Cláudia Regina Bonini Domingos

Prevenção das Hemoglobinopatias no Brasil: Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial

unesp

PREVENÇÃO DAS HEMOGLOBINOPATIAS NO BRASIL

Diversidade genética e Metodologia Laboratorial

CLAUDIA REGINA BONINI DOMINGOS

Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética. Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, UNESP, câmpus de São José do Rio Preto, SP.

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

628/94

C16.15
D713P

São José do Rio Preto (SP)

1993

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum

Prof. Titular do Departamento de Biologia

UNESP São José do Rio Preto - SP

Aos meus pais, pela minha existência e por tudo o que me ensinam a cada dia.

Ao Luis Henrique, Ana Carolina e Ana Luiza, pelo amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum pela orientação, dedicação, amizade e incentivo em todas as fases desse trabalho.

Aos Profs. Drs. Eloiza Helena Tajara de Silva, Reinaldo Azoubel, Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez e Orlando Cesar de Oliveira Barreto pela participação na análise desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Firmino Alvares Filho, grande amigo, pelos constantes apoio e auxílio.

A profa. Adriana Barbosa dos Santos pela assessoria estatística.

Ao Prof. James Robert Coleman pela revisão do Summary.

A Profa. Wanda Aparecida Leonardo de Oliveira pela revisão ortográfica.

A Soraia Fernandes Rodrigues Soares pela confecção dos desenhos.

A Maria Aparecida Azevedo de Marchi pelo auxílio na encadernação

A Neuza Hissae Murai pela paciência e amizade na fase de redação desse trabalho.

Aos colegas, Lígia Marcia Silveira Viana, André Luiz Smarra, Silvia Regina Pim Nascimento da Silva, Juliana Rodrigues Cintra, Flávio Augusto Vicente Seixas, Gislaine Longui, Adriana Angélica de Almeida Lupo, Gentil José Ciappina Júnior e Maria Elvanide Pinho dos Santos, estagiários do Centro de Referência de Hemoglobinas, pelos constantes estímulos e auxílio nas análises.

A todos os estagiários que passaram pelo Centro de Referência, que de alguma forma contribuiram para o sucesso do nosso programa preventivo.

Aos meus amigos, funcionários da UNESP de São José do Rio Preto pelo carinho e estímulo.

A todos que de alguma forma tornaram possível a realização desse trabalho.

ÍNDICE

Página

I- INTRODUÇÃO 1
1-Aspectos Gerais.....1
2-Síntese e Ontogenia das Hemoglobinas.....3
2.1-Hemoglobinas Normais.....3
2.2-Hemoglobinas Anormais
Hemoglobinas variantes e talassemias.....11
2.2.1-Variantes.....11
2.2.2-Talassemias.....16
3-Hemoglobina S.....17
3.1-Alteração Molecular.....17
3.2-Alteração Celular.....19
3.3-Alteração do Fluxo Sanguíneo.....22
3.4-Doença Falciforme.....24
3.5-Traço Falciforme.....31
3.6-Biologia Molecular da Hemoglobina S.....32
4-As Talassemias.....35
4.1-Talassemia Beta.....38
4.1.1-Talassemia Beta Homozigota.....42
4.1.2-Talassemia Beta Heterozigota.....43
4.1.3-Talassemia Intermédia.....46
4.1.4-Base Molecular da Talassemia Beta.....46
4.1.5-Hemoglobina Fetal ($alfa_2$ Gama $_2$).....49
4.1.6-Hemoglobina A_2 ($alfa_2$ Delta $_2$).....53
4.2-Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal....57
4.3-Talassemia Alfa.....59
4.3.1-Classificação das Talassemias Alfa.....61
4.3.2-Base Genética das Talassemias Alfa.....64
4.3.3-Defeitos Moleculares na Talassemia Alfa.....69
4.3.4-Talassemia Alfa e Seleção Natural.....78
4.4-Diagóstico das talassemias alfa.....78
4.5-Hemoglobinopatias Talassêmicas.....80
5-Hemoglobina C e Outras Hemoglobinas.....83
5.1-Hemoglobina C.....83
5.2-Hemoglobinas Variantes Sem Alteração Fisiológica.84
5.3-Metemoglobina.....88
5.4-Hemoglobinas Instáveis.....92
5.5-Hemoglobinas Anormais com Alta Afinidade pelo Oxigênio.....96
5.6-Hemoglobinas Anormais com Baixa Afinidade pelo Oxigênio.....98
6-Prevenção de hemoglobinopatias.....99
6.1-Estratégias para um Plano de Prevenção de Hemoglobinopatias.....102

II- OBJETIVOS.....111

III-MATERIAL E MÉTODOS.....113
Resistência Globular Osmótica.....114
Morfologia Eritrocitária.....116
Eletroforese em pH alcalino.....116
Eletroforese Quantitativa em Celulose pH 8,6.....119
Eletroforese de Diferenciação em Ágar Fosfato.....121
Dosagem de Hemoglobina Fetal.....124
Pesquisa de Corpos de Heinz e Agregados de Hemoglobina H.126
Teste de Precipitação de Hemoglobinas Instáveis.....127
Dosagem e Curva Espectrofotométrica de Metemoglobina.....130

Eletroforese de Cadeias Polipetídias.....134
Focalização Isoelétrica em Gel de Agarose.....138
Análise de peptídeos.....142
Análise Estatística.....146

IV - RESULTADOS.....148

V - DISCUSSÃO.....193

VI - CONCLUSÕES.....207

VII- RESUMO.....213

VIII-SUMMARY.....215

IX - BIBLIOGRAFIA.....217

I. INTRODUÇÃO

1. ASPECTOS GERAIS

As anemias hereditárias são das doenças geneticamente determinadas, as mais comuns, e compreendem um grupo de condições de considerável complexidade. Alguns tipos de anemias hereditárias são raras e não são importantes do ponto de vista de saúde pública; entretanto, dois grupos se destacam: as doenças hereditárias por alterações das hemoglobinas e a deficiência da enzima eritrocitária Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G-6-PD). Aproximadamente 12 a 15% da população humana é portadora assintomática de uma ou mais formas de anemias hereditárias, notadamente de falcemias, talassemias e deficiência de G-6-PD. Estima-se que essas três alterações causam a mortalidade de três a quatro em mil recém-nascidos em todo o mundo, induzindo também, significativa morbidade crônica (W.H.O, 1982).

Milhões de pessoas em todo o mundo carregam em seu patrimônio genético, hemoglobinas anormais em várias combinações, com consequências que variam das quase imperceptíveis às letais. Sua correta identificação e classificação têm grande importância nas áreas médica, genética e bioquímica. O contínuo progresso que se tem obtido em genética humana sobre as alterações que originam doenças hereditárias, requer novas estratégias e métodos para detecção de mutantes. No entanto, a extensa heterogeneidade molecular e os vários sítios de mutação em cada gene causavam, até há algum tempo atrás, sérias limitações nas pesquisas. Com a introdução da tecnologia de DNA recombinante e PCR (Polymerase Chain Reaction) aumentaram os subsídios para a resolução desses

problemas. Atualmente, mutações de um determinado gene em particular podem ser detectadas por hibridização e amplificação do alelo específico (COUTELLE, 1991).

O locus das hemoglobinas humanas (Hb) é bem conhecido e seu estudo fornece dados principalmente em duas áreas: ação gênica e dinâmica dos genes na população. A organização do gene da globina humana tem sido muito estudada, assim como se conhece, atualmente, a relação entre a estrutura gênica e o produto final e a sua função (PERUTZ, 1976). Outro fator importante com relação ao gene da globina humana, é a sua distribuição nas diferentes populações, resultando em aproximadamente 500 variantes de hemoglobinas e mais de uma centena de tipos de talassemias, fornecendo dados importantes sobre o papel da seleção natural, miscigenação racial e migrações humanas (WEATHERALL & CLEGG, 1981; SALZANO, 1986; HONIG & ADAMS III, 1986).

O Brasil, país de proporções continentais, se caracteriza por significativa mistura racial, onde o processo de colonização teve grande influência na dispersão de genes anormais, notadamente de talassemias e falcemias (NAOUM, 1984). Assim, a distribuição das hemoglobinas anormais, provenientes de formas variantes e talassemias, está intimamente relacionada com as etnias que compõem nossa população. Análises realizadas em indígenas brasileiros não miscigenados, revelaram ausência de hemoglobinas anormais entre diversas tribos de diferentes regiões (NAOUM e cols, 1979). Recentemente, por meio de técnicas de biologia molecular através da análise do gene da globina beta, confirmou-se a ausência de alterações em indígenas da Amazônia (GUERREIRO e cols, 1992).

As duas hemoglobinas variantes mais frequentes na população brasileira, as Hb S e Hb C, ambas de origem africana, mostram a intensa participação do negro na composição populacional brasileira (NAOUM e cols, 1984; ALVARES FILHO e cols, 1988), e esse fato é bem caracterizado nos estudos de prevalência de hemoglobinopatias realizado em diferentes regiões do Brasil (HUTZ & SALZANO, 1983; SALZANO, 1986; NAOUM, 1987).

As talassemias do tipo beta diagnosticadas em nossa população, têm por sua vez, significativa origem nos povos provenientes das regiões do mediterrâneo, notadamente de italianos. Da mesma forma como se procederam as distribuições das hemoglobinas S e C, as talassemias são mais frequentes em regiões que tiveram a maior participação da colonização italiana (NAOUM, 1984; RAMALHO, 1986 b).

Variantes raras também têm sido detectadas em diferentes localidades, conforme mostra a tabela 1.

2. SINTESE E ONTOGENIA DAS HEMOGLOBINAS

2.1 - HEMOGLOBINAS NORMAIS

A hemoglobina de vertebrados é uma proteína globular e oligomérica, com peso molecular de 67.000 daltons, cuja principal função é o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos. Adicionalmente participa do transporte de gás carbônico no sentido inverso. Quimicamente é composta pela conjugação do grupo prostético, tetrapirrólico, contendo ferro, denominado grupo heme, à cadeia polipeptídica de globina.

TABELA 1. Distribuição por localidade, de 15 genótipos classificados como hemoglobinas raras. Segundo NADUM, 1987.

GENÓTIPO	LOCALIDADE
AJ Oxford	Araçatuba,Brasília,Goiânia,Guaratinguetá,Natal,Presidente Prudente,Salvador São José dos Campos,São José do Rio Preto, São Luís e São Paulo.
AJ Rovigo	São Paulo e Sorocaba
AJ Baltimore	Barretos
AI	Araraquara, Belém, Botucatu, Maceió, Parnaíba, Salvador e Teresina
AM Boston	Botucatu, São José do Rio Preto e São Paulo
AO Punjab	Bauru,Botucatu,Guaratinguetá,Rio de Janeiro, Santos, São José do Rio Preto, São Paulo e Sorocaba
A_2B	Presidente Prudente, Ribeirão Preto, São José do Rio Preto e São Paulo
AG Philadelphia	Ribeirão Preto e São Paulo
AN Baltimore	Barretos e São José do Rio Preto
A Koln*	Londrina , Patos de Minas, Porto Alegre e Santa Maria
A Niteroi*	Niteroi
A Hasharon*	Ribeirão Preto
Porto Alegre	Belém e Porto Alegre
Constant Spring	São José do Rio Preto
Lepore	Bauru e São José do Rio Preto

*Hemoglobinas Instáveis.

OBS: Com exceção das hemoglobinas instáveis que foram detectadas em pacientes com anemias hemolíticas, as restantes foram identificadas em estudos populacionais.

A fração proteica da molécula de hemoglobina é formada por quatro cadeias num total de 574 aminoácidos. Duas delas são constituídas por 141 aminoácidos cada e são chamadas tipo alfa. As outras duas possuem 146 aminoácidos cada e são denominadas tipo beta.

As cadeias do tipo alfa são elaboradas por genes específicos localizados no braço curto do cromossomo 16, em uma região de aproximadamente 25 Kb (ANTONARAKIS e cols, 1985), conforme mostra a figura 1. No complexo gênico alfa existem dois genes estruturais que expressam as globinas alfa separadas por aproximadamente 3 Kb, denominados de alfa 1 e alfa 2, que permanecem em atividade durante toda a vida do indivíduo. Seu ritmo normal de síntese é bastante elevado, uma vez que participam da composição de quase todas as hemoglobinas. Outros genes pertencentes a este complexo gênico são os genes zeta de atuação na fase embrionária, e os pseudogenes psi alfa 1 e psi zeta. Pseudogenes são genes que possuem sequência homóloga aos genes estruturais ativos, mas contêm mutações que inibem sua expressão (WEATHERALL & WAINSCOAT, 1985).

As cadeias do tipo beta são produzidas por genes localizados no braço curto de cromossomo 11 em uma região de aproximadamente 50 Kb, sendo que os genes epsilon são expressados na fase embrionária, enquanto os genes gama-alanina e gama-glicina são característicos do período fetal. Os genes beta e delta são atuantes a partir de uma fase do período fetal e se expressam em toda plenitude no período pós-nascimento (ANTONARAKIS e cols, 1985).

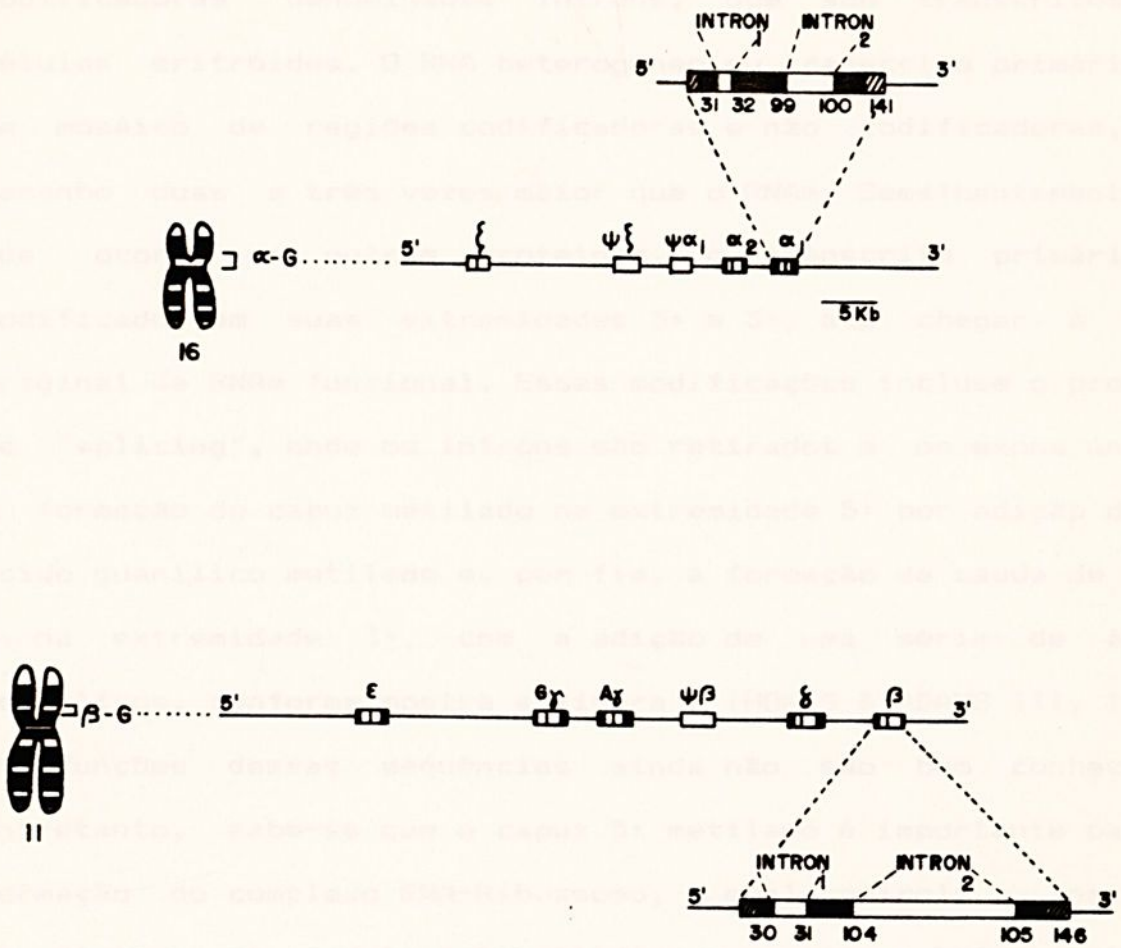


FIGURA 1 - Localização cromossômica dos genes da globina humana. A linha horizontal representa uma cadeia de DNA e os retângulos os genes. Faixas escuras representam exons e faixas claras os introns; regiões achuradas representam áreas não transcritas. Os números abaixo dos exons representam a quantidade de resíduos de aminoácidos codificados pela sequência específica. Segundo ANTONARAKIS e cols, 1985, com modificações.

Cada gene estrutural da globina humana possui três exons (sequências que codificam a globina) e duas sequências não codificadoras denominadas introns, que são transcritos nas células eritróides. O RNA heterogêneo ou transcrito primário, é um mosáico de regiões codificadoras e não codificadoras, com tamanho duas a três vezes maior que o RNAm. Semelhantemente ao que ocorre em outras proteínas, o transcrito primário é modificado em suas extremidades 5' e 3', até chegar à forma original de RNAm funcional. Essas modificações incluem o processo de "**splicing**", onde os introns são retirados e os exons unidos, a formação do capuz metilado na extremidade 5' por adição de um ácido guanílico metilado e, por fim, a formação da cauda de poli-A na extremidade 3', com a adição de uma série de ácidos adenílicos, conforme mostra a figura 2 (HONIG & ADAMS III, 1986). As funções dessas sequências ainda não são bem conhecidas; entretanto, sabe-se que o capuz 5' metilado é importante para a formação do complexo RNA-Ribossomo, o qual controla a iniciação da síntese da cadeia polipeptídica e protege o RNAm contra o ataque de endonucleases na extremidade 5', mantendo sua estabilidade. A cauda de poli-A, na extremidade 3', é importante para o transporte do RNAm do núcleo para o citoplasma e para a sua estabilidade. Esta estabilidade é mantida devido à estrutura intrínseca do RNAm maduro (LONG e cols, 1990).

O processo de "**splicing**" é fundamental para a formação do RNAm final que será traduzido na globina específica. Esse processo ocorre devido ao reconhecimento entre os introns e exons de "sequências **consensus**" como as sequências GU na posição 5' e AG na extremidade 3' dos introns. Uma notável característica do RNAm da globina é sua excepcional estabilidade sob condições de

intensa síntese, o que contribui para que os reticulócitos continuem a sintetizar hemoglobina por vários dias após a perda do núcleo.

Todos os RNAm da globina apresentam cauda de poli-A e capuz metilado nas extremidades 3' e 5' respectivamente. Para a globina beta, por exemplo, existem 53 nucleotídeos antes do codon de iniciação AUG e 132 entre o codon de terminalização UAA e a cauda de poli-A. Assim, embora a cadeia beta tenha 146 aminoácidos (que requerem 438 nucleotídeos), o RNAm para a globina beta tem aproximadamente 650-750 nucleotídeos, dependendo do tamanho da cauda de poli-A, que varia com a idade do RNAm, (as maiores são encontradas em RNAm recém sintetizados, e as menores são isoladas de reticulócitos velhos). Há alguns indícios de que o capuz metilado seja necessário para uma eficiente tradução do RNAm da globina. Com técnicas de hibridização de DNA, verificou-se que as mutações nas regiões de "**splicing**" e em outras regiões não traduzidas, levam a fenótipos talassêmicos por ação de novos sítios com diminuição ou adição de segmentos extras, além de provocar a instabilidade do RNAm processado (HONIG & ADAMS III, 1986). A síntese de hemoglobinas é determinada por um sistema complexo de regulação. É específica dos tecidos eritróides, modifica-se ao longo do desenvolvimento ontogenético do indivíduo e também durante o processo de maturação eritrocitária. Ocorre ainda a coordenação da síntese das duas subunidades codificadas em cromossomos diferentes. Os mecanismos que controlam essa regulação, não são totalmente conhecidos, e estudos de expressão controlada realizados em camundongos transgênicos, têm esclarecido algumas dúvidas relacionadas à regulação desses genes globínicos (LABIE, 1990).

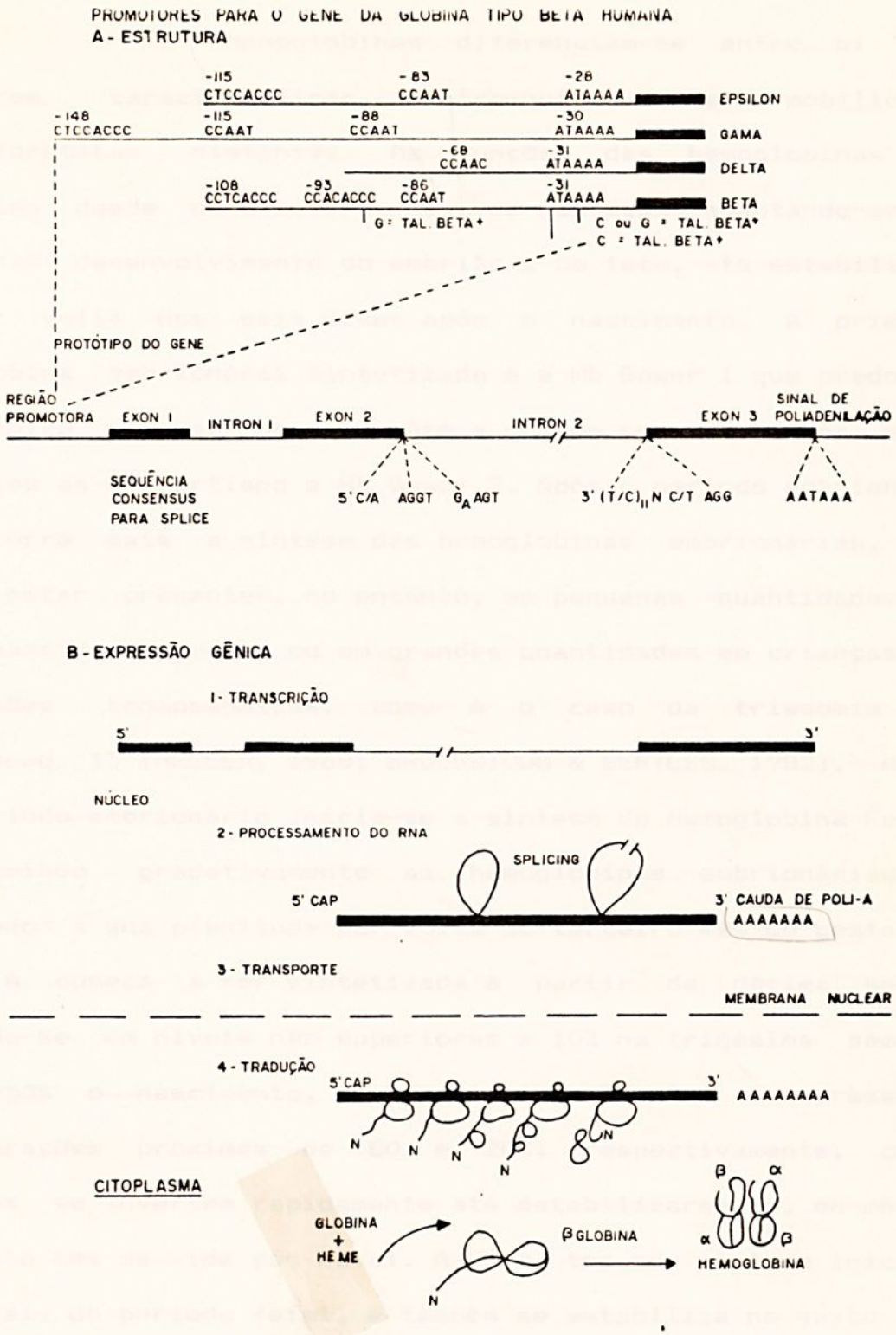


FIGURA 2 - A. Estrutura e B. Expressão dos genes da globina beta humana. Segundo ANTONARAKIS e cols, 1985, com modificações.

As hemoglobinas diferenciam-se entre si por possuirem características físico-químicas e mobilidades eletroforéticas distintas. As funções das hemoglobinas são marcantes desde os primeiros dias de gestação, adaptando-se ao constante desenvolvimento do embrião e do feto, até estabilizar-se por volta dos seis meses após o nascimento. A primeira hemoglobina embrionária sintetizada é a Hb Gower 1 que predomina nas quatro semanas iniciais. Até a décima segunda semana estão presentes as Hb Portland e Hb Gower 2. Após o período embrionário não ocorre mais a síntese das hemoglobinas embrionárias, que podem estar presentes, no entanto, em pequenas quantidades em recém-nascidos normais, ou em grandes quantidades em crianças com aberrações cromossômicas, como é o caso da trissomia do cromossomo 13 (HELLER, 1968; BROUSSIOUS & BERTLES, 1982). Ainda no período embrionário inicia-se a síntese de hemoglobina Fetal, substituindo gradativamente as hemoglobinas embrionárias e atingindo a sua plenitude por volta do terceiro mês de gestação. A Hb A começa a ser sintetizada à partir da décima semana mantendo-se em níveis não superiores a 10% na trigésima semana. Logo após o nascimento, as hemoglobinas Fetal e A apresentam concentrações próximas de 80 e 20%, respectivamente, cujas sínteses se invertem rapidamente até estabilizarem-se, em média, no sexto mês de vida pós natal. A Hb A_2 tem sua síntese iniciada no final do período fetal, e também se estabiliza no sexto mês após o nascimento (WEATHERALL & CLEGG, 1981). A figura 3 representa os diferentes estágios das hemoglobinas nos períodos embrionário, fetal e pós-nascimento, e suas respectivas concentrações. As combinações entre as cadeias globínicas do tipo alfa e do tipo beta resultam em hemoglobinas diferentes conforme

o pareamento estabelecido. De uma forma geral, as hemoglobinas normais sintetizadas após o nascimento ficam assim representadas, segundo a composição de suas cadeias, Hb A ($alfa_2$ $beta_2$) , Hb A_2 ($alfa_2$ $delta_2$) e Hb Fetal ($alfa_2$ $gama_2$). O indivíduo com hemoglobinas normais é classificado como portador de Hb AA.

2.2. HEMOGLOBINAS ANORMAIS

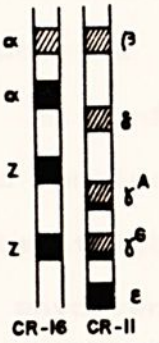
Hemoglobinas variantes e talassemias

As hemoglobinas anormais apresentam fundamentalmente alterações envolvendo genes estruturais, que promovem a formação de moléculas de hemoglobina com características bioquímicas diferentes das hemoglobinas normais. São também denominadas hemoglobinas variantes.Mutações afetando os genes reguladores promovem desequilíbrio do conteúdo quantitativo das cadeias e consequentemente dos tipos normais de hemoglobinas, causando as talassemias. Dessa forma, as hemoglobinas variantes e as talassemias são classificadas como hemoglobinas anormais hereditárias.

2.2.1.- HEMOGLOBINAS VARIANTES

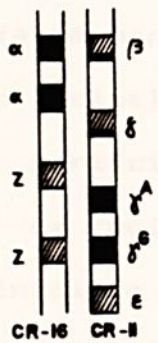
A maioria das variantes estruturais é originada por simples substituições de aminoácidos, resultantes de mudanças nas sequências dos nucleotídeos. As alterações estruturais, com consequências nas atividades físico-químicas da molécula, estão na dependência da extensão do processo mutacional e dos locais em que esses ocorrem. Dessa forma, as hemoglobinas anormais podem originar-se por:

PERÍODO EMBRIONÁRIO



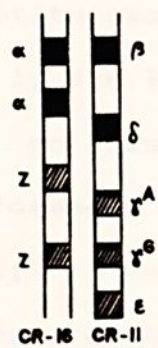
TIPOS DE Hb	CONCENTRAÇÕES
$\zeta_2\varepsilon_2$ - Hb Gower - 1	20 - 40 %
$\zeta_2\gamma_2$ - Hb Portland	5 - 20 %
$\alpha_2\varepsilon_2$ - Hb Gower - 2	10 - 20 %
$\alpha_2\gamma_2$ - Hb Fetal	5 - 40 %

PERÍODO FETAL



TIPOS DE Hb	CONCENTRAÇÕES
$\alpha_2\gamma_2$ - Hb Fetal	90 - 100 %
$\alpha_2\beta_2$ - Hb A	0 - 10 %
$\alpha_2\delta_2$ - Hb A_2	0 - 1 %

PERÍODO PÓS-NASCIMENTO (acima de 6 meses)



TIPOS DE Hb	CONCENTRAÇÕES
$\alpha_2\beta_2$ - Hb A	96 - 98 %
$\alpha_2\delta_2$ - Hb A_2	2,5 - 3,7 %
$\alpha_2\gamma_2$ - Hb Fetal	0 - 1 %

■ GENE ATIVO

▨ GENE INATIVO

CR - CROMOSSOMO

FIGURA 3 - Hemoglobinas presentes nos diferentes estágios do desenvolvimento humano. Segundo NAOUM, 1987.

a) substituição de um aminoácido por outro de características diferentes, na porção externa da molécula. Pode ocorrer também a substituição de dois aminoácidos em uma mesma cadeia, sendo, entretanto, condição muito rara. As substituições de aminoácidos na superfície externa, com exceção feita à hemoglobina S, não produzem alterações significativas no comportamento funcional da molécula;

b) substituição de aminoácidos na porção interna da molécula, envolvendo resíduos polares e não polares, especialmente nos locais invariantes da molécula - incluindo aqueles que fazem parte do "pacote hidrofóbica" em torno do grupo heme, cuja principal função é protegê-lo da entrada de água - e aqueles que participam dos contatos alfa 1 beta 1. Qualquer substituição na região interna da molécula causa instabilidade, geralmente iniciada pela oxidação do grupo heme, com formação de hemoglobinas instáveis;

c) substituição de aminoácidos que participam dos contatos alfa 1 beta 1, das ligações químicas com o 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e do resíduo histidina C-terminal da cadeia beta, provocam a formação de hemoglobinas com alterações na afinidade pelo oxigênio;

d) substituição dos resíduos de histidinas distal ou proximal, que estão ligados ao grupo heme, ou de outros resíduos, que têm importância fundamental na constituição do "pacote" de aminoácidos que protege o grupo heme contra oxidação, causam anormalidades na molécula provocando excessiva formação de metemoglobina por hemoglobina M;

e) adição de aminoácidos ao C-terminal das cadeias alfa e beta. A hemoglobina Constant Spring apresenta 31 resíduos a mais

na cadeia alfa, e a hemoglobina Tak é uma molécula anormal com 10 resíduos a mais na cadeia beta.

Outra causa de variantes estruturais ocorre por deleção de aminoácidos. Esse processo produz profundas alterações na molécula de hemoglobina, tornando-a instável. A fusão entre duas cadeias polipeptídicas diferentes também origina hemoglobinas variantes. A fusão de cadeias delta e beta resulta na formação de um tipo anormal de hemoglobina, a hemoglobina Lepore. Dependendo do local onde ocorre a fusão, formam-se diferentes tipos dessa variante: Hb Lepore Holanda, com fusão de cadeia beta no resíduo 22 da cadeia delta; Hb Lepore Baltimore, fusão no resíduo 50 da cadeia delta: Hb Lepore Boston, fusão no resíduo 87 da cadeia delta. A fusão de cadeias beta e delta, ou anti-Lepore, foi descrita em dois tipos de hemoglobinas anormais: Hb Miyada, com fusão de cadeia delta no resíduo 12 da cadeia beta, e Hb Nilotic com fusão no resíduo 22. A fusão de cadeias gama e beta foi descrita na hemoglobina Kenya, no resíduo 81 da cadeia gama, e na Hb Steinheim, no resíduo 121 (NAOUM,1987).

A perda espontânea de aminoácidos, resultando em hemoglobina variante, foi relatada na Hb Koellicker, onde o resíduo C-terminal da cadeia alfa, a arginina, separa-se do resto da cadeia e pode ser detectada na urina (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974).

Em 1992, o IHIC (International Hemoglobin Information Center) publicou uma lista atualizada das mais de 500 variantes de hemoglobinas já descritas. A grande maioria origina-se por substituição de um único aminoácido da cadeia polipeptídica. Poucas dessas variantes encontram-se associadas a manifestações clínicas e/ou hematológicas que, quando presentes, têm seu grau

de expressão intimamente relacionado ao local e extensão da mutação; assim as hemoglobinas variantes podem ser classificadas baseadas em suas características funcionais, em cinco grupos:

Grupo 1 - Hemoglobinas sem alterações fisiológicas: Esse grupo é constituído pela maioria das variantes e, embora essas hemoglobinas sejam de interesse bioquímico, genético e antropológico, não produzem efeitos clínicos significativos nem alterações hematológicas.

Grupo 2 - Hemoglobinas de agregação: As hemoglobinas S e C apresentam respectivamente a formação de tactóides e cristais, com repercussões clínicas e hematológicas variáveis.

Grupo 3 - Hemoglobinas instáveis: As hemoglobinas instáveis apresentam graus variáveis de manifestações clínicas e hematológicas, expressando-se laboratorialmente por meio de intensa instabilidade molecular quando submetidas ao calor ou agentes químicos, e pela presença de corpos de inclusão nos eritrócitos.

Grupo 4 - Hemoglobinas com alterações funcionais: Esse grupo inclui as hemoglobinas que causam metemoglobinemias por Hb M e alterações na afinidade pelo oxigênio.

Grupo 5 - Hemoglobinas variantes com fenótipo talassêmico: As hemoglobinas Lepore e Constant Spring são duas formas variantes e que apresentam fenótipos de talassemias beta e alfa, respectivamente.

2.2.2.- TALASSEMIAS

As talassemias constituem um grupo heterogêneo de alterações hereditárias que se caracterizam por um defeito na síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina, gerando um desequilíbrio entre essas subunidades, dificultando o processo de eritropoese e causando hemoglobinização deficiente dos eritroblastos. A nível periférico, as talassemias expressam-se com quadros morfológicos alterados, de intensidade variável, conforme o tipo de talassemia.

Nas talassemias, geralmente a estrutura primária da hemoglobina é normal, diferenciando-se das hemoglobinas variantes por essas serem formadas por uma cadeia de globina estruturalmente anômala.

Além da sua importância médica como o grupo mais comum de patologia monogênica na população mundial, as talassemias proporcionam uma variedade de modelos de ocorrência natural para o estudo de regulação da síntese das hemoglobinas, do seu desenvolvimento genético e da sua relação antropológica. As talassemias são classificadas segundo a cadeia polipeptídica afetada. As talassemias do tipo alfa e do tipo beta são mais frequentes e melhor definidas, mas também são conhecidas as talassemias do tipo delta-beta, delta, e gama-delta-beta. Existe ainda um outro grupo, mais raro, que se caracteriza pela manutenção de hemoglobina fetal em quantidades aumentadas na vida adulta designado por persistência hereditária de hemoglobina Fetal - PHHF, que pode ser uma forma compensada de delta-beta talassemia (HONIG & ADAMS III, 1986).

3. HEMOGLOBINA S

3.1. ALTERAÇAO MOLECULAR

A hemoglobina S é causada por uma mutação no gene beta da globina, produzindo uma alteração estrutural na molécula. Por ser uma anomalia da cadeia beta, as características clínicas do estado homozigoto só serão percebidas após a estabilização da produção dessas cadeias, o que ocorre por volta dos 4 a 6 meses de idade. No gene da globina beta S, há a substituição de um codon (GTG para GAG), resultando na substituição do ácido glutâmico (GLU), na posição 6 da cadeia, por valina (VAL). A valina é um aminoácido neutro enquanto que o ácido glutâmico é carregado negativamente. Essa troca resulta em uma mobilidade mais lenta da Hb S quando comparada com a Hb A em eletroforese de pH alcalino. Por outro lado, a carga negativa do ácido glutâmico auxilia no afastamento das moléculas de hemoglobina, enquanto que a valina, neutra, favorece a polimerização sob condições de baixo teor de oxigênio. No estado oxigenado, a molécula de Hb S está "relaxada" de acordo com o modelo de MONOD e cols,1965. Nessa conformação as globinas beta estão próximas. No estado desoxigenado ou "tenso" as cadeias beta ficam mais separadas. Essa mudança de estado favorece o contato entre as regiões da desoxiemoglobina, o que não é possível no estado oxigenado. As regiões de contato são tanto laterais (VAL-6 em relação à PHE-85 e LEU-88 da globina beta), quanto axiais (GLU-22 e GLU-121 da cadeia beta), e estão envolvidas na formação do polímero de hemoglobina. Existem algumas teorias que sugerem um período de atraso na polimerização que envolve a formação de um núcleo.

Quando esse núcleo atinge o tamanho crítico, a formação dos polímeros é energéticamente favorecida, conforme mostram as figuras 4 e 5 (HEBBEL, 1991).

Uma vez formado o polímero, a célula passa da forma discóide, flexível, para a forma alongada e mais rígida, característica da Hb S. Contudo, o tempo que a célula leva para atravessar os capilares sanguíneos é menor do que o período utilizado para a formação do polímero e produção da célula falciforme, não ocorrendo portanto a vaso oclusão contínua. A irreversibilidade da célula falciforme é dada pela formação de citoesqueleto oriundo de proteínas da membrana celular (EDELSTEIN, 1986; FRANCIS & JOHNSON, 1991).

A polimerização da hemoglobina e a falcização da célula são dependentes da concentração de Hb S e podem ser mediados pela perda de oxigênio e desidratação das células, fatos que as tornariam mais densas e facilitariam o processo de falcização (LAWRENCE e cols, 1991; FABRY e cols, 1991).

A membrana do eritrócito é uma bicamada lipídica com assimetria de fosfolipídeos. No eritrócito normal, o lado externo é composto por fosfatidil-colina e esfingomielina, o lado interno contém serina e fosfatidil-etanolamina. Nas células falciformes essa assimetria é perdida, pois a fosfatidil serina está localizada no lado externo, o que pode estar relacionado ao aumento de aderência das células e sua contribuição para o processo vaso oclusivo (BLUMENFELD e cols, 1991).

3.2. ALTERAÇÃO CELULAR

A polimerização da Hb S deforma o glóbulo vermelho, fazendo com que a célula perca seu aspécto discóide tornando-se alongada, com filamentos nas suas extremidades. Essas mudanças alteram a estabilidade da bomba de sódio e potássio, com consequente perda de potássio e água, e aumento da concentração de Hb S, fato que favorece a polimerização. Ocorre também aumento da concentração intracelular de cálcio, pela falência da bomba de cálcio/ATPase, e aumento da permeabilidade da membrana a esse íon (BLUMENFELD e cols, 1991).

As alterações de membrana resultantes da polimerização podem ser revertidas com a reoxigenação celular. Quando o processo de falcização é repetitivo, as alterações funcionais aumentam e a célula torna-se irreversívelmente falcizada (EDELSTEIN, 1986). O tempo para a ocorrência do processo de falcização varia de 2 a 4 minutos, enquanto o tempo que as hemácias permanecem na circulação venosa é de 10 a 15 segundos. Dessa forma, em áreas de estase, a vulnerabilidade à falcização é maior. A circulação venosa tem maior número de hemácias falciformes irreversíveis do que a arterial, porque o pré-requisito seria o aumento da CHCM (concentração de Hb corpuscular média), causado pela desidratação celular, e estabilizando o esqueleto celular. A vasoconstrição da circulação capilar leva à estase e ao aumento do tempo de contato da hemácia com áreas com baixo teor de oxigênio.

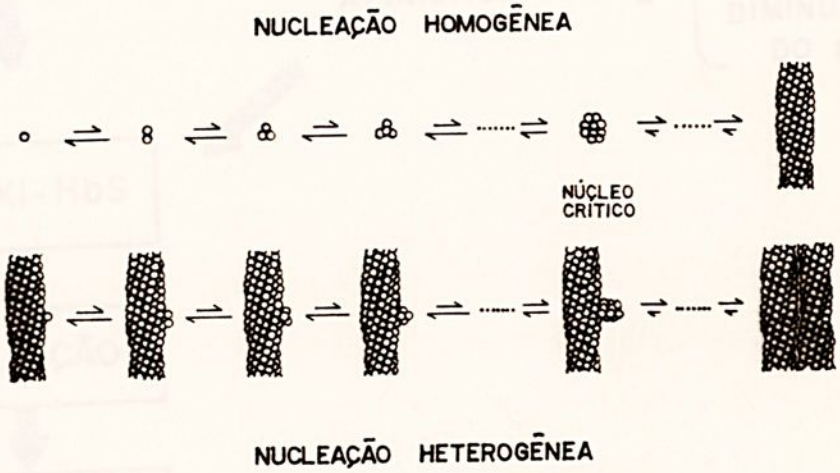


FIGURA 4 - Mecanismos de nucleação homogênea e heterogênea para a formação de fibras de Hb S. Segundo EDELSTEIN, 1986.

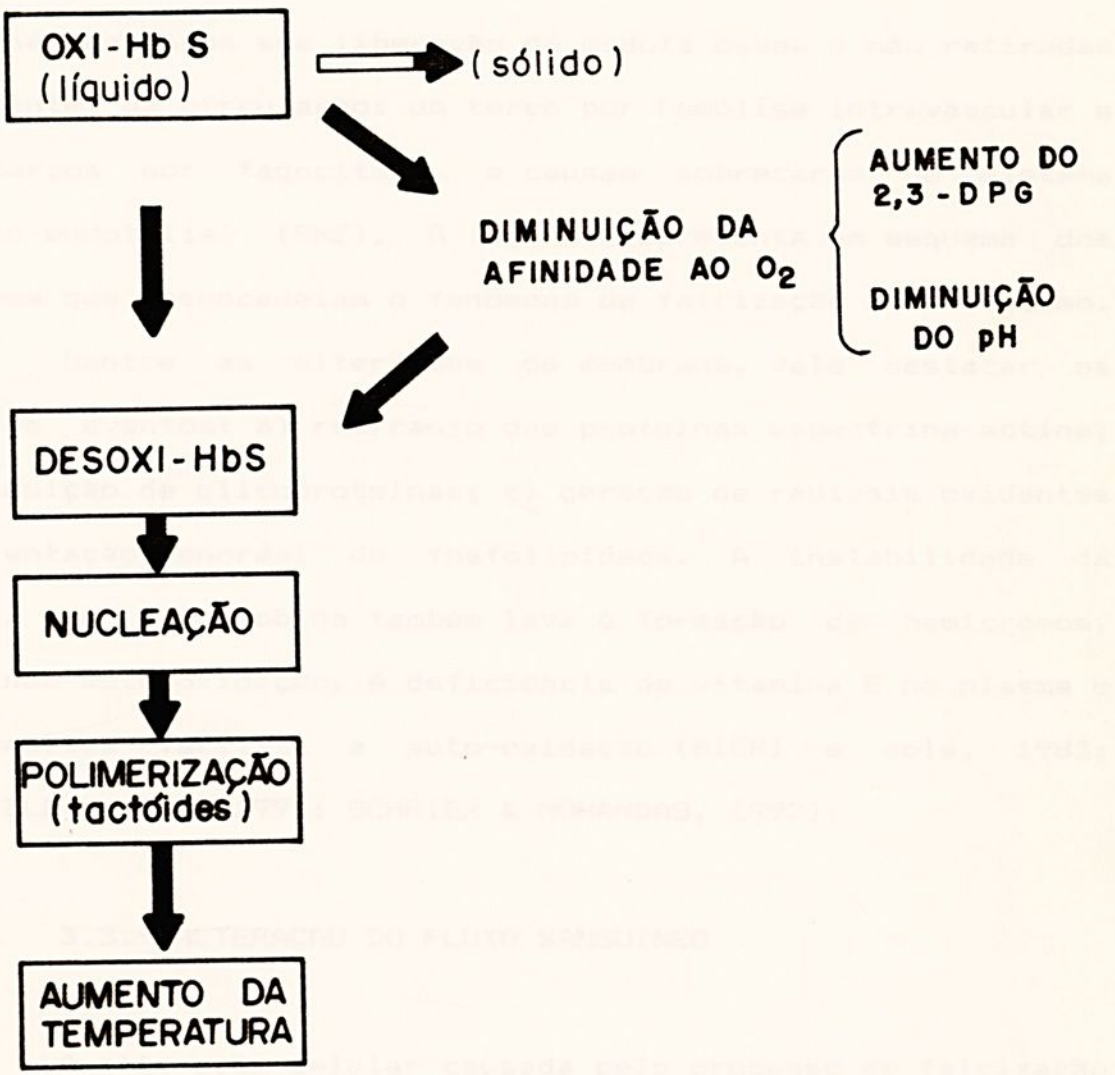


FIGURA 5 - Sequência de polimerização de Hb S. Segundo NADUM, 1987.

A desidratação do organismo também favorece a desidratação celular, bem como o aumento da concentração da Hb S.

Os homozigotos (HbSS) possuem de 4 a 44% de hemácias falciformes irreversíveis na circulação periférica (WINTROBE e cols, 1981; BEUTLER, 1983). As hemácias falciformes irreversíveis formam-se logo após sua liberação da medula óssea e são retiradas rapidamente da circulação: um terço por hemólise intravascular e dois terços por fagocitose, e causam sobrecarga do sistema retículo-endotelial (SRE). A figura 6 apresenta um esquema dos processos que desencadeiam o fenômeno de falcização no organismo.

Dentre as alterações de membrana, vale destacar os seguintes eventos: a) rearranjo das proteínas espectrina-actina; b) diminuição de glicoproteínas; c) geração de radicais oxidantes d) orientação anormal de fosfolipídeos. A instabilidade da molécula de hemoglobina também leva à formação de hemicromos, produzindo auto-oxidação. A deficiência de vitamina E no plasma e nas hemácias facilita a auto-oxidação (BIERI e cols, 1983; BLUMENFELD e cols, 1991; SCHRIER & MOHANDAS, 1992).

3.3.- ALTERAÇÃO DO FLUXO SANGUINEO

A alteração celular causada pelo processo de falcização influencia intensamente o fluxo sanguíneo, aumentando sua viscosidade. As hemácias falciformes irreversíveis têm capacidade aumentada de adesão ao endotélio vascular, principalmente devido à alta viscosidade do sangue e também pela elevação dos níveis de fibrinogênio, que ocorre como resposta natural a infecções. A adesividade pode ser devida a forças eletrostáticas.

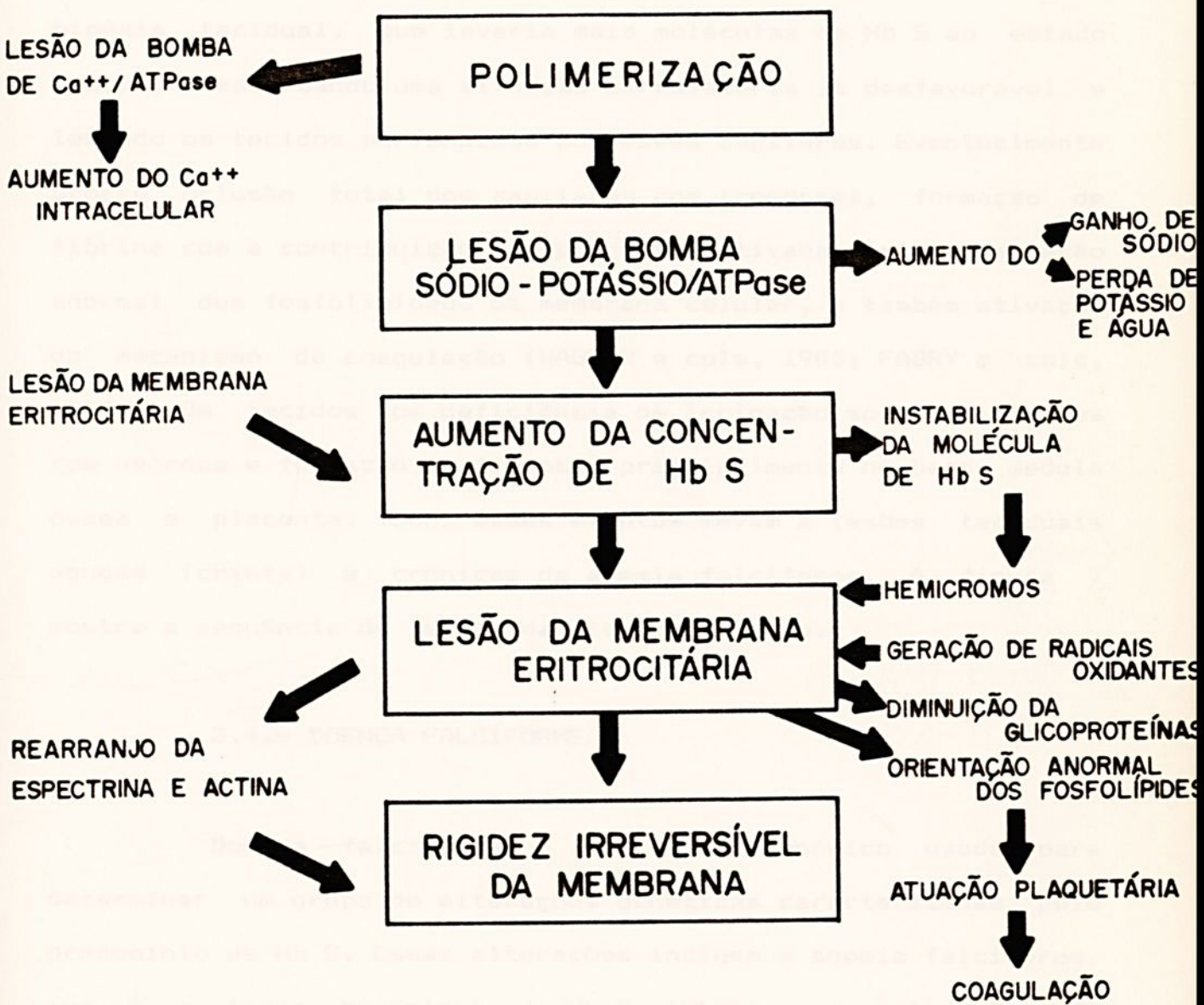


FIGURA 6 - Sequência de falcização. Segundo NAOUM, 1987.

A deposição de grande número de eritrócitos alterados na superfície endotelial reduz a luz dos capilares e a estase é inevitável, podendo ainda ser aumentada pela diminuição da temperatura ambiente. Como consequência da estase, ocorre a hipóxia tecidual, que levaria mais moléculas de Hb S ao estado desoxi, exacerbando uma situação circulatória já desfavorável e lesando os tecidos perfundidos por esses capilares. Eventualmente ocorre oclusão total dos capilares com tromboses, formação de fibrina com a contribuição das plaquetas ativadas pela orientação anormal dos fosfolipídeos da membrana celular, e também ativação do mecanismo de coagulação (WAGNER e cols, 1985; FABRY e cols, 1992). Os tecidos com deficiência de irrigação sofrem infartos com necrose e formação de fibrose, principalmente no baço, medula óssea e placenta. Todos esses eventos levam a lesões teciduais agudas (crises) e crônicas da anemia falciforme. A figura 7 mostra a sequência de lesões da microcirculacão.

3.4.- DOENÇA FALCIFORME

Doença falciforme é um termo genérico usado para determinar um grupo de alterações genéticas caracterizadas pelo predomínio de Hb S. Essas alterações incluem a anemia falciforme, que é a forma homozigota da Hb S (HbSS), as interações de síndromes talassêmicas com Hb S, e a associação de outras hemoglobinas anormais com a Hb S. As doenças falciformes são encontradas com maior frequência em habitantes da Africa, Mediterrâneo e India. Nos Estados Unidos são mais prevalentes em negros e hispânicos oriundos do Caribe, América Central e partes da América do Sul (W.H.O., 1982).

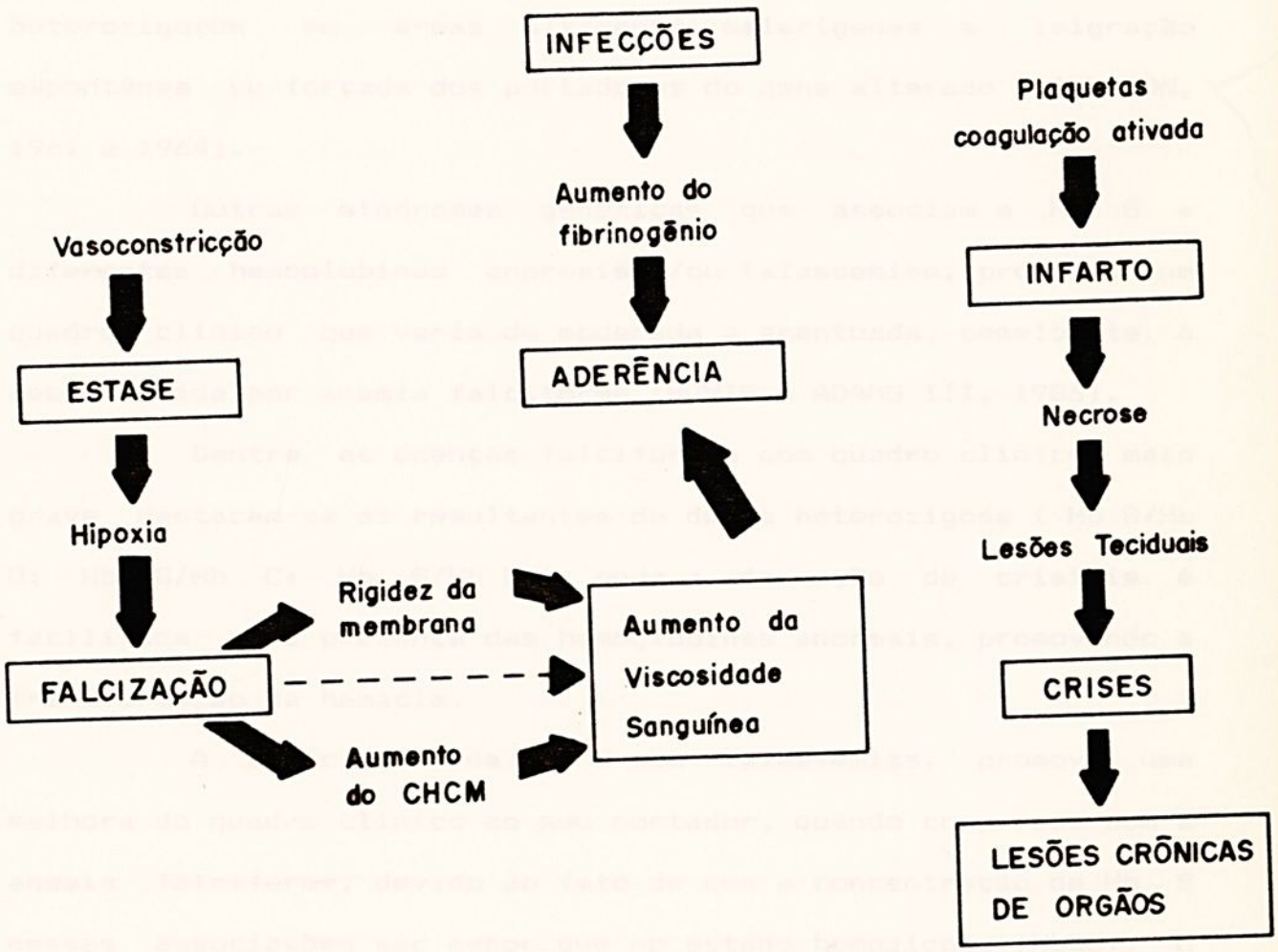


FIGURA 7 - Sequência das lesões na microcirculação. Segundo NAOUM, 1987.

O gene da Hb S apresenta alta prevalência em várias regiões da Africa e outras partes do mundo onde a malária por **Plasmódium falciparum** é endêmica, ou onde existam grupos de imigrantes portadores do gene S. A alta prevalência de Hb S nessas áreas pode ser explicada por dois mecanismos: seleção de heterozigotos em áreas altamente malarígenas e imigração espontânea ou forçada dos portadores do gene alterado (ALLISON, 1961 e 1964).

Outras síndromes genéticas que associam a Hb S a diferentes hemoglobinas anormais e/ou talassemias, produzem um quadro clínico que varia de moderada a acentuada, semelhante à desenvolvida por anemia falciforme (HONIG & ADAMS III, 1986).

Dentre as doenças falciformes com quadro clínico mais grave destacam-se as resultantes de dupla heterozigose (Hb S/Hb O; Hb S/Hb C; Hb S/Hb D), onde a formação de cristais é facilitada pela presença das hemoglobinas anormais, promovendo a transformação da hemácia.

A associação da Hb S com talassemias, promove uma melhora do quadro clínico ao seu portador, quando comparada com a anemia falciforme, devido ao fato de que a concentração de Hb S nessas associações ser menor que no estado homozigoto (HbSS). O portador de Hb S/ Talassemia beta apresenta hemoglobinas S, Fetal e A_2 - no caso de ser do tipo beta zero talassemia/Hb S, e verificam-se as presenças de hemoglobinas A, S, Fetal e A_2 no tipo beta mais talassemia/Hb S. Assim, a diminuição da concentração de HbS minimiza o curso clínico da doença com episódios de crises mais espaçados (COSTA e cols, 1989; RIEDER e cols, 1991).

As doenças falciformes são melhor classificadas pelo genótipo conforme ilustra a tabela 2, sendo que a mais prevalente e com maior gravidade sob o ponto de vista clínico é a anemia falciforme.

Homozigotos para o gene beta S associados a talassemia alfa (Hb SS/Talassemia alfa) apresentam curso clínico benigno, com expectativa de vida aumentada, o mesmo sendo verificado naqueles portadores de doenças falciformes com presença significativa de hemoglobina Fetal(HUTZ e cols, 1983; AL-AWAMY e cols, 1986; RODGERS e cols, 1986; HONIG & ADAMS III, 1986; STEINBERG, 1991). A herança de outras alterações da hemoglobina com a Hb S diminui a tendência de polimerização da HbS contribuindo para a melhora da sobrevida e curso clínico do paciente. Especificamente no caso de talassemia alfa associada à Hb S, existem compensações para o paciente pelo fato de ocorrer um aumento do nível de hemoglobina e hematócrito e diminuição da quantidade de reticulócitos, sugerindo que o grau de hemólise está reduzido, provavelmente pela presença da talassemia alfa. A frequência de acidentes vasculares cerebrais, comuns na anemia falciforme, estão diminuidos nos duplos heterozigotos (LAROS Jr. e cols, 1971; RODGERS e cols, 1986; POWARS e cols, 1986; LAWRENCE e cols, 1991; KULOZIK e cols, 1991; RIEDER e cols, 1991).

Tais observações incentivaram estudos aprofundados nos genes responsáveis pela hemoglobina Fetal (gama alanina e gama glicina), sendo que sua presença altera o processo de polimerização da Hb S, e pode também afetar a expressão do gene beta S; o mesmo ocorrendo com o locus para os genes alfa. Diante desses fatos, alguns estudos têm sido realizados, na tentativa de ativar os genes gama, pouco funcionantes em indivíduos adultos.

Tabela 2 . Síndromes falcêmicas e seu significado clínico.

Modificada de HONIG & ADAMS III, 1986

DOENÇA FALCIFORME	HEMOGLOBINAS PRESENTES	NÍVEL DE HbA_2	VCM (volume corpuscular médio)	GRAVIDADE CLÍNICA	CARACTERISTICAS CLÍNICAS
Hb SS	HbS:80-95% HbF:2-20%	Normal	Normal	++ a ++++	Anemia grave com crises de falcização
HbS/beta^0 talassemia	HbS:75-90% HbF:5-25%	Aumentada	Diminuido	++ a ++++	Semelhante a SS
HbS/beta$^+$ talassemia	HbS:55-85% HbF:5-10% HbA:10-30%	Aumentada	Diminuido	+ a +++	Geralmente menos que HbSS
HbS/delta beta tal	HbS:60-80% HbF:15-40%	Normal	Diminuido	+ a ++	Doença falciforme moderada
HbS/alfa** talassemia	HbS:80-90% HbF:10-20%	Normal	Diminuido	++ a ++++	Menos que HbSS
HbSC	HbS:45-50% HbF:2-5% HbC:45-50%	Normal	Normal	+ a +++	Menos que Hb SS
HbS/PHHF*	HbS:65-80% HbF:15-30%	Normal	Normal	0 a +	Geralmente assintomático
HbAS*	HbS:32-45% HbA:52-45%	Normal	Normal	0 a +	Assintomático

*Estas condições não provocam doença falciforme e foram colocadas a título de comparação.

** Pode ser detectada a presença de Hb H (2 a 5%) por eletroforese, ou agregados intraeritrocitários de Hb H em hemáceas incubadas com azul de crezil brilhante.

Essa ativação tem o objetivo de aumentar a produção de Hb Fetal e, assim, minimizar as consequências clínicas das alterações ligadas à Hb S (BALLAS e cols, 1991; LANCOS e cols, 1991; ONER e cols, 1992; ELION e cols, 1992).

Há duas características fisiopatológicas importantes nas doenças falciformes: anemia hemolítica crônica e vaso oclusão resultando em danos teciduais. A anemia hemolítica é causada por propriedades anormais da HbS e/ou por crises sucessivas de falcização que levam a uma irreversibilidade da membrana da hemácia e destruição eritrocitária.

A lesão tecidual é principalmente produzida por hipóxia resultante da obstrução dos vasos sanguíneos pelo acúmulo de hemácias falcizadas. Orgãos que sofrem maiores riscos são aqueles com "**sinus**" venoso por onde a circulação do sangue é lenta e a tensão de oxigênio e o pH são baixos (por exemplo: rim, fígado e medula), ou aqueles com limitada suplementação de sangue arterial (por exemplo: olhos e cabeça do fêmur) (POWARS, 1990).

Os sintomas da hipóxia também podem ser agudos com crises dolorosas, ou insidiosas, caracterizadas por necrose asséptica de quadris e retinopatia por célula falciforme. Os efeitos dos danos teciduais agudos ou crônicos podem, em último caso, resultar na falência do orgão, pricipalmente em pacientes com idade avançada.

Um problema adicional e menos reconhecido nos pacientes falciformes é sua vida sob condições de estresse psicossocial. Esses pacientes possuem não somente o estresse advindo do fato de serem portadores de uma doença crônica, mas também, convivem com o problema da natureza de sua doença, cuja repetição das crises afeta sua atuação tanto na escola quanto no trabalho e reduz

potencialmente seu senso de auto-estima (TAVARES NETO, 1981; CHARACHE e cols, 1991).

A detecção efetiva de diversas formas de síndromes falcêmicas requer diagnóstico preciso. Esse diagnóstico é baseado principalmente em técnicas eletroforéticas, hemogramas e dosagem de Hb Fetal. Nos casos de Hb SC, a associação de eletroforeses alcalina e ácida é decisiva para o correto diagnóstico. Entretanto, há casos em que o padrão eletroforético da anemia falciforme é similar aos de associações entre Hb S/talassemia beta, Hb S/talassemia delta-beta e Hb S/PHHF. Nessas situações as análises laboratoriais devem ser muito precisas, já que o quadro clínico do paciente pouco difere em cada uma delas. Por exemplo, os sintomas dos pacientes com Hb S/beta zero talassemia são parecidos aos dos pacientes com Hb SS, enquanto que aqueles que apresentam Hb S/delta-beta talassemia possuem poucos sintomas e os portadores de Hb S/PHHF são assintomáticos, apesar da similaridade no padrão eletroforético de todos eles (CHARACHE e cols, 1991). Quantificações de HbA_2 e HbF podem ajudar a distinguir essas alterações. Em geral a HbA_2 está aumentada, acima de 3,5% nos casos de associações com talassemia beta zero e baixa em pacientes com Hb S/delta beta talassemias e Hb S/PHHF. A Hb Fetal está mais alta em portadores de Hb S/beta talassemia do que em pacientes com Hb SS. Entretanto, os valores dos índices de VCM são geralmente fundamentais na conclusão dos resultados, conforme mostra a tabela 2. Nos casos em que se suspeita de HbS/PHHF, a pesquisa de distribuição intraeritrocitária de HbF nos pais deverá ser realizada (HONIG & ADAMS III, 1986).

3.5.- TRAÇO FALCIFORME

O traço falciforme caracteriza o portador assintomático, heterozigoto da HbS, sendo representado por Hb AS; não padece de doença nem possui anormalidades no número de hemácias. Os processos vaso oclusivos sob condições fisiológicas inexistem, e portanto, não têm influência na expectativa de vida de seu portador. Nessa condição heterozigota, ocorre a herança de um gene anormal (beta S) e outro normal (beta A), resultando na produção de cadeias beta normais (HbA) e beta anormais (HbS), sempre com predomínio de Hb A. O diagnóstico laboratorial é feito por técnicas eletroforéticas, e indivíduos que apresentam mais Hb S do que Hb A podem ser portadores de Hb S/beta mais talassemia (WEATHERALL & CLEGG, 1981).

O traço falciforme pode estar associado ocasionalmente, a condições clínicas graves que incluem hipostenúria, hematúria, aumento no risco a infecções do trato urinário durante a gravidez e retardo constitucional da puberdade (BRITTO e cols, 1984; POWARS e cols, 1986; GONÇALVES E RAMALHO, 1990). Os portadores de Hb AS quando iniciam quadro de hipóxia raramente desenvolvem sintomas relacionados à vaso oclusão. No entanto, existem relatos de morte súbita e complicações clínicas em portadores de Hb AS expostos a condições de baixa tensão de oxigênio, como anestesias prolongadas, esforços físicos extenuantes e trabalho sob condições adversas (HUTZ & SALZANO, 1983; SULLIVAN, 1987; CHARACHE, 1988).

3.6.- BIOLOGIA MOLECULAR DA Hb S

Todos os indivíduos são geneticamente diferentes, e essas características são transmitidas. Grande parte das diferenças individuais representam variações patológicas de DNA, enquanto outras tantas representam variações silenciosas. Essas variações silenciosas ou neutras são designadas polimorfismos, e podem ser detectadas por duas vias: a) diferenças na sequência de DNA podem ser identificadas pela análise sequencial de fragmentos de DNA clonados. Com as atuais técnicas de biologia molecular, é possível hoje, isolar determinado gene do restante do genoma humano; b) muitas vezes substituições de nucleotídeos neutros poderiam também introduzir ou remover sítios clivados por endonucleases de restrição. Uma centena de enzimas esse tipo são hoje comercializadas tornando possível a análise de um pequeno fragmento de DNA com diferentes sítios de clivagem para a análise de polimorfismos (ANTONARAKIS e cols, 1985).

O primeiro polimorfismo do gene globínico beta foi detectado em um estudo inicial de fragmentos clonados para essa região do genoma. Na observação de dois fragmentos que continham os genes gama e beta da globina de um indivíduo normal, foi notada diferença entre eles, sob a ação de uma enzima, a Pst I, que localizou uma sequência variante no segundo intron do gene gama, indicando que variações silenciosas poderiam ocorrer e ser identificadas. Kam e Dozzy, 1978, descreveram o polimorfismo de DNA para o gene beta globínico,através da localização de um sítio de clivagem pela enzima Hpa I, localizado em 5Kb3, e a frequente associação de sua ausência com o alelo da Hb S foi utilizado pelos autores como ferramenta para o diagnóstico pré-natal. Após

esses achados, um grande número de outros sítios polimórficos no gene beta foram identificados.

Grupos gênicos ligados à tais polimorfismos, designados haplótipos, são úteis marcadores para análises genéticas, relacionando os segmentos específicos do cromossomo à população que está sendo avaliada (RIEDER e cols, 1991)

As características clínicas da anemia falciforme são marcadas por grande variabilidade entre seus portadores, principalmente relacionadas com o grau de anemia, quantidade e composição de Hb Fetal, e outras características hematológicas. Fatores ecológicos estão envolvidos e não devem ser desprezados na análise global, dos quais podemos citar o clima, condições sócio-econômicas e desenvolvimento médico. Entretanto a grande maioria das diferenças clínicas e hematológicas deve-se à fatores genéticos relacionados à outros genes que podem estar ligados ou não ao gene da Hb S e que são capazes de modificar a expressão da doença. Dentre esses fatores dois merecem destaque: associação de Hb S com talassemia alfa e a presença de Hb Fetal (relacionando-se sua composição - se formada por cadeias gama glicina ou gama alanina). Portanto, o curso clínico e a gravidade da anemia falciforme estão relacionados ao haplótipo herdado. Até o presente, foram identificados quatro tipos diferentes de mutações para Hb S, e provavelmente todas originaram-se separadamente. São elas: Benin, República da Africa Central (RAC), Senegal e Arábia Saudita-India. Essas quatro variantes podem ser identificadas por análises de endonucleases de restrição. Os haplótipos Benin e RAC estão associados ao aumento da gravidade da doença falciforme e são também os mais frequentes (ABBES e cols, 1991; PADMOS e cols, 1991; RIEDER e cols, 1991; NAGEL e

cols, 1991).

Os portadores dos haplótipos Senegal e Arabia Saudita apresentam níveis de Hb F significativamente elevados, o que favorece sua clínica (ABBES e cols, 1991). O nível de Hb F varia de uma população para outra. Por ser geneticamente determinado, fornece boa evidência de que a alta expressão de cadeias gama glicina, estaria relacionada a mudanças de C para T na posição 158bp 5' do sítio "cap" do gene gama glicina, indicando que o aumento na expressão da Hb F refria-se à um sub-haplótipo específico do gene gama (ABBES e cols, 1991; NAGEL e cols, 1991).

Na Africa, os indivíduos portadores de anemia falciforme são haplotipicamente homozigotos. Nas Américas, devido ao alto grau de miscigenação, os indivíduos com anemia falciforme são haplotipicamente heterozigotos (NAGEL e cols, 1991; ABBES e cols, 1991; PADMOS e cols, 1991).

Recente estudo realizado com negros brasileiros portadores de hemoglobina S, provenientes de Ribeirão Preto, São Paulo e Uberaba, mostraram que a frequência do tipo de mutação de Hb S no Brasil é proveniente especialmente do tipo Benin, seguido de RAC (ZAGO e cols, 1992).

4. AS TALASSEMIAS

A denominação talassemia abrange um grupo heterogêneo de distúrbios genéticos da síntese de hemoglobina, caracterizado por uma redução da produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas de globina, que geralmente resulta no desenvolvimento de uma anemia microcítica e hipocrômica. A redução na síntese de determinada cadeia globínica pode ser parcial ou total, provocando um desequilíbrio entre os seus diferentes tipos. Dessa forma, as talassemias podem ser classificadas segundo a cadeia polipeptídica de globina afetada: alfa, beta, delta, delta-beta, e gama-delta-beta. Ainda que a hipocromia dos eritrócitos seja uma manifestação comum da talassemia, ela não está presente em todos os tipos como, por exemplo, no caso das talassemias delta que afetam uma pequena quantidade de cadeia. De modo geral, o desequilíbrio entre as cadeias globínicas, altera o processo de eritropoese, causando hemoglobinização deficiente dos eritroblastos, que se expressam em nível periférico com quadros morfológicos alterados, de intensidade variável segundo o tipo de cadeia afetada (WILLIAMS e cols, 1976).

O termo talassemia foi usado pela primeira vez em 1936 por Whippler e Bradford, para designar uma anemia altamente incidente na região do mar mediterrâneo que havia sido descrita por Cooley e Lee, em 1925, em crianças descendentes de italianos, gregos e sírios. Continuou sendo chamada também de anemia de Cooley em homenagem a esse autor que primeiro a descreveu e a caracterizou como uma entidade clínica. Dentre as características observadads por Cooley, podemos citar anemia hemolítica grave com aumento no volume do fígado e baço, alterações ósseas,

resistência osmótica dos eritrócitos aumentada e leucocitose (WEATHERALL & CLEGG, 1981).

Com a caracterização eletroforética da Hb S por Pauling em 1949, alterações hemoglobínicas relacionadas à talassemias começaram a ser investigadas, o que culminou com sua classificação entre as hemoglobinopatias hereditárias. Estudos posteriores foram definindo as talassemias como grupos especiais de alterações hemoglobínicas, e a talassemia clássica passou a ser designada talassemia beta. As outras formas foram classificadas segundo a alteração da respectiva cadeia. O conceito de talassemia passou então, da simples designação dada por Cooley de uma entidade mórbida, para um termo mais genérico, abrangendo os diversos enfoques, clínicos e genéticos, como o usado por Weatherall em seu livro (WEATHERALL & CLEGG, 1981).

A diferenciação das talassemias é complexa, considerando-se o amplo espectro de variações das manifestações clínicas dos diferentes alelos afetados e a associação desses com outras hemoglobinopatias. De modo geral, a classificação inicial, segundo o tipo de cadeia afetada, pode hoje ser designada pelos tipos de alterações genéticas que as originou, sendo caracterizadas molecularmente centenas de subtipos de talassemias. Até 1990, estimava-se em aproximadamente 150 os diferentes pontos de mutação que causavam talassemia beta, sem contar as deleções e inserções. Dados de 1992 acrescentaram novos pontos de mutação, e com o avanço da tecnologia para análise molecular, centenas de outras novas mutações que causam talassemias serão encontradas (HUISMAN, 1990; HUISMAN, 1992; JANKOVIC e cols, 1992; KOO e cols, 1992; CAI e cols, 1992).

Os mecanismos que determinam as talassemias podem ser agrupados em dois tipos: os que se relacionam às mutações nas porções codificadoras e os relacionados às alterações em regiões não codificadoras, mas de importância na expressão gênica.

As mutações que condicionam o fenótipo talassêmico são muitas e interferem na produção de globina em nível de transcrição, processamento do RNAm, tradução , ou mesmo após a tradução da cadeia afetada. A medida que novas técnicas de análises foram tornando-se disponíveis, um número crescente dessas diferentes alterações puderam ser identificadas: deleções gênicas, mutações em regiões promotoras, mutações que afetam o processamento do RNAm, mutações no sítio de poliadenilação, mutações no codon de iniciação, mutações que determinam a terminação prematura (por mutações geradoras de codons que não codificam qualquer aminoácido, ou que alteram a matriz de leitura), mutações no codon de terminalização, e as geradoras de globinas altamente instáveis (SPRITZ & FORGET, 1983; COLLINS e cols, 1984; NIENHUIS e cols, 1984; ORKIN & KAZAZIAN, 1984; WEATHERALL e cols, 1985; HONIG & ADAMS III, 1986; STEINBERG, 1988; SCHWARTZ e cols, 1988; HIGGS e cols, 1989).

Embora seja conveniente classificar separadamente as condições talassêmicas daquelas que resultam em PHHF, há evidências de que muitos desses casos são formas de delta-beta talassemias. A maioria das talassemias pode ser definida laboratorialmente por estudos hematológicos, eletroforese de hemoglobina e quantificação de hemoglobinas A_2 e Fetal. A síntese de cadeias globínicas, adotada para os casos que apresentam dificuldades nas análises tradicionais, e a determinação molecular, altamente específica, permitem a caracterização dos

diferentes haplótipos. Os tipos de talassemias mais prevalentes em nosso país, com números que variam segundo a origem racial da população analisada, são as talassemias alfa e beta que se manifestam através das formas heterozigota, homozigota e interativas. (THEIN & WEATHERALL, 1987; BLACK, 1988; KLEMAN e cols, 1989; LINDEMAN e cols, 1991).

4.1. TALASSEMIA BETA

As talassemias beta constituem um grupo de alterações genéticas da síntese de hemoglobina extremamente diverso e que resulta na diminuição das cadeias de globina beta. Clinicamente há grande variabilidade com relação a sintomas e manifestações e essas condições são resultantes de fatores genéticos e adquiridos. A variabilidade clínica e hematológica sugere heterogeneidade genética, que é confirmada atualmente pela grande gama de mutações e alterações gênicas que originam as talassemias beta e cuja classificação pode ser realizada por análise de DNA. O complexo gênico das cadeias do tipo beta compreende uma extensão de aproximadamente 50 Kb, incluindo cinco genes funcionais e dois pseudogenes, e estão arranjados na sequência 5'-3', na mesma ordem em que são ativados durante as fases do desenvolvimento humano. Nas talassemias beta, o excesso de cadeias alfa pode combinar-se com cadeias delta e gama, contribuindo para o aumento das hemoglobinas A_2 e Fetal, respectivamente. Esses índices alterados são importantes ferramentas para o diagnóstico das talassemias beta. Deve-se salientar, no entanto, que o mecanismo gerador dessas afecções muitas vezes interfere na síntese de cadeia gama, podendo

envolver também o gene da cadeia delta (nas talassemias delta-beta), quando então permanecem inalterados ou diminuidos os níveis de Hb Fetal e/ou Hb A_2. A porcentagem de Hb A_2, porém, apresenta-se elevada em cerca de 95% dos casos de talassemia beta (BEUTLER, 1988).

A quantidade e intensidade desses achados clínicos e hematológicos dependem do genótipo (homozigoto ou heterozigoto), e do tipo de mutação; de fatores que tendem a restaurar o equilíbrio entre as cadeias de globina (associação com a talassemia alfa, aumento da produção de cadeias gama, capacidade de proteolizar as cadeias alfa em excesso); da ligação das mutações aos diferentes haplótipos; e do estado de saúde geral do indivíduo (MELIS e cols, 1983; WASI e cols, 1985; GONZALEZ-REDONDO e cols, 1988).

Há dois tipos principais de talassemias beta, identificadas por beta mais e beta zero, que refletem a redução ou a ausência de síntese das cadeias beta. As variações quantitativas na síntese da cadeia beta da globina e, consequentemente, na síntese da hemoglobina A e cadeias alfa livres, são responsáveis por parte da variabilidade clínica. A taxa normal de síntese de cadeias alfa resulta no seu acúmulo nos glóbulos vermelhos durante a eritropoese, entretanto elas se tornam insolúveis, instáveis e não formam tetrâmeros entre si. Sua precipitação dentro das células danifica a membrana, destruindo prematuramente os glóbulos vermelhos e provocando anemia. Tentando equilibrar essa perda, a eritropoese é aumentada na medula, mas grande parte do processo é ineficaz, e os glóbulos vermelhos são destruidos ainda na fase de desenvolvimento, sem terem sido liberados para a circulação periférica (WEATHERALL &

CLEGG, 1981)

A causa exata da destruição acelerada intramedular de células eritróides e a curta vida dos glóbulos vermelhos periféricos, não estão totalmente esclarecidos. Apesar disso, há hipóteses de que as cadeias alfa livres possam acumular-se nas talassemias beta e exercer efeito prejudicial sobre a membrana do glóbulo, modificando sua permeabilidade e elasticidade. As mitocôndrias de eritroblastos ficam carregadas de ferro e existe a possibilidade de que esse fato afete a atividade do ATP, promovendo destruição intramedular (SCHRIER & MOHANDAS, 1992). A presença de hemoglobina oxidada associada às proteínas de membrana, compromete a estabilidade do glóbulo através de um "estresse oxidativo" desempenhando importante papel na hemólise dessas células. Os mecanismos que facilitam a oxidação, via formação de radicais livres, são multifatoriais e resultam da presença de cadeias livres, alto conteúdo intracelular de ferro e baixa concentração de hemoglobina normal nos glóbulos (SCHRIER e cols, 1989; SHINAR & RACHMILEWITZ, 1990; ATHANASIOV e cols, 1991; ADVANI e cols., 1992 a; ADVANI e cols., 1992 b).

O desequilíbrio da síntese de cadeias que se verifica nas talassemias faz com que os glóbulos vermelhos apresentem um aumento de superfície em relação ao volume da célula, e também aumento na rigidez da membrana. Em meio hipertônico os glóbulos de talassêmicos diferem significativamente daqueles pertencentes a não talassêmicos, sugerindo que a rigidez do glóbulo de talassêmicos é influenciada, não somente pela viscosidade citoplasmática determinada pela concentração de hemoglobina na célula, mas também pela interação entre cadeias livres e membrana. Esse processo, obviamente é diferente quando se

considera o tipo de talassemia, alfa ou beta, pois a diferença fisiopatológica dessas formas de talassemias pode estar relacionada ao tipo de cadeias livres na célula (SCHRIER e cols, 1989; SCHRIER & MOHANDAS, 1992).

O excesso de cadeias alfa livres na talassemia beta não se acumula totalmente no citoplasma e membrana da célula talassêmica, sendo removido de alguma forma. Algumas hipóteses para essa remoção são levantadas, tais como: um processo rápido de troca entre as cadeias recém-sintetizadas e as já existentes, e através de um processo mais lento, onde a troca ocorreria entre as cadeias recém-sintetizadas e as já existentes, com constituintes de um grupo localizado no retículo endoplasmático dos reticulócitos talassêmicos. O retículo ficaria sobrecarregado com o excesso de cadeias alfa retiradas do citoplasma, o que causaria alteração progressiva de suas propriedades físico-químicas. Com o tempo o retículo endoplasmático desapareceria da célula e com ele as cadeias alfa livres excedentes. E por fim, um outro processo de remoção seria a digestão proteolítica do excesso de cadeias alfa na talassemia beta (SCHRIER & MOHANDAS, 1992).

O modo de herança das talassemias, assim como de outras alterações genéticas da hemoglobina, é autossômico, e o termo dominante ou recessivo é dificil de ser aplicado, porque alguns heterozigotos apresentam claros distúrbios clínicos, ao passo que outros não. No entanto, a talassemia beta é considerada de herança autossômica recessiva, porque são necessários dois genes anormais da globina beta para produzir o fenótipo clinicamente detectável. Recentemente, no entanto, formas dominantes de talassemia beta têm sido identificadas, as quais resultam em

fenótipos de talassemia intermédia para portadores de um único gene alterado (THEIN, 1992; KAZAZIAN e cols, 1992). A tabela 3 ilustra 16 alelos dominantes de talassemia beta que foram caracterizados molecularmente.

4.1.1.- TALASSEMIA BETA HOMOZIGOTA

A talassemia beta homozigota, geralmente denominada talassemia beta maior, é o resultado do estado homozigoto, tanto do tipo beta mais quanto do tipo beta zero ou, em casos mais raros, de um componente heterozigoto de beta mais/beta zero talassemia. A ausência ou deficiência acentuada na produção de cadeias beta causa anemia grave devido à hemólise intramedular, especialmente no baço. As crianças afetadas pela talassemia beta homozigota padecem de anemia no primeiro ano de vida, à partir do período em que a produção de cadeias beta se estabiliza por volta do oitavo mês, e o resultado do desequilíbrio de síntese se manifesta por efeitos fisiopatológicos. Muitos dos doentes afetados morrem na infância ou adolescência, podendo, entretanto, alcançar a terceira década, conforme a atenção médica e a terapêutica recebidas. Destaca-se, porém, que as principais causas de óbito são infecções ou insuficiências cardíacas, devido à deposição de ferro no miocárdio e em vasos sanguíneos (ZURLO e cols, 1989). O acúmulo de ferro é decorrente da extensa e prematura destruição dos eritrócitos, tanto daqueles que são continuamente produzidos para suprir a anemia hemolítica, quanto dos recebidos em transfusões sanguíneas frequentes e necessárias, bem como da absorção gastrintestinal aumentada do ferro recebido pela dieta alimentar (MAGRO e cols, 1990; GOLDFARB e cols, 1990).

O padrão de hemoglobinas nos pacientes com talassemia beta homozigota é variável, caracterizando-se pelo aumento de Hb Fetal, com concentrações que variam de 60 a 90%. A Hb A_2 pode estar normal ou elevada e a Hb A aparece somente nos casos de deficiência parcial da síntese de cadeias beta (NAOUM e cols, 1979). As crianças que não recebem tratamento adequado desenvolvem o quadro clínico típico da talassemia beta maior, que inclui, além da anemia grave, deformidades ósseas devidas à hiperplasia medular, hepatoesplenomegalia, pigmentação marrom da pele, distúrbios cardíacos e endócrinos, atraso no crescimento e na maturação sexual, infecções recorrentes e deficiência de ácido fólico. Por isso, para garantir a sobrevida dos pacientes, é necessário um tratamento contínuo que consiste em transfusões sanguíneas regulares, as quais mantêm um nível de hemoglobina adequado e diminuem a atividade da medula óssea, e no uso de quelantes do ferro para ajudar a eliminar o excesso desse metal no organismo (CAO e cols, 1990).

4.1.2.- TALASSEMIA BETA HETEROZIGOTA

O estado heterozigoto da talassemia beta é caracterizado geneticamente pela herança de um único componente alterado. Nas formas beta zero e beta mais, a redução da taxa de síntese da globina beta é menor, mas o suficiente para causar discreto grau de anemia microcítica e hipocrômica com aumento de resistência osmótica dos glóbulos vermelhos. São indistinguíveis por exames laboratoriais de rotina; entretanto, com a utilização de técnicas de síntese de cadeias ou de biologia molecular com sondas de DNA, pode-se diferenciar esses heterozigotos.

Tabela 3. Alelos dominantes para talassemia beta. Modificada de THEIN, 1992.

VARIANTE BETA	MUTAÇÃO	GRUPO ÉTNICO
1.Substituição de uma base		
Hb Chesterfield*	Beta 28 (CTG-CGC)Leu-Arg	Ingleses
Hb Cagliari*	Beta 80 (CTG-GAG)Val-Glu	Italianos
Hb Terra Haute#	Beta 106(CTG-CGC)Leu-Arg	Europeus
Hb Showa-Yakushiji	Beta 110(CTC-CCG)Leu-Pro	Japoneses
Hb Houston	Beta 127 Gln-Pro	Italianos
2.Deleção de codons intactos - desestabilização		
Hb Korea*	Beta 32-34 (-GGT)Val.Val-Val	Coreanos
Hb Gunma	Beta 127/128 (-AAG)Gln.Ala-Pro	Japoneses
Beta 134-137	(-12 + 6)Val.Ala.Gly.Val-Gly.Arg	Portugueses
3.Terminalização prematura		
Beta zero 121 GAA-TAA	Beta 121 (Glu-Term)	Europeus
Beta zero 127 CAG-TAG	Beta 127 (Gln-Term)	Ingleses
4.Cadeia beta alongada		
Hb Agnana*	Beta 94 (+ TG) -156aa	Italianos
Hb Manhattan	Beta 109 (-G) -156aa	Judeus
Hb Geneva	Beta 114 (-CT + G) -156aa	Suiços e Franceses
Hb Makabe	Beta 123 (-A) -156aa	Japoneses
Hb Vercelli*	Beta 126 (-T) -156aa	Italianos
Beta F/S 128	Beta 128 (-4,+5,-11) -153aa	Iranianos

* Descrita inicialmente como Hb Indianápolis Beta 112 Cys-Arg; # Mutação *De Novo*; Modificado de THEIN, 1992.

Muitas vezes a doença é mal diagnosticada e os pacientes são tratados inadequadamente, como se apresentassem anemia por deficiência de ferro. Laboratorialmente, as formas de talassemia beta mais ou beta zero caracterizam-se pelo aumento de Hb A_2, cuja concentração varia de 3,5 a 7,5%, alterações morfológicas dos eritrócitos identificados especialmente por microcitose e hipocromia, resistência osmótica aumentada, diminuição da hemoglobina corpuscular média (HCM) e do volume corpuscular médio (VCM). A Hb Fetal pode estar normal ou discretamente aumentada. As manifestações clínicas, quando presentes, variam entre os diferentes grupos raciais, e entre elas podemos citar astenia, cansaço e baço palpável (LEWIS e cols, 1982). A artrite também pode ser constatada na talassemia beta heterozigota (GERSTER e cols, 1984). Os níveis de ácido fólico e vitamina B12 plasmáticas apresentam-se dentro dos limites normais em talassêmicos beta heterozigotos (SILVA & VARELLA-GARCIA, 1989).

Segundo Rund e cols, 1992, o grau de redução dos valores de VCM está diretamente relacionado ao tipo de mutação, ou seja, talassemia beta mais ou beta zero. A forma beta zero apresenta valores de VCM mais baixos que a beta mais. Para heterozigotos, a análise de VCM é um parâmetro usado para rápida identificação de mutantes em populações com grande diversidade mutacional, podendo ser utilizado em diagnóstico pré-natal. Duas hipóteses são propostas para tentar explicar essa correlação: 1) VCM é uma característica fenotípica diretamente relacionada ao genótipo podendo servir de guia para priorizar mutações quando são testados heterozigotos para algumas mutações específicas.2) muitos fatores, no entanto, podem influenciar as taxas de VCM e,

dessa forma, as causas de sua diminuição devem ser pesquisadas para que se possa correlacionar VCM com haplótipo para talassemia beta.

4.1.3.- TALASSEMIA INTERMEDIA

As formas clínicas denominadas por talassemia intermédia são aquelas resultantes de diferentes interações genéticas, cujos portadores apresentam um quadro clínico mais ameno que o da talassemia beta maior e não são dependentes de transfusão sanguínea. A talassemia beta intermédia pode decorrer da interação das talassemias alfa e beta, com redução concomitante de ambas as cadeias globínicas, o que diminui o número de cadeias desemparelhadas e propicia uma redução na taxa de destruição dos eritrócitos em comparação com as formas graves de talassemias. A talassemia beta intermédia pode decorrer também, de interações da talassemia beta com alguns tipos de hemoglobinas variantes, particularmente a Hb E, Hb S e Hb C (WEATHERALL & CLEGG, 1981; W.H.O., 1982).

4.1.4. BASE MOLECULAR DA TALASSEMIA BETA

A análise dos haplótipos do gene da globina beta e a determinação dos sítios polimórficos têm sido úteis para o estudo da epidemiologia dos genes globínicos anormais, com relações antropológicas, delineando os efeitos epistáticos nas doenças genéticas desses genes (NAGEL & RANNEY, 1990).

Mais de 80 pontos de mutação causando talassemia beta foram bem caracterizados, resultando num déficit de cadeias beta

que varia de mínima (alelos beta mais) à ausência completa (alelos beta zero). Heterozigotos, incluindo os portadores de alelos beta mais e beta zero, são clinicamente assintomáticos, ao passo que os homozigotos, ou portadores de componentes heterozigotos associados apresentam sintomas evidentes, acompanhados de quadros hematológicos muito alterados, e são dependentes de transfusão. Variações de ordem clínica e hematológica são observadas, conforme a origem racial do portador (THEIN, 1992).

Grande parte das talassemias beta é determinada por mutações que afetam um pequeno número de pares de bases e interferem na transcrição, processamento, transporte, estabilidade e tradução do RNAm, ocorrendo também, casos de variantes de cadeias polipeptídicas, dentre as quais podemos citar:

a) Mutações que afetam a transcrição - concentram-se na substituição de nucleotídeos no "TATA box" e nas sequências CACACC distal e proximal todos na região promotora 5' do gene beta. Estão geralmente associadas a fenótipos moderados com início de transcrição reduzido. Variações étnicas dos fenótipos são observadas e provavelmente são influenciadas pela presença ou ausência de um nucleotídeo na região promotora (KAZAZIAN, 1990). A amplificação gênica por PCR pode ser útil não só para o diagnóstico das talassemias, mas também para estudos de expressão gênica em nível transcricional, pois fornece taxas de RNAm específico dez vezes maior que o normal (HUANG e cols, 1991).

b) Mutantes que alteram o RNAm - as mutações que afetam a estabilidade do RNAm podem estar tanto em alterações no capuz da extremidade 5' como na região de clivagem do RNAm e no sinal de

poliadenilação AATAAA da extremidade 3'. As mutações no capuz que alteram o primeiro resíduo, afetam a função do RNAm reduzindo a transcrição e retardando o processo de formação do capuz, alterando dessa forma a estabilidade do RNAm. Do mesmo modo, mutações na extremidade 3' reduzem acentuadamente a clivagem do RNAm, produzindo moléculas mais longas e instáveis (KAZAZIAN, 1990). Metodologias para determinação das taxas de RNAm fornecem novas e simplificadas formas de diagnóstico para as síndromes talassêmicas, e avaliação da expressão gênica à nível transcricional (HUANG e cols, 1991; TRIFILLIS e cols, 1991).

c) Mutações que afetam a tradução - a talassemia beta pode ser também originada por mutações sem sentido, que formam codons de terminalização na região codificadora interrompendo a tradução, e por mutações de sentido errôneo, originando codons para aminoácidos alternativos, como por exemplo as Hb beta-Indianápolis e beta-Showa-Yakishyi, com alterações nos aminoácidos 112 e 110, respectivamente. Essas cadeias são degradadas logo após sua síntese devido à sua grande instabilidade, acarretando um estado muito similar ao produzido por redução de cadeias beta (KAZAZIAN, 1990). Sete dos 91 alelos, afetam a tradução do RNAm da globina, sendo tanto em relação às sequências sem sentido que determinam a tradução, como em inserções, deleções e mutações **"de novo"** (ANTONARAKIS e cols, 1985).

d) Deleções produzindo talassemia beta - Um grande número de deleções afetando o gene beta da globina tem sido observadas; muitas envolvendo os genes delta e beta simultaneamente, como em alguns casos de PHHF e talassemia delta-beta. A deleção mais comum remove 619 pares de bases do intron 2, do exon 3 e da

sequência 3' do gene beta. Outras possuem particular interesse porque deixam o gene beta intacto e sua expressão silenciosa, mas são raros. A figura 8 ilustra algumas deleções do gene beta (ANTONARAKIS e cols, 1985; KAZAZIAN, 1990).

As duas principais hemoglobinas presentes na talassemia beta, são as Hb A_2 e Hb Fetal, que apresentam importância para o direcionamento diagnóstico.

4.1.5.- HEMOGLOBINA FETAL ($alfa_2$ $gama_2$)

Em indivíduos normais, é uma mistura de duas espécies moleculares, onde as cadeias gama podem possuir glicina ou alanina na posição 136 da cadeia. Em crianças heterozigotas para variantes anormais da Hb Fetal, a cadeia anormal possui um ou outro aminoácido na posição 136, sugerindo, provavelmente, que na escala evolutiva já havia dois locos distintos para cadeia gama. Esse fato tem sido confirmado atualmente por técnicas de mapeamento genético e hibridização de DNA. Variações são observadas também, na taxa de síntese de cadeias gama glicina e gama alanina, em diferentes grupos raciais e em associação com outras hemoglobinopatias, influenciando seus fenótipos (WEATHERALL & CLEGG,1981).

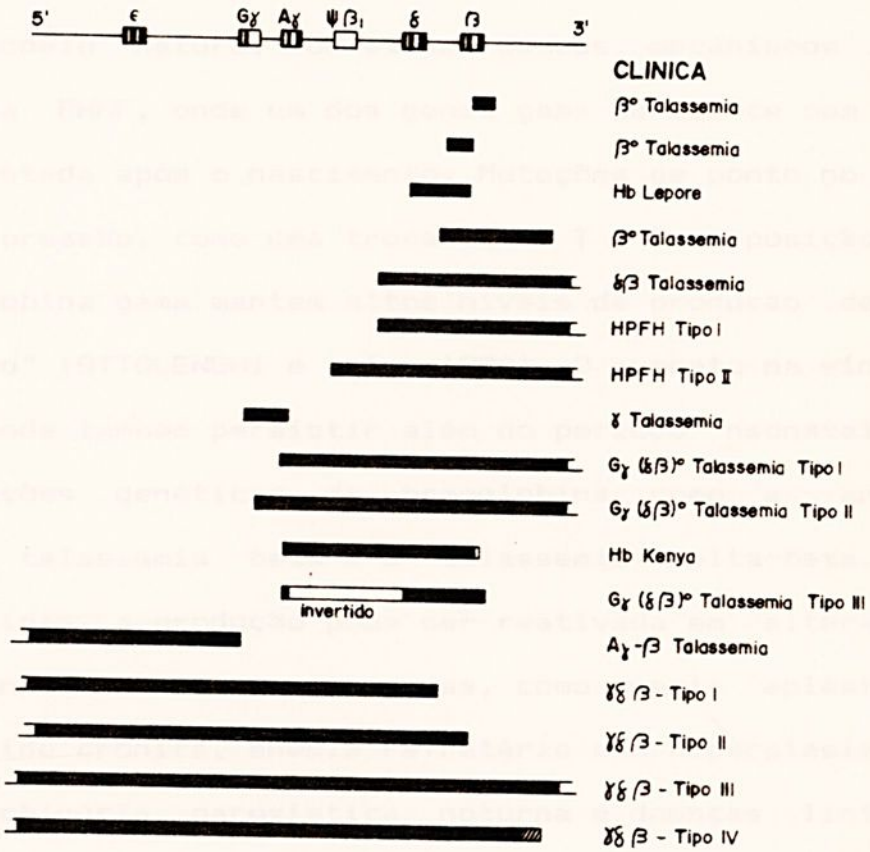


FIGURA 8 - Deleções no complexo gênico beta. Segundo ANTONARAKIS e cols, 1985.

No desenvolvimento humano, as cadeias globínicas fetais (gama) são substituidas por cadeias beta e delta, logo após o nascimento. Os mecanismos moleculares atuantes nessa troca de cadeias são ainda desconhecidos. O entendimento desses mecanismos seria de grande valia para a manutenção dos níveis de produção de Hb Fetal elevados em portadores de outras hemoglobinopatias, notadamente na anemia falciforme, o que minimizaria seus quadros clínicos (CHARACHE e cols, 1991).

Um modelo natural de estudo desses mecanismos é o entendimento da PHHF, onde um dos genes gama permanece com sua expressão aumentada após o nascimento. Mutações de ponto no gene promotor da expressão, como uma troca entre T e C na posição 175 do gene da globina gama mantem altos níveis de produção de Hb Fetal **"in vitro"** (OTTOLENGHI e cols, 1990). O aumento na síntese de Hb Fetal pode também persistir além do período neonatal em certas alterações genéticas da hemoglobina como a anemia falciforme, a talassemia beta e a talassemia delta-beta. Em doenças adquiridas, a produção pode ser reativada em alterações que são acompanhadas de desieritropoese, como anemia aplástica, leucemia mielóide crônica, anemia refratária com hiperplasia de medula, hemoglobinúria paroxística noturna e doenças linfo e mieloproliferativas (SHIMIZU e cols,1988; GOMES e cols,1988).

A gravidade da talassemia beta pode ser significativamente modificada pela associação de talassemia alfa, devido a não exacerbação do desequilíbrio entre as sínteses de globina alfa e beta. Talassemia beta homozigota, não dependente de transfusão, geralmente está associada a defeitos no gene alfa. O mesmo pode ocorrer em pacientes com doença de Hb H que têm quadro clínico minimizado pela presença de talassemia beta (WEN &

LIANG, 1992).

O estudo da regulação dos genes da globina humana tem sido grandemente facilitado, pelo elevado número de linhagens de células leucêmicas, que expressam esses genes de modo regulado, e que estão disponíveis para cultura. Uma dessas linhagens é a K562, retirada de pacientes com leucemia mielóide crônica, e que expressa alguns marcadores de diferenciação eritróide, entre eles a hemoglobina. A expressão dos genes para globina nessas células está aumentado quando a cultura é submetida a agentes indutores como o heme, a hidroxiuréia e o butirato de sódio. Os fenótipos que essa linhagem expressa, na situação induzida, são as cadeias embrionárias - épsilon e zeta, as fetais - gama,e as adultas - alfa e delta. As cadeias beta não aparecem e nem seus respectivos RNAm, mas com a clonagem desse gene em células HeLa observou-se sua expressão, fornecendo dados para o estudo da regulação desse gene. O promotor da globina beta mostrou ser completamente inativo em células K562, sugerindo que o desenvolvimento de fatores atuantes nessa linhagem é embrionário e fetal, e não sendo favorável para a expressão do gene beta adulto. No entanto, o gene delta, que tem pouca expressão nas células eritróides nos períodos fetal e adulto, é expresso em níveis detectáveis na linhagem estudada. Sugere-se então, que a ativação do gene beta é resultado de variações no desenvolvimento da célula, sendo um modelo útil para o estudo de fatores que envolvam a regulação e expressão de gene da globina (MOOKERJEE e cols, 1992).

Os mecanismos responsáveis pela expressão seletiva dos diferentes genes da globina em distintas fases do desenvolvimento, têm sido sujeitos de intensos estudos nas duas últimas décadas, e três caminhos têm sido particularmente úteis

para esses estudos :

a) O uso de sondas para o entendimento da regulação de genes normais, decorrentes de alterações de hemoglobina como a PHHF e talassemia delta-beta;

b) Uso de linhagens celulares disponíveis para estudo, que manifestam um padrão induzido de síntese de hemoglobinas, como por exemplo a K562, como modelo de regulação gênica;

c) Sistemas experimentais em camundongos transgênicos, usados com sucesso para o estudo de regulação e troca de genes da globina nos diferentes estágios do desenvolvimento (LEY, 1991; MOOKERJEE e cols, 1992; DOVER, 1992).

Estudos anteriores usando populações mistas de célula de medula, para atuação de drogas que ativariam a produção de cadeias globínicas, sugeriram que a Ativina A influencia a proliferação celular e síntese de DNA, através da mediação de células acessórias, afetando diretamente o nível de RNAm para globina e o seu produto durante o desenvolvimento de células eritróides humanas (SHAO e cols, 1992; FRIGON e cols, 1992; DOVER, 1992).

4.1.6.-A HEMOGLOBINA A_2 ($alfa_2$ $delta_2$)

A hemoglobina A^2 (Hb A_2) é formada por duas cadeias alfa e duas cadeias delta, e aparece em indivíduos normais com taxas variáveis entre 2% e 3,5% do total de hemoglobinas (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974).

O estudo da Hb A_2 fornece dados dentro da evolução e filogenia dos genes globínicos e favorece o entendimento da expressão gênica e síntese de globina, além de ser de substancial

relevância clínica (STEINBERG & ADAMS III, 1991).

Os genes de globina delta encontram-se no braço curto do cromossomo 11, no complexo dos genes tipo beta. Redução ou ausência de produção do gene delta origina a talassemia delta, cuja relevância clínica reside no fato de que, quando aparece em associação com talassemia beta, o fenótipo resultante é caracterizado por níveis de Hb A_2 dentro dos valores normais, dificultando o diagnóstico dos portadores de talassemia (MOI e cols, 1992).

Existe grande homologia entre os genes delta e beta, com relação à composição de aminoácidos (apenas 10 aminoácidos diferentes entre uma cadeia e outra), e a estabilidade dessas duas moléculas parecem ser identicas. No entanto, as cadeias delta são sintetizadas em uma taxa reduzida na medula, e um pouco menos nos reticulócitos. Assim, há um progressivo decréscimo na síntese de cadeias delta em relação ao aumento da maturidade das globinas beta. A meia vida dos RNAm para cadeia delta é uma vez e meia menor que a do RNAm para cadeia beta (HONIG & ADAMS III, 1986), sugerindo que a taxa de transcrição do gene delta é menor que a do gene beta (STEINBERG & ADAMS III, 1991).

As propriedades funcionais da Hb A_2 são semelhantes à da Hb A, com relação à afinidade ao oxigênio, efeito Bohr e cooperatividade, e resposta ao 2,3 DPG. A estabilidade termica é maior que a da Hb A e a Hb A_2 inibe a polimerização da Hb S. A cadeia delta da Hb A_2 possui duas cargas positivas adicionais quando comparada à cadeia beta da Hb A, fato que facilita sua separação por métodos eletroforéticos e cromatográficos.

A porcentagem da Hb A_2 pode ser afetada por fatores genéticos e ambientais, como por exemplo a deficiência de ferro,

doenças hematológicas, e em várias doenças adquiridas, como malária, hipertireoidismo e Doença de Chagas (WASI e cols, 1968; ISAACS, 1972; ALPERIN e cols, 1977; WILLCOX e cols, 1979; KRISHNAMOORTHY e cols, 1982; CODRINGTON e cols, 1990; DOMINGOS e cols, 1991).

Aumentos nos níveis de Hb A_2 são característicos de talassemias beta heterozigotas, em casos raros de talassemia delta, e de alguns grupos raciais.

A diminuição dos níveis de Hb A_2 geralmente estão associadas à deficiência de ferro e à redução das taxas de síntese do gene delta, e os fatores que influenciam essa redução podem estar atuando em vários pontos como, por exemplo, na iniciação da cadeia. Para as alterações genéticas com diminuição de Hb A_2, a talassemia alfa é a mais característica, sendo seguida das talassemias delta e algumas variantes dessa cadeia. Em doenças linfo e mieloproliferativas, os efeitos da redução de síntese podem ocasionar um fenótipo semelhante ao da doença de Hb H (GOMES e cols, 1988). Essas "talassemias alfa adquiridas" formam um elo de ligação entre a Hb A_2 diminuida e as anormalidades genéticas. A linhagem eritróide está envolvida, assim como sua regulação e expressão gênica. A tabela 4 ilustra as causas de redução dos níveis de Hb A_2.

Anomalias genéticas que afetam somente o gene delta, não têm grande significado clínico para seu portador, mas contribuem para o entendimento dos genes tipo beta. Os níveis de Hb A_2 são uteis para informações diagnósticas e elucidação de mecanismos de regulação (STEINBERG & ADAMS III, 1991).

Tabela 4. Causas da redução dos níveis de Hb A_2. Segundo STEINBERG & ADAMS III, 1991, com modificações.

Redução da síntese de globina delta
Período neonatal
Talassemias delta
Talassemias delta-beta e gama-delta-beta
Hb Lepore
Variantes de cadeia delta
Redução de Hb A_2 por dificuldade de tetramerização
Genéticas
Talassemias alfa
Adquiridas
Deficiência de ferro
Envenenamento por chumbo
Anemia sideroblástica
Doenças mieloproliferativas

4.2. PERSISTENCIA HEREDITARIA DE HEMOGLOBINA FETAL

A persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) compreende um grupo de condições nas quais são encontrados níveis elevados de hemoglobina Fetal em adultos, na ausência de estresse eritropoético. As formas mais comuns estão associadas com grandes deleções que ocorrem dentro do grupamento das globinas beta. Entretanto, permanece ainda inexplicado o motivo pelo qual deleções aparentemente similares determinam, ora uma talassemia delta-beta, ora uma PHHF (embora as PHHF possam incluir um componente talassêmico, e as talassemia delta-beta revelar um aumento na produção de Hb Fetal)(ORKIN & KAZAZIAN, 1984). Uma possibilidade é a união de sequências de DNA normalmente distantes, decorrentes dessas deleções, que possa criar novas relações funcionais nesse grupamento gênico, alterando a expressão dos genes de globina restantes. Essa hipótese é fundamentada nos achados de deleções nas PHHF que tendem a estender-se bem mais além da extremidade 3' do gene de globina beta, do que as deleções que determinam as talassemias delta-beta (HONIG & ADAMS III, 1986). Outra hipótese é a de que essas deleções possam alterar a conformação da cromatina e interferir na expressão do gene para a globina gama. Nesse caso, diferentes deleções teriam um ou outro efeito, segundo suas posições e tamanho. Nas formas oriundas de deleção, a expressão continuada de Hb Fetal ocorre em todos os eritrócitos durante a vida adulta (PHHF pancelular), enquanto na talassemia delta-beta o fenótipo talassêmico mostra-se mais pronunciado e está associado à expressão clonal dos genes de globina fetal durante a vida adulta (SCHWARTZ e cols, 1988). Nesses tipos de PHHF, os adultos

heterozigotos apresentam níveis de HbF entre 5% e 30% da Hb total, enquanto que os homozigotos para a variante Negro podem expressar até 100% essa hemoglobina (WEATHERALL, 1983).

Em outra classe de PHHF, os níveis de Hb Fetal são mais baixos, e sua distribuição intraeritrocitária é irregular (PHHF heterocelular). Trabalhos recentes de caracterização molecular identificaram substituições de uma única base nas regiões promotoras dos genes gama alanina (4 mutações), às quais são atribuidos os fenótipos característicos (DONALD e cols, 1988; METHERALL e cols, 1988; GILMAN e cols, 1988). Para alguns tipos de PHHF heterocelular permanece desconhecida e/ou contraditória a determinação da alteração molecular que lhes deram origem. A PHHF do tipo Suiço, que determina um nível de Hb Fetal de 1 a 3% da Hb total é um exemplo bastante discutido e ocorre com frequências de 1 a 2% em diferentes populações. A partir das análises de ligação da PHHF do tipo Suiço com a talassemia beta e com a Hb S, foi proposto que os genes reguladores dessa condição estão ligados, mesmo que de forma não muito estreita, ao complexo gênico de globinas beta, enquanto muitos outros estudos sugerem uma grande distância do mesmo, no próprio cromossomo 11 ou em outro qualquer. Existem também, fortes evidências de um padrão de herança dominante e ligado ao cromossomo X, nessa condição. Assim, a PHHF do tipo Suiço, que em heterozigose com HbS ou talassemia beta pode determinar níveis mais elevados de Hb Fetal (8 a 12%), pode ser uma entidade geneticamente heterogênea (MYIOSHI e cols, 1988).

Nas formas gama glicina/beta mais de PHHF e PHHF do tipo Grego, a típica diminuição da síntese de hemoglobina adulta que acompanha o aumento da produção de Hb Fetal são, ambas,

resultantes da única mutação encontrada nas regiões promotoras do gene gama, a -202 de gama glicina e a -117 de gama alanina, respectivamente.

As síndromes de PHHF apresentam um curso clínico essencialmente benigno, com ausência de anormalidades hematológicas significantes. Em alguns casos, podem assumir expressões muito discretas de uma talassemia, com a típica diminuição da síntese de cadeias beta que, ocasionalmente, vem acompanhada de visível sub-hemoglobinização e microcitose eritrocitária (HONIG & ADAMS III, 1986). Por outro lado, o quadro clínico de algumas hemoglobinopatias (como a Hb S ou a talassemia beta) pode ser atenuado pela coexistência, no genoma do indivíduo, de um determinante para PHHF, pelo simples aumento da síntese de cadeias gama. Na verdade, em muitas ocasiões tem-se verificado que a herança de um determinante de PHHF resulta em níveis de Hb Fetal ainda mais elevados nessas associações do que quando herdados isoladamente (HONIG & ADAMS III, 1986).

4.3.- TALASSEMIA ALFA

Em 1955, foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos e Grécia, uma nova hemoglobina rápida que chamaram de Hb H, com características instáveis, formando corpúsculos de inclusão nos eritrócitos e visualizados quando submetidos a incubação e coloração vital. Esses achados constantemente estavam associados a alterações morfológicas dos eritrócitos, afastadas as possibilidades de que a anemia microcítica e hipocrômica fosse devido à deficiência de ferro. A identificação de que a Hb H era composta por tetrâmeros de cadeia beta, realizada por técnicas de

hibridização e por análises bioquímicas, sugeriu que se tratava de uma patologia causada por defeito nos genes alfa. A Hb H tem afinidade ao oxigênio dez vezes maior que a Hb A, ausência de efeito Bohr e liga-se ao cromo mais rapidamente que a Hb A. Os portadores dessa patologia, denominada doença de Hb H, apresentam anemia significativa, hipocromia, microcitose e poiquilocitose, diminuição da fragilidade osmótica, reticulocitose e presença de Hb H nos eritrócitos e em eletroforese (WILLIAMS e cols, 1972).

Em 1965, tornou-se possivel medir a taxa de síntese de cadeias alfa e beta e visualizou-se então um progressivo decréscimo de cadeias alfa nos portadores de talassemia alfa, doença de Hb H e hidropsia fetal, respectivamente. Mesmo assim era difícil diferenciar, com as técnicas disponíveis para diagnóstico, os portadores de talassemia alfa dos não talassêmicos, principalmente nas formas brandas dessa talassemia.

A genética molecular da talassemia alfa foi prejudicada no início, em grande parte, pelo desconhecimento do número de genes alfa presentes no indivíduo normal. Baseados, então, na observação de mutantes estruturais para o gene alfa, foi sugerido que o número de locos para esta cadeia globínica, em indivíduos normais, fosse de 4 (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974). Outras observações sugeriam também, a existência de polimorfismo para o número de genes alfa em indivíduos aparentemente normais (RUCKNAGEL e cols, 1978).

A questão foi resolvida com o advento dos cDNA específicos. Indivíduos normais possuem 4 genes alfa e as formas de talassemia alfa são resultantes da deficiência de um, dois, três e quatro genes alfa. Análises por técnicas de hibridização mostraram posteriormente que os quatro genes alfa encontram-se

dois em cada cromossomo 16 (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974).

Na década de 80, a genética molecular da talassemia alfa foi resolvida, mostrando que muitos defeitos genéticos diferentes podem ocasionar talassemias alfa e seus mutantes podem ser classificados em alfa mais ou alfa zero, para indicar se o gene está reduzido ou ausente (HIGGS e cols, 1989).

A aplicação da técnica de mapeamento genético tem tornado possível a detecção de defeitos que resultam em talassemia alfa em amostras de sangue de cordão umbilical (TRENT e cols, 1984).

4.3.1. CLASSIFICAÇÃO DAS TALASSEMIAS ALFA

As talassemias alfa são caracterizadas por células hipocrômicas e microcíticas. Um componente hemolítico adicional pode surgir quando há significativo grau de desequilíbrio entre as cadeias globínicas. Não há eritropoese ineficiente porque as cadeias em excesso formam tetrâmeros, gama 4 (Hb de Bart), beta 4 (Hb H) e delta 4 (HIGGS e cols, 1989). As Hb H e Hb de Bart são significativamente mais estáveis que os agregados de cadeia alfa, que aparecem na talassemia beta e não causam hemólise intramedular. Na verdade, eles se precipitam no eritrócito, provocando danos e retirada prematura da célula da corrente circulatória pelo SRE (sistema retículo endotelial), diminuindo assim, seu tempo de vida. Existe um mecanismo compensatório nos eritrócitos com Hb H para controlar o aumento de radicais livres, como resultado do excesso de cadeias beta (PRASARTKAEW e cols, 1986; LIEBHABER, 1989).

Genotipicamente, centenas de associações podem ocorrer e determinar talassemias alfa. Fenotipicamente essas interações resultam em uma das quatro amplas classificações: Portador silencioso; Traço de talassemia alfa; Doença de Hb H e Hidropsia fetal por Hb de Bart (W.H.O., 1987; HIGGS e cols, 1989; KAZAZIAN, 1990). O fenótipo da talassemia alfa reflete, de uma forma geral, a deficiência de tetrâmeros de hemoglobina funcionalmente normais, e o acúmulo das globinas excedentes resulta em dano e disfunção eritrocitária (LIEBHABER, 1989).

Portador silencioso

Apresenta três genes funcionais para a globina alfa, e valores de VCM dentro da normalidade (80-85). E originado pela perda de um único gene alfa e é a forma mais comum e amplamente difundida pelo mundo, sendo originada geralmente por uma deleção de 3,7Kb (LIEBHABER, 1989; KAZAZIAN, 1990).

Traço de talassemia alfa

Caracteriza-se por discretas alterações hematológicas, e por repercussão clínica nula a moderada. Essa condição resulta, em geral, da heterozigose para o determinante alfa zero, bem como da homozigose ou dupla heterozigose para o gene da talassemia alfa mais (originada por deleção ou não). Em aproximadamente 60% dos indivíduos com traço talassêmico alfa podem ser vistas, em número bastante reduzido, células contendo corpos de inclusão de Hb H (GALANELLO e cols, 1984; HIGGS e cols, 1989). Geralmente possui dois genes funcionais, valores de VCM discretamente diminuídos e Hb A_2 normal. E constantemente confundida com anemia por deficiência de ferro. A forma mais frequente para esse tipo de talassemia alfa é a homozigose para a deleção de 3,7Kb, resultando na perda de dois genes alfa. A Hb H dificilmente

aparece em eletroforese, e pode ser visualizada por pesquisa citológica detalhada (LIEBHABER, 1989; KAZAZIAN, 1990).

Doença de Hb H

Resulta mais frequentemente, da disfunção de três genes alfa, ou também associação de dois determinantes talassêmicos alfa mais, oriundos de mutações do tipo "não deleção" desses genes. Clinicamente, apresenta-se por anemia, icterícia, esplenomegalia e hepatomegalia. Os níveis de Hb H e Bart's são variáveis, e os de Hb A_2 reduzidos (KATTAMIS e cols, 1988; HIGGS e cols, 1989). E considerada a forma mais expressiva de talassemia alfa, compatível com a vida. A heterogeneidade na base genética da doença de Hb H está diretamente relacionada à sua gravidade clínica. A forma de deleção mais comum (- -/- alfa) é raramente sintomática. A perda de expressão do gene alfa 1 (classificação do gene segundo sua localização no cromossomo) por não deleção também é moderadamente sintomática. No entanto, a perda do gene alfa 2 por não deleção resulta em um fenótipo mais grave, com muitos pacientes dependentes de transfusão (LIEBHABER, 1989). Outras complicações que podem ocorrer em portadores da doença de Hb H é a presença de úlcera de perna, cálculos biliares, deficiência de ácido fólico, episódios hemolíticos agudos em resposta a drogas e infecções, bem como alterações ósseas e do crescimento (HIGGS e cols, 1989).

Síndrome de Hidropsia Fetal

A Síndrome de Hidropsia Fetal por Hb de Bart é a forma mais grave de talassemia alfa, ocasionada pela herança de dois determinantes talassêmicos alfa zero. Quase sempre a morte dos indivíduos com esssa afecção ocorre ainda no útero ou poucos dias após o nascimento. O feto ou o recém-nascido apresenta-se pálido,

edemaciado, com sinais de problemas cardíacos e de anemia intra-uterina prolongada . Há também, marcada anisopoiquilocitose, com grandes macrócitos hipocrômicos e muitas células nucleadas. A Hb de Bart compõe cerca de 80% da hemoglobina total e carece de qualquer função no transporte de oxigênio (HIGGS e cols, 1989). Em algumas partes do mundo, como no sudoeste da Asia, esta é uma importante causa de morte perinatal, envolvendo também considerável morbidade e mortalidade materna (CHUI e cols, 1988). Nesta região, a hidropsia fetal é por homozigose para a deleção ($--^{sea}$), com frequência de até 3% (LIEBHABER, 1989).

4.3.2. BASE GENETICA DAS TALASSEMIAS ALFA

O complexo de genes globínicos alfa humanos se localiza na extremidade do cromossomo 16 na região 16 p.13.3.

Um segmento de 26Kb de DNA contém os genes alfa e estende-se por um segmento de 150Kb para o grupo todo, sendo portanto, maior que 200Kb e rico em G e C. O complexo gênico inclui os genes alfa propriamente ditos, que aparecem em duplicata; um gene embrionário zeta 2; três pseudogenes - psi zeta 2, psi alfa 2 e psi alfa 1; e um gene com função ainda não muito bem determinada - o teta 1 . Todos estão arranjados na sequência 5' - 3', conforme ilustra a figura 9 . Recentemente, um pseudogene da família rô, de pequenos RNAs citoplasmáticos foi identificado abaixo de alfa 1, e um outro gene, semelhante ao teta, foi também localizado no cromossomo 22, porém suas funções não estão ainda bem definidas (HIGGS e cols,1989).

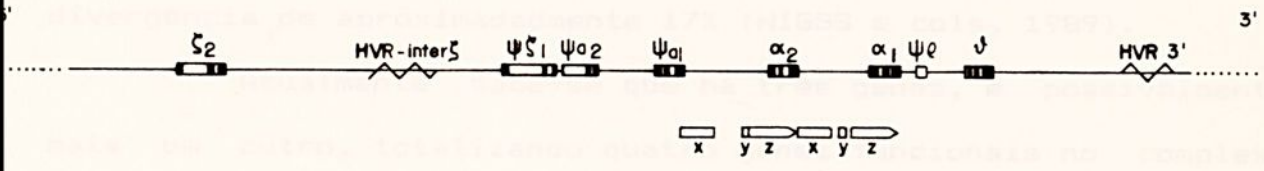


FIGURA 9. Arranjo gênico alfa no cromossomo 16. Segundo HIGGS e cols 1989. HVR = Regiões hipervariáveis.

A estrutura idêntica de dois alelos distintos da globina alfa e o alto padrão de homologia entre os locos alfa1 e alfa2, indicam que existem mecanismos para a supressão de polimorfismos alélicos e troca de informações genéticas no complexo gênico alfa (LIEBHABER e cols, 1981). As regiões complementares localizam-se entre os genes psi alfa1, alfa 2 e alfa 1 e são identificadas por X,Y e Z, conforme ilustra a figura 10. Os genes funcionais alfa e zeta apresentam 58% de homologia em seus 141 aminoácidos. Por outro lado, os genes alfa1 e alfa2, são homólogos e codificam proteínas identicas, diferindo somente no intron 2 na sua região não codificadora 3', sendo essa divergência de aproximadadmente 17% (HIGGS e cols, 1989).

Atualmente sabe-se que há três genes, e possivelmente mais um outro, totalizando quatro genes funcionais no complexo gênico alfa. O gene zeta 2 manifesta-se durante as primeiras cinco semanas de vida intra uterina, e a Hb Gower 1 (zeta2/epsilon2) é o primeiro tetrâmero de hemoglobina funcional no embrião, seguida da Hb Portland (zeta2/gama2). A partir da sexta semana de vida intra uterina a síntese de cadeias zeta decresce, ao passo que são ativados os genes alfa1 e alfa2, que estarão atuando durante o período fetal e adulto. O gene teta 1, localizado numa região de 4Kb, na extremidade 3' do gene alfa 1, é similar estruturalmente aos genes alfa. Esse gene é transcrito "in vivo" e codifica um RNAm normalmente processado e que foi traduzido "in vitro", mas o seu produto não foi, ainda, identificado "in vivo", bem como sua função que não parece ser essencial para o desenvolvimento fetal normal (LIEBHABER, 1989).

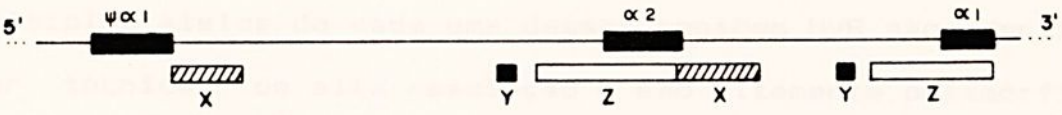


FIGURA 10. Blocos homólogos (X, Y e Z) nos genes alfa da globina humana. Segundo HIGGS e cols, 1989.

Em geral, os genes globínicos são compactos e divididos em três exons e dois introns. As posições dos introns são conservadas em todos os genes globínicos e refletem eventos evolutivos para chegar à proteína funcional. O exon 2, por exemplo, é responsável pela codificação de toda a região de ligação ao grupo heme e pelos contatos alfa1 beta2; o exon 3 codifica os contatos alfa1 beta1. Os resíduos que contribuem para o efeito Bohr e ligação ao 2,3 DPG são distribuidas ao acaso (HIGGS e cols, 1989).

Existem cinco regiões que separam os genes que fazem parte do complexo gênico alfa e são estruturalmente hipervariáveis (HVRs - Hypervariable regions). Cada uma dessas regiões é composta de múltiplos segmentos repetitivos de pequenas sequências ricas em GC, com tamanho variando de 17 a 57pb. Múltiplos alelos de cada uma dessas regiões HVR são identificados por técnicas de alta resolução e são altamente polimórficos em algumas populações, mas esses polimorfismos são neutros e não parecem apresentar consequência para a expressão dos genes alfa, até o momento (RUCKNAGEL e cols, 1978; LIEBHABER, 1989; HIGGS e cols, 1989).

A expressão do gene alfa2 é quase duas vezes maior que a do gene alfa1, existe uma produção maior de RNAm para o gene alfa2 e seus RNAs são traduzidos com igual eficiência. As mutações que originam as talassemias alfa podem afetar um ou os dois genes alfa. Assim, como o número de genes funcionais decresce de quatro para zero, a taxa de síntese de cadeias alfa/beta nos reticulócitos declina do valor normal de 1 para 0,8; 0,6; 0,2 e zero. As mutações que afetam o gene alfa2 apresentam-se fenotipicamente mais graves (GALANELLO e cols,

1984; EMBURY, 1988; LIEBHABER, 1989; HIGGS e cols, 1989; KAZAZIAN, 1990).

4.3.3.- DEFEITOS MOLECULARES NA TALASSEMIA ALFA

A talassemia alfa é mais comumente causada por deleção de um ou ambos os genes alfa. Esse processo pode ser originado por vários mecanismos, diferindo do que ocorre na talassemia beta onde predominam os defeitos moleculares originados por não deleção. Assim, alguns tipos de talassemia alfa são característicos de determinados grupos raciais.

Deleção de um único gene alfa - existem dois sub-tipos de deleção de um único gene alfa que resultam especialmente na perda de 3.7Kb ou de 4.2Kb de DNA. Ambos são resultado de recombinação desigual dos homólogos, como ilustra a figura 11. Algumas deleções podem remover sequências importantes para a ativação gênica e deixar os genes estruturais intactos, e o fenótipo expresso será de talassemia alfa silenciosa (HIGGS e cols, 1989; KAZAZIAN, 1990; ROMAO e cols, 1991; LACERRA e cols, 1991).

Deleção de ambos os genes alfa - Em adição às clássicas deleções envolvendo 3.7Kb e 4.2Kb, uma variedade de perdas de segmentos maiores ocorrem no complexo gênico alfa afetando a expressão gênica. Essas deleções variam de 5.2Kb até a remoção de todo o complexo. As duas mais comuns são $(- \text{--}^{sea})$ e $(- \text{--}^{med})$ que ocorrem mais frequentemente no Sudoeste Asiático e Meditarrâneo, respectivamente. Os mecanismos que originam essas grandes deleções ainda não foram muito bem elucidados.

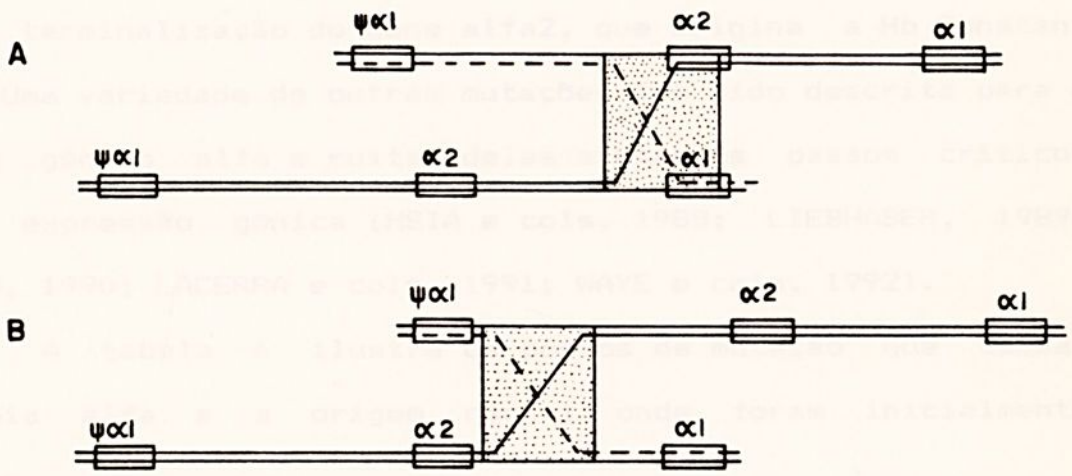


FIGURA 11.- Deleção de um único gene alfa por Crossing-over desigual originando deleções de 3.7Kb (A), e 4.2Kb (B). Segundo KAZAZIAN, 1990 com modificações.

A tabela 5 ilustra os genótipos das talassemias alfa mais frequentes originadas por mecanismos delecionais e sua expressão fenotípica (NIENHUIS e cols, 1984; HSIA e cols, 1988; LIEBHABER, 1989).

Talassemia alfa devido a não deleção - Existem até o momento 15 mutações que resultam em talassemia alfa, e incluem desde a substituição de um único par de bases até deleções muito pequenas. O exemplo mais comum é a mutação de uma única base no codon de terminalização do gene alfa2, que origina a Hb Constant Spring. Uma variedade de outras mutações tem sido descrita para o complexo gênico alfa e muitas delas afetam os passos críticos para a expressão gênica (HSIA e cols, 1988; LIEBHABER, 1989; KAZAZIAN, 1990; LACERRA e cols, 1991; WAYE e cols, 1992).

A tabela 6 ilustra os pontos de mutação que causam talassemia alfa e a origem racial onde foram inicialmente descritas.

A gravidade dos fenótipos de talassemia alfa estão diretamente relacionadas à perda de síntese do gene alfa e três grandes fatores podem estar envolvidos: número de genes afetados; o grau de decréscimo na expressão (parcial ou total); o quanto o gene afetado contribui para a síntese da globina alfa. Como o gene alfa2 é expresso duas vezes mais que o gene alfa1, alterações que afetam o gene alfa2 terão maior impacto fenotípico que aquelas que envolvam o gene alfa1. De modo geral, podemos dizer que a perda de um único gene alfa pode resultar em uma diminuição leve, moderada ou grave, da síntese de globina alfa dependendo de como ocorreu essa perda gênica (processos delecionais ou não) e qual locus foi envolvido, conforme ilustra a tabela 7 (LIEBHABER, 1989; HIGGS e cols, 1989; KAZAZIAN, 1990).

TABELA 5. - Genótipos e espressão clínica das talassemias alfa mais frequentes e seus respectivos mecanismos delecionais. Segundo HSIA e cols, 1988.

Genótipo	Espressão Clínica
(alfa alfa/alfa alfa)	normal
(- alfa/alfa alfa)	Traço de talassemia alfa 2
($alfa^{CS}$alfa/alfa alfa)	Portador silencioso
(- -/alfa alfa)	Traço de talassemia alfa 1
(- alfa/- alfa)	Anemia microcítica discreta
(- alfa/$alfa^{CS}$alfa)	
(- -/-alfa)	Doença de hemoglobina H
(- -/$alfa^{CS}$alfa)	Anemia microcítica moderada
(- -/- -)	Hidropsia Fetal por Hb de Bart

TABELA 6.- Total de mutações (15) na talassemia alfa e sua origem racial.Segundo LIEBHABER, 1989

MUTAçÕES	ORIGEM
I.RNAm não funcional	
a)mutações sem sentido	
1.codon 116 (G-T)	negros
b)mutações **frameshift**	
1.codon 30/31	negros
c)mutações no codon de iniciação	
1.ATG-ACG	mediterrâneos
2.CCACCATG-CCCCATG	mediterrâneos
3.ATG-GTG	negros/mediterrâneos
d)mutação no codon de terminalização	
1.alfa^{CS} da Hb Constant Spring (TAA-CAA)	negros
2.alfa^{KD} da Hb Koya Dora (TAA-TCA)	indianos
3.alfa^{IC} da Hb Icaria (TAA-AAA)	meditarrâneos
4.alfa^{SR} da Hb Seal RocK (TAA-GAA)	negros
II.Mutações que afetam o processamento do RNA	
a)alterações no sítio de "**splicing**"	
1.sítio doador IVS-1 (GGTGAGGCT-GGCT)	mediterrâneos
b)clivagem de RNA no sítio de poliadenilação	
1.AATAAA-AATAAG	árabes
III.Globinas instáveis	
1.alfa$^{QUONG\ SZE}$ (codon 125 LEU-PRO)	asiáticos
2.alfa$^{SUAN\ DOC}$ (codon 209,LEU-ARG)	asiáticos
3.alfa$^{PETAH\ TIKWAH}$ (codon 110,ALA-ASP)	asiáticos
4.alfa^{EVANSTON} (codon 14,TRP-ARG)	negros

TABELA 7.- Impacto das alterações que provocam talassemia alfa

Segundo KATTAMIS e cols, 1988

CROMOSSOMO	GENOTIPO	TAXA DE SINTESE DE GLOBINA ALFA
...alfa2....alfa1...	alfa/alfa	2.6 + 1.0 = 3.6
...alfa2....alfa^{T}...	alfa/alfa^{T}	2.6 + 0 = 2.6
...(3.7Kb)..alfa1...	- /alfa	0 + 1.8 = 1.8
...alfa^{T}....alfa1...	alfa^{T}/alfa	0 + 1.0 = 1.0

A talassemia alfa pode ser adquirida em associação com várias outras doenças, principalmente anormalidades da medula, como as doenças linfo e mieloproliferativas, e em outras alterações hematológicas como a eritroleucemia, leucemia mielóide crônica, leucemia mielóide aguda, leucemia linfoblástica crônica, anemia sideroblástica e mielofibrose (BEAVEN e cols, 1963; FLINT e cols, 1986; GOMES e cols, 1988).

Nas doenças de Hb H adquiridas, a anormalidade na síntese da cadeia parece ser de origem clonal, ou seja, existem duas populações de eritrócitos nos indivíduos afetados, uma com conteúdo de hemoglobina normal e a segunda com marcada hipocromia e deficiência de síntese de globina alfa (LIEBHABER, 1989).

Existem alguns relatos de talassemia alfa associada à retardo mental, podendo estar relacionada a deleções que envolvam todo o complexo gênico alfa e anormalidades citogenéticas que incluem o braço curto do cromossomo 16. Um caso recentemente descrito envolve retardo mental devido a anormalidades do cromossomo X e talassemia alfa, sugerindo que, provavelmente essas alterações no cromossomo X envolvam sítios relacionados aos processos de regulação dos genes globínicos alfa (WEATHERALL e cols, 1981; LIEBHABER, 1989; GIBBONS e cols, 1992).

Quando em associação com mutantes de cadeia beta, como as Hb S, C e E, a talassemia alfa afeta significativamente o nível dessas hemoglobinas, influenciando as manifestações clínicas do gene anormal (DE CEULAER e cols, 1983; STEIMBERG & EMBURY, 1986; EMBURY, 1988; COSTA e cols, 1989; SONATI e cols, 1991). A Hb AS é geralmente uma condição benigna, mas certas complicações podem ocorrer. A interação de Hb AS com talassemia alfa promove variações hematológicas detectáveis, cujos efeitos

são mostrados na tabela 8. Mais notável é a influência dos diferentes genótipos da talassemia alfa na porcentagem de HbS, influenciando a clínica desses portadores (SONATI e cols, 1991).

A talassemia alfa associada a variantes de cadeia beta carregadas positivamente como a Hb C e a Hb E, reduz a proporção de hemoglobina anormal. Esse efeito é mais acentuado em Hb E, provavelmente como resultado do comportamento talassêmico do gene betaE. No caso de associações com variantes de cadeia beta carregadas negativamente, como a Hb J Baltimore e Hb N, a presença de talassemia alfa aumenta a reunião de tetrâmeros de Hb J ou Hb N, aumentando, assim, o nível da Hb variante (STEIMBERG & EMBURY, 1986; STEINBERG, 1991).

TABELA 8 - Características hematológicas da talassemia alfa/Hb AS
Segundo SONATI e cols, 1991

GENOTIPO DA GLOBINA ALFA	Hb (g/dl)	VCM (fl)	alfa/beta	Hb S (%)
alfa alfa alfa/alfa alfa	13-15	80-90	---	40
alfa alfa/alfa alfa	13-15	80-90	1.0	35-45
- alfa/alfa alfa alfa	13-15	80-90	---	35-45
- alfa/alfa alfa	13-14	75-85	0.85	30-45
- alfa/- alfa	12-13	70-75	0.75	25-30
-- /- alfa	7-10	50-55	0.50	17-25

A deficiência expressiva de ferro influencia a produção de algumas hemoglobinas como a Hb A_2, Hb E e Hb S. O mesmo acontece em portadores de talassemia alfa, onde a Hb H está diminuida ou ausente e cujos níveis voltam à normalidade com a correção da ferropenia. A diminuição da Hb H provavelmente ocorre pela inibição da produção de cadeias beta pela deficiência de ferro (O'BRIEN, 1973; SALEEM e cols, 1987).

4.3.4.TALASSEMIA ALFA E SELEÇÃO NATURAL

As talassemias alfa são as mais comuns das alterações dos genes humanos e sua distribuição é limitada às regiões tropicais e subtropicais. Sua ocorrência fora dessa área é esporádica, sendo descritos alguns casos típicos na Inglaterra e Japão (W.H.O., 1987). A ocorrência de muitas variantes polimórficas de talassemia alfa sugere que diferentes mutantes têm sido selecionados nas áreas em que ela ocorre com maior frequência coincidindo com a hipótese de que tais variantes conferem melhor adaptação dos heterozigotos, principalmente nas regiões endêmicas ao **Plasmódium falciparum**, e a dispersão desses genes deve-se, em grande parte, aos processos de colonização e migração das populações portadoras (W.H.O., 1987; COSTA e cols, 1989; SONATI e cols, 1991)

4.4. DIAGNOSTICO DAS TALASSEMIAS ALFA

Os métodos utilizados para o diagnóstico das talassemias alfa apresentam suas limitações, e muitas vezes o estudo familial e a análise de DNA são necessários para a

determinação do genótipo correto e adequado aconselhamento genético. A microcitose é característica das talassemias, mas no caso das talassemias alfa, muitas vezes a morfologia dos eritrócitos assemelha-se aos normais. A Hb A_2 está geralmente normal ou discretamente diminuída. Os valores de ferro sérico são de grande valia para o diagnóstico. Valores normais permitem o diagnóstico de talassemias alfa com base na microcitose (VCM < 25 - 27 pg).

A observação de corpos de inclusão de Hb H requer prática do analista e tempo disponível, além do fato de que formas diferentes de talassemias alfa podem apresentar padrões de precipitação semelhantes, e a ausência desses corpos não exclui a talassemia alfa.

A biossíntese da globina fornece parâmetros das taxas de síntese de cada cadeia globínica, mas não oferece dados para diagnóstico de determinadas formas de talassemia alfa (W.H.O., 1987).

O uso de anticorpos monoclonais anti-zeta pode ser útil para detectar traços dessa cadeia especificamente para a deleção (- -SEA), sendo utilizado como teste específico para estudos populacionais na Ásia. O método, no entanto, não oferece parâmetros confiáveis para diagnóstico de heterozigotos com outras mutações ou deleções que incluam o gene zeta. O estudo familial nesses casos é importante para o direcionamento diagnóstico (W.H.O., 1987; CHUI, 1989).

Para análises populacionais e aconselhamento genético, é também necessário que se faça uso de métodos diagnósticos simples e úteis que contribuam para a melhoria da saúde pública em países em desenvolvimento. O teste de resistência globular

osmótica fornece dados sobre a microcitose e constitui o primeiro teste seletivo para talassemias, associado à análise da morfologia eritrocitária. A eletroforese em pH alcalino, dosagem de Hb A_2 e pesquisa de agregados intraeritrocitários de Hb H auxiliam sobremaneira o diagnóstico das talassemias alfa (W.H.O., 1987; NAOUM, 1987).

Métodos de análise de DNA diferenciam os tipos de alterações que causam a talassemia alfa, mas são difíceis de serem utilizados como rotina, principalmente em países de terceiro mundo (W.H.O., 1987). A tabela 9 mostra os métodos utilizados para diagnóstico de talassemias alfa, com diferentes enfoques populacionais e suas limitações, sendo que para um correto diagnóstico, todos os métodos podem ser necessários.

O diagnóstico pré-natal na talassemia alfa não se faz tão urgente quanto para talassemia beta, pois na talassemia alfa os homozigotos não sobrevivem após a vida intra uterina e a forma mais grave, cujo fenótipo é o da doença de Hb H, é compatível com a sobrevida normal. Casais de risco para hidropsia fetal devem ser identificados e aconselhados em populações que possuem as alterações genéticas em frequência aumentada (W.H.O., 1987).

4.5. HEMOGLOBINOPATIAS TALASSEMICAS

As hemoglobinopatias são geralmente definidas como hemoglobinas anormais com uma ou mais mudanças estruturais, geralmente a substituição de um único aminoácido na cadeia globínica, que é sintetizado com taxas normais ou próximas do normal e que causam alterações fisiopatológicas aos seus portadores. Por outro lado, mutações talassêmicas são

tradicionalmente definidas como aquelas alterações que não modificam a estrutura da cadeia globínica, mas levam a uma redução quantitativa na síntese da cadeia. A caracterização de mutações no gene da globina tem mostrado modificações que alteram tanto a estrutura quanto a síntese da cadeia em questão.Algumas hemoglobinas estruturalmente anormais são clínica e hematológicamente acompanhadas de expressão talassêmica, como consequência de diferentes mecanismos.

Essas variantes surgem da ligação a condições talassêmicas, da mutação no codon normal de terminalização, de anormalidades nos sítios de processamento ou de mutações altamente instabilizadoras. Em cada caso, o fenótipo decorre da diminuição ou término prematuro da síntese do gene envolvido, da redução da quantidade de RNAm normalmente processado, ou da rápida degradação proteolítica pós-sintética sofrida pelas cadeias afetadas. Por exemplo: Hb E [beta(26)Glu-Lys] e Hb Knossos [beta(27)Ala-Ser] são mutações que criam um sítio de **splicing** alternativo resultando em decréscimo de RNAm da globina beta. A Hb Constant Spring é um outro exemplo onde a estrutura e a síntese das cadeias alfa estão alterados por uma mutação e cujo fenótipo é alfa talassêmico. O "**crossing over**" que resulta na Hb Lepore origina um gene híbrido [5'delta3'beta]; o produto desse gene é sintetizado em uma taxa muito baixa e o fenótipo da Hb Lepore é talassêmico.

Tabela 9 - Métodos para o diagnóstico de talassemia alfa e suas limitações. Modificado de W.H.O, 1987.

MÉTODO		LIMITAÇÕES
EM ADULTOS		
Microcitose	alfa zero (HCM < 25) alfa mais (HCM < 24)	Pode representar - -/alfa alfa ou - alfa/- alfa; os valores se sobrepoem aos normais
Hb A_2 normal ou diminuida		Valores semelhantes aos normais; pode representar talassemia beta com Hb A_2 normal.
Biossíntese de globina alfa / beta		Não é confiável ára formas graves, exceto para indivíduos com grande experiência para diagnóstico
Análise de DNA		
	RFLP	Não detecta formas por não deleção; diagnostica
	Sondas de oligonucleotídeos	somente mutações conhecidas; são necessários para
	Sequenciamento de DNA	definir novas formas por não deleção
EM RECÉM-NASCIDOS		
Hb Bart por eletroforese		Ausente em 30% dos - alfa$^{3.7}$/alfa alfa
Microcitose		Valores semelhantes aos normais
Análise de DNA		

Existem aproximadamente 150 variantes estruturais do gene alfa já descritas, que resultam da substituição de um único aminoácido. A expressão desses genes varia segundo o locus afetado e o fenótipo geralmente assemelha-se à talassemia alfa (KAZAZIAN, 1989). A tabela 10 ilustra alguns desses casos. Alguns exemplos representativos dessas variantes identificadas em populações brasileiras são: Hb Constant Spring, com fenótipo alfa talassêmico; e as Hb Lepore e E com fenótipo beta talassêmico (SALZANO, 1986; NAOUM e cols, 1987).

5. HEMOGLOBINA C E OUTRAS HEMOGLOBINAS

5.1. HEMOGLOBINA C

A hemoglobina C (Hb C) é uma hemoglobina anormal originada por substituições de um aminoácido na posição 6 da cadeia de globina beta, sendo que o ácido glutâmico, original nessa posição em hemoglobinas normais, é substituido por lisina. Essa troca de aminoácidos altera sensivelmente a mobilidade eletroforética da hemoglobina, sendo facilmente diferenciável da Hb A em pH alcalino e ácido. E frequente em povos da Africa Ocidental, onde atinge valores entre 15 e 30% (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974).

Os heterozigotos (Hb AC) não possuem anemia e não apresentam evidências de diminuição do número de eritrócitos. A análise da morfologia eritrocitária pode apresentar células em alvo. A diferenciação desses portadores é feita por métodos eletroforéticos onde, em pH alcalino, a fração atinge 25 a 45% da hemoglobina total.

Tabela 10 - Hemoglobinopatias talassêmicas. Segundo NIENHUIS e cols, 1984.

MECANISMOS MOLECULARES DO EFEITO TALASSÊMICO	ANORMALIDADE ESTRUTURAL NA CADEIA GLOBÍNICA
Ativação do sítio de 'splicing'	Hb E beta(26) Glu-Lys
	Hb Knossos beta(27) Ala-Ser
Perda do sítio de terminalização	Cadeias globínicas mais longas
	Hb Constant Spring alfa(142)Ter-Gln
	Hb Icaria alfa (142) ter-Lys
	Hb Koya Dora alfa(142) ter-Ser
	Hb Seal Rock alfa (142) ter-Glu
	Hb Tak beta (147) ter-Thr
Instabilidade da cadeia ou da molécula	Hb Indianápolis beta (122) Cys-Arg
	Hb Quong Sze alfa (125) Leu-Pro
Mecanismos desconhecidos	
A.Diminuição de RNAm	Hb Vicksburg beta (75) Leu-0
	Hb North Shore beta (134) Val-Glu
B.Instabilidade pós tradução	Hb Suan-Dok alfa (109) Leu-Arg
	Hb Petah Tikvah alfa (110) Ala-Asp

Como outras hemoglobinas anormais migram na mesma posição em eletroforese de pH alcalino, devido à semelhança de seus pontos isoelétricos, a diferenciação pode ser feita em pH ácido e isoeletrofocalização. O diagnóstico dos portadores heterozigotos é fundamental do ponto de vista do aconselhamento genético, já que a associação dessa variante com Hb S ou talassemias e em homozigose, apresenta alterações clínicas detectáveis. A expressão patológica dessa hemoglobina é, portanto, encontrada primariamente em portadores homozigotos (Hb CC) e nas associações com Hb S (Hb SC) e talassemia beta (Hb C/talassemia beta) (NAOUM, 1987).

A fisiopatologia da Hb C resulta da falta de maleabilidade e aumento da viscosidade dos eritrócitos que a contém. A rigidez conferida pela tendência de formação de cristais e tactóides intraeritrocitários, torna as células mais susceptíveis à destruição principalmente pelo baço, reduzindo seu tempo de vida. O aumento da viscosidade propicia a ocorrência de oclusão de pequenos vasos sanguíneos (BEUTLER, 1983a).

Os portadores homozigotos ou portadores de dupla heterozigose (Hb SC; Hb C/talassemia beta; Hb C/talassemia alfa), sofrem de anemia hemolítica crônica de graus variáveis, porém sem maior gravidade, e frequentemente acompanhada de esplenomegalia. As queixas incluem: cansaço, fraqueza, icterícia, dor abdominal, dor óssea, colelitíase e, raramente, sintomas semelhantes aos da anemia falciforme, porém de forma mais amena. Hematológicamente os eritrócitos podem apresentar-se normocrômicos e normocíticos, ou com microcitose, hipocromia e reticulocitose, e é bastante característico o achado de um número elevado de células em alvo, no sangue periférico (LEHMANN E HUNTSMAN, 1974). A anemia pode

agravar-se após infecções, mas o prognóstico geral é considerado bom (HONIG & ADAMS III, 1986).

5.2. HEMOGLOBINAS VARIANTES SEM ALTERAÇÕES FISIOLOGICAS

Um grande número de variantes de hemoglobina tem sido descoberto com frequência, devido ao aperfeiçoamento técnico para detecção de novos mutantes. A grande maioria desses mutantes resultam em hemoglobinas variantes sem alterações fisiológicas, e grande parte delas foram descobertas em estudos populacionais ou em associação com talassemias e Hb S. Dentre as hemoglobinas classificadas nesse grupo destacaremos as hemoglobinas D, E, J e I por serem mais frequentes no Brasil (NAOUM e cols, 1987).

HEMOGLOBINA D

E uma variante de cadeia beta que apresenta a mesma mobilidade eletroforética da Hb S em pH alcalino diferenciando-se, entretanto, em pH ácido. Além disso, não apresenta falciformação dos eritrócitos e sua solubilidade é semelhante à da Hb A. O portador heterozigoto (Hb AD) não apresenta sintomas e a fração anormal constitui cerca de 35 a 50% da hemoglobina total. A homozigose para a Hb D é de ocorrência bastante rara, sendo sempre importante a análise familial para os casos suspeitos de homozigose e interações com talassemias. Clinicamente, apresentam discreto grau de anemia e são assintomáticos (HONIG & ADAMS III, 1986).

HEMOGLOBINA E

E uma variante de cadeia beta onde o aminoácido lisina da posição 26 é substuido por um ácido glutâmico. Em eletroforese de pH alcalino migra na mesma posição que a Hb C e a diferenciação ocorre em eletroforese de pH ácido. No teste de solubilidade, comporta-se como a Hb A e apresenta, ainda, discreta instabilidade molecular. Portadores heterozigotos (Hb AE) apresentam 30 a 45% de hemoglobina anormal e são assintomáticos. Homozigotos (Hb EE) apresentam esplenomegalia, graus de anemia discretos, acompanhados de microcitose e células em alvo no sangue periférico. A hemólise nesses pacientes é mínima, mas pode ser agravada em circunstâncias adversas, como febre e gripe. Observa-se também, redução da fragilidade osmótica eritrocitária. Sintomas clínicos mais acentuados são verificados nas associações dessa hemoglobina com Hb S ou talassemias (LEHMAN & HUNTSMAN, 1974).

HEMOGLOBINA J

E uma variante com mobilidade eletroforética bem característica em pH alcalino, sendo mais rápida que Hb A. Em pH ácido migra na mesma posição da Hb A. Sua origem molecular pode ser por substituição de aminoácidos tanto na cadeia alfa como na cadeia beta. Os mutantes de cadeia alfa apresentam em eletroforese a Hb J com concentração sempre inferior a 25% e um componente menor, o J_2, oriundo da combinação de cadeias alfaJ e delta, que migra entre as posições de Hb A_2 e Hb S. O mutante de cadeia beta apresenta a fração J com concentração entre 30 e 45%.

Os portadores heterozigotos de Hb J (Hb AJ) são assintomáticos e com valores hematológicos normais. Em associação com talassemias, revelam discreto grau de anemia. A ocorrência dessa variante é rara e sua descoberta ocorre geralmente em estudos populacionais, já que seus portadores são totalmente assintomáticos (NAOUM, 1987).

HEMOGLOBINA I

Essa hemoglobina variante apresenta mobilidade eletroforética bastante rápida quando comparada com a Hb A. A mutação que a origina envolve sempre a mesma troca de aminoácidos: lisina por ácido glutâmico, tanto em cadeias alfa quanto em cadeias beta, sendo que nos mutantes de cadeia alfa a ocorrência do componente menor I_2 é observada migrando na posição de Hb S. Em eletroforese de pH alcalino, a Hb I migra na mesma posição da Hb H. Em pH ácido a Hb I move-se em direção ao polo negativo enquanto a Hb H permanece no ponto de aplicação. Os portadores heterozigotos de Hb I (Hb AI) são assintomáticos e os portadores de interações com talassemias tendem a apresentar alterações discretas (LEHMAN & HUNTSMAN, 1974; NAOUM, 1987).

5.3. METEMOGLOBINEMIAS

Diariamente, cerca de 1% da hemoglobina total circulante (oxihemoglobina) converte-se espontâneamente em metemoglobina (metaHb). A manutenção do nível de metemoglobina reflete um sutil equilíbrio entre duas forças opostas que atuam "in vivo", onde uma é responsável pela formação da metemoglobina

e a outra controla a sua redução à forma oxigenada. Em pessoas normais, os níveis quantitativos da metemoglobina estão presentes entre 0,3 a 3% do total de hemoglobina circulante. Denomina-se por metemoglobinemia a situação clínica em que mais de 3% da hemoglobina circulante foi oxidada para a forma férrica. A metemoglobina não tem valor como pigmento respiratório, pois é incapaz de transportar oxigênio. A dispnéia e a fadiga são verificadas quando essa concentração ultrapassa 35-40% da hemoglobina total. Concentrações acima de 70% são geralmente letais. A hipóxia tissular é a responsável pela maioria dos sinais e sintomas da metemoglobinemia (JAFFE & HSIEN, 1971; LEHMANN & HUNTSMAN, 1974).

Um estado metemoglobinêmico pode surgir do desequilíbrio entre as forças de manutenção do equilíbrio oxi-metemoglobina, que pode ser originado pela excessiva formação de metemoglobina por indução tóxica; diminuição da taxa de reconversão da metemoglobina à oxihemoglobina por deficiência enzimática; ou anormalidades na parte globínica da molécula de hemoglobina, que mantêm os grupos prostéticos no estado férrico, originando uma molécula anormal, a hemoglobina M (Hb M)(LEHMANN & HUNTSMAN, 1974).

A metemoglobinemia tóxica é causada por drogas e compostos químicos oxidantes, dentre os quais destacam-se as sulfas e seus derivados, fenacetina, nitritos, nitratos, nitrobenzenos, anilina, etc. A metemoglobinemia por deficiência enzimática é hereditária e causada pela deficiência de diaforase de NADH. Os heterozigotos geralmente não apresentam metemoglobinemia clínica mas, sob efeito de medicamentos ou exposição a agentes oxidantes, ocorre mal estar geral, com

cianose intensa devido à combinação do fator hereditário e indução tóxica. A metemoglobina da Hb M é resultante da alteração estrutural dos aminoácidos que fazem parte da ligação com o grupo heme, levando à oxidação do ferro e impedindo sua ligação ao oxigênio. O quadro anêmico manifesta-se por ligeira icterícia e aumento de bilirrubina indireta (NAOUM,1987).

As Hb M de herança autossômica dominante estão associadas à cianose crônica devido à ocorrência de metemoglobinemia.

Quatro das variantes de Hb M têm substituidas suas histidinas proximal e distal pela tirosina na cadeia alfa ou beta: Hb M Boston, Hb M Iwate, Hb M Saskatoon, e Hb M Hide Park. O quinto tipo, Hb M Milwaukee, tem substituição da valina pelo ácido glutâmico na posição beta 67. As hemoglobinas M foram observadas em praticamente todas as partes do mundo, sendo a Hb M Boston a mais frequentemente descrita inclusive no Brasil (NAOUM e cols, 1981). Essa, como as hemoglobinas instáveis, são muitas vezes devidas a mutações novas (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974).

A deficiência de NADH- metemoglobina redutase (ou NADH-diaforase, citocromo b_5 redutase, ferrihemoglobina redutase, NADH-desidrogenase, como pode também ser chamada) determina a metemoglobinemia por diminuição da taxa de reconversão da metemoglobina a hemoglobina. E uma condição relativamente rara, de herança mendeliana autossômica recessiva (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974). A enzima NADH-metemoglobina redutase catalisa uma etapa na via principal da redução da metemoglobina, onde é responsável por aproximadamente 95% dessa atividade. Esta enzima reduz o citocromo b_5, que usa o NADH como doador de hidrogênio. O citocromo por sua vez, reduz a metemoglobina a hemoglobina. A

heterogenidade da NADH-metemoglobina redutase é bem documentada. Foram relatadas inúmeras formas alélicas, algumas delas com atividade normal e outras com atividade diminuida (GONZALEZ e cols, 1978; BOARD & PIDCOCK, 1981; SHIMIZU e cols, 1985).

A metemoglobinemia tóxica ocorre quando várias drogas e substâncias tóxicas oxidam a hemoglobina diretamente na circulação, ou facilitam a sua oxidação pelo oxigênio molecular. Muitos compostos industriais, domésticos e agentes terapêuticos, encontrados na água, no ar, no espinafre e em alimentos preservados, são responsáveis pela metemoglobinemia tóxica, mesmo em indivíduos normais, quando acima de determinadas quantidades. Alguns desses exemplos são as sulfonamidas, a lidocaina, nitritos, nitratos e derivados do benzeno (NAOUM e cols, 1981; MEDEIROS e cols, 1983).

A taxa de metemoglobina de equilíbrio dinâmico é alcançada quando a velocidade de formação de metemoglobina é igual à velocidade de sua redução mediante o sistema NADH-metemoglobina redutase ou mecanismos enzimáticos auxiliares. A exposição aos produtos que aceleram a oxidação da oxiemoglobina pode desequilibrar esse sistema quando a atividade da NADH-metemoglobina redutase passa a ser insuficiente para reduzir toda a metemoglobina formada (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974).

A metemoglobina tóxica pode apresentar-se de forma crônica ou aguda. No primeiro caso há um aumento estável da concentração de metemoglobina e o paciente terá uma cianose assintomática. A metemoglobinemia aguda, produzirá sintomas de anemia devido à incapacidade de transporte de oxigênio dessa molécula, e pode estar associada a colapso vascular, coma e morte, quando o nível de metemoglobina exceder os 60 a 70% da

hemoglobina total.

A metemoglobinemia pode também ser encontrada em portadores de Hb instáveis, porém, nesses casos, a tendência de formação de metaHb é uma característica meramente transitória ao longo da rota de desnaturação da hemoglobina, permanecendo a hemólise como a principal expressão clínica dessas hemoglobinopatias (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974). A cianose é também característica das variantes de hemoglobina com reduzida afinidade ao oxigênio. Nestes casos, porém, ela é devida a grandes quantidades de hemoglobina na forma desoxigenada (sob condições fisiológicas normais), e não à ocorrência de metemoglobinemia, como nos casos acima.

5.4. HEMOGLOBINAS INSTAVEIS

As hemoglobinas instáveis formam um grupo de variantes genéticas em que a substituição ou a deleção de um ou mais aminoácidos afeta a conformação da molécula e a sua estabilidade. A avaliação da estabilidade é realizada por testes específicos de desnaturação térmica à 50º C e química por isopropanol à 37º C. Há um grande espectro de alterações da estabilidade onde algumas hemoglobinas anormais são discretamente instáveis e não estão associadas a sintomas clínicos, enquanto outras precipitam rapidamente e dão origem às anemias hemolíticas. A anemia num portador de hemoglobina instável poderá ser grave, com diminuição do nível de hemoglobina e reticulocitose acentuada, ou poderá ser moderada com discreta diminuição da concentração de hemoglobina e reticulocitose pouco acima dos limites normais. Alguns tipos de

hemoglobinas instáveis se expressam com crises de hemólise após a administração de drogas oxidantes, enquanto outras podem ser induzidas por processos infecciosos acompanhados de febre.

Mais de 100 hemoglobinas instáveis já foram identificadas, e as alterações que lhes dão a característica instabilidade podem ocorrer em qualquer das cadeias de globina, sendo contudo, a cadeia beta a mais frequentemente envolvida (IHIC, 1989). Isto se dá provavelmente porque a herança de um único mutante de cadeia alfa, num genoma que contém quatro cópias desse gene, produz estados subclínicos, e portanto de detecção menos provável.

As alterações estruturais que dão origem às propriedades instáveis dessas hemoglobinas, ocorrem naqueles locais que são de grande importância na manutenção da estrutura helicóide normal da cadeia polipeptídica, da estrutura tetramérica, ou do firme contato globina-heme, e que são: posições internas da molécula (substituição de resíduos não-polares por polares); segmentos helicóides críticos; subunidades de contato (especialmente entre as cadeias alfa1 e beta1); e posições vizinhas ao grupo heme (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974). Dessa forma, essas mutações podem introduzir uma carga para o interior da globina, modificar as interações entre as subunidades e/ou d istorcer a configuração alfa-hélice da cadeia afetada. Quando qualquer desses mecanismos ocorre, a molécula de hemoglobina desnatura e precipita como globina insolúvel. Esse precipitado, frequentemente, liga-se aos grupamentos heme e proteínas desnaturadas da membrana, sendo denominados corpos de Heinz, que alteram a permeabilidade pelo cálcio, e diminuem a maleabilidade celular. Essas células, no entanto, podem ser continuamente

removidas pelo baço, o que pode dificultar sua detecção em indivíduos não esplenectomizados (ZINKHAM & WINSLOW, 1989).

As hemoglobinas instáveis são raras, e apresentam um caráter de transmissão autossômico dominante. Casos de homozigose não foram ainda identificados. O estado patológico que as determinam faz com que esses genes mutantes sejam mantidos sob pressão seletiva negativa, permenacendo nas populações principalmente pela ocorrência de novas mutações. Portanto, não é raro encontrar-se um paciente portador de Hb instável, cujos pais não apresentam a anormalidade (BEUTLER, 1983).

A instabilidade molecular é um fator proeminente de um grande número de hemoglobinas anormais que tem a substituição de aminoácidos em pontos de contatos entre as subunidades, especialmente aquelas que envolvem os contatos entre as cadeias alfa e beta, representados por alfa1-beta1, e que apresentam ligações firmes entre si. Quando ocorrem mudanças estruturais que enfraquecem essas ligações, as subunidades podem se dissociar mais rapidamente que o normal. As subunidades descombinadas são relativamente instáveis e essas mudanças promovem a precipitação intracelular das cadeias anormais e de suas cadeias complementares normais. Virtualmente todas as hemoglobinas anormais que contêm deleções de aminoácidos - falta de 1 a 5 resíduos na sequência estrutural de uma cadeia - podem ser caracterizadas por instabilidade molecular, com enfraquecimento da estrutura interna de suas subunidades afetadas.

Um grupo adicional de hemoglobinas instáveis são resultantes da substituição de algum aminoácido, na posição helicóide, pelo aminoácido prolina. A estrutura do anel de prolina geralmente é a causa principal do rompimento da

conformação estrutural e da estabilidade da subunidade da hemoglobina afetada, por exemplo: Hb Genova (beta 28 leucina - prolina) e Hb Madrid (beta 115 alanina - prolina). Da mesma forma, a substituição de um aminoácido interno não-polar por outro polar pode desestabilizar a estrutura molecular, por exemplo a Hb Viena (beta 130 tirosina - ácido aspártico).

A maioria das hemoglobinas instáveis quando se precipita apresenta mudanças oxidativas que podem contribuir na patogênese da doença hemolítica que frequentemente acompanha estes tipos de hemoglobinas anormais. A formação de hemoglobinas intermediárias desnaturadas - os hemicromos - se deve à oxidação do ferro do grupo heme, que se tornam cada vez menos solúveis em estágios mais avançados até sofrer a precipitação (CARRELL, 1976; WHITE, 1976).

A doença hemolítica que está associada a muitas dessas hemoglobinas anormais, também parece ser resultante, em parte, da agressão sofrida pela membrana dos eritrócitos que é mediada por superóxido e outras formas de oxigênio ativado que são gerados durante o processo de desnaturação oxidativa. Somam-se os fatores extrínsecos, especialmente aqueles devido ao envolvimento do baço, que podem contribuir para esses processos hemolíticos.

Outra característica das hemoglobinas instáveis é a presença nos eritrócitos de inclusões de hemoglobinas precipitadas, conhecidas por corpos de Heinz. Os corpos de Heinz não são normalmente visualizados nos eritrócitos circulantes, a menos que o paciente tenha sido esplenectomizado. Entretanto, a presença de inclusões pode ser vizualizada após incubação dos eritrócitos com azul de crezil brilhante ou violeta de metila. A formação de corpos de Heinz e a hemólise são fenômenos

oxidativos. Um fator comum da mutação que causa a hemoglobina instável é a alteração do meio interno do pacote do grupo heme. Esse fato promove três consequências que são importantes para a formação dos corpos de Heinz e causa da hemólise: (1) propensão oxidativa aumentada da hemoglobina; (2) diminuição da afinidade da globina pelos grupos heme, e tendência à metahemoglobinização desencadeando a formação de hemicromos. A extensão com que cada propriedade é modificada está na dependência da especificidade da mutação (MOHANDAS e cols, 1979).

5.5. HEMOGLOBINAS ANORMAIS COM ALTA AFINIDADE PELO OXIGENIO

A maioria dos relatos sobre hemoglobinas anormais com alta afinidade pelo oxigênio descreve a associação entre uma hemoglobina variante e eritrocitose. O primeiro tipo foi descoberto através da análise eletroforética que mostrou uma fração anormal, posteriormente denominada Hb Chesapeake, cuja curva de equilíbrio de oxigênio era característica de hemoglobinas com alta afinidade pelo oxigênio. Atualmente são conhecidas cerca de 90 tipos diferentes de hemoglobinas anormais caracterizadas por modificações estruturais de globinas alfa e beta, que apresentam alta afinidade pelo oxigênio (ERSLEV, 1983).

Devido à mudança da curva de equilíbrio do oxigênio que ocorre nessas hemoglobinas anormais, o sangue das pessoas afetadas apresenta falhas na distribuição de oxigênio aos tecidos. A hipóxia relativa que resulta dessa alteração serve como estímulo para a produção adicional de eritrócitos, causando

a eritrocitose. As anormalidades estruturais da molécula de hemoglobina responsáveis pelas suas alterações funcionais relativas à afinidade ao oxigênio são classificadas em seis tipos: (1) anormalidades que envolvem o pacote do grupo heme, por exemplo, Hb Zurich (beta 63 histidina-arginina); (2) anormalidades que afetam o efeito Bohr e ligação de pontes salinas, por exemplo, Hb Hiroshima (beta 146 histidina-ácido aspártico); (3) anormalidades que afetam as ligações de 2,3DPG, por exemplo, Hb Rahere (beta 82 lisina-treonina); (4) anormalidades que afetam o equilíbrio oxi-desoxi das subunidades, por exemplo, Hb Shepherd-Buch (beta 74 glicina-ácido aspártico); (5) anormalidades que afetam o equilíbrio entre estruturas quaternárias, por exemplo, Hb Chesapeake (alfa 92 arginina-leucina); (6) anormalidades que causam o aumento da dissociação de subunidades, por exemplo, Hb Hirose (beta 37 triptofano-serina) (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974; HONIG & ADAMS III, 1986).

As hemoglobinas anormais com alta afinidade pelo oxigênio são relativamente raras e os casos descritos dessas variantes foram observados somente na forma heterozigota. A eritrocitose observada na maioria dessas hemoglobinas se caracteriza por uma elevação moderada da hemoglobina e dos eritrócitos, geralmente com valores entre 10 a 20% acima dos padrões. Os portadores dessas hemoglobinopatias associadas à eritrocitose apresentam uma típica compleição vermelha mas, com poucas exceções, eles são assintomáticos. Ocasionalmente entretanto, há casos de eritrocitose elevadíssima que provocam cefaléia, tonturas e dores no peito, que podem ser resultantes da hiperviscosidade do sangue. Em alguns casos esses sintomas foram aliviados com sucesso através da flebotomia. Outras causas de

origem genética podem ser expressas por eritrocitose familial, e nessas condições podem ocorrer dificuldades para distingui-las das hemoglobinas anormais com alta afinidade pelo oxigênio. Várias formas de eritrocitose familial se devem a um aumento da produção de eritropoitina. Nesses casos, a elevação dos níveis de hemoglobina e eritrócitos é maior que as observadas nos portadores de hemoglobina anormal com alta afinidade ao oxigênio. Além disso,nessas eritrocitoses familiais a curva de dissociação de oxigênio é normal (VICHINSKY & LUBIN, 1980).

5.6. HEMOGLOBINAS ANORMAIS COM BAIXA AFINIDADE PELO OXIGENIO

A pressão de oxigênio nos capilares alveolares dos pulmões é suficientemente normal para oxigenar a hemoglobina dos eritrócitos circulantes em mais de 95% de saturação. Entretanto, se a afinidade pelo oxigênio do sangue estiver diminuida, a maior fração da hemoglobina no sangue arterial poderá permanecer na forma desoxigenada. Algumas das hemoglobinas anormais têm se mostrado com baixa afinidade ao oxigênio, suficientemente para produzir esse tipo de mudança, provocando nos portadores dessas hemoglobinopatias descoloração da pele e das membranas mucosas que adquirem cor azulada. Uma dessas hemoglobinas anormais, a Hb Kansas (beta 102 asparagina-treonina), apresenta curva de equilíbrio de oxigênio marcadamente desviada para a direita e com menos de 50% da hemoglobina oxigenada em nível arterial. A baixa saturação de oxigênio da Hb Kansas é equilibrada, entretanto, por um considerável aumento da eficiência na distribuição do oxigênio aos tecidos. Consequentemente, pessoas com Hb Kansas, ou com

outra hemoglobina com baixa afinidade ao oxigênio, são capazes de transportar eficientemente o oxigênio (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974).

Algumas hemoglobinas variantes que apresentam baixa afinidade ao oxigênio podem ser instáveis. Porém, a maioria dessas variantes não causa cianose. As anormalidades estruturais dessas variantes incluem mudanças nos resíduos de aminoácidos do pacote do grupo heme, do efeito Bohr, do equilíbrio oxi-desoxi e também do equilíbrio da estrutura quaternária (HONIG & ADAMS III, 1986).

6. PREVENÇÃO DE HEMOGLOBINOPATIAS

Estudos preventivos de hemoglobinopatias têm sido realizados nos países onde sua incidência alcança frequências marcantes para a saúde pública como, Itália, Grécia, Chipre e Tailândia entre outros, cada qual enfocando da melhor maneira a sua população e o tipo de hemoglobinopatia que a acomete (W.H.O., 1989).

A organização de um programa preventivo requer suporte de orgãos oficiais de saúde, treinamento de pessoal capacitado para diagnóstico, aconselhamento genético e clínico dos pacientes e casais de risco. Os suportes clínicos e de puericultura são importante para o bom andamento de programas de **screening** e prevenção (FESSAS, 1987; CAO e cols, 1991).

A linguagem utilizada na comunicação dos resultados e aconselhamento genético é de fundamental importância, não se esquecendo que a opinião da pessoa que recebe a informação é fundamental para a eficácia de tais programas. Geralmente, programas preventivos utilizados principalmente na Itália,

incluem educação em nível populacional, familial e profissional, aconselhamento genético dos portadores e casais de risco e acompanhamento clínico adequado à cada caso.

O estudo das hemoglobinopatias no Brasil vem sendo realizado desde a década de 40 dando ênfase sobretudo à variante S. No entanto, outras variantes, talassemias e associações, têm sido encontradas, sendo as mais prevalentes a Hb S e as talassemias (NAOUM, 1987).

A utilização da tecnologia de DNA recombinante, permitindo o diagnóstico precoce destas patologias, o estudo populacional, o aconselhamento genético e educacional e a informação de suas implicações, são importantissimos para a prevenção do nascimentos de novos homozigotos. Portanto, o ponto principal de uma campanha preventiva para hemoglobinopatias é evitar o nascimento de crianças com a forma grave da doença, através da identificação e orientação de portadores assintomáticos (BIANCO e cols, 1986).

Segundo VULLO e cols, 1992, os motivos pelos quais um programa preventivo de hemoglobinopatias é necessário, são de ordem social e econômica. De ordem social porque uma doença genética que não tem cura, é inaceitável pela grande maioria de casais de risco, e de ordem econômica porque o programa de terapia de homozigotos, requer recursos relevantes para ser realizado. O programa de prevenção é a forma adotada em diferentes centros médicos, especialmente na Grécia, Chipre e Itália, para reduzir ou eliminar o nascimento de crianças homozigotas. "**Screening**" de massa são realizados com este intuito e devem atingir o objetivo de forma compacta. Deve-se usar uma linguagem abrangente e que não deixe dúvidas aos seus portadores

Ciências, Letras e Ciências Exatas

unesp

quanto à herança do gene alterado que possuem, além de se considerar os riscos de se casarem com também portadores. No entanto, este é um processo longo e complexo e com muitas fases, inicia-se na adolescência e pode terminar na idade reprodutiva.

O programa preventivo na Itália para talassemia beta, adotado pelo Centro de Microcitemia de Roma, além de vários outros Centros especializados em diferentes regiões, consiste dos seguintes pontos:

1. Distribuição de informação para população em idade pré-reprodutiva, iniciando com adolescentes de escolas secundárias, os quais absorvem melhor as informações; distribuição de panfletos para casais que estão se casando, para grupos de casais e de jovens, em bairros e em orgãos de saúde.

2. **Screening** de massa em duas populações principais:

a. anualmente, em estudantes da rede oficial, na escola secundária;

b. continuamente, em pessoas que procuram o centro de atendimento por iniciativa própria.

3. Aconselhamento genético para todos os portadores de talassemia solteiros ou casados.

Um outro meio de **screening** com grande relevância é aquele realizado com base em diagnóstico pré-natal e neonatal, diagnosticando os possíveis portadores e orientando o tratamento para cada caso, minimizando, assim, os graves problemas psico-sociais e financeiros da doença (ROWLEY e cols, 1991a; ROWLEY e cols, 1991b; LOADRE e cols, 1991).

A talassemia, em sua grande maioria, é transmitida como um fator autossômico recessivo. Somente metodologias sensíveis e específicas para o reconhecimento dos heterozigotos

permitem a sua identificação. No entanto, desde 1974 é possível realizar, na Itália, o diagnóstico pré-natal com base em tecnologia avançada, reduzindo-se dessa maneira, o número de nascimento de homozigotos para talassemia beta, através de aborto seletivo (VULLO e cols, 1992). Os autores argumentam inclusive que, o custo da prevenção é bem inferior ao do tratamento de um só doente por ano.

6.1.- ESTRATEGIAS PARA UM PLANO DE PREVENÇÃO DE HEMOGLOBINOPATIAS

Os pontos fundamentais do programa são:

- Educação sanitária da população
- **Screening** e reconhecimento de heterozigotos
- Aconselhamento genético
- Diagnóstico pre-natal e aborto seletivo

Educação sanitária:

E o primeiro passo, e fundamental, para a prevenção de qualquer doença, pois se a população não conhece o risco de ser portadora, como poderá agir para evitar a doença? Com relação às hemoglobinopatias, é importante que a população conheça esse novo problema, de origem genética, e que pode afetar famílias inteiras.

A educação sanitária atua melhor na faixa etária pré-reprodutiva (escolares e adolescentes, que estão preocupados com seu futuro e aceitam melhor as informações). Consiste na divulgação de material educativo, escrito e ilustrado, em linguagem de fácil entendimento, enfocando a etiologia e os

aspéctos clínicos da doença. E importante que profissionais da saúde recebam as informações sobre tratamento e genética das hemoglobinopatias, com o intuito de melhor orientar as pessoas que os procuram com tais problemas. Geralmente esses profissionais são médicos, enfermeiros e assistentes sociais. A orientação com relação à possibilidade de diagnóstico pré natal deve ser sempre lembrada (BIANCO e cols, 1986; VULLO e cols, 1990). E necessário controlar periodicamente a eficiência do programa junto à população, visando melhorias, atualização de informações e modificações quando necessário. A divulgação das informações à nível populacional deve ser realizada através de jornais, televisão, cursos e panfletos educacionais.

O programa de prevenção deve enfocar principalmente a população em idade pré reprodutiva e reprodutiva, que podem ser atingidas através de programas educativos no próprio curriculo escolar, ou através de programas realizados em fábricas, ambulatórios de saúde e outros centros com a distribuição de folhetos explicativos (VULLO e cols, 1992).

Screening e reconhecimento de heterozigotos

A identificação do heterozigoto é o segundo passo indispensável à prevenção de hemoglobinopatias e é realizado principalmente por meio de screening. Para tanto, é fundamental que se escolha o melhor período para que o **screening** seja executado. Silvestroni e Bianco, iniciaram o estudo na Itália, com estudantes da escola secundária, possibilitando ao indivíduo receber informações acerca da doença, evitando o estresse psicológico da identificação de uma gravidez de risco, já em curso, ou da possibilidade de que isto ocorra em casais

heterozigotos em fase pré marital (BIANCO e cols, 1986). No entanto, Vullo e cols, 1992, acreditam que o screening realizado nessa idade, resulta em um atraso na resposta à eficácia do programa, pois após obtida a informação, transcorrerão alguns anos até que os indivíduos possam usufruir do programa educativo, e sustentam a hipótese de que a melhor idade para a realização dos primeiros passos do programa preventivo, (educação sanitária e screening do protador heterozigoto), seja na população em idade reprodutiva.

Segundo Bianco e cols, 1986, para o casal de risco, ao identificar-se pelo diagnóstico pré-natal, uma gravidez de criança afetada, é necessário um certo tempo para que aceitem a idéia de um possível aborto sendo importante, que tais casais recebam a informação do risco de gerarem uma criança afetada, antes de decidirem pela sua concepção ou não.

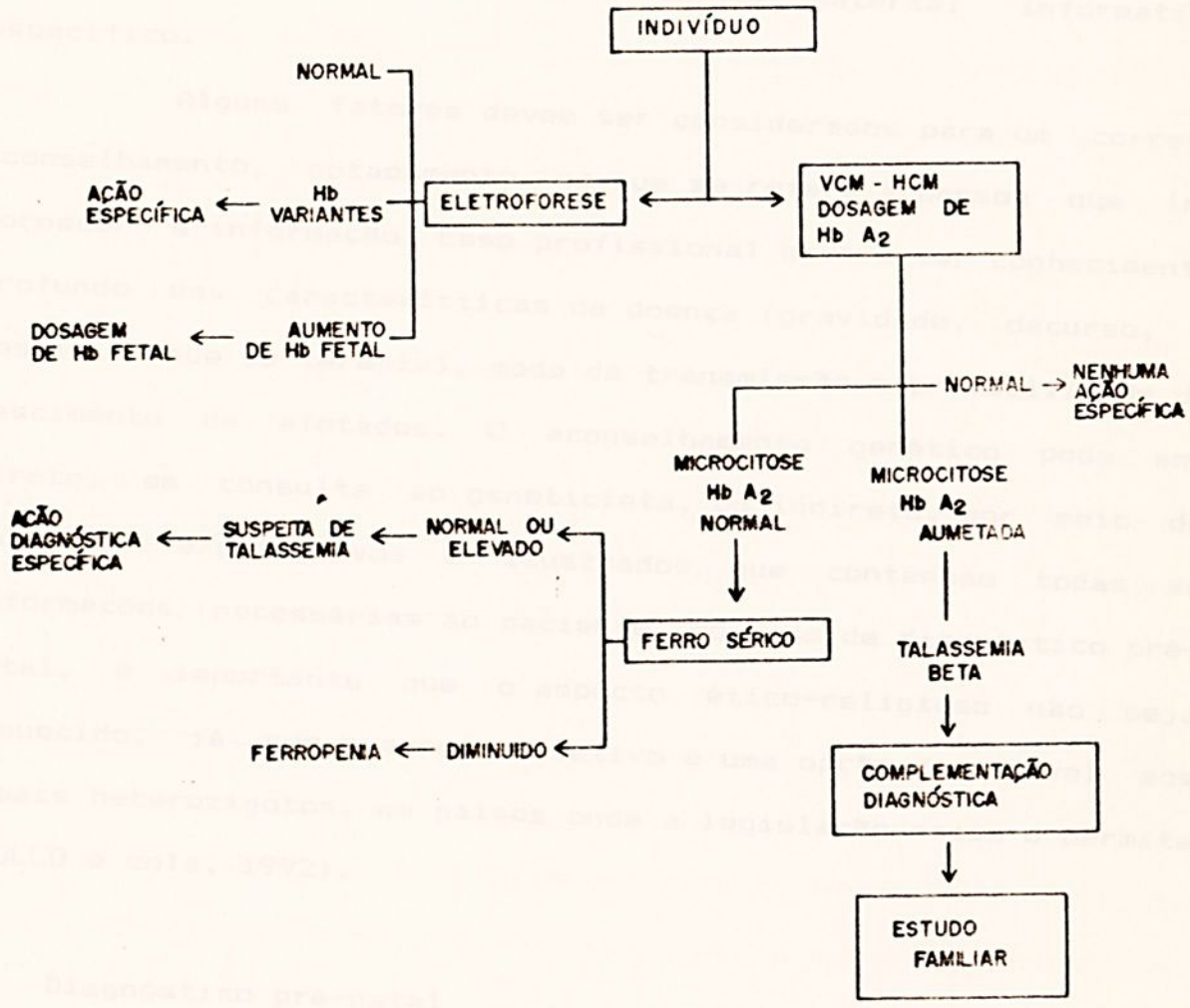
O **screening** de heterozigotos deve levar em consideração a frequência de hemoglobinopatias na população, além da tecnologia mais adequada para seu diagnóstico. Com relação às técnicas utilizadas, é importante que se tenha a contagem de glóbulos, com determinação dos índices hematimétricos (HCM e VCM), além de testes específicos como a resistência osmótica, análise da morfologia eritrocitária, eletroforese de hemoglobinas, dosagens de Hb A_2 e Hb Fetal e eletroforese em pH ácido, sendo que essas técnicas seguem um critério para a identificação dos heterozigotos conforme ilustra o quadro 1.

A probabilidade de erro diagnóstico, principalmente para talassemia beta heterozigota, deve-se ao fato de que existem na população, heterozigotos com valores hematológicos atípicos, por exemplo: a) heterozigotos com valores de VCM e HCM normais,

podem ser portadores de talassemia alfa/beta, e seu correto diagnóstico pode ser dado por síntese de globina e estudo de DNA (VULLO e cols, 1990); b) talassêmicos beta heterozigotos com Hb A_2 normal, devido a mutações nos genes beta e delta; c) portadores de talassemia silenciosa. Nesses casos é necessário o emprego de técnicas mais sofisticadas para o correto diagnóstico, e o reconhecimento do estado heterozigoto para o aconselhamento genético.

Os inconvenientes dos **screenings** populacionais compreendem, discriminação social para certos serviços, o que ocorre principalmente nos Estados Unidos, para os portadores de Hb S, somamdo-se a isso, o estado de angústia dos pais antes de receber os resultados e menor possibilidade de matrimônio. O estado de angústia ao receber o resultado e menor possibilidade de matrimônio estão hoje diminuidos devido a uma melhoria no nível sócio-cultural da população e pela ação do aconselhamento genético. Portanto, é importante que os resultados sejam divulgados por pessoas experientes, ou da área de saúde, para que não seja comprometida a estrutura do programa preventivo (VULLO e cols, 1992).

QUADRO 1. Diagrama para a identificação de heterozigotos. Modificado de VULLO e cols, 1992.



Aconselhamento genético

E o terceiro passo indispensável para um programa de prevenção. Consiste na comunicação ao portador de uma doença hereditária, das características de sua doença, do inconveniente de ser portador, ou no caso, doente; da possibilidade de terapia; do modo de transmissão e do risco do nascimento de filhos portadores ou doentes. A informação deve ser realizada por especialista ou geneticista e conter material informativo específico.

Alguns fatores devem ser considerados para um correto aconselhamento, notadamente no que se refere à pessoa que irá fornecer a informação. Esse profissional deverá ter conhecimento profundo das características da doença (gravidade, decurso, e possibilidade de terapia), modo de transmissão e probabilidade de nascimento de afetados. O aconselhamento genético pode ser direto, em consulta ao geneticista, ou indireto, por meio de folhetos explicativos e ilustrados que contenham todas as informações necessárias ao paciente. No caso de diagnóstico pré-natal, é importante que o aspécto ético-religioso não seja esquecido, já que o aborto seletivo é uma opção disponível aos casais heterozigotos, em países onde a legislação assim o permita (VULLO e cols, 1992).

Diagnóstico pré-natal

Permite aos casais que não renunciaram à atividade reprodutiva, tentarem a gravidez de uma criança normal, ou portadora, já que o aborto seletivo só é sugerido em crianças doentes. A técnica utiliza análise de DNA da vilosidade coriônica, permitindo a identificação das mutações através da

amplificação gênica pelo PCR (ROWLEY e cols, 1991 a, b.; LOADER e cols, 1991).

O diagnóstico pré-natal não favorece o aborto seletivo, como pode parecer à primeira vista; ao contrário, incentiva a continuidade de gestações em 75% dos casos testados, já que o modo de herança das hemoglobinopatias é autossômica recessiva e a probabilidade de fecundação de doentes é de 25%.

Segundo a experiência de programas de prevenção na Itália, após a estimativa prévia do número de portadores, o próximo passo é a escolha da população a ser analisada, e neste caso opta-se por **screening** na população escolar e não escolar divididos da seguinte forma:

"Screening" escolar - composto por:

- Atividade de divulgação : consiste de uma breve informação sobre hemoglobinopatias, fornecida por médicos do Centro de Atendimento, ou por professores das escolas previamente treinados, através de texto escrito e ilustrado, enfocando principalmente a existência de condições bem distintas como o portador são e o doente; um mecanismo ilustrativo simples sobre a forma de transmissão e seu mecanismo hereditário de origem da doença, ressaltando o perigo do nascimento de um filho doente no caso de matrimônio de dois heterozigotos. É solicitado aos pais autorização para que seus filhos realizem os exames. Durante todo o período do screening, ficam expostos no mural da escola, folhetos ilustrativos com os aspéctos principais das hemoglobinopatias.

- Coleta das amostras de sangue : geralmente é coletado pela manhã, 2 ml de sangue venoso daquelas crianças que foram autorizadas pelos pais, no ambulatório da escola, e

posteriormente transferidas ao Centro para as análises.

- Diagnóstico: 1ª fase - realizada em todas as amostras. Consiste na resistência globular osmótica e análise da morfologia eritrocitária. A presença de alteração nestes testes identifica 99,5% dos beta talassêmicos e boa parte dos portadores de outras hemoglobinopatias.

2ª fase - Indices hematimétricos e eletroforese de hemoglobinas. Realizados em todos os casos positivos da primeira fase e permite a verificação dos talassêmicos e de outras variantes e suas possíveis confirmações com quantificação de Hb A_2 e Hb Fetal.

3ª fase - estudo familial, síntese de globina e dosagem de ferro. Realizado em casos onde não foi possível o diagnóstico pelas técnicas anteriores, afastando a ferropenia e possíveis portadores de talassemia alfa.

- Comunicação do resultado: direcionado à familia de todos os estudantes analisados, e geralmente feito através de informação impressa tanto nos casos positivos quanto negativos, e distribuídas pela escola. Os pais são convocados a comparecerem ao Centro para maiores esclarecimentos e realização de exames em todos os membros da familia.

- Aconselhamento genético: com o resultado definitivo, a família recebe orientacão a respeito da forma de hemoglobinopatia herdada, o modo de prevenção e possibilidade de nascimento de filhos doentes para casais de risco. Para adolescentes a informação diz respeito à importância da realização de testes específicos em seu futuro parceiro para saber se é ou não portador de alguma forma de hemoglobinopatia.

Screening em não escolares – É realizado em pessoas que procuram o Centro para serem examinadas. O serviço de aconselhamento genético fornece informações adequadas à própria condição diagnosticada e assistência familiar.

Além do aspecto informativo e educacional do programa preventivo, este fornece dados da frequência relativa e absoluta de heterozigotos e da incidência e estimativa de nascimentos de homozigotos.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho intitulado "Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil, diversidade genética e metodologia laboratorial" tem o objetivo de proporcionar aos profissionais da área de saúde, especialmente hematologistas, analistas e patologistas clínicos, bem como àqueles das ciências biológicas, notadamente os geneticistas humanos, uma sequência de atividades laboratoriais e sociais direcionadas à prevenção de hemoglobinopatias em nossa população, composta por:

-estudantes

-doadores de sangue

-recém-nascidos

-crianças cadastradas em centros e postos de saúde

-crianças de creches

-operários

-famílias em campanhas de vacinação

-pacientes com suspeita de serem portadores de hemoglobinopatias, encaminhados por médicos e laboratórios.

Em vista desse objetivo propomos também:

1. A determinação da amostra em que o processo de prevenção foi mais eficiente;

2. O conhecimento do polimorfismo genético de hemoglobinas obtido no estudo das populações acima discriminadas, utilizando metodologia compatível com sua aplicação em laboratórios de pesquisa e rotina;

3. A caracterização da diversidade de polimorfismos genéticos de hemoglobinas de acordo com suas procedências regionais e raciais;

4. O conhecimento do potencial dos programas de prevenção como meio de fornecimento de material para estudos genéticos e moleculares;

5. A avaliação dos programas preventivos com relação à sua abrangência, formas de divulgação e aconselhamento.

III. MATERIAL E METODOS

O material utilizado para atingir os objetivos propostos nesse trabalho refere-se a análises de sangue de pessoas de diferentes proveniências e distribuídas em diferentes populações estudadas, a saber: estudantes, doadores de sangue, recém-nascidos, usuários de centros de saúde, creches, operários, além de pacientes encaminhados por médicos e laboratórios ao Centro de Referência de Hemoglobinas.

As amostras foram coletadas por punção digital nos programas de prevenção em escolares e por punção venosa nos casos restantes, usando em ambas heparina como anticoagulante, e os possíveis portadores foram chamados ao laboratório para nova coleta, com a finalidade de serem realizados testes confirmatórios.

Todas as amostras foram testadas para triagem e confirmação diagnósticas de hemoglobinopatias. Os métodos utilizados para a triagem foram os seguintes: resistência osmótica em solução de cloreto de sódio a 0,36%, eletroforese em pH alcalino (em ágar-amido e em acetato de celulose) e análise da morfologia eritrocitária. Para confirmação diagnóstica utilizamos técnicas de pesquisa de corpos de HbH intraeritrociários, eletroforese em pH ácido, dosagens de hemoglobinas A_2, fetal e metemoglobina, pesquisa de corpos de Heinz, teste de precipitação de hemoglobinas instáveis, eletroforese de cadeias polipetídicas, focalização isoelétrica e "fingerprint".

A divulgação antecipada da coleta foi efetuada através de folhetos sobre o programa e educação a profissionais das áreas de saúde por meio de cursos e palestras.

O aconselhamento genético foi realizado em reuniões específicas para cada uma das famílias que atenderam aos convites. Além disso, muitos pais e familiares de portadores se dirigiram ao Centro de Referência de Hemoglobinas para obter informações e esclarecimentos a respeito das alterações hereditárias diagnosticadas nos diversos programas.

DETALHAMENTO TECNICO

Devido à expectativa de que muitos serviços poderão se utilizar desses métodos para realizarem com segurança o diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias, apresentamos aqueles que foram caracterizados pela sua eficiência técnica.

TESTES SELETIVOS:

RESISTENCIA GLOBULAR OSMOTICA EM CLORETO DE SODIO 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 em solução de cloreto de sódio a 0,36%. 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.

Reagentes:

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

NaCl.....9,0 g

Na_2HPO_4.....1,36g

$NaH_2PO_4.H_2O$.....0,28g

Agua destilada q.s.p.....100ml

Solução trabalho

NaCl 10%.....36 ml

Agua destilada q.s.p.....1000ml

Procedimento

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

Interpretação

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

ANALISE A FRESCO, DA MORFOLOGIA ERITROCITARIA

Em esfregaço sanguineo à fresco analisa-se o tamanho, a forma e a coloração dos eritrócitos. Os indivíduos portadores de talassemia beta heterozigota apresentam moderada anisopoiquilocitose com prevalência de microcitose e hipocromia facilmente visualizadas ao microscópio óptico.

Os resultados devem ser divulgados da seguinte maneira:

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

ELETROFORESE EM PH ALCALINO (Marengo & Rowe, 1965)

Princípio:

E 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 de diferentes pontos isoelétricos, 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, usam-se outros processos eletroforéticos. Utilizamos a eletroforese em pH alcalino em e acetato de celulose e ágar-amido.

EM ACETATO DE CELULOSE (Marengo & Rowe,1965)

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO, pH 8,5

Tris hidroximetil aminometano.....10,2g

Acido etilenodiaminotetracético.....0,6g

Acido Bórico.....3,2g

Agua destilada q.s.p.....1000ml

Corantes:

Negro de amido

Negro de amido 10B.....0,5g

Alcool metílico.....45,0ml

Acido acético glacial.....5,0ml

Agua destilada.....45,0ml

Ponceau

Ponceau S.....0,5g

Acido tricloroacético 5,0g

Agua destilada q.s.p.....100ml

Solução descorante de ácido acético

Acido acético glacial.. .....100ml

Metanol..... .....50ml

Agua destilada q.s.p 1000ml

Procedimento:

Embeber as fitas de acetato de celulose por 15 minutos no mínimo e no máximo por 6 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 ou Ponceau, embebendo as fitas em um dos corantes por 15 minutos, e posteriormente em solução descorante por 30 minutos, com agitação da vasilha.

EM AGAR-AMIDO (Naoum, 1979)

Reagentes:

Agar.....300mg

Amido Hidrolizado.....1.200mg

TAMPÃO T.E.B. pH 8,8

TRIS.....10,1g

EDTA.....1,0g

Acido bórico.....0,76g

Agua q.s.p.....200ml

Preparação do gel

Colocar a mistura de ágar e amido en **erlenmeyer** de 240 ml e adicionar o Tampão diluido 4:40 em água destilada; aquecer em bico de Bunsen até total dissolução; Distribuir o gel em placa acrílica.

Preparação da cuba

Colocar em cada compartimento eletrolítico 200ml de tampão borato pH 8,6 - solução trabalho.

TAMPÃO BORATO pH 8,6 - Solução estoque

Acido Bórico.....32,7g

NaOH.....6,8g

Agua destilada q.s.p.....2000ml

SOLUÇÃO TRABALHO

Tampão Borato.....250ml

Agua destilada q.s.p.....1000ml

Colocar a placa com as amostras aplicadas próximas ao polo negativo, na cuba com o tampão e conectar com papel de filtro Whatman 1mm ou similr; Passar 300 Volts por 45 minutos.

Interpretação:

Consultar mapa de disposição de hemoglobinas em eletroforese alcalina (Figura 12).

TECNICAS ESPECIFICAS

ELETROFORESE QUANTITATIVA EM ACETATO DE CELULOSE, pH 8,5 (Dosagem de hemoglobina A2) -(Método de Marengo & Rowe, 1965)

Princípio:

O aumento de hemoglobina A2 na grande maioria dos casos está associado às talassemias beta heterozigotas. Porém em algumas condições patológicas, muitas de origem adquiridas, os níveis dessa hemoglobina estão acima dos normais.

Reagentes:

São os mesmos utilizados na eletroforese em acetato de celulose pH 8,6 para análise qualitativa de hemoglobinas.

Procedimento:

- Aplicar 20 microlitros de solução de hemoglobinas com concentração entre 8 e 12 g%, em fitas de acetato de celulose com 5,7 cm de largura.

FIGURA 12. Disposição das mobilidades de 118 tipos de hemoglobinas humanas em eletroforese alcalina. Segundo NAOUM, 1979.

- Passar 300 volts por 40 minutos.

- Após a separação das frações de hemoglobina A2 e A, recortá-las com tesoura e eluí-las em tubos de ensaio contendo 3 ml de água destilada para hemoglobina A2, e 15 ml de água destilada para hemoglobina A.

- Deixar eluir de duas a seis horas, com agitação periódica.

- Ler as densidades ópticas (D.O.) em 415 nm, usando água destilada como branco.

Cálculo:

$$\% \text{ HbA2} = \frac{\text{D.O. HbA2 X 100}}{\text{D.O. Hb A2 + (D.O. HbA x 5)}}$$

ELETROFORESE DE DIFERENCIAÇÃO EM AGAR-FOSFATO, pH 6,2 (Método de Vella, 1968).

Princípio:

A eletroforese em gel de ágar-fosfato pH 6,2 é específica para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas mais lentas que a hemoglobina A, como por exemplo: Hb S e Hb D; Hb C e Hb E que em eletroforese alcalina, migram em posições semelhantes, dificultando a caracterização. Por este método, as hemoglobinas S e C se separam da hemoglobina A, enquanto as hemoglobinas D e E migram na mesma posição da hemoglobina A. Esse método permite também a caracterização semi-quantitativa de hemoglobina fetal.

Reagentes:

Tampão Fosfato pH 6,2

Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel.

Na2HPO4.....2,02g

NaH2PO4.H2O.....7,66g

Agua destilada q.s.p.....1000ml

Gel de Agar-Fosfato

Agar (Difco).....200mg

Tampão fosfato pH 6,2.....20ml

Procedimento:

- Em um erlenmeyer de 250 ml aquecer os componentes do gel de ágar-fosfato até completa dissolução.

- Pipetar 3,5 ml do gel em lâminas de microscópio. Deixar gelificar à temperatura ambiente.

- Aplicar as amostras próximo à porção média da lâmina.

- Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos usar folha dupla de papel de filtro.

- Passar 100 volts por 20 minutos.

- Analisar inicialmente sem corar.

- Para melhor interpretação das frações corar com Ponceau ou Negro de Amido.

Interpretação:

Consultar o mapa de diferenciação das disposições de hemoglobinas em eletroforese ácida (Figura 13).

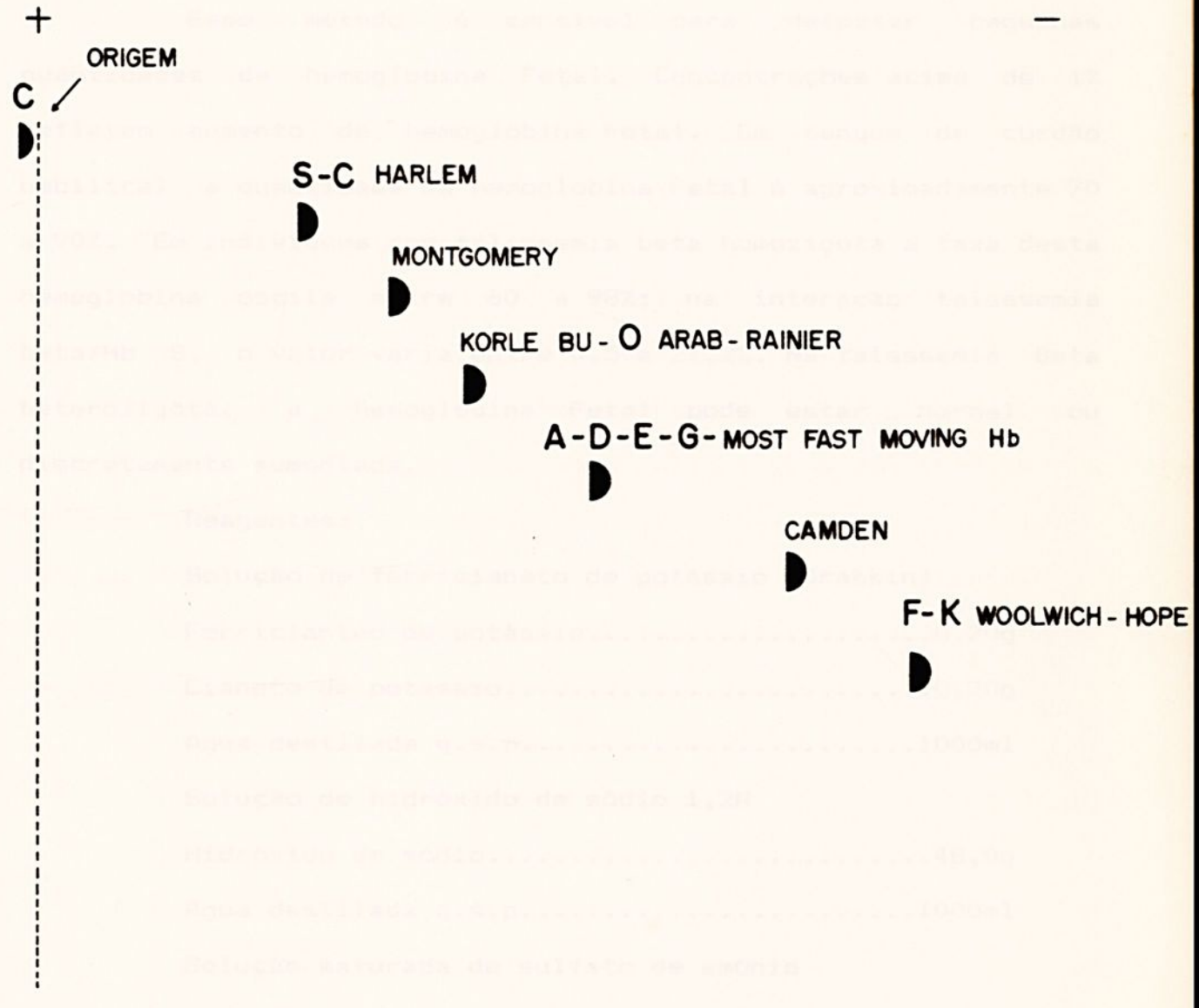


FIGURA 13. Disposição das mobilidades eletroforéticas dos tipos de hemoglobinas humanas diferenciáveis em pH ácido. Segundo NAOUM, 1979.

DOSAGEM DE HEMOGLOBINA FETAL (Método de Betke e col.1959)

Princípio:

A hemoglobina Fetal é alcali-resistente, enquanto que as hemoglobinas A, A2 e os tipos anormais são facilmente desnaturáveis por soluções alcalinas.

Esse método é sensível para detectar pequenas quantidades de hemoglobina Fetal. Concentrações acima de 1% refletem aumento de hemoglobina Fetal. Em sangue de cordão umbilical a quantidade da hemoglobina Fetal é aproximadamente 70 a 90%. Em indivíduos com talassemia beta homozigota a taxa desta hemoglobina oscila entre 60 a 98%; na interação talassemia beta/Hb S, o valor varia entre 0,5 a 21,2%. Na talassemia Beta heterozigota, a hemoglobina Fetal pode estar normal ou discretamente aumentada.

Reagentes:

Solução de ferricianeto de potássio (Drabkin)

Ferricianteo de potássio.....0,20g

Cianeto de potássio.....0,20g

Agua destilada q.s.p.....1000ml

Solução de hidróxido de sódio 1,2N

Hidróxido de sódio.....48,0g

Agua destilada q.s.p.....1000ml

Solução saturada de sulfato de amônio

Sulfato de Amônio.....500g

Agua destilada q.s.p.....500ml

Procedimento:

- Diluir 0,6 ml da solução de hemoglobina em tubo contendo 10 ml da solução de Drabkin. Homogenizar por inversão.

- Colocar 5,6 ml da solução de hemoglobina diluída em um tubo rotulado "Hb F". Adicionar 0,4 ml da solução de hidróxido de sódio 1,2N e acionar o cronômetro. Agitar cuidadosamente por 10 segundos.

- Ao final de 2 minutos exatos, adicionar 4 ml da solução saturada de sulfato de amônio. Homogenizar por inversão e deixar em repouso por 5 a 10 minutos, no máximo.

- Filtrar o conteúdo do tubo "Hb F" em duplo papel de filtro.

- Preparar a solução padrão, colocando em um tubo de ensaio de 1,4 ml da solução de hemoglobina diluída, 0,6 ml de água destilada e 2 ml da solução saturada de sulfato de amônio. Transferir 1 ml desta solução para outro tubo e juntar 9 ml de solução de Drabkin. A solução de hemoglobina total é 10 vezes mais diluída que a solução de hemoglobina alcali-resistente.

- Ler a densidade óptica dos tubos padrão e "Hb F" em 540 nm, usando solução de Drabkin como branco.

Cálculo:

$$\% \text{ de Hb F} = \frac{\text{D.O. Hb F}}{\text{D.O. Padrão} \times 10} \times 100$$

Interpretação:

Adultos normais apresentam valores entre 0,0 e 2,0% de hemoglobina fetal.

PESQUISA DE CORPOS DE HEINZ E AGREGADOS DE HEMOGLOBINA H (Método de Papayannopoulos & Stamatayannopoulous, 1974)

Princípio:

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

Reagentes:

Solução salina

Cloreto de sódio.....0,9g

Agua destilada q.s.p.....100ml

Solução citrato

Citrato de sódio.....2,2g

Agua destilada q.s.p.....100ml

Solução de azul cresil brilhante

Azul cresil brilhante.....1,0g

Solução salina.....100ml

Solução citrato.....25ml

Procedimento:

- Colocar 50 microlitros de sangue total em tubo de ensaio pequeno e adicionar 50 microlitros de solução de azul crezil brilhante. Agitar o tubo suavemente.

- Incubar o material a 37ºC 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.

TESTES DE PRECIPITAçAO PARA HEMOGLOBINAS INSTAVEIS

Princípio:

As cadeias da hemoglobina (e o tretâmero) são estruturas altamente estáveis e dependem da força coletiva de quatro fatores:

1.) um grande conteúdo helicóide que constitui 75% da estrutura de cada cadeia polipetídica;

2.) o firme ligamento entre o grupo heme e o polipetídeo (globina);

3.) a localização interna de aminoácidos não-polares e hidrofóbicos, que mantém o "pacote" de proteção ao grupo heme;

4.) os contatos alfa1 beta1 que estabilizam a integração entre as cadeias alfa e beta.

A diminuição da estabilidade da hemoglobina pode ser resultante da alteração de qualquer um dos quatro fatores, geralmente sensíveis quando expostos ao calor. Em um tampão apropriado, a hemoglobina normal dificilmente se precipita quando submetida à determinada temperatura (50°C a 60°C), por certo tempo de exposição; sob as mesmas condições as hemoglobinas instáveis se desnaturam. Foram utilizados dois testes específicos para detectar hemoglobinas instáveis: a) desnaturação ao calor, e b) precipitação por isopropanol.

TESTE DE DESNATURAÇÃO PELO CALOR (Dacie & Lewis,1985)

Reagentes:

Solução de fosfato monobásico de sódio 0,1 M

$NaH_2PO_4.H_2O$.....13,8g

Agua destilada q.s.p.....1l

Solução de hidrogeno-fosfato de di-sódio 0,1 M

Na_2HPO_4 (anidro).....14,2g

Agua destilada q.s.p.....1l

Solução tampão fosfato pH 7,4

Solução de $NaH_2PO_4.H_2O$ 0,1 M.....19,2ml

Solução de Na_2HPO_4 0,1 M.....80,8ml

NaCl 0,8%

Procedimento:

1. Em um tubo de hemólise colocar 1 ml de sangue fresco, coletado com anticoagulante. Centrifugar a 1.500rpm e desprezar o plasma. Lavar os eritrócitos com NaCl 0,85% por duas vezes. Hemolisar os eritrócitos com 5 ml de água destilada. Homogenizar por seis vezes.

2. Transferir o hemolisado para um tubo maior, e adicionar 5 ml do tampão fosfato (pH 7,4), homogenizar por seis vezes e centrifugar por 10 minutos a 1.500 rpm.

3. Transferir 2 ml do sobrenadante para outro tubo e incubá-lo a 50°C, em banho-maria, por uma hora, ou a 60°C por trinta minutos.

4. Observar se houve precipitação.

Controle

E fundamental o uso de uma amostra controle, obtida nas mesmas condições da amostra teste.

Interpretação

Em sangue com hemoglobinas normais é possível que ocorra discreto grau de precipitação. O resultado é positivo quando a precipitação é floculenta e em grande quantidade.

Precauções

1. As amostras a serem analisadas não devem exceder 72 horas após a coleta.

2. O diagnóstico da Hb instável deve ser confirmado por outros testes específicos: a) pesquisa de corpos de Heinz;b) eletroforese de hemoglobina;c) dosagem de metemoglobina.

3. A temperatura e o pH 7,4 do tampão são pontos críticos nesse teste.

TESTE DE PRECIPITAÇÃO POR ISOPROPANOL (Carrel & Kay, 1972)

Reagentes

Solução tampão Tris/isopropanol pH 7,4

Tris-hidroximetil-aminometano.....12,11g

Isopropanol puro.....170ml

Agua destilada q.s.p.....1000ml

Ajustar o pH 7,4 com HCl concentrado

NaCl 0,85%

Procedimento

1. Colocar 2 ml do tampão Tris/isopropanol em tubo de hemólise e incubar 37°C por 5 minutos.

2. Adicionar, ao tampão incubado, 0,2 ml da solução de hemoglobina que se pretende examinar. Agitar o tubo por inversão, arrolhar e deixar por uma hora a 37°C.

3. Observar se houve precipitação.

Interpretação

A presença de Hb instável causa floculação nos primeiros 10 minutos, seguida de precipitação.

Precauções

1. As hemoglobinas normais permanecem estáveis durante o processo. Entretanto, pode ocorrer discreta precipitação em alguns casos, após 30-45 minutos. A Hb S é mais estável que a Hb A. A Hb A2 é a hemoglobina mais estável entre as hemoglobinas humanas.

2. É necessário o uso de uma amostra controle, obtida nas mesmas condições que o teste.

3. A temperatura e o pH 7,4 do tampão são pontos críticos nesse teste.

4. O diagnóstico de Hb instável deve ser confirmado por outros testes específicos: a) pesquisa de corpos de Heinz; b) eletroforese de hemoglobina; c) dosagem de metemoglobina.

DOSAGEM E CURVA ESPECTROFOTOMETRICA DE METEMOGLOBINA

Princípio

A presença de metemoglobina pode ser originada por uma das causas abaixo:

1. excessiva formação de metemoglobina;

2. diminuição da reconversão de metemoglobina para globina;

3. anormalidade da porção globínica devido à substituição da histidina proximal ou distal por outro aminoácido.

As duas primeiras causas são evidenciadas por aumento de metemoglobina normal, enquanto a terceira se caracteriza pela elevação quantitativa de metemoglobina anormal - ou Hb M.

A excessiva formação de metemoglobina pode ser induzida por vários tipos de drogas (sulfas, fenacetina, anilina, etc.), bem como por determinados poluentes químicos (óxidos de nitrogênio e enxofre, nitritos, nitratos, nitro-benzeno, etc.). Esses agentes promovem, provavelmente, a formação de peróxido de hidrogênio intracelularmente, convertendo a hemoglobina em metemoglobina.

A diminuição da reconversão de meta Hb para oxi Hb é causada por deficiência enzimática, durante o ciclo de Embden-Meyerhof, especificamente por funcionamento inadequado do NADH ligado à metemoglobina-redutase ou diaforase. Essa deficiência enzimática é recessiva.

A anormalidade da porção globínica é devido à alteração do gene estrutural que promove a substituição da histidina proximal, ou distal, por outro tipo de aminoácido. A intensidade das alterações fisiopatológicas são diferentes nos cinco tipos de Hb M descritos até o presente: M Boston, M Hyde Park, M Iwate, M Milwankee, M Saskatoon.

DOSAGEM DE METEMOGLOBINA (Gerald,P.G.,1966)

Reagentes

Solução tampão fosfato M/15 pH 6,6:

$Na_2HPO_4.12H_2O$.....9,0g

KH_2PO_4.....5,7g

Agua destilada q.s.p.....1000ml

Solução Tampão fosfato M/60 pH 6,6

Diluir 250 ml da solução 1 (fosfato M/15) para 1 litro de água destilada(q.s.p.).

Solução de ferricianeto de potássio 20%

Solução de hidróxido de amônio

Cianeto neutralizado - preparar no momento de usar

a) cianeto de sódio (ou potássio) 10%

b) ácido acético 10%

c) misturar 5 gotas de cianeto de sódio 10% com gotas de ácido acético 12%.

Procedimento

Colocar em um tubo de ensaio:

1. 10 ml de tampão fosfato M/60, 0,2 ml de sangue. Agitar e deixar em repouso por 2 minutos. Ler a DO em 630 - D1: Leitura da metemoglobina

2. Adicionar uma gota de cianeto neutralizado. Agitar e deixar em repouso por 2 minutos. Ler a DO em 630 - D2: Leitura da cianometemoglobina.

3. Adicionar uma gota de ferricianeto de potássio 20% e uma gota de hidróxido de amônio. Deixar em repouso por 2 minutos. Ler a DO em 620 - D3: Leitura da sulfoemoglobina.

4. Transferir 2 ml do tubo, cuja solução foi submetida as três dosagens iniciais, para outro contendo 8 ml de tampão fosfato M/15. Deixar em repouso por 2 minutos. Ler a DO em 540 - D4: Leitura da oxiemoglobina.

Cálculo

1. Meta Hb

$$\frac{D1 - D2}{D4} \times 100 = g\%$$

2. Sulfo Hb

$$D3 - D4 \times 100 = g\%$$

Branco: 10 ml de H2O

1 gota de ferricaneto de K

1 gota de cianeto neutralizado

Interpretação

Os valores normais variam conforme o procedimento técnico e a fabrificação dos reagentes. A rigor, os valores normais para metemoglobina não ultrapassam 5%, e os de sulfoemoglobina no máximo 1%. Assim, é aconselhável realizar o teste usando uma ou duas amostras de sangue "normais".

Precauções

1. Não pipetar as soluções que contenham cianeto.
2. Obedecer rigorosamente o tempo de repouso.

CURVA DE METEMOGLOBINA(Gerald,P.G.,1966)

Reagentes

Solução de ferricianeto de potássio a 5%, preparada na hora do procedimento.

Solução tampão fosfato M/15 pH 6,6:

$Na_2HPO_4.12H_2O$.....9,0g

KH_2PO_4.....5,7g

Agua destilada q.s.p.....1000ml

Procedimento

Diluir 0,1 ml de hemolisado em 10 ml do tampão fosfato pH 6,6. Agitar por inversão. Acrescentar 0,05 ml de ferricianeto de potássio e deixar em repouso por 10 minutos. Fazer a leitura das densidades ópticas de 480 a 630 nm em espaços de 10 nm. Analisar o resultado após a confecção da curva de absorção.

Usar como branco o tampão fosfato M/15, acertando o zero da absorbância a cada comprimento de onda.

Interpretação

As metemoglobinas por defeito na globina apresentam picos de absorção diferentes ao da metemoglobina A (normal).

As amostras com metemoglobinemias induzidas apresentam absorções semelhantes às da metemoglobina A.

As metemoglobinemias causadas por deficiências enzimáticas podem exibir curva semelhantes à da metaemoglobina A, ou mostrar um platô de absorção uniforme entre 600 e 630 nm.

ELETROFORESE DE CADEIAS POLIPEPTIDICAS (Schineider, 1974)

Princípio

A caracterização estrutural das hemoglobinas anormais é realizada em condições muito especiais devido ao seu alto custo operacional e às dificuldades inerentes aos próprios métodos utilizados. Dessa forma, para dar sequência ao estudo de uma

hemoglobina anormal não identificável pelos métodos de qualificação e quantificação, utiliza-se inicialmente a eletroforese de cadeias polipeptídicas. A separação eletroforética de cadeias polipeptídicas anormais se constitui em uma pré-análise molecular, muitas vezes conclusiva para o diagnóstico de hemoglobina anormal, sem que haja necessidade de se aplicar métodos de disposição bidimensional de peptídeos e análises de aminoácidos.

Reagentes

Tampão Tris-EDTA-borato pH 8,4

Corante Ponceau

Uréia

2-mercaptoetanol

Procedimento

1) No dia anterior ao teste preparar o tampão trabalho, misturando 72 g de uréia e 140 ml de tampão Tris-EDTA-borato pH 8,4 (tampão Tris-uréia), em um "becker". Homogenizar a solução em agitador magnético, até o momento do uso, a temperatura ambiente.

2) Misturar 50 microlitros do tampão Tris-uréia, 50 microlitros de 2-mercaptoetanol e 50 microlitros de hemolisado, em um pequeno tubo. Deixar em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente.

3. Adicionar 6,4 ml de 2-mercaptoetanol ao tampão Tris-uréia, misturar bem e colocar a solução tampão Tris-uréia-mercaptoetanol nos compartimentos eletrolíticos, reservar 40 ml dessa solução para embebimento do acetato de celulose. O acetato deve ser embebido durante 30 minutos (mínimo) e 4 horas (máximo).

4. Retirar o excesso da solução tampão do acetato entre duas folhas de papel de filtro e colocá-lo bem esticado na cuba de eletroforese.

5. Aplicar as amostras na porção média do acetato.

6. Passar 150 volts por 80 minutos.

7. Corar as fitas com solução corante Ponceau ou outro corante de proteínas. Descorar com ácido acético 10%.

Controle

E importante realizar esse processo comparando com cadeias polipeptídicas de hemoglobina normal e de hemoglobinas variantes conhecidas, por exemplo: Hb AS, Hb AC, ou Hb SC.

Interpretação

O mapa de disposição de cadeias polipeptídicas representado na figura 14, facilitará a interpretação dos tipos mais frequentes de hemoglobinas variantes. Esse mapa mostra a disposição de 33 variantes diferentes, como por exemplo, a Hb J Baltimore da Hb J Oxford; a Hb G Philadelphia da Hb G Gaveston, entre outras.

Precauções

1. A solução tampão Tris-uréia-mercaptoetanol deve ser usada no mesmo dia em que foi preparada.

2. O processo de análise eletroforética das cadeias polipeptídicas deve ser realizado pelo menos em três procedimentos eletroforéticos, com uma ou duas fitas de acetato de celulose por vez.

3. A solução de hemoglobina deve ser fresca, não excedendo 48 horas da sua preparação.

4. A voltagem pode ser elevada para 250 volts, e o tempo de corrida diminuído para 60 minutos.

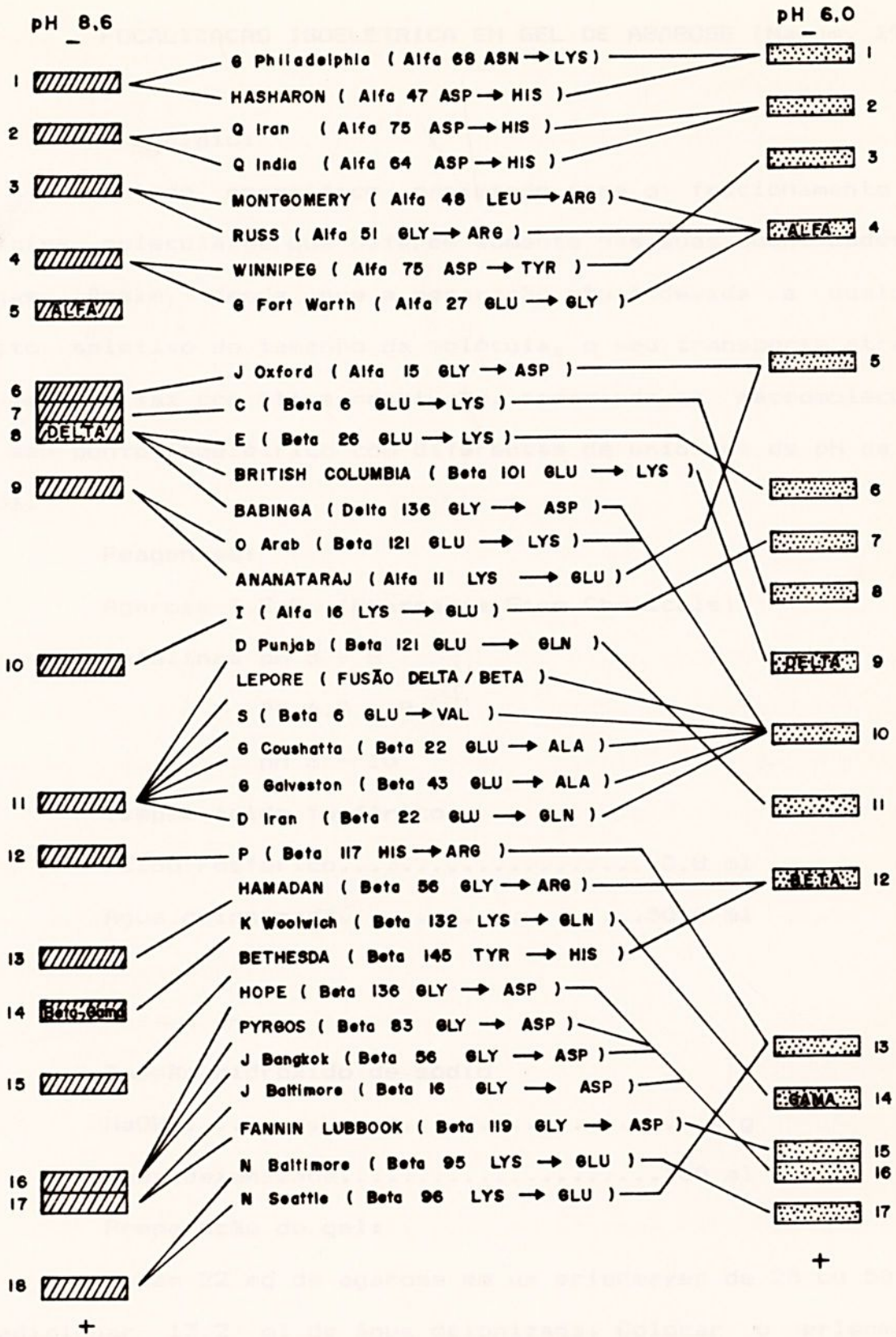


FIGURA 14. Disposição das mobilidades eletroforéticas das cadeias polipeptídicas das globinas alfa, beta, gama, e delta em acetato de celulose, pH 8.6 e pH 6,0. Segundo SCHINEIDER, 1974.

FOCALIZAÇAO ISOELETRICA EM GEL DE AGAROSE (Naoum, 1990)

Princípio:

Método específico projetado para o fracionamento de espécies moleculares que diferem somente nas suas quantidades de cargas. Assim, desde que a separação não é devida a qualquer efeito seletivo do tamanho da molécula, o seu transporte através do meio se faz com ótima resolução, separando as macromoléculas por seu ponto isoelétrico com diferenças de unidades de pH de até 0,001.

Reagentes:

Agarose I.E.F. (Pharmacia Fine Chemicals)

Anfolinas pH 5 - 8

Ph 6.5 - 9

pH 3 - 10

Tampão ácido fosfórico

Acido Fosfórico.....3,8 ml

Agua deionizada.....50,0 ml

Tampão hidróxido de sódio

NaOH.....4 g

Agua deionizada.....100 ml

Preparação do gel:

Pesar 22 mg de agarose em um erlenmayer de 25 ou 50 ml, e adicionar 13,2 ml de água deionizada. Colocar o erlenmayer dentro de um becker de 100 ml com água em ebulição e rolhas de borracha no fundo e observar constantemente a dissolução da agarose que deverá ocorrer dentro de 5 a 10 minutos. Após este

período adicionar as anfolinas nas seguintes proporções: 0,8 ml de Ph 5-8; 0,8 ml de pH 6,5-9 e 0,4 ml de pH 3-10. A seguir, o gel é rapidamente colocado em placas de vidro. Enquanto o gel se solidifica, as amostras devem ser preparadas.

Preparação da solução de hemoglobinas:

O hemolisado deve ser feito com sangue recente. Os eritrócitos devem ser lavados por 3 vezes com solução salina e ao volume dos eritrócitos lavados, adicionar 3 a 5 volumes de água deionizada. A concentração de hemoglobina deverá estar próxima de 5 g/dl.

Pré-focalização:

A placa com o gel deverá ser colocada em cuba refrigerada. Na extremidade catódica da placa colocar uma tira de papel de filtro embebido em tampão NaOH. Na extremidade anódica, o papel de filtro deverá estar embebido em tampão ácido fosfórico. A seguir, conectar os eletrodos e aplicar corrente de 5 mA por 10 minutos, para que se forme o gradiente de pH. Após este período, desconectar os eletrodos e remover a placa para aplicação das amostras.

Aplicação das amostras:

Embeber pequenas tiras de papel de filtro com as amostras e colocar sobre o gel.

Focalização:

Aplicar uma corrente de 5 mA até que as amostras migrem para o gel. Neste momento, retirar as tiras de papel de filtro e aumentar a potência para 8 mA até perfeita separação das amostra, o que deverá ocorrer por volta de 40 minutos.

Fixação, secagem e coloração:

As placas de agarose devem ser fixadas com ácido tricloro acético 20% por 3 minutos. A seguir, a placa deve ser lavada em água destilada por aproximadamente 1 minuto. Para secagem, envolver a placa em papel de filtro umedecido com água destilada e deixar à temperatura ambiente por 12 a 15 horas. A coloração pode ser feita com Ponceau e Negro de Amido por 10 a 15 minutos, e a descoloração, em água destilada.

Interpretação:

Após o fracionamento é possível visualizar numa amostra normal as hemoglobinas A, A_2 e A_{1c}, essa última com migração mais rápida que a Hb A. A resolução dessa técnica é superior à dos métodos eletroforéticos convencionais, permitindo a separação de metemoglobinas A sulfoemoglobinas A, entre outras, conforme ilustra a figura 15.

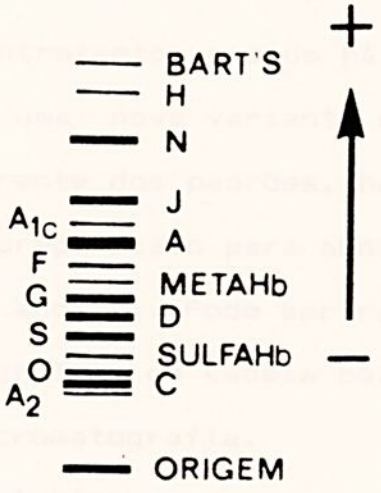


FIGURA 15.- Distribuição eletroforética das hemoglobinas humanas por Focalização isoelétrica.Segundo NADUM, 1990.

ANALISE DE PEPTIDEOS (NAOUM, 1987)

Essas análises são realizadas por mapeamento ou "fingerprint" de peptideos, e se faz necessária quando a hemoglobina anormal não pode ser caracterizada pelos métodos anteriores. E um método sensível que, com o auxílio de corantes específicos para aminoácidos, permite a detecção do peptídeo que possui o aminoácido mutante. Muitos tipos de hemoglobinas possuem peptideos alterados em posições padrões que, identificados por coloração específica dos aminoácidos, dispensam a análise quantitativa desses. Entretanto, quando há a suspeita de que a hemoglobina anormal é uma nova variante ou a disposição do peptídeo alterado é diferente dos padrões, há a necessidade de se fazer o **fingerprinting** preparativo para análise quantitativa de aminoácidos do peptídeo anormal. Pode ser realizado por meio de análise de globina integral ou da cadeia polipeptídica alterada, previamente isolada por cromatografia.

Preparação da globina

Consiste na quebra dos ligamentos entre as cadeias polipeptídicas e os grupos heme.

Reagentes:

a) Solução de acetona ácida (preparada no momento do uso)

Acido Clorídrico conc.....1,5ml

Acetona..... 100ml

b) Acetona P.A. 4ºC

c) Eter P.A.

Procedimento:

- Em proveta com capacidade para 100ml, colocar 75ml da solução de acetona ácida e 5ml de solução de hemoglobina. Agitar vigorosamente e deixar em repouso por 5 minutos.

- Aspirar o sobrenadante (heme) e ao precipitado (globina) adicionar 20 ml de acetona. Misturar e centrifugar a 3.000rpm por 2 minutos. Desprezar o sobrenadante e repetir o procedimento duas vezes.

- Adicionar ao precipitado lavado 5ml de éter, homogenizar e centrifugar nas condições acima. Desprezar o sobrenadante e secar o precipitado com nitrogênio ou dessecador à vácuo.

- A globina nestas condições pode ser estocada em refrigerador por 90 dias ou ser utilizada imediatamente.

MAPEAMENTO DE PEPTIDEOS (fingerprinting)

Princípio:

Consiste na conjugação bidimensional de eletroforese de alta voltagem e cromatografia. A eletroforese separa os peptídeos pelas suas cargas elétricas, e a cromatografia os separa pelas qualidades hidrofílicas e hidrofóbicas dos aminoácidos que os constituem.

Eletroforese de alta voltagem

Reagentes:

Tampão Piridina pH 6,4

Piridina.....400ml

Acido acético glacial.....16ml

Agua destilada.....6.000ml

Procedimento:

a)Ressuspender o digerido tríptico em 0,02ml de tampão piridina pH 6,4.

b)Recortar o papel Whatman 3MM na medida de 23 x 57cm

c)Aplicar o digerido triptico a 15cm da extermidade do papel que entrará em contato com anodo e a 4cm da margem lateral

d)Embeber o papel em tampão piridina e secar entre duas folhas de papel Whatman 1MM

e)Colocar o papel no suporte da cuba deixá-lo esticado

f)Passar 2.400 volts por uma hora e ligar refrigeração do tanque

g)Após o processo eletroforético, retirar o papel, deixá-lo secar ao ar, suspenso.

h) proceder à cromatografia

Cromatografia:

Reagentes:

Solvente cromatográfico

Piridina.....300ml

Alcool Isoamílico.....300ml

Agua destilada.....350ml

Procedimento:

a)Grampear as extremidades do papel, deixando-o na forma cilíndrica, e colocá-lo em tanque cilíndrico de cromatografia com a lateral em que foi aplicada a amostra em contato com o solvente.

b)Deixar o desenvolvimento cromatográfico se processar por 12 a 18 horas. Após estes processo, retirar o papel, deixá-lo secar ao ar.

c)Proceder a coloração.

Coloração dos peptídeos:

Para a análise qualitativa utiliza-se, inicialmente, o corante de nihidrina que revelará as posições dos peptídeos. Muitas hemoglobinas anormais apresentam peptídeos em posições alteradas, que por serem evidentes, dispensam colorações específicas. Entretanto, quando a hemoglobina anormal mostra o peptídeo alterado em posições de difícil identificação há necessidade de se utilizar os corantes específicos.

Coloração com nihidrina: Produz um complexo colorido em púrpura devido à ação que esse reagente exerce sobre os grupos amino terminais que ficam livres após a digestão.

Coloração de metionina: Específico para coloração de aminoácidos que possuem enxofre em sua composição.

Coloração de histina: Os peptídeos que contêm coram-se em vermelho. Os peptídeos que possuem histidina e tirosina coram-se em marrom.

Coloração de tirosina: É específica para os fenóis em posições ortolivres, e somente a tirosina reage a este corante.

Coloração triptofano: É específico para compostos indol. Os peptídeos que contêm triptofano coram-se em púrpura, enquanto os outros perdem a cor.

Coloração de arginina: Os peptídeos que não contêm arginina perdem a coloração púrpura da nihidrina, enquanto aqueles que as possuem ficam com a coloração laranja.

ANALISE ESTATISTICA (Larson, 1982; Daniel, 1983)

A análise estatística dos dados foi realizada no Departamento de Análise Estatística e Computação da UNESP de São José do Rio Preto, utilizando-se teste Qui-quadrado.

O teste qui-quadrado pode ser usado pra testar independência de variáveis categóricas. Uma variável categórica é aquela na qual os níveis de observação são categorias, isto é, quantidades não numéricas que não possuem as propriedades de um número real. No caso da investigação de independência entre duas variáveis categóricas, o procedimento de comparação é baseado na análise de como as quantidades observadas são distribuídas (frequências) sobre os níveis da variável 2 para os vários níveis da variável 1 (ou vice-versa). Se essas quantidades são distribuídas, sobre os níveis da variável 2, da mesma maneira para todos os níveis da variável 1, então as duas variáveis categóricas são dependentes; se são distribuídas de maneira diferenciada, podemos concluir que as duas variáveis são independentes.

O teste qui-quadrado não se restringe ao uso de variáveis categóricas, pode também ser usado em variáveis numéricas desde que essas possuam níveis bem definidos. Constitui um dos primeiros passos no domínio de testes de hipóteses estatísticas sendo aplicado nos seguinte casos:

H_0: há independência entre as duas variáveis

contra

H_1: há associaçào entre as duas variáveis.

A finalidade do teste qui-quadrado é quantificar descritivamente o grau de dependência entre as duas variáveis

confrontadas, verificando-se as frequência observadas e esperadas, sob hipótese de independência. Quanto maior o valor de qui-quadrado (X^2), mais o observado se distancia do esperado e maior é a dependência entre as variáveis. A estatística X^2 tem distribuição com (l-1) x (c-1) graus de liberdade, no qual l e c correspondem aos números de atributos das variáveis confrontadas.

A rejeição de H_o se dá sempre que o valor de p (probabilidade) for pequeno. Quanto menor o p, maior é a evidência de rejeição de H_o. E usual a comparação dos valores de p com os níveis de significância 5%, 1% e 10%. A distribuição de X^2 nesses casos é aproximada e são necessários certos cuidados na sua aplicação, como garantir que todas as frequências esperadas sejam superiores ao número de 5.

IV. RESULTADOS

No período compreendido entre 1982 e 1992, analisamos diferentes populações provenientes de escolas da rede estadual e da rede particular de ensino, ambas englobando alunos de segundo grau; instituições universitárias; usuários de postos de saúde e obras assistenciais; funcionários de empresas e outras entidades; doadores de sangue; recém-nascidos; famílias durante campanhas de vacinação; pais de portadores de hemoglobinopatias que foram detectados durante o programa preventivo nas escolas estaduais e, finalmente, pessoas que procuraram nosso Centro por vontade própria ou encaminhadas por médicos e laboratórios para pesquisa de hemoglobinas anormais.

O número total de análises efetuadas foi de 41.235 amostras de sangue, sendo que 5.356 (12,98%) apresentaram hemoglobinas anormais em diferentes formas e aqui agrupadas em Hb AS 1002 (2,42%), Hb AC 282 (0,68%), Talassemia beta heterozigota 1.718 (4,16%), Talassemia alfa 1.736 (4,21%) e outros vinte e dois genótipos anormais para hemoglobinas que totalizaram 618 casos (1,49%), conforme ilustra a tabela 11. Especificamente, os vinte e dois genótipos observados, incluem talassemia beta homozigota, talassemia alfa/beta, hemoglobinas variantes em homozigose (Hb SS, Hb CC), interações de talassemias com hemoglobinas variantes (Hb S/talassemia beta, Hb C/talassemia beta, Hb D/talassemia beta, Hb SS/talassemia alfa, Hb AS/talassemia alfa, Hb AC/talassemia alfa) e outras hemoglobinas anormais de rara frequência: Hb SC, Hb AI, Hb AN, Hb AD, PHHF, Hb AB2, Hb AJ, Hb Lepore, metemoglobinas, Hb Instáveis, Hb AM Boston, Hb Constant Spring e Hb Koln.

TABELA 11. Populações analisadas e frequência de hemoglobinas variantes e talassemias.

POPULAÇÃO	TOTAL ANALISADO	TIPOS DE HEMOGLOBINAS														TOTAL COM Hb ANORMAIS	
		AA		AS		AC		TAL.BETA		TAL.ALFA		OUTRAS Hb					
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			n	%
Escolares da rede estadual	12.703	12.453	(98,03)	119	(0,93)	30	(0,23)	77	(0,60)	13	(0,10)	11	(0,08)			250	(1,96)
Escolares da rede particul.	1.135	1.120	(98,70)	7	(0,61)	4	(0,35)	2	(0,17)	-	-	2	(0,17)			15	(1,32)
Universidades	2.682	2.591	(96,6)	23	(0,90)	13	(0,50)	42	(1,60)	9	(0,30)	4	(0,14)			91	(3,40)
Postos de saúde e outras assistenciais*	5.776	5.467	(94,6)	173	(2,99)	41	(0,70)	67	(1,15)	17	(0,29)	8	(0,13)			309	(5,34)
Campanha de vacinação *	363	307	(84,57)	6	(1,65)	1	(0,27)	13	(3,58)	36	(9,91)	-	-			56	(15,42)
Empresas e outras entidades	904	889	(98,3)	7	(0,8)	3	(0,3)	3	(0,3)	1	(0,1)	1	(0,1)			15	(1,65)
Encaminhamentos Brasil *	4.773	2.474	(51,8)	285	(6,0)	80	(1,7)	790	(16,5)	812	(17,0)	332	(6,9)			2.299	(48,1)
Encaminhamentos São Paulo *	4.038	2.197	(54,4)	207	(5,12)	61	(1,51)	660	(16,3)	690	(17,8)	223	(5,52)			1.841	(45,6)
Hospital de D.	7.403	7.062	(95,5)	148	(2,00)	35	(0,47)	39	(0,52)	87	(1,17)	32	(0,42)			341	(4,60)
Base * RN.	1.208	1.121	(92,7)	8	(0,60)	9	(0,74)			68	(5,62)	2	(0,16)			87	(7,20)
País de portadores	250	195	(78,0)	19	(7,6)	5	(2,0)	25	(10,0)	3	(1,30)	3	(1,30)			55	(22,2)
TOTAL	41.235	35.879	(87,01)	1.002	(2,42)	282	(0,68)	1.718	(4,16)	1.736	(4,21)	618	(1,49)			5.356	(12,98)

* OBS: Nestas populações foram realizadas análises citológicas específicas para talassemia alfa, por meio de detecção de precipitados intraeritrocitários de Hb H.

D = Doadores de sangue

RN = Recém-nascidos

A caracterização e confirmação diagnóstica dessas hemoglobinas foram realizadas por tecnologia especializada incluindo eletroforese de cadeias polipeptídicas, focalização isoelétrica, fingerprint e testes citológicos. As talassemias alfa nas populações assinaladas na tabela 11, provenientes de postos de saúde, campanha de vacinação, encaminhamentos, doadores de sangue, e recém-nascidos, foram analisadas através de eletroforese alcalina e confirmação em análise citológica para agregados de Hb H. Nas populações restantes o diagnóstico laboratorial para talassemia alfa foi realizado através da presença de Hb H em eletroforese, devido ao fato de que no início dessa investigação, ainda não dispunhamos de toda a metodologia com a qual finalizamos.

Dentre as 5.356 hemoglobinas anormais identificadas deve-se destacar dois grupos básicos, um composto por programas preventivos e outro constituído por amostras enviadas por outras instituições de saúde (hospitais, laboratórios) e médicos, para diagnóstico de "anemias à esclarecer". No grupo constituído por programas preventivos, no qual estão incluídos os escolares da rede estadual, rede particular e universitários, postos de saúde e obras assistenciais, empresas, campanhas de vacinação (Sabin), doadores de sangue, sangue de cordão umbilical (recém-nascidos), e pais de portadores, observou-se a prevalência de Hb AS (1,56%) sobre talassemia beta heterozigota (0,82%), entre os 3,73% de hemoglobinas anormais, nas 32.424 amostras analisadas. Por outro lado, no grupo composto por instituições e médicos que enviaram amostras para esclarecimento sobre anemias, constatou-se que a maior prevalência coube a talassemia alfa (17,04%), seguida de talassemia beta heterozigota (15,46%) e Hb AS (5,58%), do total

de 46,98% de hemoglobinas anormais em 8.811 amostras analisadas. A figura 16 ilustra a distribuição das hemoglobinas anormais observadas nas diferentes populações.

A análise da população escolar da rede estadual foi subdividida entre escolas de São José do Rio Preto (tabela 12) e de sua sub-região (tabela 13) na qual estão incluidas quinze cidades. Assim, em São José do Rio Preto foram analisados 8.421 estudantes na faixa etária entre 15 e 18 anos, durante os programas de prevenção nessas escolas no período compreendido de 1982 a 1987. Desse total, 156 (1,9%), apresentaram hemoglobinas anormais, destacando-se a Hb AS como a forma mais prevalente (0,9%) seguido da talassemia beta heterozigota (0,5%). Por outro lado, a análise de escolares provenientes de quinze cidades da sub-região de São José do Rio Preto, que totalizou 4.282 estudantes, mostrou 94 (2,19%) casos de hemoglobinas anormais. Nesse grupo, a prevalência de formas alteradas também foi de Hb AS (0,93%) seguida de talassemia beta heterozigota (0,77%).

A análise da população escolar proveniente da rede particular de ensino envolveu 1.135 estudantes, dos quais 0,61% eram portadores de Hb AS, seguido de Hb AC (0,35%), conforme mostra a tabela 11.

Como continuidade do programa preventivo em escolares, convocamos os pais ou responsáveis e familiares de portadores para esclarecimentos, bem como para efetuar análises para detecção de hemoglobinas anormais nos familiares. Das 250 pessoas que compareceram às reuniões, 55 delas (22,2%) apresentaram hemoglobinas anormais, com maior frequência para talassemia beta heterozigota com 25 (10,0%) amostras, seguida da Hb AS com 19 (7,6%) portadores, conforme ilustram a tabela 14 e a figura 17.

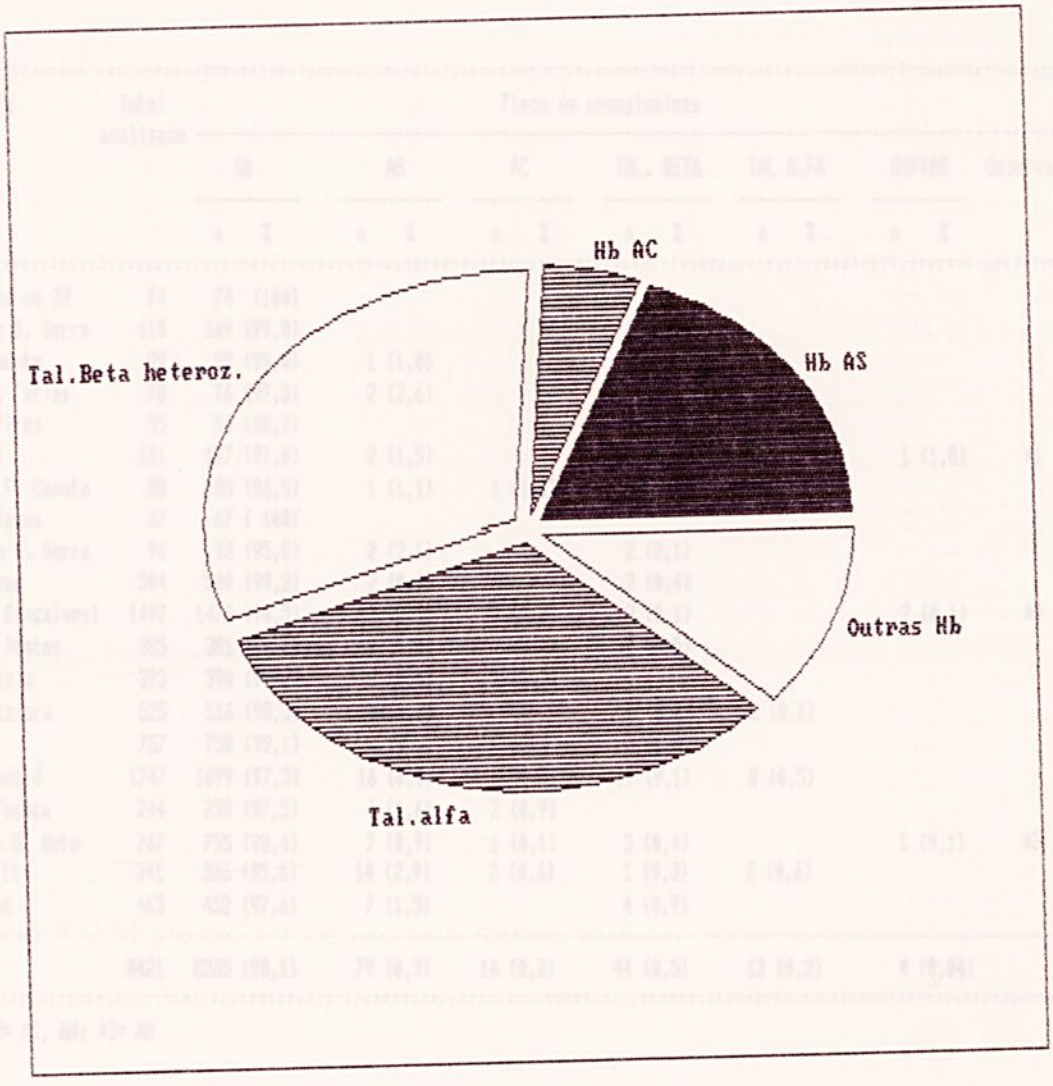


FIGURA 16.- Distribuição gráfica da hemoglobinas variantes e talassemias observadas nas diferentes populações analisadas.

TABELA 12. Escolas de rede estadual de São José do Rio Preto, SP, em que foram realizados os programas preventivos para hemoglobinas anormais

Procedência	Total analisado	Tipos de hemoglobinas							Total com Hb anormais
		AA	AS	AC	TAL. BETA	TAL ALFA	OUTRAS	Observação	
		n %	n %	n %	n %	n %	n %		n %
Voluntários de 32	74	74 (100)							0 0
Antônio de B. Serra	110	109 (99,0)			1 (0,9)				1 (0,9)
Padre Clemente	99	98 (99,0)	1 (1,0)						1 (1,0)
Justino J. Farias	78	76 (97,3)	2 (2,6)						2 (2,6)
Oscar A. Pires	55	54 (98,2)			1 (1,8)				1 (1,8)
Nair Cunha	131	127 (97,0)	2 (1,5)		1 (0,8)		1 (1,8)	*1	4 (3,1)
Francisco F. Caputo	88	85 (96,5)	1 (1,1)	1 (1,1)	1 (1,1)				3 (3,4)
Ezequiel Ramos	67	67 (100)							0 0
Cenobelino B. Serra	96	92 (95,8)	2 (2,1)		2 (2,1)				4 (4,2)
Carceal Leme	504	500 (99,2)	2 (0,4)		2 (0,4)				4 (0,8)
Monsenhor Gonçalves)	1497	1476 (98,5)	13 (0,9)	4 (0,3)	2 (0,1)		2 (0,1)	*2	21 (1,4)
Victor B. Bastos	385	381 (98,6)	2 (0,5)		2 (0,5)				4 (1,0)
Amira Chalela	393	390 (99,2)	2 (0,5)	1 (0,3)					3 (0,8)
Felício Miziara	525	516 (98,3)	4 (0,8)		2 (0,4)	3 (0,6)			9 (1,7)
Pio X	757	750 (99,1)	4 (0,5)		3 (0,4)				7 (0,9)
Alberto Ancaló	1747	1699 (97,3)	16 (0,9)	5 (0,3)	19 (9,1)	8 (0,5)			48 (2,7)
Adair G. Fogaça	244	238 (97,5)	4 (1,6)	2 (0,9)					6 (2,5)
Filadelpho G. Neto	767	755 (98,4)	7 (0,9)	1 (0,1)	3 (0,4)		1 (0,1)	*3	12 (1,6)
Baby Bassitt	341	326 (95,6)	10 (2,9)	2 (0,6)	1 (0,3)	2 (0,6)			15 (4,4)
Jamil Kawan	463	452 (97,6)	7 (1,5)		4 (0,9)				11 (2,4)
TOTAL	8421	8265 (98,1)	79 (0,9)	16 (0,2)	44 (0,5)	13 (0,2)	4 (0,04)		156 (1,9)

*1= SS; *2= AI, AN; *3= AD

TABELA 13. Escolas da rede estadual da sub-região de São Jose do Rio Preto, Sp, em que foram realizados os programas preventivos para hemoglobinopatias.

Procedência	Total analisado	Tipos de hemoglobinas							Total com Hb anormais	
		AA	AS	AC	TAL. BETA	TAL ALFA	OUTRAS	Observação		
		n %	n %	n %	n %	n %	n %		n	%
Nova Granada	285	275 (96,5)	1 (0,35)	3 (1,05)	5 (1,75)		1 (0,35)	*1	10	(3,50)
Fernandópolis	1031	1011 (98,1)	12 (1,16)	1 (0,09)	7 (0,67)				20	(1,93)
Cedral	358	351 (98,0)	2 (0,55)	1 (0,27)	3 (0,83)		1 (0,27)	*2	7	(1,95)
Potirendaba	163	160 (98,1)	2 (1,22)		1 (0,61)				3	(1,84)
Monte Aprazível	337	335 (99,4)		2 (0,59)					2	(0,59)
Poloni	83	81 (97,6)		1 (1,20)	1 (1,20)				2	(2,40)
Palestina	104	100 (96,1)	4 (3,84)						4	(3,84)
Nova Aliança	85	83 (97,6)	1 (1,17)				1 (1,17)	*3	2	(2,35)
Mirassol	961	939 (97,7)	8 (0,83)	4 (0,41)	6 (0,62)		4 (0,41)	*4	22	(2,28)
José Bonifácio	271	264 (97,4)	3 (1,10)	1 (0,36)	3 (1,10)				7	(2,58)
Uchoa	152	151 (99,3)			1 (0,65)				1	(0,65)
Ibirá	105	101 (96,2)	2 (1,90)		2 (1,90)				4	(3,80)
Paulo de Faria	220	211 (95,9)	5 (2,27)		4 (1,81)				9	(4,09)
Icém	87	86 (98,8)		1 (1,14)					1	(1,14)
Orindiúva	40	40 (100)							0	0
TOTAL	4282	4188 (97,8)	40 (0,93)	14 (0,32)	33 (0,77)		7 (0,16)		94	(2,19)

*1= PHHF; *2= PHHF; *3= Talassemia beta homozigota (2), PHHF (1); *4= C/talassemia beta (3),Talassemia beta homozigota.

TABELA 14. Pais de portadores de hemoglobinopatias que se submeteram ao programa de prevenção, realizado em escolas das redes estadual e particular.

Procedência	Total analisado	Tipos de hemoglobinas						Observação	Total com Hb anormais	
		AA		AS		AC				
		n	%	n	%	n	%		n	%
Pais de Portadores	250	195	(78,0)	17	(7,6)	5	(2,00)	*1	55	(22,2)
Negróides	20	10	(50,0)	10	(50,0)				10	(50,0)
Caucasóides	230	185	(80,4)	9	(2,2)	5	(2,20)		45	(19,6)

Procedência	Total analisado	Tipos de hemoglobinas						Observação	Total com Hb anormais	
		TAL. BETA		TAL ALFA		OUTRAS				
		n	%	n	%	n	%		n	%
Pais de Portadores	250	25	(10,0)	3	(1,30)	3	(1,30)	*1	55	(22,2)
Negróides	20								10	(50,0)
Caucasóides	230	25	(10,9)	3	(1,30)	3	(1,30)		45	(19,6)

*1=AN (2); PPHF(1).

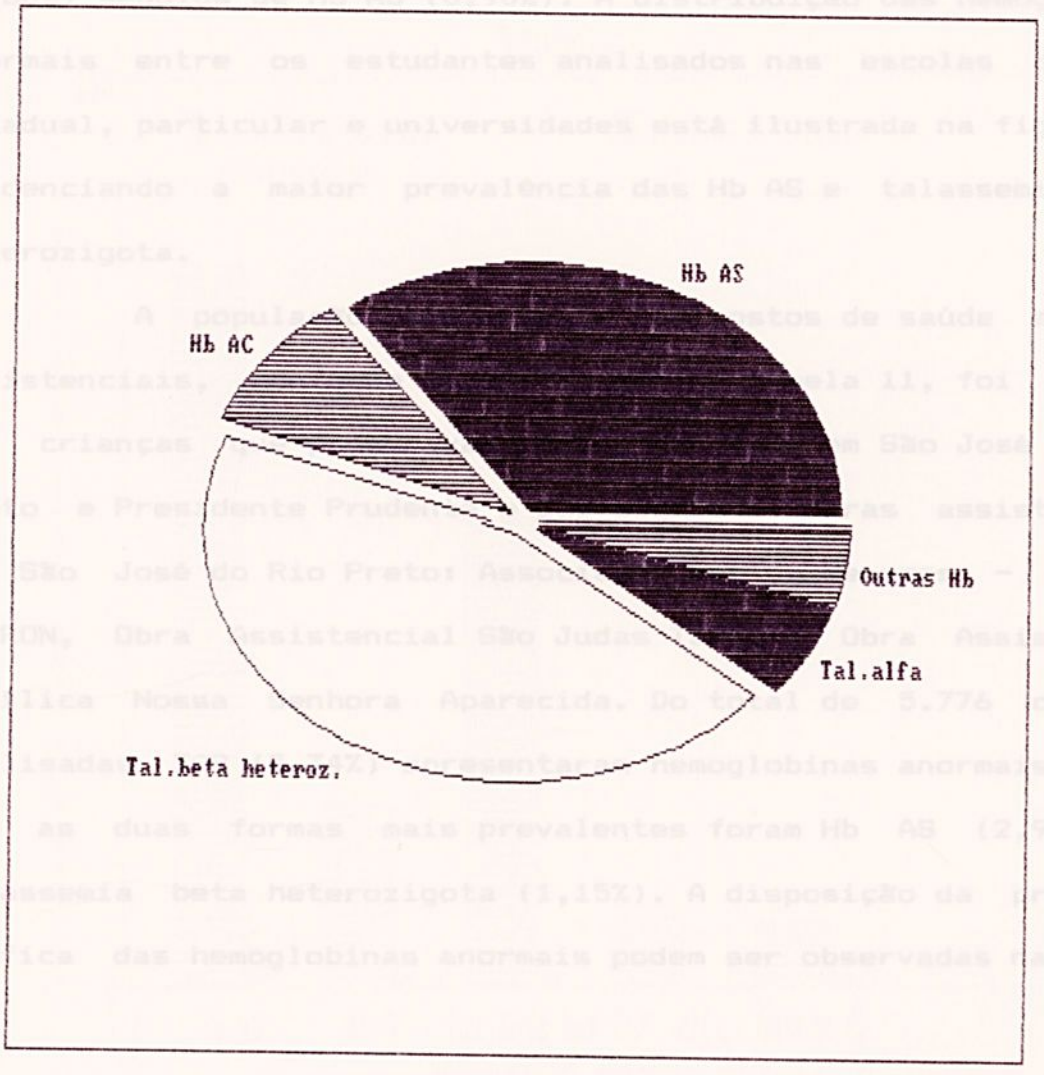


FIGURA 17.- Distribuição gráfica das hemoglobinas variantes e talassemias em pais de portadores de hemoglobinopatias, analisados durante os programas preventivos nas escolas das redes estadual e particular de ensino.

Na população de universitários provenientes da UNESP, Faculdade de Direito e Administração, todas de São José do Rio Preto e da Fundação Educacional de Votuporanga, do total de 2.682 amostras coletadas, 91 delas (3,4%) apresentaram hemoglobinas anormais, com maior frequência de talassemia beta heterozigota (1,60%) seguida de Hb AS (0,90%). A distribuição das hemoglobinas anormais entre os estudantes analisados nas escolas da rede estadual, particular e universidades está ilustrada na figura 18, evidenciando a maior prevalência das Hb AS e talassemia beta heterozigota.

A população proveniente de postos de saúde e obras assistenciais, conforme especificação na tabela 11, foi formada por crianças que procuravam postos de saúde em São José do Rio Preto e Presidente Prudente e das seguintes obras assistenciais de São José do Rio Preto: Associação Lar de Menores - ALARME, ARPRON, Obra Assistencial São Judas Tadeu e Obra Assistencial Basílica Nossa Senhora Aparecida. Do total de 5.776 crianças analisadas 309 (5,34%) apresentaram hemoglobinas anormais sendo que as duas formas mais prevalentes foram Hb AS (2,99%), e talassemia beta heterozigota (1,15%). A disposição da proporção gráfica das hemoglobinas anormais podem ser observadas na figura 19.

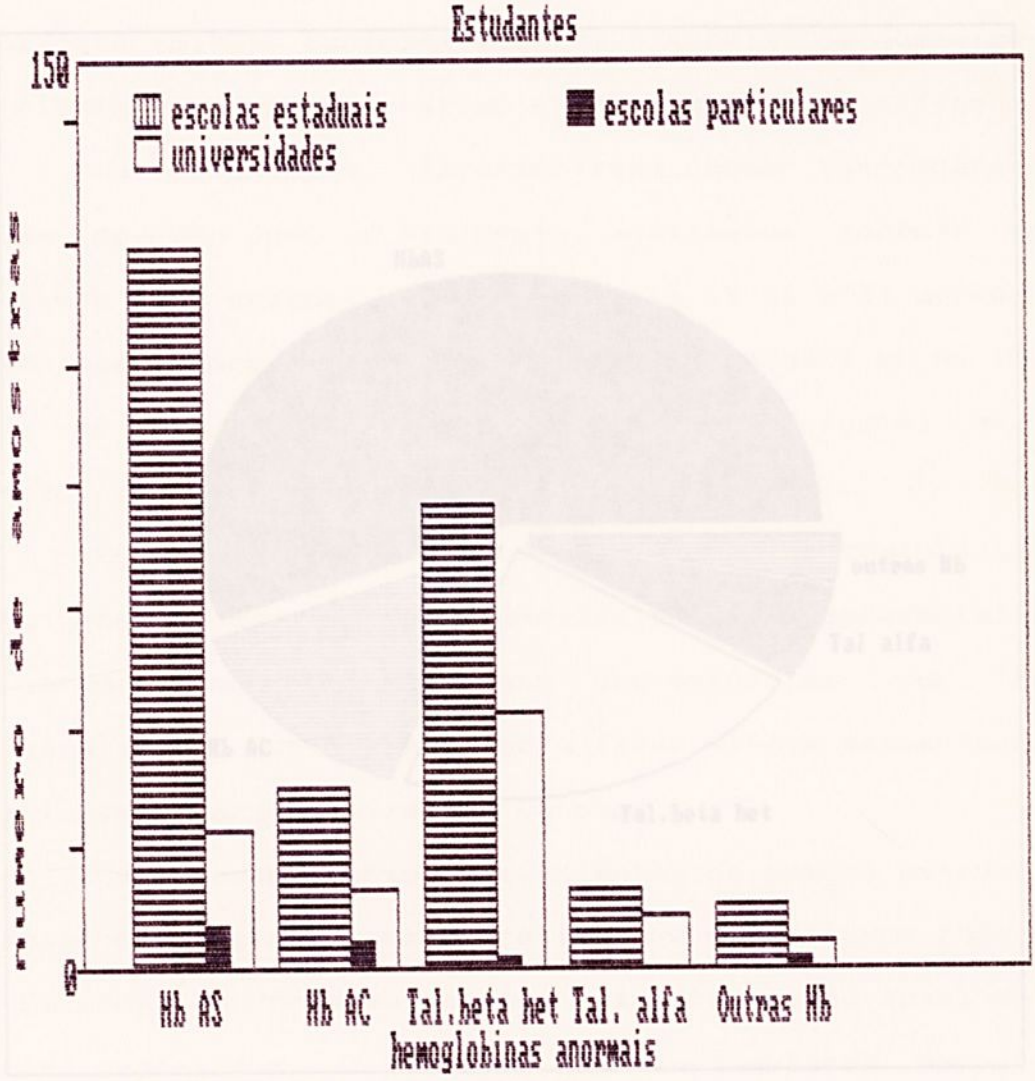


FIGURA 18.- Distribuição gráfica das hemoglobinas variantes e talassemias entre estudantes das escolas das redes estadual e particular e universidades.

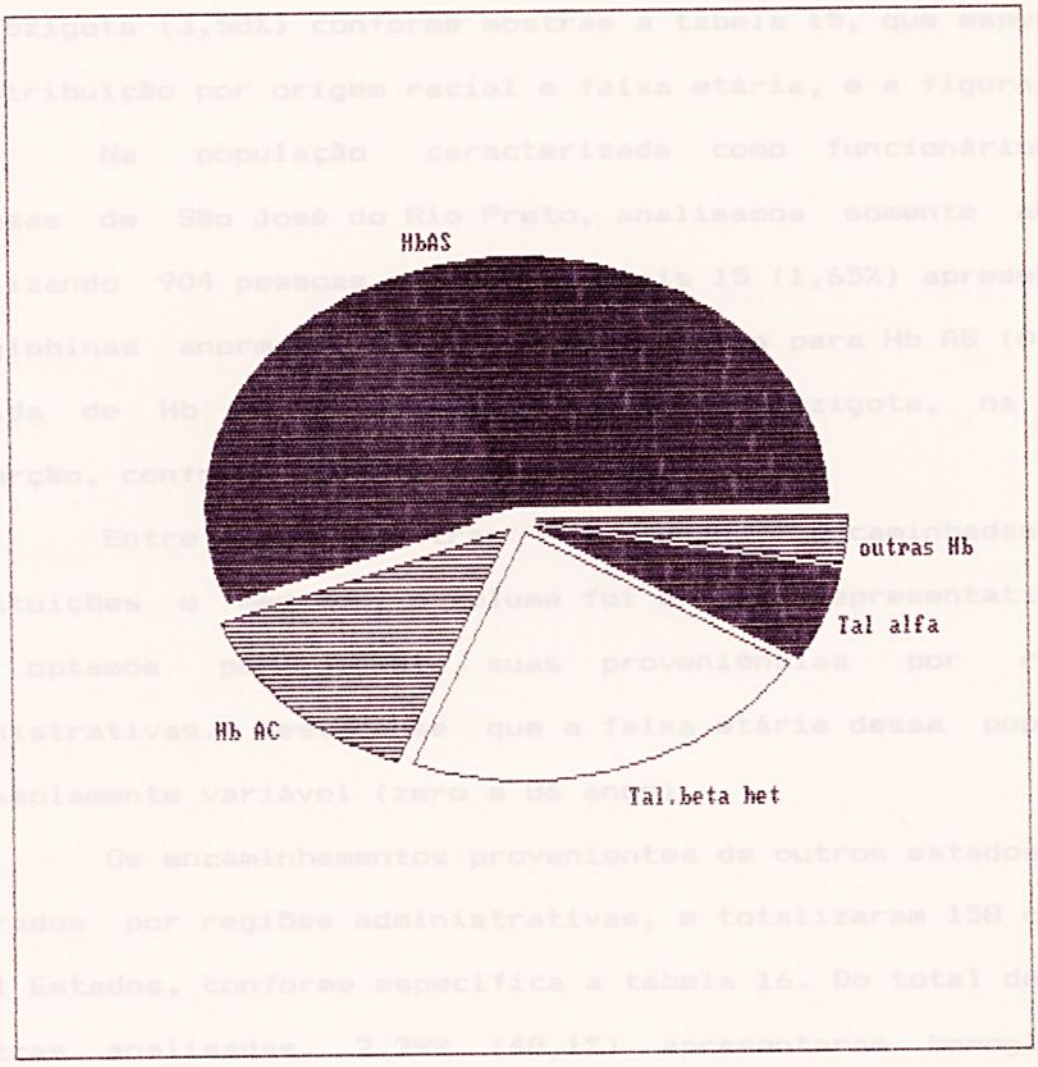


FIGURA 19.- Distribuição de hemoglobinas variantes e talassemias entre usuários de postos de saúde e obras assistenciais.

Durante a campanha de vacinação, realizada em agosto de 1992, analisamos famílias que se dirigiram até um dos postos de vacinação, localizado na UNESP de Rio Preto. Em 363 pessoas analisadas para o diagnóstico de hemoglobinopatias, observou-se que 56 (15,42%) apresentaram hemoglobinas anormais. A talassemia alfa foi a mais prevalente (9,91%) seguida da talassemia beta heterozigota (3,58%) conforme mostram a tabela 15, que especifica a distribuição por origem racial e faixa etária, e a figura 20.

Na população caracterizada como funcionários de empresas de São José do Rio Preto, analisamos somente adultos totalizando 904 pessoas, dentre as quais 15 (1,65%) apresentaram hemoglobinas anormais, com maior prevalência para Hb AS (0,81%), seguida de Hb AC e talassemia beta heterozigota, na mesma proporção, conforme ilustra a figura 21.

Entre as amostras de sangue encaminhadas por instituições e médicos, o volume foi de tal representatividade que optamos por dividir suas proveniências por regiões administrativas. Destaca-se que a faixa etária dessa população foi amplamente variável (zero a 86 anos).

Os encaminhamentos provenientes de outros estados foram separados por regiões administrativas, e totalizaram 158 cidades em 21 Estados, conforme especifica a tabela 16. Do total de 4.773 amostras analisadas, 2.299 (48,1%) apresentaram hemoglobinas anormais, sendo mais prevalentes as formas de talassemias alfa e beta, seguida da Hb AS. Além disso, caracterizamos vinte diferentes genótipos de hemoglobinas variantes e talassemias interativas. Quando comparamos a frequência de hemoglobinas anormais por região administrativa, notamos que a região Norte apresenta maior porcentagem de hemoglobinas anormais (81,8%)

TABELA 15. Resultado das análises para hemoglobinas variantes e talassemias obtido em amostras coletadas durante campanha de vacinação "Sabin", de 22 de agosto de 1992, na UNESP de São José do Rio Preto, SP

TOTAL	AA		AS		AC		Tal.Beta		Tal.Alfa		Total com Hb
analisado	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	anormais
363	307	(84,57)	6	(1,65)	1	(0,27)	13	(3,58)	36	(9,91)	56 (15,42)
CRIANÇAS- 0/15 ANOS											
192	158	(82,29)	4	(2,08)	1	(0,52)	7	(3,64)	22	(11,42)	34 (17,70)
ADULTOS- 16/58 ANOS											
171	149	(87.13)	2	(1,16)	-	-	6	(3,5)	14	(8,18)	22(12,86)
NEGROIDES											
43	37	(80,43)	-	-	-	-	-	-	6	(13,95)	6(13,95)
CAUCASOIDES											
320	270	(84,37)	6	(1,87)	1	(0,31)	13	(4,06)	30	(9,37)	50(15,62)

seguida da região Nordeste com 67,4%. A análise estatística para a presença de hemoglobinas anormais nas diferentes regiões mostrou ser significativa com valores de X^2=49,746 e p < 0,05.

As amostras provenientes de encaminhamentos por médicos, hospitais e laboratórios do Estado de São Paulo, totalizaram 4.038 pessoas de exatamente 100 cidades. Desse total, 45,6% apresentaram hemoglobinas anormais, e a forma mais prevalente foi a talassemia alfa, conforme ilustra a tabela 17. As 100 cidades analisadas estão distribuídas pelas 11 regiões administrativas do estado, sendo que à região 8, que inclui São José do Rio Preto, somaram-se 48 cidades. Nessa região específica foram analisadas 3.612 pessoas e destas, 44% apresentaram hemoglobinas anormais. Nas 10 regiões restantes, 52 cidades foram analisadas e, de 426 pessoas testadas para hemoglobinopatias, 58,7% apresentaram hemoglobinas anormais. Esta diferença foi estatisticamente significativa com valores de X^2= 28,97 e p < 0,05. Os diferentes genótipos encontrados incluem interações de talassemias com hemoglobinas variantes e algumas hemoglobinas raras como Hb Koln e Hb AM Boston. Do total de hemoglobinas anormais encontradas, a talassemia alfa foi a forma mais prevalente (17,8%), seguida da talassemia beta heterozigota (16,3%).

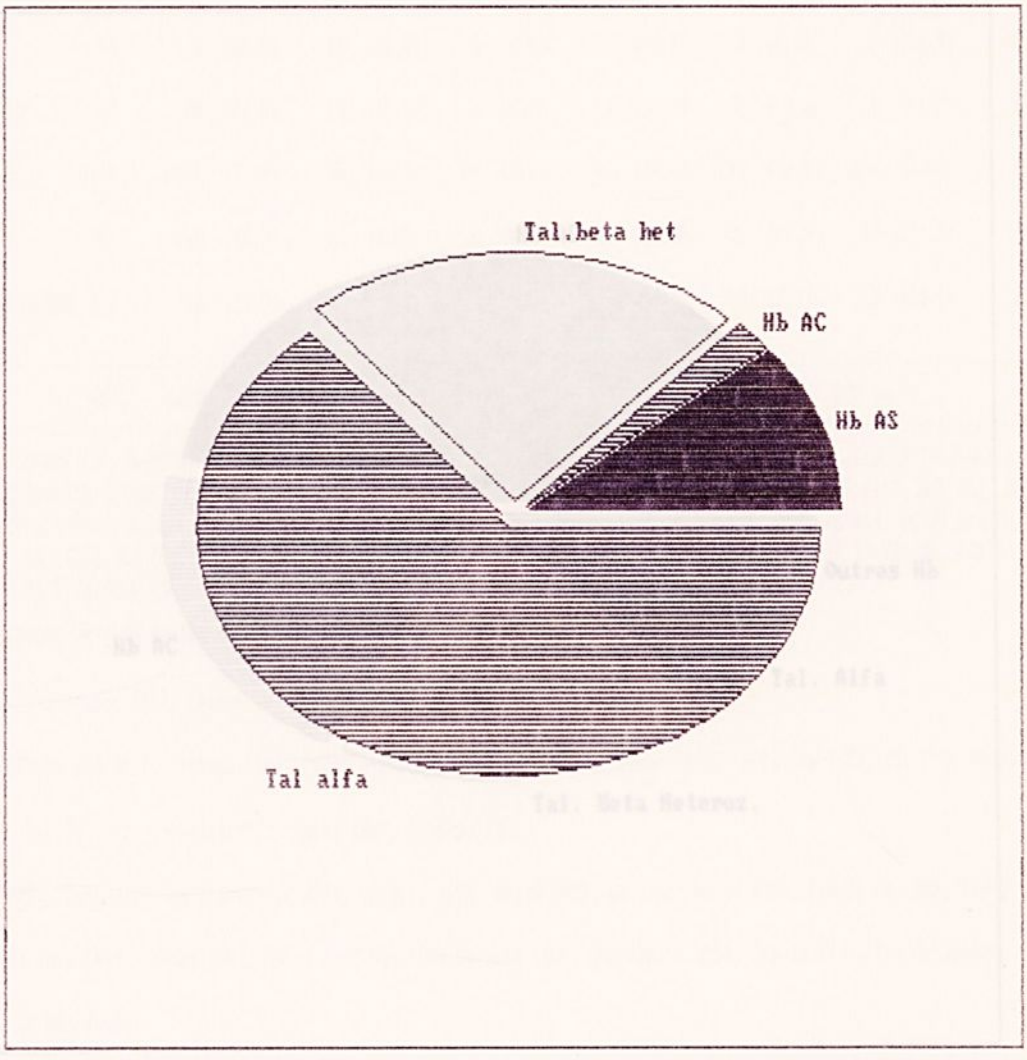


FIGURA 20.- Distribuição gráfica das hemoglobinas variantes e talassemias obtidas durante a campanha de vacinação de 22 de agosto de 1992.

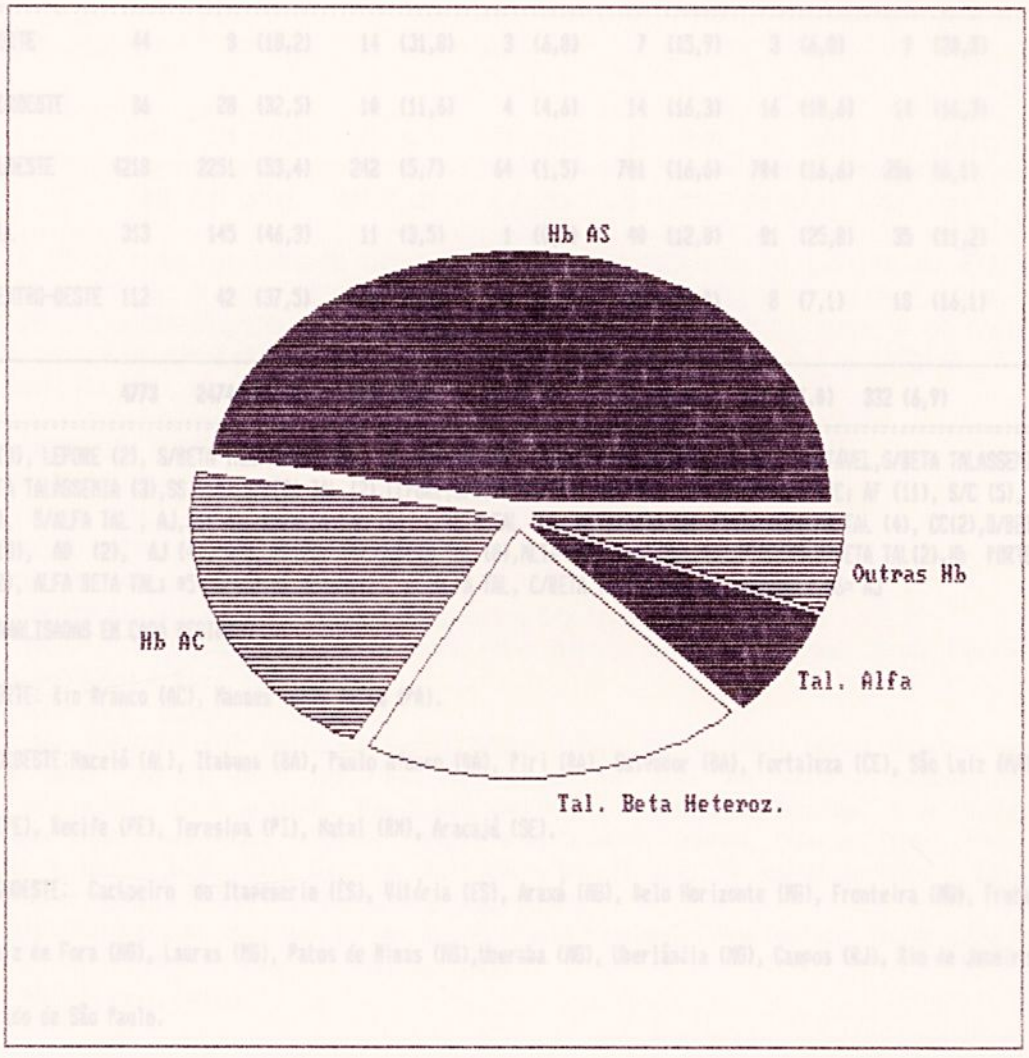


FIGURA 21.- Distribuição gráfica das hemoglobinas variantes e talassemias em funcionários de empresas.

TABELA 16. Resultados das análises para hemoglobinas variantes e talassemias provenientes de emcaminhamentos de outros estados do Brasil, agrupados em regiões administrativas

Procedência	Total analisado	Tipos de hemoglobinas												Observação	Total com Hb anormais	
		AA		AS		AC		TAL. BETA		TAL ALFA		OUTRAS				
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		n	%
REGIÃO NORTE	44	8	(18,2)	14	(31,8)	3	(6,8)	7	(15,9)	3	(6,8)	9	(20,5)	*1	36	(81,8)
REGIÃO NORDESTE	86	28	(32,5)	10	(11,6)	4	(4,6)	14	(16,3)	16	(18,6)	14	(16,3)	*2	58	(67,4)
REGIÃO SUDESTE	4218	2251	(53,4)	242	(5,7)	64	(1,5)	701	(16,6)	704	(16,6)	256	(6,1)	*3	1967	(46,6)
REGIÃO SUL	313	145	(46,3)	11	(3,5)	1	(0,3)	40	(12,8)	81	(25,8)	35	(11,2)	*4	168	(53,7)
REGIÃO CENTRO-OESTE	112	42	(37,5)	8	(7,1)	8	(7,1)	28	(25,0)	8	(7,1)	18	(16,1)	*5	70	(62,5)
TOTAL	4773	2474	(51,8)	285	(6,0)	80	(1,7)	790	(16,5)	812	(17,0)	332	(6,9)		2299	(48,1)

*1= AF (3), LEPORE (2), S/BETA TALASSEMIA (3), SS; *2= METAHb , AS/ALFA TALASSEMIA,AO,S/C, INSTÁVEL,S/BETA TALASSEMIA(4); *3=AF (5),SF, AJ,AS/ALFA TALASSEMIA (3),SS (10),D/BETA TAL (2),LEPORE,S/BETA TAL (4),INSTÁVEL (2),METAHb(2),S/C; AF (11), S/C (5), METAHb (21), S/BETA TAL (24), S/ALFA TAL , AJ,SS(34), AS/ALFA TAL (5), C/BETA TAL (5), ALFA/BETA TAL (15), AC/ALFA TAL (4), CC(2),D/BETA TAL, AM BOSTON, INSTÁVEL(8), AO (2), AJ (4), AO2, AN(2). *4= S/BETA TAL (8),METAHb(5),INSTÁVEL(4),SS,AF(6),D/BETA TAL(2),Hb PORTO ALEGRE,S/C,AO(2), LEPORE (2), ALFA BETA TAL; *5= AF(5),SS,METAHb(2), AS/ALFA TAL, C/BETA TAL(4),S/C,CC,INSTÁVEL; *6= AJ

CIDADES ANALISADAS EM CADA REGIÃO

REGIÃO NORTE: Rio Branco (AC), Manaus (AM), Belém (PA).

REGIÃO NORDESTE:Maceió (AL), Itabuna (BA), Paulo Afonso (BA), Piri (BA), Salvador (BA), Fortaleza (CE), São Luiz (MA), João Pessoa (PB), Caruaru (PE), Recife (PE), Teresina (PI), Natal (RN), Aracajú (SE).

REGIÃO SUDESTE: Cachoeiro do Itapemerim (ES), Vitória (ES), Araxá (MG), Belo Horizonte (MG), Fronteira (MG), Frutal (MG), Itapagipe (MG), Juiz de Fora (MG), Lauras (MG), Patos de Minas (MG),Uberaba (MG), Uberlândia (MG), Campos (RJ), Rio de Janeiro (RJ), Terezópolis (RJ), Estado de São Paulo.

REGIÃO SUL: Cascavel (PR), Curitiba (PR), Londrina (PR), Maringa (PR), Paranavaí (PR),Itajaí (RS), Maraú (RS), Passo Fundo (RS), Porto Alegre (RS), São Josquim (RS), Santa Maria (RS), Criciuma (SC), Florianópolis (SC), Joinville (SC).

REGIÃO CENTRO-OESTE:Brasília (DF), Araguaiana (GO), Bom Jesus do Goias (GO), Goiânia (GO), Itumbiara (GO), Amambaí (MT), Cuiabá (MT), Rondonópolis (MT), Água Clara (MS), Campo Grande (MS), Paranaíba (MS), Araguaí (TO).

TABELA 17. Resultados das análises para hemoglobinas variantes e talassemias provenientes de encaminhamentos do Estado de São Paulo, separado por regiões administrativas.

Procedência	Total analisado	Tipos de hemoglobinas												Total com Hb anormais	
		AA		AS		AC		TAL. BETA		TAL ALFA		OUTRAS		Observação	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		n	%
REGIÃO 8 S.J.Rio Preto	3612	2021	(56,0)	182	(5,0)	37	(1,02)	579	(16,0)	645	(17,9)	148	(4,1)	*1	1591	(44,0)
Outras Regiões do Estado	426	176	(41,3)	25	(5,9)	24	(5,6)	81	(19.0)	45	(10,6)	75	(17,6)	*2	250	(58,7)
TOTAL	**4038**	**2197**	**(54,4)**	**207**	**(5,12)**	**61**	**(1,51)**	**660**	**(16,3)**	**690**	**(17,8)**	**223**	**(5,52)**		**1841**	**(45,6)**

*1=AF (11), S/C (5), METAHb (21), S/BETA TAL (24), S/ALFA TAL , AJ,SS(34), AS/ALFA TAL (5), C/BETA TAL (5), ALFA/BETA TAL (15), AC/ALFA TAL (4), CC(2),D/BETA TAL, AM BOSTON, INSTÁVEL(8), AD (2), AJ (4), AB2, AN(2).=CC (2), AI (6), AJ (4), S/ALFA TAL, METAHb (4) , D/BETA TAL, INSTÁVEL (6), Hb CONSTANT SPRING (2), AF (3),HASHARON, S/BETA TAL, AD, AN. *2= S/C (3), METAHb, AF (2), C/ALFA TAL , CC, INSTÁVEL (2).S/BETA TAL (2),S/C, S/ALFA TAL, C/BETA TAL, METAHb , INSTÁVEL.ALFA /BETA TAL. S/BETA TAL, AI, C/BETA TAL. AF, SS. LEPORE. S/BETA TAL, SS, S/ALFA TAL. SS(2), S/C, AJ(2). METAHb, C/BETA TAL, S/BETA TAL.

REGIÕES ADMINISTRATIVAS DO ESTADO DE SÃO PAULO - CIDADES ANALISADAS EM CADA REGIÃO

REGIÃO 1- GRANDE SÃO PAULO= Mogi das Cruzes, Santo André, São Bernardo do Campo, São Paulo

REGIÃO 2- LITORAL= Santos

REGIÃO 3- VALE DO PARAÍBA= São José dos Campos, Taubaté

REGIÃO 4- SOROCABA= Sorocaba

REGIÃO 5- CAMPINAS= Campinas, Limeira, Piracicaba, Santa Barbara D'Oeste, São José do Rio Pardo

REGIÃO 6- RIBEIRÃO PRETO= Araraquara, Barretos, Bebedouro, Colina,Itápolis, Jaboticabal, Jaborandi, Kococa, Ribeirão Preto, Santa Lucia, São Carlos, São Josquim da Barra, Taquaritinga

REGIÃO 7- BAURÚ= Baurú , Iacanga,Lins, Pongaí

REGIÃO 8- SÃO JOSÉ DO RIO PRETO= Adolfo, Bady Bassitt, Balsamo, Barbosa, Castilho,Cedral, Estrela D'Oeste, Fernandópolis, Floreal, Gonzaga de Campos, Guapiaçú, Ibirá, Icem,Ipiguá, Irapuã, Itajobi, Jaci ,Jales, José Bonifácio, Kacaubal, Marinópolis, Mendonça, Mirassol, Mirassolândia, Monte Aprazível, Nova Aliança, Nova Granada, Nhandeara, Nova Itapirema, Neves Paulista, Novo Horizonte, Olímpia, Onda Branca, Onda Verde, Palestina, Paulo de Faria, Paranapuã, Pindorama, Planalto, Poloni, Pontes Gestal, Populina, Potirendaba, Riolândia, Sales, Santa Albertina, Santa Adélia, Santa Fé do Sul, São José do Rio Preto , Sebastianópolis do Sul, Severínia, Tanabi, Uchoa, União Paulista, Urupês, Votuporanga, Zacarias

REGIÃO 9- ARAÇATUBA= Araçatuba , Auriflama, Birigui, General Salgado, Miranópolis ,Nova Luzitânia, Penápolis, Sud Mennci

REGIÃO 10- PRESIDENTE PRUDENTE= Pirapozinho, Presidente Prudente

REGIÃO 11- MARÍLIA= Assis, Marília.

As análises efetuadas em doadores de sangue e recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto, no período compreendido entre 1990 e 1992, mostrou que em 7.403 doadores testados 4,60% deles apresentaram hemoglobinas anormais, sendo a Hb AS a forma mais prevalente (2,0%) seguida da talassemia alfa (1,17%). Entre os 1.208 recém-nascidos pesquisados 7,20% apresentaram hemoglobinas anormais e a forma mais prevalente foi a talassemia alfa (5,62%) confirmada através da presença de Hb Bart's na eletroforese e agregados intraeritrocitários de Hb H na análise citológica.

As talassemias beta não aparecem na tabela 11 devido ao fato dos casos suspeitos não terem retornado ao nosso laboratório para testes confirmatórios. A figura 22 ilustra a distribuição das hemoglobinas anormais nestas duas populações.

Quando observamos as diferentes populações com relação à origem racial notamos que dos 16.289 caucasóides testados 2,35% apresentaram hemoglobinas anormais, e entre 1.256 negróides 9,31% apresentaram anormalidades, conforme ilustram as tabelas 18 e 19. A diferença com relação aos totais de analisados nas populações deve-se ao fato de que nem todas as amostras testadas apresentaram a especificação para o tipo de cor de pele.

A prevalência dos diferentes fenótipos encontrados nas diversas populações, listadas na tabela 19, e separados segundo a origem racial, mostra que entre os escolares da rede estadual a talassemia beta heterozigota foi mais prevalente entre os caucasóides, enquanto que entre os negróides prevaleceu a Hb AS. A figura 23 ilustra esta distribuição. Entre os escolares da rede particular de ensino a Hb AS foi mais prevalente entre os caucasóides e, entre os negróides apenas um caso de Hb AC foi

detectado. Entre os universitários a talassemia beta heterozigota foi mais frequente entre os caucasóides e a Hb AS entre os negróides, conforme ilustra a distribuição gráfica na figura 24.

Na população proveniente de postos de saúde e obras assistenciais, apenas 539 pessoas apresentaram especificação para origem racial. Destas, 340 eram caucasóides e 199 negróides. Entre os caucasóides a talassemia alfa foi a forma mais prevalente (2,05%), enquanto que entre os negróides a Hb AS foi a forma mais frequente (8,50%) conforme ilustra a figura 25.

A talassemia alfa foi a forma de hemoglobina anormal mais frequente, tanto em negróides quanto em caucasóides, nas famílias analisadas durante a campanha de vacinação, conforme demonstra a figura 26.

Entre os funcionários de empresas e outras entidades a Hb AS foi a forma de hemoglobina anormal mais frequente, tanto em negróides quanto em caucasóides, segundo ilustra a figura 27.

Para os pais de portadores, entre os caucasóides a forma mais prevalente foi a talassemia beta heterozigota, e entre os negróides foi a Hb AS. A figura 28 ilustra esta distribuição.

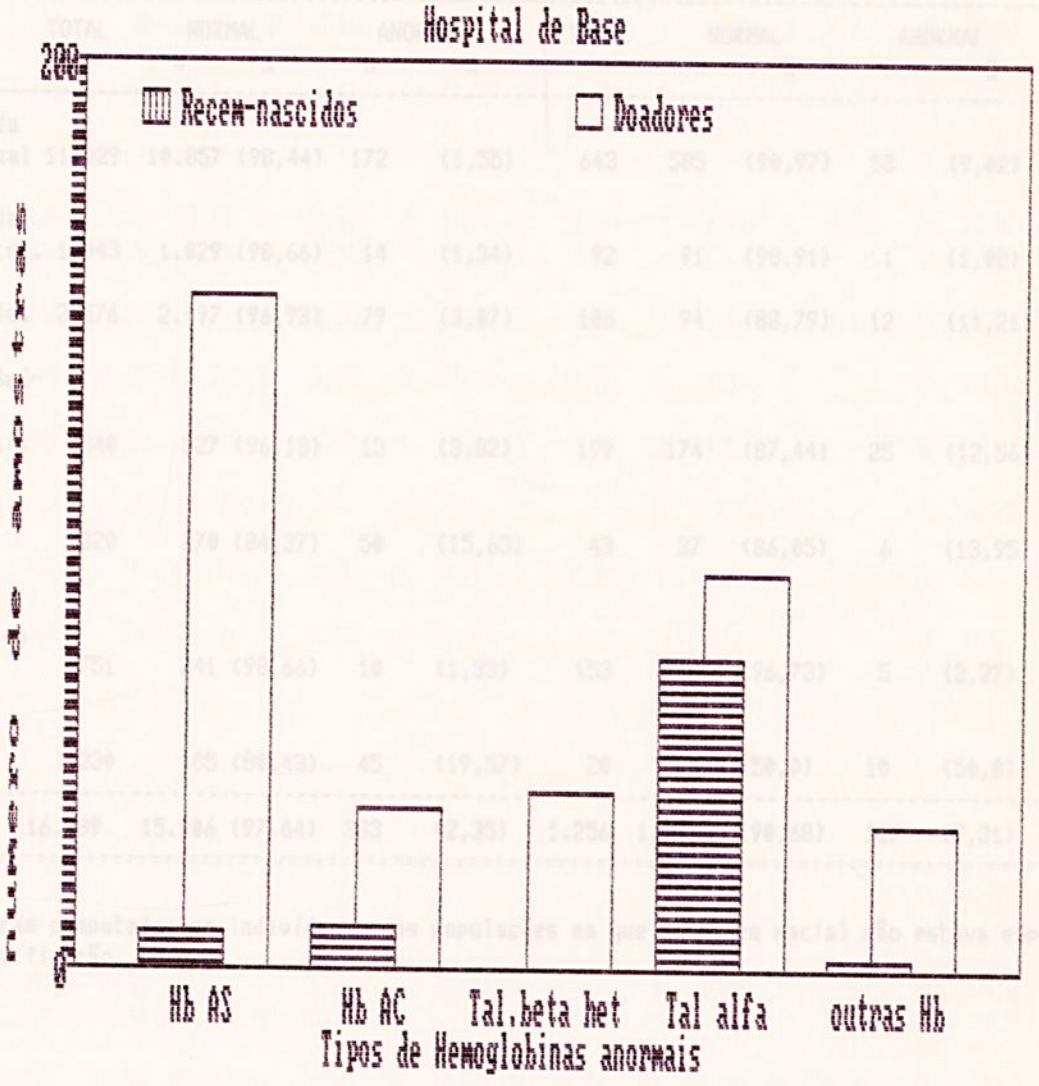


FIGURA 22.- Distribuição gráfica das hemoglobinas variantes e talassemias entre doadores e recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP.

TABELA 18. Resultados da prevalência de hemoglobinas anormais entre caucasóides e negróides nas diferentes populações analisadas

POPULAÇÕES ANALISADAS	CAUCASÓIDE					NEGRÓIDE				
	TOTAL	NORMAL		ANORMAL		TOTAL	NORMAL		ANORMAL	
		N	%	N	%		N	%	N	%
Escolares da rede estadual	11.029	10.857	(98,44)	172	(1,55)	643	585	(90,97)	58	(9,02)
Escolares da rede particul.	1.043	1.029	(98,66)	14	(1,34)	92	91	(98,91)	1	(1,08)
Universidades	2.576	2.497	(96,93)	79	(3,07)	106	94	(88,79)	12	(11,21)
Postos de Saúde e obras assistenciais	340	327	(96,18)	13	(3,82)	199	174	(87,44)	25	(12,56)
Campanha de vacinação	320	270	(84,37)	50	(15,63)	43	37	(86,05)	6	(13,95)
Empresas e outras entidades	751	741	(98,66)	10	(1,33)	153	148	(96,73)	5	(3,27)
Pais de portadores	230	185	(80,43)	45	(19,57)	20	10	(50,0)	10	(50,0)
TOTAL	**16.289**	**15.906**	**(97,64)**	**383**	**(2,35)**	**1.256**	**1.139**	**(90,68)**	**117**	**(9,31)**

OBS: Não foram computados os indivíduos e as populações em que a origem racial não estava especificada na sua identificação.

TABELA 19. Resultado da prevalência de hemoglobinas variantes e talassemias nas diversas populações analisadas, separadas por origem racial

POPULAÇÃO		TOTAL ANALISADO	TIPOS DE HEMOGLOBINAS												TOTAL COM Hb ANORMAIS	
			AA		AS		AC		TAL.BETA		TAL.ALFA		OUTRAS Hb			
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Escolares da rede estadual	C	11.029	10.857	(98,44)	65	(0,58)	18	(0.16)	68	(0,61)	12	(0,10)	9	(0,08)	172	(1,55)
	N	643	585	(90,97)	43	(6,68)	10	(1,55)	2	(0,31)	1	(0,15)	2	(0,31)	58	(9,02)
Escolares da rede particular	C	1.043	1.029	(98,6)	7	(0,67)	3	(0,28)	2	(0,19)	-	-	2	(0,19)	14	(1,34)
	N	92	91	(98,9)	-	-	1	(1,08)	-	-	-	-	-	-	1	(1,08)
Universidades	C	2.576	2.497	(96,9)	16	(0,62)	9	(0,34)	41	(1,59)	9	(0,34)	4	(0,15)	79	(3,06)
	N	106	94	(88,8)	7	(6,50)	4	(3,70)	1	(0,93)	-	-	-	-	12	(11,2)
Postos de saúde e ob.assist.	C	340	327	(96,2)	2	(0,60)	1	(0,30)	2	(0,60)	7	(2,05)	1	(0,30)	13	(3,82)
	N	199	174	(87,4)	17	(8,50)	1	(0,50)	2	(1,00)	5	(2,50)	-	-	25	(12,5)
Campanha de vacinação	C	320	270	(84,37)	6	(1,87)	1	(0,31)	13	(4,06)	30	(9,37)	-	-	50	(15,62)
	N	43	37	(80,43)	-	-	-	-	-	-	6	(13,95)	-	-	6	(13,95)
Empresas e outras entidades	C	751	741	(98,80)	4	(0,50)	1	(0,40)	3	(0,40)	1	(0,13)	1	(0,13)	10	(1,19)
	N	153	148	(96,7)	3	(1,90)	2	(1,30)	-	-	-	-	-	-	5	(3,30)
Encaminhamentos Brasil		*														
Encaminhamentos São Paulo		*														
Hospital de Base		*														
Pais de portadores	C	230	185	(80,4)	9	(3,91)	5	(2,17)	25	(10,9)	3	(1,30)	3	(1,30)	45	(19,6)
	N	20	10	(50,0)	10	(50,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	10	(50,0)
TOTAL	C	16.289	15.906	(97,64)	109	(0,66)	38	(0,23)	154	(0,94)	62	(0,38)	20	(0,12)	383	(2,35)
	N	1.256	1,139	(90,68)	80	(6,36)	18	(1,43)	5	(0,39)	12	(0,95)	2	(0,15)	117	(9,31)

OBS: Não foram computados os indivíduos em que a origem racial não estava especificada na sua identificação.
* :Populações onde não foi possível identificar a origem racial com exatidão.
C : Caucasóides
N : Negróides

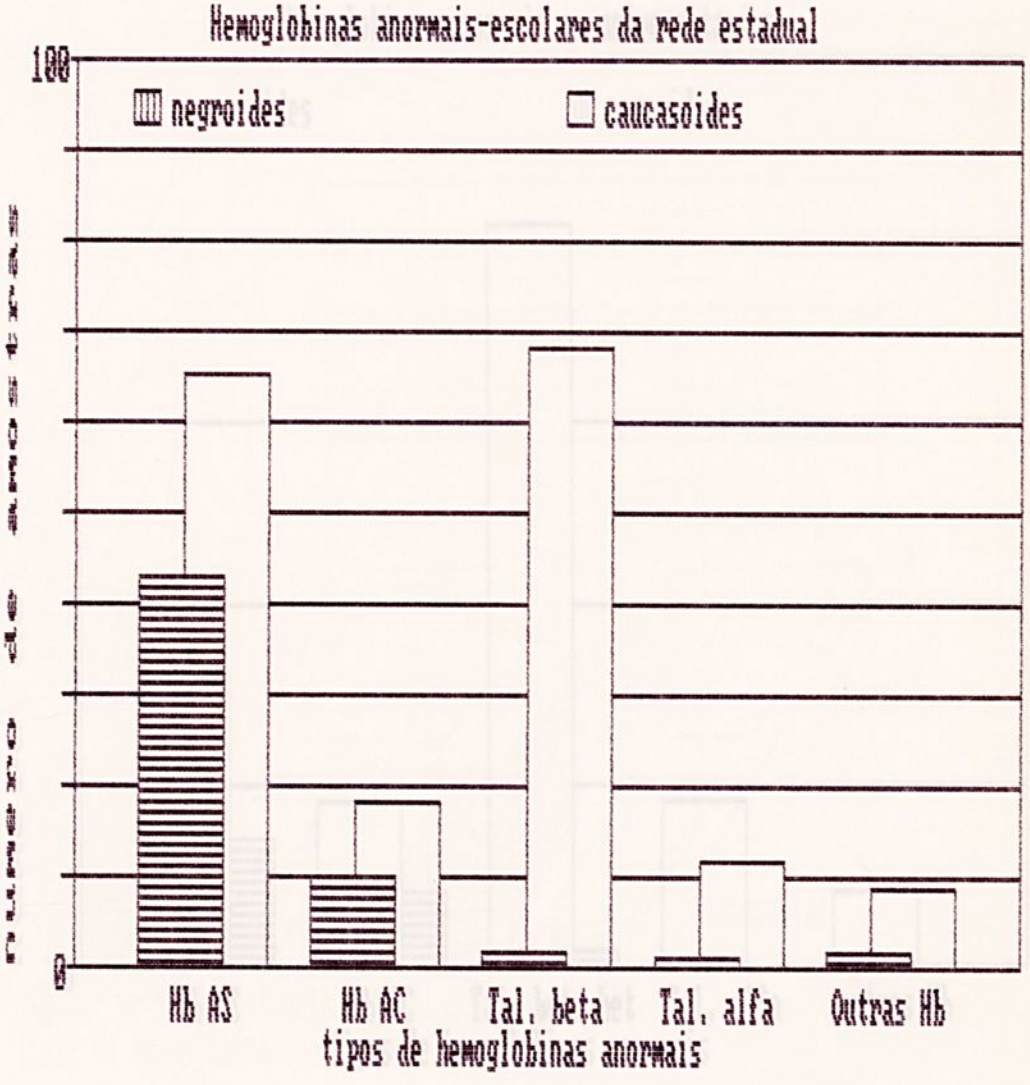


FIGURA 23.- Distribuição gráfica das hemoglobinas variantes e talassemias entre caucasóides e negróides em escolares da rede Estadual.

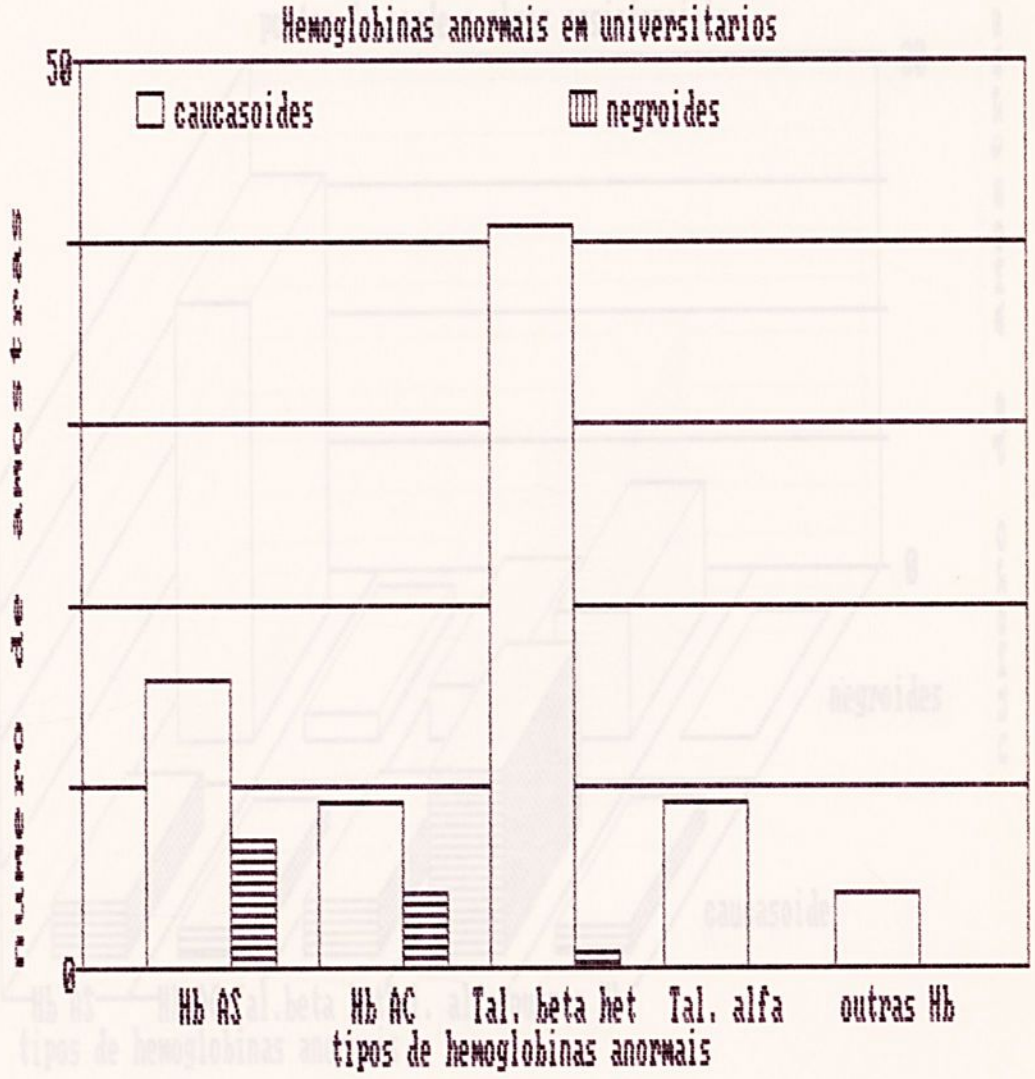


FIGURA 24.- Distribuição gráfica das hemoglobinas variantes e talassemias entre universitários separados por origem racial.

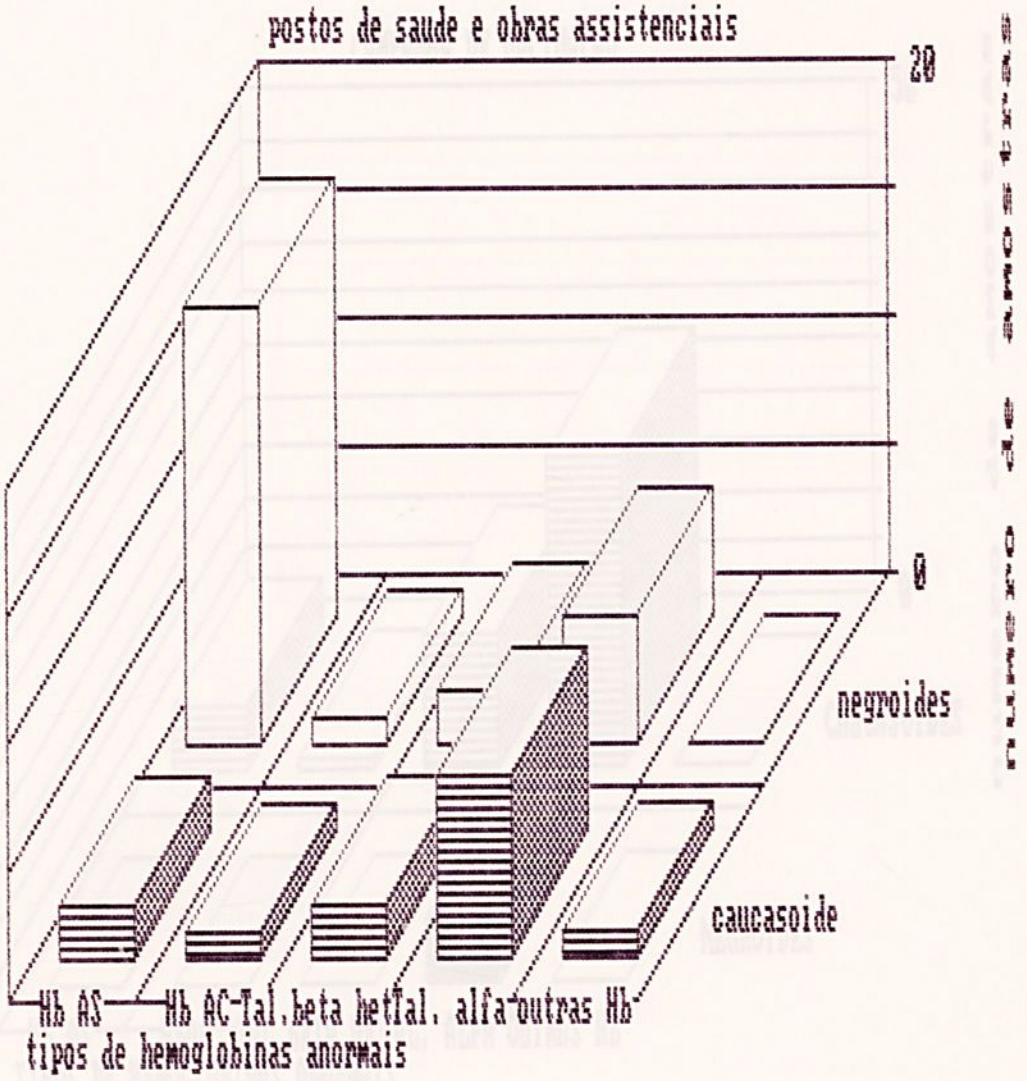


FIGURA 25.- Distribuição gráfica de hemoglobinas variantes e talassemias em postos de saúde e obras assistenciais, separados por origem racial.

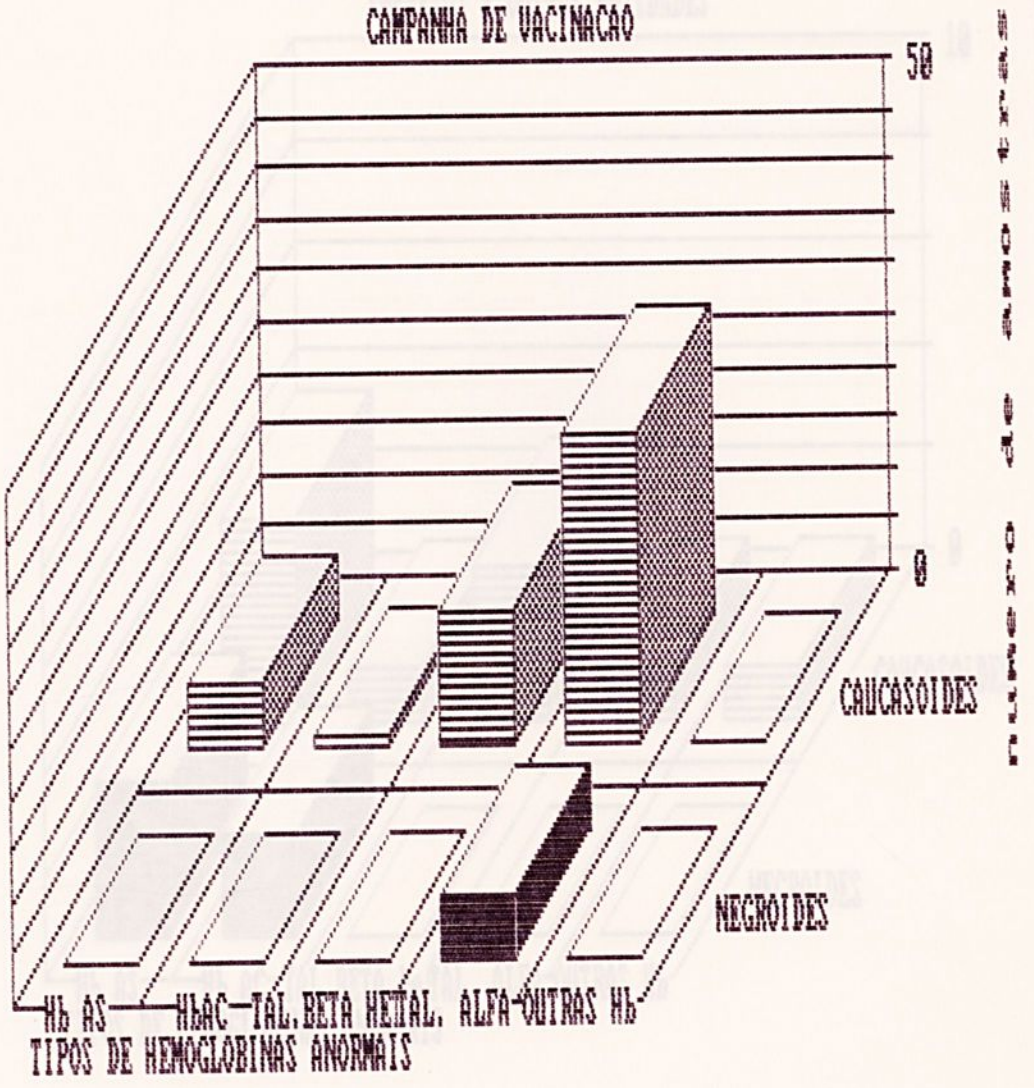


FIGURA 26.- Distribuição gráfica das hemoglobinas variantes e talassemias em famílias analisadas durante a Campanha de vacinação, separadas por origem racial.

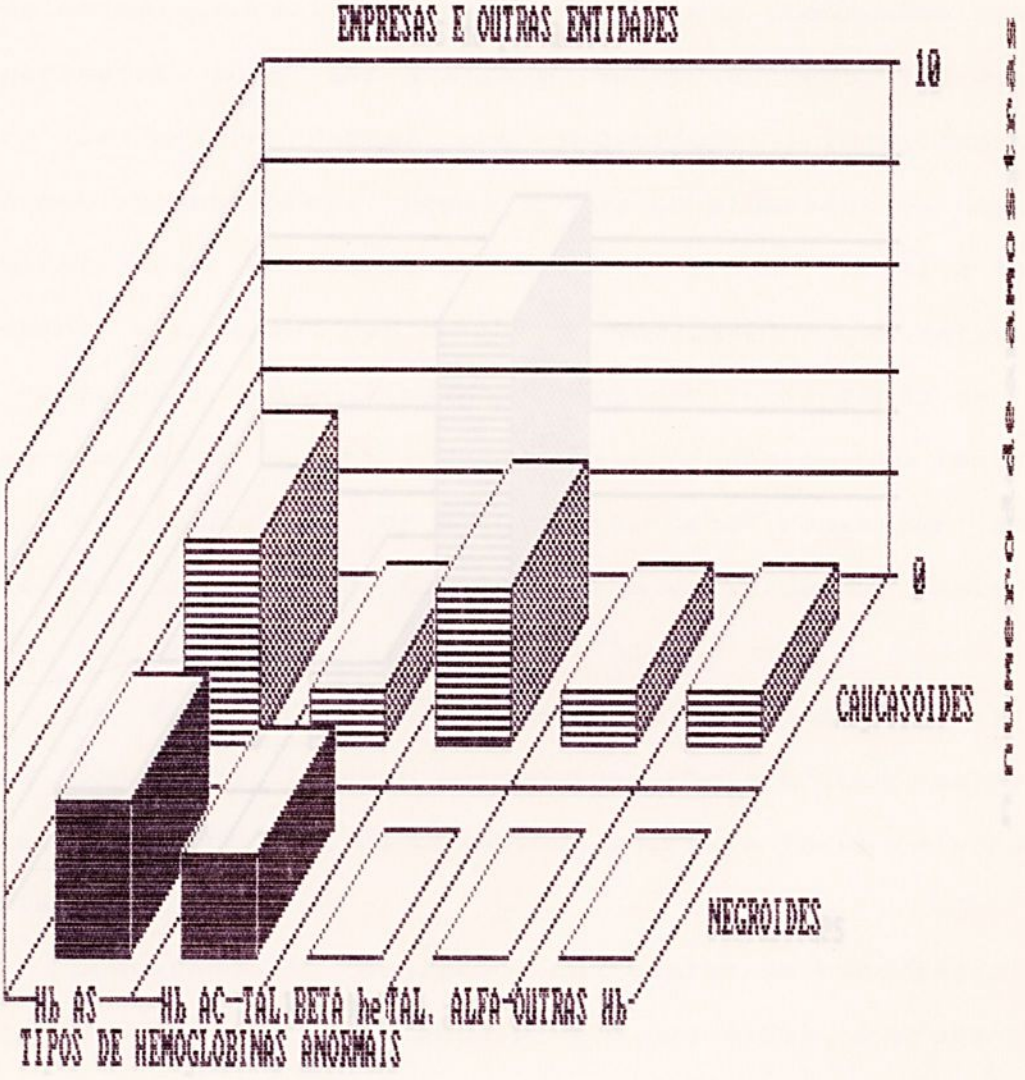


FIGURA 27.- Distribuição gráfica das hemoglobinas variantes e talassemias em funcionários de empresas, separados por origem racial.

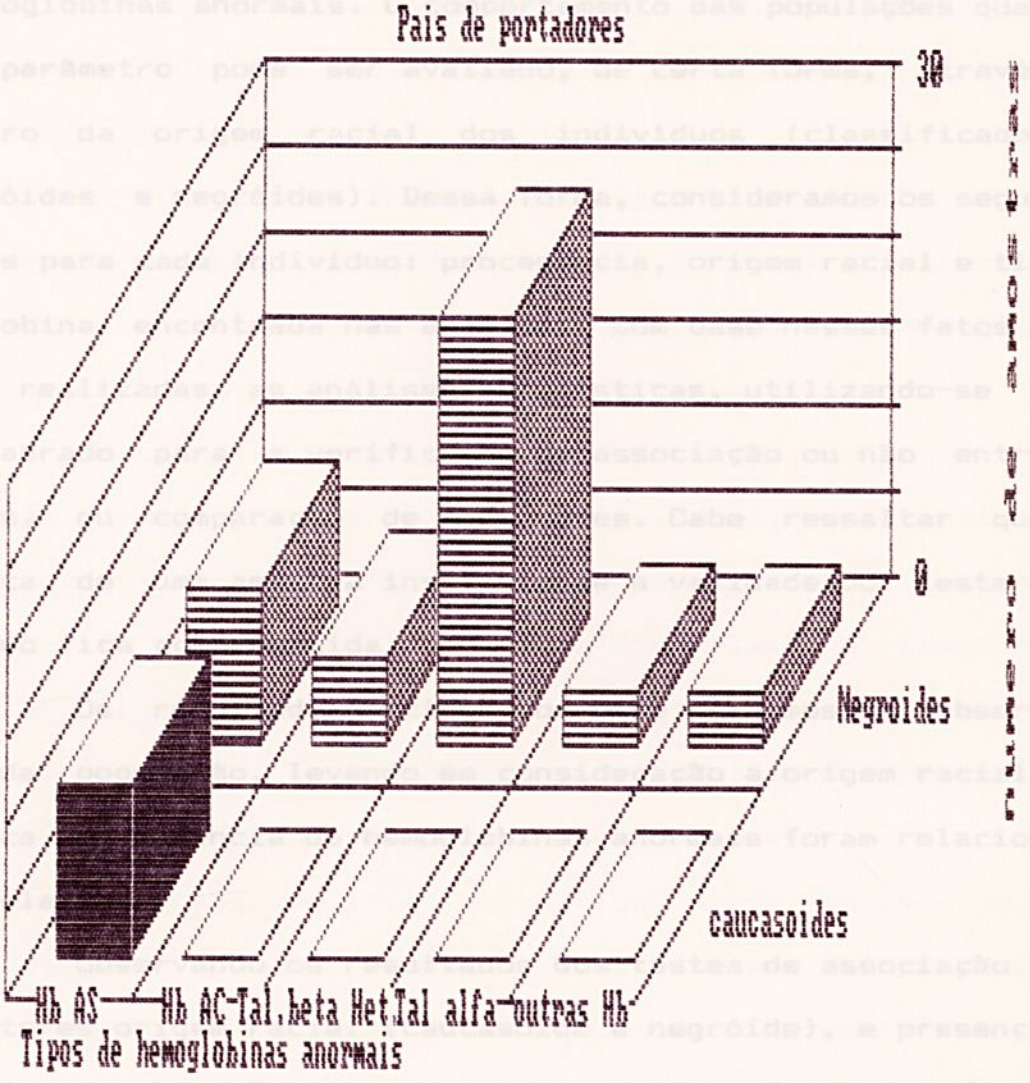


FIGURA 28.- Distribuição gráfica das hemoglobinas variantes e talassemias em pais de portadores de hemoglobinopatias, separados por origem racial.

ANALISE ESTATISTICA DOS RESULTADOS

Os dados desse trabalho são provenientes de registros envolvendo vários tipos de populações, podendo essas serem diferenciadas sob vários aspectos, sendo um deles a prevalência de hemoglobinas anormais. O comportamento das populações quanto a esse parâmetro pode ser avaliado, de certa forma, através do registro da origem racial dos indivíduos (classificados em caucasóides e negróides). Dessa forma, consideramos os seguintes fatores para cada indivíduo: procedência, origem racial e tipo de hemoglobina encontrada nas análises. Com base nesses fatos é que foram realizadas as análises estatísticas, utilizando-se teste qui-quadrado para a verificação de associação ou não entre os fatores, ou comparação de proporções. Cabe ressaltar que na presença de uma amostra insuficiente a validade do teste qui-quadrado fica comprometida.

Os resultados obtidos com base nas amostras observadas em cada população, levando em consideração a origem racial e a presença ou ausência de hemoglobinas anormais foram relacionados na tabela 20.

Observando os resultados dos testes de associação entre os fatores origem racial (caucasóide e negróide), e presença ou ausência de hemoglobinas anormais dentro de cada população estudada, constatamos que para os indivíduos de escolas da rede estadual há uma forte associação entre a origem racial e o tipo de hemoglobinopatia. Esse fato pode ser verificado através da probabilidade de significância calculada a partir da estatística qui-quadrado ($p<0,001$ - altamente significativo), observando-se uma diferença significativa entre a proporção de negróides com

hemoglobinas anormais e caucasóides com hemoglobinas anormais, 8,88% e 1,45% respectivamente.

Resultado semelhante observamos entre os usuários de postos de saúde, onde 10,31% dos negróides, e 1,08% dos caucasóides apresentaram hemoglobinas anormais. Tal diferença foi significativa em um nível inferior a 0,001. Quanto às demais populações nada se pôde concluir com base nas amostras disponíveis, devido ao número insuficiente.

Outro aspécto interessante na exploração dos dados foi a comparação das populações duas a duas. A tabela 21 apresenta os cruzamentos entre as populações e a proporção de hemoglobinas anormais com os respectivos cálculos de qui-quadrado.

Da análise dos resultados pôde-se constatar que a população formada por escolares (rede estadual, rede particular e universidades), apresenta uma diferença significativa da proporção de hemoglobinas anormais com relação à campanha de vacinação, postos de saúde e doadores de sangue, sendo que entre os escolares há uma proporção inferior de casos de hemoglobinas anormais, (como mostram os cruzamentos 2, 3 e 4).

A população de postos de saúde apresentou uma diferenciação estatisticamente significativa das Empresas e Recém-nascidos, sendo que as duas últimas apresentaram menor número de portadores de hemoglobinas anormais (cruzamentos 6 e 9).

TABELA 20. Cálculo estatístico e valor da probabilidade de significância do teste qui-quadrado, nas populações onde a origem racial estava determinada.

população	origem racial: caucasóide Ausência %	caucasóide Presença %	negróide Ausência %	negróide Presença %	X^2	P
Campanha de vacinação	93,10	6,90	100,0	0,0	*	-
Empresas	98,80	1,20	96,73	3,27	*	-
Escolas particulares	98,66	1,34	98,91	1,09	*	-
Escolas estaduais	98,55	1,45	91,12	8,88	183,16	0,001(s)
Postos de saúde	98,20	1,80	89,69	10,31	18,92	0,001(s)
Universidades	97,27	2,73	88,68	11,32	*	-

* Não é apropriada a utilização do teste qui-quadrado em função do tamanho da amostra ser insuficiente para garantir o resultado.
(s)- valor significativo a um nível inferior a 1%
Ausência = corresponde à ausência de hemoglobinas anormais
Presença = corresponde à presença de hemoglobinas anormais

TABELA 21. Qui-quadrado e probabilidade para o teste de igualdade de proporções.

Cruzamento	populações		X^2	Probabilidade
1	Escolares x Empresas			
	1,97%	1,55%	0,775	0,379
2	Escolares x Campanha			
	1,97%	6,12%	27,434	0,000 (s)
3	Escolares x P.Saúde			
	1,97%	4,93%	22,195	0,000 (s)
4	Escolares x Doadores			
	1,97%	3,47%	47,094	0,000 (s)
5	Escolares x R.N			
	1,97%	1,67%	0,500	0,480
6	Empresas x P. Saúde			
	1,55%	4,93%	14,009	0,000 (s)
7	Campanha x P. Saúde			
	6,12%	4,93%	0,554	0,457
8	Doadores x P. Saúde			
	3,47%	4,93%	3,051	0,081
9	P.Saúde x R. N.			
	4,93%	1,67%	14,644	0,000 (s)
10	Campanha x Empresas			
	6,12%	1,55%	18,620	0,000 (s)
11	Campanha x Doadores			
	6,12%	3,47%	6,332	0,012 (s)
12	Campanha x R. N.			
	6,12%	1,67%	19,441	0,000 (s)
13	Empresas x Doadores			
	1,55%	3,47%	9,408	0,001 (s)
14	Empresas x R. N.			
	1,55%	1,67%	0,043	0,836
15	Doadores x R. N.			
	3,47%	1,67%	10,287	0,001 (s)
16	Velho x Novo *			
	2,04%	3,34%	40,314	0,001 (s)

(s) valor significativo a 5%
* comparação entre os métodos de análise antigos e novos
P.Saúde = postos de saúde e obras assistenciais;
R.N. = recém-nascidos.

Pôde-se destacar através dos resultados da análise estatística que a população designada por campanha de vacinação mostrou maior índice de portadores de hemoglobinas anormais (6,12%) e na comparação com as outras populações, verificou-se que somente com postos de saúde apresentou uma porcentagem cuja diferença não se mostrou significativa (cruzamentos 7, 10, 11 e 12).

No cruzamento 15 observa-se uma maior proporção de hemoglobinas anormais entre os doadores, quando comparados aos recém-nascidos, com diferença estatisticamente significativa, porém, os casos de talassemias alfa, muito frequentes entre os recém-nascidos analisados, foi suprimido, e entre os doadores ocorre uma "seleção" dos portadores de talassemia beta heterozigota, que podem apresentar hematócrito levemente alterado, não sendo aceitos, portanto para doação.

Comparando as técnicas de análise para hemoglobinopatias utilizadas anteriormente por nosso laboratório e a tecnologia hoje disponível, observamos através do cruzamento 16 que a nova tecnologia permite detectar com maior precisão as diversas hemoglobinas anormais, evidenciando uma maior proporção de portadores de hemoglobinopatias nas populações onde essas técnicas foram utilizadas, com nível de significância inferior a 0,1%. Vale ressaltar que para estas comparações a talassemia alfa foi retirada da proporção, pois no início dos programas preventivos, o diagnóstico não era baseado em testes citológicos específicos.

ANALISE DO PROGRAMA DE PREVENÇAO (abrangência, formas de divulgação e aconselhamento)

Por se tratar de um programa que foi realizado ao longo de dez anos, com diferentes grupos populacionais, a metodologia aplicada foi também diversificada, sem contudo deixar de considerar seis fases sequenciais:

1.Programação de atividades e seleção de locais de coleta.

2.Conscientização do programa para os escalões superiores ou dirigentes, dos locais onde se procederam as coletas, e a seguir, para as pessoas que seriam submetidas aos testes.

3.Coleta das amostras de sangue e identificação individual.

4.Análises laboratoriais.

5.Comunicação dos resultados.

6.Reunião de esclarecimento aos portadores de hemoglobinopatias, aos pais ou responsáveis, e análise familiar.

Dentro do esquema proposto, a metodologia para prevenção foi aplicada em sua totalidade nos seguintes grupos: Escolares e Universitários, Postos de saúde e Obras assistenciais, Doadores de sangue, Recém-nascidos, Empresas e Campanha de vacinação (Sabin). No grupo caracterizado como "Encaminhamentos", a metodologia utilizada considerou as fases 3, 4 e 5 acima propostas.

E importante destacar que a metodologia utilizada foi sendo gradativamente expandida e melhorada à medida que o programa se desenvolvia e se tornava mais abrangente. Um exemplo desse progresso refere-se à fase de conscientização que, no início, era realizada apenas por meio de palestras, a seguir, sentimos a necessidade de incluir um boletim explicativo -

modificado à medida que o programa foi sendo desenvolvido - e finalmente foi editado um audio-visual, com diapositivos e gravação. Por outro lado, o desenvolvimento das técnicas laboratoriais foi sendo realizado e implantado gradualmente. No início do programa de prevenção, de 1982 a 1984, utilizamos para **screening** dos portadores técnicas eletroforéticas em pH alcalino e ácido, permitindo as microanálises com grande eficiência, pois as coletas eram realizadas por punção digital. A partir do início de 1985, a introdução do teste de resistência globular osmótica em NaCl 0,36% auxiliou o **screening** das talassemias beta, permitindo uma sensível elevação na detecção dessas alterações. Em 1987, com a adição da análise da morfologia eritrocitária a fresco, também utilizada para o **screening** de talassemias beta, houve um grande aumento na frequência de casos detectados. É importante destacar que a introdução dessas duas técnicas exigiu apenas a coleta adicional de uma gota de sangue (aproximadamente 50 microlitros). Entretanto, com a microtécnica de pesquisa citológica de Hb H intraeritrocitária, através da coloração com Azul de Crezil Brilhante, também introduzida em meados de 1987, tornou-se possível a detecção de talassemia alfa com maior sensibilidade. Dessa forma, nossos programas preventivos atuais consideram como metodologia laboratorial básica para o **screening** de hemoglobinopatias, as eletroforeses em pH alcalino e ácido, testes de resistência globular osmótica em NaCl 0,36%, análise da morfologia eritrocitária, e pesquisa intraeritrocitária de Hb H.

A diversificação dos grupos estudados exigia diferenciação com relação a comunicação dos resultados e a utilizada em estudantes foi a mais completa, motivo pelo qual foi aqui apresentada na íntegra. Entretanto, sem prejuizo do objetivo

da divulgação e conscientização, as comunicações para os outros grupos estudados foram realizadas utilizando expressões que permitissem o entendimento do programa, dos resultados dos exames, etc. Assim, passamos a descrever os resultados da metodologia utilizada no grupo de estudantes de escolas das redes estadual e particular, seguido dos outros grupos.

1) **Fase de programação de atividades e seleção de escolas** - A forma de execução das atividades incluiram: nominação do programa; contatos com a Delegacia Regional de Ensino de São José do Rio Preto; seleção das escolas; formas de coleta das amostras de sangue; identificação dos escolares, catalogação e transporte das amostras; técnicas laboratoriais para a detecção e identificação de hemoglobinas anormais. O nome escolhido para o programa foi **"Você tem anemia hereditária?"**. A seleção das escolas fundamentou-se naquelas que possuiam o segundo grau escolar. Com relação às escolas da rede particular, foram consideradas todas as cinco em funcionamento na época.

2) **Fase de conscientização do programa aos professores e alunos das escolas selecionadas** - Inicialmente apresentamos o programa à direção da Delegacia Regional de Ensino, órgão oficial do governo estadual, responsável pela coordenação das escolas estaduais de São José do Rio Preto e região. Por meio deste órgão foi possível realizar uma reunião de esclarecimento aos professores de Ciências e Biologia, bem como aos diretores e representantes das escolas envolvidas. Nessa ocasião foram apresentados os objetivos do programa e noções básicas sobre as causas e consequências das anemias, e anemias hereditárias com ênfase especial para talassemias e falcemias heterozigotas e homozigotas. Na oportunidade, solicitou-se aos professores a

divulgação das informações aos estudantes. Vale ressaltar que a aceitação do programa por parte dos dirigentes e professores das instituições escolhidas foi grande e com intensa participação de todos.

A conscientização dos escolares foi realizada em cada escola selecionada, precedendo às coletas de sangue, através da distribuição de folhetos ilustrativos que explicavam sucintamente as seguintes questões: o que é anemia; quais as causas de anemia; o que é anemia hereditária; o que deve fazer o portador de anemia hereditária. A seguir, eram explicados os objetivos de nossa ida àquela escola, e finalizando, projetava-se um audio visual sobre o programa, com duração de quinze minutos abordando os seguintes tópicos: retirada de sangue; composição e função específica de cada tipo celular sanguíneo; anemias e suas causas; anemias hereditárias: causas e origens; talassemias e falcemias; distribuição geográfica dessas hemoglobinopatias no Brasil e países da Europa, Africa e Asia; importância das hemoglobinopatias para a saúde pública, genética, hematologia e bioquímica; análises laboratoriais; cuidados básicos que os portadores de hemoglobinopatias devem ter. Após esta explanação iniciava-se a coleta de sangue.

3) **Fase da coleta de sangue** - optou-se nesta atividade pela punção digital por meio de lancetas descartáveis e armazenamento do sangue em tubos capilares heparinizados, obtendo-se desta forma cerca de 50 microlitros de amostra de cada escolar previamente identificado por nome, sobrenome, idade, sexo, cor da pele, e procedência. Os tubos capilares preenchidos com sangue, e vedados em uma das extremidade com massa de modelar, eram alojados em compartimentos plásticos com capacidade para vinte e

cinco tubos, cujos números coincidiam com os da folha de identificação correspondente. Muito poucos alunos das escolas analisadas deixaram de realizar as coletas, estando sempre bastante interessados com o programa.

4) Fase das análises laboratoriais das amostras - As análises foram efetuadas no máximo 24 horas após a coleta, e compreenderam três etapas: a) técnicas seletivas para detecção de hemoglobinopatias; b) técnicas específicas para identificação de hemoglobinas anormais; c) técnicas para caracterização estrutural de alterações de hemoglobinas variantes, que foram se compondo conforme já exposto. Todas as amostras foram submetidas às análises e aquelas que apresentaram alterações foram separadas para estudos complementares.

As amostras que exibiram anormalidades no processo seletivo, foram submetidas à eletroforese em agar-fosfato pH 6,2, identificando assim as Hb S e C nas combinações usuais (AS, AC, SS, SC); As amostras que apresentaram aumento de Hb Fetal, ou formas variantes diferentes, foram submetidas à técnicas específicas como dosagem de Hb Fetal, ou caracterização estrutural. As amostras suspeitas de apresentarem talassemias, foram coletadas novamente e submetidas às análises orientadas pelo grupo de trabalho da Organização Mundial da Saúde para o diagnóstico destas patologias.

As técnicas utilizadas para caracterização estrutural de hemoglobinas variantes raras, não qualificáveis pelos métodos anteriores, foram submetidas a eletroforeses para separação de globinas em acetato de celulose, usando tampão TRIS-EDTA-BORATO com Uréia 6M e 2-mercaptoetanol 0,05M nos pH 6,0 e 8,9, e fingerprinting de hemoglobinas por análise de péptidos isolados

por ação tríptica e submetidos, a seguir, a eletrocromatografia bidimensional. As amostras coletadas foram suficientes para a realização das duas primeiras etapas de análises laboratoriais. As caracterizações posteriores requereram novas coletas de sangue por punção venosa.

5) **Fase de comunicação dos resultados aos portadores de hemoglobinopatias** - Os resultados foram divulgados a cada portador por membros componentes da equipe. Na ocasião era entregue uma carta explicativa sobre o tipo de alteração identificada, onde se destacava os cuidados básicos que o portador deveria tomar e convidáva-o juntamente com seus familiares, a participarem da reunião de esclarecimento em data previamente estabelecida.

6) **Fase de reuniões de esclarecimentos aos pais ou responsáveis dos portadores de hemoglobinopatias** - Essas reuniões, realizadas para cada grupo de quinze a vinte e cinco portadores, tinham duração total de noventa minutos e foram padronizados para a abordagem dos seguintes temas: sangue, seus componentes e suas funções; o que é anemia e quais suas causas mais comuns; anemias graves e moderadas; o que são anemias hereditárias e quais as formas de transmissão; anemia hereditária imperceptível (heterozigota) e perceptível (homozigota); talassemias: causas e efeitos nas formas homozigota e heterozigota; quais os cuidados básicos que o talassêmico deve ter; falcemias (Hb S): causas e efeitos nas formas heterozigota e homozigota; quais os cuidados básicos que o falcêmico deve ter; hemoglobinopatia C e suas manifestações nas associações com outros genes anormais (Hb S/C, Hb C/talassemia); noções gerais sobre a origem das anemias hereditárias no Brasil; aconselhamento

genético. A última parte da reunião com duração de trinta minutos, foi destinada a perguntas pelos portadores e seus familiares. Ao final da reunião os portadores recebiam suas carteiras de identificação da anemia hereditária, sendo orientados no sentido de apresenta-las a cada consulta médica. Em seguida efetuavam-se as coletas de sangue de seus familiares para a análise de detecção dessas alterações hereditárias. A resposta ao chamado das reuniões de esclarecimento esteve dentro das previsões do nosso laboratório, com intensa participação de pais e familiares, que mesmo após as reuniões encaminhavam outros parentes ao laboratório para análise.

As análises em obras assistenciais e empresas seguiu basicamente o mesmo esquema para coleta e análise laboratorial utilizados nos escolares.

Para amostras provenientes de postos de saúde, doadores e recém nascidos, a coleta era realizada em seus locais de origem através de punção venosa, usando-se EDTA como anticoagulante, e encaminhadas ao nosso laboratório com as respectivas identificações, e dados relativos à idade e cor de pele, sendo que este último nem sempre era preenchido pelos responsáveis pela coleta das amostras, provavelmente devido à inexperiência em identificar as características referentes a cada origem racial. Todas as amostras foram inicialmente submetidas a três testes: análise da morfologia eritrocitária, teste de resistência osmótica em solução de NaCl 0,36%, e eletroforese em pH alcalino. As amostras que apresentaram alterações na morfologia eritrocitária ou resistência osmótica, ou ainda em ambos, foram submetidas à hematimetria, dosagem de hemoglobina A_2 e pesquisa de agregados intraeritrocitários de Hb H. As amostras que

apresentaram anormalidades durante o processo seletivo de eletroforese em pH alcalino, do tipo Hb S ou C, foram submetidas a confirmações em eletroforese de pH ácido, e as interações de hemoglobinas variantes e talassemias foram submetidas à testes específicos para suas caracterizações. As variantes diferentes das Hb S e C foram submetidas a técnicas específicas para sua caracterização.

Durante as análises realizadas na campanha de vacinação de 1992, orientamos os familiares e as crianças que seriam vacinadas, por meio de folhetos explicativos sobre as anemias hereditárias. Coletamos as amostras por punção digital, realizando os testes de resistência osmótica e morfologia eritrocitária no mesmo dia. A seguir todas as amostras foram submetidas a eletroforese de pH alcalino em acetato de celulose, e pesquisa de agregados intraeritrocitários de Hb H. Os portadores que necessitavam de dosagens e testes complementares foram chamados ao nosso laboratório para nova coleta de sangue. A divulgação dos resultados foi realizada por meio de carta, pedindo o comparecimento da família ao laboratório para receberem a orientação necessária referente ao tipo de hemoglobina anormal detectada. A totalidade dos casos detectados compareceu ao nosso laboratório para receberem informações sobre as alterações e aconselhamento genético e educacional, assim como, seus familiares.

No período compreendido entre 1982 e 1992, o laboratório de hemoglobinas desenvolveu atividades de Centro de Referência para o diagnóstico de Hemoglobinopatias, e dentro dessa atividade, realizamos análises em milhares de amostras encaminhadas através de solicitações de hematologistas,

analistas clínicos, patologistas clínicos, biomédicos e geneticistas. Os pedidos encaminhados incluiam pacientes suspeitos de serem portadores de hemoglobinopatias, pacientes com anemia refratária a tratamentos convencionais, pacientes com anemias hemolíticas de causa desconhecida, e portadores de hemoglobinas de difícil identificação. As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa e com uso de anticoagulantes. Os meios de transporte utilizados foram o aéreo e o rodoviário; algumas amostras foram encaminhadas por Sedex, da Empresa Brasileira de Correios e Telégrafos. A forma de acondicionamento utilizada foi caixa de isopor, geralmente com gelo reciclável em seu interior. A identificação das amostras seguiu o mesmo padrão das anteriores.

Todas as análises foram desenvolvidas por métodos padronizados em nosso laboratório para o diagnóstico de hemoglobinas anormais e talassemias, sendo que inicialmente todas foram triadas pelos testes de resistência globular osmótica, análise da morfologia eritrocitária e eletroforese de pH alcalino em acetato de celulose. A comprovação de Hb S e C foi feita por eletroforese em gel de agar, pH 6,2. Para a caracterização de outras variantes hemoglobínicas foram utilizadas a focalização isoelétrica, eletroforese de cadeia polipeptídicas em pH alcalino e ácido e mapeamento peptídico, quando necessário. Diante da suspeita de hemoglobinas instáveis realizamos testes específicos de estabilidade molecular, determinação qualitativa e quantitativa de metemoglobinas e pesquisa de corpos de Heinz. As dosagens de hemoglobinas A_2 e Fetal foram realizadas nas suspeitas de talassemias e em suas interações com hemoglobinas variantes. Para as talassemias alfa, foi pesquisada a presença de

agregados intraeritrocitários de Hb H, bem como a presença de Hb H em eletroforese de acetato de celulose.

V. DISCUSSÃO

A população brasileira é reconhecidamente muito miscigenada, devido às características de nossa colonização, que absorveu lentamente, grandes contingentes populacionais, e portanto, apresenta genes que são característicos de determinadas origens raciais. Os genes responsáveis pelas hemoglobinas anormais, são encontrados em nossa população com prevalências que variam de região para região dependendo de seus grupos raciais formadores. A detecção dos portadores heterozigotos, e sabidamente assintomáticos, é de grande importância para a saúde pública, pois representam fonte de novos heterozigotos e possíveis homozigotos.

Programas de prevenção se revestem de grande importância para a conscientização dos heterozigotos, fornecendo dados para que possam decidir de maneira responsável sobre seus descendentes, favorecendo o direcionamento clínico para os casos brandos, e acompanhamento adequado aos portadores de formas graves. A melhor idade e a população ideal para esse tipo de estudo são discutíveis. Uma adequada tecnologia para o diagnóstico é indispensável, utilizando-se vários testes laboratoriais, dados clínicos e estudo familial, bem como a formação de pessoal capacitado para o correto diagnóstico, conscientização da população e acompanhamento dos portadores. Recentemente a Organização Mundial da Saúde divulgou as dificuldades que alguns países têm para realizar tratamento adequado e eficiente aos portadores da doença falciforme e estimula a execução tanto de programas educativos para profissionais da saúde e população em geral quanto de prevenção

(W.H.O., 1989).

A população brasileira é formada por 44% de negros, é pobre e a mortalidade infantil reflete a falta de saúde e infra estrutura básica. Mesmo assim, é importante a conscientização e a prevenção de doenças genéticas como a anemia falciforme e as talassemias que podem ter seus quadros clínicos agravados nestas situações. Tais doenças eram tidas há alguns anos atrás como uma sentença; hoje, no entanto, são passíveis de cura, e as perspectivas melhoram a cada dia com os avanços da terapia genética. Com base nesses dados e no trabalho clássico de Silvestroni e Bianco (1975), na Itália, o Centro de Referência de Hemoglobinas vem realizando estudos preventivos de hemoglobinopatias desde 1982.

As primeiras comunicações sobre prevalência de hemoglobinopatias no Brasil datam do início da década de 40. Dessa época até o final dos anos 60, as análises dispunham de tecnologia limitada, e certamente por este motivo, as hemoglobinas anormais descritas tenham sido apenas Hb AS, Hb AC, Hb SS e Hb SC, nas populações examinadas. Nos trabalhos publicados neste período quase nada se refere às talassemias. Evidências mais consistentes à respeito de hemoglobinopatias no Brasil podem ser encontradas nos trabalhos de Monteiro Marinho, em 1970, sobre Hb S no Rio de Janeiro; Naoum em 1982, a respeito de hemoglobinopatias no Estado de São Paulo, Culpi e Salzano em 1984, abordando hemoglobinopatias em Curitiba; Ramalho em 1986, sobre talassemias no Estado de São Paulo; Alvares Fo. em 1990, sobre a distribuição de Hb S no Brasil. Em nosso país a prevalência de hemoglobinas anormais é extremamente variável e influenciada por fatores ecológicos e raciais, variando ainda

conforme a região analisada, de 6 a 12%, mas de modo geral, a estimativa de hemoglobinas anormais é de 4% (SALZANO, 1979; HUTZ, 1981; ZAGO e cols, 1981; ZAGO e cols, 1983; NAOUM e cols, 1983; NAOUM, 1984; RUIZ e cols, 1986; NAOUM e cols, 1987; GUERRA e cols, 1987; SONATI & COSTA, 1990; NAOUM e cols, 1991; MEDEIROS e cols, 1992).

O presente trabalho descreve os resultados da prevalência de hemoglobinas anormais em diferentes populações do Brasil, de diversas procedências, especialmente do Estado de São Paulo, analisadas com técnicas laboratoriais que foram se compondo num espaço de dez anos, em uma metodologia hoje proposta pela sua eficiência e, finalmente, apresenta os resultados obtidos em programas de prevenção, que foram melhorados gradualmente no curso de sua aplicação.

A diversidade da população analisada pode ser constatada, inicialmente, pela heterogênea amostragem que inclui recém-nascidos, crianças de postos de saúde e de obras assistenciais, adolescentes de escolas de segundo grau, adultos de universidades, empresas e doadores de sangue, além daqueles provenientes de campanhas de vacinação com ampla variedade etária. Para todo este conjunto foi possível proceder à aplicação de programas preventivos, que resultaram em investigações de familiares e aconselhamento genético. Por outro lado foram incluidas também análises efetuadas por encaminhamentos médicos e laboratoriais de pacientes ou amostras de sangue coletadas nos locais de origem. Enfim, todas essas análises possibilitaram que fossem realizadas pesquisas em 41.235 amostras de sangue, de 158 cidades pertencentes a 21 Estados brasileiros.

As análises efetuadas possibilitaram detectar 5.356 hemoglobinas anormais, caracterizando um total de quatorze genótipos específicos e que incluem as seguintes hemoglobinas variantes e suas associações: S (AS, SS, SC), C (AC, CC), I (AI), N (AN), D (AD), B2 (AB2), J (AJ), Lepore (A-Lepore), M (AM Boston), Koln (A-Koln), Constant Spring (A-CoSp), além de metemoglobinemias e hemoglobinas instáveis não identificadas; e os seguintes tipos de talassemias: talassemia beta heterozigota, talassemia beta homozigota, talassemia alfa (incluindo as com um, dois e três genes afetados), associações entre talassemia alfa e beta, persistência hereditária de hemoglobina Fetal e as formas interativas: Hb S/talassemia beta, Hb C/talassemia beta, Hb D/talassemia beta, Hb SS/talassemia alfa, Hb AS/talassemia alfa, Hb AC/talassemia alfa.

Analisando esses resultados, observa-se a formidável diversidade genotípica de hemoglobinas variantes e talassemias numa amostragem que representa apenas uma pequena fração da população brasileira. Entretanto, é necessário considerar que as Hb AS e AC predominam entre as hemoglobinas variantes e as talassemias alfa e beta heterozigotas entre as formas talassêmicas. Em vista destas considerações iniciais, os resultados gerais obtidos não apresentam diferenças significativas quando comparados com os da literatura. Entretanto, ao efetuarmos as análises dos resultados específicos para cada população examinada observamos algumas diferenças, notadamente em relação às amostras coletadas durante o programa de prevenção na campanha de vacinação "Sabin", cujos resultados mostraram uma prevalência de 15,42% de portadores de hemoglobinas anormais, com destaque para talassemia alfa (9,91%), e entre os

recém-nascidos que resultaram em 7,20% de portadores, também com maior prevalência de talassemia alfa. E provável que na amostragem proveniente do programa de campanha de vaciação, o alto índice de alterações de hemoglobinas deveu-se ao fato de terem sido analisados vários membros de grupos familiares (pais, filhos, irmãos), destacando-se, porém, que a coleta foi realizada sem prévio aviso de que as análises para anemias hereditárias (hemoglobinas anormais) seriam efetuadas. Desta forma, acredita-se que a alta prevalência de talassemias possa ser explicada pela eficiência dos testes aplicados. A ausência na literatura de análises em grupo populacional semelhante impede a comparação dos resultados obtidos. Nessa população a resposta ao programa preventivo foi altamente efetiva, abrangendo de maneira uniforme os grupos familiares estudados.

Com relação aos recém-nascidos, destaca-se que os resultados deste trabalho não divergem dos obtidos por outros autores que estudaram amostras semelhante em outras regiões do Brasil (RUIZ e cols, 1986; COSTA e cols, 1989), no entanto, com relação a divulgação dos resultados e aconselhamento genético e educacional, essa amostragem ficou prejudicada pois não tivemos contato direto com os possíveis portadores e seus familiares e sim com o hospital que encaminhava as amostras. Os resultados foram encaminhados ao hospital que se encarregaria de anexá-los aos prontuários, mas não obtivemos retorno dos portadores e familiares para estudos complementares.

Nas populações onde foi possível a caracterização racial, a análise estatística para prevalência de hemoglobinopatias correlacionada aos grupos negróides e caucasóides, mostrou ser significativa entre os escolares da rede

estadual (p<0,001) e em postos de saúde (p<0,001). O restante das populações não apresentaram número suficiente para a utilização de testes estatísticos.

As diferentes populações analisadas duas a duas, excetuando os encaminhamentos e os casos de talassemia alfa, para observar a prevalência de hemoglobinas anormais, nota-se que a população formada por escolares (rede estadual, rede particular e universidades) apresenta diferença significativa em relação à amostra formada por: campanha de vacinação, postos de saúde e doadores de sangue, sendo que entre os escolares a proporção de hemoglobinas anormais foi menor que nas outras populações. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que, entre os escolares, a metodologia diagnóstica utilizada foi basicamente eletroforética, e portanto, grande parte das talassemias passaram desapercebidas.

A amostra de postos de saúde apresentou diferenças estatisticamente significativas, quando comparadas às empresas e recém-nascidos, com frequências menores de hemoglobinas anormais nas duas últimas. Do total de 5.776 crianças analisadas, apenas 539 apresentaram caracterização racial, o que se deve em parte, pela dificuldade das pessoas que realizaram as coletas das amostra, em identificar corretamente tais características. Desse montante, 340 foram caucasóides e 199 negróides, e a forma de hemoglobina anormal mais frequente entre os caucasóides foi a talassemia alfa e entre os negróides a Hb AS.

A amostra analisada na campanha de vacinação mostrou maior proporção de hemoglobinopatias e a diferença foi significativa em todas as comparações exceto com postos de saúde. Este fato evidencia a facilidade de análise familial e sua

abrangência com relação ao diagnóstico e aconselhamento educacional, aliada ao uso de técnicas adequadas para o diagnóstico.

Com relação a doadores e recém-nascidos, a proporção de hemoglobinas anormais foi maior no segundo grupo com diferenças estatisticamente significativas, o que pode ser explicado em grande parte, pelo fato de os possíveis portadores de talassemias beta e seus pais não terem retornado ao laboratório para análises complementares, e confirmação diagnóstica, o que provavelmente, elevaria o número de hemoglobinas anormais entre os recém-nascidos, podendo apresentar resultados estatísticos diferentes. Entre os doadores, a talassemia beta heterozigota apresentou menor frequência, provavelmente devido ao fato de que os portadores desta patologia podem apresentar alterações no hematócrito, o que os impossibilitaria de realizarem doações de sangue. Entre os doadores de sangue a resposta ao programa preventivo foi positiva. Grande parte dos portadores compareceram ao nosso laboratório para estudo familiar.

Comparando o conjunto de técnicas utilizadas no início da campanha de prevenção, em 1982 e as realizadas atualmente no Centro de Referência de Hemoglobinas, nota-se que o aprimoramento técnico desenvolvido ao longo deste período nos permite diagnosticar com maior precisão as diferentes hemoglobinas anormais, principalmente as talassemias. Vale ressaltar que as análises estatísticas excetuaram a talassemia alfa, pois no início desse programa preventivo os testes específicos para essa alteração não eram ainda aplicados.

Progressos significativos têm sido observados nas ciências básicas relacionadas aos serviços de saúde, mas

programas educativos e de prevenção são necessários, principalmente em países onde a mortalidade infantil por causas não genéticas, alcançam índices preocupantes (WALKER, 1992). As hemoglobinopatias são as mais comuns das alterações que acometem o gene da globina humana e são consideradas sérios problemas de saúde pública em países onde os índices são relevantes. Em nosso país estes índices são significativos em algumas regiões, no entanto, muito ainda deve ser realizado em termos de saÜde pública, em benefício da nossa população. Diante destes fatos, os programas preventivos e educativos para hemoglobinopatias ainda constituem um meio bastante eficaz para a conscientização populacional, na tentativa de diminuir ou minimizar os efeitos dessas alterações em nossa população.

A intensa diversidade fenotípica das hemoglobinopatias e principalmente das talassemias pode ser hoje explicada por técnicas de DNA recombinante (CAO e cols, 1991). Programas preventivos para o controle de talassemias baseados em screening, aconselhamento e diagnóstico neonatal, aliado à tecnologia de ponta, torna tais programas altamente efetivos, resultando em sensível declínio na incidência de homozigotos, como observado em países que fazem uso desta tecnologia (W.H.O., 1989). O crescente número de pesquisadores e profissionais que têm se dedicado ao estudo das hemoglobinas anormais, aliado à melhoria técnica dos laboratórios clínicos, têm permitido obter informações cada vez mais consistentes acerca da importância que as hemoglobinopatias representam para a saúde pública de nosso país.

Durante o período de 1982 a 1992, as amostras encaminhadas ao Centro de Referência por médicos, laboratórios e instituições de saúde, para o diagnóstico de hemoglobinas

variantes e talassemias, foram de tal representatividade que optamos por dividí-las em dois grupos: do Estado de São Paulo, e de outros Estados do País. A faixa etária foi bastante variável e a caracterização racial nem sempre acompanhou os pedidos de encaminhamento, provavelmente devido à dificuldades em reconhecer tal característica.

As amostras provenientes de outros Estados da federação foram separados por regiões administrativas, totalizando 158 cidades em 21 Estados. Do total de 4.773 amostras analisadas, 2.299 (48,1%) apresentaram hemoglobinas anormais, sendo as talassemias alfa e beta heterozigotas as mais frequentes seguidas da Hb AS. Vinte genótipos diferentes foram detectados incluindo hemoglobinas variantes e talassemias interativas destacando, portanto, a grande diversidade desse tipo de alteração genética em nossa população. A região Norte foi a que apresentou maior prevalência de hemoglobinas anormais seguida da região Nordeste. A diferença de prevalência de hemoglobinopatias nas diferentes regiões administrativas foi estatisticamente significativa. Quando observamos a prevalência de diferentes hemoglobinas anormais nestas populações fica evidente a grande dificuldade de outros centros em identificar e diagnosticar corretamente as diferentes formas de talassemias e variantes raras, mostrando a necessidade contínua de formação de recursos humanos capacitado.

As amostras provenientes do Estado de São Paulo totalizaram 4.038 pessoas de exatamente 100 cidades. Deste total, 45,6% apresentaram hemoglobinas anormais. As cidades estudadas encontram-se distribuidas pelas 11 regiões administrativas do Estado, e à oitava região, que inclui São José do Rio Preto, somam-se 48 cidades, com uma amostra de 3.612 indivíduos, dos

quais 44% apresentaram hemoglobinas anormais. Nas outras regiões, das 52 cidades estudadas, as 426 amostras analisadas apresentaram 58,7% de hemoglobinas anormais.

Destaca-se ainda que, a grande maioria das amostras encaminhadas era suspeita de apresentar algum tipo de hemoglobinopatia ou possuia anemia à esclarecer, o que pode explicar a alta frequência encontrada. Tais fatos evidenciam ainda mais a importância da realização de programas preventivos e a contínua necessidade de formação de recursos humanos capacitados para a realização de diagnósticos corretos em seus centros de origem, bem como a orientação de portadores e de seus familiares.

Os programas preventivos a nível neonatal são amplamente difundidos em países da Europa, principalmente por possibilitarem a profilaxia de homozigotos precocemente. Favorecem, ainda, a sobrevida, minimizando os efeitos deletérios da doença, com redução significativa da morbidade e mortalidade infantil, além de apresentarem excelente retorno em nível de aconselhamento genético (ROWLEY e cols, 1991; LOADER e cols, 1991). As hemoglobinas anormais e talassemias atingem em média 4% da população brasileira, com nítidas variações regionais. Assim, se faz necessária uma maior sensibilização dos orgãos oficiais de saúde para que programas de tal envergadura possam ser realizados em nossa população, já que a estimativa de nascimentos de uma das formas de hemoglobinas anormais, como é o caso da anemia falciforme (Hb SS), é de 1:2.500 crianças por ano. Estudos populacionais realizados por vários pesquisadores brasileiros, indicam que o genótipos mais frequentes na nossa população são os da Hb AS e as talassemias alfa e beta heterozigotas. O uso de

técnicas mais precisas para o diagnóstico, e de pessoal capacitado, foram fundamentais. Técnicas como a focalização isoelétrica e análise molecular, auxiliaram na identificação de novos mutantes facilitando o diagnóstico, sendo certamente responsáveis pelo aumento no número de casos de algumas alterações como as talassemias alfa. No entanto, para a realidade econômica de nosso país, não é possível a utilização de tais técnicas em laboratórios de rotina e estas ficam restritas a poucos centros de pesquisa, dificultando o estudo à nível populacional. As talassemias alfa são bastante frequentes na China, Malásia, Nova Guiné, India, Arabia Saudita e em populações do novo mundo que descendem destes países, bem como de regiões da Africa e Mediterrâneo, entre outras. A frequência de talassemia alfa em nosso país, já foi estimada pela presença de Hb de Bart em recém-nascidos, com prevalências que variam de 0,7 a 11,9% na população negra e miscigenada, estando por volta de 4% entre os caucasóides (ZAGO e cols, 1983; SONATI, 1987; PEDROLLO e cols, 1990).

A metodologia utilizada para o diagnóstico mostrou-se importante para estudos populacionais, e este fato pode ser constatado com a evolução das atividades práticas. No início do programa preventivo nas escolas eram utilizadas basicamente técnicas eletroforéticas e, por isso, a talassemia alfa apresentou índices abaixo do observado na literatura atual: escolas estaduais (0,10%), escolas particulares (0,0%), universidades (0,30%), empresas (0,10%), pais de portadores (1,30%). Quando acrescentamos testes específicos para o auxilio diagnóstico das talassemias, a saber: análise da morfologia eritrocitária, resistência osmótica e pesquisa intraeritrocitária

de Hb H, o aumento no número de casos foi sensível: campanha de vacinação (9,91%) e recém-nascidos (5,62%). Para os encaminhamentos médicos de anemia crônica ou a esclarecer este índice chegou a 17,0% evidenciando a grande dificuldade técnica em diagnosticar corretamente estas alterações. Para os recém-nascidos a utilização da técnica de focalização isoelétrica foi decisiva na identificação das frações confirmadas por pesquisa citológica dos corpos de Hb H.

E sabidamente comprovada a existência de determinadas hemoglobinopatias em alguns grupos raciais, podendo-se relacionar seus polimorfismos às origens raciais, como é o caso da Hb S para negros africanos e a talassemia beta para povos do mediterrâneo. Com o uso de tecnologia de DNA, pode ser determinado exatamente o haplótipo característico de uma determinada população, e no caso de nosso país, determinar quais as populações que tiveram influencia na sua formação. Muitos estudos, no entanto, têm sido feitos relacionando-se as características fenotípicas raciais aos tipos de hemoglobinas anormais. Com este intuito, nas populações analisadas em nosso trabalho, e nas quais obtivemos informações acerca da origem racial (caucasóide ou negróide), foram realizadas análises estatísticas para verificar a associação de hemoglobinopatias com as populações estudadas. Observamos que entre os escolares da rede estadual esta associação foi significativa para os negróides ($p < 0,001$). Resultado semelhante foi observado entre as crianças de postos de saúde ($p < 0,001$). As amostragens com determinação da origem racial nas outras populações, não apresentaram número significativo para análise estatística.

A intensa diversidade fenotípica das hemoglobinopatias e principalmente das talassemias pode hoje ser explicada por técnicas de DNA recombinante (CAO e cols, 1991). O diagnóstico pré-natal vem sendo amplamente divulgado e realizado em outros países com altos índices de hemoglobinopatias, porém, para o Brasil, esta realidade está muito longe de ser efetivada. Nossa legislação não permite o aborto terapêutico, normalmente sugerido aos casais em que homozigotos são detectados, e soma-se ainda, os custos destas análises, que por serem muito altos tornam bastante difícil sua aplicação em nosso país. O diagnóstico tardio destas alterações em nosso meio, motiva a implantação de programas preventivos neonatais. Ainda se faz necessária a concientização em nível profissional para melhor atendimento de doentes e portadores, bem como o retorno desejado em estudos neonatais em nível de aconselhamento e análise familial. Todos estes fatos evidenciam a importância da implantação de programas educativos e de prevenção, o que poderia modificar a realidade vivida pelos já portadores destas alterações, e auxiliaria outros tantos que pudessem surgir.

Em nosso programa de prevenção, a amostra que apresentou melhor resposta a nível de aconselhamento genético e educacional, foi a de escolares, coincidindo com a visão de Silvestroni e Bianco, 1975, em seu estudo preventivo para talassemia beta na Itália, no entanto, o uso de tecnologia adequada tornaria os estudos em tal população muito mais efetivos e abrangentes, o que pôde ser observado nos estudos familiares na amostra de campanha de vacinação, sendo significativo para estudos preventivos. Sem nenhuma dúvida, a utilização de tecnologia diagnóstica adequada aliada ao aconselhamento genético

e estudo familial, favoreceriam o controle desta alteração em nosso meio. Vale ressaltar também, que a constante formação de recursos humanos capacitado para o diagnóstico e aconselhamento de tais alterações são fundamentais para o seu conhecimento e controle em nosso país.

VI. CONCLUSÕES

1. No presente trabalho foram analisadas amostras de sangue de 41.235 indivíduos sendo que 5.356 (12,98%) apresentaram hemoglobinas anormais em diferentes formas, das quais destacamos a Hb AS (2,42%), Hb AC (0,68%), talassemia beta heterozigota (4,16%), talassemia alfa (4,21%), e outros vinte e dois genótipos diferentes com 1,49% incluindo talassemia beta homozigota, talassemia alfa/beta, interações de talassemias com hemoglobinas variantes (Hb S/talassemia beta, Hb C/talassemia beta, Hb D/talassemia beta, Hb S/talassemia alfa, Hb AS/talassemia alfa, Hb AC/talassemia alfa), Hb AS, Hb SS, Hb AC e hemoglobinas de raras frequências como Hb SC, Hb AI, Hb AN, Hb AD, PHHF, Hb AB2, HbAJ, Hb Lepore, metemoglobinas, Hb AM Boston, Hb Constant Spring e Hb Koln.

2. Para melhor análise as populações estudadas foram separadas em dois grupos: as dos programas preventivos e as encaminhadas por médicos e instituições. Nas populações estudadas durante os programas preventivos de hemoglobinopatias foram analisadas 32.424 amostras de sangue, dentre as quais as hemoglobinas mais prevalentes foram Hb AS (1,56%) e talassemia beta heterozigota (0,82%). A frequência de hemoglobinas anormais neste grupo para cada uma das amostras foi a seguinte: Escolares da rede estadual (1,96%), Escolares da rede particular (1,32%), Universidades (3,40%), Postos de saúde (5,34%), Campanha de vacinação (15,42%), Empresas (1,65%), Doadores de sangue (4,60%), recém-nascidos (7,20%), pais de portadores (22,2%). A prevalência média de

hemoglobinopatias nos programaspreventivos foi de 7,01%.

3. Entre os escolares da rede estadual foram analisadas 12.703 amostras e as hemoglobinas anormais mais frequentes foram a Hb AS (0,93%), as mais prevalentes entre os negróides, e talassemia beta heterozigota (0,60%), a mais prevalente entre os caucasóides analisados . Em escolares da rede particular de ensino foram analisadas 1.135 amostras e as formas mais frequentes de hemoglobinas anormais a Hb AS (0,61%), seguida de Hb AC (0,35%), sendo a Hb AS a mais frequente entre os caucasóides, e o único caso de Hb AC detectado entre os negróides.

4. A análise de 250 pais e familiares de portadores de hemoglobinopatias mostrou 22,2% apresentaram hemoglobinas anormais destacando a talassemia beta heterozigota (10,0%) seguida de Hb AS (7,6%). Entre os caucasóides a talassemia beta heterozigota foi mais frequente e entre os negróides a Hb AS.

5. Entre os universitários obtivemos 2.682 amostras, das quais 3,4% apresentaram hemoglobinas anormais, com maior prevalência de talassemia beta heterozigota (1,60%) seguida de Hb AS (0,90%), sendo a talassemia beta heterozigota a forma mais prevalente entre os caucasóides e a Hb AS a mais frequente entre os negróides.

6. Para um total de 5.776 crianças de postos de saúde e obras assistenciais, 5,34% apresentaram alguma forma de hemoglobina anormal, sendo as mais prevalentes a Hb AS (2,99%) e a talassemia beta heterozigota (1,15%).

7. Em um dos postos de vacinação, durante campanha "Sabin" realizada em agosto de 1992, foram analisadas famílias que vinham vacinar seus filhos, computando um total de 363 pessoas. Desse grupo 15,42% apresentaram hemoglobinas anormais, sendo as talassemias alfa (9,91%) e beta heterozigotas (3,58%), as formas mais prevalentes. A talassemia alfa foi a mais prevalente tanto em negróides quanto em caucasóides.

8. Entre os 904 funcionários de algumas empresas de São José do Rio Preto, 1,65% apresentaram hemoglobinas anormais, sendo a Hb AS (0,81%) a forma mais prevalente seguida da talassemia beta heterozigota e Hb AC com a mesma proporção (0,3%). A Hb AS foi a mais frequente tanto em negróides como em caucasóides.

10. Durante o período de 1982 a 1984 os programas preventivos revelaram índices de hemoglobinopatias relativamente pequenos como podem ser observados em escolares da rede estadual (1,96%), escolares da rede particular de ensino (1,32%), universidades (3,40%) e empresas (1,65%), pois as técnicas laboratoriais utilizadas baseavam-se apenas em eletroforeses. A partir de 1985, com a introdução do testes de resistencia globular osmótica em NaCl a 0,36%, observou-se um sensível aumento da prevalência de talassemias do tipo beta, e esse aumento foi maior ainda após a introdução da análise morfológica dos eritrócitos, à partir de março de 1987.

11. No período compreendido entre 1990 e 1992 dos 7.403 doadores de sangue, 4,60% apresentaram hemoglobinas anormais, sendo a Hb AS (2,0%) a mais prevalente, seguida da talassemia alfa (1,17%).

Tais alterações não apresentam qualquer tipo de sintomatologia, e no caso das talassemias alfa técnicas mais precisas auxiliaram sua detecção.

12. Entre 1.208 recém-nascidos analisados, 7,20% apresentaram hemoglobinas anormais, sendo a forma mais prevalente a talassemia alfa, cuja confirmação diagnóstica foi realizada por identificação de frações de Hb de Bart utilizando as de focalização isoelétrica e pesquisa de corpos de inclusão de Hb H intraeritrocitários. As talassemias beta não foram relacionadas porque os casos suspeitos e seus familiares não retornaram ao laboratório para testes complementares.

13. Dentro das amostras analisadas durante programas preventivos a frequência de hemoglobinas anormais foram as seguintes: pais de portadores (22,2%), campanha de vacinação (15,42%), recém-nascidos (7,20%), Doadores de sangue (7,20%), postos de saúde/creches (2,99%), escolares (2,15%) e empresas (1,65%).

14. Os encaminhamentos de médicos e de instituições, para anemias a esclarecer, ou suspeita de hemoglobinopatias, provenientes de 100 cidades do Estado de São Paulo, totalizaram 4.038 pessoas, e deste grupo 45,6% apresentaram hemoglobinas anormais. As formas mais prevalentes foram as talassemias alfa e beta heterozigotas. Nas amostras provenientes dos outros 21 Estados da federação, de 158 cidades, 4.773 amostras de sangue revelaram 48,1% de hemoglobinas anormais, sendo que as formas mais prevalentes também foram as talassemias alfa e beta. Diante disto conclui-se que as talassemias constituem um grupo de alterações de grande

dificuldade de diagnóstico laboratorial.

15. Nas populações onde foi possível a caracterização racial, a análise estatística para a prevalência de hemoglobinopatias correlacionada aos grupos raciais estudados mostrou que a diferença entre caucasóides e negróides é significativa entre os escolares da rede estadual ($p<0,001$) e em postos de saúde ($p<0,001$).

16. Comparando os agrupamentos das amostras analisadas para observar a prevalência de hemoglobinas anormais, excetuando-se os casos de encaminhamento médico constituem um conjunto previamente selecionado, e a talassemia alfa, por apresentar discrepância de prevalência devido à tecnologia diagnóstica utilizada no início dos programa de prevenção, observa-se que as diferenças são estatisticamente significativas nas seguintes comparações: Escolares X Campanha ($p<0,000$); Escolares X Postos de Saúde ($p<0,000$); Escolares X Doadores ($p<0,000$); Empresas X Postos de Saúde ($p<0,000$); Postos de Saúde X Recém-nascidos ($p<0,000$); Campanha X Empresas ($p<0,000$); Campanha X Doadores ($p<0,012$); Campanha X Recém-nascidos ($p<0,000$); Empresas X Doadores ($p<0,001$); Doadores X Recém-nascidos ($p<0,001$).

17. A intensa diversidade fenotípica das hemoglobinopatias e suas implicações sejam elas sociais ou clínicas, mostram a importância destas alterações genéticas para a saúde pública e evidenciam a necessidade de implantação de amplos programas preventivos e de formação de recursos humanos, visando a melhoria das condições de saúde de nossa população. Tais programas são de grande

importância para o controle desta alterações em nosso meio, tanto à nível de formação de recursos humanos capacitado para o diagnóstico, quanto para detecção de heterozigotos e aconselhamento genético adequado a doentes e portadores.

18. Embora a nossa população apresente carência em muitas áreas da saúde pública, programas de tal porte podem contribuir para o benefício de indivíduos portadores de hemoglobinas anormais, especialmente aqueles com as formas patológicas.

VII. RESUMO

Uma característica importante das hemoglobinas anormais é sua distribuição heterogênea pelo mundo, atingindo índices que chegam a mais de 50%, dependendo da região estudada. Nestes países as hemoglobinopatias, especialmente as falcemias e talassemias são consideradas um problema sério de saúde pública. A população brasileira é reconhecidamente muito miscigenada, devido às características de nossa colonização, e aos processos migratórios e imigratórios. Os genes para as hemoglobinas anormais são portanto, encontrados em nossa população com frequências variáveis, e assim, influenciados por seus grupos raciais formadores.

A detecção de portadores destas alterações genéticas é de importância para a saúde pública, pois representam fonte de novos heterozigotos e de possíveis homozigotos. A dificuldade diagnóstica e de aconselhamento destes portadores evidencia a necessidade de programas preventivos à nível de screening populacional, aconselhamento genético e educacional e formação de recursos humanos capacitados para o diagnóstico.

Por essas razões o presente trabalho teve como objetivos as seguintes verificações: análise do processo de prevenção das hemoglobinopatias em populações de diferentes procedências, a saber: estudantes, doadores de sangue, recém-nascidos, crianças cadastradas em centros e postos de saúde, crianças de creches, operários, pacientes com suspeita de serem portadores de hemoglobinopatias, encaminhados por médicos e laboratórios; determinar qual a população em que o processo de

prevenção é mais eficiente; análise do polimorfismo genético de hemoglobinas obtido no estudo das populações acima discriminadas, utilizando metodologia compatível com sua aplicação em laboratórios de pesquisa e rotina; relacionar a diversidade do polimorfismo genético de hemoglobinas com as populações de diferentes procedências, com caracterização regional, racial e etária; avaliar o potencial dos programas de prevenção para constituir um contínuo fornecimento de material para análises de biologia molecular e, dessa forma, contribuir para o aperfeiçoamento técnico de sua implantação em nosso meio; avaliar o grau de abrangência desses programas nos níveis familiar, científico e de saúde pública; avaliar as formas de divulgação e abordagem dos programas de prevenção; Análise do processo de aconselhamento genético, visando o seu aperfeiçoamento, especialmente para talassemias e falcemias.

Do total de 41.235 amostras de sangue analisadas no período de 1982 a 1992 em diferentes populações observamos uma prevalência de hemoglobinas anormais de 12,98%, sendo as formas encontradas a Hb AS (2,42%), Hb AC (0,68%), Talassemia beta heterozigota (4,16%), Talassemia alfa (4,21%) e outros vinte e dois genótipos diferentes que incluem talassemias interativas e hemoglobinas variantes raras (1,49%).

A diversidade de prevalência dos diferentes tipos de hemoglobinas anormais nas diversas populações analisadas evidenciam a necessidade de cuidados na escolha da população a ser estudada em programas preventivos de hemoglobinopatias, bem como da técnologia laboratorial utilizada.

VIII. SUMMARY

An important characteristic of abnormal hemoglobins is their heterogeneous distribution around the world, reaching numbers of more than 50%, depending on the region studied. In these countries the hemoglobinopathies, especially sickle cell anemia and thalassemias are considered serious problems of public health. The Brazilian population is known to be very miscigenous, due to our colonization characteristics and to the migration and immigration process. The genes for abnormal hemoglobins are therefore,found in our population with variable frequencies, and, thus, influenced by its racial groups.

Carrier detection of these genetic alterations is important to public health, because they represent a source of new heterozygotes and possible homozygotes. The difficult diagnosis and counselling of these carriers turns evident the necessity of preventive programs considering populational screening, genetic and educational counselling and formation of human sources with capacity for diagnosis.

For these reasons the present work had as goals the following verifications: process analysis of hemoglobinopathy prevention in populations with different origins, ie: students, blood donors, newborns, children recorded in health stations, nursery children, workmen, patients suspect of being hemoglobinopathy carriers, directed by doctors and laboratory; determine what is the population in which the process of prevention is more efficient; analysis of genetic polymorphism of hemoglobins acquired by the study of the above mentioned populations, using compatibile methodology with its application

in research and routine laboratories; report the variety of genetic polymorphism of hemoglobins with populations from different origins, with regional and racial characterizations; evaluate the potential of prevention programs in forming a continuous supply of material for analysis of molecular biology and, in this way, contribute for the technical improvement of its implantation in our country; evaluate the degree of extension of these programs on family, scientific and public health levels; evaluate the patterns of divulging and coming to grips with programs of prevention; analysis of the genetic counselling process, having in view its improvement, especially for thalassemias and sickle cell anemia.

From the total of 41,235 samples of blood analysed in the period of 1982 to 1992 in different populations, we observed a prevalency of abnormal hemoglobins of 12.98%, being the patterns found: a Hb AS (2.42%), Hb AC (0.68%), thalassemia beta heterozygous (4.16%), alpha thalassemia (4.21%) and others 22 differents genotypes that include interative thalassemias and rare hemoglobins variants (1.49%).

The diversity of prevalency of different types of abnormal hemoglobins on the different populations analyzed makes evident the necessity of care in the choice of population to be studied in preventive programs of hemoglobinopathies, besides the laboratorial technology used.

IX. BIBLIOGRAFIA

ABBES,S.; FATTOUM,S.; VIDAUD,M.; GOOSSENS,M. & ROSA,J. Sickle cell anemia in the Tunisian population: haplotyping and Hb F expression. **HEMOGLOBIN,15** (1&2):1-9,1991.

ADVANI,R.; RUBIN,E.; MOHANDAS,N. & SCHRIER,S.L. Oxidative red blood cell mambrane injury in the pathophysiology of severe mouse beta thalassemia. **BLOOD,79** (4):1064-1067,1992.

ADVANI,R.; SORENSON,S; SHINAR,E.; LANDE,W.; RACHMILEWITZ,E & SCHRIER,S.L. Characterization and comparison of the red blood cell membrane damage in severe human alpha and beta thalassemia. **BLOOD,79** (4):1058-1063;1992.

AGOSTINIOTIS,M.; KYRIAKIDOV,S. & HADJIMINAS, M. How thalassemia was controlled in Cyprus. **WORLD HEALTH FORUM,** 7:291-297,1986.

AL-AWAMY,B.H.; NIAZI,G.A.; EL-MOUZAN,M.I.; ALTORKI,M.T. & NAEEM, M.A. Relationship of haemoglobin F and alpha thalassemia to severity of sickle cell anaemia in the Eastern Province of Saudi Arabia. **ANN. OF TROP. PAEDIAT.,**6:261-265,1986.

ALLISON,A.C. Genetic factors in resistence to malaria.**ANN. N. Y. ACAD. SCI.,**91:710-729,1961.

ALLISON,A.C. Polymorphism and natural selection in the human populations. **COLD SPRING HARBOUR SYMP. QUANT.BIOL.,** 29:137-149,1964.

ALPERIN,J.B.; DOW,P.A.; MOZELLAR,B. & PETTEWAY,B.S. Hemoglobin A2 levels in health and various hematologic disorders. **AM. J. CLIN.PATHOL.,**6:219-226,1977.

ALVARES,F^{O}.,F.; NAOUM,P.C.; MOREIRA,H.W. & ANGULO,I.L. Variabilidade polimórfica das hemoglobinas humans anormais em indivíduos das cidades de Barretos e Colina, SP, Brasil. **REV. BRAS. PATOL. CLIN.,**24 (2):32,1988.

ALVARES, F^{O}.,F **"O gene beta S (hemoglobina S) no Brasil. Distribuição geográfica, etária e racial.** Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciências, no Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas, Genética, UNESP, São José do Rio Preto,SP, 1990.

AKINYANJU,O. Management of sickle cell disorders and beta thalassemia in Nigeria. **WORKING PAPER FOR THE VITh ANNUAL MEETING OF THE W.H.O.** Cagliari, Sardinia, April,1989.

ANTONARAKIS,S.E.; KAZAZIAN Jr.,H.H. & ORKIN,S.H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene cluster. **HUM. GENET.,**69:1-14,1985.

ATAHNASIOV,G.; ZOUBOS,N. & MISSIRLIS,Y.; Erythrocyte membrane deformability in patients with thalassemia syndromes. **NOUV. REV.FR. HEMATOL.,**33:15-20,1991.

BALLAS,S.K.; TALACKI,C.A.; ADACHI,K.; SCHWARTZ,E.; SURREY,S. & RAPPAPORT,E. The XMNI site (-158,C-T)5' to the gama G globin gene: correlation with the Senegalense haplotype and gama G globin expression. **HEMOGLOBIN,15** (5):393-405,1991.

BEAVEN,G.H.; STEVENS,B.L.;DANCE,N. & WHITE,J.C. Ocurrence of haemoglobin H in Leukaemia. **NATURE,199** (28);1297-1298,1963.

BETKE,K.; MARTI,N.R. & SCHLICHT,I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. **NATURE,184**:1877,1959.

BEUTLER,E. The sickle cell disases and related disorders. "In: **HEMATOLOGY** - WILLIAMS,W.J.; BEUTLER,E.; ERSLEV,A.J. & LICHTMAN,M.A., 3rd Ed., New York, Mc Graw Hill, p.583-609,1983.

BEUTLER,E. The common anemias. Review. **J. AMER. MED. ASSOC.,259** (16):2433-2437,1988.

BIANCO,I.; GRAZIANI,B.; LERONE,M.; CONGEDO,P.; ALIQUO,M.Q.; PONZINI,D.;BRACONI,F.; FOGLIETTA,E.; MONDIANO,G. & SILVESTRONI,E. La prevenzione dell' anemia mediterranea nel Lazio: risultati del programa apllicato negli ultimi 10 anni. **PROG. MED. ROMA,42**:521-549,1986.

BIERI,J.G.; CORASH,L. & HUBBARD,V.S. Medical uses of vitamin E. **NEW ENGLAND J. MED.,308**:1063-1071,1983.

BLACK,J. An Isoelectricfocusing method to detect hemoglobin variants in newborn blood sample including the beta thalassemia. **HEMOGLOBIN,12**(5&6):681-689,1988.

BLUMENFELD,N.; ZACHOWSKI,A.; GALACTEROS,F.; BEUZARD,Y. & DEVAUX, P.F. Trans membrane mobility of phospholipids in sickle erythrocytes: Effect of deoxigenation on diffusion and assymmetry. **BLOOD,77**(4):849-854,1991.

BOARD,P.G. & PIDCOCK,M.E. Methaemoglobinaemia resulting from heterozygosity for two NADH-mathaemoglobin reductase variants: characterization as NADH-ferricyanide reductase. **BRITISH J. OF HAEMATOL.,47**:361-370,1981.

BRITTO,M.M.S.; ALVES,A.F.P. & RABELO,M.M. Alterações do desenvolvimento somático e sexual na anemia falciforme e taço falcêmico. **ARQ. BRAS. ENDOC. METABOL,29** (4):4,1984.

BROUSSIOUS,T. & BERTLES,J.F. Simultaneous expression of globin genes for embryonic and adult hemoglobins during mammalian ontogeny. **SCIENCE,218**:1225-1227,1982.

CAI,S.P.; ENG,B.; FRANCOMBE,W.H.; OLIVIERI,N.F.; KENDALL,A.G.; WAYNE,J.S.;& CHUI,D.H.K. Two novel beta thalassemia mutations in the 5' and 3' noncoding regions of the beta globin genes. **BLOOD,79** (5):1342-1346,1992.

CAO,A.; GABUTTI,V.; MASERA,G.; MODEL,B.; SIRCHIA,G. & VULLO,C. **Recomendações para o tratamento de talassemia beta.** Tradução autorizada. São Paulo, SP, 1990.

CAO,A.; ROSATELLI,C.; PIRASTU,M. & GALANELLO,R. Thalassemias in Sardinia: molecular pathology phenothype-genotype correlation and prevention. AM. J. PED. HEM. ONC.,13(2):179-188,1991.

CARRELL,R.W. & KAY,R. A simple method for detection of unstable hemoglobins. BRITISH J.OF HEMATOL., 23:615-619,1972.

CHARACHE,S. Sudden death in sickle trait. AMER. J. OF MED. 84:459-461,1988.

CHARACHE,S.; LUBIN,B. & REID,C.D. Management and therapy of sickle cell disease. U.S. DEPART. OF HEALTH AND HUM.SERV. Washington, D.C., 1991.

CHUI,D.H.K.; LUO,H-Y & CLARKE,B.J. Potential application of a new screening test for alpha thalassemia 1 carriers. HEMOGLOBIN,12(5&6):459-463,1988.

CODRINGTON,J.F.; LI,H-W.; KUTLAR,F.; GU,L-H.; RAMACHANDRAN, M. & HUISMAN, T.H.J. Observations on the levels of Hb A2 in patients with different beta thalassemia mutations and a delta chain variant. BLOOD,76(6):1246-1249,1990.

COLLINS, F.S.; STOERCKERT, C.J.; SERJEANT,G.R.; FORGET,B.G. & WEISSMAN,S.M. Gama G beta $^{+}$ hereditary persistence of fetal hemoglobin: cosmid cloning and identification of a specific mutation 5' to the gana G gene. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA., 81:4894-4898,1984.

COLONNA,P. & AMARA,F. Hemoglobinopathies in Algeria: beta-thalassemia and sickle cell disease. 6th annual meeting of the W.H.O. Work Group. Cagliari, Sardinia, April,1989.

COOLEY,T.B. & LEE,P. A serie of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. TRANS. AM. PEDIATR. SOC.,37:29-30,1925.

COSTA,F.F.; TAVELLA,M.H. & ZAGO,M.A. Deletion type alpha thalassemia among brazilian patients with sickle cell anemia. REV. BRAS. GENET.12(3):605-611,1989.

COUTELLE,C. New DNA analysis techniques (mini review). BIOMED. BIOCHIM. ACTA,50(1):3-10,1991.

CULPI,L. & SALZANO,F.M. Migration, genetic markers and race admixture in Curitiba, Brazil. J. BIOSC. SCI.,16:127-135, 1984.

DACIE,J.V. & LEWIS,S.M. "In: Practical Haematology" 6th ed. Churchill, London, p.516, 1985.

DANIEL,W.W. Bioestatistics: A foundation for analysis in the health sciences. JOHN WILEY & SONS. New York,1983.

DE-CEULAER,K.; HIGGS,D.R.; HAYES,R.J.; SERJEANT,B.E. & SERJEANT, G.R. Alpha thalassemia reduces the hemolytic rate in homozygous sickle cell disease. NEW ENGL. J. MED.,309 (3):189-190,1983.

DOMINGOS,C.R.B.; NAOUM,P.C.; MOREIRA,H.W.; BASSI,M.G.; MANZATO,A. J. & ALVARES Fo.,F. Hemoglobinopatias e haptoglobinas em portadores de doença Chagas. REV. BRAS. PAT. CLIN.,27(3): 80-88,1991.

DONALD,J.A.; LAMMI,A. & TRENT,R.J. Hemoglobin F production in heterocellular hereditary persistence os foetal hemoglobin and its linkage to the beta globin gene complex. HUM. GENET., 80:69-74,1988.

DOVER,J.G. Pharmacological manipulation of fetal hemoglobin. Update on clinical trials with hydroxyurea. ANN. N. Y. ACAD. OF SCI.,612:184-190,1992

EDELSTEIN,S.J. The sickled cell - from myths to molecules. HAVARD UNIVERSITY PRESS. Cambridge, Massachusetts, London, England, p.197, 1986.

ELION,J.; BERG,P.E.; LAPOUME ROULIE,C.; TRABUCHET,G.; MITTELMAN, M.; KRISHNAMOORTHY,R.; SCHECHTER,A.N. & LABIE,D. DNA sequence variation in a negative control region 5' to the beta globin gene correlates with the phenotypic expression of the beta S mutation. BLOOD,79(3):787-792,1992.

EMBURY,S.H. The interaction of alpha thalassemia with sickle cell anemia. HEMOGLOBIN,12(5&6):509-517,1988.

EMBURY,S.H. The different types of alpha thalassemia 2: genetic aspects. HEMOGLOBIN,12(5&6):445-453,1988.

ERSLEV,A.J. Hemoglobinpathies producing erythrocytosis. "In: HEMATOLOGY WILLIAMS,W.J.; BEUTLER,E.; ERSLEV,A.J.; LICHITMAN, M.A. eds. " N.Y. Mc Graw Hill, p.686-690,1983.

FABRY,M.E.; ROMERO,J.R.; BUCHANAM,I.D.; SUZUKA,S.M.; STAMATOYANNOPOULOS,G.; NAGEL,R.L. & CANESSA,M. Rapid increase in red blood cell density driven by K:Cl cotransport in a subset of sickle cell anemia reticulocytes and discocytes. BLOOD,78(1):217-225,1991.

FABRY,M.E.; FINE,E.; RAJANAYAGAM,V.; FACTOR,S.M.; GORE,J.; SYLLA, M. & NAGEL,R.L. Demonstration of endothelial adhesion of sickle cell in vivo: a distinct role for deformable cell discocytes. BLOOD,79(6):1602-1611,1992.

FESSAS, P. Prevention of thalassemia and haemoglobin S Syndromes in Greece. HEMOGL. PROC. INT. MEETING LONDON, 78:168-172, 1987.

FLINT,J.; HILL,A.V.S.; BOWDEN,D.K.; OPPENHEIMER,S.J.; SILL,P.R.; SERJEANTSON,S.W.; BANA-KOIRI,J.; BHATIA,K.; ALPERS,M.P.; BOYCEA.J.; WEATHERALL,D.J. & CLEGG,J.B. High frequencies of alpha thalassemia are the result of natural selection by malaria.NATURE,321(19):744-750,1986.

FRANCIS Jr.,R.B. & JOHNSON,C.S. Vascular oclusion in sickle cell disease: current concepts and unanswered questions. BLOOD,77(7):1405-1414,1991.

FRIGON,N.L.; SHAO,L.E.; YOUNG,A.L.; MADERAZO,L. & YU-J. Regulation of globin genes expression in human K562 cells by reconbinant Activin A. **BLOOD**,79(3):765-772,1992.

GALANELLO,R.; PAGLIETTI,E.; MELIS,M.A.; GIAGU,L. & CAO,A. Hemoglobin inclusion in heterozygous alpha thalassemia according to their alpha globin genotype. **ACTA HAEMATOL.**, 72:34-36,1984.

GERALD,P.G. The methemoglobinemias."In:**METABOLIC BASIS OF INHERITED DISEASE**". STAMBURU,J.B.; WYNGAARDEN,J.B. AND FREDICKSON,D.S. eds. p. 1069. Mac Graw Hill, N.Y.,1966.

GERSTER,J.C.; DARDEL,R. & GUGGI,S Recurrent episodes of arthritis in thalassemia minor. **J. OF RHEUMAT.**,11(3): 352-354,1984.

GIBBONS,R.J.; SUTHERS,G.K.; WILKIE,A.O.M.; BUCKLE,V.J. & HIGGS,D. R. X-Linked alpha thalassemia/mental retardation (ATR-X) syndrome: localization to Xq12-q21.31 by X inactivation and linkage analysis. **AM.J. HUM. GENET.**,51:1136-1149,1992.

GILMAN,J.G.; MISHIMA,N.; WEN,X.J.; KUTLAR,F. & HUISMAN,T.H.J. Upstream promotors mutation associatede with a modest elevation of fetal hemoglobin espression in human adults. **BLOOD**,72(1):78-81,1988.

GOLDFARB,A.; GRISARU,D.; GIMMON,Z.; OKON,E.; LEBENSART,P. & RACHMILEWITZ,E.A. High incidence of cholelithiasis in older patients with homozygous beta thalassemia. **ACTA HAEMATOL.**83: 120-122,1990.

GOMES,C.T.; NAOUM,P.C. & ANGULO,I.L. Talassemia alfa adquirida nas doenças linfo e mieloproliferativas. **REV.BRAS. PATO. CLIN**, 24(3):98-101,1998.

GONÇALVES,M.S. & RAMALHO,A.S. Frequency and glomerular or post-glomelurar origin of hematuria in brazilian patients with sickle cell syndromes. **REV. BRAS. GENET**,13(4):841-848,1990.

GONZALEZ,R.; ESTRADA,M.; WADE,M.; DE LA TORRE, E.; SUARCH,E.; FERNANDEZ,O.; ORTIZ,R.; GUSMAN,E. & COLOMBO,B. Heterogeneity of hereditary methaemoglobinaemia: a study of 4 cuban families with NADH-methaemoglobin reductase deficiency including a new variant (Santiago de Cuba variant)**SCAND. J. HAEMATOL.**,20:385-393,1978.

GONZALEZ-REDONDO,J.M.; STOMING,T.A.; LANCOS,K.D.; GU,U.C. KUTLAR, A.; KUTLAR,F.; NAKATSUJI,T.; DENG,B.; HAN,I.S.; McKIE,V.C. & HUISMAN,T.H.J. Clinical and genetic heterogeneity in black patientes with homozygous beta thalassemia from the southeastern United States. **BLOOD**,72(3):1007-1014,1988.

GUERRA,C.C.C.; ROSENFELD,L.G.M.; HAMERSCHALAK,N.; PIAZZA,F.J.D.; SZTERLING,G. & CAVAGNOLI,K.S. Triagem de hemoglobinoptias em doadores de sangue na cidade de São Paulo. **BOLETIM SBHH**,IX (143):5-8,1987.

GUERREIRO,J.F.; FIGUEIREDO,M.S.; SANTOS,S.E.B. & ZAGO,M.A. Beta globin gene cluster haplotypes in Yanomama Indians from the Amazon region of Brazil. **HUM. GENET.,89**:629-631,1992.

GUPTA,R.B.; TIWARY,R.S.; PANDE,P.C.; KUTLAR,F.; ONER,C.; ONER,R. & HUISMAN,T.H.J. Hemoglobinopathies among the gond tribal groups of central India: interaction of alpha and beta thalassemia with beta chain variants. **HEMOGLOBIN,15**(5):441-458,1991.

HEBBEL,R. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophisiology. **BLOOD,77**(2):214-237,1991.

HELLER,P. Hemoglobinopathic dysfunction of the red cell. **AM J. MED,41**:799-802,1968.

HIGGS,D.R.; VICKERS,M.A.; WILKIE,A.O.M.; PRETORIUS,I-M.;JARMAN,A. P. & WEATHERALL,D.J. A review of the molecular genetics of the human alpha globin gene cluster. **BLOOD,73**(5):1081-1104,1989.

HONIG,G.R. & ADAMS III,J.G. **Human hemoglobin genetics**, Springer Verlag/wien,N.Y., 1986.

HSIA,Y.E.; YUEN,J.; HUNT,J.A.; RATTAMANASAY,P.; HALL,J.; TAKAESU, N.; TITUS,E.A.B.; FUJITA,J. & FORD,C.A. The different types of alpha thalassemai: practical and genetical aspects. **HEMOGLOBIN,12**(5&6):465-484,1988.

HUANG,S-Z.; RODGERS,G.P.; ZENG,F-Y.; ZENG,Y-T. & SCHECHTER,A.N. Diagnosis of thalassemia using cDNA amplification of circulating erythroid cell mRNA with the polymerase chain reaction. **BLOOD,78**(9):2433-2437,1991.

HUISMAN,T.H.J. The beta thalassemia repository. **HEMOGLOBIN,14**(6):661-675,1990.

HUISMAN,T.H.J. The Beta and delta thalassemia repository. **HEMOGLOBIN,16** (4):237-258,1992.

HUTZ,M.H. **Historia natural da anemia falciforme em pacientes da região metropolitana do Rio de Janeiro** . Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor em genetica. Porto Alegre. RS,1981.

HUTZ,M.H. & SALZANO,F.M. Sickle cell anemia in Rio de Janeiro, Brazil: demographic, clinical and laboratorial data. **BRAZ. J. OF MED. BIOL. RES.,16**:219-226,1983.

HUTZ,M.H.; SALZANO,F.M. & ADAMS,J. Hb F levels, longevity of homozygotes and clinical course of sickle cell anemia in Brazil. **AMER. J. OF MED. GENET.,14**:669-676,1983.

IHIC - INTERNATIONAL HEMOGLOBIN INFORMATION CENTER - Variants list. **HEMOGLOBIN,16**(3):127-217,1992.

IHIC - INTERNATIONAL HEMOGLOBIN INFORMATION CENTER - Variants list. **HEMOGLOBIN**,13(3):223-297,1989.

ISAACS,A. The influence of malarua and the Hb S gene on Hb A2 synthesis. **CLIN. CHIM. ACTA**,36:27-31,1972.

JAFEE,E.R. & HSIEN,H.S. DPNH-Methemoglobin reductase deficiency and hereditary methemoglobinemia. **SEMIN. HEMATOL.** 8:417-437,1971.

JANKOVIC,L.; DIMOVSKI,A.J.; EFREMOV,G.D. & JURICIC,D. A mutation at (DS 82183 C-G) observed in a Yugoslavian family with a heterozygosity for beta thalassemia. **HEMOGLOBIN**,16 (4):291-294,1992.

JARA,N.O.; GUEVARA ESPINOSA,A. & GUDERIAN,R.H. Investigacion de hemoglobinas anormales en poblaciones ecuatorianas de rza negra. **SANGRE**,34(1):10-13,1989.

KAN,Y.W. & DOZY,A.M. Polymophism of DNA sequence adjacent to human beta globin structural gene: relationship to sickle mutation. **PROC. NATL. ACAD. SCI.**,75:5631-5635,1978.

KATTAMIS,C.; TZOTZOS,S.; KANAVAKIS,E.; SYNODINOS,J. & METAXOTOU-MAVROMMATI,A. Correlation of clinical phenotype to genotype in haemoglobin H disease. **THE LANCET**,27:442-444,1988.

KAZAZIAN Jr.,H.H. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. **SEM. IN HEMATOL.**,27 (3):209-228,1990.

KAZAZIAN Jr.,H.H; DOWLING,C.E.; HURWITZ,R.L.; COLEMAN,M.; STOPECK,A. & ADAMS III,J.G. Dominant thalassemia like phenotypes associated with mutations in Exon 3 of the beta globin gene. **BLOOD**,79(11):3014-3018,1992.

KLEMAN,K.M.; VICHINSKY,E. & LUBIN,B.H. Experience with newborn screening using isoelectric focusing. **PEDIATRICS**,31: 852-854,1989

KOO,M.S.; KIM,S.I.; CHO,H.I.; HATTORI,Y.; YAMASHIRO,Y.; HOSHITANI,M.; OHBA,Y.; MIYAJI,T.; YAMAMOTO,K.U. & YAMAMOTO,K. I. A beta thalassemia mutation found in Korea. **HEMOGLOBIN**,16(4):313-320,1992.

KRISHNAMOORTHY,R.; ELION,J.; KUHN,J.M.; LAGRANGE,J.L.; ROCHETTE, J.; LUTON,J.P. BRICAIRE,I.T. & LABIE,D. Hemoglobin A2 is elevated in hyperthyroid patients. **NOUV. REV. FR. HEMATOL.**, 24:39-42,1982.

KULOZIK,A.E.; BAIL,S.; KAR,B.C.; SERJEANT,B.E. & SERJEANT,G.E. Sickle cell-beta + thalassemia in Orissa State, India. **BRITISH J. OF HAEMATOL.**,77:215-220,1991.

LABIE,L. La commutation (switch) perinatale de l'hemoglobine. **MED. SCI.**,6:572-573,1990.

LABIE,D.; BENNANI,C. & BELDJORD,C. Beta thalassemia in Algeria. **ANN.N.Y. ACAD. SCI.,612:43-54,1990.**

LACERRA,G.; FIORETTI,G.; DE ANGIOLETTI,M.; PAGANO,L.; GUARINO,E.; BONIS,C.; VIOLA,A.; MAGLIONE,G.; SCARALLO,A.; DE ROSA,L. & CARESTIA,C. (alpha)alpha$^{5.3}$: a novel alpha^{+}-thalassemia deletion with the breakpoint in the alph2-globin gene and in close proximity to an ALU family repeat between the psy-alpha2 and psy-alpha1 globin genes. **BLOOD,78(10):2740-2746,1991.**

LANCOS,K.D.; ONER,C.; DIMOVSKI,A.J.; GU,Y-C. & HUISMAN,T.H.J. Sequence variations in the 5' flanking and IVS-II regions of the gama G and gama A globin genes of the beta S chromosomes with five different haplotypes. **BLOOD,77(11):2488-2496,1991.**

LAROS Jr,R.K.; FACOG,J. & KALSTONE,C.E. Sickle cell beta thalassemia and pregnancy. **OBSTET. AND GYNECOL.,** 37(1):76-71:1971.

LARSON,H.T. **Introduction to probability theory and statistical inference.** JOHN WILEY & SONS, New York, 1982.

LAWRENCE,C.; FABRY,M.E. & NAGEL,R.L. The unique red cell heterogeneity of SC disease: crystal formation dense reticulocytes, and unusual morphology. **BLOOD,78(8):2104-2112,1991.**

LEHMANN,H & HUNTSMAN,R.G. **Man's haemoglobin.** Amsterdan, North Holland Publication., p.478,1974.

LEY,T.J. The pharmacology of hemoglobin switching of mice and men. **BLOOD,77(6):1146-1152,1991.**

LEWIS,D.; STOCKLEY,R.J. & CHANARIN,I. Changes in the mean corpuscular red cell volume in women with beta thalassemia trait during pregnancy. **BRITISH J. OF HAEMATOL.,** 50:423-425,1982.

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,290(5):26-29,1981.**

LIEBHABER,S.A. Alpha thalassemia . Invited review. **HEMOGLOBIN,13** (7&8):685-713,1989.

LINDEMAN,R.; HU,S.P.; VOLPATO,F. & TRENT,R.J. Polymerase chain reaction (PCR) mutagenesis enabling rapid non-radioactive detection of commons beta-thalassemia mutations in mediterraneans. **BRITISH J. OF HAEMATOL.,78:** 100-104,1991.

LOADER,S.; SUTERA,C.; WALDEN,M.; KOZYRA,A. & ROWLEY,P.T. Prenatal screening for hemoglobinopathies.II. Evaluation of counseling. **AM.J. HUM GEN.,48:447-451,1991.**

LONG,J.C.; CHAKRAVARTI,A.; BOHEM,C.D.; ANTONARAKIS,S.C. & KAZAZIAN Jr.,H.H. Phylogeny of human beta globin haplotypes and its implications for recent human evolution. **AM. J. PHYS. ANTHROPOL.,81**:113-130,1990

LUZATTO,L. Genetics of red cells and susceptibility to malaria. **BLOOD,56**:961,1979.

MAGGIO,A.; DIMARZO,R.; GIAMBONA,A.; RENDA,M.; ACUTO,S.; LO GIOCO, P.; D'ALCAMO,E.; DI TRAPANI,F.; MARINO,M.; ABATE,I. ; SAMMARCO,P. & KAZAZIAN Jr.,H.H. Beta thalassemia mutations in Sicily. **ANN. N. Y. ACAD. SCI.,612**:67-73,1990.

MAGRO,S.; PUZZONIA,P.; CONSARINO,C.; GALATI,M.C.; MORGIONE,S.; PORCELLI,D.; GRIMALDI,S.; TANCRE,D.; ARCURI,V.; DE SANTIS,V. & ALBERTI,A. Hypothiroidism in patients with thalassemia syndromes.**ACTA HAEMATOL.,84**:72-76,1990.

MANIATIS,T.; FRITSCH,E.F.; LAVER,J. & LAWN,R.M. The molecular genetics of human hemoglobins. **AM. REV. GENET.,14**: 145-178,1980

MARENGO-ROWE,A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **J. CLIN. PATH.,18**: 90-792,1965.

MEDEIROS,T.M.D.; BEZERRA,F.L.; GOUVEIA,J.B.B. Tipos de hemoglobinas em escolares da cidade de Natal, RN.**REV. BRAS. ANAL. CLIN.,24**:79-80,1992.

MEDEIROS,M.H.G.; BECHARA,E.J.H.; NAOUM,P.C. & MOURÃO,C.A. Oxygen toxicity and hemoglobinemia in subjects from a highly polluted town. **ARCH.ENVIROM. HEALTH.,38**:11-16,1983.

MELLIS,M.A.; PIRATSU,M.; GALANELLO,R.; FURBETTA,M.; TUVERI,T. & CAO,A. Phenotypic effect of heterozygous and beta^{O}-thalassemia interaction. **BLOOD,62**:226-229,1983.

METHERALL,J.E.; GILLESPI,F.P. & FORGET,B.G. Analyses of linked beta globin genes suggest that nondeletion forms of hereditary persistence of fetal hemoglobin are bona fide switching mutants. **AM. J. HUM. GENET.,42**:476-481,1988.

MOI,P.; LOUDIANOS,G.; LAVINHA,J.; MURRU,S.; LOSSU,P.; CASU,R.; OGGIANO,L.; LONGINOTTI,M.; CAO,A. & PIRATSU,M. delta thalassemia due to a mutation in a erythroid specific binding protein sequence 3' to the delta globin gene. **BLOOD,79**(2):5120516,1992.

MONOD,I.; WYMAN,L. & CHANDEUX,J.P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. **J. MOL. BIOL.,12**:88-118,1965.

MONTEIRO MARINHO ,H. Hemoglobinopatia S. Doença eritrofalcemica. **PUBLICAÇÕES TECNICAS DO CENTRO DE ESTUDOS TREINAMENTO E APERFEIÇOAMENTO DA SECRETARIA DE SAÚDE.** Rio de Janeiro,1970.

MOOKERJE,B.; ARCASOY,M.O. &TWEH,G.F. Spontaneous delta- to beta-globin switching in K562 human leukaemia cells. **BLOOD**,79(3):820-825,1992.

MOREIRA,H.W.; NAOUM,P.C.; FERREIRA,R.R.; FONSECA,L.M.; MENDONÇA, C.P.; ARANTES,J.B.; ALVARES Fo.,F. & SOARES,C.P. Distribuição dos fenótipos de hemoglobinas no vale do ribeira,SP. **REV. BRAS. PAT.CLIN.**,25(3):76-79,1989.

MYIOSHI,K.; KANETO,Y.; KAWAI,H.; OHCHI,H.; NIKI,S.; HASEGAWA,K.; SHIRAKAMI,A. & YAMANO,T. X-linked dominant control of F cells in normal adult life: characterization of the Swiss type as hereditary persistence of fetal hemoglobin regulated dominanttly by gene(s) on X chromosome. **BLOOD**,72(6):1854-1860,1988.

NAGEL,R.L. & RANNEY,H.M. Genetic epidemiology of structural mutations of the beta globin genes. **SEMIN. IN HEMATOL.**, 27(4):342-359,1990.

NAGEL,R.L.; ERLINGSSON,S.; FABRY,M.E.; CROIZAT,H.; SUSUKA,S.M.; LACHMAN,H.; SUTTON,M.; DRISCOLL,C.; BOUHASSIRA,E. & BILLET,H. H. The Senegal DNA haplotype is associated with the amelioration of anemia in African American sickle cell anemia patients. **BLOOD**,77(6):1371-1375,1991.

NAOUM,P.C.; MACHADO,P.E.A.; MICHELIN,O.C.; CURY,R.R. & PIO DA SILVA,M. Concentration of haemoglobin A2 an Fetal in Brazilian Indians relationship between these haemoglobins and malaria. **CIENCIA E CULTURA**,31:188-190,1979.

NAOUM,P.C. **Hemoglobinopatias no Estado de São Paulo.** Tese de Livre Docência, UNESP, São José Do Rio Preto,SP, 1982.

NAOUM,P.C.; MATTOS,L.C.; CHALELLA,C.R. & UEZONO,M.M Hemoglobinas anormais em uma população do Estado de São Paulo, Brasil. **REV. BRAS. PAT. CLIN.**,19(3):86-89,1983.

NAOUM,P.C. Anemias imigrantes. A origem das anemias hereditárias no Brasil. **CIENCIA HOJE**,3(14):59-64,1984.

NAOUM,P.C. **Diagnóstico das hemoglobinopatias.** Sarvier,SP. ,1987.

NAOUM,P.C.; ALVARES Fo.,F.; DOMINGOS,C.R.B.; FERRARI,F.; MOREIRA, H.W.; SAMPAIO,Z.A.; MAZIERO,P.A. & CASTILHO,E.M. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. **REV. BRAS. PAT. CLIN.**,23(3):68-79,1987.

NAOUM,P.C.; ISIQUE, W.D.; PAGOTTO,R.C. & DOMINGOS,C.R.B. Prevalência de hemoglobinopatias em amostras de proveniência diferenciada. **BOLETIN SBHH, XI**(153):69-72,1989.

NAOUM,P.C.; DOMINGOS,C.R.B. & MELLO,S.M.A. Hemoglobinopatias no Brasil - 1991. **ANAIS II SIMPOSIO DE POS GRADUAÇAO E PESQUISA EM CIENCIA BIOLOGICAS.**P.53. Aguas de São Pedro, SP,1991.

NAOUM P.C. **Eletroforese, técnicas e diagnósticos.** Editora Santos, São Paulo, 1990.

NIENHUIS,A.W.; ANAGNOU,N.P. & LEY,T.J. Advances in the thalassemia research. **BLOOD,63(4):738-758,1984.**

NORTH,M.L.; PIFFAUT,M.C.; DUWING,I.; LUCOH-DONOV,A.G. & LUCOH-DONOV,A.M. Detection of haemoglobinopathies at birth in Togo. **NOUV. REV, FR. HEMATOL.,30:237-241,1988.**

O'BRIEN,R.T. The effect of iron deficiency on the expression of hemoglobin H. **BLOOD,41(6):853-856,1973.**

ONER,C.; DIMOVSKI,A.J.; ALTAY,C.; GURGEY,A.; GU,Y-C. ; HUISMAN, THJ. & LANCOS,K.D. Sequence variations in the 5' hypersensitive site 2 of the locus control region of betaS chromosome are associated with different levels of fetal globin in hemoglobin S homozygotes. **BLOOD,79(3):813-819,1992.**

ORKIN,S.T. & KAZAZIAN,H.H. The mutation and polymorphism of the human beta globin gene and its surrounding DNA. **ANN. REV. GEN.,18:131-171,1984.**

OTTOLENGHI,S.; NICOLLIS,S.; BERTINI,C.; RONCHI,A.; CROTTA,S. & GIGLIONI,B. Regulation of gama globin expression in hereditary persistence of fetal hemoglobin. **ANN. N.Y. ACAD. SCI.,612:191-195,1990.**

PADMOS,M.A.; ROBERTS,G.T.; SACKEY,K.; KULOZIK,A.; BAIL,S.; MORRIS,J.S.; SEJEANT,B.E. & SERJEANT,G.R. Two different forms of homozygous sickle cell disease occur in Saudi Arabia. **BRITISH J. OF HAEMATOL.,79:93-98,1991.**

PAPAYANNOPOULOUS,R. & STAMATAYANNOPOULOUS,G. Stains for inclusions bodies ."In: **Standatization of laboratoru reagents and methods for detection of haemoglobinopathies".** Hew puplications, (CDC) Atlanta, Georgia,1974.

PAULING,L.; ITANO,H.A.; SINGER,S.J & WELLS,I.C. Sickle cell anemia molecular disease. **SCIENCE,110:543,1949.**

PEDROLLO,E.; HUTZ,M.H. & SALZANO,F.M. Alpha thalassemia frequency in newborn children from Porto Alegre, Brazil. **REV. BRAS. GENET.,13(3):573-581,1990.**

PERUTZ,M.F. Structure and mechanism of hemoglobin. **BRITSH MED. BULL.,32(2):195-208,1976.**

POWARS,D.R.; SANDHU,M.; NILAND-WEISS,J.; JOHNSON,C.; BRUCE,S. & MANNING,P.R. Preganacy in sickle cell disease. **OBSTET. AND GYNECOL.,67(2):217-228,1986.**

POWARS,D.R. Sickle cell anemia and major organ failure. **HEMOGLOBIN,14(6):573-598,1990.**

PRASARTKAEW,S.; BUNYARATVEJ,A.; FUCHAROEN,S. & WASI,P. Comparison of erythrocyte antioxidative enzyme activities between two types of haemoglobin H disease. **J. CLIN. PATHOL., 39:1299-1303,1986.**

RAMALHO,A.S. As hemoglobinopatias hereditárias - Um problema de saúde pública no Brasil. Gráfica e Editora FCA. São Paulo. p.46-50,1986 (a).

RAMALHO,A.S. A talassemia minor como causa de anemia no Estado de São Paulo. REV. BRAS. PAT. CLIN.,22:32-38,1896 (b).

RIEDER,R.F.; SAFAYA,S.; GILLETE,P.; FRYD,S.; HSU,H.; ADAMS,J.G. & STEINBERG,M.H. Effect of beta globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. AMER. J. OF HEMATOL.,36:184-189,1991.

RODGERS,G.P.; SAHOVIC,E.A.; PIERCE,L.E.; ANAGNOU,N.P.; NOGUCHI,C. T. & SCHECHTER,A.N. Hemoglobin SC disease and alpha thalassemia. AMER. J. OF MED.,180:746-750,1986.

ROMAO,L.; OSORIO-ALMEIDA,L.; HIGGS,D.R.; LAVINHA,J. & LIEBHABER, S.A. Alpha thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the alpha globin structural genes. BLOOD,78(6):1589-1595,1991.

ROWLEY,P.T.; LOADER,S.; SUTERA,C.; WALDEN,M. & KOZYRA,A. Prenatal screening for hemoglobinopathies.III. Aplicabillity of the health belief model. AM. J. HUM. GEN.,48:452-459,1991.

ROWLEY,P.T.; LOADER,S.; SUTERA,C.; WALDEN,M. & KOZYRA,A. Prenatal screening for hemoglobinopathies.I. A prospective reginal trial. AM. J. HUM. GEN.,48:439-446,1991.

RUCNAGEL,D.L.; BAINE,R.M.; HANASH,S.M. & WINTER,W.P. Polymorphism in the number of hemoglobin alpha-chain loci and mechanisms governing the balance of chain synthesis. "In: The red cell BEWER,G.J. eds. New York, Liss. p.63,1978.

RUND,D.; FILON,D.; DOWLING,C.; KAZAZIAN Jr.,H.H.; RACHMILEWITZ,E. A. & OPPENHEIM,A. Molecular studies of beta thalassemia in Israel. ANN. N.Y. ACAD. SCI.,612:98-105,1990.

RUND,D.; FILON,D.; STRAUSS,N.; RACHMILEWITZ,E.A. & OPPENHEIM,A. Mean corpuscular volume of heterozygotes for beta thalassemia correlates with the severity of mutations. BLOOD,79(1):238-243,1992.

RUIZ,M.A.; GUERRA,C.C.C. & NAOUM,P.C. Detecção de hemoglobinas anormais em sangue de cordão de recém-nascidos na cidade de Santos, São Paulo, através da eletroforese em gel de agar-amido. BOLETIN SBHH,VII(137):8-13,1986.

RUIZ FRANCO,O.E.; VILLACORTA WETTSTEIN,M.E. ZAGA CATACORA,R.E. & MARQUEZ TORRES,M.C. Estudio de hemoglobinas anormales en una población de raza negra en el Perú. SANGRE,35 (4):263-265,1990.

SAENZ,G.F.; ALTAFULLA,M.; SANCHO,G. & SALGADO,M. Hemoglobinas anormales e talassemias en Costa Rica, otros apíses de centroamérica y Panama. BOL. OF SANIT, PANAM. ,105(2):101-118,1988.

SAENZ RENAULD,G.F. Hemoglobinopatias en los paises de la cuenca del Caribe. **REV. BIOL. TROP.,36(2B):361-372,1988.**

SALEEM,A.; IRANI,D.R.; BART,J.B. & ALFREY Jr,C.P. Suppression of hemoglobin H in disorders of iron metabolism. **ACTA HAEMATOL., 77:34-37,1987.**

SALZANO,F.M. Abnormal hemoglobins studied and counseling in Brazil. "In: **PROCEEDINGS OF THE FIRST INTERNATIONAL CONFERENCE OF SICKLE CELL DISEASE: A WORLD HEALTH PROBLEM.** Scott, R.B. ed, Howard University, Washington, 1979.

SALZANO,F.M. Hemoglobin variants in Brazil. "In:**Hemoglobins variants in human population** Vol1. Cap.8,WINTER,W.P. eds CRC press, Boca Raton, Florida,p 117-130,1986.

SCHNEIDER,R.G. Differentiation of electrophoretically hemoglobins - such as S, D, G and P or A2, C, E and O - by electrphoresis of the globin chains. **CLIN. CHEM.,20:1111-1115,1974.**

SCHNEIDER,R.G.; HIGHTWOER,B.; HOSTY,T.S.; RYDER,H.; TOMLIN,G.; ATKINS,R.; BRIMHILL,B. & JONES,R.T. Abnormal hemoglobins in a quarter milion people. **BLOOD,48(5):629-637,1976.**

SCHRIER,S.L. & MOHANDAS,N. Globin chain specificity of oxidation induced changes in red blood cell membrane properties. **BLOOD,79(6):1586-1592,1992.**

SCHRIER,S.L.; RACHMILEWITZ,E. & MOHANDAS,N. Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemia erythrocytes are different: inplications for differences in clinical manifestation.**BLOOD,74(6):2194-2202,1989.**

SCHWARTZ,E.; COHEN,A. & SURREY,S. Overview of the beta thalassemias: genetic and clinical aspects. **HEMOGLOBIN,12 (5&6):551-564,1988.**

SHAO,L.E.; FRIGON Jr,N.L.; YOUNG,A.L.; LU,A.L.; MATHEUS,L.S.; VAUGHAN,J. & VALE,W. Effect of activin A on globin gene expression in purified human erythroide progenitor. **BLOOD,79(3):773-781,1992.**

SHIMIZU,K.; KEINO,H.; MIZUTANI,A.; ITHO,T. & NISHIGAKI,I. Red cell NADH diaphorase variants in Japanese. **HUM. HERED., 35:212-217,1985.**

SHIMIZU,K.; KEINO,H.; TERASAWA,T.; SHICHISHIMA,T.; IKUTA,K. & HAYASHI,Y. Elavated haemoglobin F in Juvenile and adult chronic myelogenous leukaemia. **ACTA HAEMATOL.,80:28-33,1988.**

SHINAR,E. & RACHMILEWITZ,E.A. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. **SEMIN. IN HEMATOL.,27 (1):70-82,1990.**

SILVA,A.E. & VARELLA-GARCIA,M. Plasma folate and vitamin B12 levels in beta thalassemia heterozygotes. **BRAZ. J. MED. BIOL. RES.,22:1225-1228,1989.**

SILVESTRONI, E. & BIANCO,I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **AM. J. HUM. GENETIC,27:198,1975.**

SONATI,M.F. & COSTA,F.F. Hemoglobin Bart's in a Brazilian black population. **BRAZ. J. MED. BIOL. RES.,23:295-396,1990.**

SONATI,M.F. **Thalassemia alfa em uma população negróide brasileira** Tese de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Genética. UNICAMP, Campinas,SP .1987.

SONATI,M.F.; FARAH,S.B.; RAMALHO,A.S. & COSTA,F.F. High prevalence of alpha thalassemia in a black population of Brazil. **HEMOGLOBIN,15(4):309-311,1991.**

SPRITZ,R.A. & FORGET,B.G. The thalassemias: molecular mechanisms of the human genetic disease. **AM. J. HUM.GENT.,35: 333-361,1983**

STEINBERG,M.H. & EMBURY,S.H. Alpha thalassemia in blacks:genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **BLOOD,68(5):985-990,1986.**

STEINGERG,M.H. Review:thalassemia - molecular pathology and management. **AM. J. MED. SCI.,296(5):308-321,1988.**

STEINBERG,M.H. The interaction of alpha thalassemia with hemoglobinopathies. **HEMATOL./ONCOL. CLIN. OF NORTH AMERICA,5(3):453-473,1991.**

STEINBERG,M.H. & ADAMS III,J.G. Hemoglobin A2: origin, evolution and aftermath. **BLOOD,78(9):2165-2177,1991.**

SULLIVAN,L.W. The risks of sickle cell trait. **NEW ENGLAND J. OF MED.,(24):830-831,1987.**

TAVARES NETO,J. A hemoglobinopatia S: um problema de saúde pública e ocupacional. **BOL.OF SANIT. PANAM., 90(3):229-238,1981.**

THEIN,S.L. & WEATHERALL,D.J. Aproach to the diagnosis of beta thalassemia by DNA analysis. **ACTA HAEMATOL.,78: 159-167,1987.**

THEIN,S.L. Dominant beta thalassemia molecular basis and pathophysiology. **BRITISH J. OF HAEMATOL.,80: 273-277,1992.**

TRENT,R.J.; BROCK,P.E.; YAKAS,J.; TRENT, L.M. & KRONENBERG,H. Diagnois of alpha thalassemia in the newborn cord blood survey utilizing gene mapping. **PATHOLOGY,16:16-21,1984.**

TRIFILLIS,P.; LOANNOV,P.; SCHWARTZ,E. & SURREY,S. Identification of four novel delta globin gene mutation in Greek Cypriots using polymerase chain reaction and automated fluorescent based DNA sequence analysis. **BLOOD,78(12):3298-3305,1991.**

VELLA,F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **AM. J. CLIN. PATH.,49:440,1968.**

VICHINSK,E.P. & LUBIN.B.H. Instable hemoglobins , hemoglobins with altered affinity and M hemoglobins. **PEDIATR. CLIN. OF NORTH AMERICA,27(2):421-427,1980.**

VULLO,C.; LUCCI,M. & TOFFOLI,C. La prevenzione dell'omozigosi beta talassemia. **REC. PROGR. IN MED.,83(1): 47-55,1992.**

WAGNER,G.M.; SCHWARTZ,R.S. & CHUI,D.T.Y. Menbrane phospholipid organization and vesiculation of erythrocytes in sickle cell anemia. **CLIN. HAEMATOL.,14:183-200,1985.**

WALKER,B. Public health perspective on newborn screening for hemoglobinopathies. **PEDIATRICS,83(5):912-913,1989.**

WASI,P.; DISTHASONGCHAN,P & NAKORN,S. The effect of iron deficiency on the levels of hemoglobins A2 and E. **J. OF LAB. AND CLIN. MED.,71:85-91,1968.**

WASI,P.; POOTRAKUL,P.; FUCHAROEN,S.; WINICHAGOON,P.; WILAIRAT,P. & PROMBOON,A. Thalassemia in the southeast Asia: determination of different degree of severity of anemia in thalassemia. **ANN. N. Y. ACAD. SCI.,445:119-126,1985.**

WAYE,J.S.; ENG,B. & CHUI,D.H.K. Identification of an extensive alpha globin gene deletion in a Chinese individual. **BRITISH J. OF HAEMATOL.,80:378-380,1992.**

WEATHERALL,D.J. & CLEGG,J.B. **The thalassemia syndromes.** Third edition/Blackwell scientific Publications. p.875,1981.

WEATHERALL,D.J.; HIGGS,D.R.; BUNCH,C.; OLD,J.M.; HUNT,D.M.; PRESSLEY,L.; CLEGG,J.B.; BETHELENFALVAY,N.C.; SJALIN,S.; KOLER,R.D.; MAGENIS,E.; FRANCIS,J.L. & BEBBINGTON,D. Hemoglobin H disease and mental retardation - a new syndrme or a remarkable coincidence? **NEW ENGLAND J. OF MED., 305(11):607-611,1981.**

WEATHERALL,D.J. The thalassemias. "In: **HEMATOLOGY** WILLIAMS,W.J.; BEUTLER,E.; ERSLEV,A.J.; LICHTMAN,M.A.eds., New York, Mac Graw Hill,p.493-521, 1983.

WEATHERALL,D.J. & WAINSCOAT,J.S. The molecular pathology of thalassemia ."In: **Recent Advances in Haematology.** HOFFBRAND, A.V. eds Oxford, Englands. Churchill Livingstone, p.63-88,1985.

WEATHERALL,D.J.; WAINSCOAT,J.S.; THEIN,S.L.; OLD,J.M.; WOOD,W.G.; HIGGS,D.R. & CLEGG,J.B. Genetic and molecular analysis of mild forms of beta thalassemias. **ANN.N. Y. ACAD. SCI., 445:68-80,1985.**

WEN,X-J. & LIANG,S. Mild Hb Constant Spring HbH disease with beta ^{O} thalassemia trait. **HEMOGLOBIN,16(4):321-323,1992.**

WHIPPLER ,G.H. & BRADFORD,W.L. Mediterranean disease thalassemia (erythroblastic anemia of Cooley). **J. PEDIATRIC,9: 279-280.1936**

WHITE,J.M. The unstable hemoglobins. **BRITISH MED. BULL.**, 32(3):219-222,1976.

W.H.O. - WORLD HEALTH ORGANIZATION WORKING GROUP. Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, diagnosis and treatment. **BULLETIN OF THE W.H.O.**,60(5):643-661,1982.

W.H.O.- WORLD HEALTH ORGANIZATION Update of the progres of haemoglobinopathies control. Milan, October 29-30, 1984.

W.H.O.- WORLD HEALTH ORGANIZATION Update of the progress of haemoglobinopathies control. Bangkok, july 4-5,1985.

W.H.O.- WORLD HEALTH ORGANIZATION Report of thr VTh annual meeting of the WHO Working group on the feasibility study on the hereditary disease community control programes. Herakleion, (Crete), October,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). April 8-9,1989.

WILLCOX,M.; BROHULT,J.; SIRLEAF,V. & BENGTSSON,E. Malaria and haemoglobin A2 levels in northern Liberia. **TRANS. ROY. SOC. TROP. MED. HYG.**,73(2):209-211,1979.

WILLIAMS,W.J. BEUTKER,E.; ERSLEV,A.J. & RUNDLES,R.W. **Hematologia.** Guanabara Koogan.RJ. p.1160,1976.

WINTROBE,M.M.; LEE,G.R. & BOGGS,D.R. **Clinical hematology.** 8th ed. Philadelphia. Lea & Febriger,1981.

ZAGO,M.A. COSTA,F.F. & BOTURA,C. Beta thalassemia in Brazil. **BRAZ. J. MED. BIOL. RES.**,14:383-388,1981.

ZAGO,M.A.; COSTA,F.F.; TONE,L.G. & BOTTURA,C. Hereditary hemoglobins disorders in a brazilian population. **HUM. HERED.**, 33:125-129,1983.

ZAGO,M.A. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. **REV. PAUL.MED.**,104(6):300-304,1986.

ZAGO,M.A. Hemoglobinopathies: recents advances and collaborative research. **CIENCIA E CULTURA**,39(9):829-833,1987.

ZINKHAN,W.H. & WINSLOW,R.M. Unstable hemoglobin. Influence of enviroment of phenotypic expression of a genetic disorders. **MEDICINE**,68(5):309-320,1989.

ZURLO,M.G.; DE STEFAN,P.; BORGNA-PIGNATTI,C.; DI PALMA,A.; PIGA, A.; MELEVENDI,C.; DIGREGORIO,F.; BURATTINI,M.G. & TERZOLI,S. Survival and causes of death in thalassemia major. THE LANCET,:27-29,1989.

ANEXOS

Referem-se a folhetos explicativos, cartas, carteirinhas e fichas de identificação dos programas preventivos e encaminhamentos.

VOCÊ TEM ANEMIA HEREDITÁRIA?

O Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP), de São José do Rio Preto, está empenhado em saber se você é portador de anemia hereditária. Para isto serão necessárias apenas duas gotas de sangue, e você será informado do resultado em caso positivo.

O QUE é ANEMIA?

A anemia se caracteriza por um estado de fraqueza, desânimo, mal-estar e palidez. Por exames laboratoriais, a anemia é demonstrada por diminuição dos glóbulos vermelhos do sangue. Essa diminuição pode ser do tamanho e/ou da quantidade dos glóbulos.

QUAIS AS CAUSAS DE ANEMIA?

São muitas as causas que provocam a anemia. As principais são a subnutrição e as hemorragias. Entretanto, as anemias podem ser causadas por infecções bacterianas, doenças nos órgãos produtores de sangue, intoxicações a drogas e inseticidas. Uma outra causa muito importante é a anemia hereditária.

O QUE é ANEMIA HEREDITÁRIA?

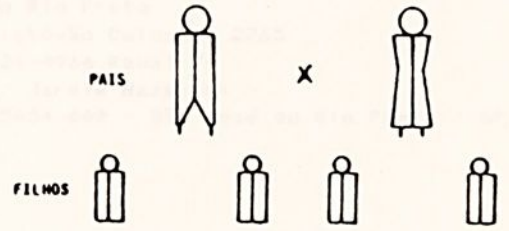
Anemia hereditária é aquela que é transmitida de pais para filhos. Este tipo de anemia pode se transmitir por muitas gerações. A anemia hereditária se manifesta de duas formas: a

imperceptível e a perceptível. Na forma imperceptível, também chamada de heterozigota, a anemia está presente sem que a pessoa a perceba, pois quase não há sinais de anemia. Na forma perceptível, também chamada de homozigota, a anemia é facilmente percebida, e a pessoa além de ter muita fraqueza e mal-estar, é também amarelada (ictérica).

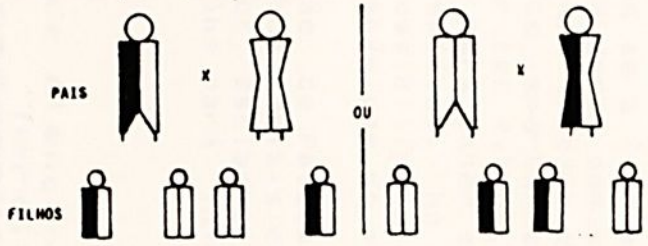
Atualmente, um em cada trinta brasileiros é portador da forma imperceptível, enquanto um em cada cinco mil é portador da forma perceptível de anemia hereditária.

COMO SE TRANSMITE A ANEMIA HEREDITÁRIA?

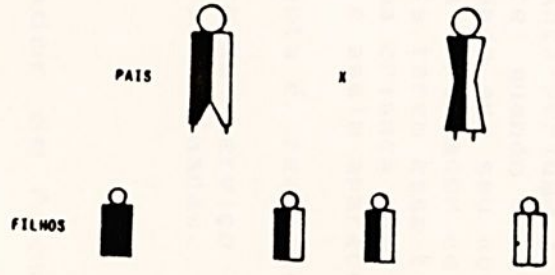
As figuras a seguir representam famílias com os pais e quatro filhos. A figura nº 1 mostra uma situação em que o pai e a mãe não tem anemia hereditária e, consequentemente, os filhos também não apresentarão esta anemia.



A figura nº 2 mostra duas situações que podem ocorrer: um dos pais tem a anemia hereditária imperceptível e, nesse caso, os filhos gerados têm a probabilidade de 50% de herdar a forma imperceptível transmitida por um dos pais.



A figura nº 3 mostra uma família em que tanto o pai quanto a mãe são portadores de forma imperceptível de anemia. Nessa situação a chance de gerar filhos com a forma perceptível de anemia hereditária é de 25%, com a forma imperceptível é de 50% e, sem anemia, é de 25%.



O QUE DEVE FAZER O PORTADOR DE ANEMIA HEREDITÁRIA?

O portador de anemia hereditária imperceptível, sempre que for ao médico se consultar, deve mostrar o cartão de identidade da anemia hereditária, que é distribuído pelo Centro de Referência de Hemoglobinas. O médico deverá informá-lo dos cuidados que o portador da anemia deve tomar. Entretanto, para melhor esclarecimento, deve ser procurado um médico hematologista. Quanto ao portador da forma perceptível, este deve ser imediatamente encaminhado ao hematologista.

Maiores informações poderão ser obtidas no Centro de Referência de Hemoglobinas - UNESP - São José do Rio Preto com Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum e Profa. Claudia Regina Bonini Domingos.

Nosso Endereço:
Centro de Referência de Hemoglobinas - UNESP - São José do Rio Preto
Rua Cristóvão Colombo, 2265
Fone: 21-4766 Ramal 74
Bairro: Jardim Nazareth
CEP: 15054-000 - São José do Rio Preto - SP.

FALCEMIA HETEROZIGOTA

A Falcemia Heterozigota é o nome dado a um tipo de anemia hereditária imperceptível presente numa pessoa aparentemente sadia.
Essa pessoa é, portanto, um portador assintomático (não doente) de uma alteração na hemoglobina, que é uma proteína que se encontra no interior dos glóbulos vermelhos.

A pessoa que que tem a Falcemia Heterozigota é normal, com resultados quantitativos de glóbulos vermelhos e de hemoglobina dentro dos padrões de normalidade.

O portador de falcemia Heterozigota não deve,entretanto, fazer uso de drogas ou medicamentos que "queimam oxigênio", por exemplo: inalação de éter, lança-perfume e anestesia geral sem oxigenação suplementar. Também os exercícios físicos muito intensos devem ser evitados, pois "queimam o oxigênio" com extrema rapidez. Da mesma forma, devem ser evitado o mergulho prolongado e a prática de natação em águas muito frias.

Todos esses cuidados estão relacionados com a diminuição de oxigênio,pois quando falta quantidade suficiente deste gás em pessoa que tem Falcemia Heterozigota,os glóbulos vermelhos se deformam, mudando sua forma globular para a de "foice" ou "meia-lua", daí o nome falciforme. Com a forma alterada, os glóbulos vermelhos além de não desempenhar com eficiência a sua função, que é o transporte de oxigênio, provocam, também, alteração na circulação do sangue. É necessário dizer que esses efeitos são muito discretos no portador de Falcemia Heterozigota, mas podem se tornar perigosos se a "queima de oxigênio" ocorrer por longo período (anestesia geral sem suplementação de oxigênio) ou se ocorrer de forma aguda (cheiro de éter ou lança-perfume).

Outro fato muito importante é o seguinte: quando você fôr se casar ou optar por ter filhos, há necessidade que seu noivo ou noiva faça o exame para saber se ele ou ela é portador de anemia hereditária imperceptível. No caso dos dois terem esse tipo de anemia, existe a possibilidade de nascer uma criança que poderá receber as partes anêmicas do pai e da mãe e assim aparecerá uma anemia muito grave.

A identificação de Falcemia Heterozigota é realizada por meio de análises laboratoriais específicas.

Para um melhor esclarecimento procure um serviço médico especializado, que lhe dará informações mais detalhadas.

Serviço de Atenção ao Portador de Anemia Hereditária
CENTRO DE REFERÊNCIA DE HEMOGLOBINAS
UNESP - SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Rua Cristovão Colombo 2265
CEP:15054-000 Tel (0172)244966 Ramal 74
São José do Rio Preto-SP

TALASSEMIA HETEROZIGOTA OU TALASSEMIA MENOR

A Talassemia Heterozigota, ou Talassemia Menor, é o nome dado a um tipo de anemia hereditária presente numa pessoa aparentemente sadia. Essa pessoa,é portanto, um portador assintomático (não doente) de uma alteração da hemoglobina, que é uma proteína que se encontra no interior dos glóbulos vermelhos.

Nessa alteração, o portador de Talassemia Heterozigota tem seus glóbulos vermelhos com o tamanho diminuído, em relação a outra pessoa sem talassemia. A diminuição do tamanho dos glóbulos vermelhos reduz a quantidade de hemoglobina dentro dessas células do sangue. Como se sabe, todo oxigênio que respiramos é transportado pela hemoglobina e distribuído por todo o organismo. O oxigênio é nossa principal fonte de energia. Assim, quando ocorre diminuição da quantidade de hemoglobina - e na Talassemia Heterozigota esse fato acontece de forma discreta - o oxigênio transportado também diminui. Sendo o oxigênio a principal fonte de energia, sua diminuição embora pequena nesse caso, pode causar periodicamente:*cansaço, dores musculares nas pernas e palidez discreta*.

A Talassemia Heterozigota pode provocar discreto grau de anemia, entretanto, sua identificação somente é feita por análises laboratoriais específicas.

A pessoa que é portadora de Talassemia Heterozigota tem um desenvolvimento físico, sexual e intelectual normal. O maior cuidado porém, é quando se decide ter filhos. Nesse caso é de fundamental importância que o seu parceiro faça esse exame para saber se é portador de anemia hereditária imperceptível. No caso dos dois terem anemia hereditária imperceptível existe a possibilidade de gerar uma criança que poderá receber as partes alteradas do pai e da mãe, provocando uma anemia muito grave.

Para melhor esclarecimento procure um serviço médico especializado, que lhe dará explicações detalhadas.

O seu tipo de Talassemia Heterozigota identificado em nosso laboratório é:_____.

Serviço de Atenção ao Portador de Anemia Hereditária
CENTRO DE REFERÊNCIA DE HEMOGLOBINAS
UNESP - SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Rua Cristovão Colombo 2265
CEP:15054-000 Tel (0172)244966 Ramal 74

HEMOGLOBINA C

Prezado(a):

Venho por meio desta informá-lo que, durante as análises efetuadas em seu sangue, observamos um tipo de anemia hereditária imperceptível, ou seja, uma forma de anemia que a pessoa tem mas não percebe. a anemia que identificamos em você é conhecida por **Hemoglobina C.**

Essa anemia não é observada em exames de sangue (hemograma). Somente com métodos especiais é possível identificá-la.

A pessoa que tem essa anemia é **NORMAL.**Não afeta o desenvolvimento físico, nem o mental e nem o sexual.

Não há nenhuma proibição à prática de esportes, alimentação ou medicamentos para quem tem esse tipo de anemia. Só uma coisa é importante: quando você for se casar é importante que se realize esse exame para saber se o seu futuro marido (ou mulher) é portador de anemia hereditária. Isso é importante, pois, no caso de seu noivo (ou noiva) ter anemia hereditária, existe a possibilidade de um de seus filhos ter uma anemia grave, proveniente da contaminação da parte anêmica do pai com a parte anêmica da mãe.

Serviço de Atenção ao Portador de Anemia Hereditária

CENTRO DE REFERENCIA DE HEMOGLOBINAS

UNESP - SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Rua Cristovão Colombo 2265

CEP:15054-000 Tel (0172)244966 Ramal 74

São José do Rio Preto-SP

IDENTIDADE DE ANEMIA HEREDITARIA

nome .....

idade ..... data do diagnóstico ..../..../....

tipo de anemia .....

Universidade Estadual Paulista - UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE
CENTRO DE REFERÊNCIA DE HEMOGLOBINAS
15.100 São José do Rio Preto SP

IDENTIDADE DE ANEMIA HEREDITARIA

nome .....

idade ..... data do diagnóstico ..../..../....

tipo de anemia TALASSEMIA HETEROZIGOTA

Universidade Estadual Paulista - UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE
CENTRO DE REFERÊNCIA DE HEMOGLOBINAS
15.100 São José do Rio Preto SP

O portador da **talassemia heterozigota** não deve tomar remédios e nem vitaminas que contenham ferro ou sais ferrosos, pois o sangue de quem tem talassemia sempre apresenta quantidade suficiente de ferro. Assim, ao ser tomado, o ferro do medicamento vai para o sangue, aumentando a sua quantidade. O ferro em excesso no sangue é muito perigoso, pois se deposita em determinados órgãos (ex.: fígado, baço, coração), nas veias e nos tecidos, alterando-lhes as funções e, com o passar do tempo, pode provocar outras doenças. Recomendamos que você informe os médicos, por ocasião das consultas, sobre esse tipo de anemia hereditária que você tem

IDENTIDADE DE ANEMIA HEREDITARIA

nome .....

idade ..... data do diagnóstico ..../..../....

tipo de anemia FALCIFORME HETEROZIGOTA

Universidade Estadual Paulista - UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE
CENTRO DE REFERÊNCIA DE HEMOGLOBINAS
15.100 São José do Rio Preto SP

O portador de **anemia falciforme heterozigota** não deve fazer uso de drogas ou medicamentos que "queimam o oxigênio", por exemplo inalação de éter e clorofórmio, cheiro de lança-perfume, anestesia geral sem oxigenação durante e após a cirurgia. Os exercícios físicos **muito intensos** também devem ser evitados, pois "queimam o oxigênio" rapidamente. Um esporte que deve ser evitado é o mergulho prolongado em rios, piscinas, lagos ou mar.



N.o de Registro

CENTRO DE REFERÊNCIA DE HEMOGLOBINAS - IBILCE - UNESP

Rua Cristovão Colombo, 2265 - Tel.: (0172) 21-4966 - Ramal 74
CEP 15.055 — São José do Rio Preto — Estado de São Paulo

IDENTIFICAÇÃO - NOME	SOBRENOME	SEXO	IDADE	DESCENDÊNCIA

DATA DA COLETA	PROVENIÊNCIA DO PACIENTE	MÉDICO RESPONSÁVEL

Solicitação feita por:

Endereço

Cidade UF Telefone

Informações Laboratoriais

Eritrócitos: Hemoglobina:

Hematócrito: HCM: VCM:

Outras:

Resumo Clínico

Diagnóstico Presumível:

SOLICITAÇÃO DE TESTES PARA HEMOGLOBINOPATIAS

	TESTES	RESULTADO		TESTES	RESULTADO
	Eletroforese (Fenótipos)			Dosagens	
	Acetato de celulose			Hb A2 N: 2,1-3,7%	
	Agar-fosfato			Hb Fetal N: 0,0-1,2%	
	Eletroforese de Globina			MetaHb N: 0,0-3,0%	
	G-6PD			Instabilidade - Isopropanol	
	Hb Fetal Intra-eritrocit.			Pesquisa de Talassemia alfa	
	Resistência Osmótica			Outro: M E	

Conclusão:

Data Responsável:

IBILCE/UNESP - S. J. R. Preto
Rua Cristovão Colombo 2265
15.100 - S. J. Rio Preto - SP
Fone 32-4966

FOLHA

Data / /

N.º	NOME	ID	SX	C	OUTROS	Fenót. Globular	ELETROFORESE AGAR AMIDO	Celogel	AGAR
01									
02									
03									
04									
05									
06									
07									
08									
09									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									

Apoio: ESCRITÓRIO MODELO — Rua 18 N.º 162 - Fone 22-3082

