comuns de talassemia alfa por ser esta uma técnica simples, mais segura, rápida, e prática que a convencional análise de restrição enzimática (KATTAMIS et al., 1996).

Para a detecção de mutações não delecionais foram desenvolvidas várias estratégias utilizando a amplificação seletiva dos genes  $\alpha_2$  ou  $\alpha_1$ . Os produtos de PCR podem ser ligados em membranas de nylon e hibridizados com sondas oligonucleotídicas alelo específicas (ASO), ou ser digeridos com endonucleases de restrição, quando a mutação cria ou elimina um sítio de clivagem (LEBO et al, 1990). Quando estas metodologias não permitem identificação da alteração molecular, a caracterização direta da mutação pode ser realizada pelas análises da seqüência de DNA, empregando estratégias de seqüenciamento manual ou automático (KATTAMIS et al., 1996).

Uma metodologia envolvendo a aplicação combinada de métodos de detecção indiretos, eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE) e análise da conformação do DNA de fita simples (SSCA), seguida de seqüenciamento direto do DNA tem sido descrita por Hartevelde et al. (1996) para a análise de mutações de ponto e polimorfismos nos genes alfa.

Para a detecção das formas deletoriais, tem sido utilizada a amplificação seletiva dos alelos mutante e normal, por meio de *primers* específicos; em alguns casos seguidos pela digestão enzimática para a determinação de haplótipos (DODÉ et al, 1992; BOWDEN et al., 1992; BAYSAL; HUISMAN, 1994, FOGLIETTA, et al 1996, ORON-KARNI, et al 1998).

Nos últimos anos, a PCR múltipla (*Multiplex-PCR*), a qual permite a amplificação e identificação do alelo normal e vários alelos mutantes em uma mesma reação de amplificação, tem sido aplicada nos programas de rastreamento para a identificação das mutações de ponto e deleções gênicas (SHAJI et al, 2000; CHONG, et al 2000; LIU et al.,2000; LIU et al, 2004; TAN et al, 2001; WANG et al., 2003).

Estratégias utilizando PCR em tempo real (*Real Time PCR*), HPLC desnaturante (DHPLC) e *microarrays* têm sido desenvolvidas recentemente para o rastreamento das principais mutações responsáveis pelas talassemias alfa (SUN et al., 2001; GUIDA et al., 2004; BANG-CE et al., 2004).

## 1. 8 Distribuição Geográfica das Talassemias Alfa

As anemias hereditárias representam uma das principais doenças genéticas que contribuem de forma expressiva para a morbidade e mortalidade infantil em diversos países em desenvolvimento (W.H.O.,1982). Em geral, a elevada prevalência das hemoglobinopatias pode ser consequência de dois mecanismos principais: as mutações foram “favorecidas” nas populações autóctones, como consequência do efeito seletivo da malária, onde os indivíduos afetados são mais resistentes; ou alternativamente, foram inseridas por migração de indivíduos de uma população previamente afetada. O primeiro mecanismo, explica as altas frequências de hemoglobinopatias nos países da região Mediterrânea, no Oriente Médio, Sudeste da Ásia e na África (FLINT et al., 1986).

Como resultado da vantagem dos heterozigotos contra a malária, as desordens hereditárias de hemoglobinas são as doenças monogênicas mais comuns <sup>11</sup>. Tem sido estimado que aproximadamente 7% da população mundial é portadora de algum tipo de hemoglobinopatia e que, 300.000-400.000 crianças com formas graves dessa doença nascem a cada ano (W.H.O., 1989). Porém, estas condições ocorram com maior frequência nas regiões tropicais, a migração populacional tem garantido que agora sejam encontradas na maioria dos países (WETHERALL; CLEGG, 2001).

Nas talassemias alfa, as formas mais brandas (alfa<sup>+</sup> talassemia) são extremamente comuns, oscilando entre 10 a 20% em partes do Saara Africano, chegando a 40% ou mais em algumas populações Indianas e do Oriente Médio, alcançando 80% no norte de Papua Nova Guiné e em grupos isolados do Nordeste da Índia (Figura 8). As formas  $\alpha^0$  possuem uma distribuição mais restrita, ocorrendo em alta frequência unicamente no Sudeste da Ásia e na bacia do mar Mediterrâneo (FLINT et al., 1993; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

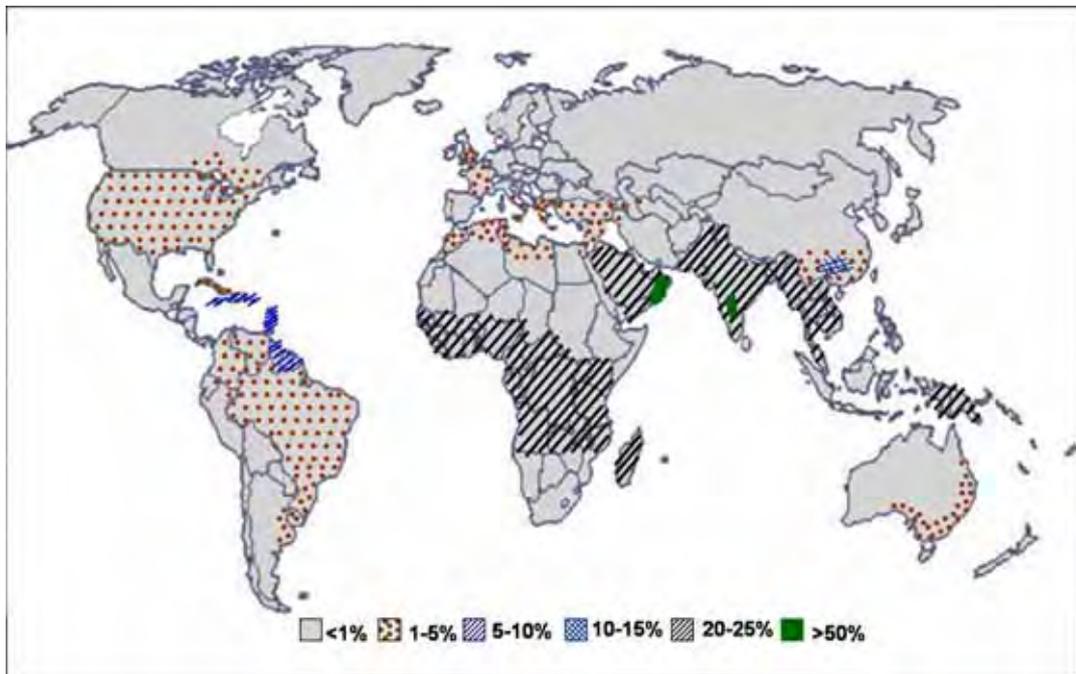
---

<sup>11</sup> STEINBER et al., 2001; WEATHERALL; CLEGG, 2001 apud WEATHERALL; CLEGG, 2001.

No Brasil, estudos feitos na região sudeste relatam uma frequência de 20 a 25% de talassemias alfa devido a deleção  $-\alpha^{3.7}$  na população negra (SONATI et al., 1991), e de aproximadamente 48% em pacientes adultos com microcitose e hipocromia sem anemia (BORGES et al., 2001). Na região nordeste, estudos feitos em um grupo de mulheres grávidas heterozigotas para Hb C, mostraram uma frequência de 22,6% da deleção  $-\alpha^{3.7}$  (COUTO et al., 2003). Uma frequência similar para esta deleção (22.2 %) foi encontrada em recém nascidos da mesma região (ADORNO et al., 2005).

Em outros estudos, por meio da identificação de Hb Bart's, foi calculada uma frequência de 2,5%, 3,67% e 7.77% para talassemia alfa em neonatos das regiões, Rio de Janeiro-RJ, Porto Alegre-RS e São José do Rio Preto-SP, respectivamente (PEDROLLO, 1990; FLEURY, 1994; MENDEZ-SIQUEIRA, 2000). Trabalhando com amostras de bancos de sangue e escolares do Triangulo Mineiro-MG, Alves de Melo (1993) encontrou uma frequência de 5,5% de talassemia alfa.

Pode-se estimar uma frequência de 10% na população selecionada ao acaso, e entre 20-30 % em grupos específicos, como por exemplo, indivíduos com anemia não ferropriva (BONINI-DOMINGOS, 1993).



**Figura 8.** Distribuição Mundial de  $\alpha^+$  Talassemia (adaptado de W.H.O., 1987).

A elevada frequência de talassemias alfa no Brasil, relatadas na literatura e em estudos realizados no Laboratório de Hemoglobina e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), demonstra a expressiva contribuição das talassemias alfa nas anemias e, destaca a necessidade de seu diagnóstico.

Como destacado por Leoneli (2000), o correto diagnóstico laboratorial das talassemias alfa requer a associação de diferentes metodologias laboratoriais que, apesar de simples, precisam de pessoas treinadas para a interpretação dos resultados, o que, nem sempre é possível em todos os laboratórios de análises. O diagnóstico definitivo só é possível por meio da análise por biologia molecular, metodologia ainda pouco difundida nos laboratórios de análises.

Em virtude da dificuldade diagnóstica das talassemias alfa e da elevada frequência com que esta patologia foi encontrada em estudos realizados no Brasil, elaborou-se o presente projeto, com a finalidade de contribuir para o conhecimento desta alteração, sua expressão nos métodos de diagnóstico tradicionais e relação como os mutantes teoricamente mais frequentes no Brasil.

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Caracterizar laboratorialmente as talassemias alfa por procedimentos de rotina, incluindo a HPLC.
2. Identificar portadores da deleção  $-\alpha^{3.7}$  por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
3. Correlacionar os achados moleculares e laboratoriais clássicos.

### **3. 1 Casuística**

Após a coleta de sangue periférico em tubos contendo anticoagulante (EDTA 5%), nos locais de origem, as amostras foram encaminhadas ao LHGDH (IBILCE-UNESP). Ao chegarem ao laboratório, foram codificadas para preservar a identidade dos indivíduos.

O grupo de amostras inseridas neste trabalho foi selecionado a partir de amostras com resultados sugestivos de talassemia alfa nos testes laboratoriais, sendo incluídas apenas aquelas que possuíam valores para os índices eritrocitários.

Todas as amostras pertenceram a indivíduos adultos de ambos sexos, sem distinção étnica provenientes de dois estados das regiões nordeste e sudeste do Brasil, totalizando 399 amostras.

O presente estudo é parte integrante de amplo estudo sobre essa alteração genética desenvolvido no LHGDH desde 2000, com aprovação pelo CONEP no parecer Nº 1153/2000 e processo Nº 25000.057566/2000-42.

### **3. 2 Detalhamento Técnico**

#### ***3. 2. 1 Preparação de Hemolisados***

Para que as amostras fossem submetidas à procedimentos eletroforéticos e testes bioquímicos para caracterizar as frações de hemoglobinas, foi necessário lisar as células para a obtenção da solução de hemoglobinas pelo seguinte procedimento:

##### *3. 2. 1. 1 Hemolisado Rápido:- com saponina (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998)*

Esse procedimento é o mais indicado para a realização da triagem e o recomendado para observação de interações com outras hemoglobinas. Não é aconselhável utilizá-lo para dosagens bioquímicas de hemoglobinas, especialmente de Hb Fetal.

Reativo hemolisante:

Saponina P.A.	1 g
Água destilada	100 mL

*Procedimento:*

- Em placa de Kline misturar 1 volume de sangue com 1 volume de reativo hemolisante;
- A homogeneização deve se processar até a hemólise completa da mistura;
- Utilizar o hemolisado após 5 minutos e até, no máximo, 24 horas após sua preparação.

### 3. 2. 2 Testes de Triagem

#### 3. 2. 2. 1 Resistência Globular Osmótica em Solução Cloreto de Sódio a 0,36% (SILVESTRONI; BIANCO, 1975)

##### *Princípio:*

Técnica utilizada para detectar talassemia 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 os heterozigotos para hemoglobina C. Cerca de 97% dos portadores de talassemia beta heterozigota apresentam positividade para esse teste. É uma metodologia utilizada para triagem de todas as hemoglobinas anormais, preconizada no LHGDH- IBILCE/UNESP.

##### *Reagentes:*

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4 NaCl	9,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,36g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,28g
Água destilada q.s.p	100mL
Solução trabalho	
NaCl 10%	36mL
Água destilada q.s.p	1000mL

##### *Procedimento:*

Em tubo de hemólise colocar 1,5 mL de solução de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total. Agitar, suavemente por inversão, e aguardar 10 minutos para leitura.

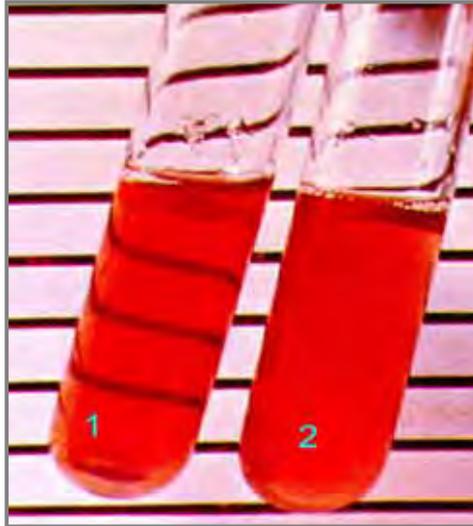
*Interpretação:*

Colocar o tubo de hemólise com a amostra na solução de NaCl a 0,36% à 2,0 cm de uma folha branca com linhas negras. A resistência aumentada à hemólise do eritrócito torna a amostra opaca e não visualiza-se as linhas negras. Em amostras com resistência normal à hemólise, visualiza-se facilmente as linhas através da solução, como ilustrado na figura 9. Submeter as amostras com resistência aumentada a exames posteriores para o diagnóstico da talassemia beta heterozigota.

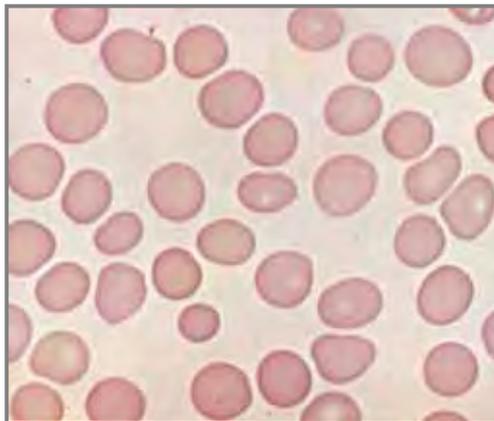
**3. 2. 2 .2 *Análise da Morfologia Eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 1993)***

Em esfregaço sangüíneo à fresco analisa-se o tamanho, a forma e a coloração dos eritrócitos como ilustrado na figura 10. Os resultados padronizados no LHGDH-IBILCE/UNESP podem ser expressos da seguinte maneira:

- alterações discretas: (+)
- alterações moderadas: (++)
- alterações acentuadas: (+++)
- células normais: (N)



**Figura 9:** Resistência globular osmótica em solução de cloreto de sódio a 0,36%. O tubo 1 ilustra um teste negativo e o tubo 2 um teste positivo.



**Figura 10:** Esfregaço sanguíneo apresentando discretas alterações dos eritrócitos.

**3. 2. 2. 3 Eletroforese em Acetato de Celulose pH Alcalino  
(MARENGO; ROWE,1965)**

*Princípio:*

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

*Reagentes:*

Tampão TRIS-EDTA-BORATO, pH 8,5

Tris hidroximetil aminometano	10,2g
Ácido etilenodiaminotetracético	0,6g
Ácido Bórico	3,2g
Água destilada q.s.p	1000mL

Corante:

Negro de amido 10B	0,5g
Álcool metílico	45,0mL
Ácido acético glacial	5,0mL
Água destilada	45,0mL

*Procedimento:*

- Embeber as fitas de acetato de celulose por 15 minutos no mínimo e no máximo por seis horas, em tampão TEB pH 8,5;
- 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 mata-borrão;
- Aplicar as amostras de hemoglobinas a 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo;
- Passar 300 volts por 40 minutos.

Analisar as frações sem coloração e posteriormente corar com negro de amido, embebendo as fitas em um dos corantes por cinco minutos, e posteriormente em solução descorante de ácido acético a 5%. A interpretação das hemoglobinas deverá ser feita seguindo o mapa de migração ilustrado da figura 11.

Após os procedimentos de triagem e direcionamento das frações anormais, as amostras foram submetidas à metodologias específicas visando a sua caracterização.

### **3. 2. 3 Provas complementares para Talassemia Alfa**

#### ***3. 2. 3. 1 Eletroforese em Acetato de Celulose pH Neutro (DACIE; LEWIS, 1985):***

*Princípio:*

Técnica utilizada para qualificação e quantificação da hemoglobina H e Bart's.

*Reagentes:*

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,11 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,66 g
<b><i>Água destilada q.s.p.</i></b>	<b><i>1000 mL</i></b>

*Procedimento:*

- Embeber as fitas de acetato de celulose por quinze minutos no mínimo em tampão pH neutro. Colocar o mesmo tampão nos compartimentos eletrolíticos da cuba de eletroforese;
- Secar as fitas entre duas folhas de papel absorvente e colocá-las na cuba de eletroforese conectando-as com os compartimentos eletrolíticos por meio de tiras de papel mata borrão;
- Aplicar as amostras de hemoglobina a 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo;
- Passar 300 Volts por 30 minutos;
- Analisar as frações sem coloração.

*Interpretação:* a visualização da hemoglobina H deverá ser feita sem coloração como ilustrado no esquema da figura 12, destacando-se a presença (+) ou ausência (-) da fração de Hb H.

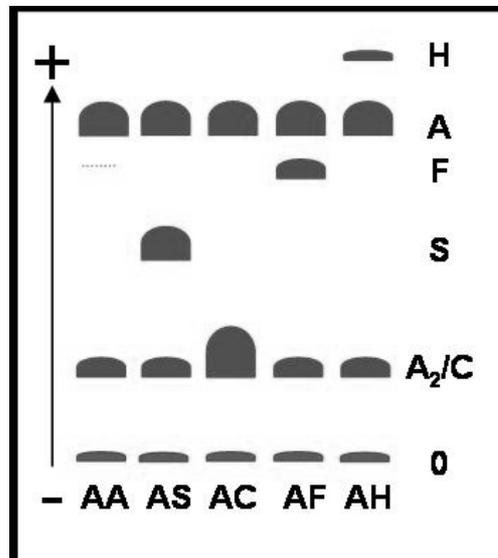


Figura 11: Mapa de interpretação dos padrões eletroforéticos em pH alcalino (pH 8.5).

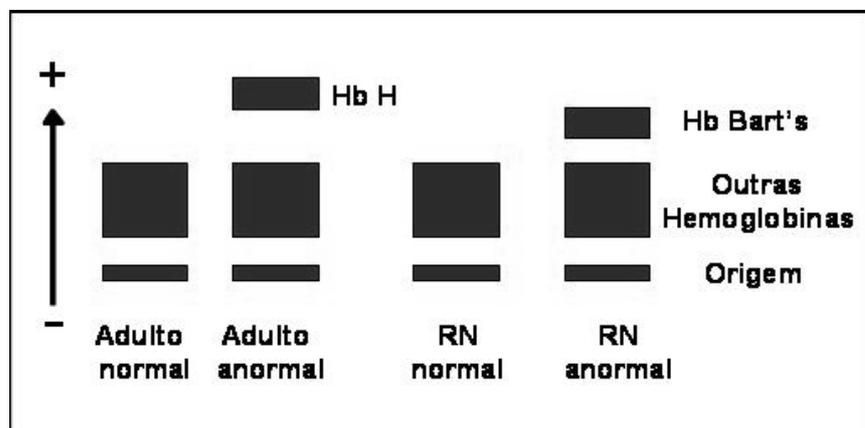


Figura 12: Representação esquemática do padrão de migração de hemoglobinas humanas em pH neutro.

**3. 2. 3. 2 Pesquisa de Corpúsculos de Inclusão de Hemoglobina H  
(PAYANNOPOULOS; STAMATAYANNOPOULOS, 1974)**

*Princípio:*

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

*Reagentes:*

Solução salina:

Cloreto de sódio	0,9g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Solução citrato:

Citrato de sódio	2,2g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Solução de Azul Cresil Brilhante:

Azul Cresil brilhante	1,0g
Solução salina	100 mL
Solução citrato	25 mL

*Procedimento:*

- Colocar 50 µL de sangue total em tubo de ensaio pequeno e adicionar 50 µL de solução de azul Cresil brilhante. Agitar o tubo suavemente;
- Incubar o material a 37°C por 30 minutos;
- Fazer esfregaços finos e examinar ao microscópio em objetiva de imersão.

*Interpretação:*

A presença de hemoglobina H nos eritrócitos aparece como fina granulação distribuída homogeneamente, caracterizando um portador de alfa talassemia como ilustrado na figura 13.

### **3. 2. 4 Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)**

*Princípio:*

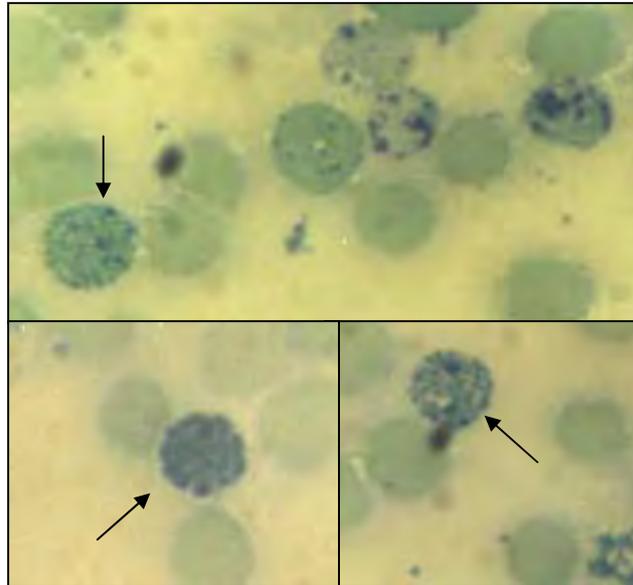
O equipamento utilizado foi o VARIANT da BIO-RAD com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota. A Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), neste equipamento, consiste da cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição com controles de gradientes pré-programados passam através de uma coluna analítica em alta pressão. Um fotômetro de filtro de comprimento de onda duplo (415 e 690 nm) monitora a eluição da hemoglobina na coluna, detectando as alterações de absorbância a 415 nm. O filtro secundário corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura dos tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorbância versus tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção, é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da hemoglobina. Cada hemoglobina tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

*Procedimento:*

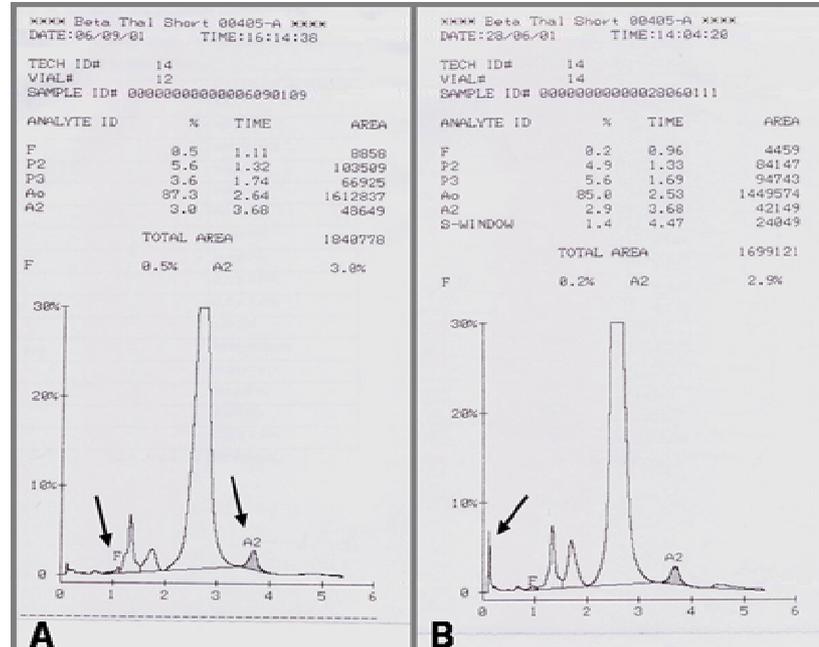
Misturar, em um tubo, 5 $\mu$ L de sangue total com 1 mL de solução hemolisante fornecida no kit de análise. Após hemólise total, acondicioná-los nos recipientes adequados e alojá-los no equipamento, que irá realizar os procedimentos pré-programados de leitura das amostras.

*Interpretação:*

Permite a quantificação das diferentes frações de hemoglobina em uma amostra e a identificação do perfil de variantes, comparando os valores obtidos com padrões de calibração. A figura 14 ilustra o cromatograma de um indivíduo normal e um com talassemia alfa, donde se destaca um pico em forma de agulha, com tempo de retenção próximo a zero, correspondente a Hb H.



**Figura 13:** Corpúsculos de inclusão de Hb H (seta) observados após coloração vital com Azul de Cresil brilhante.



**Figura 14.** Cromatograma de um indivíduo normal (A), onde pode ser observados os picos de Hb F e Hb A<sub>2</sub> (setas); e de um com talassemia alfa (B) apresentando um pico com tempo de retenção próximo de zero (seta).

### **3. 2. 5 Extração de DNA**

Para a obtenção do DNA genômico utilizado nos procedimentos moleculares foram realizadas metodologias de extração conforme segue:

#### ***3. 2. 5. 1 Extração Fenólica por Meio de Sangue Periférico (PENA, et al. 1991)***

##### *Princípio:*

Técnica utilizada para extrair DNA genômico a partir de sangue total. Os tampões de lise rompem os eritrócito e glóbulos brancos. O fenol é utilizado para a remoção de proteínas e enzimas contaminantes. O DNA é precipitado com etanol.

##### *Reagentes:*

##### 1. Solução de lise 1 ( utilizado na lise de células vermelhas)

Sacarose 0,32M	10,95 g
Tris HCl 10mM	1 mL
MgCl <sub>2</sub> 5mM	0,5 mL
Triton 1% 100x	1 mL
Água mili-Q autoclavada q.s.p.	100 mL

##### 2. Solução de lise 2 (utilizado na lise de células brancas)

NaCl 0,075 M	2,19 g
EDTA 0,02 M	20 mL
Água mili-Q q. s. p.	500 mL

3. Proteinase K (20 mg/mL)

Proteinase K 20 mg

Água mili-Q q.s.p. 1 mL

Conservar em freezer.

4. Fenol

5. Clorofórmio : álcool isoamílico (24:1)

6. Etanol 70%

7. KCl 2M

*Procedimento:*

De 300 a 1000 ul de amostras de sangue periférico, colhidas com EDTA foram colocadas em tubos *ependorf* (1,5ml) completando para um volume de 1.5 mL com solução de lise 1. Após homogeneização, foi centrifugado por 5 minutos a 6500 rpm. Após descartar o sobrenadante se completou o volume para 1,5ml com solução de Lise 1 e, após homogeneizar, se deixou descansar por 10 minutos. Depois deste tempo foi centrifugado por 5 minutos a 6500rpm. Esta etapa foi repetida uma vez mais e logo após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. Ao *pellet* foram acrescentados 450ul de solução de Lise 2, 25µl de SDS a 10% e 5µL de proteinase K 20 mg/ml. Após homogeneização, o tubo foi colocado em banho-maria por 3 horas ou *overnight*, a 37°C.

Após três horas ou no dia seguinte, foram adicionados 500ul de fenol, em cada tubo e, após homogeneização e centrifugação por 5 minutos a 7000rpm, a fase superior foi transferida para outro tubo sendo adicionados 500ul da solução de clorofórmio e álcool isoamílico.

O material foi homogeneizado e novamente centrifugado por 5 minutos a 7000 rpm. Esse último passo foi repetido por mais uma

vez. O sobrenadante foi colocado em tubo, acondicionado em um recipiente com gelo, contendo 50µl de solução de KCl 2M, logo após foram acrescentados 500ul de etanol 100% (bem gelado). O tubo foi invertido várias vezes até a precipitação do DNA.

O material foi novamente centrifugado por 30 segundos a 13000rpm e o sobrenadante desprezado. O DNA no fundo do tubo foi lavado com 200ul de etanol 70% (gelado), e após nova centrifugação por 30 segundos a 13000rpm o sobrenadante foi desprezado deixando secar o DNA a temperatura ambiente por 15 minutos.

Depois de seco, o DNA foi re-hidratado em 20-100ul de água MilliQ em temperatura ambiente por 24hs, e conservado em freezer – 20°C.

### **3. 2. 6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (SAIKI, 1992)**

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica para amplificação, *in vitro*, que sintetiza, enzimaticamente, seqüências específicas de DNA. A reação utiliza dois *primers* que se hibridizam em fitas opostas e flanqueiam a seqüência de DNA a ser amplificada.

O alongamento dos *primers* é catalisado pela *Taq* polimerase. Os ciclos são séries repetidas de desnaturação do DNA, anelamento e extensão dos *primers*, pela *Taq* polimerase, resultando em um acúmulo exponencial de um fragmento específico de DNA.

#### **3. 2. 6. 1 PCR convencional para a detecção da deleção - $\alpha^{3.7}$ (BAYSAL; HUISMAN, 1994, com modificações)**

Esta metodologia permite a identificação da deleção - $\alpha^{3.7}$  por meio da amplificação específica da região onde acontece a deleção.

São realizadas duas amplificações em separado, utilizando *primers* específicos, uma para o alelo normal (gene  $\alpha_2$ ) e outra para o alelo  $-\alpha^{3.7}$  (figura 15). O *primer* A, 5' CCCTCCCCCTCGCCAAGTCCACCCC 3', localiza-se 5' do gene  $\alpha_2$  (nt.32741-32761, GI 14523048 do GenBank), enquanto que o *primer* B, 5' GGGGGGAGGCCCAAGGGGCAAGAA 3', está localizado a 3' do gene  $\alpha_1$  (nt. 38297-38320, GI 14523048 GenBank) e o *primer* C, 5' GGGAGGCCCATCGGGCAGGAGGAAC 3', anela a 3' do gene  $\alpha_2$  (nt. 34482-34506, GI 14523048 GenBank).

#### *Amplificação in vitro:*

Cada reação de PCR (25ul) contém aproximadamente 250ng de DNA; 100mM (A+T) e 200mM (G+C) de dNTPs; 12,5 picomols dos *primers* A+C ou A+B; 8% dimetiosulfoxido (DMSO); 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol; 1,25 unidades de Taq DNA polimerase (Biotools) em um tampão contendo 75 mM de Tris-HCl pH 8.0; 50 mM KCl; 20mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$ , e 4 mM de  $\text{MgCl}_2$ . A amplificação foi realizada utilizando o termociclador *I'Cyler* (Bio-Rad) com um passo de desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C seguida de 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 63°C por 60 segundos e 72°C por 2 minutos, incluindo um ciclo adicional de extensão a 72°C por 5 minutos.

Análise dos produtos de PCR

Dez microlitros dos produtos de PCR foram separados eletroforéticamente em géis de agarose 1% com brometo de etídeo, em tampão TEB (Tris Borato EDTA) 1X, durante 40-50 minutos a 80 volts. As bandas específicas foram visualizadas usando um transiluminador UV.

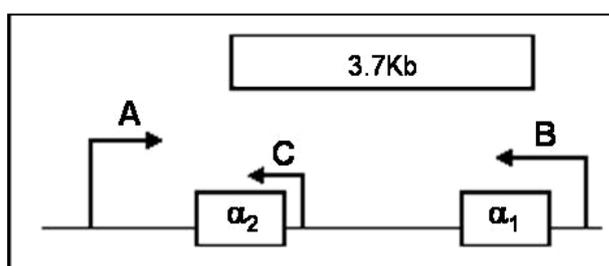


Figura 15. Localização dos primers A, B e C para a detecção da deleção  $-\alpha^{3.7}$ .

Interpretação:

Ambas as combinações de primers (A+B ou A+C) geram fragmentos de 1.8 Kb quando o alelo correspondente está presente. A interpretação se deu seguindo as combinações listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados possíveis da amplificação utilizando os primers A, B e C.

•Combinação de •Primers usada	•Resultado da amplificação	•Genótipo
•A+B	•+	•Homozigoto para a deleção $-\alpha^{3.7}$
•A+C	•-	
•A+B	•+	•Heterozigoto para a deleção $-\alpha^{3.7}$
•A+C	•+	
•A+B	•-	•Normal
•A+C	•-	

### 3. 2. 6. 2 Multiplex-PCR para a identificação da deleção - $\alpha^{3.7}$

O desenho da estratégia molecular, utilizado para a análise da deleção - $\alpha^{3.7}$ , foi baseado no trabalho publicado por Chong (2000). No entanto os *primers* foram redesenhados e o protocolo de amplificação sofreu modificações para adaptá-lo às nossas condições. O desenho dos novos *primers* foi realizado com ajuda do programa *primer3*<sup>12</sup>.

Esta nova estratégia permitiu a identificação do alelo normal (gene  $\alpha_2$ ) e da deleção - $\alpha^{3.7}$  em uma mesma reação de amplificação. Foi realizada a amplificação utilizando *primers* específicos (figura 16). O *primer*  $\alpha_2/3.7F$ , 5' CTGGCCAAACCATCACTTTT 3', localiza-se a 5' do gene  $\alpha_2$  (nt.32684-32699, GI 14523048 do GenBank), enquanto que o *primer*  $\alpha_2R$ , 5' GTGCAAGGAGGGGAGGAG 3', esta localizado a 3' do gene  $\alpha_2$  (nt. 34515-34530, GI 14523048 GenBank) e o *primer* 3.7R, 5' CTCCACTTTCCTCCTCCAT 3', anela no extremo 3' do gene  $\alpha_1$  (nt. 38517-38532, GI 14523048 GenBank). Na presença do alelo normal (gene  $\alpha_2$ ) os *primers*  $\alpha_2/3.7F$  e  $\alpha_2R$  geram um fragmento de 1.8Kb, enquanto que na presença do alelo - $\alpha^{3.7}$  os *primers*  $\alpha_2/3.7F$  e 3.7R geram um fragmento de 2.1kb.

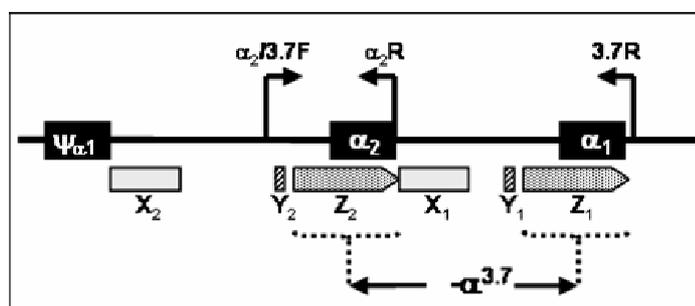
<sup>12</sup> [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

**Amplificação in vitro:**

Cada reação de PCR (25ul) contém aproximadamente 250ng de DNA; 100mM (A+T) e 200mM (G+C) de dNTPs; 1,2 uM do *primer*  $\alpha_2/3.7F$ ; 0,6uM dos *primers*  $\alpha_2R$  e 3.7R; 8% de dimetiosulfoxido (DMSO); 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol; 1,25 unidades de Taq DNA polimerase (Biotoools) em um tampão contendo 75mM de Tris-HCl pH 8.0; 50mM KCl; 20mM de  $(NH_4)_2SO_2$ , e 4mM de  $MgCl_2$ . A amplificação foi realizada utilizando o termociclador *I'Cyler* (Bio-Rad) com um passo de desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 63°C por 60 segundos e 72°C por 2 minutos, incluindo um ciclo adicional de extensão a 72°C por 5 minutos.

**Análise dos produtos de PCR**

Dez microlitros de produtos de PCR foram separados eletroforéticamente em géis de agarose 1% com brometo de etídeo, em tampão TEB (Tris Borato EDTA) 1X, durante 30-50 minutos a 80 volts. A bandas específicas foram visualizadas usando um transiluminador UV.



**Figura 16.** Localizações dos *primers* específicos para a identificação da deleção  $-\alpha^{3.7}$  por *Multiplex-PCR*.

*Interpretação:*

A presença de duas bandas, uma de 1.8Kb e outra de 2.1Kb no gel de agarose indica um resultado heterozigoto para a deleção - $\alpha^{3.7}$ , enquanto que a presença de uma única banda, de 1.8kb ou 2.1Kb, indica um genótipo normal ou a homozigose para a deleção - $\alpha^{3.7}$ , respectivamente.

### **3. 2. 7 Análise estatística**

Para a análise das frequências genóticas foi utilizado o teste de Qui-quadrado segundo Callegari-Jacques (2003), por meio da construção de uma tabela de contingência. Este teste também foi utilizado na análise dos resultados da pesquisa de corpos de inclusão de Hb H obtidos para cada grupo genotípico. As restantes análises estatísticas foram realizadas como o auxílio do software *BioEstat* (AYRES et al, 2003).

Antes de realizar qualquer teste foram calculados os valores extremos (*outlier*) positivos (média mais duas vezes o desvio padrão) e negativos (média menos duas vezes o desvio padrão). Os valores localizados fora dos *outliers* foram substituídos pelo valor da média aritmética calculada na ausência de tais valores. Após a eliminação destes valores foi testada a normalidade e a homocedasticidade dos dados, utilizando o teste *Shapiro-Wilk* e o teste *F*, respectivamente. As amostras com distribuição normal e com resultado positivo para o teste de homocedasticidade foram comparados usando o teste paramétrico *t*. Enquanto que as amostras que não apresentaram distribuição normal e/ou resultados negativos no teste *F*, foram comparadas utilizando o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Em todas as análises estatísticas foi utilizado um nível de significância de 0,05 ( $\alpha= 0,05$ ).

Neste trabalho foram analisadas 399 amostras de sangue, sendo 127 provenientes do estado de Sergipe, região nordeste e, 272 do estado de São Paulo, região sudeste. Os resultados globais obtidos para cada amostra encontram-se nas Tabelas de N° 13, 14, 15, 16, 17 e 18 do Apêndice, não foram incluídas aquelas amostras cujo genótipo não foi possível determinar.

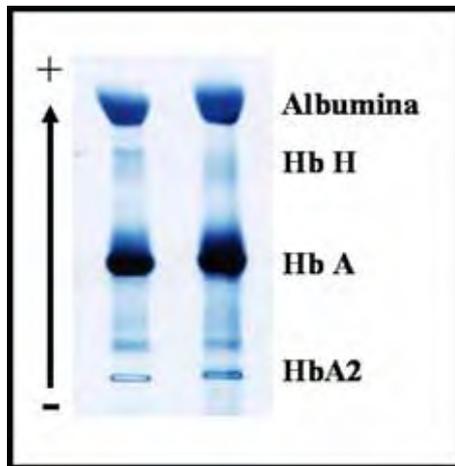
#### ***4.1 Resultados das análises eletroforéticas e citológicas***

Todas as amostras apresentaram resultados laboratoriais que em conjunto foram sugestivos de talassemia alfa, isto é: resistência osmótica em NaCl 0,36% negativa, alterações na morfologia eritrocitária, Hb H na eletroforese em pH alcalino, nos testes de triagem e, nas provas complementares para talassemias alfa, foi identificada uma banda correspondente a Hb H na eletroforese em pH neutro e, observados corpúsculos de inclusão de Hb H na maioria dos casos.

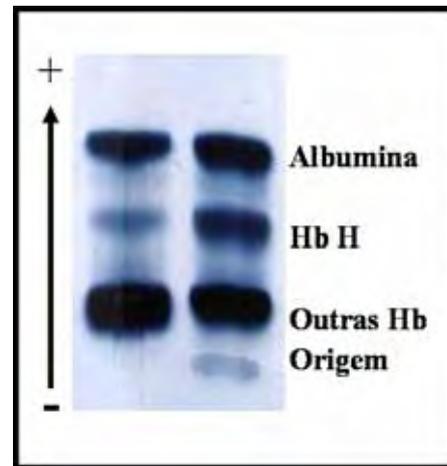
As Figuras 17, 18 e 19, mostram a Hb H identificada pelos métodos eletroforéticos e, células contendo corpúsculos de inclusão de Hb H após a coloração com ACB, de amostras que apresentaram resultados laboratoriais expressivos. No entanto, na maioria dos casos, esses achados foram menos evidentes; nos testes eletroforéticos foram observados traços, às vezes muito fracos, de Hb H e, os corpos de inclusão, quando observados, estiveram presentes em um número reduzido de células, sendo difícil confirmar sua presença, considerando-se a análise inconclusiva para esse teste.

#### ***4.2 HPLC***

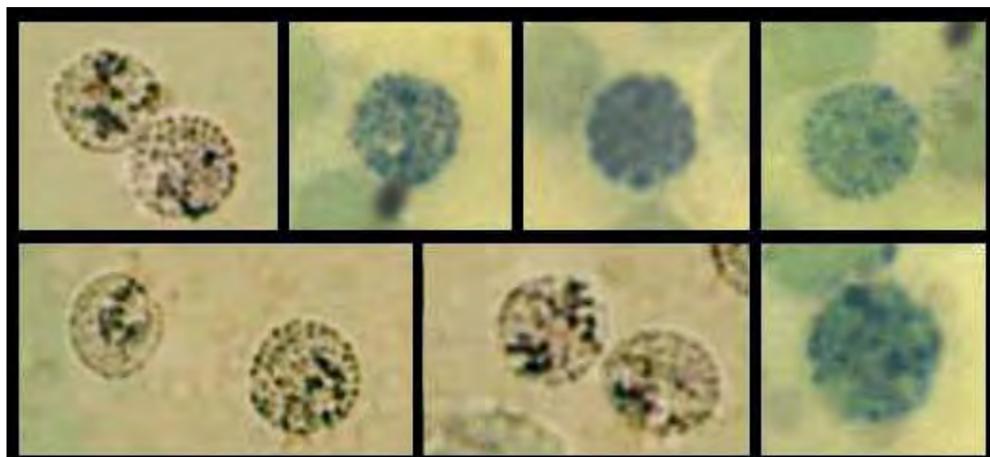
Por meio da cromatografia foram quantificadas as hemoglobinas A<sub>2</sub> e Fetal. A Hb A<sub>2</sub> foi quantificada em 98% (116) das amostras provenientes da região NE e, em 65,4% (178) das amostras provenientes da região SE.



**Figura 17.** Identificação de Hb H na eletroforese alcalina.



**Figura 18.** Identificação de Hb H na eletroforese neutra.



**Figura 19.** Corpúsculos de inclusão de Hb H, após coloração com ACB.

A maioria das amostras analisadas apresentou valores normais para Hb A<sub>2</sub> (2,5-3,5%) e Hb F (< 1%). No entanto, foram identificados 44 indivíduos com Hb A<sub>2</sub> diminuída (Hb A<sub>2</sub> < 2,5%), sendo 14 (12 mulheres e 2 homens) da região NE e, 31 (19 mulheres e 12 homens) da região SE. Também foi identificado um único indivíduo (mulher do NE) com Hb F aumentada (2,1%). Estes valores permitiram descartar a talassemia beta e a persistência hereditária de hemoglobina fetal, nas quais as hemoglobinas A<sub>2</sub> e F encontram-se aumentadas, respectivamente.

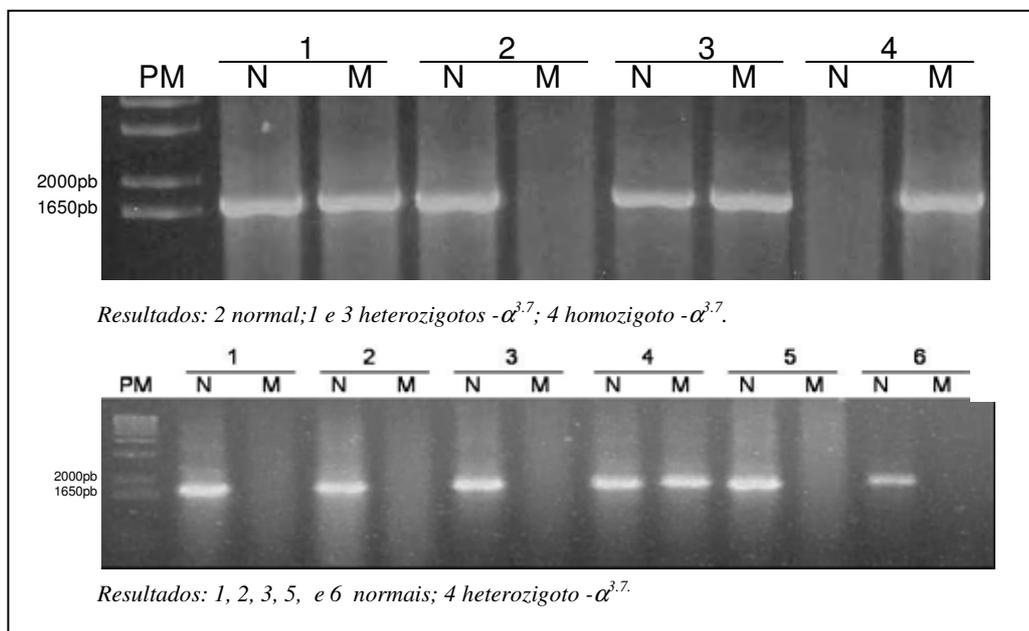
#### **4.3 Resultados da Análise Molecular**

As metodologias de análise molecular precisaram ser otimizadas. Para este propósito foram utilizadas sete amostras, três normais e 4 heterozigotos para a deleção  $-\alpha^{3.7}$ , previamente genotipadas por método de utilização do kit comercial *InstaGene Alpha Gene I* (Bio-Rad).

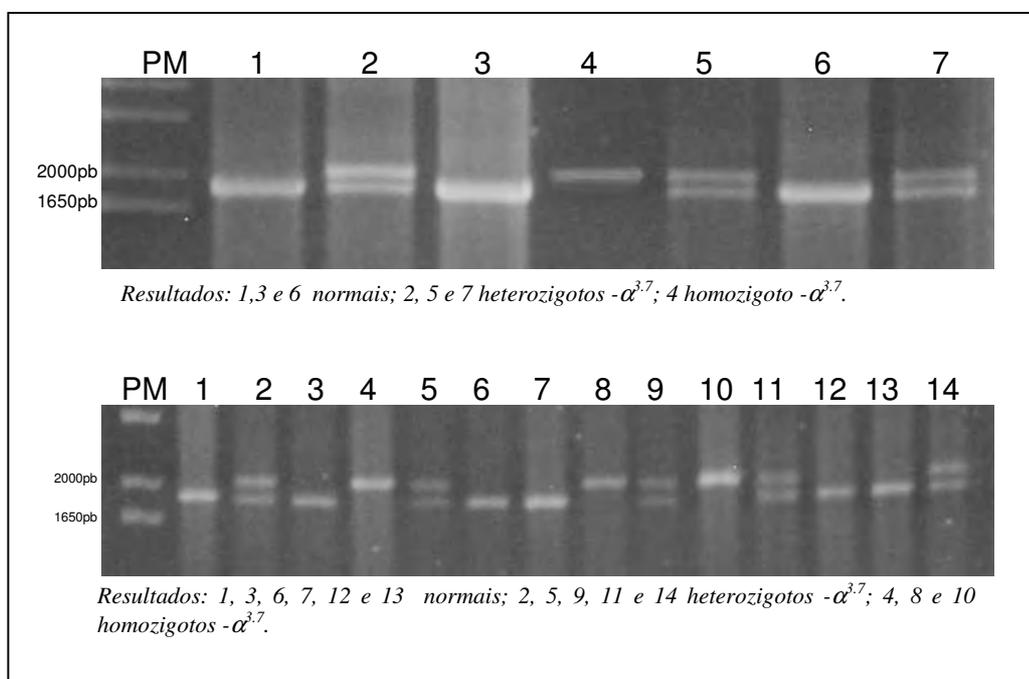
Após extensa revisão bibliográfica e diversos testes otimizou-se as duas metodologias de análise molecular apresentadas neste trabalho. Como a metodologia convencional foi otimizada em primeiro lugar, a genotipagem das primeiras quarenta amostras foi realizada por esta e, as demais foram analisadas por *Multiplex-PCR*. Nas figuras 20 e 21 são mostradas fotos dos géis de agarose onde os produtos de PCR foram separados eletroforéticamente.

Todas as amostras foram analisadas, sendo possível genotipar a maioria delas, 367 de 399 (92%). Os resultados da análise molecular se resumem na tabela 3.

A análise estatística não mostrou diferenças significativas entre as frequências dos genótipos nas duas áreas estudadas ( $p=0,4267$ ). Portanto, os resultados foram agrupados e as frequências genotípicas calculadas (Tabela 4). A partir destas foi obtida a frequência gênica de 0,1 para o alelo  $-\alpha^{3.7}$ .



**Figura 20.** Amostras amplificadas com PCR convencional.



**Figura 21.** Amostras amplificadas com Multiplex-PCR.

**Tabela 3.** Distribuição dos diferentes genótipos nas duas regiões estudadas.

Genótipos	Regiões	
	Nordeste	Sudeste
	n (%)	n (%)
$\alpha/\alpha$	95 (80,51)	211 (84,74)
$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	20 (16,95)	30 (12,05)
$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$	3 (2,54)	8 (3,21)
total	118 (100)	249 (100)

**Tabela 4.** Frequências genotípicas.

Genótipos	n	Frequências Genotípicas
$\alpha/\alpha$	306	0,83
$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	50	0,14
$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$	11	0,03
Total	367	1

#### ***4. 4 Correlação dos achados moleculares com os laboratoriais***

A presença de Hb H na eletroforese em acetato de celulose é o critério mais utilizado para encaminhar as amostras para os teste confirmatórios de talassemia alfa. No grupo analisado, todas as amostras apresentaram a banda de Hb H, às vezes muito fraca. No entanto, só 16,62 % apresentaram a deleção  $-\alpha^{3.7}$ . Resultado similar foi obtido quando comparou-se os dados da eletroforese neutra e da análise molecular. Neste caso só 16,99% dos indivíduos com resultado positivo na eletroforese neutra apresentaram a deleção.

Após a genotipagem, os indivíduos foram agrupados por região e origem. Uma vez agrupados foram analisados estatisticamente os índices eritrocitários (VCM e HCM) de cada genótipo em cada grupo. Os resultados da análise estatística inicial, que incluíram Média e Desvio Padrão, estão resumidos na Tabela 5.

Comparou-se estatisticamente os valores médios de VCM e HCM entre os grupos genotípicos de cada região (Tabela 6). Como não se observaram diferenças, estatisticamente significativas, reuniu-se os dados em um único grupo (NE-SE) (Tabela 7).

**Tabela 5.** Valores médios de VCM e HCM para cada genótipo das regiões estudadas.

Região	Genótipo	n	VCM $\bar{X} \pm DP$	HCM $\bar{X} \pm DP$
Nordeste	aa/aa	95	83,27 ± 9,62	26,71 ± 3,61
	-a <sup>3.7</sup> /aa	20	79,96 ± 6,80	25,58 ± 2,23
	-a <sup>3.7</sup> /-a <sup>3.7</sup>	3	69,9 ± 3,10	21,20 ± 2,20
Sudeste	aa/aa	211	83,25 ± 9,04	27,51 ± 3,30
	-a <sup>3.7</sup> /aa	30	80,43 ± 4,60	26,21 ± 1,79
	-a <sup>3.7</sup> /-a <sup>3.7</sup>	8	72,10 ± 1,69	22,43 ± 2,15

$\bar{X}$  : média, DP: desvio padrão.

**Tabela 6.** Comparação dos valores médios de VCM e HCM de cada grupo genotípico pertencentes às duas regiões estudadas.

Genótipos		VCM	HCM	Genótipos	
Nordeste	aa/aa	p= 0,8253	p= 0,0986	aa/aa	Sudeste
	-a <sup>3.7</sup> /aa	p= 0,7713	p= 0,2740	-a <sup>3.7</sup> /aa	
	-a <sup>3.7</sup> /-a <sup>3.7</sup>	p= 0,2616	p= 0,3074	-a <sup>3.7</sup> /-a <sup>3.7</sup>	

**Tabela 7.** Valores médios de VCM e HCM para cada genótipo.

Região	Genótipo	n	VCM $\bar{X} \pm DP$	HCM $\bar{X} \pm DP$
NE-SE	aa/aa	306	83,25 ± 9,21	27,32 ± 3,46
	-a <sup>3.7</sup> /aa	50	80,28 ± 4,85	25,85 ± 2,12
	-a <sup>3.7</sup> /-a <sup>3.7</sup>	11	71,43 ± 2,23	22,55 ± 1,47

NE-SE= grupo total avaliado.

Merece destaque o fato de que as amostras identificadas como normais (genótipo  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), são normais para a deleção  $-\alpha^{3.7}$ , porém, não se elimina a possibilidade de outras mutações estarem presentes. Devido a este fato não foi possível comparar estatisticamente os valores de HCM e VCM deste grupo fenotípico com os outros.

Com o intuito de realizar comparações separou-se o grupo normal em dois: um ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) incluindo indivíduos sem microcitose (VCM  $\geq 80$ fl) e/ou hipocrômica (HCM  $\geq 27$ pg), com poucas probabilidades de portar alguma mutação e; um outro ( $\alpha\alpha/?$ ) contendo indivíduos com microcitose (VCM  $< 80$ fl) e/ou hipocrômica (HCM  $< 27$ pg), com maior probabilidade de possuir alguma alteração molecular diferente da investigada.

Estabelecidos os dois grupos, foram calculados os valores médios e desvio padrão para Hb A<sub>2</sub>, Hb F, VCM e HCM. Na Tabela 8, apresentam-se os valores médios e o desvio padrão de VCM e HCM para cada grupo. Como os indivíduos com genótipo  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$  apresentaram valores médios para VCM e HCM dentro dos parâmetros de normalidade, segundo valores previamente estabelecidos para o Brasil, listados no Quadro 1, foram utilizados como “grupo normal” nas comparações estatísticas.

O grupo com genótipo  $\alpha\alpha/?$  apresentou valores médios para VCM e HCM significativamente menores que os do grupo com genótipo heterozigoto ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ), sugerindo a presença de outras alterações moleculares com expressão fenotípica similar a apresentada pelo o grupo homozigoto ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ), com o qual não apresentou diferenças significativas (Tabela 9).

Por outro lado, observaram-se diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para os valores de VCM e HCM entre os grupos normal, heterozigoto e homozigoto (Tabela 10 e Figuras 22 e 23).

Tabela 8. Valores médios de VCM e HCM.

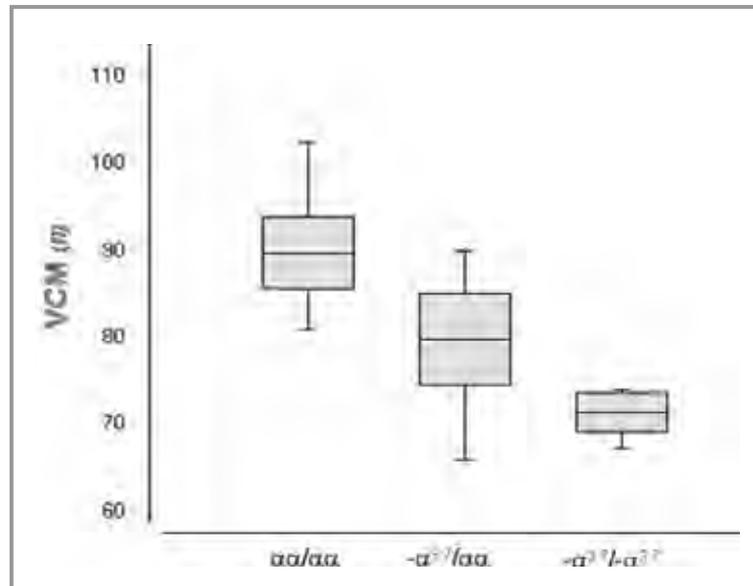
Região	Genótipo	n	VCM $\bar{X} \pm DP$	HCM $\bar{X} \pm DP$
NE-SE	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	171	89,87 ± 4,19	29,64 ± 1,33
	$\alpha\alpha/?$	135	73,03 ± 6,80	23,23 ± 2,78
	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	50	79,96 ± 5,25	25,71 ± 2,66
	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	11	71,43 ± 2,23	22,55 ± 1,47

Tabela 9. Comparação dos valores médios de HCM e VCM entre o grupo  $\alpha\alpha/?$  e os grupos heterozigoto e homozigoto.

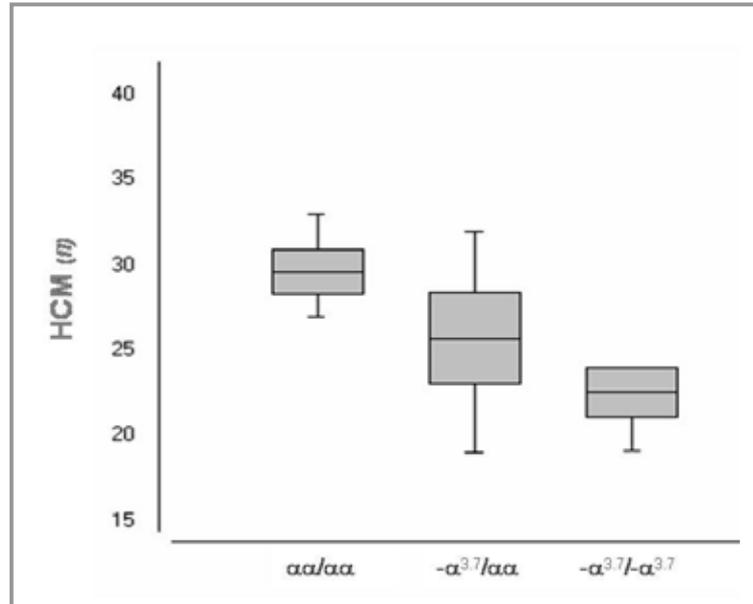
Genótipos	VCM	HCM	Genótipos
$\alpha\alpha/?$	p= 0,000	p= 0,000	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
$\alpha\alpha/?$	p= 0,1820	p= 0,1421	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$

Tabela 10. Comparação dos valores médios de HCM e VCM entre os grupos genotípicos avaliados.

Genótipos	VCM	HCM	Genótipos
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	p= 0,000	p= 0,000	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	p= 0,000	p= 0,0000	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$



**Figura 22.** Comparação dos níveis de VCM entre os grupos genotípicos



**Figura 23.** Comparação dos níveis de HCM entre os grupos genotípicos

Na pesquisa de corpúsculos de inclusão de Hb H foram obtidos três tipos de resultados: positivo, negativo e inconclusivo. Células contendo corpúsculos de inclusão de Hb H foram observadas tanto em indivíduos com a deleção como também em indivíduos sem a deleção (tabela 11). Não foram observadas diferenças significativas ( $p=0,4497$ ) na comparação dos resultados obtidos entre os três grupos genotípicos. O mesmo resultado foi obtido quando a comparação foi feita entre indivíduos com e sem a deleção ( $p=0,1952$ ). Os resultados mantiveram-se após do reagrupamento do grupo com genótipo normal, descrito anteriormente,  $p= 0,2883$  para comparação entre genotípicos e,  $p= 0,1157$  para comparação entre indivíduos com e sem deleção. Estes dados mostram que não existem diferenças estatisticamente significativas para a presença de corpúsculos de inclusão de Hb H entre os grupos genotípicos ou entre indivíduos com ou sem a deleção.

Quando comparamos os valores de Hb A<sub>2</sub> e F entre os diferentes genótipos, observamos valores de Hb A<sub>2</sub> significativamente menores no grupo homozigoto em relação aos grupos normal e heterozigoto ( $p<0,05$ ) (Figura 24). No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os valores médios de Hb F entre os grupos genotípicos ( $p>0,05$ ). Estes achados estatísticos se mantiveram após o reagrupamento das amostras com genótipo normal. Na Tabela 12 apresentam-se os valores médios e o desvio padrão das Hb A<sub>2</sub> e F para cada grupo genotípico.

**Tabela 11.** Resultado de pesquisa de corpúsculos de inclusão de Hb H.

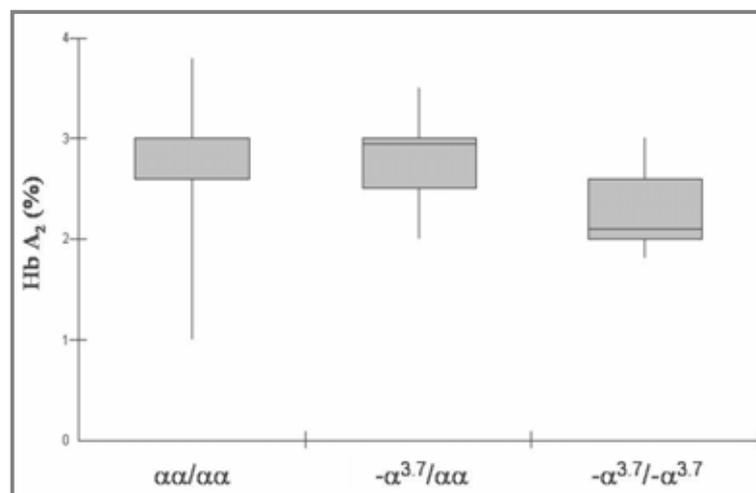
Genótipos	Resultados		
	+	-	Inconclusivo
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	80	166	60
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	11	25	14
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	3	4	4

+= resultado positivo, -=resultado negativo.

**Tabela 12.** Valores médios de Hb A<sub>2</sub> e F para cada grupo genotípico

Genótipos	Hemoglobinas	
	A <sub>2</sub>	F
	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	2,85 ± 0,41	0,42 ± 0,39
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	2,81 ± 0,43	0,41 ± 0,61
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	2,30 ± 0,44	0,30 ± 0,41

$\bar{X}$  : média, DP: desvio padrão.

**Figura 24.** Comparação dos níveis de Hb A<sub>2</sub> entre os grupos genotípicos.

A talassemia alfa é uma anemia que resulta da síntese deficiente de globina alfa, levando a produção insuficiente de hemoglobina normal e ao acúmulo de tetrâmeros instáveis  $\gamma_4$  (Hb Bart's) ou  $\beta_4$  (Hb H), com a conseqüente destruição acelerada de glóbulos vermelhos. A talassemia alfa pode ser herdada ou adquirida e, pode ser originada por defeitos em um ou mais dos quatro genes de globina alfa (LIEBHABER, 1989). A gravidade depende do número de genes alfa afetados (LIEBHABER, 1989; HIGGS et al., 1989; KAZAZIAN, 1990). As deleções são o principal defeito molecular, sendo a deleção de 3.7kb a mais freqüente e amplamente distribuída pelo mundo (ORON-KARNI et al., 2000). No Brasil, esta alteração tem sido encontrada em uma freqüência considerável nos grupos estudados (SONATI et al., 1991; BORGES et al., 2001; COUTO et al., 2003; ADORNO et al., 2005).

Neste trabalho foram analisadas amostras de sangue provenientes das regiões nordeste e sudeste do Brasil. Na triagem básica para talassemias, os resultados da análise eletroforética em acetato de celulose, pH alcalino, e pH neutro não mostraram correlação com os resultados obtidos por biologia molecular. Vários autores (JONES et al, 1981; CLARKE; HIGGINS, 2000; OU; ROGNERUD, 2001) alertam para o perigo de falsos negativos, devido a limitada resolução dessas técnicas para identificar baixas concentrações de Hb H ou Bart's. A Hb H é quase sempre detectável na eletroforese quando três dos quatros genes alfa estão deletados. No entanto, quando um ou dois genes alfa são afetados, a quantidade de Hb H é quase sempre indetectavel em fitas de acetato de celulose (JONES et al., 1981; STEINBERG, 1991; HIGGS, 1993). Os resultados deste trabalho apresentaram uma correlação inversa, só uma fração dos indivíduos que apresentaram Hb H na eletroforese teve seu resultado confirmado por biologia molecular, sugerindo dificuldade metodológica ou de interpretação nos testes iniciais. Para todas as amostras que não confirmaram na biologia molecular, não foi possível considerar a

presença de outras mutações, não pesquisadas neste trabalho, devido a deleção  $-\alpha^{3.7}$  ser a mais freqüente, segundo a literatura, para a população brasileira.

A supressão da síntese normal de cadeias globínicas alfa, provocada pela deleção de um ou mais genes alfa, leva a um desequilíbrio proporcional das cadeias beta com a formação de tetrâmero de Hb H ( $\beta_4$ ), os quais precipitam na membrana eritrocitária, e podem ser visualizados quando corados com ACB, dando às células um aspecto de bola de golfe (CLARKE; HIGGINS, 2000; PAN et al., 2005). A identificação dos corpúsculos de inclusão de Hb H, após a coloração com ACB, é muito utilizada no diagnóstico das talassemias alfa, considerada por vários autores como mais eficiente que a eletroforese para a identificação de traço talassêmico, sem o risco de falsos positivos (WINICHAGOON; ADIROJNANON; WASE, 1980; JONES et al., 1981; SKOGERBOE et al., 1993; PAN et al., 2005). Vários trabalhos foram publicados relatando melhorias na técnica que aumentam a eficiência na identificação das inclusões de Hb H (JONES et al., 1981; LIN et al., 1990; LIN et al., 1991; SABATH et al., 2003; PAN et al., 2005). No entanto Thompson et al (1989) e Clarke & Higgins (2000) consideram este método ineficiente para o diagnóstico de portadores dos genótipos  $-\alpha/\alpha\alpha$  ou  $-\alpha/-\alpha$ , pois, nestes indivíduos o número de células contendo corpúsculos de Hb H é muito baixo ou inexistente. Por esse motivo a ausência de corpúsculos não é considerada um critério de exclusão de talassemia alfa.

Em nosso estudo foram observadas células contendo corpúsculos de inclusão tanto em indivíduos portadores da deleção como em indivíduos genotipicamente normais para a deleção  $-\alpha^{3.7}$ , não mostrando diferenças estatisticamente significativas para a presença de corpúsculos de inclusão de Hb H entre os grupos genotípicos ou entre indivíduos com ou sem a deleção. Estes resultados não correspondem aos publicados na literatura, nos quais não foram observadas inclusões em indivíduos genotipicamente normais ou, com os genótipos  $-\alpha/\alpha\alpha$  e  $-\alpha/-\alpha$  (GALANELLO et al., 1984; PAN et al., 2005). Mesmo utilizando

reticulócitos enriquecidos, que aumenta a possibilidade de observar corpúsculos de inclusão (THOMPSON et al., 1989; WANG et al., 2000; SABATH et al., 2003)

A pesquisa de corpos de inclusão de Hb H é trabalhosa, sendo os resultados altamente dependentes do observador (CHUI; WAYE, 1998), e o desempenho da coloração com ACB pode variar amplamente dependendo do fabricante e até do lote do corante. O tempo de análise é muito importante, e o espaço de tempo entre a coleta e análise também (PAN et al., 2005). Dificuldades na identificação dos corpúsculos de inclusão são esperadas, conforme observado por Clarke e Higgins (2000), pois o ACB não é específico para Hb H, podendo corar também ácidos nucléicos e proteínas, o que enfatiza a necessidade de pessoal bem treinados para a identificação das inclusões de Hb H. Com base nestes relatos, pode-se considerar que os resultados obtidos evidenciam problemas metodológicos ou de interpretação, pois seria esperado encontrar corpúsculos de inclusão só nos indivíduos com alguma alteração molecular.

As hemoglobinas A<sub>2</sub> e F auxiliam o diagnóstico de talassemia beta e da persistência hereditária de Hb F. Quando o interesse é o diagnóstico de talassemias alfa a quantificação destas hemoglobinas tem sido utilizada para eliminar a presença de outras alterações, pois nas talassemias alfa os valores destas hemoglobinas permanecem dentro dos limites de normalidade. Valores de Hb A<sub>2</sub> diminuídos abaixo de 2% são um forte indicador de talassemias alfa mais graves (OLD, 2003). A Hb A<sub>2</sub> pode também estar diminuída na anemia ferropriva, cujo quadro laboratorial assemelha-se ao das talassemia alfa. Sendo essa anemia freqüente no Brasil, deve ser afastada sua presença.

Baysal, Qin e Huisman. (1994) observaram uma correlação entre o número de genes alfa e a diminuição dos níveis de Hb F. Em nossos estudos, os níveis de Hb F estavam dentro da normalidade (0-1%), entretanto, o grupo homocigoto apresentou níveis menores de Hb F quando comparados aos grupos normal e heterocigotos, que apresentaram valores muito similares desta Hb. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas, sendo necessária

uma análise mais ampla, incluindo um número maior de indivíduos homozigotos, para confirmar estas diferenças.

Os níveis médios de Hb A<sub>2</sub> foram estatisticamente inferiores no grupo homozigoto em relação aos grupos normal e heterozigoto, entre os quais não se observou diferença significativa. Resultados similares foram encontrados por Head et al. (2003) quantificando Hb A<sub>2</sub> e Hb S em indivíduos com e sem talassemia alfa. Apesar de existir superposição entre os valores observados nos grupos, valores de Hb A<sub>2</sub> em torno de  $2,30 \pm 0,44$  podem ser utilizados para sugerir o provável genótipo. Um estudo mais amplo deverá ser feito para confirmar este achado.

As talassemias alfa são definidas como anemias microcíticas hipocrômicas. Portanto, os índices eritrocitários (VCM e HCM) podem ser utilizados no diagnóstico desta alteração. Os valores médios para VCM e HCM, obtidos para cada grupo genotípico neste trabalho, estão de acordo com os observados em outros estudos (BOWDEN et al., 1987; THOMPSON et al., 1989; SKOGERBOE et al., 1992; WANG et al., 2000; CHAN et al., 2001). Existem pequenas diferenças que podem ser justificadas por terem sido analisados diferentes grupos populacionais. Ressalta-se que é possível observar diferenças entre os níveis de VCM e HCM citados na literatura e os encontrados em nosso grupo normal, que mesmo tendo sido reagrupado não representou uma amostra randômica de uma população normal.

Quando comparou-se os valores médios de VCM e HCM entre os grupos genotípicos, observou-se diferenças significativas, mostrando uma correlação entre o nível destes índices e o número de genes alfa presentes. Apesar de existir esta correlação e, ser possível estimar o genótipo a partir dos valores de VCM e HCM (SKOGERBOE et al., 1992), existe uma sobreposição dos índices entre os grupos genotípicos avaliados, não sendo viável a utilização destes como parâmetros únicos para determinar o genótipo dos indivíduos. Esta mesma observação foi feita previamente por outros autores (SKOGERBOE et al., 1992; SONATI; KIMURA; FERREIRA, 1992; WILLIAMS et al., 1996).

A amostragem  $\alpha\alpha/?$  obtida após o reagrupamento do grupo com genótipo normal, apresentou valores médios dos índices eritrocitários que sugerem a presença de outras mutações diferentes da pesquisada, possivelmente deleções de dois genes alfa (genótipo:  $\alpha\alpha/--$ ). Novos trabalhos serão necessários para identificar os possíveis mutantes.

Neste estudo, a utilização da análise molecular não só permitiu identificar os portadores da deleção  $-\alpha^{3.7}$ , como também avaliar os métodos laboratoriais de rotina utilizados no diagnóstico das talassemias alfa.

Como não foram encontradas diferenças significativas nas frequências genótípicas entre os grupos analisados, foram agrupadas e calculadas as frequências genótípicas para o total das amostras analisadas. A partir das frequências genótípicas, calculou-se a frequência gênica do alelo  $-\alpha^{3.7}$ . Quando comparamos a frequência genótípicas obtidas em nosso trabalho com as relatadas por outros autores, observamos que as frequências de talassemias alfa encontradas em nossos estudos para a região nordeste estão de acordo aos encontrados por Couto et al.,(2003) em uma amostra de mulheres grávidas com Hb AS e, Adorno et al. (2005) em recém-nascidos em Salvador, Bahia. Não foi possível comparar nossos achados com os relatados por Sonati et al (1991) e Borges et al. (2001), pois estes trabalhos foram realizados em grupos populacionais específicos. As frequências genótípicas encontradas para a região sudeste concordam com as observadas em São José do Rio Preto, São Paulo, por Bonini-Domingos (1993). Frequências menores, que as encontradas em nosso estudo, foram relatadas por vários autores (PEDROLLO, 1990; ALVES DE MELO, 1993; FLEURY, 1994; MENDEZ-SIQUEIRA, 2000). Estas diferenças são esperadas, tendo em vista que nesses trabalhos, a frequência de talassemia alfa foi calculada por meio da identificação eletroforética de Hb Bart's. Como demonstrado por Sonati et al (1991), esta metodologia de análise pode subestimar a frequência de talassemias alfa.

Leoneli et al. (2000), destaca a dificuldade no diagnóstico das hemoglobinopatias de forma geral e, em particular, das talassemias em sua forma heterozigota. A partir desses dados e com os resultados obtidos neste trabalho destacamos a necessidade de:

Reavaliar a utilização da eletroforese e da pesquisa de corpúsculos de inclusão de Hb H no diagnóstico das talassemias alfa. Para a pesquisa de corpúsculos de inclusão é preciso contar com pessoal devidamente treinado e disposto, por ser trabalhosa, tediosa e altamente dependente do observador.

Incluir a análise dos valores de Hb A<sub>2</sub> e Hb F obtidos por HPLC, não só para descartar a talassemia beta e PHHF, mas também porque valores normais ou diminuídos destas hemoglobinas sugerem a presença de mutações nos genes alfa.

A análise dos índices eritrocitários é significativa para avaliar a gravidade da anemia e útil no diagnóstico das formas graves de talassemias alfa. Indivíduos com microcitose (VCM < 80fl) e hipocromia (HCM < 27pg) deverão ser investigados molecularmente para a presença de mutações clinicamente relevantes.

A análise molecular tem mostrado ser o único método, altamente sensível, específico e reproduzível para o diagnóstico e confirmação das talassemias alfa. Portanto, é essencial sua introdução como método de diagnóstico na rotina. A principal desvantagem é seu elevado custo, que nos últimos anos, esta se revertendo, sendo cada vez mais acessível. Calculamos um custo de aproximadamente R\$ 10 por amostra para a identificação molecular da deleção  $-\alpha^{3,7}$ , pelo método aqui utilizado.

Baseados em dados da literatura e nos resultados obtidos neste trabalho, propomos o seguinte fluxo de avaliação para o diagnóstico de talassemias alfa:

- Análise dos índices eritrocitários, VCM e HCM.
- Análise dos níveis de ferritina e ferro sérico.
- Análise da morfologia eritrocitária para identificar alterações compatíveis com microcitose e hipocrômica.
- Utilização da eletroforese em pH alcalino para eliminar a possível presença de outras alterações de hemoglobinas.
- Utilização do HPLC para quantificar Hb A<sub>2</sub> e Hb F e, identificar outras variantes.
- Naqueles indivíduos com microcitose (VCM<80fl) e/ou hipocrômica (HCM<27pg) que apresentarem padrão de hemoglobinas normais na eletroforese e HPLC, níveis normais de ferro sérico e ferritina e, valores normais ou levemente diminuídos de Hb A<sub>2</sub>, investigar molecularmente a presença de mutações clinicamente relevantes. Quando a análise molecular não for disponível, é possível sugerir o provável genótipo do indivíduo por meio da avaliação cuidadosa dos resultados laboratoriais.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. A eletroforese em acetato de celulose, em pH alcalino e neutro, e a pesquisa de corpúsculos de inclusão de H não foram metodologias eficientes no diagnóstico das talassemias alfa devido a deleção  $-\alpha^{3,7}$ , super estimando as frequências destas.
2. Os valores médios de Hb A<sub>2</sub> são significativamente menores no grupo homozigoto ( $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ ) quando comparado ao grupo normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) e heterozigoto ( $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ ). Podendo ser úteis no diagnóstico de talassemias alfa.
3. Não existem diferenças significativas para os valores médios de Hb F entre os genótipos avaliados.
4. Os níveis médios de HCM e VCM foram estatisticamente diferentes nos grupos genotípicos avaliados. Podendo ser utilizadas para auxiliar o diagnóstico das talassemias alfa, pois existe correlação entre estes valores e o número de genes alfa presentes.
5. A talassemia alfa devido a deleção  $-\alpha^{3,7}$  foi observada em uma frequência considerável nos grupos analisados, confirmando os dados da literatura. Sendo necessário associar varias metodologias de análises para realizar seu diagnóstico.

ADORNO, E. V. et al. **Hemoglobinopatias in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil.** *Cad. Saúde Publica.* V. 21, n. 1, p.292-298, Jan. 2005.

ABUELO, D. N.; FORMAN, E. N.; RUBIN, L.P. Limb defects and congenital anomalies of the genitalia in an infant with homozygous alpha-thalassemia *Am J Med Genet.* v. 68, n. 2, p. 158-161, Jan. 1997.

ALVES de MELO, S. M. **Prevalência da hemoglobinopatias em amostras de bancos de sangue e escolares do triangulo minero.** 1993. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 1993.

AYRES, M. et al. **Bioestat.** 3<sup>ra</sup> ed. MPEG/CNPq, 1998.

BANG-CE, Y. et al. Simultaneous detection of alpha-thalassemia and beta-thalassemia by oligonucleotide microarray. **Haematol.** v. 89, n. 8, p. 1010-1012, Aug. 2004.

BAYSAL, E.; HUISMAN, T. H. Detection of common deletional alpha-thalassemia-2 determinants by PCR. **Am J Hematol.** v. 446, n. 3, p. 208-213, Jul. 1994.

BAYSAL, E.; QIN, W. B.; HUISMAN, T. H. J.  $\alpha$ -Thalassemia and Fetal hemoglobin. **Blood.** v. 84, n. 9, p. 3241-3242, Nov. 1994.

BONINI-DOMINGOS, C. R. **Hemoglobinopatias no Brasil:** variabilidade genética e metodologia laboratorial. 1993. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 1993.

BORGES E. et al. High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 34, n. 6, p. 759-762, Jun. 2001.

BOWMAN, E. et al. Hemoglobin Bart hydrops fetalis syndrome. **Haematol.** (Budap). v. 20, n. 3, p. 125-130, 1987.

BOWDEN, D. K. et al. Different hematologic phenotypes are associated with the leftward ( $-\alpha^{4.2}$ ) and rightward ( $-\alpha^{3.7}$ )  $\alpha^+$ -thalassemia deletions. **J. Clin Invest.** v. 79, p. 39-43, Jan. 1987.

BOWDEN, D. K.; VICKERS, M. A.; HIGGS, D. R. A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of alpha-thalassemia. **Br. J. Haematol.** v. 81, p. 104-108, Jan. 1992.

BUNYARATVEJ, A. et al. Hydration of red cells in alpha and beta thalassemias differs. A useful approach to distinguish between these red cell phenotypes. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 102, n. 2, p. 217-222, Aug. 1994.

CHEN, F. E. et al. Genetic and clinical features of hemoglobin H disease in Chinese patients. **N. Engl. J. Med.** v. 343, n. 8, p. 544-550, Apr. 2001.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. Bioestatística: princípios e aplicações. 1<sup>ra</sup> ed. Artmed. Porto Alegre, 2003.

CHAN, L. C. et al. Should we screen for globin gene mutations in blood samples with mean corpuscular volume (MCV) greater than 80 fl in areas with a high prevalence of thalassemia?. **J. Clin. Pathol.** v. 54, p. 317-320, 2001.

CHUI DH, WAYE JS. Hydrops fetalis caused by alpha-thalassemia: an emerging health care problem. **Blood**. v. 91, n. 7, p. 2213-2222, Apr. 1998.

CHONG SS, BOEHM CD, CUTTING GR, HIGGS DR. Simplified multiplex-PCR diagnosis of common southeast asian deletional determinants of alpha-thalassemia. **Clin Chem**, v. 46, n. 10, p. 1692-1695, 2000.

CLARKE GM, HIGGINS TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. **Clin. Chem**. v. 46, n. 8, p. 1284-1290, Aug. 2000.

CHUI DH, FUCHAROEN S, CHAN V . Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. **Blood**. v. 101, n. 3, p. 791-800, Feb. 2003.

COUTO, F. D. et al. Alpha-Thalassemia 2, 3.7 kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: a molecular and hematological analysis. **Clin. Lab. Haematol**. v. 25, n. 1, p. 29-34, Feb. 2003.

DACIE JV, LEWIS SM. "In: **Practical Haematology**". 6 ed. **Churchill**, London, p.516, 1985.

DACIE, J. V., LEWIS, S. M. **Practical Haematology**. 8 ed. **Livingstone: Churchill**, 1995.

DODÉ, C. et al. Rapid analysis of  $-\alpha^{3.7}$  thalassaemia and  $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$  triplication by enzymatic amplification analysis. **Br. J. Haematol.** v. 82, p. 105-111, Jul. 1992.

DONDORP, A. M. et al. Red cell deformability, splenic function and anaemia in thalassaemia. **Br. J. Haematol**. v. 105, n. 2, p. 505-508, May. 1999.

EASTMAN, J. W. et al. Automated HPLC screening of newborns for sickle cell anemia and other hemoglobinopathies. **Clin. Chem.**, v. 42, n. 5, p. 704-710, May. 1996.

EMBURY, S.H. et al. Two different molecular organizations account for the single alpha-globin gene of the alpha-thalassemia-2 genotype. **J Clin Invest**, v. 66; n. 6; p. 1319-1325, 1980.

FISCHEL-GHODSIAN, N. et al. Characterization of two deletions that remove the entire human zeta-alpha globin gene complex (- -THAI and - -FIL). **Br. J. Haematol**, v.70; n. 2; p. 233-238, 1988.

FOGLIETTA, E. et al. Detection of alpha-globin gene disorders by a simple PCR methodology. **Haematol.**, v. 81, n. 5, p. 387-396, Sep-Oct. 1996.

FLINT, J. et al. High frequencies of alpha-thalassaemia are the result of natural selection by malaria. **Nature**, v. 321; n. 6072; p. 744-750, 1986.

FLINT, J. et al. The population genetics of the haemoglobinopathies. **Baillieres Clin Haematol**, v. 6; n. 1; p. 215-262, 1993.

FLEURY, M. K. **Pesquisa de hemoglobina “S” e outras hemoglobinas em neonatos**. 1994. Tese ( Mestrado em Ciências da Saúde) – Instituto de Biologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Rio de Janeiro, 1994.

FORTINA, P. et al. A large deletion encompassing the entire alpha-like globin gene cluster in a family of northern European extraction. **Nucleic Acids Res**, v. 16; n.23; p. 11223-11235, 1988.

FUCHAROEN, S. et al. Prenatal and postnatal diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. **Clin. Chem.** v. 44, p. 740-748, 1998.

FUCHAROEN, S.; WINICHAGOON, P. Thalassemia and abnormal hemoglobin. **Int. J. Hematol.** v. 76, supl 2, p. 83-89, Aug. 2002.

GALANELLO, R. et al. Hemoglobin inclusions in heterozygous alpha-thalassemia according to their alpha-globin genotype. **Acta Haematol.** v. 72, n. 1, p. 34-36, 1984.

GALANELLO, R. et al. HbH disease in Sardinia: molecular, hematological and clinical aspects. **Acta Haematol.** v. 88, n. 1, p. 1-6, 1992.

GUY, G. et al. alpha-Thalassemia hydrops fetalis: clinical and ultrasonographic considerations. **Am J Obstet Gynecol.** v. 153, n. 5, p. 500-5004, Nov. 1985.

GOOSSENS, M. et al. Triplicated alpha-globin loci in humans **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 77; n. 1; p. 518-521, 1980.

GUIDA, V. et al Denaturing HPLC-based assay for molecular screening of nondeletional mutations causing alpha-thalassemias. **Clin Chem.** v. 50, n. 7, p. 1242-1245, Jul. 2004.

HATTON, C. S. R. et al.  $\alpha$ -Thalassemia Caused by a Large (62 kb) Deletion Upstream of the Human  $\alpha$  Globin Gene Cluster. **Blood.** v. 76, n. 1, p. 221-227, Jul. 1990.

HARTEVELD, K. L. et al. Rapid detection of point mutations and polymorphisms of the alpha-globin genes by DGGE and SSCA. **Hum. Mutat.** v. 7, n. 2, p. 382, 1996.

HESS, J. F.; SCHMID, C. W.; SHEN, C. K. A gradient of sequence divergence in the human adult alpha-globin duplication units. **Science**. v.226; n. 4670; p. 67-70, 1984.

HIGGS, D. R. et al. A novel alpha-globin gene arrangement in man. **Nature**, v.284; n. 5757; p. 632-635, 1980.

HIGGS, D. R. et al. Highly variable regions of DNA flank the human alpha globin genes. **Nucleic Acids Res.** v. 9, n. 17, p. 4213-4224, Sep. 1981.

HIGGS, D. R. et al. Independent recombination events between the duplicated human alpha globin genes; implications for their concerted evolution. **Nucleic Acids Res**, v. 12; n. 18; p. 6965-6977, 1984.

HIGGS, D. R. A review of the molecular genetics of the alpha gene cluster. **Blood**, v. 73; n.5; p. 1081-1104, 1989.

HIGGS, D. R. The molecular genetics of the  $\alpha$  globin gene family. **Eu. J. Cl. Invs.** v. 20, p. 340-347, 1990.

HIGGS, D. R.  $\alpha$ -Thalassemia. **Baillieres Clin. Haematol.** v. 6, p. 117-150, 1993.

HONIG, G. R.; ADAMS III, J. G. **Human Hemoglobin Genetics**. Springer Verlag/wien - N.Y., 1986.

JARMAN, A.P. et al. Molecular characterisation of hypervariable region downstream of the human  $\alpha$ -globin gene cluster **EMBO**. vol. 5, no.8, p.1857-1863, 1986.

JARMAN, A. P, HIGGS, D. R. A new hypervariable marker for the human alpha-globin gene cluster. **Am. J. Hum. Genet.** v. 43, n. 3, p. 249-256, Sep. 1988.

JARMAN, A. P. et al. Characterization of the Major Regulatory Element Upstream of the Human  $\alpha$ -Globin Gene Cluster. **Mol. Cell. Biol.** v. 11, n. 9, p. 4679-4689, Sep. 1991.

JONES, J. A. et al. An improved method for detection of red cell hemoglobin H inclusions. **Am J Med Technol.** v. 47, n. 2, p. 94-96, Feb. 1981.

JONES, W.; CLARK, L. A. Hemoglobinopathy and thalassemia testing: an automated method. **Am. Clin. Lab.** Nov. 1994

KANAVAKIS, E. et al. Phenotypic and molecular diversity of haemoglobin H disease: a Greek experience. **Br J Haematol.** v. 111, n. 3, p. 915-923, Dec. 2000.

KATTAMIS, C. et al. Correlation of clinical phenotype to genotype in haemoglobin H disease. **Lancet.** v. 1, n. 8583, p. 442-444, Feb. 1988.

KATTAMIS, A. C. et al. HUMAN  $\alpha$ -THALASSEMIA Syndromes: Detection of Molecular Defect: *An. J. Hematol.* v. 53, p. 81-91, 1996:

KAZAZIAN, J.R. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. **Semin Hematol**, v. 27; n. 3; p. 209-128, 1990.

KUYPERS, F. A. Red cell membrane damage. **J. Heart. Valve. Dis.** v. 7, n. 4, p. 387-395, Jul. 1998.

LAUER, J.; SHEN, C. K.; MANIATIS, T. The chromosomal arrangement of human alpha-like globin genes: sequence homology and alpha-globin gene deletions. **Cell.** v. 20; n. 1; 119-130, 1980.

LAFFERTY, J. D. et al. The evaluation of various mathematical RBC indices and their efficacy in discriminating between thalassemic and non-thalassemic microcytosis. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 106, n. 2, p. 201-205, Aug. 1996.

LEBO, R.V. et al. Prenatal diagnosis of alpha-thalassemia by polymerase chain reaction and dual restriction enzyme analysis. **Hum. Genet.** v. 85, n. 3, p. 293-299, Aug. 1990.

LEONELI, G. G. et al. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. **Ver Brás Hematol. Hemoter.** v. 22, n. 3, p. 396-403, 2000.

LIANG, S. T. et al. Homozygous alpha-thalassaemia: clinical presentation, diagnosis and management. A review of 46 cases. **Br. J. Obstet. Gynaecol.** v. 92, n. 7, p. 680-684, Jul. 1985.

LIU, Y. T. et al. Rapid detection of alpha-thalassaemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. **Br. J. Haematol.** v. 108, n. 2, p. 295-299, Feb. 2000.

LIU, J. Z. et al. Detection of three common, deletional alpha-thalassemia determinants in Southern China by a single-tube multiplex polymerase chain reaction method. **Hemoglobin.** v. 28, n. 1, p. 39-44, Feb 2004.

LIEBHABER, S. A.; GOOSSENS, M.; KAN, Y. W. Homology and concerted evolution at the alpha 1 and alpha 2 loci of human alpha-globin. **Nature**, v. 290; n. 5801; p. 26-29, 1981.

LIEBHABER, S. A., AND KAN, Y.W. Differentiation of the mRNA transcripts originating from the alpha 1- and alpha 2-globin loci in normals and alpha-thalassemics. **J. Clin. Invest.** v. 68, n. 2, p. 439-446, Aug. 1981.

LIEBHABER, S. A., CASH, F. E., AND BALLAS, S. K. Human alpha-globin gene expression. The dominant role of the alpha 2-locus in mRNA and protein synthesis. **J. Biol. Chem.** v. 261, n. 32, p. 15327-15333, Nov. 1986.

LIEBHABER, S. A.  $\alpha$ -Thalassemia. **Homoglobin.** v. 13, n. 7 & 8, p. 685-731, 1989.

LIEBHABER, S A. et al. Inactivation of human alpha-globin gene expression by a de novo deletion located upstream of the alpha-globin gene cluster. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 87, n. 23, p. 9431-9435, Dec. 1990.

LIN, C. K. et al. Efficacy of a modified improved technique for detecting red cell haemoglobin H inclusions. **Clin. Lab. Haematol.** v. 12, n. 4, p. 409-415, Aug. 1990.

LIN, C. K. et al. Alpha thalassemic traits are common in the Taiwanese population: usefulness of a modified hemoglobin H preparation for prevalence studies. **J Lab Clin. Med.** v. 118, n. 6, p. 599-603, Dec. 1991.

LOREY, F. et al Universal screening for hemoglobinopathies using high-performance liquid chromatography: clinical results of 2.2 million screens. **Eur. J. Hum. Genet.** v. 2, n. 4, p. 262-271, 1994.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **J. Clin. Path.**, v.18, p.790-2, 1965.

MIRABILE, E. et al. Phenotype-genotype correlation in Sicilian patients with Hb H. **Eur. J. Haematol.** v. 65, p. 306-309, 2000.

MENDEZ-SIQUEIRA, F. A. **Diagnóstico neonatal de hemoglobinopatias**. 2000. Tese (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2000.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. Sarvier Ed. Livros Médicos, São Paulo, 1997, p. 22-24.

NAOUM, P. C.; DOMINGOS, C. R. B. Alfa talassemias. **Laes & Haes**. n. 113; p. 70-98, 1998.

NEISHABURY, M. et al. Alpha-thalassemia: deletion analysis in Iran. **Arch. Iran. Med.** v. 4, n. 4, p. 160-164, 2001.

NICHOLLS, R. D. et al. Alpha zero-thalassemia due to recombination between the alpha 1-globin gene and an AluI repeat. **Blood**. v. 65; n. 6; p. 1434-1438, 1985.

NICHOLLS, R. D.; FISCHER-GHODSIAN, N.; HIGGS, D. R. Recombination at the human alpha-globin gene cluster: sequence features and topological constraints. **Cell**. v. 49; n. 3; p. 369-378, 1987.

ORKIN, S. H. AND GOFF, S. C. The duplicated human alpha-globin genes: their relative expression as measured by RNA analysis. **Cell**. v. 24, n. 2, p. 345-351, May. 1981.

ORON-KARNI, V. et al. Rapid detection of the common Mediterranean alpha-globin deletions/rearrangements using PCR. **Am. J. Hematol.** v. 58, n. 4, p. 306-310, Aug. 1998.

ORON-KARNI, V. et al. Diversity of alpha-globin mutations and clinical presentation of alpha-thalassemia in Israel. **Am. J. Hematol.** v. 65, n. 3, p. 196-203, Nov. 2000.

OLD, J. M. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. **Blood Rev.** v. 17, p. 43-53, 2003.

OU, C. N.; ROGNERUD, C. L. Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. **Clin. Chim. Acta.** v. 313, n. 1-2, Nov. 2001.

PAPAYANNOPOULOS, R., STAMATONYANNOPOULOS, G. Stains for inclusions bodies. "In: STANDARTIZATION of laboratory reagents and methods for detection of haemoglobinopathies". **Atlanta: Hew publications**, 1974.

PAPASSOTIRIOU, I. et al. Rapid and Accurate Quantitation of Hb Bart's and HbH Using Weak Cation Exchange High Performance Liquid Chromatography: Correlation with the  $\alpha$ -Thalassemia Genotype. **Hemoglobin.** v. 23, n. 3, p. 203-211, 1999.

PAN, L. L. et al. Usefulness of brilliant cresyl blue staining as an auxiliary method of screening for alpha-thalassemia. **J. Lab. Clin. Med.** v. 145, n. 2, p. 94-97, Feb. 2005.

PENA, S.D.J. et al. DNA bioprint: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes, **Electrophoresis**, v 12, p. 146-152, 1991.

PEDROLLO, E.; HUTZ, M. H.; SALZANO, F. M. Alpha thalassemia frequency in newborn children from Porto Alegre, Brazil. **Rev. Bras. Genet.**, v. 13, n. 3, p.573-581, 1990.

PUTKEY. Syllabus supplements. Department of biochemistry and molecular biology site manager. Amy L. Gilbert Created 2000, Last Updated 10/3/02e>  
[www.bmb.med.uth.tme.edu/MedBiochem/](http://www.bmb.med.uth.tme.edu/MedBiochem/)

ROMAO, L.  $\alpha$ -thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the  $\alpha$ -globin structural gene. **Blood**. v. 78, n. 6, p. 1589-1595, Sep. 1991.

RUND, D.; RACHMILEWITZ, E. Pathophysiology of alpha- and beta-thalassemia: therapeutic implications. **Semin. Hematol**. v. 38, n. 4, p. 343-349, Oct. 2001.

RIBEIRO, V. S.; DE ARAÚJO, J.T. [Hemoglobin H: laboratory identification].**Rev Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo**. v. 47, n. 4, p. 176-179, Jul-Aug. 1992.

SAIKI, R. K. **The design and optimization of the PCR**. I: Erlich, H. A. (Ed.) PCR technology – Principles and applications for DNA amplification. New York: Oxford University Press. p. 7-16, 1992.

SABATH, D. E.; CROSS, S. T.; MAMIYA, L.Y. An improved method for detecting red cells with hemoglobin H inclusions that does not require glass capillary tubes. **Clin. Lab. Haematol**. v. 25, n. 2, p. 87-91, Apr. 2003.

SHAW, J.P. et al. The adult alpha globin gene loci from monkeys to man: the theta globin subfamily and the alpha globin duplication units in Old World monkeys. **Prog. Clin. Biol. Res.** v. 251, p. 65-79. 1987.

SHAJI, R.V. et al A single tube multiplex PCR method to detect the common alpha+ thalassemia alleles. **Blood.** v. 95, n. 5, p. 1879-1881, Mar. 2000.

SILVESTRONI, E., BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **Am. J. Hum. Genet.** v.27, p.198-212, 1975.

SILVESTRONI-BIANCO I. **Le talassemie e un problema medico-sociale ieri e oggi.** Instituto Italiano di Medicina Sociale. Editor Roma, 1998, p. 122-179.

SKOGERBOE, K.J. et al. Screening for alpha-thalassemia. Correlation of hemoglobin H inclusion bodies with DNA-determined genotype. **Arch. Pathol. Lab. Med.** v. 116, n. 10, p. 1012-1018, Oct. 1992.

SONATI MF, FARAH SB, RAMALHO AS, COSTA FF. High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil. **Hemoglobin.** v. 15, n. 4, p. 309-311, 1991.

SONATI MF, KIMURA E M, FERREIRA F. Red cell indices and alpha-thalassemia. **Rev. Brasil. Genet.** v. 15, n. 3, p. 687-693, 1992.

SUN, C. F. et al. Real-time quantitative pcr analysis for alpha-thalasseia-1 of Southeast Asian type deletion in Taiwan. **Clin. Genet.** v. 60, n. 4, p. 305-309, Oct. 2001.

STEIN, J. et al. A screening protocol for a prenatal population at risk for inherited hemoglobin disorders: results of its application to a group of Southeast Asians and blacks. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 150, n. 4, p. 333-341, Oct. 1984.

STEINBERG, M. H. The interaction of  $\alpha$ -thalassemia with hemoglobinopathies. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.** v. 5, p. 453-469, 1991.

THOMPSON, C. C. et al. Positional effect of cis/trans alpha globin gene deletions on the formation of "H" bodies. **Am. J. Hematol.** v. 31, n. 4, p. 242-247, Aug. 1989.

TAN, A. S. et al. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. **Blood.** v. 98, n. 1, p. 250-251, Jul. 2001.

VAEUSORN O, FUCHAROEN S, WASI P. A study of thalassemia associated with pregnancy. **Birth. Defects. Orig. Artic. Ser.** v. 23, n. 5B, p. 295-299, 1988.

VAN DER DIJS, F. P. et al. Screening cord blood for hemoglobinopathies and thalassemia by HPLC. **Clin. Chem.** v. 38, n. 9, p. 1864-1869, Sep. 1992.

VOGEL F., MOTULSKY A. G. **Human genetics: problems and approaches.** Chapter 7. Gene action: genetic diseases, human hemoglobin, p. 299-325. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 3rd edition 1997.

WANG, C.; BEGANYI, L.; FERNANDES, B. J. Measurements of red cell parameters in  $\alpha$  - thalassemia trait: correlation with the genotype. **Lab. Hematol.** v. 6, p. 163-166, Nov. 2000.

WAYE JS, CHUI DH. The alpha-globin gene cluster: genetics and disorders. **Clin. Invest. Med.** v. 24, n. 2, p. 103-109, Apr. 2001.

WAYE, J. S. et al. Hemoglobin H (Hb H) disease in Canada: molecular diagnosis and review of 116 cases. **Am. J. Hematol.** v. 68, n. 1, p. 11-5, Sep. 2001.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bull. World Health Organ.** v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.

WINICHAGOON, P. et al. The molecular basis of alpha-thalassaemia in Thailand. **EMBO J.** v. 3, n. 8, p. 1813-1818, Aug. 1984.

WINICHAGOON, P.; ADIROJNANON, P.; WASI, P. Levels of hemoglobin H and proportions of the cell with inclusion bodies en the two types of hemoglobin H disease. **Br. J. Haematol.** v. 46, p. 507-509, 1980.

W.H.O. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Vith Annual Meeting of the WHO. Working group on the feasibility study on hereditary disease community control programes (Hereditary Anaemias: Alpha Thalassaemia) Herakleion (Crete), p. 21-24, Oct 1987.

W.H.O. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Vith Annual Meeting of the WHO Working group on the feasibility study on hereditary disease community control programes (Hereditary anaemias). Cagliari (Sardinia), p. 8-9, Apr. 1989.

W.H.O. WORLD HEALTH ORGANIZATION WORKING GROUP. Hereditary anaemias: genetc basis, clinical features, diagnosis and treatment. **Bulletin of W.H.O.**, v. 60, n. 5, p. 643-661, 1982.

WILLIAMS, T.N. et al. Red blood cell phenotypes in the alpha + thalassaemias from early childhood to maturity. **Br. J. Haematol.** v. 95, n. 2, p. 266-272, Nov. 1996.

WINICHAGOON, P. et al. Screening for the carriers of thalasseмии and abnormal hemoglobins at the community level. Southeast Asian. **J. Trop. Med. Public Health.** v. 33, s. 2, p. 145-150, 2002.

ZIMMER, E.A. et al. Rapid duplication and loss of genes coding for the alpha chains of hemoglobin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 77, n. 4, p. 2158-2162, Apr. 1980.

WANG, W. et al. Single-tube multiplex-PCR screen for anti-3.7 and anti-4.2  $\alpha$ -globin gene triplications. **Clin. Chem.** v. 49, n. 10, p. 1679-1683, 2003.

WEATHERALL DJ, CLEGG JB. **The Thalassaemia Syndromes**, 3<sup>rd</sup> ed. Oxford:Blackwell,1981.

WILKIE, A.O. et al. A truncated human chromosome 16 associated with alpha thalassaemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)<sub>n</sub>. **Nature.**v. 346, n. 6287, p. 868-871, Aug. 1990.

*Apêndices*

---



Cont.

Código	Molecular	Sexo	R.O.	M.E.	E. Alc.	E.N.	ACB	HbA2	HbF	VCM	HCM
705	N	F	-	N/+	A + F + H	+	+	3.5	1	89	29
716	N	F	-	+	AA +H	+	raros	3.5	0.2	95	31
787	N	F	-	+	AA +H	+	sugest.	3	0.1	93	27
797	N	F	-	N/+	AA +H	+	+	3	0	79	24
799	N	F	-	N/+	AA +H	+	+	3	0.5	99	30
880	N	F	-	N/+	AA +H	+	sugest.	3.1	0.2	90	29.5
911	N	F	-	N/+	AA + H	+	-	2.8	0	100	33.3
931	N	F	-	N/+	AA2dim + H	+	sugest.			86	27
963	N	F	-	+	AA + H	+	sugest.	3	0.5	96	30.5
964	N	F	-	+	AA + H	+	-			94	30.6
965	N	F	-	N/+	A + F + H	+	raros	3	0.3	93	30.4
995	N	F	-	N/+	AA + H	+	-	2.8	0	89	29.2
996	N	F	-	N/+	AA + H	+	-	2.7	0	88	29.5
1104	N	F	-	N/+	AA + H	+	+	3	0	79	26
1109	N	F	-	N/+	AA + H	+	+	2.5	0	85	28
1112	N	F	-	+ /++	A + F + H	+	+	3.1	0.3	75.6	24.1
1117	N	F	-	+	AA + H	+	-	3	0	93	30
1129	N	F	-	N/+	AA + H	+	raros	2	0	89	29
1139	N	F	-	+	AA + H	+	+	2	0	69	20.5
1175	N	F	-	+++	AA2dim + H	+	raros	1.7	0	60	15.4
1182	N	F	-	+ /++	AA + H	+	-	2.2	0	79.1	24.4
1212	N	F	-	N/+	A + F + H	+	raros	2.5	0.5	81	25
1308	N	F	-	N/+	AA + H	+	+	2.5	0	88.4	30
1310	N	F	-	N/+	AA + H	+	+	2.5	0	77	26
1334	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	3	0	94	31
1396	N	F	-	+	AA + H	+	raros	2.5	0	89.1	27.2
1418	N	F	-	+	AA2dim + H	+	+	1.96	0	114	36
1504	N	F	-	+	AA + H	+	+	2.5	0.8	79	25
1511	N	F	-	+	AA + H	+	+	2	0	72	24
1528	N	F	-	+ /++	AA2dim + H	+	+	1	0	66	21
1532	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	1.8	0.5	75.8	23.9
1554	N	F	+	++	AA2dim + H	+	+	1.96	0	73.5	21.2
2031	N	F	-	++	AA2dim + H	+	sugest.	2.1	0.2	61	16.8
2169	N	F	-	+	AA + H	+	-	2.5	0.5	79	25
2209	N	F	-	++	AA2dim + H	+	+	2	0	71	22
2390	N	F	-	+ /++	AA + H	+	+	3	0.5	65	20
2421	N	F	-	N/+	AA + H	+	-	2.5	0.6	88	29.3
2430	N	F	-	+	AA2dim + H	+	-	2.4	0.2	69	23
1108	N	F	-	+ /++	AA + H	+	+	3.2	0.1	76.5	24.3
720	N	F	-	+	A + F + H	+	-	2.5	1	70	22
1030	N	F	-	N/+	AA + H	+	+	2.5	0.5	82	26.8
1333	N	F	-	N/+	AA + H	+	+	2.5	0	94	30
41	N	F	-	N	AA + H	+	+	2	0	81	25
116	N	F	-	+ /++	AA + H	+	+	2	1	62	18
76	N	F	-	N/+	AA + H	+	+	3	0.6	93	31
172	N	F	-	N/+	AA2dim + H	+	+	3.2	1.1	77.7	26.5

Tabela 14. Resultados laboratoriais de homens e mulheres do nordeste heterozigotos para a deleção.

Código	Molecular	Sexo	R.O.	M.E.	E. Alc.	E.N.	ACB	HbA2	HbF	VCM	HCM
449	H	M	-	+	AA + H	+	-	2.5	0	71.7	23.5
1698	H	M	-	+	AA + H	+	+	2.8	0.1	77.1	23.1
2030	H	M	-	+	AA + H	+	sugest.	3	0.7	77.8	24.7
330	H	M	-	N/+	AA + H	+	sugest.	3	0	76.6	25.1
1801	H	M	-	+	AA + H	+	raros	3.1	0.5	92	32
384	H	F	+	+	A + F + H	+	+	3.2	0.4	83.4	28
405	H	F	-	N/+	A + F + H	+	+	3.2	0.5	80	27
575	H	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2.8	0.1	86	28
615	H	F	-	+	AA + H	+	+	3.5	0	78	25
679	H	F	-	+	AA + H	+	raros	3	0.1	83.3	26.5
1064	H	F	-	+	AA + H	+	sugest.	3.2	0.2	86	28
1184	H	F	-	+	AA + H	+	-	2.5	0	84	24
1185	H	F	-	+ / ++	AA + H	+	+	2.6	0	82	25
1352	H	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2.8	0.2	81	24
1359	H	F	-	+ / ++	AA + H	+	-	3.5	0.5	66	19
1537	H	F	-	+	AA + H	+	+	3	0.5	79.2	25.6
1575	H	F	+	++	AA + H	+	+	3.03	0.5	70	22
1529	H	F	-	N/+	A + F + H	+	+	2	0.5	85	29
423	H	F	-	+ / ++	AA + H	+	+	2.7	0	90	30
496	H	F	-	+ / ++	AA + H	+	+	3	0.8	70	22

Tabela 15. Resultados laboratoriais de homens e mulheres do nordeste homozigotos para a deleção

Código	Molecular	Sexo	R.O.	M.E.	E. Alc.	E.N.	ACB	HbA2	HbF	VCM	HCM
1190	HOM	M	-	+	AA + H	+	-	2	0.2	67.3	19.1
2229	HOM	M	-	++	AA + H	+	-	2.5	0	69	21.1
448	HOM	F	-	N/+	AA2dim + H	+	sugest.	2	0	73.3	23.4

Tabela 16. Resultados laboratoriais de homens e mulheres do sudeste normais para a deleção

Código	Molecular	Sexo	R.O.	M.E.	E. Alc.	E.N.	ACB	Hb A2	Hb F	VCM	HCM
450	N	M	+	++	AA + H	+	+	2.5	0.7	54.8	15.6
311	N	M	-	N/+	AA + H	+	+	3	0	92.7	30.8
325	N	M	-	N/+	AA + H	+	raros	3		83.8	27.7
427	N	M	-	N/+	AA + H	+	-	2.6	0	72.4	23.4
481	N	M	-	N/+	AA + H	+	-			83.2	29.2
492	N	M	-	N/+	AA + H	+	-	2.5		92	30.4
594	N	M	-	N/+	AA + H	-	raros	3	1	92	23.6
721	N	M	-	N/+	AA + H	+	-	2.9	0	87.6	30.2
755	N	M	-	N/+	AA + H	+	+	3.5		78.8	27.4
759	N	M	-	N/+	AA + H	+	+	3.5		91	31.2
763	N	M	-	+	AA + H	+	-			70.3	23.8
772	N	M	-	+ / ++	AA + H	-	sugest.			78.4	25.5
830	N	M	-	+	AA + H	+	+			65.9	21.4
837	N	M	-	N/+	AA + H	+	raros			85.8	28.1
865	N	M	-	N/+	AA + H	+	sugest.			84.8	28.5
873	N	M	-	N/+	AA + H	+	+			72.6	24.3
1024	N	M	+	++	AA2dim + H	+	+			64	21.1
1113	N	M	-	+	AA + H	+	raros	2.5	0.2	72	24
1353	N	M	-	N/+	AA + H	+	sugest.			67.9	20.4
1651	N	M	-	N/+	AA + H	+	+			88.6	30.4
1652	N	M	-	N/+	AA + H	+	+			68.3	22.3
1692	N	M	-	+ / ++	AA + H	+	-			88.1	28.4
1736	N	M	-	+	AA + H	+	-			93.8	33.5
1742	N	M	-	N/+	AA + H	+	+			77.5	27.5
1926	N	M	+	+ / ++	AA2dim + H	+	-	2	1	61.6	18.3
1960	N	M	-	+	AA + H	+	+	2.5	0.5	79.4	24.2
2065	N	M	-	N/+	AA + H	+	-	3.1		88.6	31.2
2068	N	M	-	+ / ++	AA + H	+	+	2.87	0.5		
2083	N	M	-	+ / ++	AA + H	+	sugest.	2.5	0.9	73.4	22.6
2107	N	M	-	+	AA + H	+	+	2.5	0	86.5	27.6
2110	N	M	-	N/+	AA + H	-	sugest.	3	1.5	89	27.9
2112	N	M	+	+ / ++	A + F + H	+	+	3.5	1	67	20.2
2183	N	M	-	+	AA + H	+	+	3.8	1	76.8	23.7
2198	N	M	-	N/+	AA + H	+	sugest.	3	1	79	26.5
2199	N	M	-	N/+	AA + H	+	-	3	0.8	72	24.9
2201	N	M	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2.9	1.5	75	25.7
2216	N	M	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2.5	0.5	93.2	31.8
2220	N	M	-	++	AA2dim + H	+	+	1.8	1	59.3	18
2223	N	M	-	N/+	AA + H	+	+	2.5	0.5	76	25.2
2224	N	M	-	N/+	AA + H	+	-	3	0.2	82	27.9
2225	N	M	-	+ / ++	AA + H	+	+	2.5	0.5	76	25.6
2236	N	M	-	+	AA + H	+	-	3	0.7	85.3	27.3
2237	N	M	-	+	AA + H	+	+	3	0.9	84.9	26.5
2239	N	M	-	+ / ++	AA2dim + F + H	+	-	2.3	1.6	48.5	12.4
2242	N	M	-	+	AA + H	+	-	2.4	0	107.3	34.7
955	N	M	-	N/+	AA + H	+	+			91	30.3
1931	N	M	-	+	AA + H	+	+	2.8	0.5	94.2	30.8
921	N	M	-	+	AA + H	+	+			77.7	25.2
1754	N	M	-	++	AA + H	+	-	3.1	0	57.4	17
1929	N	M	-	+ / ++	AA2dim + H	+	+	2	0.5	63.1	18.1
836	N	M	-	+	AA2dim + H	+	+			72.7	23.2
920	N	M	+	+	AA + H	+	+			77.6	25.3
2070	N	M	-	+	AA + H	+	+			88.7	28.5
2078	N	M	-	+	AA + H	+	-	2.5	0.5	80.9	25.8
924	N	M	+	+ / ++	AA2dim + H	+	+			58.3	17.3
1633	N	M	-	+	AA + H	+	+	2.5	0.4	80	25.9

Cont.

Cont.

Código	Molecular	Sexo	R.O.	M.E.	E. Alc.	E.N.	ACB	Hb A2	Hb F	VCM	HCM
1942	N	M	-	+	AA + H	+	sugest.	2.5	0.5	90.5	29.5
1007	N	M	-	+ / + +	AA2dim + F + H	+	+			74.3	22.9
2073	N	M	-	+	AA + H	+	sugest.	2.9	0.4	98.1	31.4
2081	N	M	-	+	AA2dim + H	+	+	2	0	59.2	16.8
1959	N	M	-	+ / + +	AA2dim + H	+	+	1.8	1	59.9	16
2072	N	M	-	N / +	AA + H	+	+			92	29.1
1368	N	M	-	+ / + +	AA + H	+	-	3	0	77.6	25.3
925	N	M	-	+	AA2dim + H	+	+	2	0.2	66.3	19
440	N	M	-	N / +	AA + H	+	-	2.4	0	76.7	24.5
1939	N	M	-	+	AA + H	+	sugest.	3	0.5	79.9	25.8
254	N	M	-	N / +	AA + H	-	sugest.	3.5		85.7	29.3
1693	N	M	-	+ / + +	AA + H	+	-	2.2	0	76.2	24.8
910	N	M	-	+	AA + H	+	+	2	0.5	68.2	21.4
374	N	M	-	N / +	AA + H	+	+	2.8	0	80.2	27
953	N	M	-	+	AA + H	+	+			68.7	21.8
170	N	F	-	N / +	AA + H	+	raros	2	2	79	26
229	N	F	-	+	AA + H	+	+	3.5	0.5	76	27
246	N	F	-	N / +	AA + H	-	sugest.	3	0.5	94	30
329	N	F	-	N / +	AA + H	+	+	3	0	99	31
342	N	F	-	N / +	AA + H	+	+	3.1	0.4	95	31
365	N	F	-	+	AA + H	+	+	2.8	0.4	76.1	24.9
377	N	F	-	N / +	A + F + H	+	sugest.	3	0.9	86.2	27.5
387	N	F	-	+	AA + H	+	+	2	0	80	26.6
416	N	F	-	N / +	AA + H	+	-			73.7	25.1
476	N	F	-	N / +	AA + H	+	+	3	0.5	76.1	25
490	N	F	+	+	AA + H	+	raros	2.7	0	65	18
500	N	F	-	N / +	AA + H	+	+	3	0	65.4	20.6
516	N	F	-	+	AA + H	+	sugest.		0.96	74.3	24.4
538	N	F	-	N / +	AA2dim + H	+	-	2.5	0.7	81.6	25.2
541	N	F	-	+	AA + H	+	+		0.8	70.1	20.6
547	N	F	-	N / +	AA + H	+	+	3.1	0.7	90.9	30.4
548	N	F	-	N / +	A + F + H	+	+	3.1	1.2	89.5	29.5
552	N	F	-	+	AA + H	+	raros			82.5	26.3
553	N	F	-	N / +	AA + H	+	sugest.		0.5	80.8	26.4
565	N	F	-	+	AA + H	+	-			90.9	29.2
566	N	F	-	N / +	AA + H	+	+	2		78.3	24.6
582	N	F	-	+	AA + H	+	-			59.8	18.6
683	N	F	-	+	AA + H	+	+	2.8	0.7	83	28
733	N	F	-	+	AA + H	+	sugest.	3	1.5	77	25.5
756	N	F	-	N / +	AA + H	+	+			75.2	24.5
773	N	F	-	+	AA + H	+	raros	3.6	1	93.1	31.9
781	N	F	-	N / +	AA + H	+	+	3.5		81	26.5
805	N	F	-	N / +	AA + H	-	-			88.3	29
807	N	F	-	N / +	AA + H	+	sugest.			79.7	26.3
811	N	F	-	+	AA + H	+	raros			77.3	25.3
822	N	F	-	N / +	AA + H	+	+			91.8	30.5
824	N	F	-	+	AA + H	+	-			100.5	33.3
825	N	F	-	N / +	AA + H	+	-			86.4	28.9
828	N	F	-	N / +	AA + H	+	-			94.8	31
832	N	F	-	N / +	AA + H	+	sugest.			91.3	29.5
833	N	F	+	++	AA2dim + H	+	+			62.5	18.7
834	N	F	-	+ / + +	AA + H	+	-			87.3	28.5
905	N	F	-	+	AA + H	+	+			92.8	30.9
985	N	F	-	+	AA + H	+	+			85.4	28.7
992	N	F	-	N / +	AA + H	+	+	3.5	0	88	30.5

Cont.

Cont.

Código	Molecular	Sexo	R.O.	M.E.	E. Alc.	E.N.	ACB	Hb A2	HbF	VCM	HCM
1012	N	F	-	N/+	AA + H	+	-	3	0.5	90	31.3
1013	N	F	-	+	AA2dim + H	+	sugest.	2	0	72	24
1025	N	F	-	+ /++	AA + H	+	raros	3.2	0.2	88	29.1
1027	N	F	-	+ /++	AA + H	+	-	3	0	88.2	30
1031	N	F	-	N/+	AA + H	+	-			90.7	30.3
1032	N	F	-	+ /++	AA + H	+	+	1.5		73.8	23.3
1034	N	F	-	N/+	AA2dim + H	+	+	3.23	0.3	86.7	29.2
1071	N	F	+	+ /++	AA + H	+	-	3	0.9	65	19.6
1083	N	F	-	+	AA + H	+	sugest.	2.5	0.5	70.4	23.5
1084	N	F	-	+	AA + H	+	raros	2.7	0.3	92	31.1
1085	N	F	-	+	AA + H	+	+	2.8	0.3	90	29.8
1247	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2.5	0	88	30.4
1249	N	F	-	+	AA + H	+	-	3	0	87	29
1351	N	F	-	+ /++	AA + H	+	sugest.			74.2	23.1
1354	N	F	-	N/+	AA + H	+	-			98.2	32.7
1355	N	F	-	+ /++	AA + H	+	-			84.7	27.9
1356	N	F	-	+	AA + H	+	-			88.4	30.1
1357	N	F	-	N/+	AA + H	+	-	3.1	0.2	89	29
1358	N	F	-	+	AA + H	+	-	2	0	94	31
1370	N	F	-	N/+	AA + H	+	-	2.8		83.5	28.8
1372	N	F	+	+	AA + H	+	+	3.1	0.5	67.3	20.9
1384	N	F	-	+	AA2dim + H	+	-	2.4		64.1	20.1
1392	N	F	-	N/+	AA + H	+	-			90.5	30.5
1650	N	F	-	N/+	AA + H	+	+			64	18
1656	N	F	-	N/+	AA + H	+	+			87.3	29.1
1731	N	F	-	+	AA + H	+	-			76.3	23.7
1870	N	F	+	+ /++	AA + H	+	-	2.5	1.5	67.9	19.8
1920	N	F	-	+	AA + H	+	sugest.			89.9	31.7
1925	N	F	-	+	AA + H	+	sugest.	3	0.5	85.5	27.6
1935	N	F	-	+	AA + H	+	sugest.	2.5	0	94.8	30.1
2097	N	F	-	N/+	AA	+	-	2.7	0	104.6	33.4
2100	N	F	-	+	AA	+	-	3.2	0	83	24.9
2103	N	F	-	N/+	AA + H	+	+	3	1	89.1	27.7
2104	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2.5	0.5	82.4	26
2113	N	F	-	+	AA2dim+M+H	+	+	1.8	0.5	93.7	29.3
2150	N	F	-	+	AA + H	+	-	3.8	0.5	77.4	26.4
2152	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	3	0.5	86.6	28.3
2154	N	F	-	+	AA	+	-	3.5		64.7	20.8
2155	N	F	-	+	AA + H	+	+	3	0	79.7	26.6
2211	N	F	-	N/+	AA + H	+	+	2.8	0.5	88.4	29.5
2212	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	3	0.5	75.8	26.1
2213	N	F	-	+ /++	AA + H	+	-	3	0	93.6	30.9
2214	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2.8	0.5	86.6	29.9
2217	N	F	-	+	AA + H	+	+	2.8	1	88.1	30.8
2219	N	F	-	+	AA + H	+	-	3	0.8	75.7	24.9
2227	N	F	-	+ /++	AA + H	+	+	2.5	0.8	71	23
2228	N	F	-	N/+	AA2dim + H	+	-	2	0.5	74	24.6
2231	N	F	-	N/+	AA + H	+	+	3	1	96	29.9
2235	N	F	-	+	AA + H	+	sugest.	3.5	0	101.3	32
2244	N	F	-	N/+	AA + H	+	-	2.6	0.8	98.6	31.2
1240	N	F	-	+	AA + H	+	+			89.9	29
1705	N	F	-	N/+	AA + H	+	+			66.4	20.5
181	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	3		83.3	27.9
2222	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	3	0	77	26.4
326	N	F	-	N/+	AA + H	+	+			82.1	27.1

Cont.

Cont.

Código	Molecular	Sexo	R.O.	M.E.	E. Alc.	E.N.	ACB	Hb A2	HbF	VCM	HCM
308	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2		92.1	31.2
1704	N	F	-	+	AA + H	+	+			84.2	28.7
1124	N	F	-	N/+	AA + H	+	-			84.3	27.4
1689	N	F	-	+	AA + H	+	+	2	0.2	89.1	29.6
338	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2.8	0.5	93	31.6
309	N	F	-	+	AA2dim + H	+	+	1		87.8	29.7
1703	N	F	-	N/+	AA + H	+	-			90	30.1
1945	N	F	-	+	A+H+F	+	+	3.5	1	93.1	29.9
1868	N	F	-	N/+	AA + H	+	+	2.5	0	92	29.8
1923	N	F	-	+	A + F + H	+	raros	3	1.5	88	28.3
2207	N	F	-	+	AA + H	+	-	2.5		71	24
1657	N	F	-	+	AA + H	+	-			86.7	28.7
1717	N	F	-	N/+	AA + H	+	+			89.4	29.4
1696	N	F	-	N/+	AA + H	+	-			84.4	28
1645	N	F	-	N	AA + H	+	+	2.8	0.5	93.6	32.4
1125	N	F	-	N/+	AA + H	+	raros	3.5		90.3	29.6
670	N	F	-	N/+	AA + H	+	raros	3.8		90.6	29.1
1965	N	F	-	N/+	AA + H	+	-	3.5	1.2	58.9	20.4
1629	N	F	-	N/+	AA + H	+	+			69.1	23.2
1658	N	F	-	N/+	AA + H	+	+			80.4	26.6
245	N	F	-	+ / ++	AA2dim + H	+	+	2		92.1	31
2061	N	F	-	+	AA + H	+	+			90.7	30.9
1653	N	F	-	+	AA + H	+	-			90.5	30.4
2206	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2.5		85	28.9
1362	N	F	-	+	AA + H	+	-			90.5	30.9
1984	N	F	-	+	AA + H	+	sugest.	3	0	92.7	30.2
2111	N	F	-	N	AA + H	+	raros	3	2	87.6	27.7
808	N	F	-	+	AA + H	-	-			89.1	29.6
1033	N	F	-	+	AA + H	+	-			92.5	30.5
174	N	F	-	N/+	AA + H	+	-			90.7	30.2
352	N	F	-	N/+	AA + H	+	-	2.7	0.8	95.3	32
188	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	3.2	0.4	92.5	31
695	N	F	-	+	AA2dim + H	+	+	2		75.7	24.2
2226	N	F	-	N/+	AA + H	+	-	2.5	0.5	83	28.5
339	N	F	-	N/+	AA + H	+	+	3.2	0.6	88.8	29.7
1732	N	F	-	N/+	AA + H	+	-			84.7	28.1
682	N	F	-	N/+	AA + H	+	+	2.5	0.1	80.2	25.9
1369	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.			90.3	31.1
1937	N	F	-	+	AA + H	+	+	3	0.2	96.5	30.9
1867	N	F	-	+	AA + H	+	sugest.	2.5	0	102.5	33
757	N	F	-	N/+	AA + H	+	+			87.1	29.6
238	N	F	-	+	AA + H	+	+	3		82.1	27.9
1922	N	F	-	+	AA + H	+	-	2.5	1	94.8	30.8
323	N	F	-	N/+	AA + H	+	raros	2.5		97.6	32.2
2218	N	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	3	0.5	86.9	29.8

Tabela 17. Resultados laboratoriais de homens e mulheres do sudeste heterozigotas para a deleção

Código	Molecular	Sexo	R.O.	M.E.	E. Alc.	E.N.	ACB	Hb A2	HbF	VCM	HCM
83	H	F	-	+	AA + H	+	-	2.7	0.4	69	22
360	H	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2.5	0	81	26
386	H	F	-	N/+	AA + H	+	+	3	0	79	25
549	H	F	-	+	AA + H	+	sugest.			80.6	25
675	H	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	3.5		78.7	24.8
680	H	F	-	N/+	AA + H	+	+	2.4	0.9	80	26
693	H	F	-	+++	AA + H	+	sugest.	3	0.2	67	20.6
1008	H	F	+	+	AA + H	+	+			83.8	27.1
1011	H	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2.5	0	86.4	29.2
1213	H	F	-	+	AA + H	+	-			78.2	25.9
1231	H	F	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2.8	0.2	79	27
1381	H	F	-	+	AA + H	+	-			83.9	29
1741	H	F	-	N/+	AA + H	+	+			84.5	27.8
1750	H	F	-	N/+	AA + H	+	raros			89.1	29.6
2151	H	F	-	+	AA + H	+	sugest.	3.5	1	87.8	28.3
2230	H	F	-	+	AA2dim + H	+	sugest.	2	0.5	85.2	26.8
1683	H	F	-	+	AA + H	+	-	2.5	0	82	27
660	H	F	-	+	AA + H	+	+		3	87.5	29
1751	H	F	-	+	AA + H	+	-			67	19.2
2203	H	F	+	+	AA	+	-	3	0.5	71	23.6
1655	H	F	-	+	AA + H	+	-			80.9	27.2
717	H	M	-	+	AA + H	+	+	3		80.2	26.5
867	H	M	-	+ / ++	AA + H	+	raros			78	26.1
1863	H	M	-	+	AA + H	+	+	2	0	77.4	25.2
2062	H	M	-	N/+	AA + H	+	+			75.4	26.7
2108	H	M	-	+	AA + H	-	+	2	0	82.5	25.3
2170	H	M	-	N/+	AA + H	+	sugest.	2		76	25.2
2076	H	M	-	+ / ++	A + H + F	+	+	2.9	2.1	80	25.4
904	H	M	-	+	AA + H	+	+			74.5	23.6
2102	H	M	+	+ / ++	AA + H	+	-	3	0.5	80.3	23.7

Tabela 18. Resultados laboratoriais de homens e mulheres do sudeste homozigotas para a deleção

Código	Molecular	Sexo	R.O.	M.E.	E. Alc.	E.N.	ACB	Hb A2	HbF	VCM	HCM
160	Hom	F	+	+ / ++	AA + H	+	+	2.1	0.6	73	24
561	Hom	F	-	+ / ++	AA + H	+	sugest.			70.7	22
584	Hom	F	-	+	A + F + H	+	+	2.7	1	69	22.5
1029	Hom	F	-	+	AA + H	+	-			73.7	23.1
1320	Hom	F	+	N/+	AA2dim + H	+	+	1.8	0	74	24
1608	Hom	F	-	++	AA + H	+	sugest.			71.3	22.3
282	Hom	F	+	++	A + F + H	+	sugest.			57.5	17.5
886	Hom	M	+	+	AA + H	+	+	3		73.0	24

As talassemias alfa constituem um dos mais prevalentes distúrbios de hemoglobinas no mundo. No Brasil, as talassemias alfa tem sido observadas em alta frequência nos grupos analisados. A expressão fenotípica variável desta alteração dificulta seu diagnóstico laboratorial e clínico. Em virtude da dificuldade diagnóstica e da elevada frequência das talassemias alfa; analisou-se amostras de indivíduos adultos de dois estados do Brasil, com o objetivo de caracteriza-las laboratorialmente por procedimentos de rotina, incluindo HPLC, e biologia molecular. Todas as amostras apresentaram resultados laboratoriais sugestivos de talassemia alfa, sendo identificados molecularmente 50 (14%) heterozigotos e 11 (3%) homozigotos para a deleção  $-\alpha^{3.7}$ . As frequências genótípicas não apresentaram diferenças nos grupos analisados. Não observou-se correlação entre os resultados obtidos na triagem e os da análise molecular. O nível médio da Hb A<sub>2</sub> foi significativamente menor no grupo homozigoto quando comparado aos grupos normal e heterozigoto. Porém, não foram observadas diferenças nos níveis de Hb F entre os grupos genotípicos. Os valores médios de HCM e VCM foram significativamente diferentes entre os grupos genótipos. Os resultados deste trabalho confirmam a frequência da talassemia alfa pela deleção  $-\alpha^{3.7}$  e, evidenciam a dificuldade diagnóstica desta alteração. A eletroforese em acetato de celulose e, a pesquisa de corpúsculo de inclusão de Hb H, não foram métodos eficientes na identificação das formas leves de talassemias alfa. No entanto, as diferenças observadas para os níveis de Hb A<sub>2</sub>, VCM e HCM, podem auxiliar o diagnóstico desta alteração.

The alpha thalassemias consist one of the most prevalent disturbances of hemoglobins in the world. In Brazil, the alpha thalassemias have been observed in high frequency in the analyzed groups. The variable phenotypic expression of this alteration difficult its laboratorial and clinical diagnosis. Because of the diagnostic difficulty and of the high frequency of the alpha thalassemias, it was analyzed samples of adult individuals of two states of Brazil, with the goal to laboratory characterize them for routine procedures, including HPLC, and molecular biology. The samples presented suggestive laboratory results of alpha thalassemia, being identified molecularly 50 (14%) heterozygotes and 11 (3%) homozygotes for the deletion  $-\alpha^{3.7}$ . The genotypic frequencies didn't present differences in the analyzed groups. Correlation was not observed among the results obtained in the routine screening and in the molecular analysis. Hb A<sub>2</sub> medium level was significantly smaller in the homozygote group when compared to the normal and heterozygotes groups. However, differences were not observed in Hb F levels among the genotypic groups. The medium values of HCM and VCM were significantly different among the genotypes groups. The results of this work confirm the high frequency of the alpha thalassemie for the deletion  $-\alpha^{3.7}$  and, make evidence the diagnoses difficulty of this alteration. The eletroforese in cellulose acetate and, the Hb H inclusion body study, were not efficient methods in the identification of the light forms of alpha thalassemies. However, the observed difference for Hb A<sub>2</sub>, VCM and HCM levels can aid the diagnose of this alteration.

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
São José do Rio Preto, 09/ 08/ 2005.

---

Carlos Fabián Mendiburu