

**LYA BUENO DE CARVALHO**

**Avaliação da expressão da talassemia do tipo beta  
no Brasil pela co-herança com defeitos de  
hemocromatose**

**LYA BUENO DE CARVALHO**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA TALASSEMIA DO  
TIPO BETA NO BRASIL PELA CO-HERANÇA COM  
DE DEFEITOS DE HEMOCROMATOSE**

Dissertação apresentada  
ao Programa de Pós-  
Graduação em Genética,  
do Instituto de  
Biociências, Letras e  
Ciências Exatas da  
Universidade Estadual  
Paulista – UNESP, para  
a obtenção do título de  
Mestre.

---

**SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

**2003**

Carvalho, Lya Bueno

Avaliação da Expressão da Talassemia Beta no Brasil pela Coherança com Defeitos de Hemocromatose / Lya Bueno de Carvalho. – São José do Rio Preto: [s. n.], 2003

147 f. : il.; 30 cm

Orientador: Cláudia Regina Bonini Domingos

Tese (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1 Talassemia Beta. 2. Hemocromatose Hereditária. 3. Anemias. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Univerdidade Estadual Paulista. Instituo de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – SP, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

***Orientadora: Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos***

Departamento de Biologia

IBILCE – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

*Aos meus avós Lázaro (in memoriam) e Josephina*

*E aos meus pais, Alcir e, Sueli,*

*Estrelas que norteiam o céu da minha vida.*

## Agradecimentos

---

*A Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos, que me recebeu em seu grupo, acreditando em minha capacidade profissional. Sua coragem e perseverança são um exemplo a ser seguido.*

*À prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Eliana Morielli Versuti e prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes, pelo incentivo à carreira científica.*

*Aos voluntários doadores de sangue, saudáveis e portadores de talassemia beta, pela contribuição desinteressada e fundamental.*

*A prof<sup>a</sup>. Cláudia Augusta Hidalgo, pela amizade que nasceu durante este estudo e pela análise estatística dos dados obtidos.*

*Às funcionários, Rosana e Oscar, da Seção de Pós Graduação do IBILCE/UNESP, pela gentileza e profissionalismo com que contribuíram para este trabalho.*

*Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética do IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto, em especial às professoras Dr<sup>a</sup>. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, Dr<sup>a</sup>. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo e Dr<sup>a</sup>. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira.*

*Aos companheiros do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, pela convivência amigável. Em especial, agradeço à Fátima Adriana Mendes Siqueira e Ana Regina Chinelato Fernandes pela valiosa amizade.*

*Aos queridos amigos do curso de Pós-Graduação, Luís Gustavo Conceição Galego, Cláudia Pacheco, Sandra Regina Marchesin pelo companheirismo e solidariedade em todos os momentos.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Genética do IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto, pela oportunidade.*

## Agradecimentos Especiais

---

*Aos queridos pais, Sueli e Alcir, agradeço o amor e a presença, além do exemplo de vida.*

*À minha avó Nenê, minha maior incentivadora e ombro amigo de todos os momentos.*

*À minha irmã Andréia, que com sua presença espirituosa proporcionou momentos de riso e descontração frente às agruras desse período.*

*Aos meus queridos sobrinhos, Luísa e Luís Eduardo, por preencherem minha vida com seus sorrisos iluminados.*

*Aos meus tios, Roseli e João e aos primos Daniela, Paula e João, que estiveram ao meu lado desde o início da busca por esse sonho.*

*À família Aidar, pela calorosa acolhida e cooperação incondicional. Sua admiração por minha capacidade profissional me impulsionou a essa conquista.*

*Aos amigos: Andréa Regina Baptista Rossit, Isabel Rosa Cabral, Marcelo Ferreira Lourenço e Sheila Adami Vayego, agradeço pela amizade e pelos ensinamentos que auxiliaram a minha formação pessoal e profissional.*

*Á Deus, pela vida.*

*Agradeço a todos que compartilharam deste trabalho, assim lhe atribuindo sentido.*

*“... Queremos saber, queremos viver  
Confiantes no Futuro...  
... Pois se foi permitido ao Homem  
tantas coisas conhecer  
É melhor que todos saibam o que pode acontecer...”  
(Gilberto Gil)*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

- AA:** Perfil de Hemoglobinas Normais
- ABT:** Alfa/beta Talassemia
- ASO:** Sonda Oligonucleotídeo Alelo-Específica
- BTH:** Talassemia Beta Heterozigota
- CTAB:** Cetil Brometo Trimetilamônio
- CHCM:** Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
- DNA:** Ácido Desoxirribonucléico
- DTAB:** Dodecil Brometo Trimetilamônio
- EDTA:** Ácido Etilenodiaminotetracético
- El. Alc.:** Eletroforese Alcalina
- El. Ác.:** Eletroforese Ácida
- GV:** Glóbulos Vermelhos
- Hb:** Hemoglobina
- Hb F:** Hemoglobina Fetal
- HCM:** Hemoglobina Corpuscular Média
- HH:** Hemocromatose Hereditária
- HPLC:** Cromatografia Líquida de Alta Pressão
- HT:** Hematócrito
- HVR:** Regiões hipervariáveis
- LCR:** Região controladora do locus
- LHGDH:** Laboratório de Hemoglobinas e Genética de Doenças Hematológicas
- M.E.:** Morfologia Eritrocitária à Fresco
- M:** Mutante
- N:** Normal
- O.M.S:** Organização Mundial da Saúde
- PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase
- PCR-ASO:** Reação em Cadeia da Polimerase Sonda Oligonucleotídeo Específica
- RFLP:** Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição
- R.G.:** Resistência Globular Osmótica

**RNA:** Ácido Ribonucléico

**VCM:** Volume Corpuscular Médio

**W. H. O.:** World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

---

**Figura 1:** Cluster beta e suas respectivas localizações cromossômicas (modificado do site <http://globin.cse.psu.edu/>).

**Figura 2:** Principais sítios HS da LCR conservados em mamíferos e sua relação com sítios para fatores de transcrição (modificado do site <http://globin.cse.psu.edu/>).

**Figura 3:** Cluster alfa (modificado do site <http://globin.cse.psu.edu/>).

**Figura 4:** Ontogenia das hemoglobinas humanas (modificado do Weatherall & Clegg, 1981).

**Figura 5:** Representação esquemática do equilíbrio fisiológico na produção das cadeias de globina em indivíduo normal.

**Figura 6:** Representação esquemática da produção de globinas na talassemia beta maior.

**Figura 7:** Representação esquemática da produção de globinas na talassemia beta maior ( $\beta^0$ ).

**Figura 8:** Representação esquemática da produção de globinas na talassemia beta menor ( $\beta^+$ ).

**Figura 9:** Representação esquemática da produção de globinas na talassemia alfa.

**Figura 10:** Representação esquemática da produção de globinas na doença de Hb

**Figura 11:** Representação esquemática da produção de globinas na Hidropsia fetal.

**Figura 12:** Modelo da proteína HFE, modificado de Worwood, 1998.

**Figura 13:** Resistência globular osmótica em solução de cloreto de sódio a 0,36%.

**Figura 14:** Esfregaço sangüíneo apresentando discretas alterações dos eritrócitos (fonte: LHGDH).

**Figura 15:** Mapa eletroforético de migração de algumas hemoglobinas humanas em pH alcalino (pH 8,5).

**Figura 16:** Mapa eletroforético de migração de algumas hemoglobinas humanas em pH ácido (pH 6,2).

**Figura 17:** Padrão de migração de hemoglobinas humanas em pH neutro.

**Figura 18:** Corpos de Hb H observados após coloração vital com Azul Cresil Brillante (fonte: LHGDH).

**Figura 19:** Cromatograma de um indivíduo portador de talassemia beta (fonte: LHGDH).

**Figura 20:** Esquematização da placa de PCR-ASO onde são visualizados três indivíduos portadores de mutações. As flechas vermelhas indicam indivíduos portadores da mutação H63D e a flecha azul indica indivíduo portador da mutação C282Y.

**Figura 21:** Distribuição da porcentagem de amostras encaminhadas ao LHGDH segundo estado brasileiro.

**Figura 22:** Resultados globais da análise de resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36% nos três grupos estudados.

**Figura 23:** Frequência dos diferentes perfis eritrocitários obtidos pela análise da morfologia eritrocitária à fresco nos diversos fenótipos analisados.

**Figura 24:** Distribuição da frequência de achados nos diferentes perfis eletroforéticos obtidos por eletroforese em pH alcalino para os três grupos estudados.

**Figura 25:** Distribuição da frequência de achados nos diferentes perfis eletroforéticos obtidos por eletroforese em pH ácido para os três grupos estudados.

**Figura 26:** Distribuição da frequência de porcentagem de Hemoglobina A<sub>2</sub> quantificada pelas metodologias de Eluição e HPLC no grupo AA.

**Figura 27:** Distribuição da frequência de porcentagem de Hb F quantificada pelas metodologias de Betcke e HPLC no grupo AA.

**Figura 28:** Distribuição da frequência de porcentagem de Hemoglobina A<sub>2</sub> quantificada pelas metodologias de Eluição e HPLC no grupo BTH.

**Figura 29:** Distribuição da frequência de porcentagem de Hb F quantificada pelas metodologias Betcke e HPLC no grupo BTH.

**Figura 30:** Distribuição da frequência de porcentagem de Hemoglobina A<sub>2</sub> quantificada pelas metodologias de Eluição e HPLC no grupo ABT.

**Figura 31:** Distribuição da frequência de porcentagem da Hb F quantificada pelas metodologias de Betcke e HPLC no grupo ABT.

**Figura 32:** Distribuição da frequência de mutações para Hemocromatose Hereditária encontrada nos grupos BTH e ABT.

## LISTA DE TABELAS

---

**Tabela 1:** Média e desvio padrão dos índices hematológicos encontrados nos três grupos analisados.

**Tabela 2:** Coeficiente de variação dos índices hematológicos e de reticulócitos encontrados nos três grupos analisados.

**Tabela 3:** Resultados globais da análise da resistência globular osmótica em solução de NaCl 0,36% nos grupos estudados.

**Tabela 4:** Indicação da frequência dos diferentes perfis eritrocitários obtidos pela análise da morfologia eritrocitária à fresco nos diversos fenótipos analisados.

**Tabela 5:** Distribuição da frequência de achados nos diferentes perfis eletroforéticos.

**Tabela 6:** Resultados obtidos por eletroforese ácida pH 6,2 nos diferentes fenótipos.

**Tabela 7:** Valores da média e desvio padrão da quantificação da Hb A<sub>2</sub> e Hb F pelas diversas metodologias utilizadas.

**Tabela 8:** Frequência dos mutantes C282Y e H63D para HH nos grupos com fenótipos BTH e ABT.

**Tabela 9:** Relação dos valores hematimétricos obtidos para o grupo de amostras normais (AA).

**Tabela 10:** Relação dos valores hematimétricos obtidos para o grupo de amostras com talassemia beta heterozigota (BTH).

**Tabela 11:** Relação dos valores hematimétricos obtidos para o grupo de amostras com talassemia alfa/beta (ABT).

**Tabela 12:** Relação dos valores obtidos pelas análises de triagem básica e HPLC para o grupo de amostras com perfil de hemoglobinas normais(AA).

**Tabela 13:** Relação dos valores obtidos pelas técnicas de triagem básica e HPLC para o grupo de amostras com perfil de talassemia beta heterozigota (BTH).

**Tabela 14:** Relação dos valores obtidos pelas análises de triagem básica e HPLC para o grupo de amostras com perfil de talassemia alfa/beta (ABT).

**Tabela 15:** Relação das amostras com perfil de talassemia beta heterozigota rastreadas para mutação de hemocromatose hereditária (HH).

**Tabela 16:** Relação das amostras com perfil de talassemia alfa/beta rastreadas para mutação de hemocromatose hereditária (HH).

# SUMÁRIO

---

<b>I. Introdução</b> .....	16
I.1. Genética e estrutura das hemoglobinas.....	18
I.2. Hemoglobinas e as fases do desenvolvimento humano.....	23
I.3. Hemoglobinas Anormais.....	25
I.3.1. Variantes.....	25
I.3.2. Talassemias.....	26
I.3.2.a Talassemias do Tipo Beta.....	27
I.3.2.b. Talassemias do Tipo Alfa .....	33
I.4. Importância do diagnóstico.....	35
I.5. Anemias.....	37
I.6. Hemocromatose Hereditária.....	39
<b>II. Objetivos</b> .....	42
<b>III. Material e Métodos</b> .....	44
III.1. Casuística.....	45
III.2. Métodos de diagnóstico.....	45
III.2.1. Detalhamento Técnico. ....	46
III.3. Análise Estatística.....	76
<b>IV. Resultados</b> .....	78
<b>V. Discussão</b> .....	96
<b>VI. Conclusão</b> .....	105
<b>VII. Referências Bibliográficas</b> .....	107
<b>VIII. Resumo</b> .....	118
<b>IX. Abstract</b> .....	120
<b>X. Anexos</b> .....	122



## ***I. Introdução***

Dentre as doenças hematológicas hereditárias, as mais comuns e difundidas no mundo são as hemoglobinopatias. Compreendem um grupo complexo de anemias hereditárias, destacando-se a anemia falciforme e as talassemias como as mais frequentes. Em países onde a incidência é alta tornam-se um problema de saúde pública. Estima-se que 7% da população mundial são portadores de tais distúrbios e pelo menos 300.000 a 400.000 nascimentos a cada ano, apresentam as formas severas dessas patologias (Weatherall & Clegg, 2001).

A alta prevalência destas alterações em certas regiões pode ser explicada pela dispersão da população por força do efeito seletivo da malária ou introdução pela imigração de uma população afetada. A seleção de heterozigotos em áreas malarígenas pode explicar as elevadas frequências de hemoglobinopatias em países da região do Mediterrâneo, Oriente Médio, Sudoeste da Ásia e África, enquanto que a imigração espontânea ou forçada seria responsável por sua ocorrência nos países do Novo Mundo, incluindo o Brasil (Zago, 1986).

O Brasil é um país altamente miscigenado e apresenta intensa heterogeneidade entre seus estados (Salzano & Freire-Maia, 1967). Essa heterogeneidade é devida ao padrão peculiar de colonização desses locais, uma vez que variou o número de indivíduos que compuseram o estoque genético de cada grupamento étnico parental. A região Norte, por exemplo, é a que exhibe a maior contribuição ameríndia, enquanto que no Sul do país é observada maior proporção de caucasóides (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Assim, a incidência das hemoglobinopatias difere de uma região para outra de acordo com a população colonizadora.

As hemoglobinopatias são decorrentes de alterações na síntese de hemoglobinas e compreendem principalmente os defeitos estruturais e quantitativos dos aminoácidos que compõem as cadeias de globina. As primeiras resultam na produção de uma hemoglobina com estrutura anormal, as variantes de hemoglobina. As alterações quantitativas resultam em redução na síntese de uma

das cadeias globínicas, originando as talassemias, que são classificadas de acordo com a cadeia afetada.

As duas hemoglobinas variantes mais freqüentes na população brasileira são a hemoglobina S e a hemoglobina C, ambas de origem africana. As talassemias do tipo beta, diagnosticadas em nossa população, têm origem nos povos provenientes das regiões do mediterrâneo, principalmente italianos (Hutz & Salzano, 1983; Bonini-Domingos, 1993; Naoum, 1997).

Através do estudo das hemoglobinas anormais em diferentes grupos populacionais foi possível a identificação de mais de 700 variantes de hemoglobinas e mais de três centenas de tipos de talassemias, fornecendo dados importantes sobre a ação da seleção natural, miscigenação racial e migrações humanas (Weatherall & Clegg, 1981; Salzano, 1986; Honig & Adams III, 1986; IHIC, 1996).

### **I.1. Genética e Estrutura das Hemoglobinas**

A hemoglobina é uma proteína globular oligomérica de peso molecular 64.458 daltons, sintetizada nos eritroblastos policromatófilos e nos ortocromáticos, cuja principal função é transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos e gás carbônico no sentido inverso. Estruturalmente é formada por dois pares de cadeias polipeptídicas que interagem entre si. Duas das cadeias que participam da formação do tetrâmero possuem 141 aminoácidos cada, e são denominadas tipo alfa, e as outras duas, que possuem 146 aminoácidos cada, são denominadas tipo beta. Cada cadeia polipeptídica denominada globina, está ligada a um grupo prostético tetrapirrólico, chamado heme que contém o átomo de ferro no estado ferroso e que dá cor vermelha à hemoglobina (Lehninger, 1995; Champe & Harvey, 1996).

As cadeias globínicas são sintetizadas por um ou mais genes estruturais pertencentes a dois *clusters* gênicos localizados em cromossomos diferentes (Lewin, 2000).

As cadeias do tipo beta são sintetizadas por genes localizados no braço curto do cromossomo 11, na região 11p15 que se estende por aproximadamente 60 Kb, sendo cinco genes funcionais: épsilon, gama-glicina, gama-alanina, delta e beta ( $\epsilon$ ,  $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ,  $\delta$  e  $\beta$ ) e um pseudogene psi-beta ( $\Psi\beta$ ) (Shelton *et al.*, 1997). Os pseudogenes possuem sequência homóloga aos genes ativos mas não são funcionais. O gene  $\epsilon$ , expresso na fase embrionária, está distante 15 Kb do gene  $\gamma^G$ . Os genes  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$  diferem em apenas um aminoácido na posição 136, estão distantes entre si 3,5 Kb e possuem expressão característica do período fetal. O gene  $\delta$ , distante do  $\gamma^A$  por 14 Kb, e o gene  $\beta$ , distante 5,4 Kb do gene  $\delta$ , começam a ser codificados ainda no período fetal e se expressam em sua plenitude seis meses após o nascimento (Honig & Adams III, 1986; Bonini-Domingos, 1993) (Figura 1).

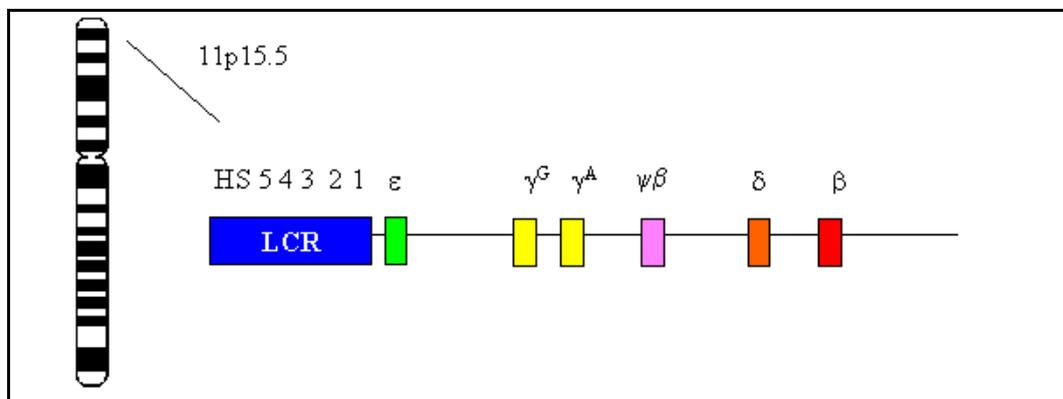


Figura 1 – Ilustração do cluster beta e suas respectivas localizações cromossômicas (modificado do site <http://globin.cse.psu.edu/>)

Cada um dos genes do *cluster* beta consiste de um segmento na região promotora 5', uma pequena região não traduzida (UTR), códons de iniciação, éxons e íntrons (IVS), códon de terminação, uma UTR 3' e sinal de poli adenilação (Huisman *et al.*, 1997).

A região promotora do gene da beta globina, está localizada na extremidade 5' da região codificadora e apresenta várias seqüências de nucleotídeos conservadas e aparentemente envolvidas no controle da transcrição. A primeira é caracterizada por ser rica em nucleotídeos adenina e timina sendo denominada TATA box. A segunda seqüência conservada é constituída de nucleotídeos GGC/TCAATCT, denominada CAT box, e encontra-se duplicada nos genes  $\gamma$ , e a seqüência CCACCCT, duplicada no gene  $\beta$  (Benoist *et al.*, 1980; Efstradiadis *et al.*, 1980; Dierks *et al.*, 1981; Charnay *et al.*, 1985).

Através dos estudos das regiões promotoras dos genes das globinas foi possível o esclarecimento de alguns mecanismos normais do controle da transcrição gênica. Alterações em um único nucleotídeo nas regiões promotoras podem interferir na ligação DNA-proteína, resultando em distúrbios da produção gênica como as talassemias (Mitchell & Tjan, 1989). O controle da expressão gênica pode ser realizado por outros locais específicos, como os “intensificadores”, que atuam de modo independente da sua posição em relação à região promotora (Khoury & Gruss, 1983; Gruss *et al.*, 1984).

Outra região fundamental para o controle da expressão dos genes do complexo beta é a região controladora do locus (LCR), ilustrada na figura 1. A LCR é uma região reguladora que se estende por 20 Kb na posição 5' anterior ao gene  $\epsilon$ . Caracteriza-se por apresentar cinco sítios sensíveis à digestão da DNase I, identificados por HS e numerados de 1 a 5. A figura ilustra 2 os principais sítios HS conservados em mamíferos e sua interação com fatores de transcrição (Jackson *et al.*, 1996).

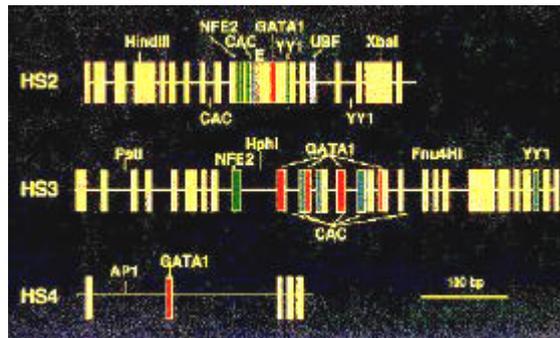


Figura 2: Principais sítios HS da LCR conservados em mamíferos e sua relação com sítios para fatores de transcrição (modificado do site <http://globin.cse.psu.edu/>).

A LCR é exclusiva das famílias dos genes da globina beta e regula a síntese de cadeias de acordo com o desenvolvimento humano (Behringer *et al.*, 1987; Blom Van Assendelft *et al.*, 1989; Enver *et al.*, 1990; Hanscombe *et al.*, 1991; Raich *et al.*, 1992). Esta região apresenta propriedades tais como: criar uma abertura cromossomal mais acessível aos fatores de transcrição de ação trans (Langdon & Kaufman, 1998); alterar a estrutura cromatínica e o padrão e replicação do DNA em seqüências que se estendem por aproximadamente 200 Kb (Forrester *et al.*, 1990); interagir com cada gene da globina (Blom Van Assendelft *et al.*, 1989; Enver *et al.*, 1990).

As cadeias do tipo alfa são codificadas por genes específicos que se estendem por uma região de 28 Kb, na seqüência 5'-3', no braço curto do cromossomo 16 na região 16p13.3 (Honig & Adams III, 1986; Bonini-Domingos, 1993). O complexo gênico do *cluster* alfa compreende três genes funcionais: genes zeta, alfa 2 e alfa 1; três pseudogenes: psi zeta, psi alfa 2 e psi alfa 1 e um gene de função indeterminada denominado teta ( $\zeta$ ,  $\psi\zeta$ ,  $\psi\alpha$ ,  $\psi\alpha$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ ,  $\theta$ ) (Bonini-Domingos, 1993). A figura 3 ilustra o arranjo dos genes e a localização cromossômica do *cluster*.

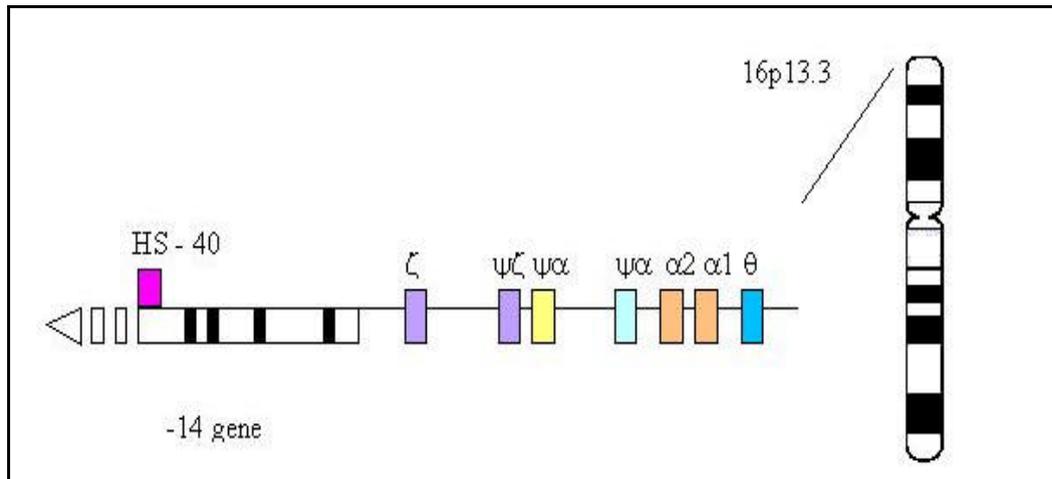


Figura 3: Representação esquemática do *cluster* alfa (modificado do site <http://globin.cse.psu.edu/>).

O gene  $\zeta_2$  é expresso durante as primeiras cinco semanas de vida intra-uterina. A partir da sexta semana de vida intra-uterina, a síntese de cadeia zeta decresce, e os genes  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  são ativados e atuarão durante o período fetal e adulto. Os genes  $\alpha$  estão separados por uma região de aproximadamente 3 Kb, são homólogos, codificam proteínas idênticas e participam da composição de quase todas as hemoglobinas (Honig & Adams III, 1986).

Os genes do complexo gênico alfa são separados por cinco regiões estruturalmente hipervariáveis (HVRs – *Hypervariable regions*). Cada uma dessas regiões é composta de múltiplos segmentos repetitivos de pequenas seqüências ricas em GC, apresentando tamanho variável de 17 a 57 pb. Técnicas de alta resolução identificaram múltiplos alelos de cada uma dessas regiões HVR sendo altamente polimórficos em determinadas populações, entretanto, esses polimorfismos parecem não apresentar conseqüências para a expressão dos genes alfa (Rucknagel *et al.*, 1978; Liebhaber, 1989; Higgs *et al.*, 1989; Bonini-Domingos, 1993).

Na extremidade 5', há aproximadamente 40 Kb à montante do *cluster* alfa encontra-se uma região denominada HS-40. Essa região é hipersensível à enzima DNase e um sítio de união para fatores de transcrição. Sua

integridade é essencial para a expressão dos genes deste *cluster* (Waye & Chui, 2001).

As moléculas distintas de hemoglobina resultam da combinação entre as cadeias tipo alfa e tipo beta e em ambos os complexos gênicos, os genes estão arranjados na seqüência 5'-3', na mesma ordem em que são ativados durante as diferentes fases do desenvolvimento humano. A produção de hemoglobina segundo as fases do desenvolvimento, pode ser explicadas por mudanças adaptativas relacionadas à disponibilidade de oxigênio durante o desenvolvimento do organismo (Honig & Adams III, 1986).

Após a síntese das cadeias alfa e beta, estas se combinam com o grupo heme para formar a molécula funcional de hemoglobina. Na molécula de DNA há regiões reguladoras, envolvidas em assegurar que as cadeias globínicas sejam produzidas em quantidades adequadas, em certos tecidos, e no tempo certo do desenvolvimento, envolvendo as regiões LCR no *cluster* beta e HS no *cluster* alfa (Weatherall, 1997).

## I. 2. Hemoglobinas e as fases do desenvolvimento humano

O pareamento entre as cadeias globínicas do tipo alfa e do tipo beta resultam em diferentes tipos de hemoglobina. A diferenciação entre elas ocorre em decorrência das características físico-químicas e mobilidades eletroforéticas distintas. Suas funções 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 a ser sintetizada é a hemoglobina embrionária Gower 1, que predomina nas quatro semanas iniciais. Até a décima segunda semana estão presentes as hemoglobinas Portland e hemoglobina Gower 2. Após este período não ocorre mais síntese das hemoglobinas embrionárias, que podem estar presentes, no entanto, em pequenas quantidades em recém-nascidos normais, ou em grande quantidade em crianças com aberrações cromossômicas, como no caso

da trissomia do cromossomo 13 (Heller, 1968; Boussios & Bertles, 1982; Honig & Adams III, 1986).

A síntese da hemoglobina Fetal (Hb F) inicia-se ainda no período embrionário, substituindo gradativamente as hemoglobinas embrionárias, e atingindo sua plenitude por volta do terceiro mês de gestação. A hemoglobina A (Hb A) começa a ser sintetizada a partir da décima semana de gestação, mantendo-se em níveis não superiores a 10% por volta da trigésima semana. As hemoglobinas características do período fetal são as Hb F (90-100%), Hb A (0-10%) e hemoglobina A<sub>2</sub> (Hb A<sub>2</sub>) (0-1%) (Weatherall, 1997).

Após o nascimento, as Hb F e Hb A apresentam concentrações próximas de 80 e 20%, respectivamente. As sínteses desses dois tipos de hemoglobina invertem-se rapidamente até se estabilizarem por volta do sexto mês após o nascimento. A síntese da Hb A<sub>2</sub> é iniciada no final do período fetal, e também se estabiliza por volta do sexto mês de vida (Weatherall & Clegg, 1981).

Segundo a composição de suas cadeias, as hemoglobinas normais no adulto, podem ser representadas como hemoglobina A ( $\alpha_2\beta_2$ ), com concentrações próximas a 96%-98%; Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), com 2,5%-3,5% e Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ), com 0%-1%. O indivíduo com hemoglobinas normais é classificado como portador de hemoglobinas AA, devido ao maior componente hemoglobínico presente. A figura 4 ilustra a ontogenia das hemoglobinas humanas.

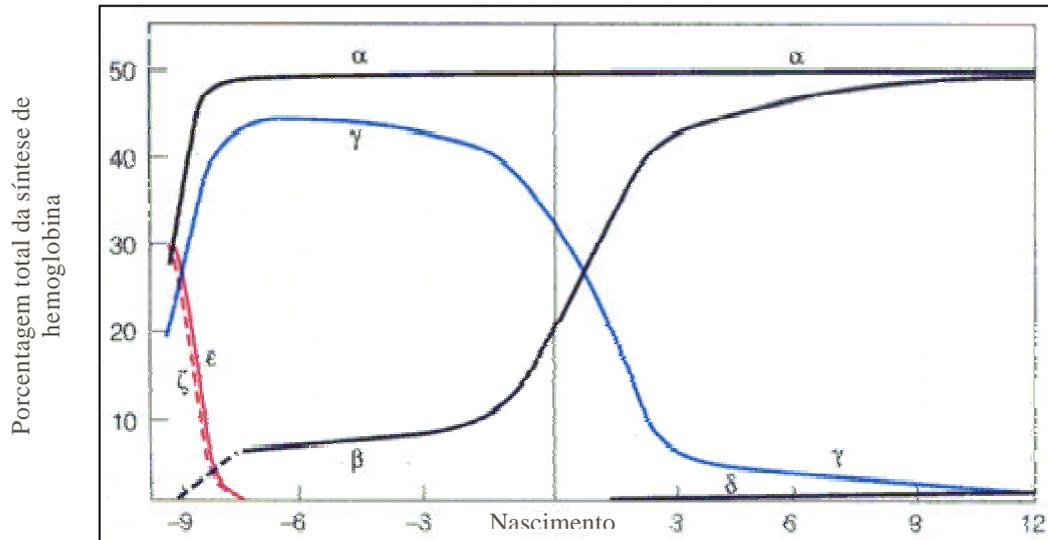


Figura 4: Representação esquemática da ontogenia das hemoglobinas humanas (modificado de Weatherall, 1997).

### I.3. Hemoglobinas Anormais

#### I.3.1. Variantes

As hemoglobinas variantes apresentam fundamentalmente alterações envolvendo genes estruturais, que promovem a formação de moléculas de hemoglobina com características físico-químicas diferentes das hemoglobinas normais. A maioria das variantes é originada por simples substituições de aminoácidos, resultantes de mudanças nas seqüências dos nucleotídeos. Mais de setecentas variantes já foram identificadas, onde os exemplos mais conhecidos são a hemoglobina S e a hemoglobina C, ambas de origem africana (Weatherall & Clegg, 2001).

A hemoglobina S, que em homozigose causa a anemia falciforme, é determinada por uma alteração na posição seis da cadeia de beta globina, levando à substituição de um ácido glutâmico, de carga negativa, por uma valina de carga neutra. Como consequência, tem-se a produção de uma proteína estruturalmente anormal, a Hb S, que em situações de baixa tensão de oxigênio e/ou na alteração do pH apresenta polimerização, levando à deformação

do eritrócito tornando-o rígido, sem elasticidade e capaz de desencadear fenômenos obstrutivos com conseqüente isquemia e infarto tecidual (Hoffman et al, 1991).

A hemoglobina C é uma hemoglobina anormal originada pela substituição do ácido glutâmico pela lisina na posição seis da cadeia de beta globina. Essa substituição torna as células alteradas mais rígidas que as normais, podendo ocorrer fragmentação das mesmas na corrente circulatória (Modiano *et al.*, 2001). Os portadores heterozigotos não apresentam anemia, e a análise eritrocitária pode apresentar células em alvo. O diagnóstico destes indivíduos é importante do ponto de vista do aconselhamento genético, pois a associação desta variante com a hemoglobina S ou talassemias e em homozigose, apresenta alterações clínicas detectáveis. O estado homozigoto para hemoglobina C é caracterizado por anemia hemolítica de intensidade variável (Barreto, 1992).

### **I. 3.2. Talassemias**

Em 1936, Whipple e Bradford utilizaram pela primeira vez o termo talassemia para designar uma anemia altamente incidente na região do Mar Mediterrâneo, descrita anteriormente por Cooley & Lee, em 1925, em quatro crianças descendentes de italianos e gregos, que apresentavam anemia grave, com aumento do baço e deformidades ósseas da face e do crânio, resistência osmótica dos eritrócitos aumentada e leucocitose (Bonini-Domingos, 1993; Naoum, 1997).

Com a caracterização eletroforética da Hb S por Pauling, em 1949, teve início a investigação das alterações hemoglobínicas relacionadas às talassemias, culminando com sua classificação entre as hemoglobinopatias hereditárias. Estudos seguintes definiram as talassemias como grupos especiais de alterações hemoglobínicas abrangendo diversos enfoques clínicos e genéticos (Naoum, 1997).

As talassemias compreendem os distúrbios genéticos da síntese de hemoglobina caracterizados por redução parcial ou total na produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas de globina. Essa redução provoca um desequilíbrio

entre os diferentes tipos de globina resultando no desenvolvimento de uma anemia microcítica e hipocrômica. De acordo com a cadeia globínica afetada, as talassemias podem ser classificadas como: alfa, beta, delta, delta-beta, e gama-delta-beta, entretanto, as talassemias alfa e beta são consideradas as mais importantes do ponto de vista da saúde pública, e as mais frequentes em todo o mundo (Weatherall & Clegg, 2001).

Nos países em desenvolvimento, a melhoria das condições sócio-econômicas aliadas à diminuição da mortalidade infantil devido à infecção e má nutrição, permitiu que crianças com talassemia que morriam muito cedo, sobrevivam e necessitem de tratamento adequado, aumentando assim o número de casos diagnosticados e destacando a importância do estudo destas alterações genéticas (Weatherall, 1997).

No Brasil, os tipos de talassemia mais prevalentes são as talassemias alfa e beta que se manifestam em heterozigose, homozigose e formas interativas. O número de indivíduos afetados varia segundo a origem racial do grupo populacional analisado.

### **1.3.2.a. Talassemia do Tipo Beta**

Uma das doenças monogênicas mais comum identificada e estudada por várias décadas é a talassemia beta. Constitui um grupo heterogêneo de distúrbios genéticos da síntese de hemoglobina com origem na região do Mediterrâneo, espalhando-se pela África, através do Meio Oeste, subcontinente indiano, sudeste da Ásia, Malásia e ilhas do Pacífico (Weatherall & Clegg, 2001). Em virtude do fluxo de migração das populações, a talassemia beta pode ser encontrada em todos os continentes, estimando-se mais de 100.000 pacientes vivendo com esta doença no mundo (Capellini *et al.*, 2000). O modo de herança das talassemias, assim como de outras hemoglobinopatias, é autossômico recessivo sendo necessário dois genes anormais de globina beta para produzir o fenótipo clinicamente detectável (Thein *et al.*, 1990).

Através de técnicas de biologia molecular foi possível identificar mais de 200 diferentes mutações no gene da beta globina que podem ocasionar talassemia beta, com ausência ( $\beta^0$  talassemia) ou redução ( $\beta^+$  talassemia) das cadeias de beta globina. Esse defeito resulta em diminuição na síntese da cadeia de beta globina e conseqüente excesso da cadeia de alfa globina, que se combina com as cadeias delta e gama, contribuindo para o aumento das hemoglobinas A<sub>2</sub> e F, respectivamente (Ko *et al.*, 1998; Weatherall & Clegg, 2001).

Deve-se ressaltar que o mecanismo gerador da talassemia beta muitas vezes interfere na síntese de cadeia gama, podendo envolver também o gene para a cadeia delta, como nas talassemias delta-beta, onde os valores de Hb F e/ou Hb A<sub>2</sub> estão inalterados ou diminuídos (Honig & Adams III, 1986).

A talassemia beta pode ser causada por mutação em ponto, deleção ou inserção de poucos nucleotídeos, resultando num decréscimo da transcrição, incapacidade de iniciação da tradução, processamento anormal de RNA, matriz de leitura, terminação prematura e produção de hemoglobinas instáveis (Hattori, 1999).

As mutações que levam à substituição de nucleotídeos no "TATA box" e nas seqüências 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; Thompson & Thompson, 1993).

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, como no caso da IVSI:6, de origem mediterrânea; e no sinal de poliadenilação AATAAA da extremidade 3'. As mutações no capuz alteram o primeiro resíduo e 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.

As mutações sem sentido formam códons de terminalização na região codificadora interrompendo a tradução como no caso da mutação CD39, de origem mediterrânea. Mutações de sentido errôneo, originam códons para aminoácidos alternativos. As cadeias formadas são degradadas logo após sua síntese devido à grande instabilidade, acarretando um estado muito similar ao produzido por redução de cadeias beta (Kazazian, 1990; Thompson & Thompson, 1993; Naoum, 1998).

Um grande número de deleções afetando o gene da globina beta tem sido observado, muitas envolvendo os genes delta e beta simultaneamente, como em alguns casos de Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal e talassemia delta-beta (Kazazian, 1990).

Os variados tipos de mutações observados podem levar a um grande número de combinações genéticas, resultando na extrema heterogeneidade clínica observada. Entretanto, são indistinguíveis por exames laboratoriais de rotina, sendo necessário a utilização de técnicas de biologia molecular para diferenciar essas alterações.

A talassemia beta maior ou talassemia beta homozigota é resultante do estado homozigoto, tanto do tipo  $\beta^+$  quanto do tipo  $\beta^0$  (Figuras 5, 6 e 7). O indivíduo apresenta grave anemia hemolítica devido à ausência ou deficiência acentuada na produção de cadeias beta e é dependente de transfusão sanguínea. O excesso de cadeias alfa globina despareadas precipita-se nas células precursoras das hemácias, levando à sua destruição precoce. Este processo causa uma anemia severa, o que ocasiona o aumento da produção de eritropoietina e expansão da medula óssea, além de deformidades ósseas, esplenomegalia, e retardo do crescimento. O indivíduo talassêmico beta maior apresenta acentuada hipocromia, microcitose, poiquilocitose, pontilhado basófilo, hemácias em alvo e eritroblastos circulantes (Vullo *et al.*, 1995).

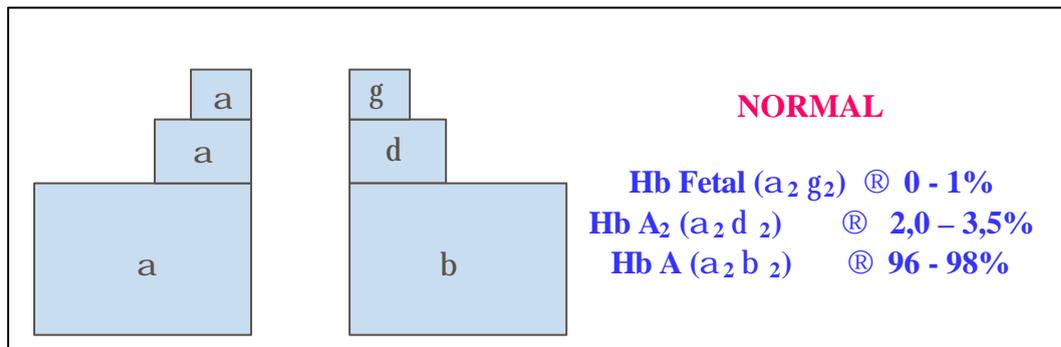


Figura 5: Representação esquemática do equilíbrio fisiológico na produção das cadeias de globina em indivíduo normal.

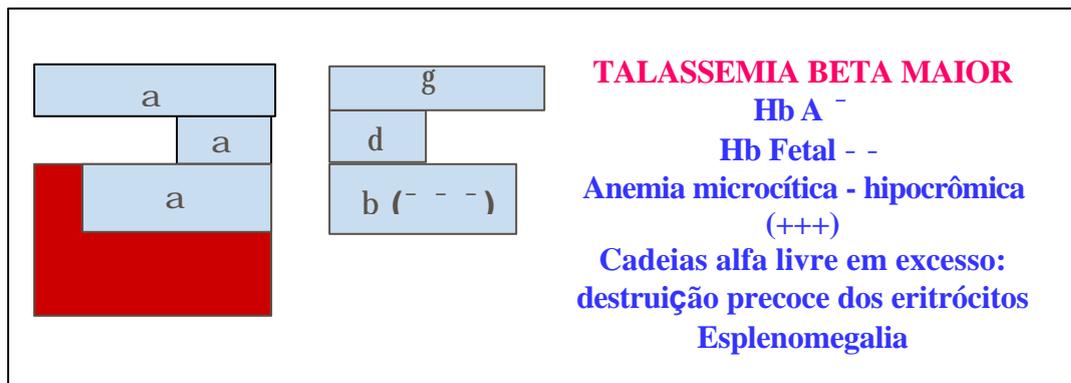


Figura 6: Representação esquemática da produção de globinas na talassemia beta maior .

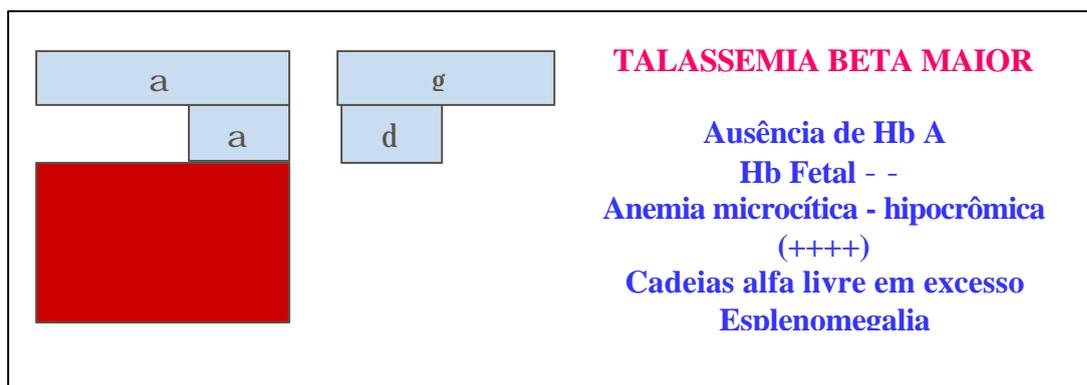


Figura 7: Representação esquemática da produção de globinas na talassemia beta maior ( $\beta^0$ ).

Crianças afetadas pela talassemia beta homozigota padecem de anemia desde o primeiro ano de vida, a partir do período em que a produção de cadeias beta se estabiliza por volta do sexto mês, e o resultado do desequilíbrio de síntese se manifesta por efeitos fisiopatológicos como anemia severa, pigmentação marrom da pele, distúrbios cardíacos e endócrinos, atraso na maturação sexual, infecções recorrentes e deficiência de ácido fólico. Muitos dos portadores de talassemia beta homozigota morrem na infância ou na adolescência, podendo, entretanto, alcançar a terceira década, conforme tratamento médico e terapêutica adequada. As principais causas de óbito são infecções ou doenças cardíacas, devido à deposição de ferro no miocárdio. 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, bem como da absorção gastrointestinal aumentada do ferro recebido pela dieta alimentar (Rapaport, 1987; Naoum, 1997).

O padrão de hemoglobinas nos pacientes com talassemia beta homozigota é variável, caracterizado pelo aumento de Hb F, com concentrações variando de 20 a 90%. A Hb A<sub>2</sub> pode apresentar-se normal ou elevada e a Hb A somente aparece nos casos de deficiência parcial da síntese de cadeias beta.

O nível de hemoglobina circulante nesses pacientes varia entre 3 e 7 g/dL, há presença de eritroblastos em diferentes fases de maturação no sangue periférico e a contagem de reticulócitos geralmente está entre 2 e 8%, em virtude da intensa eritropoiese ineficaz e da hemólise intramedular (Naoum, 1997).

O tratamento dos pacientes portadores de talassemia beta maior é realizado através de esquemas de transfusões sanguíneas juntamente com terapia quelante infusional como a desferoxamina. Recentes avanços da medicina acenam para a possibilidade de cura através de transplante de células tronco (TIF, 2001).

A talassemia beta heterozigota caracteriza-se pela herança de um único gene beta alterado. Nas formas  $\beta^0/\beta^+$ , a redução da taxa de síntese da beta globina é menor, mas o suficiente para causar discreto grau de anemia

microcítica e hipocrômica com aumento de resistência osmótica dos glóbulos vermelhos e elevação da hemoglobina  $A_2$ . Indivíduos afetados por este tipo de talassemia beta geralmente não necessitam de tratamento (figura 8).

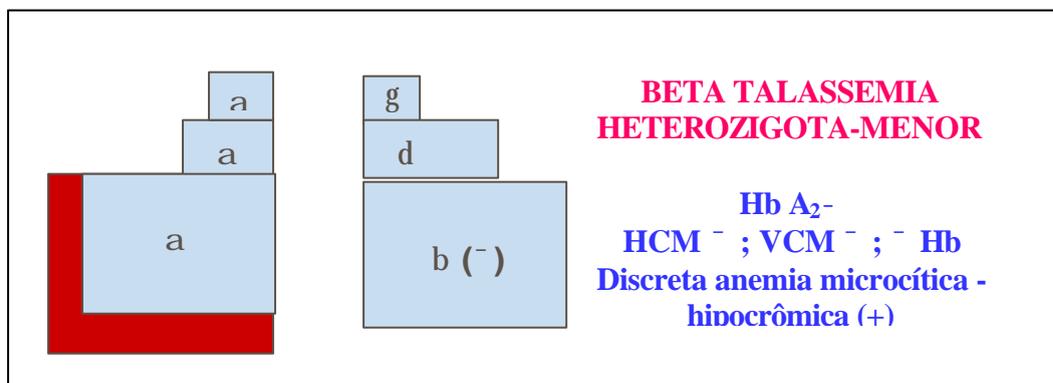


Figura 8: Representação esquemática da produção de globinas na talassemia beta menor ( $\beta^+$ ).

Em muitos casos, a talassemia beta menor é diagnosticada erroneamente e os pacientes são tratados inadequadamente como se fossem portadores de anemia ferropriva. A talassemia beta menor é caracterizada laboratorialmente por apresentar aumento da Hb  $A_2$ , com concentração entre 4 a 7%, além de alterações morfológicas dos eritrócitos como microcitose e hipocromia, e resistência osmótica aumentada em solução de NaCl a 0,36%, diminuição da hemoglobina corpuscular média (HCM) e do volume corpuscular médio (VCM). A Hb F pode estar normal ou discretamente aumentada (Pao *et al.*, 1993; Melo *et al.*, 2002).

As manifestações clínicas variam entre os diferentes grupos étnicos que podem apresentar astenia, cansaço e baço palpável. Os níveis de ácido fólico e vitamina B12 plasmáticas apresentam-se dentro dos limites normais.

A designação de talassemia intermédia aplica-se a pacientes com um quadro clínico mais ameno que o da talassemia beta maior, apresentando reticulocitose e em alguns casos dependente de transfusão sanguínea. A talassemia beta intermédia pode decorrer da herança de diferentes mutantes de talassemia beta ou 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 (Adams & Coleman, 1990; TIF, 2000).

### 1.3.2.b. Talassemia do Tipo Alfa

A talassemia do tipo alfa é uma das alterações mais comuns na espécie humana. Apresenta ampla distribuição mundial ocorrendo com mais frequência em regiões da África, mais precisamente na região sub Saara, meio Oeste da Índia, Norte da Papua e Nova Guiné e em grupos isolados do Noroeste da Índia; além da região do Mediterrâneo e Ásia (Weatherall & Clegg, 2001).

Caracteriza-se por apresentar células hipocrômicas e microcíticas, sendo que um componente hemolítico adicional pode surgir quando há significativo grau de desequilíbrio entre as cadeias em excesso, ocorrendo formação de tetrâmeros:  $\gamma_4$  (Hb Bart's),  $\beta_4$  (Hb H) e  $\delta_4$  (Higgs *et al.*, 1989).

A classificação da talassemia alfa é realizada conforme a síntese da cadeia de alfa globina esteja reduzida ( $\alpha^+$ ) ou ausente ( $\alpha^0$ ). A duplicação dos genes  $\alpha$  leva à formação de cinco possíveis genótipos talassêmicos, além do genótipo normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), que são:  $-\alpha/\alpha\alpha$ ,  $--/\alpha\alpha$ ,  $--/-\alpha$ ,  $--/--$  (Bunn & Forget, 1986; Stamatoyannopoulos *et al.*, 1994; Hoffbrand & Pettit., 1995). Há centenas de associações genótípicas que podem determinar talassemia 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 Bart's (Higgs *et al.*, 1989; Kazazian, 1990; Naoum & Bonini-Domingos, 1998). O fenótipo de talassemia alfa reflete, de forma geral, em formação de tetrâmeros de hemoglobina funcionalmente anormais, e o acúmulo das globinas excedentes que resulta em dano e disfunção eritrocitária (Liebhaber, 1989) (Figuras 9, 10 e 11).

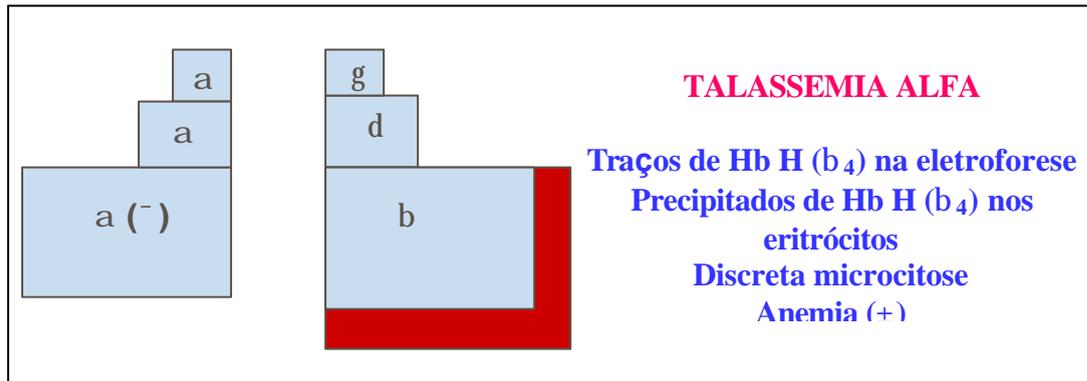


Figura 9: Representação esquemática da produção de globinas na talassemia alfa.

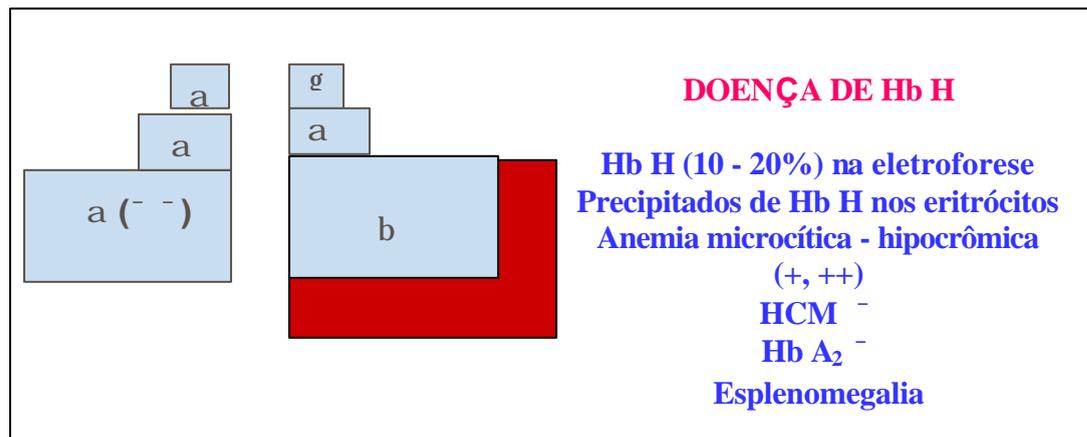


Figura 10 Representação esquemática da produção de globinas na doença de Hb H.



Figura 11: Representação esquemática da produção de globinas na Hidropsia fetal.

A causa mais comum de talassemia alfa é a deleção de um ou ambos os genes alfa, processo este que pode ser originado por vários mecanismos. Assim, alguns tipos de talassemia alfa são característicos de determinados grupos raciais (Weatherall & Clegg, 2001).

A severidade dos fenótipos de talassemia alfa está diretamente relacionada à perda da 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  $\alpha_2$  é expresso três vezes mais que o gene  $\alpha_1$ , alterações que afetam o gene  $\alpha_2$  terão maior impacto fenotípico do que aquelas que envolvam o gene  $\alpha_1$ . De modo geral, podemos dizer que a perda de um único gene alfa pode resultar em uma diminuição leve, moderada ou grave, da síntese da globina alfa dependendo de como ocorreu essa perda gênica (processos deletoriais ou não) e qual locus foi envolvido (Liebhaber, 1989; Higgs *et al.*, 1989; Kazazian, 1990; Bonini-Domingos, 1993).

#### **1.4. Importância do Diagnóstico**

As hemoglobinopatias são alterações genéticas com ampla distribuição mundial. A W. H. O., desde 1982, alerta para a mobilização dos setores de saúde na detecção e prevenção dos indivíduos com anemias hereditárias. Estudos preventivos de hemoglobinopatias têm sido realizados em países onde a incidência constitui um fator de risco para a saúde pública, cada qual enfocando da melhor maneira a sua população e o tipo de hemoglobinopatia que acomete (W.H.O., 1989).

Segundo a W. H. O., cerca de 2.500 a 3.000 crianças portadoras de hemoglobinopatias nascem por ano no Brasil. Destas 20% não atingem cinco

anos de idade, devido a problemas ocasionados pela doença, que poderiam ser minimizados pelo diagnóstico precoce e terapia adequada (Araújo et al, 1993).

Os programas de triagem neonatal visam detectar precocemente indivíduos portadores de talassemia e conseqüentemente, fornecer o tratamento adequado. Em países com incidência aumentada, essas atuações permitem reduzir a morbidade e mortalidade dos indivíduos portadores de talassemia beta. Além disso, é importante o aconselhamento genético, com apoio psicológico diante do diagnóstico preciso, fornecendo ao indivíduo a possibilidade de decidir conscientemente sobre sua prole (Ramalho, 1986; Modell *et al.*, 2001).

Medidas efetivas de profilaxia e prevenção podem ser tomadas e as complicações decorrentes da alteração, evitadas ou reduzidas, melhorando a qualidade de vida do paciente (Wethers *et al.*, 1989; Galacteros, 1996).

O diagnóstico de talassemia beta é feito primeiramente através de uma triagem básica constando de resistência osmótica globular em solução NaCl 0,36%, morfologia eritrocitária e eletroforese em pH alcalino. Com os resultados dessa triagem e os resultados da hematimétrica com índices hematimétricos, pode-se suspeitar de talassemia beta. É necessário também a quantificação da hemoglobina A<sub>2</sub>, caso esta esteja aumentada na eletroforese em pH alcalino. A dosagem da hemoglobina A<sub>2</sub> pode ser realizada através da metodologia de eluição ou através da quantificação por cromatografia líquida de alta pressão (Naoum, 1997).

Para a correta identificação do mutante é necessário análise molecular que pode ser realizada através de técnicas como PCR-RFLP (polimorfismo do comprimento de fragmento de restrição), PCR-ASO (sondas oligonucleotídeo alelo-específica) ou seqüenciamento.

Para o diagnóstico de talassemia alfa são necessários os mesmos testes de triagem básica, além da eletroforese em pH neutro para identificação da hemoglobina H e a pesquisa intraeritrocitária da hemoglobina H, através da coloração com azul cresil brilhante. A identificação do mutante é realizada através de análise molecular, como PCR-RFLP (polimorfismo do comprimento de fragmento de restrição), PCR-ASO (Naoum, 1997).

## I.5. Anemias

Entende-se por anemia a diminuição do volume de hemácias ou da hemoglobina por unidade de volume de sangue com conseqüente diminuição na capacidade transportadora de oxigênio aos tecidos (Kellermeyer, 1984).

A anemia não representa diagnóstico definitivo e sim achado laboratorial, que demanda criteriosa investigação etiológica e patogênica, tornando-se necessário uma avaliação peculiar de cada caso, história clínica do paciente com ênfase às perdas crônicas, antecedentes pessoais e familiares e exame físico para estabelecer o quadro clínico (Oliveira & Figueiredo, 1998).

A anemia pode ser classificada como aguda e crônica. A anemia do tipo aguda ocorre devido a uma hemorragia ou hemólise aguda; enquanto que a anemia crônica ocorre por estados carenciais de vitaminas ou ferro, anemias hereditárias, ou como causa secundária de doenças inflamatórias crônicas ou neoplásicas. Pode ser classificada de acordo com sua etiologia ou morfologia das hemácias.

A classificação morfológica é mais utilizada na prática clínica por auxiliar o médico hematologista na conduta médica. Anemia normocrômica e macrocítica significa que o indivíduo apresenta eritrócitos com coloração normal (normocítica) porém, apresenta células de tamanho maior do que o normal (macrocítica). Esse quadro pode indicar uma anemia por deficiência de vitamina B12, de ácido fólico ou mesmo uma doença hepática. Uma anemia normocítica e normocrômica indica que o indivíduo apresenta células de coloração e tamanho normal, porém uma perda súbita de sangue pode ter ocorrido, ou mesmo apresentar uma doença crônica. Quando a morfologia sugere uma anemia hipocrômica e microcítica, significa que o indivíduo apresenta células com pouca coloração, isto é, os eritrócitos apresentam-se “pálidos”, com pouca hemoglobina (hipocrômica) e menores do que o normal (microcítica), o que ocorre com

freqüência nos casos de anemia ferropriva e nas talassemias (Barreto, 1992; Oliveira & Figueiredo, 1998).

De acordo com a etiologia, a anemia pode ser classificada como anemia carencial, isto é, por falta de produção ou ingestão de elementos nutritivos; e anemia por hemólise, isto é, destruição de glóbulos vermelhos ou perdas sangüíneas (Oliveira & Figueiredo, 1998).

Na anemia carencial, o sistema hematopoiético se encontra íntegro quantitativa e qualitativamente. As células apresentam-se em número suficiente e o sistema sintetizador da célula, desde os genes até a produção final das proteínas, está perfeito. O que lhe falta são os elementos nutritivos, substâncias como vitamina B12, coenzimas, elementos químicos como o ferro e o ácido fólico, eritropoietina, etc. Porém, também pode ocorrer anemia carencial quando o sistema hematopoiético se encontra comprometido quantitativamente, ocorrendo uma diminuição da densidade, do número de células hematopoiéticas, isto é, o tecido hematopoiético normal é substituído por outro, como o tecido adiposo, tecido fibrótico ou neoplásico. Esse mecanismo ocorre nas aplasias medulares, nos processos invasivos da medula por processos neoplásicos malignos como as leucemias, metástases de outras neoplasias, moléstias de depósito e fibrose (Barreto, 1992).

No caso da anemia hemolítica o mecanismo envolvido pode ser adquirido ou hereditário. Quando a anemia ocorre por um mecanismo adquirido, as anemias hemolíticas são auto-ímmunes ou ocorrem por incompatibilidade materno-fetal dos grupos sangüíneos ABO, Rh, Duffy, Kell, MN entre outros, como por exemplo, as anemias hemolíticas do recém-nascido. Há também as anemias tóxicas, como as desencadeadas pela intoxicação pelo chumbo, hidreto de arsênio e aquelas causadas por microorganismos como bactérias, vírus e parasitas (Barreto, 1992). Dentre as anemias que ocorrem por um mecanismo hereditário como é o caso das hemoglobinopatias, das eritroenzimopatias e das anemias com distúrbios protéicos da membrana celular, o sistema hematopoiético encontra-se alterado qualitativamente. Estas situações levam a diminuição da vida

média das hemácias, o que configura uma anemia hemolítica, ou seja, uma anemia causada por destruição prematura dos glóbulos vermelhos (Barreto, 1992).

## 1.6. Hemocromatose

A hemocromatose hereditária (HH) é uma patologia autossômica recessiva do metabolismo de ferro, que afeta aproximadamente um em cada 300 indivíduos descendentes de caucasianos do norte europeu (Gochee & Poweel, 2001). É caracterizada por absorção excessiva do ferro pelas células do trato gastrointestinal e progressiva deposição deste metal no parênquima celular de órgãos, como fígado, pâncreas e coração e subsequente disfunção e falha dos mesmos. O não tratamento desta doença pode levar a diabetes *mellitus*, cardiopatia, artrite, hipogonadismo, cirrose hepática seguida de carcinoma hepatocelular e morte precoce do indivíduo (Le Gac *et al.*, 2000; Gochee & Poweel, 2001).

A identificação do gene HFE, localizado na região 21.3 no braço curto do cromossomo 6, em 1996, forneceu algumas hipóteses para essa patogênese. O gene HFE apresenta sete regiões codificadoras alternadas por íntrons e codifica a proteína HFE (Féder *et al.*, 1996).

A proteína HFE é uma proteína transmembrana expressa nas células intestinais e do fígado. Participa da regulação da afinidade do receptor de transferrina (proteína que transporta o ferro), que está presente em vários tipos celulares, mais freqüente no trato gastrointestinal (duodeno e jejuno), indicando a relação da absorção do ferro nesta área (Parkkila *et al.*, 1997). Uma vez sintetizada, a proteína HFE forma um complexo com a beta 2 microglobulina e é assim transportada para a superfície da célula onde se fixa, próxima ao receptor da transferrina. Sua função é regular a afinidade do receptor da transferrina, controlando a quantidade de ferro que é captada pela célula (Worwood, 1998).

Duas mutações foram caracterizadas para essa proteína, a mutação C282Y, uma transição G → A, que substitui o aminoácido 282 de cisteína por tirosina, e a mutação H63D, uma transversão C → G, que substitui o

aminoácido 63 de histidina por ácido aspártico (Feder *et al.*, 1996). A mutação C282Y torna a proteína HFE incapaz de se associar com a beta2-microglobulina, que portanto, não é expressa na membrana celular levando a um significativo aumento da afinidade do receptor da transferrina. A mutação H63D permite a associação da proteína HFE com a beta2-microglobulina, porém, há uma perda parcial de função, ocasionando um aumento discreto do receptor de transferrina.

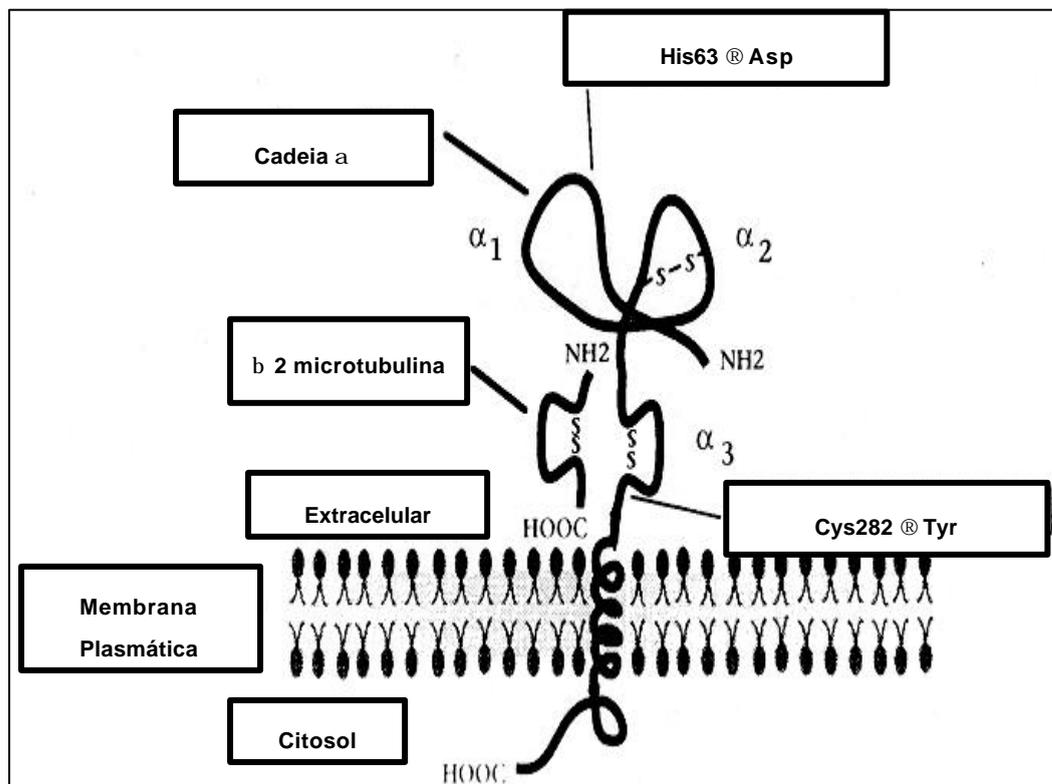


Figura 12: Modelo da proteína HFE, modificado de Worwood, 1998.

Por muito tempo pensou-se em uma alta frequência de heterozigotos para hemocromatose em pacientes com porfiria cutânea tardia, anemia sideroblástica, e esferocitose hereditária, entre outras condições (Simon, 1985). Alguns estudos mostraram uma alta frequência de HLA-A3 em pacientes com porfiria cutânea enquanto outros não demonstram alta frequência. Entretanto, mutações de hemocromatose parecem causar suscetibilidade ao desenvolvimento esporádico de porfiria cutânea tardia (Worwood, 1998).

Atualmente, o desenvolvimento de testes genético para essas duas mutações tem importante papel no diagnóstico na doença bem como na detecção de pacientes assintomáticos.

A frequência estimada dos distúrbios que geram hemocromatose é variável e prevalente em caucasianos. No Canadá, a prevalência é 1:250 para homozigose de ambas mutações, C282Y e H63D, e 1:7 para portadores das mesmas. Na Irlanda, a frequência para homozigose de C282Y é 1:83 e 1:5 para heterozigotos de C282Y. Para heterozigotos de ambas as mutações, a frequência é 1:25. Na Nova Zelândia, estima-se a presença de 18.960 pessoas apresentando hemocromatose e 541.000 portadores da doença ([www.harry-arends.nl/Html/links.htm](http://www.harry-arends.nl/Html/links.htm)).

®



## ***II. Objetivos***

A população brasileira, intensamente miscigenada, reflete nas variações fenotípicas das hemoglobinopatias, interações genéticas destes distúrbios e/ou fatores ambientais, além da co-herança de outras afecções genéticas. O presente trabalho teve como objetivos gerais caracterizar as formas talassêmicas do tipo beta e verificar os interferentes na expressão do fenótipo como a possível co-herança com hemocromatose, através dos seguintes objetivos específicos:

2.1. Identificação dos portadores de talassemia do tipo beta através de procedimentos clássicos e da análise por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).

2.2. Identificação dos mutantes para hemocromatose por PCR-ASO.

2.3. Relação dos valores encontrados para talassemia beta e hemocromatose com possível efeito na expressão do fenótipo beta talassêmico.

2.4. Avaliação das metodologias aplicadas para fins diagnósticos.



### ***III. Materiais e Métodos***

### III. 1. Casuística

Foram analisadas 332 amostras de sangue periférico de indivíduos de ambos os sexos, origens étnicas distintas com suspeita de talassemia beta provenientes de diferentes regiões brasileiras. Estas amostras foram encaminhadas juntamente com o termo de consentimento por médicos e profissionais que trabalham em colaboração com o Laboratório de Genética de Doenças Hematológicas (LHGDH) do IBILCE – UNESP.

Cada amostra constou de 10 mL de sangue periférico, colhido por punção venosa, usando-se EDTA a 5% como anticoagulante. Até o momento das análises o material foi mantido sob refrigeração (4° C).

Ao chegar ao laboratório, cada amostra recebeu um número de código para preservar a identidade dos envolvidos. Os resultados das análises foram repassados aos pacientes em conjunto com o hematologista responsável.

### III.2. Métodos de Diagnóstico

Após os procedimentos de identificação, as amostras foram submetidas a análises para identificação de talassemias preconizadas pelo LHGDH como: triagem básica, constando de Resistência Globular Osmótica em Solução de Cloreto de Sódio a 0,36% (Silvestroni & Bianco, 1975), Análise a Fresco da Morfologia Eritrocitária (Bonini–Domingos, 1993) e Eletroforese em pH Alcalino (Marengo & Rowe, 1965) e eletroforese em pH ácido (Vella, 1968). A análise por HPLC foi realizada para quantificação das hemoglobinas A, A<sub>2</sub> e F, e obtenção do perfil cromatográfico dos indivíduos. Para confirmação de talassemia beta foram realizados testes de dosagem de Hb A<sub>2</sub>, por eluição (Marengo & Rowe, 1965), e Hb F por desnaturação alcalina (Betcke, 1959). Para talassemia alfa foram utilizadas metodologias específicas como: eletroforese em pH neutro (Dacie & Lewis, 1985) e pesquisa intraeritrocitária de Hb H (Payannopoulos & Stamatayannopoulos, 1974).

Os estudos moleculares foram realizados após a extração do DNA genômico, seguido de amplificação e caracterização das mutações para hemocromatose hereditária por ASO.

A seguir, a descrição das metodologias laboratoriais aplicadas a cada caso de talassemias.

### III.3. Detalhamento Técnico

#### III.3.1. Valores Hematológicos (Rapaport, 1987)

Os valores hematológicos de cada paciente foram obtidos por equipamentos automatizados específicos para a avaliação hematológica. Os índices hematimétricos foram obtidos através de cálculos padronizados pela O.M.S. Esses índices devem ser sempre calculados em pacientes com suspeita de anemia, a fim de se confirmar os achados obtidos no esfregaço sangüíneo, sobre o tamanho da célula e o conteúdo da hemoglobina.

*-Volume Corpuscular Médio (VCM):* Este índice representa o volume médio do eritrócito. É obtido através da divisão do volume dos glóbulos vermelhos em 1000 mL de sangue ( $HT \times 10$ ) pela contagem desses glóbulos em milhões.

$$VCM = \frac{HT \times 10}{GV} \mu^3 \text{ ou ft}$$

*Interpretação:* Valor normal: 82 a 92  $\mu^3$ .

Valor abaixo de 82  $\mu^3$  indica microcitose e valor acima de 92  $\mu^3$  é indicativo de macrocitose.

*-Hemoglobina Corpuscular Média (HCM):* Este índice fornece o peso médio de hemoglobina contida em cada eritrócito. É obtido dividindo-se a quantidade de hemoglobina em 1000 mL de sangue (Hb x 10) pela contagem de hemácias em milhões.

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb} \times 10}{\text{GV}} \text{ pg}$$

*Interpretação:* Valor normal:  $29 \pm 2$  pg.

Valor abaixo do valor de referência pode indicar microcitose, hipocromia ou ambos. Um valor alto de HCM é evidência de macrocitose.

*-Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM):* Este índice representa a quantidade de hemoglobina por volume globular e, portanto, é um indicador da concentração de hemoglobina da célula, independente de seu tamanho. É calculado dividindo-se o valor da hemoglobina pelo hematócrito e multiplicando-se por 100.

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb}}{\text{HT}} \times 100 \text{ g/dL ou \% HT}$$

*Interpretação:* Valor normal:  $32 \pm 2$  g/dL ou %

Valor abaixo da média indica hipocromia; enquanto que uma CHCM acima da média é encontrada apenas em casos de esferocitose marcada.

### III.3.2. Preparação de Hemolisados

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

Hemolisado Rápido - com saponina (Naoum, 1998);

Solução de Hemoglobinas - com clorofórmio (Naoum, 1998)

### **-Hemolisado Rápido - com Saponina**

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

#### *Reagentes:*

1. Reativo hemolisante

-Saponina P.A. 1 g

-Água destilada q.s.p. 100 mL

#### *Procedimento:*

1. Em placa de Kline, misturar um volume de sangue com 1 volume de reativo hemolisante;
2. Homogeneizar com auxílio de um bastão plástico; até a hemólise total da mistura;
3. Utilizar o hemolisado após 5 minutos e até, no máximo 24 horas após sua preparação.

### **-Solução de Hemoglobinas**

*Princípio:* A obtenção de hemolisado entre 10 e 15g/dL de hemoglobina, tal qual o método descrito a seguir, é importante para a dosagem de Hb F, Hb A<sub>2</sub>. Para eletroforese qualitativa de hemoglobina é aconselhável usar hemolisados com concentrações de hemoglobina variáveis entre 4 e 6 g/dL.

*Reagentes:*

1. Solução salina 0,85%
  - Cloreto de Sódio 8,5 g
  - Água destilada q.s.p. 1000 mL
2. Clorofórmio
3. Água destilada

*Procedimento:*

1. Centrifugar 1 mL de sangue total colhido com anticoagulante a 1.500 r.p.m., durante 5 minutos;
2. Remover o plasma e adicionar solução salina a 0,85% na proporção 1:1 para lavar os eritrócitos. Centrifugar por cinco minutos e desprezar o sobrenadante. Repetir esse passo três vezes.
3. Ao volume dos eritrócitos lavados, adicionar o mesmo volume de água destilada. Homogeneizar, e a seguir adicionar um volume de clorofórmio, idêntico ao do hemolisado formado. Agitar vigorosamente e centrifugar a 2.000 r.p.m., por 15 minutos.
4. A solução de hemoglobina sobrenadante, ou hemolisado, é retirado por meio de pipeta Pasteur e transferida para um frasco limpo com identificação da amostra. A concentração do hemolisado, preparado conforme a metodologia apresenta, geralmente é variável entre 10 e 15 g/dL.

**III.3.3 Para pesquisa de Talassemia**

*-Resistência Globular Osmótica 0,36% (Silvestroni & Bianco, 1975).*

*Princípio:* Técnica utilizada para detectar talassemia beta principalmente na forma heterozigota, pois nesses casos os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise nesta solução; entretanto, 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 Utilizados:*

1. Solução Estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

-NaCl	9,0 g
-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,36 g
-NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,28 g
-Água destilada	q.s.p. 100 mL

2. Solução Trabalho

-NaCl 10%	36 mL
-Água destilada	q.s.p. 1000 mL

*Procedimento:*

1. Em tubo de hemólise, colocar 1,5 ml de solução de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total;
2. Agitar por inversão, suavemente e aguardar 10 minutos para leitura;
3. Colocar o tubo de hemólise com a amostra na solução de NaCl a 0,36% a 2,0 cm de distância de uma folha branca com linhas negras.

*Interpretação:* A resistência aumentada à hemólise do eritrócito torna a amostra opaca e não se visualiza as linhas negras, sendo interpretado como resultado positivo ao teste. Em amostras com resistência normal à hemólise, é possível visualizar facilmente as linhas através da solução (Figura 13).

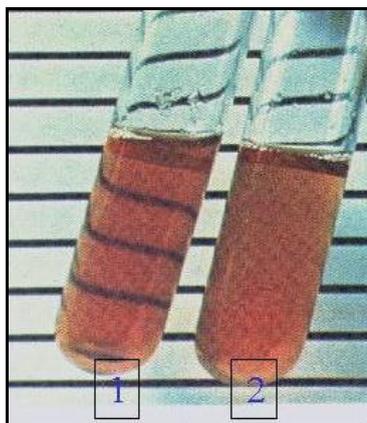


Figura 13: Resistência globular osmótica em solução de cloreto de sódio a 0,36%. O tubo 1 ilustra um resultado negativo e o tubo 2, um resultado positivo (Fonte: LHGDH).

*-Análise a fresco da morfologia eritrocitária (Bonini-Domingos, 1993).*

*Princípio:* Em esfregaço sanguíneo a fresco, analisa-se o tamanho, a forma e a coloração dos eritrócitos. Os indivíduos portadores de beta talassemia heterozigota apresentam moderada anisopoiquilocitose com prevalência de microcitose e hipocromia facilmente visualizadas ao microscópio óptico. As lâminas são visualizadas ao microscópio em objetiva de 40 vezes. (Figura 14).

Os resultados são divulgados do seguinte modo, preconizado pelo LHGDH nas análises das alterações morfológicas em conjunto.

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

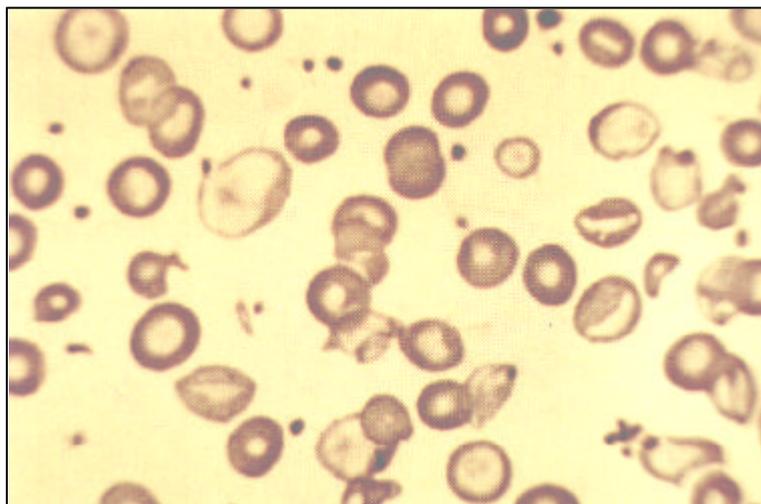


Figura 14: Esfregaço sangüíneo apresentando discretas alterações dos eritrócitos (Fonte: LHGDH).

*-Eletroforese em Acetato de celulose em pH alcalino (Marengo & Rowe, 1965).*

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

*Reagentes:*

1. Tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,5 (TEB)

-Tris hidroximetilaminometano	10,2 g
-Ácido etilenodiaminotetracético	0,6 g
-Ácido bórico	3,2 g
-Água destilada	q.s.p. 1000 mL

## 2. Corantes:

### 2.1. Negro de amido

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

### 2.2. Ponceau

-Ponceau S	0,5 g
-Ácido tricloroacético	5,0 g
-Água destilada q.s.p.	100 mL

## 3. Solução Descorante de Ácido Acético

-Ácido acético glacial	100 mL
-Metanol	50 mL
-Água destilada q.s.p.	1000 mL

### *Procedimento:*

1. Embeber as fitas de acetato de celulose por 15 minutos no mínimo, em tampão TEB pH 8,5;
2. Secar as fitas entre duas folhas de papel absorvente para retirar o excesso de solução tampão e colocá-las na cuba de eletroforese, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos através de tiras de papel de filtro;
3. Aplicar as amostras de hemoglobinas a 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo;
4. Passar 300 volts por 40 minutos;
5. Analisar as frações sem coloração e posteriormente corar com Negro de amido ou Ponceau, embebendo as fitas em um dos corantes por 15 minutos;

6. Transferir as fitas para um recipiente que contenha Solução Descorante, agitando cuidadosamente entre 3 a 5 minutos, trocar a Solução Descorante usada por outra nova, deixando as fitas embebidas nesta solução o tempo necessário para clareá-las.

*Interpretação:* A interpretação é realizada através da consulta a um mapa de disposição de hemoglobina em eletroforese alcalina (Figura 15).

Eletroforese Alcalina pH (8-9)	Interpretação
<p>Origem</p> <p>- : █      █      +</p> <p style="text-align: center;">A<sub>2</sub> S F A J H</p> <p style="text-align: center;">C D                      I</p>	A <sub>2</sub> - A
<p>█      █</p>	A <sub>2</sub> - A
<p>█      █</p>	A <sub>2</sub> - F
<p>█      █      █</p>	A <sub>2</sub> - F - A
<p>█      █</p>	A <sub>2</sub> - F - A
<p>█      █      █</p>	A <sub>2</sub> - A - H

Figura 15: Mapa eletroforético de migração de algumas hemoglobinas humanas em pH alcalino (pH 8,5) .

*-Eletroforese Quantitativa em Acetato de Celulose, pH 8,5*  
*Dosagem de Hemoglobina A<sub>2</sub> (Marengo & Rowe, 1965).*

*Princípio:* O aumento de hemoglobina A<sub>2</sub> na grande maioria dos casos está associado as talassemias beta heterozigotas. Porém em algumas condições patológicas, muitas de origem adquirida, 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:*

1. Aplicar 20µL de solução de hemoglobinas com concentração entre 8 e 12g%, em fita de acetato de celulose com 5,7 cm de largura;
2. Passar 300 volts por 40 minutos;
3. Após a separação das frações de Hb A<sub>2</sub> e A, recortá-las com tesoura e eluí-las em tubos de ensaio contendo 3 mL de água destilada para hemoglobina A<sub>2</sub>, e 15 mL de água destilada para hemoglobina A.
4. Deixar eluir por quatro horas com agitação periódica.
5. Ler as densidades ópticas (D.O.) em 415 nm, usando água destilada como branco.

*Cálculo:*

$$\% \text{ Hb A}_2 = \frac{\text{D.O. Hb A}_2}{\text{D.O.Hb A}_2 + (\text{D.O.Hb A} \times 5)} \times 100$$

*Interpretação:* Valores normais de Hb A<sub>2</sub>: 2,5-3,5%.

*-Eletroforese de Diferenciação em Ágar Fosfato, pH 6,2 (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 sua correta caracterização. Por esse método, as hemoglobinas S e C se separam das hemoglobinas A enquanto as Hb D e Hb E migram na mesma posição da

hemoglobina A. Esse método permite também a caracterização semi-quantitativa de hemoglobina Fetal.

*Reagentes:*

1. Tampão Fosfato pH 6,2

Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel.

-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,02 g
-NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	7,66 g
-Água destilada	q.s.p. 1000 mL

2. Gel de ágar-fosfato

-Ágar	300 mg
-Tampão fosfato pH 6,2	20 mL

*Procedimento:*

1. Em um erlenmeyer de 250 mL aquecer os componentes do gel de ágar-fosfato até completa dissolução;
2. Pipetar 3,5 mL do gel em lâminas de microscópio. Deixar gelificar à temperatura ambiente;
3. Aplicar as amostras próximo à porção mediana da lâmina;
4. Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos usar folha dupla de papel de filtro;
5. Passar 100 volts por 20 minutos;
6. Analisar inicialmente sem corar;
7. Para melhor interpretação das frações corar com Ponceau ou Negro de Amido.

*Interpretação:* Consultar o mapa de diferenciação das disposições de hemoglobinas (Figura 16).

Eletroforese Ácida em Ágar pH (5-6)		Interpretação	
Origem			
+	:	-	A
C	S	F	
			A
			F
			A - F
			A - F

Figura 16: Mapa eletroforético de migração de algumas hemoglobinas humanas em pH ácido (pH 6,2).

*-Dosagem de Hb F (Betcke et al., 1959)*

*Princípio:* A Hb F é álcali-resistente, enquanto que as hemoglobinas A, A<sub>2</sub> são facilmente desnaturáveis por soluções alcalinas. Esse método é sensível para detectar pequenas quantidades de Hb F. Concentrações acima de 2% refletem aumento de Hb F. Em sangue de cordão umbilical a quantidade de Hb F é aproximadamente de 70 a 90%. Em indivíduos com talassemia beta homozigota a taxa dessas hemoglobinas oscila entre 60 e 98%, na interação talassemia beta/ Hb S o valor está entre 0,5 a 21,2 %. Na talassemia beta heterozigota, a Hb F pode estar normal ou discretamente aumentada.

*Reagentes:*

1. Solução de Ferricianeto de Potássio (Drabkin)

-Ferricianeto de potássio	0,20 g
-Cianeto de potássio	0,20 g
-Água destilada	q.s.p 1000 mL

## 2. Solução de Hidróxido de Sódio 1,2N

-Hidróxido de sódio	4,8 g
-Água destilada	q.s.p 100 mL

## 3. Solução Saturada de Sulfato de Amônio

-Sulfato de amônio	200 g
-Água destilada	q.s.p 200 mL

*Procedimento:*

1. Diluir 0,6 mL da solução de hemoglobina em um tubo contendo 10 mL da Solução de Drabkin. Homogeneizar por inversão.

2. 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 1,2 N e acionar o cronômetro. Agitar cuidadosamente por 10 segundos.

3. Ao final de 2 minutos exatos, adicionar 4 mL da Solução saturada de Sulfato de Amônio. Homogeneizar por inversão e deixar em repouso por 5 a 10 minutos no máximo.

4. Filtrar o conteúdo do tubo “Hb F” em duplo papel de filtro.

5. 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 adicionar 9mL da Solução de Drabkin. A solução de hemoglobina total é 10 vezes mais diluída que a solução de hemoglobina alcali-resistente.

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

*Cálculo:*

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

*Interpretação:* Adultos normais apresentam valores entre 0 e 1,0% de Hb F.

*-Eletroforese em Acetato de Celulose pH Neutro (Dacie & Lewis, 1985)*

*Princípio:* É uma técnica utilizada para qualificação e quantificação da hemoglobina H e Bart's.

*Reagentes:*

1. Reagentes para o Tampão:

-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,11 g
-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,66 g
-Água destilada	q.s.p. 1000 mL

*Procedimento:*

1. Embeber as fitas de acetato de celulose por 15 minutos, no mínimo, em tampão pH neutro. Colocar o mesmo tampão nos compartimentos eletrolíticos da cuba de eletroforese;

2. 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;

3. Aplicar as amostras de hemoglobina a 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo;

4. Passar 300 volts por 30 minutos;

5. Analisar as frações sem coloração seguindo o mapa de identificação (Figura 17).

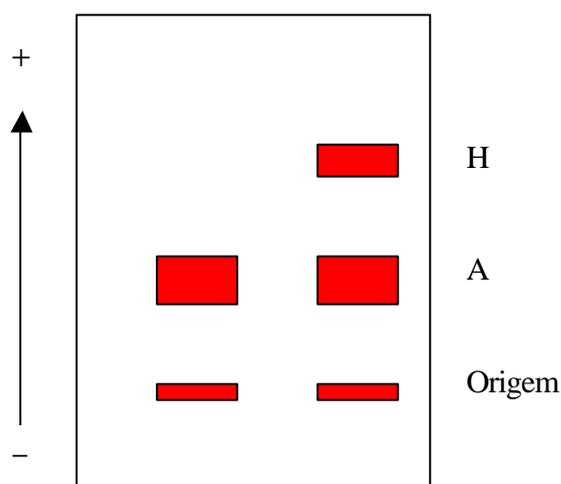


Figura 17: Representação esquemática do padrão de migração de hemoglobinas humanas em pH neutro.

*-Pesquisa de Corpúsculos de Heinz e Agregados de Hemoglobina H (Payannopoulos & Stamatayannopoulos, 1974)*

Princípio: Os corpúsculos 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:*

1. Solução Salina:

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

2. Solução Citrato:

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

### 3. Solução de azul cresil brilhante:

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

#### *Procedimento:*

1. Colocar 50  $\mu\text{L}$  de sangue total em tubo de ensaio pequeno e adicionar 100  $\mu\text{L}$  de solução de azul cresil brilhante. Agitar o tubo suavemente;
2. Incubar o material a 37°C por 30 minutos, 1 hora e 2 horas;
3. Fazer esfregaços finos e examinar ao microscópio em objetiva de imersão.

*Interpretação:* A presença de hemoglobina H nos eritrócitos aparece como fina granulação distribuída homogeneamente, caracterizando um portador de alfa talassemia. Os corpos de Heinz são facilmente observados nos casos de hemoglobinas instáveis (Figura18).



Figura 18: Corpos de Hb H observados após coloração vital com Azul Cresil Brilhante (Fonte: LHGDH).

*-Análise de Hemoglobina por HPLC com o equipamento Variant e kit de análise para talassemia beta heterozigota Bio-Rad*

*Princípio:* O equipamento utilizado para esta análise foi o VARIANT da BIO-RAD com kit de análise Beta Talassemia Heterozigota. Este equipamento e respectivo software associam HPLC à cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, onde duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição com controles de gradientes pré-programados, passam através de uma coluna analítica em alta pressão. Um fotômetro de filtro de comprimento de onda duplo (415 e 690 nm), monitora a eluição da hemoglobina na coluna, detectando as alterações de absorbância a 415 nm. O filtro secundário corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura dos tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorbância x tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção, que é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da hemoglobina. Assim, cada fração de hemoglobina tem um tempo de retenção característico. No final da análise de cada amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório foram automaticamente impressos. Esta metodologia forneceu valores percentuais de cada uma das frações de hemoglobina da amostra. A figura 19, ilustra um cromatograma obtido neste equipamento e os respectivos dados analíticos.

*Procedimento:*

1. Colocar em um tubo de ensaio, 5 $\mu$ L de sangue total com 1 mL de Solução Hemolisante fornecida no *kit* de análise.
2. Homogeneizar até hemólise total e acondicioná-los nos recipientes adequados e alojá-los no equipamento, que realizará os procedimentos pré-programados de leitura das amostras.

*Interpretação:* A quantificação das diferentes frações de hemoglobina em uma amostra e a identificação do perfil de variantes, comparando os valores obtidos com padrões de calibração.

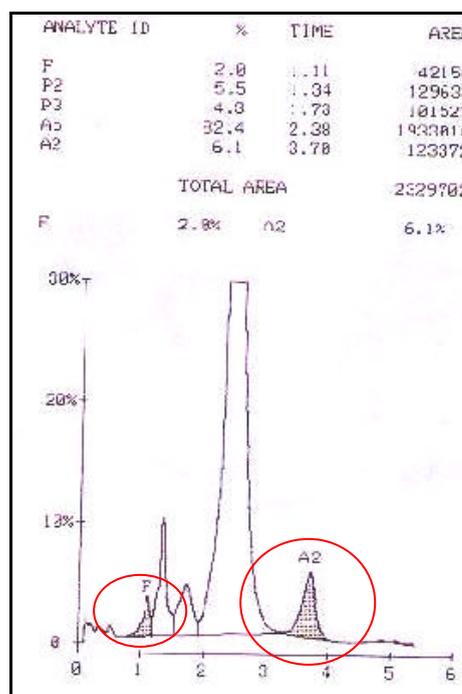


Figura 19: Cromatograma de um indivíduo portador de talassemia beta, onde pode ser observados os picos de Hb F e Hb A<sub>2</sub> (Fonte: LHGDH).

### III.3.4. Para análise molecular

Para avaliarmos qual metodologia de extração de DNA genômico se adequaria melhor para as amostras de talassemia beta, realizaram-se testes utilizando quatro diferentes técnicas: extração pelos kits *mD<sub>x</sub><sup>tm</sup> InstaGene Whole Blood BIO-RAD* e *mD<sub>x</sub><sup>tm</sup> InstaGene Genomic BIO-RAD*, extração rápida de DNA com uso de CTAB e DTAB e extração pelo método Fenol/Clorofórmio.

Os procedimentos específicos para a análise molecular são descritos à seguir:

*-Extração de DNA genômico pelo Kit InstaGene<sup>™</sup> Whole Blood**BIO-RAD*

*Princípio:* Utilizado para purificar DNA genômico do sangue total para uso em reações de amplificação. O Tampão de Lise rompe as células, liberando a hemoglobina nos eritrócitos e o núcleo dos glóbulos brancos. O sedimento formado após a centrifugação é constituído pelos núcleos celulares, que é então lavado com Tampão de Lise para remover todo resquício de hemoglobina. A Matriz, uma resina quelante de cátions polivalente, é adicionada ao sedimento. Depois de uma rápida incubação à 70°C, os núcleos são lisados e liberam o DNA para o sobrenadante.

Provavelmente, a função da Matriz Instagene envolve ligações de cátions que poderiam catalisar a degradação do DNA em altas temperaturas.

*Reagentes:*

1. Tampão de Lise	200 mL
2. Matriz InstaGene	20 mL

*Procedimento:*

1. Ajustar os banhos-maria à 70°C e 95°C;
2. Em um tubo de 1,5 mL, misturar 50 µL de sangue com 1 mL de Tampão de Lise. Homogeneizar por inversão. Deixar à temperatura ambiente por 8 minutos, invertendo de vez em quando;
3. Centrifugar o tubo a 10.000-12.000 r.p.m. por 1 minuto;
4. Remover o sobrenadante com ponteira descartável;
5. Adicionar 0,5 mL de Tampão de Lise ao sedimento. Agitar no vórtex por 10 segundos. Centrifugar por 1 minuto. Aspirar o sobrenadante sem movimentar o sedimento;
6. Repetir a etapa número 5. Ao final, o sedimento deve estar branco;

7. Colocar o frasco da Matriz em uma placa agitadora. Ligar em velocidade moderada por 30 segundos para obter uma suspensão uniforme. Remover 200  $\mu\text{L}$  do frasco e adicionar ao tubo contendo o sedimento. Incubar à 70°C por 8 minutos;

8. Após incubação, passar pelo vórtex por 10 segundos. Transferir o tubo para o banho à 95°C e incubar por 4 minutos;

9. Passar pelo vórtex por 10 segundos. Centrifugar por 1 minuto.

10. Para preservar quantidades de DNA que não são prontamente utilizadas, estocar o tubo à -20°C.

*-Protocolo para extração de DNA segundo o kit BIO-RAD  $mD_x^{tm}$  InstaGene Genomic.*

*Reagentes:*

1. Tampão de Lise 1	2100 $\mu\text{L}$
2. Tampão de Lise 2	15 $\mu\text{L}$
3. Solução de Precipitação de Proteínas	200 $\mu\text{L}$
4. Etanol 95%	400 $\mu\text{L}$
5. Etanol 70%	500 $\mu\text{L}$
6. Solução de Reidratação	20-200 $\mu\text{L}$

*Procedimento:*

1. Pipetar 900  $\mu\text{L}$  da Solução de Lise 1 em um tubo de 1,5 mL estéril;

2. Pipetar 300  $\mu\text{L}$  de sangue total no tubo contendo a Solução de Lise 1, homogeneizando por inversão por 10-15 vezes.

3. Centrifugar a 13.000-15.000 r.p.m. por 20 segundos. Descartar o sobrenadante sem agitar o sedimento.

4. Lavar o sedimento de células brancas adicionando 500  $\mu\text{L}$  de Solução de Lise 1, ressuspendendo o sedimento. Centrifugar a 13.000-5.000 r.p.m.

por 20 segundos. Descartar o sobrenadante sem agitar o sedimento. Repetir-se esse passo.

5. Ressuspender o sedimento de células brancas em 200  $\mu$ L de Solução de Lise 1.

6. Adicionar 15  $\mu$ L de Solução de Lise 2. Agitar no vórtex por alguns segundos;

7. Adicionar 200  $\mu$ L de Solução de Precipitação de Proteínas e agitar no vórtex por 10-20 segundos. Centrifugar a 13.000 - 15.000 r.p.m. por 3 minutos para precipitar as proteínas;

8. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL e adicionar 400  $\mu$ L de etanol 95%. Inverter o tubo 10-20 vezes para precipitar o DNA;

9. Centrifugar a 13.000-15.000 r.p.m. por 20 segundos. O DNA será visível como um sedimento branco. Descartar o sobrenadante cuidadosamente;

10. Adicionar 500  $\mu$ L de etanol 70% e inverter o tubo por 5-10 vezes para lavar o DNA. Centrifugar a 13.000-15.000 r.p.m. por 20 segundos. Descartar o sobrenadante cuidadosamente, sem agitar o sedimento.

11. Inverter o tubo sobre papel absorvente para remoção do restante do etanol. Deixar secar por 5 - 10 minutos.

12. Adicionar 20-200  $\mu$ L de Solução de Reidratação de DNA e deixar durante a noite toda em temperatura ambiente.

13. Conservar o DNA a 2-8° C.

*-Protocolo para extração rápida de DNA com uso de CTAB e DTAB (Gustinchic et al., 1991)*

*Reagentes:*

1. DTAB 12% (*dodecyl trimethylammonium bromide* – Sigma D – 8638)

DTAB

12g

---

NaCl	13,15
Tris-HCl 2M pH 8,6	7,5 mL
EDTA 0,4M	18,75 mL
Água deionizada.	q.s.p 100mL

2. Clorofórmio;

3. CTAB 5% (*cetyl trimethylammonium bromide* – Sigma H – 5882);

-CTAB	5g
-NaCl 0,4M	q.s.p. 100mL

4. NaCl 0,4M;

-NaCl	23,73g
-Água deionizada.	q.s.p 1000mL

5. Etanol Absoluto;

6. Etanol 70%;

-Etanol absoluto	70 mL
-Água deionizada q.s.p.	100mL

7. Tris-HCl 2M pH 8,6

-Tris	242,28g
-Água deionizada.	q.s.p 1000mL

*Procedimento:*

1. Preparar o *buffy coat* para um volume de 5 mL de sangue colhido com anticoagulante, e centrifugar por 10 minutos a 1.500 r.p.m.;

2. Aspirar *buffy coat* e dividí-lo em dois tubos de 2mL; sendo 400 µL para cada um;

3. Adicionar 400  $\mu\text{L}$  de DTAB a 12% e homogeneizar por inversão por 15 segundos;
4. Incubar em banho-maria a 68° por 5 minutos;
5. Adicionar 700  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e homogeneizar por inversão vigorosa por 15 segundos;
6. Centrifugar a 10.000 r.p.m. em centrífuga refrigerada por 2 minutos;
7. Transferir o sobrenadante para outro tubo contendo 100  $\mu\text{L}$  de CTAB a 5% e 700 $\mu\text{L}$  de água milli – Q;
8. Homogeneizar por inversão até formação do precipitado;
9. Centrifugar a 10.000 r.p.m. em centrífuga refrigerada por 2 minutos e desprezar o sobrenadante;
10. Dissolver o precipitado em 300  $\mu\text{L}$  de NaCl 1,2 M;
11. Adicionar 750  $\mu\text{L}$  de etanol a 99,5% à temperatura ambiente;
12. Homogeneizar para precipitação do DNA e centrifugar a 10.000 r.p.m. em centrífuga refrigerada por 2 minutos;
13. Desprezar o sobrenadante;
14. Lavar uma vez com etanol a 70% e centrifugar a 10.000 r.p.m. por 2 minutos;
15. Descartar o etanol e secar as paredes do tubo;
16. Dissolver o DNA em 300  $\mu\text{L}$  de água, utilizando o vórtex por 20 segundos.

*-Protocolo de extração de DNA genômico pelo método Fenol – Clorofórmio*

*Princípio:* O DNA genômico dos indivíduos foi obtido a partir de leucócitos de sangue periférico, segundo técnica descrita por Pena *et al.*,

(1991), com modificações. A extração foi realizada através de um composto fenol-clorofórmio e precipitação por etanol.

*Reagentes:*

1. Solução de Lise 1 para extração de DNA (lise de células vermelhas)

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

2. Solução de Lise 2 para extração de DNA (lise de células brancas)

-0,075 M de NaCl	2,19 g
-0,02 M de EDTA (solução estoque pH 8,0)	20 mL
-Água milli-Q	q.s.p. 500 mL

3. Proteinase K (20 mg/mL)

-Proteinase K	20 mg
-Água milli-Q.	q.s.p mL
-Conservar em freezer.	

4. Clorofórmio/ álcool isoamílico 24:1 (Preparar na hora)

-Clorofórmio	24 mL
-Álcool isoamílico	1 mL

5. SDS 20%

-SDS	20 g
-Água milli-Q.	q.s.p 100 mL

6. Etanol 70%

7. KCl 2M	
-KCl	14,91 g
-Água milli-Q	q.s.p 100 mL

*Procedimento:*

1. Colocar 3 mL de sangue periférico, colhido com EDTA, em tubo copolímero e completar o volume para 10 mL com Solução de Lise 1;
2. Deixar descansar por 15 minutos e centrifugar 20 minutos a 2700 r.p.m.;
3. Desprezar o sobrenadante;
4. Acrescentar ao sedimento 4,5 mL de Solução de Lise 2, agitar no vórtex, adicionar 250 µL de SDS a 10% e 50 µL de proteinase K 20 mg/mL e homogeneizar;
5. Incubar em banho-maria a 37°C durante a noite toda;
6. Adicionar 5 mL de fenol e homogeneizar;
7. Centrifugar 20 minutos a 2700 r.p.m.;
8. Transferir a fase superior para outro tubo e adicionar 5 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);
9. Homogeneizar e centrifugar por 20 minutos a 2700 r.p.m.;
10. Transferir a fase superior para outro tubo e adicionar novamente 5 mL de clorofórmio:álcool isoamílico e homogeneizar. (Repetição do passo 8);
11. Centrifugar 20 minutos a 2700 r.p.m.;
12. Transferir o sobrenadante para outro tubo contendo 500 µL de KCl 2M (gelada). Adicionar etanol 100% (gelado) até completar 12 mL. Inverter o tubo várias vezes até precipitar o DNA;
13. Centrifugar a 20 minutos a 2700 r.p.m.;
14. Desprezar o sobrenadante e lavar o DNA, que ficou aderido ao tubo, com etanol 70% (gelado); deixar secar por 15 minutos;

15. Colocar 100  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e manter em banho-maria a 37°C por 24 horas, para total solubilização do DNA;
16. Conservar em freezer -20°C.

#### *-Reação em Cadeia de Polimerase*

*Princípio:* A PCR é uma técnica utilizada para amplificação *in vitro* de seqüências específicas de DNA. Utiliza dois oligonucleotídeos que se hibridizam em fitas opostas e flanqueiam a seqüência de DNA a ser amplificada. Os ciclos são séries repetidas de desnaturação do DNA, anelamento e extensão dos oligonucleotídeos, pela enzima *Taq* polimerase, resultando em um acúmulo exponencial de um fragmento específico de DNA.

#### *Procedimento:*

1. Em um tubo preparar o mix de amplificação através do Master Mix Amplificação do kit da BIO-RAD e adicionar a *Taq* polimerase segundo as especificações do fabricante;
2. Em seguida, pipetar 40  $\mu\text{L}$  desse mix em cada tubo contendo uma amostra de 10  $\mu\text{L}$  de DNA genômico de cada paciente;
3. Levar os tubos ao termociclador para iniciar o processo de amplificação;
4. O programa de amplificação consta de 3 ciclos divididos em passos. O primeiro ciclo consta de uma desnaturação inicial a 94° C por 3 minutos; o segundo ciclo consta de três passos repetidos por 34 vezes: o primeiro passo ocorre a 94°C por 45 segundos, o segundo passo (anelamento dos oligonucleotídeos) ocorre a 60°C por 30 segundos e o terceiro passo (extensão da cadeia de DNA formada) ocorre a 72°C por 30 segundos. O terceiro ciclo é realizado apenas uma vez a 72°C por 5 minutos.

### *-PCR-ASO para Hemocromatose Hereditária*

Para a realização destas análises foi utilizado o kit *mD<sub>x</sub><sup>tm</sup>-Hemochromatosis Hereditary BIO-RAD*, o qual é um teste qualitativo para investigação das mutações em ponto mais freqüentes de hemocromatose: C282Y e H63D em amostras de DNA genômico.

*Princípio:* O kit *mD<sub>x</sub><sup>tm</sup>-Hemochromatosis Hereditary BIO-RAD* utiliza o princípio da hibridização do ASO. Oligonucleotídeos sintéticos hibridizam especificamente com a seqüência complementar de DNA. Portanto, sob condições apropriadas de hibridização somente bases complementares pareadas formarão os dúplex. O kit *mD<sub>x</sub><sup>tm</sup>-Hemochromatosis Hereditary BIO-RAD* foi dividido em 3 fases: preparação amostras, amplificação do DNA *in vitro* por PCR, e detecção alelo específica dos produtos amplificados pela captura por ASO.

#### *Reagentes:*

1. Master Mix de amplificação;
2. Solução Desnaturante;
3. Solução de Hibridização;
4. “Solução de parada”;
5. Conjugado de Estreptavidina-HRP (AS-HRP);
6. Tampão de Lavagem 10X;
7. Substrato (TMB);
8. Ensaio de Validação.

#### *Procedimento:*

*Preparação da amostra:* As amostras de DNA foram extraídas de sangue total utilizando as metodologias de extração já descritas.

*Amplificação in vitro:* A amplificação foi realizada como mencionado acima.

#### *Deteccão*

1. Primeiramente, retirar a Solução de Hibridização, Solução de Desnaturação, Conjugado AS-HRP e Substrato (TMB) do refrigerador para que estes adquirissem a temperatura ambiente. Preparar o Tampão de Lavagem através da adição de 100 mL do Tampão de lavagem 10X com 900 mL de água deionizada.
2. Remover o ensaio do controle de validação do refrigerador e colocá-lo no gelo.
3. Remover do refrigerador, um número apropriado de fitas para as amostras e uma fita controle e colocá-las na microplaca.
4. Realizar a lavagem das fitas através do programa de lavagem automática da lavadora *Bio-Rad Model 1575 Immunowash*;
5. Enquanto a microplaca é lavada, preparar os produtos da reação de PCR e o ensaio do controle de validação para deteção da reação.
6. Em um tubo separado de 0,5 mL, colocar 5  $\mu$ L do produto de reação de PCR, 20  $\mu$ L de água deionizada, e 25  $\mu$ L de solução desnaturante. Agitar no vórtex por 5 segundos. Centrifugar em microcentrífuga por 5 segundos. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
7. Em um tubo separado de 0,5 mL, pipetar 9  $\mu$ L do ensaio de validação controle, 36  $\mu$ L de água deionizada, e 45  $\mu$ L de solução desnaturante. Agitar no vórtex por 5 segundos. Centrifugar em microcentrífuga por 5 segundos. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
8. Pipetar 40  $\mu$ L da Solução de Hibridização em cada poço das amostras e em cada poço da fita controle;
9. Pipetar 10  $\mu$ L do produto de PCR desnaturado dentro de cada poço das amostras;

10. Pipetar 10  $\mu\text{L}$  do ensaio de validação controle dentro dos poços da fita controle;
11. Homogeneizar a Solução de Desnaturação e Solução de Hibridização por agitação manual da placa;
12. Vedar a placa com a fita seladora de placa e incubar a 37° C por uma hora;
13. Depois da hibridização, remover a fita seladora da placa e lavá-la por 5 vezes na lavadora automática;
14. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  do conjugado AS-HRP em cada poço das fitas das amostras e da fita controle. Cobrir a placa com fita de vedação, e incubar por 37° C por 30 minutos.
15. Remover a fita seladora da placa e lavar a placa por 5 vezes na lavadora automática;
16. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  do substrato (TMB) dentro de cada poço da fita das amostras e da fita controle. Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos. Os poços com a reação positiva ficarão azuis. Os poços sem reação ficarão menos coloridos.
17. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  da “solução de parada” dentro de cada poço. A cor mudará de azul para amarelo.
18. Imediatamente, transferir a placa para o leitor de microplaca, onde se lerá as amostras na absorbância de 450 nm, utilizando 665 nm como comprimento de onda.

### *Interpretação*

Análises dos dados: Para análise dos dados é necessário calcular a razão do valor de  $A_{450-455}$  para os alelos normais (N) divididos pelo valor de  $A_{450-655}$  dos alelos mutantes (M).

Ensaio de Validação: Para o ensaio de validação ser válido, é necessário verificar se ambos controle e amostra do paciente tem valores dentro de determinada faixa.

1. Para controles, os valores devem ser:

Média do controle de linha de base :  $A_{450-655} \leq 0.1$

Média do Controle background :  $A_{450-655} \leq 0.1$

Média do Controle de detecção de hibridização :  $A_{450-655} \geq 0.8$

Média do Controle de detecção:  $A_{450-655} \geq 0.8$

2. Para a amostra paciente:

Os valores  $A_{450-655}$  para cada alelo normal e mutante devem ser  $\leq 3,0$ .

A soma dos valores de  $A_{450-655}$  para alelo normal e para o alelo mutante devem ser  $\geq 0,6$ .

3. Para uma amostra de paciente o valor N/M calculado deve cair numa dessas 3 especificações a seguir:

- $N/M \geq 8$

- $N/M \leq 0.125$

-N/M dentro da linha 0,3-3

4. Interpretação dos Resultados

-Valores  $\geq 8$ , são indicativos de genótipo normal;

-Valores  $\leq 0.125$ , são indicativos de genótipo mutante homozigoto;

-Valores entre 0.3 a 3, são indicativos do genótipo heterozigoto.

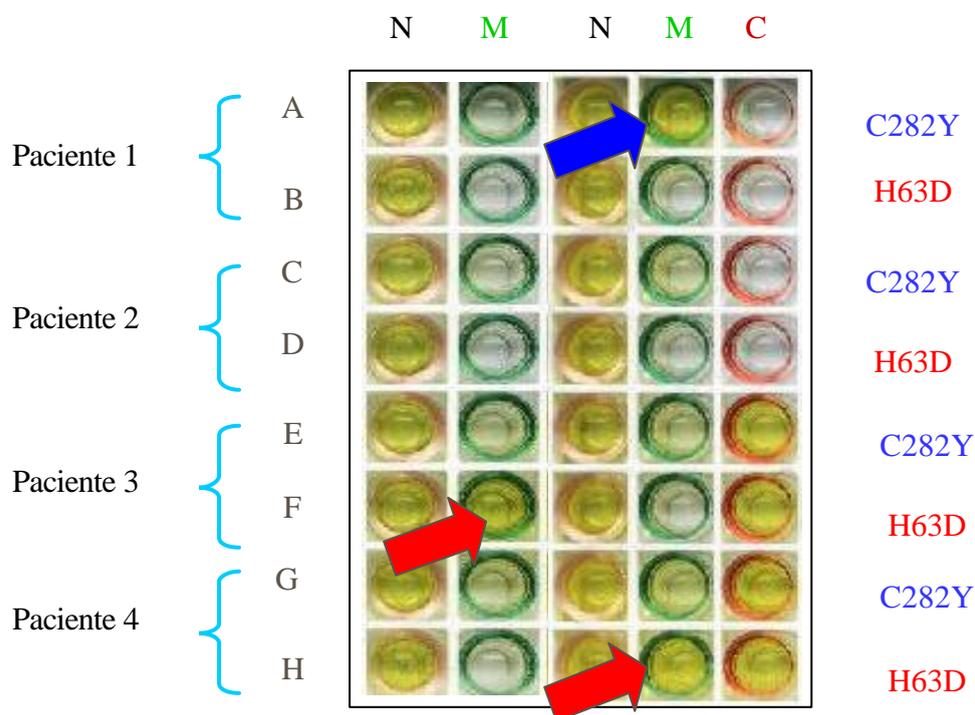


Figura 20: Esquematização da placa de PCR-ASO onde são visualizados três indivíduos portadores de mutações. As flechas vermelhas indicam indivíduos portadores da mutação H63D e a flecha azul indica indivíduo portador da mutação C282Y.

### III.3.5. Análise Estatística

Utilizamos em nosso estudo o programa Excel 2000, da Microsoft Corporation e o programa Statdisk, Triola, M. F., 1998, para análise estatística dos dados.

A análise de estatística descritiva dos dados foi realizada através do programa Excel, onde se obteve a média, mediana, o desvio-padrão, mínimo e máximo dos dados hematimétricos e da quantificação de Hb A<sub>2</sub> e F pelos métodos clássicos e HPLC.

Os cálculos relacionados a coeficiente de variação e Qui-quadrado foram realizados através da fórmula padrão com a utilização da calculadora Casio *Fx-82*. O coeficiente de variação indica a dispersão dos dados

em relação à média e foi utilizado para análise estatística dos valores hematimétricos. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para verificar o nível de significância dos dados obtidos pelas metodologias clássicas.

O teste de hipótese de média e a análise de regressão linear foram realizados através do Statdisk. O teste de hipótese de média foi utilizado para análise estatística dos valores hematimétricos e para os valores de quantificação de Hb A<sub>2</sub> e Hb F, para as três metodologias de quantificação. A análise de regressão linear foi utilizada para análise estatística dos resultados obtidos pelas metodologias clássicas e HPLC, para quantificação das Hb A<sub>2</sub> e Hb F.



## ***IV. Resultados***

#### IV. 1. Amostra

As amostras para compor o presente estudo foram encaminhadas no período de fevereiro de 2001 a outubro de 2002, de indivíduos de ambos os sexos, idade variando de 05 meses a 84 anos e, apesar da solicitação da indicação da etnia, esta informação nem sempre foi precisa, ou preenchida no formulário, sendo, nos casos informados a maior frequência de caucasianos.

O formulário de solicitação de amostra (anexo 1) apresentou campos para preenchimento de informações sobre identificação, como nome, idade, sexo, origem étnica, médico responsável, valores hematológicos e história ou indicação clínica, além dos testes que seriam aplicados e foi preenchido após orientação sobre o estudo e concordância de participação em termo apropriado (anexo 2), segundo aprovação no CONEP processo nº 25000.122494/2001-01 (anexo 3).

As amostras foram colhidas de sangue venoso e acondicionadas em tubos estéreis contendo EDTA 5% como anticoagulante, anexadas aos formulários citados no parágrafo acima e enviadas ao LHGDH em caixas de isopor com gelo reciclável. Após a chegada ao laboratório, foram identificadas e codificadas, preservando a identidade dos participantes.

A equipe de apoio nos diferentes estados da União foi composta de enfermeiros, assistentes sociais e médicos, previamente treinados por nossa equipe e colaboradores do LHGDH, para que as informações sobre a inclusão na pesquisa e as orientações sobre os resultados fossem fornecidos igualmente e com o mesmo nível de segurança em todas as localidades.

Os critérios de inclusão das amostras do presente estudo foram indicação clínica de talassemias e/ou casos familiares de talassemia do tipo beta. Dessa forma, foram avaliadas 332 amostras de sangue de indivíduos de 30 localidades diferentes.

As amostras foram provenientes de diferentes regiões brasileiras sendo a maior proveniência da região sudeste seguida das regiões Nordeste, Sul e Centro-Oeste.

O estado de São Paulo colaborou com 26,50% das amostras encaminhadas ao LHGDH, seguido do Sergipe (25,60%), Espírito Santo (20,48%), Rio de Janeiro (15,36%), Rio Grande do Sul (5,42%), Bahia e Mato Grosso do Sul (2,10%), Mato Grosso (0,90%), Goiás (0,60%) e Rio Grande do Norte (0,30%). Esses dados podem ser melhor visualizados na figura 18.

As cidades que mais encaminharam amostras foram Aracaju (25,60%), Nova Friburgo e Vitória (14,75%). O quadro 1 mostra a relação das cidades de onde as amostras foram enviadas, seus estados e respectivas regiões.

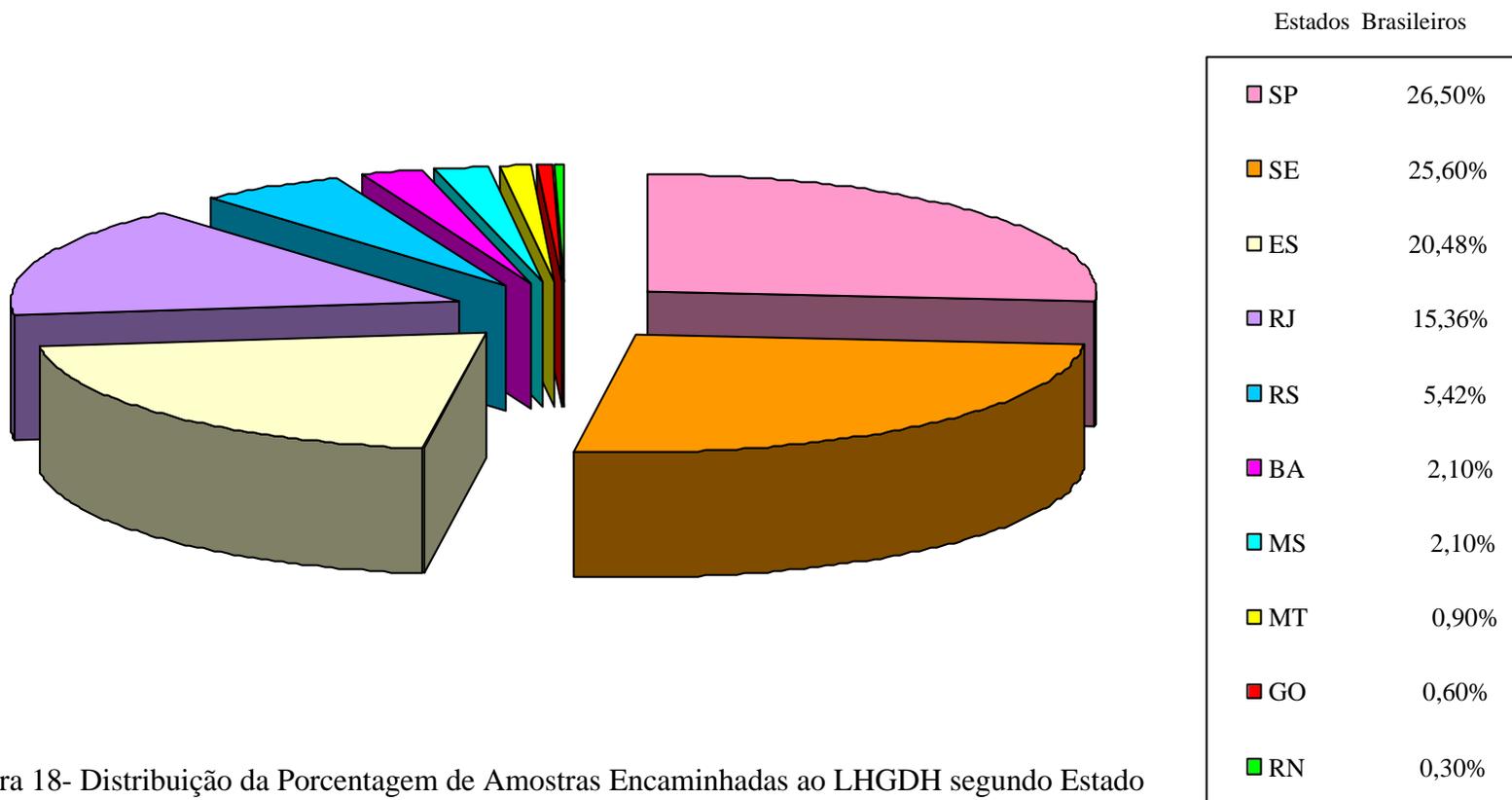


Figura 18- Distribuição da Porcentagem de Amostras Encaminhadas ao LHGDH segundo Estado Brasileiro.

Quadro 1 – Distribuição da amostras de acordo com cidade, estado e região.

<i>Cidade</i>	<i>%</i>	<i>Estado</i>	<i>%</i>	<i>Região</i>	<i>%</i>
<i>Piracicaba</i>	<i>12,65</i>	<i>SP</i>	<i>26,50</i>	<i>Sudeste</i>	<i>62,34</i>
<i>São José do Rio Preto</i>	<i>9,03</i>				
<i>São Carlos</i>	<i>2,10</i>				
<i>Fernandópolis</i>	<i>0,60</i>				
<i>Presidente Venceslau</i>	<i>0,60</i>				
<i>Marília</i>	<i>0,60</i>				
<i>Ribeirão Preto</i>	<i>0,30</i>				
<i>Vitória</i>	<i>14,75</i>	<i>ES</i>	<i>20,48</i>		
<i>Serra</i>	<i>5,72</i>				
<i>Nova Friburgo</i>	<i>14,75</i>	<i>RJ</i>	<i>15,36</i>		
<i>Aracaju</i>	<i>25,60</i>	<i>SE</i>	<i>25,60</i>	<i>Nordeste</i>	<i>28,01</i>
<i>Salvador</i>	<i>2,10</i>	<i>BA</i>	<i>2,10</i>		
<i>Santa Maria</i>	<i>3,61</i>	<i>RS</i>	<i>5,42</i>	<i>Sul</i>	<i>5,42</i>
<i>Porto Alegre</i>	<i>1,80</i>				
<i>Caxias do Sul</i>	<i>0,30</i>				
<i>Campo Grande</i>	<i>2,10</i>	<i>MS</i>	<i>2,10</i>	<i>Centro-Oeste</i>	<i>3,61</i>
<i>Cuiabá</i>	<i>0,90</i>	<i>MT</i>	<i>0,90</i>		
<i>Rio Verde</i>	<i>0,60</i>	<i>GO</i>	<i>0,60</i>		

## IV.2. Parâmetros Hematológicos

Segundo os critérios de inclusão propostos e a combinação dos resultados laboratoriais obtidos, foram separados para avaliação dos resultados globais três grupos identificados por:

-Grupo Controle (AA) – sem sinais ou sintomas de anemia, valores hematológicos normais e perfil laboratorial de hemoglobinas AA (n = 70);

-Grupo Talassemia Beta Heterozigota (BTH) – com sinais e sintomas de anemia, valores hematológicos e perfil laboratorial desta forma de hemoglobinopatia (n = 145);

-Grupo Talassemia Alfa/Beta (ABT) – com sinais e sintomas de anemia, valores hematológicos e perfil laboratorial desta forma de hemoglobinopatia (n = 117).

Os valores hematológicos de cada grupo foram obtidos nos locais de origem por equipamentos automatizados específicos para avaliação hematológica e estão agrupados nos anexos 4, 5 e 6.

Observou-se que a média dos valores de glóbulos vermelhos foi maior no grupo ABT. Os valores de hemoglobina foram menores no grupo de BTH e os de hematócrito no grupo BTH.

A análise estatística descritiva por coeficiente de variação mostrou que o grupo de BTH foi o que menos dispersou em relação à média nos seguintes índices hematológicos GV, Hb, HT, HCM e CHCM. O grupo AA apresentou menor coeficiente de variação nos índices VCM, CHCM. Estes valores estão agrupados na tabela 2.

Os índices hematimétricos, VCM, HCM apresentaram médias menores no grupo BTH e média de CHCM menor no grupo ABT.

As médias percentuais observadas nos reticulócitos foram: para o grupo AA, 1,64%; para BTH, 1,64% e para ABT, 1,56%.

A tabela 1 ilustra as médias e desvio padrão de cada um dos parâmetros hematológicos obtidos nos três grupos de estudo, e a tabela 2 os valores do coeficiente de variação de cada analito para a análise estatística.

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos índices hematológicos encontrados nos três grupos analisados.

Fenótipo	GV ( $10^6/\text{mm}^3$ ) X $\pm$ SD	Hb (g) X $\pm$ SD	HT (%) X $\pm$ SD	VCM ( $\mu\text{m}^3$ ou ft) X $\pm$ SD	HCM ( $\mu\text{m}$ ou pg) X $\pm$ SD	CHCM (g/dl ou %) X $\pm$ SD	Ret. (%) X $\pm$ SD
AA (n = 70)	4,37 $\pm$ 0,69	12,08 $\pm$ 2,16	36,80 $\pm$ 5,98	84,70 $\pm$ 9,49	27,79 $\pm$ 3,84	32,72 $\pm$ 1,42	1,64 $\pm$ 0,66
BTH (n = 145)	4,97 $\pm$ 0,55	11,05 $\pm$ 1,27	37,27 $\pm$ 4,22	75,36 $\pm$ 9,03	22,34 $\pm$ 2,64	29,84 $\pm$ 3,63	1,64 $\pm$ 0,86
ABT (n = 117)	5,17 $\pm$ 0,65	11,52 $\pm$ 1,44	41,02 $\pm$ 5,64	78,15 $\pm$ 12,24	22,91 $\pm$ 5,61	28,80 $\pm$ 5,03	1,56 $\pm$ 1,64

Tabela 2 – Coeficiente de variação dos índices hematológicos e de reticulócitos encontrados nos três grupos analisados.

Fenótipo	GV ( $10^6/\text{mm}^3$ ) C.V.*	Hb (g) C.V.	HT (%) C.V.	VCM ( $\mu\text{m}^3$ ou ft) C.V.	HCM ( $\mu\text{m}$ ou pg) C.V.	CHCM (g/dl ou %) C.V.	Ret.* (%) C.V.
AA (n = 70)	15,78	17,88	16,25	11,20	13,81	4,33	40,24
BTH (n = 145)	11,24	11,4	11,28	11,95	11,93	12,14	52,43
ABT (n = 117)	12,57	12,50	13,74	15,66	24,48	17,46	105,12

C.V.: Coeficiente de variação

Ret.: Reticulócitos

### IV.3. Triagem De Hemoglobinopatias

Os anexos 7, 8, e 9 detalham os resultados laboratoriais obtidos em cada uma das amostras do diferentes grupos avaliados.

Para os testes de triagem, observou-se que na resistência globular osmótica, os grupos BTH e ABT apresentaram respectivamente, positividade em 66,89% (97) e 57,26% (67) das amostras; o grupo AA, apresentou 92,85% (65) de negatividade para este teste. Os resultados comparativos dos três grupos avaliados estão representados na tabela 3 e podem ser visualizados na figura 22.

Tabela 3 – Resultados globais da análise da resistência globular osmótica em solução NaCl 0,36% nos grupos estudados.

Fenótipo	Positivo	Negativo
AA (n = 70)	05 (7,14%)	65 (92,85%)
BTH (n = 145)	97 (66,89%)	48 (33,10%)
ABT (n = 117)	67 (57,26%)	50 (42,70%)

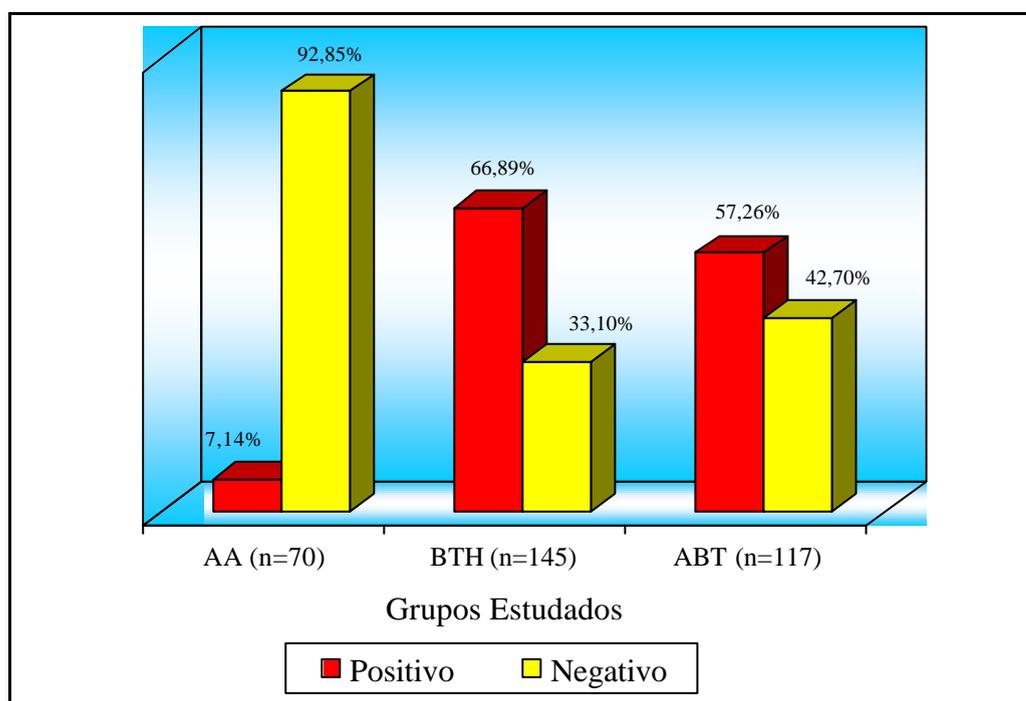


Figura 22: Resultados globais da análise de resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36% nos três grupos estudados.

Na análise da morfologia eritrocitária à fresco, foram observados os seguintes perfis: N, N/+, +, +/++ , ++, ++/+++ e +++ . A análise nos diferentes grupos mostrou que as observações mais frequentes para os grupos: AA, BTH e ABT foram respectivamente, N/+, ++ e +. A tabela 4 e a figura 23 ilustram os resultados obtidos em cada grupo de estudo.

Tabela 4 – Indicação da frequência dos diferentes perfis eritrocitários obtidos pela análise da morfologia eritrocitária à fresco nos diversos fenótipos analisados.

Fenótipo	N	N/+	+	+/++	++	++/+++	+++
AA (n = 70)	04 (5,71%)	40 (57,14%)	19 (27,14%)	04 (5,71%)	02 (2,85%)	01 (1,42%)	0 (0%)
BTH (n = 145)	01 (0,68%)	24 (16,55%)	32 (22,06%)	28 (19,31%)	58 (40%)	01 (0,68%)	01 (0,68%)
ABT (n = 117)	0 (0%)	18 (15,38%)	61 (51,13%)	12 (10,25%)	26 (22,22)	0 (0%)	0 (0%)

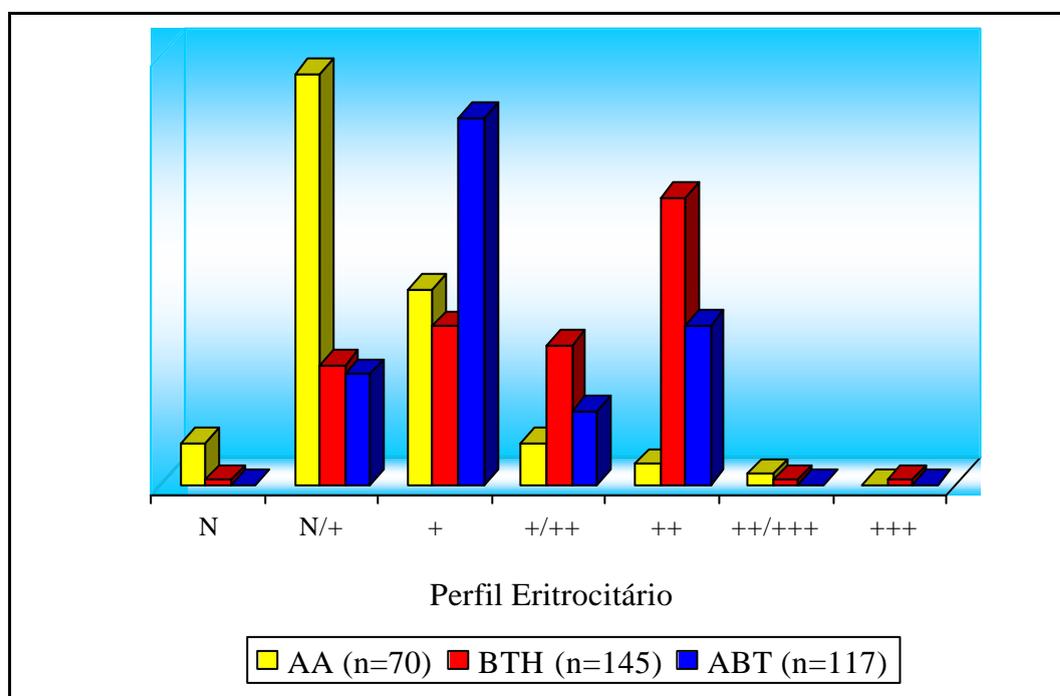


Figura 23: Frequência dos diferentes perfis eritrocitários obtidos pela análise da morfologia eritrocitária à fresco nos diversos fenótipos analisados.

Na eletroforese em acetato de celulose pH alcalino foram observados os seguintes fenótipos de hemoglobinas: AA, AA<sub>2</sub>, AA<sub>2</sub> diminuído, AA<sub>2</sub> F aumentada, AA<sub>2</sub> aumentada F H , AA<sub>2</sub> meta Hb F aumentada, AF, AA diminuído F aumentada, AA<sub>2</sub> H e AH; sendo o mais prevalente no grupo AA, o fenótipo AA, no grupo BTH, o AA<sub>2</sub> aumentado e no grupo ABT, o AA<sub>2</sub> H.

A tabela 5 e a figura 24 mostram a frequência de cada fenótipo de hemoglobinas obtido em cada grupo de estudo.

Tabela 5 – Distribuição da frequência de achados nos diferentes perfis eletroforéticos (\*).

Fenótipo	AA	AF	A↓F↑	AA <sub>2</sub> ↑	A <sub>2</sub> F↑	AA <sub>2</sub> ↓	A <sub>2</sub> metaHb	A <sub>2</sub> ↑FH	AA <sub>2</sub> H	AA <sub>2</sub> ↓H	AH
							H				
AA (n=70)	61	03	-	01	-	03	-	-	-	-	02
BTH (n=145)	16	09	03	74	42	-	01	-	-	-	-
ABT (n=117)	01	-	-	-	-	-	-	52	63	01	-

(\*) ↑:Aumentado

↓: Diminuído

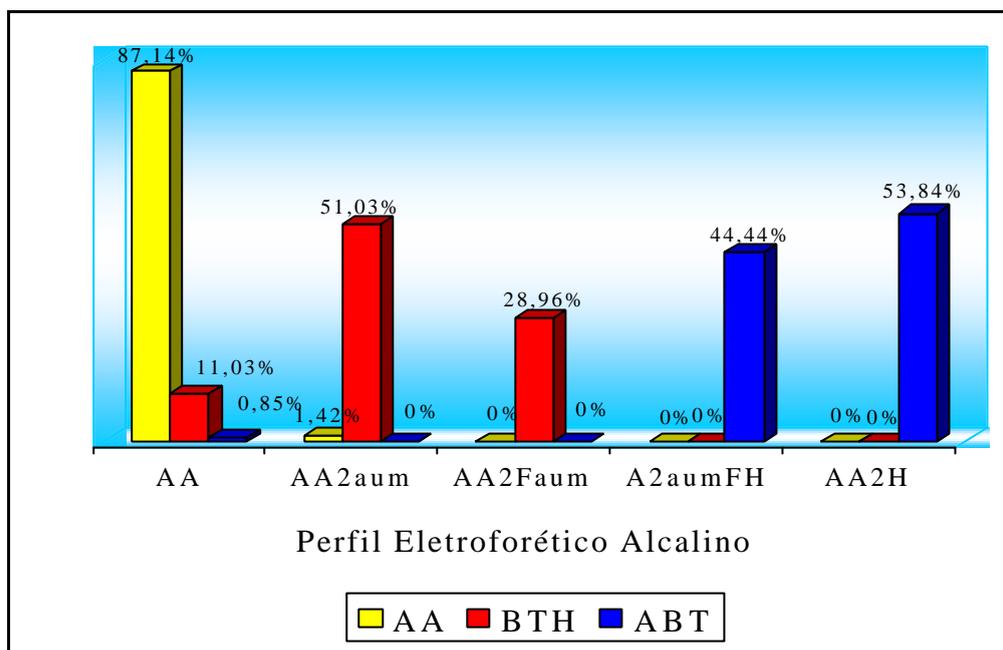


Figura 24: Distribuição da frequência de achados nos diferentes perfis eletroforéticos obtidos por eletroforese em pH alcalino para os três grupos estudados.

A eletroforese em gel de ágar pH ácido utilizada como alternativa para diferenciação de hemoglobinas com migração similar em procedimentos eletroforéticos em pH alcalino foi realizada para confirmação dos conteúdos majoritários de hemoglobinas e avaliação semi-quantitativa de hemoglobina fetal. Os fenótipos observados nas amostras analisadas foram Hb AA e Hb AF, sendo que no grupo AA, o fenótipo mais freqüente foi AA enquanto que nos grupos BTH e ABT foram AF e AA, respectivamente. A tabela 6 e a figura 25 mostram a distribuição dos fenótipos nos grupos avaliados.

Tabela 6 – Resultados obtidos por eletroforese ácida pH 6,2 nos diferentes fenótipos.

Fenótipo	AA	AF
AA (n = 70)	66	04
BTH (n = 145)	53	92
ABT (n = 117)	63	54

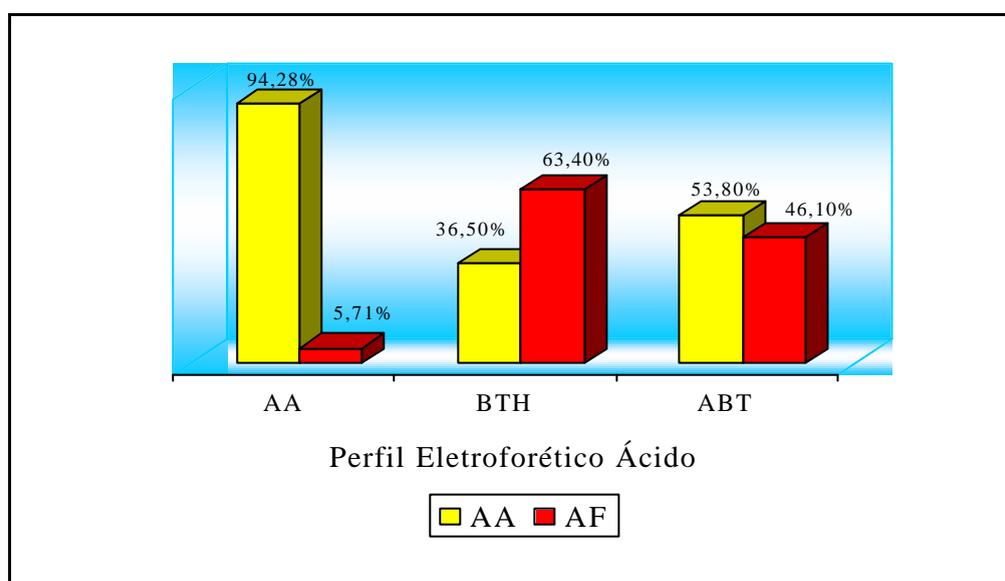


Figura 25: Distribuição da frequência de achados nos diferentes perfis eletroforéticos obtidos por eletroforese em pH ácido para os três grupos estudados.

A tabela 7 mostra as médias e desvios padrões dos valores de Hb A<sub>2</sub> e Hb F obtidos por eluição, desnaturação alcalina (Betcke) e HPLC nos três grupos estudados.

Tabela 7 - Valores da Média e Desvio Padrão da Quantificação da Hb A<sub>2</sub> e Hb F pelas diversas metodologias utilizadas.

Fenótipo	%A <sub>2</sub> (Eluição)	%F (Betcke)	%A <sub>2</sub> (HPLC)	%F (HPLC)
	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD
AA (n = 70)	2,69 ± 0,39	0,36 ± 0,37	0,36 ± 0,37	2,69 ± 0,39
BTH (n = 145)	4,71 ± 1,00	1,57 ± 1,45	5,05 ± 1,08	1,74 ± 1,40
ABT (n = 117)	4,66 ± 0,83	1,21 ± 1,84	5,04 ± 0,89	1,47 ± 2,08

Os valores apresentados na tabela 7 são melhor visualizados nas figuras abaixo.

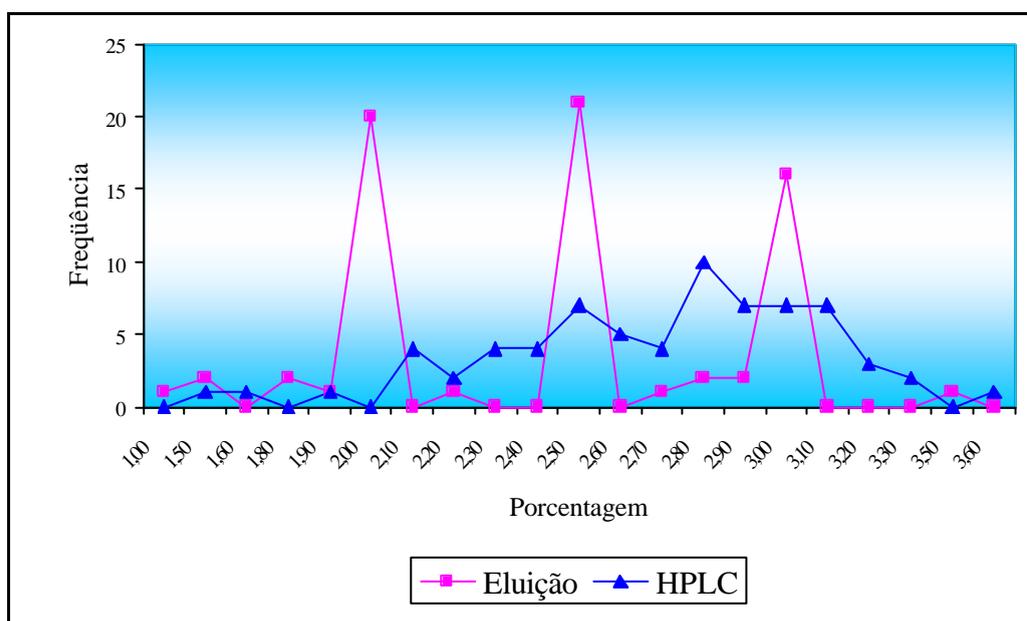


Figura 26: Distribuição da frequência de porcentagem de Hemoglobina A<sub>2</sub> quantificada pelas metodologias de Eluição e HPLC no grupo AA.

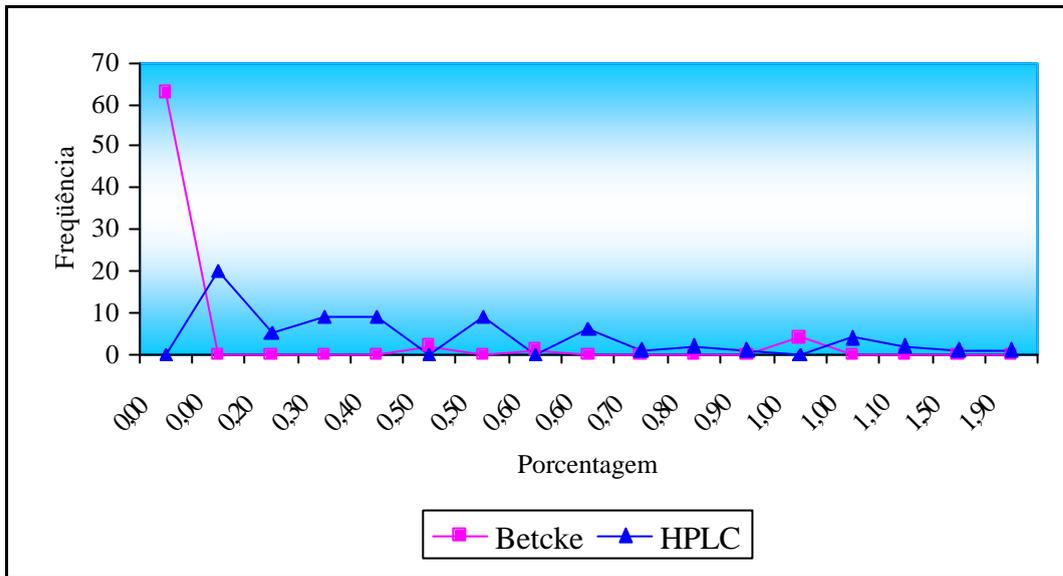


Figura 27: Distribuição da frequência de porcentagem de Hb F quantificada pelas metodologias de Betcke e HPLC no grupo AA.

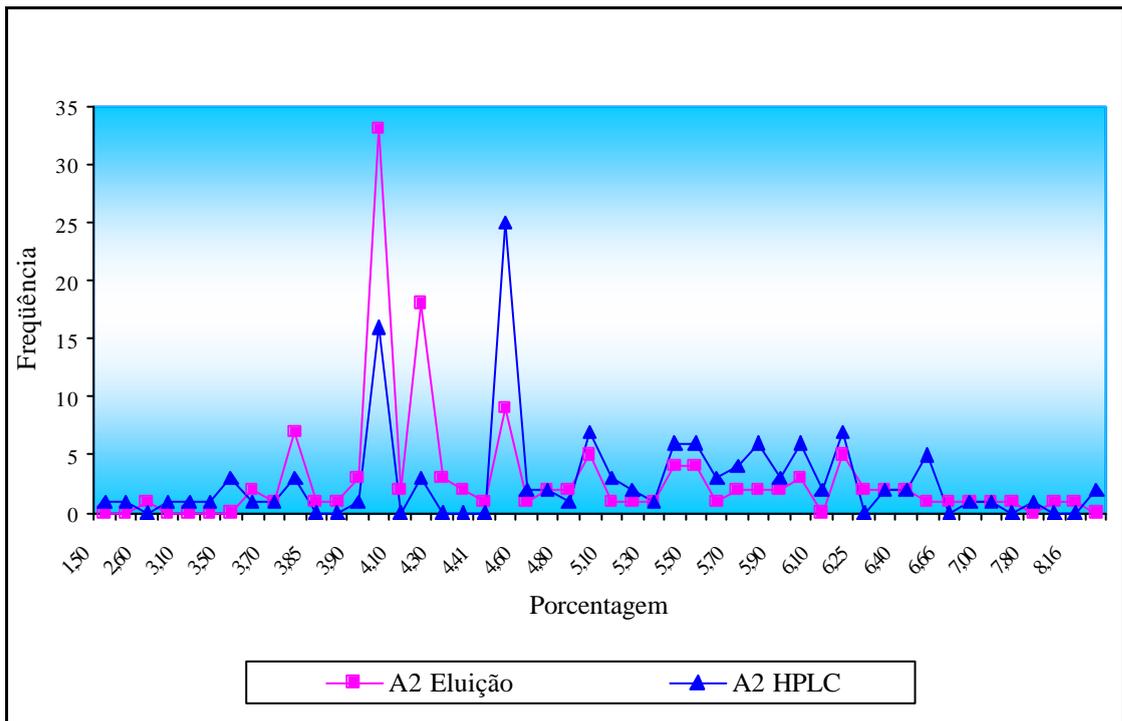


Figura 28: Distribuição da frequência de porcentagem de Hemoglobina A<sub>2</sub> quantificada pelas metodologias de Eluição e HPLC no grupo BTH.

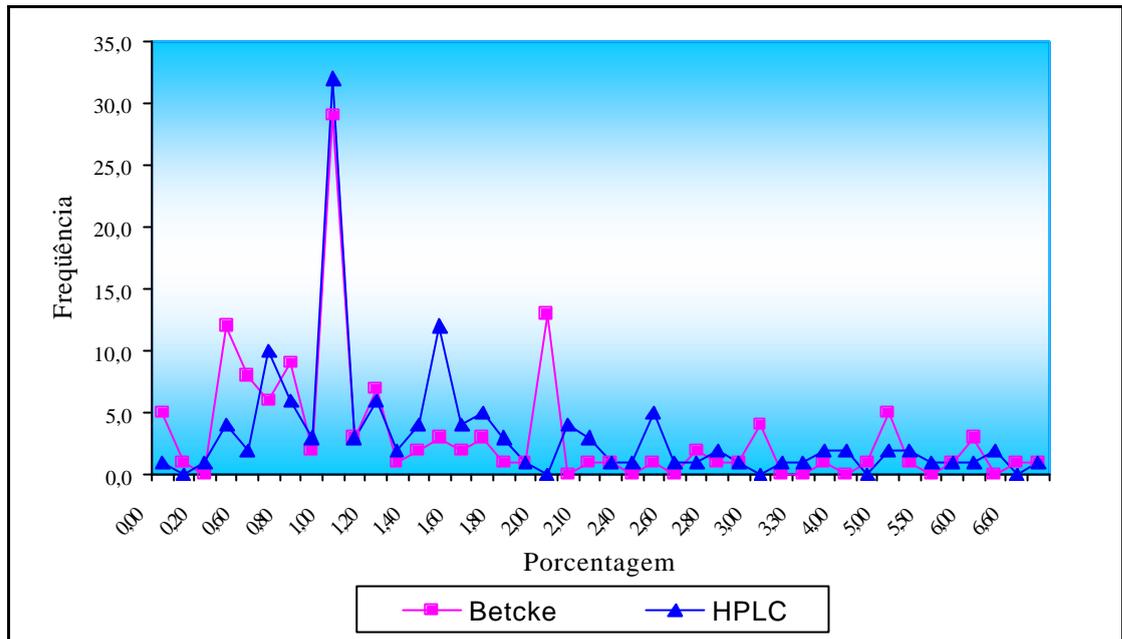


Figura 29: Distribuição da frequência de porcentagem de Hb F quantificada pelas metodologias Betcke e HPLC no grupo BTH.

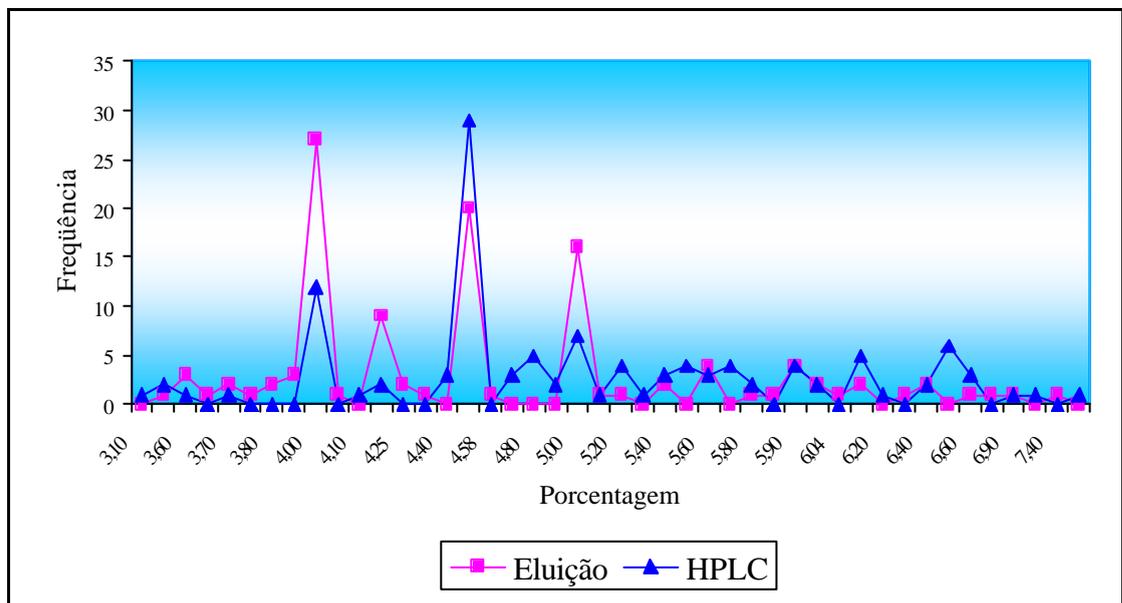


Figura 30: Distribuição da frequência de porcentagem de Hemoglobina A<sub>2</sub> quantificada pelas metodologias de Eluição e HPLC no grupo ABT.

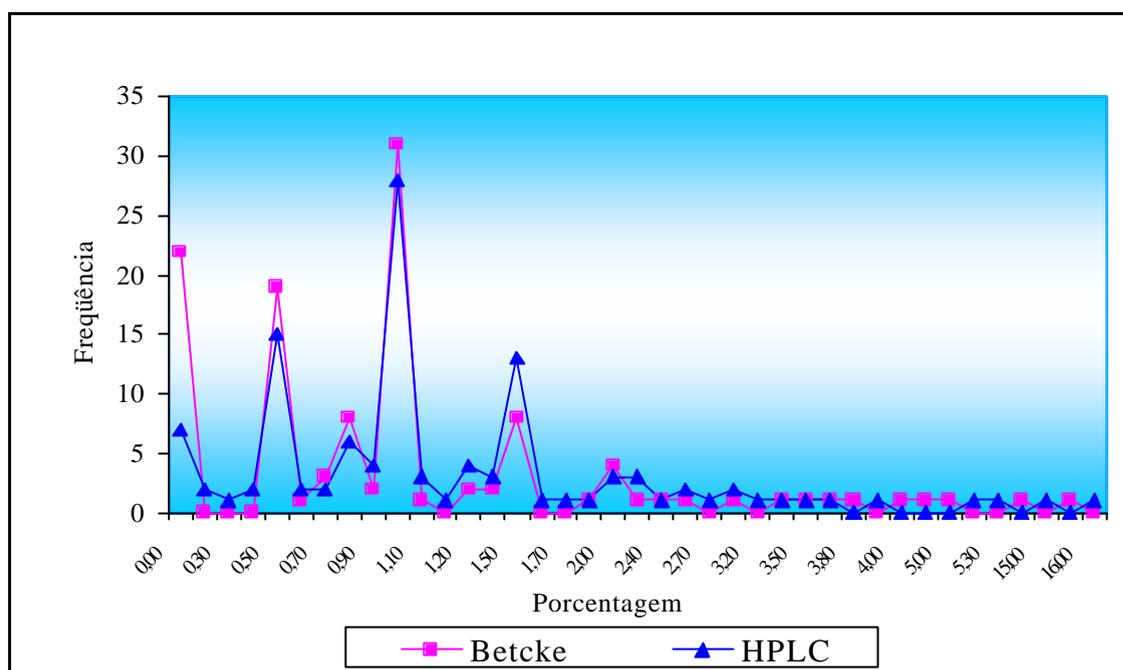


Figura 31: Distribuição da frequência de porcentagem da Hb F quantificada pelas metodologias de Betcke e HPLC no grupo ABT.

Nos casos de interação com alfa talassemia, testes laboratoriais específicos foram realizados como a eletroforese em pH neutro, que evidencia a migração da fração de Hb H, característica dessa hemoglobinopatia, e a pesquisa de corpos de inclusão de Hb H nos eritrócitos. Observou-se valores médios de 1,21% Hb H no grupo de ABT.

Os achados laboratoriais sugestivos de alfa talassemia por outros procedimentos não foram considerados, tendo em vista que, para segurança nos laudos, são considerados portadores dessa afecção genética somente os casos em que todos os procedimentos laboratoriais são positivos.

#### IV.4. Avaliação Molecular

Para avaliação molecular, os procedimentos de análise realizados foram: extração pelos kits *mD<sub>x</sub><sup>tm</sup> InstaGene Whole Blood BIO-RAD* e *mD<sub>x</sub><sup>tm</sup> InstaGene Genomic BIO-RAD*, extração rápida de DNA com uso de CTAB e DTAB e extração pelo método Fenol/Clorofórmio.

A análise molecular para identificação da hemocromatose hereditária rastreou a presença dos mutantes C282Y e H63D. Foram avaliadas 109 amostras, sendo 91 de BTH e 18 ABT, que apresentaram condições ideais de análise. No grupo BTH, das 17 amostras que apresentaram mutações, 11,76% foram heterozigotos para C282Y; 70,58% foram heterozigotos para H63D; 5,88%, duplo heterozigoto C282Y/H63D e 11,76%, homozigotos para H63D.

Para o grupo ABT, dentre as 4 amostras que apresentaram mutações, 25% eram heterozigotos para C282Y e 75% heterozigotos para H63D.

Os dados gerais obtidos estão relacionados na tabela 8, visualizados na figura 32 com detalhes individuais nos anexos 10 e 11.

Tabela 8 – Frequência dos mutantes C282Y e H63D para HH nos grupos com fenótipos BTH e ABT.

Fenótipo	C282Y	H63D
BTH	11,76%	70,58%
ABT	25%	75%

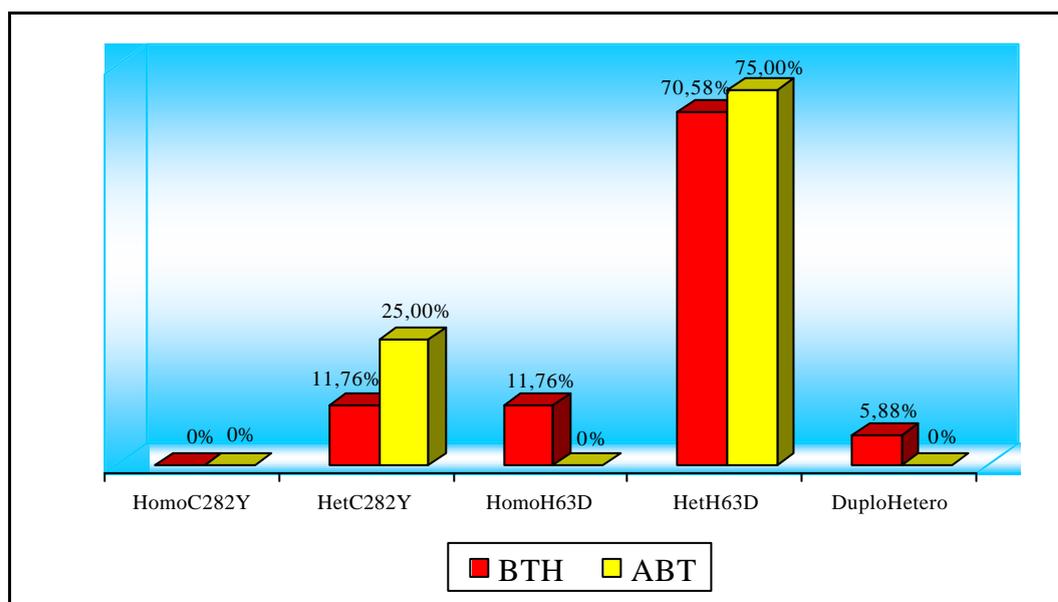


Figura 32: Distribuição da frequência de mutações para Hemocromatose Hereditária encontrada nos grupos BTH e ABT.

Apesar dos cuidados na obtenção das amostras de DNA, alguns resultados de hibridização não foram conclusivos, provavelmente decorrentes de limitações técnicas e foram excluídos da análise.



## *V. Discussão*

As talassemias são os distúrbios genéticos mais comuns resultantes de uma ampla variedade de diferentes mutações. Essas mutações afetam os genes da globina alfa e/ou beta ocasionando um desequilíbrio na produção da cadeia globínica afetada. Atualmente, as talassemias, as quais são originárias dos povos mediterrâneos, podem ser encontradas em todos os continentes estimando cerca de 100.000 pacientes afetados em todo o mundo (Thalassaemia International Federation, 2000).

As talassemias são divididas em dois grupos: talassemia do tipo beta e talassemia do tipo alfa. Na talassemia do tipo beta, a cadeia afetada é a da globina  $\beta$ , e na talassemia alfa a cadeia afetada é da globina  $\alpha$ . O desequilíbrio na síntese de produção dessas cadeias é o fator principal na determinação da severidade deste tipo de anemia, que varia desde ausência de sinais clínicos até anemia grave com dependência de transfusão sanguínea (Thein et al., 1990).

Dois componentes clinicamente importantes para o diagnóstico e acompanhamento da talassemia beta são as concentrações de Hb A<sub>2</sub> e Hb F, cujos ensaios para suas quantificações evoluíram nos últimos anos, tornando-os mais precisos e rápidos (Cotton et al., 1999). Para um direcionamento clínico e aconselhamento genético faz-se necessário a correta determinação dos parâmetros para talassemia beta, devido a combinação dos diferentes genótipos de hemoglobinas influenciarem o fenótipo, como no caso da talassemia beta intermédia (Huisman, 1997).

Em virtude do Brasil ser um país altamente miscigenado, apresentando intensa heterogeneidade genética torna-se necessária a identificação de portadores de talassemia beta com possível co-herança de hemocromatose. Através dessa premissa, o presente trabalho foi desenvolvido.

A amostragem de sangue foi proveniente de diferentes regiões brasileiras, com prevalência da região sudeste, seguida das regiões nordeste, sul e centro-oeste, no encaminhamento das amostras com suspeita de talassemia beta.

A prevalência da região Sudeste no encaminhamento das amostras para confirmação diagnóstica, provavelmente está relacionada a uma maior facilidade no envio das amostras ao LHGDH – IBILCE – UNESP, embora seja a região mais avançada em termos diagnósticos. Outro fato reside na formação da população devido à movimentos migratórios, resultando em uma maior variabilidade genética e, portanto, na maior presença das hemoglobinopatias.

Nenhuma amostra da região norte foi encaminhada ao LHGDH com suspeita de talassemia beta e apenas 07 amostras foram enviadas pela região Centro-Oeste. Este fato deve-se à dificuldade de envio das amostras em virtude da grande distância dessas cidades com relação ao nosso laboratório.

Um outro viés encontrado no presente trabalho diz respeito ao preenchimento do formulário de identificação do paciente. Apesar das equipes de apoio estarem cientes da necessidade do correto preenchimento do formulário, alguns dados não foram relatados, apresentando ausência de informações como idade, etnia e sexo.

A idade é um fator importante visto que há diferenças significativas na concentração de hemoglobina com relação à idade, principalmente em crianças e idosos. Ao nascimento, a criança apresenta concentração de hemoglobina por volta de 18 a 20g/dL de sangue. Com um ano de idade, a concentração de hemoglobina situa-se entre 10 a 11 g/dL e aumenta gradativamente de 12 a 13g/dL dos três aos sete anos; por volta dos 13 anos, atinge valores característicos do indivíduo adulto, porém, essa concentração difere em relação ao sexo.

No caso onde não havia referência com relação ao sexo, a identificação sexual foi realizada através no nome do paciente. Essa diferenciação é importante pois os homens apresentam maior concentração de hemoglobina que as mulheres em virtude da ação dos hormônios androgênicos. Esse quadro iniciado na adolescência, permanece até os 55 anos, quando as taxas hormonais androgênicas diminuem e a concentração de hemoglobina nos homens iguala-se à das mulheres.

A classificação da população com relação à etnia não foi realizada devido a dificuldade quanto à classificação em grupos étnicos em virtude da extrema miscigenação observada em nosso país e somente características como cor da pele e textura do cabelo não são suficientes para estratificação étnica (Cabral, 2000).

Com relação à seleção das amostras, esta foi realizada de acordo com a indicação clínica de talassemias e/ou casos familiares de talassemia do tipo beta e separadas em três grupos distintos: grupo controle (AA), grupo talassemia beta heterozigota (BTH) e talassemia alfa/beta (ABT), confirmados pelos procedimentos laboratoriais.

Os valores hematológicos de cada grupo foram obtidos nos locais de origem por equipamentos automatizados específicos para a avaliação hematológica e não oferecem viés ao estudo pois as equipes laboratoriais foram treinadas por nosso laboratório para calibrarem corretamente seus equipamentos.

De acordo com os valores hematológicos, os três grupos apresentaram média de GV e HT dentro dos valores normais. Isto ocorre devido à produção aumentada dos glóbulos vermelhos ser um mecanismo compensatório nos casos de talassemia beta. As taxas de hemoglobina para os grupos BTH e ABT estavam abaixo do normal, corroborando os dados da literatura (Rapaport, 1987; Naoum, 1997). Entretanto, a análise estatística realizada através do teste de hipótese da média com intervalo de confiança 0,99%, mostrou que apenas o valor de Hb não serve como um parâmetro de identificação de indivíduos portadores de talassemia alfa/beta.

Os índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM estavam abaixo do valor normal para os grupos BTH e ABT, em virtude dos pacientes talassêmicos apresentarem células microcíticas e hipocrômicas. A aplicação do teste de hipótese da média com intervalo de confiança 0,99% para os índices GV, Hb, HT, VCM, HCM, CHCM, mostrou que apenas o valor de HT não é um bom parâmetro de identificação de indivíduos portadores de talassemia beta.

Segundo Bertuzzo et al. (1997), um valor alto de HCM e de Hb A<sub>2</sub> pode ser indicativo de mutações brandas de talassemia beta como no caso de

heterozigotos para  $\beta$  IVSI-nt 6 quando comparados aos heterozigotos para as mutações  $\beta^{039}$  e  $\beta$  IVSI-nt 1. Os níveis de Hb e VCM também podem apresentar-se elevados nos heterozigotos para  $\beta$  IVSI-nt 6. Uma perspectiva futura para a identificação de mutantes de talassemia beta é a detecção por PCR em tempo real, onde sondas de hibridização marcadas por fluoróforos são utilizadas permitindo a rápida identificação dos mutantes (Moreno et al., 2002).

Em determinados casos clínicos, como a anemia ferropriva, os índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM apresentam-se inferior ao valor de referência e o esfregaço sangüíneo apresenta células microcíticas e hipocrômicas, podendo resultar num diagnóstico falso-positivo para talassemia beta. Nesse caso, faz-se necessário a realização de exames específicos como de dosagem de ferritina, transferrina e receptor de transferrina para diferenciação de anemia ferropriva da talassemia beta heterozigota (Rapaport, 1987; Lima & Grotto, 2002).

Um outro parâmetro de grande importância é a contagem de reticulócitos pois este reflete a produção eritrocitária medular. Valores elevados indicam eritropoiese aumentada, situação que ocorre no terceiro ou quarto dia após hemorragias agudas, em hemorragias crônicas e nas hemoglobinopatias (Miale, 1977; Pires-Nascimento, 2003). A média percentual de reticulócitos nos três grupos analisados situou-se dentro dos valores normais porém, a análise por coeficiente de variação mostrou que os grupos BTH e ABT dispersaram muito em relação a média. Esta variação pode ter ocorrido em virtude da contagem manual apresentar resultados imprecisos.

Com relação ao testes clássicos de triagem, a resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36%, através da análise estatística por Qui-Quadrado, demonstrou ser um teste seletivo para talassemia beta heterozigota, pois os eritrócitos apresentam um aumento da mesma devido à reduzida hemoglobinizacão. Para o grupo BTH, a positividade encontrada foi 66,89% e 57,26% para o grupo ABT. A literatura relata 97% de positividade nos casos de talassemia beta heterozigota (Silvestroni & Bianco, 1975), valor não observado para nossas amostras. Este fato pode ter ocorrido devido a interferentes na forma e tempo de coleta, cuidado no armazenamento e envio das amostras

para a nossa unidade, além dos componentes genéticos diversos dos estudos anteriormente realizados.

A análise da morfologia eritrocitária nos grupos BTH e ABT apresentou alterações significativas na forma (anisocitose), tamanho (microcitose) e coloração (hipocromia) das células. No grupo BTH, encontramos maior alteração das células (++) quando comparados ao grupo ABT (+). Essa diferença pode ser explicada em virtude da associação das duas condições patológicas (alfa/beta talassemia) apresentarem um mecanismo compensatório devido a síntese ineficiente dos dois tipos de globinas, ocasionando um fenótipo morfológico menos acentuado do que o apresentado pelo grupo BTH. A análise estatística por Qui-Quadrado mostrou que essas alterações morfológicas são significantes para os três grupos analisados.

A eletroforese em pH alcalino foi utilizada para avaliação das frações de Hb A<sub>2</sub> e Hb F que apresentam-se em concentrações elevadas nos casos de talassemia beta. Esta metodologia foi utilizada em razão da facilidade de execução, baixo custo e por ser a metodologia mais difundida. O aumento da concentração da Hb A<sub>2</sub> pode estar influenciado por associação com outros defeitos globínicos, deficiência de ferro e processos infecciosos diversos (Cotton et al., 1999). A concentração elevada de Hb F pode ser resultante de defeitos genéticos ou fatores ambientais como indução por drogas. Entretanto, a co-migração de diferentes tipos de hemoglobinas dificultando a identificação das mesmas e a detecção de hemoglobinas rápidas, evidencia a necessidade de associação de diferentes metodologias para um diagnóstico seguro, em especial para as interações entre as formas talassêmicas.

A eletroforese em pH ácido foi realizada para analisar semi-quantitativamente a presença de Hb F. No grupo AA, 03 amostras que não apresentaram presença de Hb F na eletroforese em pH alcalino, apresentaram na eletroforese em pH ácido; no grupo BTH, 35 (24,13%) amostras e no grupo ABT, apenas 06 (5,12%) amostras apresentaram a presença de Hb F na eletroforese em pH ácido. Esta técnica foi realizada pois na eletroforese alcalina, a Hb F migra um pouco abaixo da Hb A, e em alguns casos torna-se difícil a identificação da sua

presença. Na eletroforese em pH ácido, a Hb F migra acima da Hb A, sendo facilmente visualizada e identificada. Esta técnica foi utilizada com a finalidade de comprovar ou não a presença de Hb F, conduta que deveria ser adotada sempre que houver dúvida sobre a presença de Hb F na eletroforese em pH alcalino.

De 332 amostras, apenas 320 foram submetidas a quantificação de Hb A<sub>2</sub> e Hb F pelos respectivos métodos: eluição e desnaturação alcalina, além da quantificação por HPLC.

As técnicas de quantificação de Hb A<sub>2</sub> por eluição e de desnaturação alcalina para quantificação de Hb F, foram realizadas para comparação com os dados obtidos pelo HPLC avaliando a eficácia dos mesmos.

Na quantificação de Hb A<sub>2</sub> por eluição obteve-se as seguintes médias percentuais para os grupos analisados: grupo AA, 2,42%; grupo BTH, 4,71%; e grupo ABT, 4,66%. Por HPLC, as médias percentuais foram 2,69%; 5,05% e 5,04% para os grupos AA, BTH e ABT, respectivamente. A diferença observada entre os resultados obtidos pela técnica clássica de quantificação e por HPLC pode ser explicada devido a algumas variáveis do procedimento como: tempo de eluição da amostra e leitura das densidades ópticas. A análise de regressão linear demonstrou que os valores obtidos através dessas metodologias foram estatisticamente diferentes, com intervalo de confiança de 99%.

Os valores das médias percentuais obtidos através da metodologia de desnaturação alcalina para Hb F nos grupos AA, BTH, ABT foram respectivamente: 0,06%; 1,63% e 1,21%. As médias percentuais obtidas por HPLC foram: 0,36%; 1,74% e 1,47% para AA, BTH e ABT, respectivamente. A diferença observada entre as médias obtidas pelas duas metodologias, pode ser explicada devido à erros com relação ao tempo de realização de cada passo da técnica; concentrações variáveis das soluções e erro na leitura da densidade óptica. A análise de regressão linear com intervalo de confiança de 99% corrobora os valores estatisticamente diferentes obtidos por ambas metodologias.

Zamaro (2002) comparou valores de Hb F obtidos por desnaturação alcalina e HPLC, e observou que os resultados obtidos por HPLC apresentaram valores próximos dos perfis normais obtidos para diferentes

populações e compatíveis com o perfil eletroforético e cromatográfico de cada uma das amostras analisadas. Os resultados obtidos com nosso estudo corroboram estes achados.

Através da análise estatística de regressão linear, evidenciou-se a acurácia do HPLC como metodologia qualitativa e quantitativa das frações da hemoglobina, além da rapidez, facilidade de manuseio, boa reprodutibilidade, sensibilidade e precisão quando comparado com as técnicas convencionais (Tan et al., 1993; Cotton et al., 1999; Eastman et al., 1996; Fucharoen et al., 1990).

A confirmação da presença de Hb H nos casos de interação alfa/beta talassemia foi realizada através da eletroforese em pH neutro e da pesquisa de corpos de inclusão em esfregaço sangüíneo. Este procedimento foi realizado pois através da eletroforese em pH alcalino não é possível confirmar a presença da Hb H, devido à dificuldade de sua identificação, que muitas vezes é confundida com a proteína albumina. Esta conduta deveria ser adotada por laboratórios que realizam análises de hemoglobinopatias, pois são testes específicos para confirmação de talassemia alfa além, de serem rápidos e de baixo custo.

O acúmulo de ferro pode ocasionar a manifestação de várias patologias dentre as quais destacam-se cardiomiopatias, hepatite e carcinoma hepatocelular, além de processos hematológicos (Franco et al., 1998; Calado et al., 2000; Martinelli et al., 2000) que podem influenciar os fenótipos de talassemia beta.

Para a extração do DNA genômico foram realizados vários ensaios para estabelecer qual o melhor procedimento para a obtenção das amostras de DNA, com quantidade e qualidade. Foram utilizadas as seguintes metodologias: extração pelos kits *mD<sub>x</sub><sup>tm</sup> InstaGene Whole Blood BIO-RAD* e *mD<sub>x</sub><sup>tm</sup> InstaGene Genomic BIO-RAD*, extração rápida de DNA com uso de CTAB e DTAB e extração pelo método Fenol/Clorofórmio. Os ensaios realizados através dos *kits* de extração embora rápidos, não permitiram a obtenção de DNA de boa qualidade e quantidade; já os ensaios de extração com uso de CTAB e DTAB e o

método fenol/clorofórmio permitiram a obtenção de DNA de boa qualidade e quantidade para o rastreamento das mutações de HH.

A técnica de extração adotada para nosso estudo foi extração pelo método Fenol/Clorofórmio, com modificações. Utilizou-se este ensaio diminuído dez vezes e obtivemos DNA com qualidade e em boa quantidade além, da redução dos custos com materiais e reagentes.

Após a extração do DNA genômico realizou-se a identificação dos mutantes C282Y e H63D para hemocromatose hereditária em 109 amostras sendo 91 amostras de BTH e 18 amostras de ABT. Essas mutações estudadas são as mais freqüentes em caucasianos europeus.

Dentre as mutações identificadas para o grupo BTH, encontrou-se 11,76% das amostras com perfil heterozigoto para a mutação C282Y. O grupo ABT apresentou 25% das amostras com perfil heterozigoto para a mutação C282Y. Para a mutação H63D, o grupo BTH apresentou 70,58% das amostras heterozigotas e 11,76% de amostras homozigotas; e o grupo ABT apresentou 75% das amostras heterozigotas para essa mutação. No grupo BTH, observou-se 5,88% das amostras com perfil heterozigoto para ambas mutações C282Y/H63D. Segundo Merryweather-Clarke et al. (1997), a mutação C282Y está presente em populações de origem européia, sendo mais comum no norte europeu, particularmente na Dinamarca e Islândia, onde sua incidência é alta. Este relato difere dos resultados obtidos pelo nosso trabalho, que pode ser explicado pela miscigenação da população brasileira, que apresentou em sua colonização grupos de diversas regiões da Europa, principalmente da região mediterrânea e África. Entretanto, os achados das mutações de hemocromatose em pacientes portadores de talassemia beta é preocupante, pois estes podem desenvolver hemocromatose em virtude das transfusões sanguíneas freqüentes, da absorção gastrointestinal aumentada do ferro recebido pela dieta alimentar.



## ***VI. Conclusão***

A análise dos resultados obtidos através da hematimetria, das técnicas clássicas de triagem e das metodologias específicas de confirmação demonstraram a importância da associação destas metodologias para a correta identificação da talassemia beta.

Para a quantificação de hemoglobinas, o HPLC demonstrou ser uma metodologia precisa, rápida e de fácil reprodutibilidade quando comparado com as metodologias de eluição e desnaturação alcalina.

Para a quantificação de Hb A<sub>2</sub> por eluição obtivemos as seguintes médias percentuais: 2,69%; 4,71% e 4,66% para os seguintes grupos AA, BTH e ABT. As médias percentuais obtidas por HPLC nos grupos AA, BTH e ABT foram, respectivamente: 0,36%; 5,05% e 5,04%. Os valores obtidos pelas duas metodologias foram esperados para o perfil de talassemia beta. A média percentual obtida para a metodologia de desnaturação alcalina nos grupos AA, BTH e ABT foram, respectivamente: 0,36%, 1,57% e 1,21%. E a quantificação realizada por HPLC apresentou os percentuais para AA, BTH e ABT: 2,69%, 1,74% e 1,47%, respectivamente. Os valores de Hb F obtidos por desnaturação alcalina e HPLC foram esperados conforme preconizado em literatura.

Para o correto diagnóstico da interação talassemia alfa/beta foram necessários testes específicos de confirmação para Hb H tais como eletroforese em pH neutro e pesquisa de corpos de inclusão.

Para análise de possível co-herança entre talassemia beta e hemocromatose hereditária realizamos o rastreamento das mutações C282Y e H63D e encontramos maior incidência de H63D tanto no grupo BTH quanto no grupo ABT.

Através do presente trabalho evidenciamos a necessidade da associação de metodologias para o correto diagnóstico de talassemia beta e de suas interações, além da caracterização molecular de HH nestes pacientes para o correto tratamento.



## ***VII. Referências Bibliográficas***

ADAMS, J. G.; COLEMAN, M. B. Structural hemoglobin variants that produce the phenotype of thalassemia. **Semin. Hematol.**, v. 27; p. 229, 1990

ANTONARAKIS, S. E.; KAZAZIAN, H. H.; ORKIN, S. H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene cluster. **Hum. Genet.**, v. 69, p. 1-14, 1985.

ARAÚJO, A. S. et al. **Doença falciforme**: manual. Brasília: Ministério da Saúde, 1993.

BARRETO, O. C. O. Como diagnosticar e tratar anemias. **Rev. Bras. Méd.**, v. 49, n. 10, p. 710-733, 1992.

BENOIST, C. et al. The ovalbumin gene-sequence of putative control regions. **Nucleic. Acids. Res.** v. 8, p. 127-142, 1980.

BEHRINGER, R. et al. Two 3' sequences direct adult erythroid-specific expression of human  $\beta$  globin genes in transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 84, p. 7056-7060, 1987.

BERTUZZO, C. S.; SONATI, M. F.; COSTA, F. F. Hematological phenotype and the type of  $\beta$  thalassemia mutation in Brazil. **Braz. J. Gen.**, v. 20, n. 2; p. 319-321, 1997.

BETCKE, K., MARTI, N. R., SCHLICHT, I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. **Nat.**, v. 184, p. 1877, 1959.

BLOM VAN ASSENDELFT, G.; et al. The beta-globin dominant control region activates homologous and heterologous promoters in a tissue-specific manner. **Cell**, v. 56, p. 969-977, 1989.

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

BOUSSIOS, T., BERTLES, J. F. Simultaneous expression of globin genes for embryonic and adult hemoglobins during mammalian ontogeny. **Science**, v. 218, p. 1225-1227, 1982.

BUNN H. F. & FORGET B. G. **Hemoglobin: Molecular, Genetics and Clinical Aspects**, W. B. Saunders, Philadelphia, 1986.

CABRAL, I. R. **Polimorfismos de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos e a suscetibilidade à cirrose alcoólica**. 2000. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CALADO, R. T.; et al. HFE gene mutation in coronary atherothrombotic disease. **Bras. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 301-306, 2000.

CAPELLINI, N. et al. Guidelines for the Clinical Management of Thalassaemia. Thalassaemia International Federation, 2000. 114p.

CARVALHO-SILVA, D. R.; et al. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 68, p. 281-286, 2001.

CHAMPE, P. C. & HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996.

CHARNAY, P.; MELLON, P.; MANIATTIS, T. Linker scanning mutagenesis of the 5' flanking region of the mouse beta-major globin gene. Sequence requirements for transcription in erythroid cells. **Mol. Cell. Biol.** v. 5, p. 1498-1511, 1985.

COOLEY, T. B. & LEE, P. Series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. **Trans. Am. Ped. Soc.**, v. 37; p. 29, 1925.

COTTON, F.; et al. Evaluation of a capillary electrophoresis method for routine determination of hemoglobins A<sub>2</sub> and F. **Clin. Chem.**, v. 45, p. 237-243, 1999.

DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. **Practical haematology**. 8 ed. Livingstone: Churchill, 1985.

DIERKS, P.; et al. DNA sequences preceding the rabbit beta-globin gene are required for formation in mouse L cells of beta-globin RNA with the correct 5' terminus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 78, p. 1411-1419, 1981.

EASTMAN, J. W.; et al. Automated HPLC screening of newborns for sickle anemia and other hemoglobinopathies. **Nat.** v. 42, p. 704-710, 1996.

EFSTRATIADIS, A. et al. The structure and evolution of the human  $\beta$ -globin gene family. **Cell**. v. 21, p. 653-668, 1980.

ENVER, T.; et al. Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. **Nat. (London)**, v. 334, p. 309-313, 1990.

FÉDER, J. N.; et al.. A novel MHC class I like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. **Nat. Gen.**, v. 13, p. 399-409, 1996.

FRANCO, R. F.; et al. Prevalence of Hereditary haemochromatosis in premature atherosclerotic vascular disease. **Br. J. Haematol.**, v. 102, p. 1172-1175, 1998.

FORRESTER, W. C. Et al. A deletion of the human  $\beta$ -globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire  $\beta$ -globin locus. **Genes Dev.**, v. 4, p. 1637-1649, 1990.

FUCHAROEN, S.; SHIMIZU, K.; FUKUMAKI, Y. A novel C $\rightarrow$ T transition within the distal CCAAT motif of the  $\gamma^G$  - globin gene in the Japanese HPFH: implication of factor binding in elevated fetal globin expression. **Nucl. Acids. Res.**, v. 18, p. 5245-5253, 1998.

GALACTEROS, F. Détection néonatale de la drépanocitose en France métropolitaine. **Arch. Pediatr.**, v.3, p.1026-1031, 1996.

GOCHEE, P. A & POWELL, L. W. What's new in hemochromatosis. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 8, n. 2, p. 98-104, 2001.

GRUSS, P. Review: Magic enhancers? *DNA*, v. 3, p. 1-9, 1984.

Guidelines for the Clinical Management of Thalassaemia. Thalassaemia International Federation (TIF), 2000. 114 p.

GUSTINCHIC et al. **Biothechniques**, v. 11, p. 298-302, 1991.

HANSCOMBE, O.; et al. Importance of globin gene order for correct developmental expression. **Genes Dev.**; v. 5, p. 1387-1394, 1991.

HATTORI, Y. Globin gene mutation is a model of genetic abnormalities. **Rinsho Byori**, v. 47, n. 3, p. 244-251, Mar. 1999.

HELLER, P. Hemoglobinopathic dysfunction of the red cell. **Am. J. Med.**, v. 41, p. 799-802, 1968.

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

HOFFBRAND, A. V. & PETTIT, J. E. **Essential Haematology** 3rd edition, Blackwell Science Publication, London, Edinburgh, Boston, 1995.

HOFFMAN, R.; BENZ, J. R.; E. J. et al. **Hematology – Basic principles and practice**. 1 ed, U.S.A. Churchill Livingstone, 1991.

HONIG, G. R. & ADAMS III, J. G. **Human hemoglobin genetics**. Wien: Springer Verlag, 1986.

[http:// globin.cse.psu.edu/](http://globin.cse.psu.edu/) acesso 12/06/2002.

[http:// www.harry-arends.nl/Html.links.htm](http://www.harry-arends.nl/Html.links.htm) acesso 14/01/2003.

HUISMAN, T. H. J; CARVER, M. F. H.; BAYSAL, E. **A syllabus of thalassemia mutations**. U. S. A.: The Sickle Cell Anemia Foundation. 1997.

HUTZ, M H. & SALZANO, F. M. Sickle cell anemia in Rio de Janeiro, Brazil: demographic, clinical and laboratory data. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 16, p. 219-226, 1983.

IHIC – INTERNATIONAL HEMOGLOBIN INFORMATION CENTER – Alphabetical hemoglobin variants list. **Hemoglobin**, v. 20, n. 3, p. 313-335, 1996.

JACKSON, J.; PETRYKOWSKA, H., PHILIPSEN, S. et al; Role of DNA sequences outside the cores of DNase hypersensitive sites (HSs) in functions of the  $\beta$ -globin locus control region. Domain opening and synergism between HS2 e HS 3. **The Journ. Biol. Chem.**, v. 271, n. 20, p. 11871-11878, 1996.

KAZAZIAN, Jr., H. H. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. **Sem. Hemat.**, v. 27, n. 3, p. 209-228, 1990.

KELLERMEYER, R. W. Princípios gerais de avaliação e terapia das anemias. **Clin. Méd. Am. Norte**, v. 3, p. 561-572, 1984.

KHOURY, G.; GRUSS, P. Enhancer elements. **Cell**, v. 33, p. 313-314, 1983.

KO, T. M.; CAVILES, A. P.; HWA, H. L. et al. Prevalence and molecular characterization of  $\beta$ -thalassemia in Filipinos. **Ann Hematol.** v. 77, p. 257-260, 1998.

LABIE, L. La commutation (switch) perinatale de l'hémoglobine. **Med. Sci.**, v. 6, p. 572- 573, 1990.

LANGDON, S. D.; KAUFMAN, R. E. Gamma-globin gene promoter elements required for interaction with globin enhancers. **Blood**, v. 91, p. 309-318, 1998.

LE GAC, G.; MURA, C.; FÉREC, C. Complete scanning of the hereditary haemochromatosis gene (HFE) by use of denaturing high performance liquid chromatography. Brest: France, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. Sarvier, 1985.

LEWIN, B. **Genes VII**. Oxford, International Student Edition, 2000.

LIEBHABER, S.A. Alpha thalassemia. Invited review. **Hemoglobin**, v. 13 n. 78, p. 685-713, 1989.

LIMA, G. A. F. M. & GROTTTO, H. Z. W.; Laboratory assessment of iron status and reticulocyte parameters in differential diagnosis of iron deficiency anemia and heterozygous. **Jorn. Bras. Pat. Med. Lab.**, v. 38, nº 4, p. 273-280, ou/nov/dez/2002.

MARENGO & ROWE, A J. Rapid electrophoresis and quantification of haemoglobin on cellulose acetate. **J. Clin. Path.**, v. 18, p. 90-792, 1965.

MARTINELLI, A. L.; et al; Are haemochromatosis mutations related to the severity of liver disease in hepatitis C virus infection? **Acta Haematol.**, v. 102, p. 152-156, 2000.

MELO, M.; PURINI, M.; CANÇADO, R.; et al. Uso de índices hematimétricos no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas: uma abordagem a ser adotada? **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 48, n. 3, p. 222-224, 2002.

MERRYWEATHER-CLARKE, A. T.; et al. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. **J. Med. Gen.**, v. 34; p. 275-278, 1997.

MIALE, J. B. **Laboratory medicine hematology**. The CV mosby Company, Fifth edition: Saint Louis, 1993. p. 154.

MITCHELL, P. J.; TJIAN, R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. **Science**, v. 245, p. 371-378, 1989.

MODELL, B.; KHAN, M.; DARLISON, M. et al. A national register for surveillance of inherited disorders:  $\beta$  thalassaemia in the United Kingdom. **B. W. H. O.**, v. 79, n. 11, p. 1006-1013, 2001.

MODIANO, D.; LUONI, G.; SIRIMA, B. S.; et al. Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. **Nat.**, v. 414, n. 15, p. 305-308, 2001.

MORENO, I.; et al. Rapid detection of the major Mediterranean  $\beta$ -thalassaemia mutations by real-time polymerase chain reaction using fluorophore-labelled hybridization probes. **Brit. J. Haem.**, v. 119, n. 2, p. 554, 2002.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997.

NAOUM, P. C. **Eletroforese, técnicas e diagnósticos**. São Paulo: Santos, 1998. 174 p.

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

OLIVEIRA, J. S. R. & FIGUEIREDO, M. S. Como diagnosticar e tratar anemias. **Rev. Bras. Med.**, v. 54, p. 191-213, 1998.

PARKKILA, S.; et al. Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 2534-2539, 1997.

PAO, C. LIN, C. Y.; TANG, G. C.; Detection of  $\beta$  thalassemia carrier by direct analysis of  $\beta$ -globin gene lesions. **Biochem. Bioph. Res. Com.** v. 191, n. 3, p. 1118-1123, 1993.

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

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

PIRES NASCIMENTO, M. L. Novos índices reticulocitário: volume globular média normal, reticulopenias e reticulocitoses. **Laes & Haes**. v. 6, n. 14, p. 106-123, 2003.

RAICH, N.; et al. Demonstration of human  $\epsilon$ -globin gene silencer with studies in transgenic mice. **Blood.**, v. 79, p. 79, p. 861-864, 1992.

RAMALHO, A. S. **As hemoglobinopatias hereditárias**: um problema de saúde pública no Brasil. FCA, São Paulo, p. 46-50, 1986.

RAPAPORT, S. **Introdução à Hematologia**. São Paulo: Roca, 1987, 346 p.

RUCKNAGEL, D.L.; et al. 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.

SALZANO, F. M. Hemoglobin variants in Brazil. "In: **Hemoglobins variants in human populations**. vol 1. Cap. 8, WINTER. W. P. eds. CRC press, Boca Raton, Florida, p. 117-130, 1986.

SALZANO, F. M. & FREIRE-MAIA, N. **Populações brasileiras: aspectos demográficos, genéticos e antropológicos**. São Paulo, EDUSP, 1967. 177p.

SHELTON D.; STEGMAN, L.; HARDISON R.; et al. Phylogenetic footprinting of hypersensitive site 3 of the  $\beta$ -globin locus control region. **Blood.** v. 89, n. 9, p. 3457-3469, 1997.

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

SIMON, M. Secondary iron overload and the haemochromatosis allele. **Brit. J. Haem.**, v. 60, p. 1-5, 1985.

STAMMATOYANNOPOULOS G; et al. **The Mol. Bases Blood Dis**. 2nd edition, Saunders Company, Philadelphia, 1994.

TAN, G. B.; et al. Evaluation of high performance liquid chromatography for routine estimation of haemoglobin A<sub>2</sub> and F. J. **Clin. Pathol**, v. 46, p. 852-856, 1993.

Thalassaemia International Federation Magazine. Cyprus: Othon Press. n. 34, dez. 2001.

THEIN, S. L.; HESKETH, C.; TAYLOR, P.; et al. Molecular basis for dominantly inherited inclusion body  $\beta$ -thalassemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 3924-3928, 1990.

THOMPSON, M. W., McINNES, R. R., WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson - Genética médica**. 5. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1993.

TRIOLA, M. F. Elementary Statistics. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

WAYE, J.S.; ENG, B. & CHUI, D.H.K. Identification of na extensive alpha globin gene deletion in a Chinese individual. **British J. of Haematol.**, 80: 378-380, 2001.

WEATHERALL, D. J. The thalassaemias. **Brit. Med. J.**, v. 314, p. 1675-1678, 1997.

WEATHERALL, D. J. & CLEGG, J. B. **The thalassaemia syndromes**. 3.ed. Blackwell: Oxford, 1981. 875 p.

WEATHERALL, D. J. & CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bul. W. H. O.**, v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.

WETHERS, D.; PEARSON, H.; GASTON, M. Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies. **Pediatrics**, v. 83, p. 813-814, 1989.

WHIPPLE; G. H. & BRADFORD, W. L. Mediterranean disease – thalassaemia (erythroblastic anemia of Cooley): associated pigment anomalies simulating hemochromatosis. **J. Ped.**, v. 9, p. 279-311, 1936.

W. H. O. - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, diagnosis, and treatment. **B. W. H. O.**, v. 60, n. 5, p. 643-659, 1982

W. H. O. - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the VI annual meeting of the WHO Working group on the feasibility study on hereditary disease community control programs (hereditary anaemias). Cagliari (Sardinia). April, 8-9, 1989.

WORWOOD, M. Haemochromatosis. **Clin. Lab. Haem.** v. 20, p. 65-75, 1998.

VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobin. **Am. J. Clin. Path.**, v.49, n.3, p.440-442, 1968.

VULLO, R et al. **What is thalassaemia?** Cyprus: Thalassaemia International Federation, 1995. 117 p.

ZAGO, M. A. Hemoglobinopatias:prevalência e variabilidade. **Rev. Paul. Méd.**, v. 104, n.6, p.300-304, 1986.

ZAMARO, P. J. A. **Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em doadores de sangue.** São José do Rio Preto, 2002. Tese (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.



## ***IX. Resumo***

A talassemia beta constitui um grupo heterogêneo de distúrbios genéticos da síntese de hemoglobina sendo uma das doenças monogênicas mais comuns, identificada e estudada por várias décadas. É originária da região do Mediterrâneo porém, atualmente apresenta-se amplamente distribuída pelo mundo devido ao fluxo gênico pela migração das populações. No Brasil, os tipos de talassemia mais prevalentes são as talassemias alfa e beta e apresentam número variável de indivíduos portadores devido ao alto grau de miscigenação da população. As formas graves de talassemia beta são facilmente diagnosticadas entretanto, as formas mais suaves muitas vezes são interpretadas e tratadas como anemia ferropriva. O presente estudo teve como objetivo caracterizar as formas talassêmicas do tipo beta e verificar os interferentes na expressão do fenótipo como a possível co-herança com hemocromatose hereditária. Através da associação de análise hematimétrica, metodologias clássicas e análise por HPLC analisamos 332 amostras de sangue com suspeita de talassemia beta. Um total de 70 amostras foram identificadas como portadores de hemoglobinas normais (AA), 145 portadores de talassemia beta heterozigota (BTH) e 117 portadores de talassemia alfa/beta (ABT). A análise estatística por regressão linear entre as metodologias clássicas e HPLC para quantificação de hemoglobina A<sub>2</sub> e Fetal para os três grupos foram estatisticamente significativas. A análise molecular por PCR-ASO para identificação dos mutantes para hemocromatose hereditária mostraram 11,76% de mutação C282Y e 70,58% para H63D no grupo de talassemia beta e 25% de mutação C282Y e 75% H63D para o grupo de talassemia alfa/beta. Esses resultados evidenciam a necessidade da associação de metodologias para o correto diagnóstico da talassemia beta, bem como caracterização molecular para hemocromatose, em virtude da possível co-herança desta com a talassemia beta, devido a grande diversidade genotípica existente no Brasil.

Palavras-chaves: Talassemia beta, hemoglobinopatias, hemocromatose.



***X. Abstract***

The beta-thalassemia constitutes a heterogeneous group of genetic disorders of hemoglobin synthesis. It has been one of the most common monogenic diseases identified and studied for many decades. Its origins are from Mediterranean region, although nowadays it is spread for the whole world due to gene flow of migration populations. In Brazil, the most prevalent types of thalassemia are the alpha-thalassemia and beta-thalassemia. They present a variable number of individual carriers due to high degree of miscigenation. The serious forms of beta-thalassemia are easily identified, but the milder forms are many times diagnosed and treated as iron deficiency anemia. The objective of the present study was to characterize the thalassemic forms and verify the interferences in the expression of the phenotype as the possible co-inheritance with hereditary hemochromatosis. It was analysed, utilizing hematimetric analysis, classic methodologies and HPLC analysis, 332 blood samples suspect of beta-thalassemia. The total of 70 samples were identified as carriers of normal hemoglobins (AA), 145 carriers of beta-thalassemia heterozygote (BTH) and 117 carriers of alpha/beta-thalassemia (ABT). The statistic analysis by linear regression between classic methodologies and HPLC for quantification of hemoglobin A<sub>2</sub> and Fetal hemoglobin were statistically different and significant. The molecular analysis by PCR-ASO to identify the mutants with hereditary hemochromatosis showed 11,76% of mutation C282Y and 70,58% to H63D in the beta-thalassemia group and 25% of mutation C282Y and 75% of H63D in the alpha/beta- thalassemia group. These results prove the necessity of association of methodologies in order to achieve the correct diagnosis of beta-thalassemia, as well as the molecular characterization of hemochromatosis, due to the fact of its possible co-inheritance with beta-thalassemia in the vast genotypic diversity found in Brazil.

Keywords: Beta thalassemia, hemoglobinopathies, hemochromatosis.



## ***VIII. ANEXOS***

## ANEXO 1

### FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE AMOSTRA



**NOME:** \_\_\_\_\_ **Nº Registro:** \_\_\_\_\_  
**SEXO:** \_\_\_\_\_ **IDADE:** \_\_\_\_\_ **ETNIA:** \_\_\_\_\_  
**MÉDICO RESPONSÁVEL:** \_\_\_\_\_  
**DADOS HEMATOLÓGICOS:** \_\_\_\_\_  
**HISTÓRIA CLÍNICA:** \_\_\_\_\_  
**PROVENIÊNCIA:** \_\_\_\_\_

TESTES REALIZADOS	RESULTADO	MÉTODO	VALORES NORMAIS
Eletroforese alcalina		Marengo & Rowe	AA
Eletroforese ácida		Vella	AA
Resistência osmótica em NaCl 0,36%		Silvestroni & Bianco	Negativo
Pesquisa de corpos de Hb H		Papayannopoulos	Ausente
Dosagem de Hb A2		Marengo & Rowe	2,5 a 3,5%
Dosagem de Hb Fetal		Betke	0,0 a 1,0%
Morfologia Eritrocitária			Normocitose
Eletroforese para Hb H		Dacie & Lewis	Ausente
Pesquisa de reticulócitos		Dacie & Lewis	0,5 a 2,0%
Outros			

**CONCLUSÃO:**

São José do Rio Preto, de de 200 .

**Dra. Claudia R. Bonini Domingos**  
**CRB 03.973/01-D**

**ANEXO 2**

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, RESOLUÇÃO 196/96

**Nome do Projeto:** “Avaliação dos Mutantes que originam Talassemia do Tipo Beta no Brasil”

**Nome do Responsável pela condução da pesquisa:**

Lya Bueno de Carvalho (UNESP) – (17) 2212392

**Dados do Indivíduo:**

Nome:..... Idade:.....

RG:.....

End.:.....

Cidade – UF.....

CEP: .....Fone: .....Nº. registro no projeto.....

Estou ciente de haver concordado em participar, voluntariamente, da pesquisa acima referida e para tanto fornecerei uma amostra do meu sangue coletada por profissionais capacitados. Este procedimento apresenta risco mínimo para minha saúde como o caso do aparecimento de uma mancha roxa no local da punção.

Fui informado também que terei conhecimento de todos os resultados obtidos, independentemente do fato de mudar meu consentimento em participar da pesquisa em qualquer momento; que poderei consultar a pesquisadora responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone (0XX17) 221.2392, para esclarecimento de quaisquer dúvidas. Estou ciente que não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes; que este estudo é importante para a identificação e caracterização das hemoglobinas anormais, contribuindo para o melhor entendimento, correto diagnóstico e tratamento adequados aplicados à população brasileira.

Este estudo poderá ser apresentado em reuniões e publicações científicas sem a minha identificação pessoal.

Data:....., / /200 \_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente ou Responsável

Data: ..... / /200 \_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável

**OBS:** Este termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante legal e a outra ao pesquisador.

**ANEXO 3**

**PARECER DE APROVAÇÃO DO CONEP**

## ANEXO 4

TABELA 9 - RELAÇÃO DOS VALORES HEMATIMÉTRICOS OBTIDOS PARA O GRUPO DE AMOSTRAS NORMAIS (AA)

Código	Idade	Estado	GV (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	Hb (g/dL)	%HT	VCM(μ <sup>3</sup> )	HCM (pg)	%CHCM	%Ret.
C001	14 anos	SE	5,57	12,70	40,40	72,50	22,80	31,40	-
C002	06 anos	SE	4,00	11,90	36,00	90,00	29,70	33,00	0,50
C003	20anos	SE	5,78	16,20	50,50	87,30	28,00	32,00	-
C004	14 anos	SE	4,90	13,90	44,00	89,70	28,30	31,50	-
C005		SE	3,35	11,10	31,40	93,70	33,10	35,30	-
C006		SE	4,60	8,50	30,00	65,20	18,40	28,30	-
C007	04 anos	SE	4,00	11,10	33,00	82,50	27,70	33,60	0,50
C008	35 anos	SE	4,40	10,60	34,00	77,20	24,00	31,10	-
C009	03 anos	SE	4,40	12,90	38,00	86,30	29,30	33,90	-
C010	39 anos	SE	4,04	9,90	31,70	78,40	24,50	31,20	-
C011	16 anos	SE	4,72	13,50	42,00	88,90	28,60	32,10	0,90
C012	26 anos	SE	4,42	11,70	36,30	82,10	26,40	32,20	0,50
C013	15 anos	SE	4,61	12,40	37,40	81,10	26,80	33,10	0,50
C014		SE	4,29	13,60	39,20	91,30	31,70	34,60	0,50
C015		SE	3,64	11,80	35,90	98,60	32,40	32,80	-
C016		SE	3,80	11,70	34,00	89,40	30,70	34,40	-
C017		SE	3,63	11,80	35,70	98,30	32,50	33,00	-
C018		SE	5,50	14,30	45,00	81,80	26,00	31,70	-
C019	31 anos	SE	3,97	11,70	36,10	90,90	29,40	32,40	-
C020	52 anos	SE	4,57	14,40	44,10	96,40	31,50	32,60	-
C021	08 anos	SE	2,29	8,80	26,90	117,40	38,40	32,70	-
C022	34 anos	SE	3,80	11,70	35,00	92,10	30,70	33,40	-
C023		SE	4,82	14,50	42,40	87,90	30,00	34,10	-
C024	47 anos	SE	3,73	9,20	28,40	76,10	24,60	32,30	2,50
C025		ES	3,42	10,40	31,00	90,60	30,40	33,50	1,50
C026	30 anos	SE	4,67	14,30	42,10	90,10	30,60	33,90	1,60
C027	42 anos	SE	4,30	9,20	28,80	66,90	21,30	31,90	2,50
C028	13 anos	SE	5,20	14,30	41,00	78,80	27,50	34,80	2,00
C029	24 anos	SE	4,04	12,30	36,90	91,30	30,40	33,30	1,80
C030		SE	5,10	16,50	47,80	93,70	32,30	34,50	-
C031	35 anos	SE	4,18	11,70	35,70	85,40	27,90	32,70	1,50
C032	29 anos	ES	4,84	12,40	38,90	80,30	25,60	31,80	-
C033	01 ano	SE	4,20	11,00	33,50	79,70	26,10	32,80	1,50
C034		SE	5,22	14,40	43,80	83,90	27,50	32,80	2,00
C035		SE	3,98	11,40	33,10	83,10	28,60	34,40	-
C036	27 anos	SE	4,60	13,60	41,00	89,10	29,50	33,10	1,00
C037	04 anos	ES	5,24	10,90	35,30	67,30	20,80	30,80	3,00

## Continuação do Anexo 4

Código	Idade	Estado	GV (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	Hb (g/ dL)	%HT	VCM(μ <sup>3</sup> )	HCM (pg)	%CHCM	%Ret.
C038		SE	3,00	8,70	27,00	90,00	29,00	32,20	-
C039	40 anos	SE	4,20	11,20	36,00	85,70	26,60	31,10	-
C040	26 anos	SE	4,20	9,80	30,00	71,40	23,30	32,60	
C041	02 anos	ES	2,42	6,00	18,30	75,60	24,70	32,70	
C042	07anos	ES	4,93	10,10	34,00	69,00	20,00	29,70	0,50
C043	41 anos	ES	4,40	10,60	32,90	74,80	24,10	32,20	-
C044	38 anos	SE	4,45	13,90	39,10	87,80	31,20	35,50	-
C045	38 anos	SE	4,60	11,50	35,00	76,00	25,00	32,80	-
C046	42 anos	SE	4,31	13,10	39,00	90,40	30,30	33,50	-
C047	47 anos	SE	5,19	8,90	30,00	57,80	17,10	29,60	-
C048	37 anos	SE	3,88	9,40	29,00	74,70	24,20	32,40	-
C049	16 anos	SE	4,66	14,40	43,10	92,40	30,90	33,40	1,50
C050	22 anos	SE	4,40	13,40	40,00	90,90	30,40	33,50	2,00
C051	38 anos	SE	4,53	11,50	36,30	80,10	25,30	31,60	2,00
C052		SE	5,30	16,70	49,00	92,40	31,50	34,00	-
C053		SE	4,80	12,80	38,00	79,10	26,60	33,60	-
C054	37 anos	SE	4,80	10,00	33,00	68,70	20,80	30,30	1,50
C055		SE	4,90	11,00	35,90	73,20	22,40	30,60	1,80
C056		SE	4,35	13,70	40,40	92,80	31,40	33,90	-
C057	50 anos	SE	4,20	13,40	40,00	95,20	31,90	33,50	-
C058	07 anos	SE	3,77	11,80	35,30	93,60	31,20	33,40	-
C059	55 anos	SE	4,28	13,40	39,30	91,80	31,30	34,00	2,00
C060	46 anos	SE	4,10	10,00	32,00	78,00	24,30	31,20	1,80
C061	71 anos	SE	4,00	12,00	36,00	90,00	30,00	33,30	1,50
C062	67 anos	SE	5,28	16,10	48,60	92,00	30,40	33,10	2,00
C063	71 anos	SE	5,40	15,30	45,00	83,30	28,30	34,00	1,20
C064	58 anos	SE	5,73	17,20	48,80	85,10	30,00	35,20	2,50
C065	08 anos	SE	3,70	11,40	33,00	89,10	30,80	34,50	2,20
C066	51 anos	SE	4,19	11,10	36,50	87,10	26,40	30,40	2,00
C067		SE	4,68	12,90	41,10	87,80	27,50	31,30	2,00
C068	06 anos	SE	4,28	11,40	36,00	84,10	26,60	31,60	2,00
C069	24 anos	ES	3,22	9,80	28,90	89,70	30,40	33,90	2,00
C070	19 anos	ES	3,95	11,00	33,30	84,30	27,80	33,00	2,00

## ANEXO 5

TABELA 10 – RELAÇÃO DOS VALORES HEMATIMÉTRICOS OBTIDOS PARA O GRUPO DE TALASSEMIA BETA HETEROZIGOTA (BTH)

Código	Idade	Estado	GV (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	Hb (g/dL)	%HT	VCM(μ <sup>3</sup> )	HCM (pg)	%CHCM	%Ret.
B002	40 anos	RJ	4,90	10,00	32,00	65,30	20,40	31,20	1,00
B003	43 anos	SP	3,90	10,00	32,00	82,00	25,60	31,20	1,50
B005	66 anos	ES	3,50	10,20	33,00	94,20	29,10	30,90	1,00
B006	33 anos	SP	4,00	11,00	33,00	82,50	27,50	33,30	0,70
B009	08 meses	ES	4,70	12,00	35,00	74,40	25,50	34,20	0,60
B011	01 ano	ES	4,80	11,20	36,00	75,00	23,30	31,10	1,00
B013	14 anos	RJ	4,90	10,00	32,00	65,30	20,40	31,20	0,70
B014		ES	4,80	11,00	31,00	64,50	22,90	35,40	0,50
B018		SE	4,00	11,00	32,00	80,00	27,50	34,30	0,80
B021		MT	4,90	10,00	32,00	65,30	20,40	31,20	1,00
B022	80 anos	SE	4,90	10,00	32,00	65,30	20,40	31,20	2,00
B023		RN	4,70	11,00	31,20	66,30	23,40	35,20	2,00
B024		RJ	4,50	12,00	33,00	73,30	26,60	36,30	2,00
B025		RJ	4,70	11,00	32,20	68,50	23,40	34,10	2,50
B028		ES	4,60	11,00	32,00	69,50	23,90	34,30	2,00
B031		ES	4,60	10,00	33,20	72,10	21,70	30,10	1,00
B032		RJ	4,50	10,00	32,00	71,10	22,20	31,20	1,00
B033		MT	4,80	10,00	31,00	64,50	20,80	32,20	0,50
B034	29 anos	SE	4,98	9,20	31,30	62,80	18,40	29,30	2,00
B036		RJ	5,00	10,00	30,00	60,00	20,00	33,30	1,00
B037		RJ	4,95	10,20	31,00	62,60	20,60	32,90	0,80
B039	28 anos	ES	6,50	11,80	31,00	47,60	18,10	38,00	0,80
B042	19 anos	SP	5,00	12,80	40,00	80,00	25,60	32,00	1,00
B045	03 anos	ES	5,50	10,00	40,00	72,70	18,10	25,00	2,00
B048	01 ano	SP	4,90	10,20	39,00	79,50	20,80	26,10	2,00
B050	12 anos	BA	5,10	11,00	39,00	76,40	21,50	28,20	0,50
B051		RJ	5,50	12,00	40,00	72,70	21,80	30,00	1,00
B054		MT	5,00	9,80	41,00	82,00	19,60	23,90	1,00
B058		ES	4,90	11,00	37,00	75,50	22,40	29,70	2,00
B059		RJ	5,00	10,00	48,00	96,00	20,00	20,80	0,80
B061		RJ	5,20	10,00	48,00	92,30	19,20	20,80	1,00
B063		RS	5,50	9,00	47,00	85,40	16,30	19,10	3,00
B064		RJ	5,00	10,00	44,00	88,00	20,00	22,70	0,80
B066	03 anos	ES	4,70	11,00	44,00	93,60	23,40	25,00	0,60
B068	13 anos	ES	4,50	11,20	40,00	88,80	24,80	28,00	1,00
B070	21 anos	ES	4,70	11,00	38,00	80,80	23,40	28,90	1,00
B073		RS	4,90	10,00	35,00	71,40	20,40	28,50	0,50
B075		SP	5,00	11,00	38,00	76,00	22,00	28,90	0,80

## Continuação do Anexo 5

Código	Idade	Estado	GV ( $10^6/\text{mm}^3$ )	Hb (g/dL)	%HT	VCM( $\mu^3$ )	HCM (pg)	%CHCM	%Ret.
B076	02 anos	SP	4,50	11,20	39,00	86,60	24,80	28,70	1,00
B077	29 anos	SP	5,00	12,00	39,00	78,00	24,00	30,70	0,70
B078	0 anos	SP	4,50	12,00	41,00	91,10	26,60	29,20	1,00
B080	38 anos	SP	4,20	11,50	36,00	85,70	27,30	31,90	2,00
B081	01 ano	ES	4,40	12,00	40,00	90,90	27,20	30,00	0,60
B083	0 ano	SP	4,42	11,00	40,00	95,20	24,80	27,50	0,60
B084	0 ano	SP	5,10	10,00	49,00	96,00	19,60	20,40	2,50
B085	0 ano	SP	5,01	10,00	44,00	87,80	19,90	22,70	1,00
B089		RJ	4,70	10,10	41,00	87,20	21,40	24,60	1,00
B091	25 anos	RS	4,60	10,20	41,00	89,10	22,10	24,80	0,60
B092	02 anos	RJ	4,50	10,00	40,00	88,80	22,20	25,00	0,60
B097		RJ	5,40	10,00	41,00	75,90	18,50	24,30	0,60
B098	30 anos	SP	4,80	9,80	37,00	77,00	20,40	26,40	0,60
B099		RJ	4,80	9,70	38,00	79,10	20,20	25,50	0,50
B100	19 anos	MS	4,90	9,00	37,00	75,50	18,30	24,30	0,70
B102	01 ano	ES	4,50	10,00	35,00	77,70	22,20	28,50	1,00
B103	02 anos 02 meses	SP	4,50	10,00	34,00	75,50	22,20	29,40	1,00
B106		MS	4,50	10,10	35,00	77,70	22,40	28,80	2,50
B107		MS	4,70	10,20	34,00	72,30	21,70	30,00	1,00
B108	02 anos e 10 meses	SP	5,00	11,00	38,00	76,00	22,00	28,90	0,80
B109		SP	5,50	11,00	40,00	72,70	20,00	27,50	0,50
B110		SP	5,20	12,00	41,00	78,80	23,00	29,20	0,60
B114	08 meses	ES	4,00	9,60	37,00	92,50	24,00	25,90	0,70
B116		RJ	4,70	13,00	38,00	80,80	27,60	34,20	0,90
B117		RJ	5,00	12,50	42,00	84,00	25,00	29,70	0,50
B118		ES	5,50	13,00	41,00	74,50	23,60	31,70	0,50
B119	05 anos	SP	4,60	11,70	33,90	73,60	25,40	34,50	1,50
B120	36 anos	SP	4,50	11,50	35,00	77,70	25,50	32,80	0,90
B122	52 anos	SP	4,70	9,80	29,70	63,10	20,80	32,90	1,50
B123		ES	4,60	10,00	35,00	76,00	21,70	28,50	0,60
B125	02 anos	ES	4,40	10,00	35,00	79,50	22,70	28,50	0,90
B126		SP	5,00	10,20	39,00	78,00	20,40	26,10	1,00
B128		RJ	5,00	11,00	37,00	74,00	22,00	29,70	2,00
B130		ES	5,00	11,00	38,00	76,00	22,00	28,90	1,00
B136		SP	5,40	10,00	39,00	72,20	18,50	25,60	1,00
B137	61 anos	RS	6,00	10,00	41,00	68,30	16,60	24,30	2,00
B139		RJ	5,10	11,00	39,00	76,40	21,50	28,20	0,50
B140		RJ	5,10	12,00	40,00	78,40	23,50	30,00	3,00
B141		ES	5,00	9,00	41,00	82,00	18,00	21,90	2,50
B142	15 anos	RS	4,70	12,00	39,00	82,90	25,50	30,70	2,50

## Continuação do Anexo 5

Código	Idade	Estado	GV ( $10^6/\text{mm}^3$ )	Hb (g/dL)	%HT	VCM( $\mu^3$ )	HCM (pg)	%CHCM	%Ret.
B147		RJ	4,40	12,00	38,00	86,30	27,20	31,50	2,00
B148		SP	6,00	13,00	41,00	68,30	21,60	31,70	1,00
B149	51 anos	SP	5,50	10,50	31,20	56,70	19,00	33,60	2,00
B150		ES	5,50	12,00	38,00	69,00	21,80	31,50	1,20
B151		SP	5,20	11,00	39,00	75,00	21,10	28,20	1,50
B154	41 anos	RS	5,00	10,00	39,00	78,00	20,00	25,60	2,50
B155		SP	5,20	10,40	31,60	60,70	20,00	32,90	2,00
B156		BA	5,00	10,50	37,00	74,00	21,00	28,30	2,50
B157	27 anos	ES	5,70	10,00	34,00	59,60	17,50	29,40	3,00
B158		RJ	6,00	13,00	38,00	63,60	21,60	34,20	2,50
B160	20 anos	SE	4,70	12,00	33,00	70,20	25,50	36,30	2,00
B161		ES	4,80	12,00	36,00	75,00	25,00	33,30	2,00
B164		SP	6,00	13,80	39,00	65,00	23,00	35,30	2,50
B165	14 anos	RS	4,70	12,00	39,00	82,90	25,50	30,70	2,00
B167	26 anos	BA	4,40	11,00	38,00	86,30	25,00	28,90	3,00
B168	36 anos	BA	5,00	10,00	39,00	78,00	20,00	25,60	3,00
B169		ES	5,50	13,00	34,00	61,80	23,60	38,20	3,00
B170		MS	6,00	13,30	37,00	61,60	22,10	35,90	2,00
B171	39 anos	ES	5,00	13,50	35,00	70,00	27,00	38,50	3,00
B172		RS	4,86	8,80	28,70	59,00	18,10	30,60	3,00
B173		SE	2,76	7,10	22,30	80,70	26,20	31,80	2,50
B174		SP	4,50	9,00	38,00	84,40	20,00	23,60	3,00
B176	06 anos	ES	4,00	9,90	38,00	95,00	24,70	26,00	2,50
B177	33 anos	SP	5,50	9,80	38,00	69,00	17,80	25,70	1,60
B178	09 anos	ES	6,00	10,90	39,00	65,00	18,10	27,90	1,50
B179		SE	5,50	11,00	39,00	70,90	20,00	28,20	3,00
B182		ES	5,60	12,00	41,00	73,20	21,40	29,20	3,50
B185	04 anos	SP	4,90	12,00	40,00	81,60	24,40	30,00	3,00
B188	28 anos	SP	5,20	14,00	41,00	78,80	26,90	34,10	3,00
B189	02 anos	SP	4,50	12,50	40,00	88,80	27,70	31,20	2,00
B193		SE	5,00	12,00	39,00	78,00	24,00	30,70	2,00
B194		RJ	5,40	13,00	38,00	70,30	24,00	34,20	3,00
B195	67 anos	RJ	3,50	8,00	27,00	77,10	22,80	29,60	3,00
B198	26 anos	ES	5,55	11,70	37,70	67,90	21,00	31,00	3,50
B199	75 anos	ES	5,02	10,40	34,30	68,30	20,70	30,30	1,00
B200	01 ano	ES	6,00	13,00	41,00	68,30	21,60	31,70	2,50
B201	25 anos	ES	5,20	12,00	40,00	76,90	23,00	30,00	1,50
B202	16 anos	SP	5,30	12,00	40,00	75,40	22,60	30,00	1,00
B203	28 anos	SP	5,00	11,00	40,00	80,00	22,00	27,50	1,00
B204	24 anos	ES	4,11	8,40	26,10	63,50	20,40	32,10	2,50
B205	17 anos	ES	5,50	11,60	37,20	67,60	21,00	31,10	1,50
B206	52 anos	RJ	5,20	11,50	39,00	75,00	22,10	29,40	1,00

## Continuação do Anexo 5

Código	Idade	Estado	GV ( $10^6/\text{mm}^3$ )	Hb (g/dL)	%HT	VCM( $\mu^3$ )	HCM (pg)	%CHCM	%Ret.
B207	09 anos	ES	6,12	11,90	39,40	64,30	19,40	30,20	2,00
B208	32 anos	SP	4,60	8,50	29,00	63,00	18,40	29,50	3,50
B211		ES	4,50	11,20	37,00	68,20	24,80	30,20	3,50
B212		RS	4,70	11,00	37,00	78,70	23,40	29,70	3,00
B213		RS	4,80	11,00	37,00	77,00	22,90	29,70	2,00
B218	34 anos	SP	4,90	11,00	38,00	77,50	22,40	29,70	2,50
B219		SP	5,00	12,00	38,00	76,00	24,00	31,50	2,00
B225		RS	5,20	13,00	39,00	75,00	25,00	33,30	1,50
B226		BA	5,50	13,00	39,00	70,90	23,60	33,30	2,00
B230		ES	5,20	13,30	41,00	78,80	25,50	32,40	2,50
B233	06 anos	SP	5,30	13,30	41,00	77,30	25,00	32,40	3,00
B234	16 anos	SP	5,00	11,00	40,00	80,00	22,00	27,50	3,00
B235	28 anos	SP	6,00	13,00	40,00	66,60	21,60	32,50	2,00
B237	20 anos	ES	5,80	11,00	40,00	68,90	18,96	27,50	-
B238		ES	6,00	11,00	41,00	68,30	18,60	26,82	-
B239		SP	6,00	12,90	41,00	68,30	21,50	31,40	2,00
B245		ES	5,20	12,50	41,00	78,80	24,00	30,40	2,50
B248	47 anos	SP	5,25	12,00	37,00	70,40	22,80	32,40	1,50
B250		SE	5,50	11,00	38,00	69,00	20,00	28,90	2,00
B251		SE	5,50	12,00	41,00	74,50	21,80	29,20	2,00
B255	13 anos	ES	5,00	12,50	40,00	80,00	25,00	31,20	2,00
B257		ES	4,70	12,00	35,00	74,40	25,20	34,20	2,00
B258		SP	4,90	11,00	36,00	73,40	22,40	30,50	1,50
B259		SE	6,00	11,00	39,00	65,00	18,30	28,20	1,50
B262	60 anos	SP	6,00	13,00	39,80	66,30	21,60	32,60	1,00

## ANEXO 6

TABELA 11 – RELAÇÃO DOS VALORES HEMATIMÉTRICOS OBTIDOS PARA O GRUPO DE TALASSEMIA ALFA/BETA (ABT)

Código	Idade	Estado	GV (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	%Hb (g)	%HT	VCM(μ <sup>3</sup> )	HCM (pg)	%CHCM	%Ret.
B001	02anos 6 meses	SP	4,80	11,00	40,00	83,30	22,90	27,50	17,30
B004	05 anos	SP	4,90	11,00	42,00	85,70	22,40	26,10	2,50
B007		RS	5,00	12,00	40,00	80,00	24,00	30,00	3,00
B008		SP	5,00	12,00	41,00	82,00	24,00	29,20	3,00
B010		ES	5,60	11,00	45,00	80,30	19,60	24,40	3,00
B012		SE	5,90	12,40	41,30	69,00	21,00	30,00	0,60
B015	27 anos	ES	5,70	12,50	47,00	82,40	21,90	26,50	1,80
B016	07 anos	ES	4,80	13,00	40,00	83,30	27,00	32,50	2,00
B017		RS	4,70	13,00	45,00	95,70	27,60	28,80	1,50
B019		RJ	4,80	12,00	41,00	85,40	25,00	29,20	2,00
B020		RJ	4,00	11,00	30,00	75,00	27,50	36,60	3,00
B026		RJ	4,00	11,50	31,00	77,50	28,70	37,00	0,60
B027	25 anos	SP	5,20	12,00	47,00	90,30	23,00	25,50	1,50
B029		RJ	5,90	12,00	48,00	81,30	20,30	25,00	1,50
B030		ES	5,60	12,30	50,00	89,20	21,90	24,60	0,70
B035	03 anos	RS	5,50	11,00	50,00	90,90	20,00	22,00	0,70
B038	26 anos	SP	5,50	11,20	49,00	89,00	20,30	22,80	2,50
B040	33 anos	RS	4,50	11,00	41,00	91,10	24,40	26,80	0,50
B041	11 anos	SP	4,50	10,00	40,00	88,80	22,20	25,00	2,00
B043	05 meses	BA	4,00	10,50	30,00	75,00	26,20	35,00	2,00
B044	12 anos	SE	4,20	14,00	40,00	95,20	33,30	35,00	0,60
B046	55 anos	RS	4,50	10,00	40,00	88,80	22,20	25,00	2,00
B047	22 anos	MS	5,00	10,00	45,00	90,00	20,00	22,20	2,50
B049		RJ	4,50	12,00	40,00	88,80	26,60	30,00	2,00
B052		SE	4,80	14,60	44,60	91,00	30,00	33,00	0,50
B053	42 anos	SP	5,50	14,00	50,00	90,90	25,40	28,00	1,00
B055	22 anos	SP	5,90	14,50	50,00	90,90	24,50	29,00	1,50
B056	05 anos	ES	5,70	13,50	50,00	87,70	23,60	27,00	2,50
B057		RJ	4,50	12,00	40,00	88,80	26,60	30,00	0,70
B060	55 anos	SP	4,90	12,00	42,00	85,70	24,40	28,50	2,50
B062		RJ	4,30	11,10	40,00	93,00	25,80	27,70	0,60
B065		RJ	5,70	11,00	40,00	70,10	19,20	27,50	0,60
B067	04 meses	ES	4,70	10,00	37,00	78,70	21,20	27,00	2,00
B069		MS	4,80	9,50	38,00	79,10	19,70	25,00	2,00
B071	01 ano	ES	4,70	9,00	30,00	63,80	19,10	30,00	0,50
B072		RJ	5,00	10,50	41,00	82,00	21,00	25,60	0,50
B074		RJ	5,20	10,00	42,00	80,70	19,20	23,80	0,60
B079	01ano	RJ	5,20	12,00	50,00	96,10	23,00	24,00	1,00
B082		RS	5,00	12,00	40,00	80,00	23,00	30,00	0,50
B086		ES	5,70	13,50	41,00	71,90	23,60	32,90	1,80

## Continuação do Anexo 6

Código	Idade	Estado	GV (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	%Hb (g)	%HT	VCM(μ <sup>3</sup> )	HCM (pg)	%CHCM	%Ret.
B087	35 anos	MS	5,90	13,00	47,00	79,60	22,00	27,60	1,00
B088		ES	6,00	14,50	50,00	83,30	24,10	29,00	0,60
B090	02 anos 1mês	SP	6,20	14,40	52,00	83,80	23,20	27,60	1,00
B093	22 anos	BA	5,90	14,30	51,00	86,40	24,20	28,00	2,50
B094	54 anos	SP	5,00	11,50	48,00	96,00	23,00	23,90	1,00
B095	01 ano	SP	4,70	12,00	34,00	72,30	25,50	35,20	2,50
B096		RJ	4,50	13,50	34,00	75,50	30,00	39,70	0,60
B101	04 anos	ES	4,70	11,00	35,00	74,40	23,40	31,40	2,50
B104		ES	3,70	11,00	34,00	90,00	29,00	32,30	0,80
B105		RJ	4,00	11,00	33,00	82,50	27,50	33,30	2,00
B111	03 anos	SP	4,20	10,00	33,00	78,50	23,80	30,30	2,00
B112	07 anos	SP	4,00	9,50	34,00	85,00	23,70	27,90	1,00
B113		SP	4,70	9,90	35,00	74,40	21,00	28,20	0,50
B115	29 anos	ES	4,70	10,00	35,00	37,40	21,20	28,50	0,90
B121		RJ	5,70	13,00	40,00	70,10	22,80	32,50	0,70
B124	03 anos	SP	4,00	13,10	39,40	78,90	32,70	33,20	1,00
B127		ES	4,80	11,00	39,00	81,20	22,90	28,20	1,00
B129	03 anos	ES	5,70	11,00	42,00	73,60	19,20	26,10	1,00
B131		RS	5,60	11,30	46,00	82,10	20,10	24,50	1,00
B132		SP	5,70	8,90	45,00	78,90	15,60	19,70	3,50
B133		SP	6,70	10,70	34,00	50,70	15,90	31,40	3,00
B134		SP	5,70	10,60	34,00	58,10	18,50	53,70	2,00
B135	09 anos	SE	5,70	11,60	37,00	64,90	20,30	31,80	2,00
B138		RJ	4,90	11,50	33,00	67,30	23,40	34,80	2,00
B143	41 anos	SP	5,00	10,70	33,20	23,10	71,80	32,20	2,00
B144		RJ	5,00	10,00	40,00	80,00	20,00	25,00	0,50
B145	03 anos	SP	5,20	10,50	42,00	80,70	20,10	25,00	1,20
B146	73 anos	SE	4,70	9,40	30,00	63,80	20,00	31,30	1,00
B152		ES	5,70	9,70	56,00	18,00	17,00	17,30	1,00
B153		ES	5,70	9,00	47,00	82,40	15,70	19,10	1,00
B159	47 anos	SE	5,17	10,50	34,00	66,60	20,30	30,80	2,00
B162		RJ	3,90	9,20	33,00	84,60	23,50	42,30	1,20
B163		SE	4,00	9,00	35,00	87,50	22,50	25,70	1,50
B166	15 anos	SE	6,49	12,10	38,90	60,00	19,00	31,00	1,50
B175		ES	5,70	11,00	47,00	82,40	19,20	23,40	2,00
B180	40 anos	ES	5,00	11,50	43,00	86,00	23,00	26,70	2,50
B181	47 anos	SP	5,00	11,00	40,00	80,00	22,00	27,50	2,00
B183	40 anos	SP	5,20	12,00	42,00	80,70	23,00	28,50	2,50
B184	21 anos	SP	5,50	13,00	40,00	72,70	23,60	32,50	3,00
B186	28 anos	SP	5,00	13,00	41,00	82,00	26,00	31,70	2,00
B187	71 anos	SP	5,00	12,00	41,00	82,00	24,00	29,20	2,50
B190	57 anos	SP	5,40	10,80	37,00	68,50	20,00	29,10	2,50
B191		RJ	5,70	13,50	47,00	82,40	23,60	38,70	1,00
B192	25 anos	SE	5,40	10,80	39,90	64,00	20,00	31,00	2,00
B196		SP	5,70	13,00	45,00	78,90	22,80	28,80	1,00
B197		RJ	6,00	14,00	46,50	77,50	23,30	30,10	1,00
B209		ES	6,20	13,00	47,00	75,80	20,90	27,60	1,50

## Continuação do Anexo 6

Código	Idade	Estado	GV (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	%Hb (g)	%HT	VCM(μ <sup>3</sup> )	HCM (pg)	%CHCM	%Ret.
B210		SP	5,70	12,00	47,50	83,30	21,00	25,20	1,00
B214		RJ	4,90	11,00	42,30	86,30	22,40	26,00	0,80
B215		ES	5,20	11,50	49,00	94,20	22,10	23,40	1,00
B216	24 anos	SP	5,00	11,00	43,20	86,40	22,00	25,40	1,00
B217	44 anos	SP	5,00	10,00	40,00	80,00	20,00	25,00	1,00
B220		SP	5,00	9,00	40,10	80,20	18,00	22,40	1,50
B221	17 anos	SP	5,20	10,00	40,20	77,30	19,30	19,20	1,00
B222	06 anos	SP	5,70	11,00	40,00	70,10	19,20	27,50	0,80
B223	84 anos	SP	5,90	12,00	47,00	79,60	20,30	25,50	0,50
B224	03 anos	SP	6,00	13,00	45,00	75,00	21,60	28,80	0,50
B227	15 anos	SP	6,00	14,00	50,00	83,30	23,30	28,00	1,00
B228	60 anos	SP	6,20	14,00	45,00	72,50	22,50	31,10	1,00
B229		ES	6,70	13,00	44,50	78,00	22,80	29,20	1,50
B231		ES	5,70	11,00	44,80	78,50	19,20	24,50	1,00
B232	05 anos	SP	4,00	13,00	34,00	85,00	32,50	38,20	1,00
B236	02 anos	SP	4,20	9,00	34,80	82,80	21,40	25,80	1,00
B240	03 anos	SP	4,70	9,50	35,00	74,40	20,20	27,10	0,80
B241		RJ	4,70	10,00	37,00	78,70	21,20	27,00	0,80
B242	06 anos	SP	4,70	11,00	37,80	80,40	23,40	29,10	1,00
B243		RJ	5,00	13,00	39,00	78,00	26,00	33,30	1,00
B244		RJ	5,20	12,00	38,70	74,40	23,00	31,00	1,00
B246		RJ	5,30	11,00	40,00	75,40	20,70	27,50	1,00
B247		SE	5,30	11,00	43,00	81,10	20,70	25,50	0,80
B249	59 anos	SP	5,00	10,00	37,80	75,60	20,00	26,40	1,00
B252		SE	6,20	11,00	45,00	72,50	17,70	24,40	1,00
B253	36 anos	RJ	6,00	11,30	47,00	78,30	18,80	24,00	0,80
B254	04 anos	RJ	5,90	13,00	37,00	62,70	22,00	35,10	2,00
B256		SP	5,70	14,00	33,80	59,20	24,50	41,40	1,50
B260	28 anos	SE	5,70	12,00	33,80	59,20	21,00	35,50	1,00
B261	42 anos	SE	5,70	11,00	39,00	68,40	19,20	28,20	1,50

## ANEXO 7

TABELA 12 - RELAÇÃO DOS VALORES OBTIDOS PELAS ANÁLISES DE TRIAGEM BÁSICA E HPLC PARA O GRUPO DE AMOSTRAS COM PERFIL DE HEMOGLOBINAS NORMAIS (AA)

Código	R. G.	M.E.	El.Alc.	El. Ác.	% A <sub>2</sub> (Eluição)	%F(Betck)	%A <sub>2</sub> (HPLC)	%F(HPLC)
C001	+	+	AA	AA	2,50	0,60	2,70	0,60
C002	-	N/+	AA	AA	3,00	1,00	3,10	1,90
C003	-	N/+	AA	AA	2,50	0,00	2,80	0,30
C004	-	N/+	AA	AA	2,00	0,00	2,30	0,20
C005	-	N	AA	AA	2,00	0,00	2,40	0,30
C006	+	+	AA	AA	1,00	0,00	1,60	0,00
C007	-	N/+	AA	AA	3,00	0,00	3,10	0,50
C008	-	N/+	AA	AA	2,50	0,00	2,60	0,00
C009	-	N/+	AAF	AAF	3,00	1,00	3,20	1,50
C010	+	+/++	AA2	AA	2,00	0,00	2,20	0,00
C011	-	N/+	AA	AA	3,50	0,00	3,60	0,40
C012	-	N	AA	AA	2,50	0,00	2,80	0,40
C013	-	N	AA	AA	2,50	0,00	2,90	0,00
C014	-	N/+	AA	AA	2,70	0,00	2,60	0,30
C015	-	N/+	AA	AA	2,00	0,00	2,50	0,50
C016	-	N/+	AA	AA	1,50	0,00	2,50	0,40
C017	-	N/+	AA	AA	2,20	0,00	2,90	0,60
C018	-	N/+	AA	AA	3,00	0,00	3,10	0,00
C019	-	N/+	AA	AA	2,50	0,00	2,70	0,40
C020	-	N/+	AA	AA	3,00	0,50	3,10	1,00
C021	-	+	AAF	AA	2,80	0,50	3,10	1,10
C022	-	N/+	AA	AA	2,50	0,00	2,80	0,00
C023	-	N/+	AA	AA	2,50	0,00	3,00	0,00
C024	-	+	AA	AA	2,00	0,00	2,40	0,00
C025	-	N/+	AA	AA	3,00	0,00	3,20	0,60
C026	-	N/+	AA	AA	2,50	0,00	3,00	0,30
C027	-	++	AA2dim	AA	2,00	0,00	2,30	0,00
C028	-	N/+	AA	AA	2,00	0,00	1,50	0,70
C029	-	N/+	AA	AA	2,00	0,00	2,50	0,30
C030	-	N	AA	AA	2,50	0,00	2,30	0,40
C031	-	+	AA2dim	AA	2,00	0,00	2,10	0,10
C032	-	+	AA	AA	2,00	0,00	2,50	0,20
C033	-	+	AA	AA	2,50	0,00	2,60	0,90
C034	-	+	AAH	AA	2,80	0,00	3,00	0,00
C035	-	N/+	AA	AA	3,00	0,00	2,80	0,50
C036	-	N/+	AA	AA	2,50	0,00	3,00	0,50
C037	-	+/+++	AA	AA	2,50	0,00	2,60	0,80
C038	-	N/+	AAH	AA	3,00	0,00	2,90	0,00
C039	-	N/+	AA	AA	3,00	0,00	2,50	0,00
C040	-	++	AA	AA	2,50	0,00	2,40	0,30

## Continuação do Anexo 7

Código	R. G.	M.E.	El.Alc.	El. Ác.	%A <sub>2</sub> (Eluição)	%F(Betck)	%A <sub>2</sub> (HPLC)	%F(HPLC)
C041	-	+	AA	AA	3,00	1,00	2,80	1,10
C042	-	+	AA	AA	1,50	0,00	2,10	0,10
C043	+	N/+	AA	AA	1,80	0,00	2,10	0,50
C044	-	N/+	AA	AA	1,80	0,00	2,10	0,40
C045	-	+/>+	AA	AA	2,00	0,00	2,80	0,50
C046	-	N/+	AA	AA	2,50	0,00	2,70	0,80
C047	+	+/>+	AA	AA	2,00	0,00	1,90	0,00
C048	-	+	AA	AA	2,00	0,00	2,60	0,00
C049	-	N/+	AA	AA	2,90	0,00	3,30	0,60
C050	-	N/+	AA	AA	2,00	0,00	2,80	0,00
C051	-	+	AA	AA	2,00	0,00	2,20	0,20
C052	-	N	AA	AA	2,90	0,00	3,00	0,30
C053	-	N/+	AA	AA	3,00	0,00	3,30	0,00
C054	-	+	AA	AA	2,00	0,10	2,30	0,10
C055	-	N/+	AA	AA	2,50	0,00	2,90	0,00
C056	-	N/+	AA	AA	3,00	0,00	3,10	0,30
C057	-	N/+	AA	AA	2,50	0,00	3,00	0,00
C058	-	N/+	AA	AA	2,00	0,00	3,20	0,40
C059	-	+	AA2dim	AA	2,50	0,00	2,80	0,20
C060	-	+	AA	AA	2,00	0,00	2,40	0,20
C061	-	N/+	AA	AA	2,00	0,00	2,50	0,40
C062	-	N/+	AA	AA	1,90	0,00	2,50	0,30
C063	-	N/+	AA	AA	2,00	0,00	2,70	0,50
C064	-	N/+	AAF	AA	2,50	0,00	2,80	0,50
C065	-	N/+	AA	AA	3,00	0,00	3,10	0,00
C066	-	+	AA	AAF	3,00	0,00	2,90	0,50
C067	-	+/>+	AA	AAF	2,50	0,00	2,80	0,60
C068	-	+	AA	AAF	2,50	0,00	3,00	0,40
C069	-	N/+	AA	AA	3,00	0,00	2,90	0,60
C070	-	+	AA	AA	3,00	0,00	2,90	0,00

## ANEXO 8

TABELA 13 - RELAÇÃO DOS VALORES OBTIDOS PELAS TÉCNICAS DE TRIAGEM BÁSICA E HPLC NAS AMOSTRAS COM PERFIL DE TALASSEMIA BETA HETEROZIGOTA (BTH)

Código	R. G.	M.E.	El. Alc.	El. Ác.	%A2(Eluição)	%F(Betck)	%A2(HPLC)	%F(HPLC)
B002	+	+	A2aum	AF	4,00	1,00	6,10	0,90
B003	+	+	A2aum	AA	3,90	0,50	5,00	1,90
B005	+	+	A2aum	AA	4,00	0,60	-	-
B006	+	++	A2aum	AA	4,20	2,00	5,40	0,70
B009	-	+ / ++	A2Faum	AF	4,20	1,00	5,10	1,10
B011	-	+	A2aumF	AF	4,00	1,90	4,50	1,20
B013	+	++	A2aum	AF	6,00	1,20	6,00	1,20
B014	-	N / +	A2aum	AA	3,80	0,00	4,00	1,00
B018	-	N / +	A2Faum	AF	4,50	1,50	5,50	0,50
B021	+	++	AA	AF	4,00	6,00	6,00	2,80
B022	+	+ / ++	AA	AF	2,60	5,80	5,80	2,60
B023	+	+	A2aum	AA	4,00	0,60	3,80	1,30
B024	-	+	A2aum	AF	5,50	1,70	5,50	1,70
B025	+	++	AA	AF	4,00	5,00	3,80	4,00
B028	-	N / +	A2Faum	AF	4,00	2,00	4,00	2,00
B031	+	++	A2aum	AF	5,40	2,70	5,40	2,70
B032	+	+	A2Faum	AF	6,20	3,50	6,20	3,50
B033	+	++	AA	AA	4,20	0,60	4,00	1,00
B034	+	+ / ++	A2aum	AA	5,60	0,70	5,00	0,70
B036	+	+	A2Faum	AF	4,20	2,00	4,00	1,00
B037	-	++	A2Faum	AF	4,50	1,00	4,00	1,00
B039	+	++	A2aum	AA	4,50	0,60	-	-
B042	+	++	A2aum	AA	5,90	0,60	5,90	0,60
B045	-	N / +	A2Faum	AF	4,20	2,00	4,00	1,50
B048	+	+	A2Faum	AF	3,85	1,00	6,20	5,20
B050	-	N / +	A2Faum	AF	4,50	2,90	3,50	2,90
B051	+	++	A2aum	AA	5,00	0,50	3,50	1,20
B054	+	++	A2Faum	AF	5,20	2,00	5,60	0,70
B058	-	+ / ++	A2Faum	AF	4,50	1,00	5,60	0,70
B059	+	++	AA	AA	4,00	0,60	3,50	2,40
B061	-	+	A2Faum	AF	6,20	6,00	6,20	6,00
B063	+	+ / ++	A2aum	AF	6,20	1,60	6,20	1,60
B064	+	+	A2aum	AF	4,00	1,00	4,00	1,00
B066	+	++	AA	AA	4,00	0,50	4,00	1,00
B068	-	++	A2aum	AA	4,40	0,60	5,70	1,70
B070	-	+	A2aum	AA	4,00	0,80	4,00	1,00
B073	-	+ / ++	A2aum	AA	4,20	0,80	4,00	1,00
B075	-	N / +	A2aum	AF	4,20	1,00	4,20	1,00
B076	+	++	AA	AA	3,86	0,00	4,00	0,20
B077	-	+ / ++	A2aum	AA	7,00	0,80	7,00	0,80

## Continuação do Anexo 8

Código	R. G.	M.E.	El. Alc.	El. Ác.	%A2(Eluição)	%F(Betck)	%A2(HPLC)	%F(HPLC)
B078	+	N/+	A2Faum	AF	4,00	1,00	5,80	2,10
B080	-	N	A2Faum	AF	4,41	1,50	4,50	1,00
B081	-	+	AF	AF	3,80	1,00	3,80	1,00
B083	-	+/++	AdimFaum	AF	3,90	5,00	4,00	5,80
B084	+	N/+	AdimFaum	AF	4,00	6,00	4,20	5,00
B085	+	+	AdimFaum	AF	4,00	6,60	4,00	6,50
B089	+	+/++	A2Faum	AF	4,50	0,90	6,00	1,80
B090	+	+	A2aumFH	AA	4,50	1,50	4,50	1,50
B091	-	++	A2Faum	AF	4,00	0,80	3,40	2,10
B092	+	+/++	A2aum	AF	4,20	2,10	2,40	2,10
B097	+	++	A2Faum	AF	4,00	1,00	4,00	0,80
B098	+	+/++	A2aum	AA	4,00	0,80	4,20	0,80
B099	+	+/+++	A2aum	AA	5,00	0,60	5,20	0,60
B100	+	+	A2Faum	AF	3,80	2,00	4,00	1,50
B102	-	+/++	AF	AF	4,50	2,00	4,70	2,00
B103	+	++	A2Faum	AF	7,3	4,3	7,80	4,00
B106	+	N/+	A2aum	AF	8,00	1,00	8,50	1,00
B107	+	+/++	A2aum	AF	4,50	1,00	4,50	1,00
B108	-	N/+	AF	AF	3,80	1,10	5,80	1,60
B109	+	N/+	A2aum	AA	4,00	0,50	4,50	1,00
B110	+	N/+	A2aum	AA	5,00	0,00	5,20	0,80
B114	-	+	AF	AF	3,80	5,00	4,50	6,50
B116	+	+/++	A2aum	AA	5,00	0,90	5,50	1,00
B117	+	N/+	AF	AF	5,80	3,00	5,80	3,20
B118	-	+/++	A2aum	AA	5,50	0,70	5,50	0,70
B119	-	+/++	A2aum	AA	4,10	0,00	4,50	0,50
B120	+	+	A2aum	AA	5,90	0,08	5,90	0,80
B122	-	++	A2Faum	AF	3,80	1,00	4,50	1,00
B123	+	+	AF	AF	5,30	1,60	5,30	1,60
B125	-	N/+	AF	AF	3,70	2,50	3,70	2,50
B126	+	+/++	A2aum	AA	5,40	0,70	5,40	0,70
B128	+	++	A2aum	AF	6,20	1,10	6,20	1,10
B130	+	++	AA	AF	3,70	1,00	-	-
B136	-	N/+	AA	AA	6,70	0,50	6,70	0,50
B137	+	+/++	A2aum	AA	5,40	0,80	5,40	0,80
B139	-	+/++	A2aum	AF	5,40	1,40	5,40	1,40
B140	+	+	A2Faum	AF	6,00	1,00	6,00	1,00
B141	+	+/++	A2aum	AA	6,40	0,70	6,40	0,70
B142	-	N/+	AmetaHF?	AF	4,10	1,00	4,50	1,00
B147	-	N/+	A2Faum	AF	3,80	1,20	1,50	1,50
B148	+	+	A2Faum	AF	6,00	2,70	6,00	2,50
B149	+	+	A2aum	AF	3,90	1,70	3,90	1,70
B150	+	N/+	AF	AF	3,60	1,20	4,60	1,50
B151	-	N/+	AA	AF	5,10	1,10	5,10	1,10
B154	-	+	A2Faum	AF	6,30	2,30	6,30	2,30
B155	+	+/++	A2Faum	AF	4,80	7,70	4,80	7,70

## Continuação do Anexo 8

Código	R.G.	M.E.	El. Alc.	El. Ác.	%A2(Eluição)	%F(Betck)	%A2(HPLC)	%F(HPLC)
B156	-	+	AA	AF	4,60	1,40	4,60	1,40
B157	+	+ / ++	A2aum	AA	6,25	0,50	6,50	1,00
B158	-	N / +	A2Faum	AA	6,40	0,70	6,40	0,70
B160	-	N / +	AA	AA	5,80	0,50	5,80	1,20
B161	+	++	A2aum	AA	4,00	0,50	4,50	1,00
B164	+	++	A2aum	AF	6,50	5,00	6,50	5,00
B165	-	N / +	A2Faum	AF	5,50	1,80	5,50	1,80
B167	-	++	A2aum	AF	5,70	1,70	5,70	1,70
B168	-	+	A2aum	AF	5,70	1,20	5,70	1,20
B169	+	++	AA	AA	4,00	0,50	4,50	1,00
B170	-	N / +	A2Faum	AAF	5,50	1,30	5,50	1,30
B171	+	+	A2aum	AA	6,66	0,50	6,50	1,00
B172	+	+++	A2Faum	AF	6,20	5,20	6,20	5,20
B173	-	++	A2aum	AF	4,00	1,00	4,50	1,00
B174	+	+	A2Faum	AAF	4,70	2,00	5,00	2,50
B176	-	++	A2aum	AF	4,50	1,00	5,00	1,00
B177	-	N / +	A2aum	AA	3,60	0,00	4,00	0,50
B178	+	++	A2aum	AF	6,25	1,00	6,50	1,50
B179	+	++	AA	AF	4,20	1,00	5,60	0,90
B182	-	+	AA	AA	6,30	0,70	6,30	0,70
B185	+	++	AA	AF	4,20	1,00	4,50	1,50
B188	+	++	A2Faum	AF	4,00	3,00	5,90	1,60
B189	+	++	A2aum	AF	4,00	2,00	5,80	1,00
B193	+	++	A2aum	AF	4,20	1,00	2,90	1,00
B194	+	++	A2Faum	AF	4,30	3,00	5,10	1,70
B195	+	++	A2Faum	AF	4,50	3,00	6,50	3,50
B198	+	++	A2aum	AF	4,80	1,00	6,20	1,40
B199	+	++	A2aum	AA	4,20	0,50	-	-
B200	+	++	A2aum	AA	4,00	0,50	-	-
B201	+	+	A2aum	AA	4,10	0,60	-	-
B202	+	+	A2aum	AA	4,00	0,50	3,60	0,00
B203	+	++	A2aum	AA	4,20	0,50	4,50	1,00
B204	-	++	A2aum	AA	6,97	0,80	-	-
B205	-	++	A2aum	AA	4,10	0,80	-	-
B206	+	++	A2aum	AF	6,61	2,00	-	-
B207	+	++	A2aum	AF	5,80	2,00	-	-
B208	+	+ / ++	A2Faum	AF	8,16	2,80	8,50	2,80
B211	+	++	A2aum	AF	5,00	1,50	6,00	1,50
B212	+	++	A2aum	AF	4,20	1,00	5,40	0,90
B213	+	++	A2aum	AF	4,30	1,00	4,50	1,50
B218	+	++	A2aum	AF	4,00	1,00	5,00	1,40
B219	+	++	A2aum	AF	4,00	1,00	4,50	1,50
B225	+	++	A2Faum	AF	4,20	1,20	4,50	1,50
B226	+	+	A2Faum	AF	4,70	1,00	5,70	3,30
B230	+	++	A2Faum	AF	4,40	1,20	5,00	1,20

## Continuação do Anexo 8

Código	R. G.	M.E.	El. Alc.	El. Ác.	%A2(Eluição)	%F(Betck)	%A2(HPLC)	%F(HPLC)
B233	+	+ / ++	A2Faum	AF	4,00	2,00	4,70	0,70
B234	+	++	A2aum	AA	4,00	1,00	4,50	1,50
B235	+	++	A2aum	AA	4,30	1,00	4,50	1,00
B237	+	++	A2aum	AA	4,20	1,00	-	-
B238	+	++	A2aum	AA	4,00	1,00	-	-
B239	-	++	A2aum	AF	4,20	5,00	4,50	5,50
B245	+	+ / ++	A2aum	AA	4,00	0,80	6,10	2,00
B248	+	++	A2aum	AA	4,00	0,60	4,50	1,00
B250	+	++	A2aum	AA	4,20	0,80	5,00	1,00
B251	-	+	A2aum	AA	4,20	0,80	4,50	1,00
B255	+	+ / ++	A2aum	AA	4,50	0,60	4,50	1,00
B257	+	++	A2Faum	AF	4,00	2,00	4,50	2,50
B258	+	++	A2Faum	AF	4,00	2,00	4,50	2,00
B259	+	+	A2Faum	AF	4,00	1,20	4,50	1,50
B262	+	+ / ++	A2Faum	AF	4,00	2,00	4,50	2,50

## ANEXO 9

TABELA 14 – RELAÇÃO DOS VALORES OBTIDOS PELA TRIAGEM BÁSICA E HPLC NO GRUPO COM PERFIL DE TALASSEMIA ALFA/BETA (ABT)

Código	R.G.	M.E.	El. Alc.	El.Ác.	%A2(Eluição)	%F(Betck)	%A2(HPLC)	%F(HPLC)	Corpos Inclusão	El. pH Neutro
B001	+	+	A2aumFH	AF	4,00	10,00	4,60	16,00	Presente	1,50
B004	+	++	AA2H	AA	4,00	1,00	4,50	1,50	Presente	1,00
B007	-	+	AA2H	AA	4,50	0,80	4,50	1,00	Presente	1,50
B008	+	+	A2dimH	AA	3,90	1,00	4,00	1,50	Presente	1,00
B010	+	+	AA2H	AA	4,20	1,00	4,50	1,00	Presente	1,50
B012	-	+/++	AA2H	AA	4,00	0,50	4,00	0,80	Presente	1,00
B015	-	+	AA2H	AA	4,20	0,80	4,50	1,00	Presente	1,50
B016	+	+	A2aumFH	AF	4,20	2,00	4,50	2,50	Presente	0,50
B017	+	+	AA2H	AA	4,20	0,50	4,50	0,50	Presente	1,00
B019	+	++	AA2H	AA	3,90	0,50	3,10	0,20	Ausente	1,50
B020	+	++	AA2H	AA	5,90	3,80	5,90	3,90	Presente	1,50
B026	-	N/+	AA2H	AA	6,60	0,00	6,50	0,50	Presente	1,00
B027	-	+	AA2H	AA	4,20	0,90	4,50	1,00	Presente	1,00
B029	-	+	AA2H	AA	4,50	0,50	4,90	1,00	Presente	1,00
B030	+	+	AA2H	AA	5,60	0,00	5,90	0,50	Presente	1,50
B035	+	+	A2aumFH	AF	6,04	1,50	6,50	2,00	Presente	1,00
B038	-	+/++	AA2H	AA	5,90	0,50	6,00	0,00	Presente	2,00
B040	-	N/+	AA2H	AA	6,77	1,00	6,50	1,00	Presente	0,80
B041	-	+	AA2H	AF	4,00	0,90	4,50	1,00	Presente	1,00
B043	+	+/+/+	A2aumFH	AA	6,40	15,60	6,10	15,00	Presente	1,50
B044	-	N/+	AA2H	AA	3,78	0,70	3,50	0,40	Presente	1,00
B046	+	++	AA2H	AA	5,20	0,80	5,20	0,80	Presente	1,00
B047	-	N/+	AA2H	AA	3,70	0,00	3,70	0,00	Presente	1,00
B049	-	+	AA2H	AA	4,00	1,00	4,50	1,50	Presente	1,50
B052	-	N/+	AA2H	AA	3,80	0,00	4,00	1,00	Presente	1,00
B053	-	++	AA2H	AA	4,00	1,00	4,00	1,00	Ausente	1,00
B055	+	+	AA2H	AA	4,20	0,50	4,50	0,50	Presente	1,00
B056	+	++	A2aumFH	AF	4,50	1,00	5,70	1,20	Presente	2,00
B057	-	+	A2aumFH	AF	6,00	0,00	5,70	1,60	Presente	1,00
B060	+	+	A2aumFH	AF	4,25	0,80	4,90	0,90	Presente	1,00
B062	+	+	AA2H	AF	4,20	0,80	4,50	0,90	Presente	1,50
B065	-	+/++	A2aumFH	AF	4,00	0,80	4,50	1,00	Presente	1,50
B067	+	++	A2aumFH	AF	4,50	3,00	5,00	3,50	Presente	1,80
B069	-	N/+	AA2H	AA	4,50	0,00	4,00	0,50	Presente	1,00
B071	-	+	A2aumFH	AF	4,00	1,00	4,50	1,50	Presente	1,50
B072	+	+/++	AA2H	AF	4,00	1,00	4,50	1,00	Presente	1,00
B074	-	+	AA2H	AA	4,00	0,50	4,50	1,00	Inconclusivo	1,50
B079	+	++	AA2H	AA	5,00	0,50	5,30	0,00	Presente	1,50
B082	-	N/+	A2aumFH	AF	4,25	0,00	5,00	1,00	Presente	2,00
B086	-	+	AA2H	AA	4,50	0,00	4,50	0,50	Presente	1,50

## Continuação do Anexo 9

Código R.G.	M.E.	El. Alc.	El.Ác.	%A2(Eluição)	%F(Betck)	%A2(HPLC)	%F(HPLC)	Corpos Inclusão	El. pH Neutro	
B087	-	N/+	AA2H	AA	4,04	0,00	4,40	0,20	Presente	1,00
B088	-	N/+	A2aumFH	AF	3,60	1,20	4,00	1,50	Presente	1,00
B090	+	+	A2aumFH	AA	4,50	1,50	4,50	1,50	Presente	1,50
B093	+	+++	AA2H	AF	7,40	1,00	7,50	1,00	Presente	2,00
B094	+	+	AA2H	AA	4,50	0,00	4,80	0,50	Presente	1,50
B095	-	+	A2aumFH	AF	4,80	3,50	5,00	3,00	Presente	2,00
B096	-	N/+	A2aumFH	AF	4,58	1,50	5,00	1,00	Inconclusivo	1,00
B101	+	++	A2aumFH	AF	5,00	1,50	6,60	0,80	Presente	2,00
B104	+	++	AA2H	AA	3,65	0,50	4,50	1,00	Inconclusivo	1,00
B105	-	+	AA2H	AA	4,20	0,80	4,20	0,80	Presente	0,50
B111	+	+/+	AA2H	AA	5,90	0,70	5,90	0,70	Inconclusivo	0,50
B112	+	+	AA2H	AA	5,40	0,60	5,40	0,60	Inconclusivo	0,80
B113	-	N/+	AA2H	AA	3,60	0,50	3,60	0,50	Inconclusivo	1,00
B115	-	N/+	A2aumFH	AF	3,60	5,00	4,60	5,20	Presente	1,50
B121	+	N/+	AA	AA	5,60	0,70	5,60	0,70	Inconclusivo	1,50
B124	-	+	A2aumFH	AF	5,88	1,00	5,80	1,20	Presente	1,00
B127	+	+/+	A2aumFH	AA	5,60	1,80	5,60	1,80	Inconclusivo	1,00
B129	-	+/+	A2aumFH	AAF	6,40	1,00	6,40	1,00	Presente	1,00
B131	+	++	A2aumFH	AF	6,10	2,10	6,10	2,10	Presente	1,00
B132	+	+	AA2H	AA	5,60	0,50	5,60	0,50	Presente	0,50
B133	+	+	AA2H	AA	3,90	1,00	4,00	1,00	Raros	1,00
B134	+	+/+	A2aumFH	AF	5,40	3,60	5,40	3,60	Ausente	1,00
B135	+	+	A2aumFH	AA	6,10	1,10	6,10	1,10	Ausente	0,50
B138	-	+	AA2H	AA	4,00	0,50	4,50	1,00	Inconclusivo	1,00
B143	+	N/+	A2aumFH	AA	4,20	1,20	4,50	1,00	Presente	0,50
B144	+	++	A2aumFH	AF	6,00	2,40	6,20	2,50	Presente	0,80
B145	-	N/+	A2aumFH	AF	4,00	1,50	4,00	1,50	Presente	1,00
B146	-	+	AA2H	AA	5,90	1,30	5,90	1,30	Presente	1,00
B152	+	++	A2aumFH	AF	3,70	1,50	4,00	1,00	Presente	1,00
B153	+	++	A2aumFH	AF	4,00	1,00	4,50	1,00	Presente	1,00
B159	-	N/+	A2aumFH	AF	4,00	2,00	4,00	2,00	Presente	0,50
B162	-	N/+	A2aumFH	AF	3,80	1,50	4,00	1,50	Presente	0,50
B163	+	+	A2aumFH	AF	4,50	1,00	5,70	0,90	Presente	2,00
B166	-	+/+	AA2H	AA	6,90	1,30	6,90	1,30	Presente com 1h	0,50
B175	-	+	AA2H	AA	4,00	1,00	4,20	1,00	Presente com 1h	0,50
B180	+	N/+	AA2H	AA	6,30	0,50	6,50	1,00	Presente	0,50
B181	+	+	AA2H	AA	5,00	0,00	5,20	0,00	Presente	1,00
B183	+	+/+	AA2H	AA	5,10	3,30	5,10	3,00	Inconclusivo	1,00
B184	+	+/+	AA2H	AF	4,00	1,00	4,40	2,10	Presente	0,50
B186	+	++	AA2H	AA	5,00	0,50	5,20	0,00	Presente com 1h	2,00
B187	+	++	AA2H	AF	4,30	1,00	5,00	1,50	Presente	0,50
B190	+	+	AA2H	AA	5,00	0,50	6,60	0,50	Presente	2,00
B191	+	++	A2aumFH	AF	4,50	2,50	5,50	3,30	Presente	1,50

## Continuação do Anexo 9

Código	R.G.	M.E.	El. Alc.	El.Ác.	%A2(Eluição)	%F(Betck)	%A2(HPLC)	%F(HPLC)	Corpos Inclusão	El. pH Neutro
B192	-	+	A2aumFH	AF	5,80	1,00	6,00	1,00	Inocclusivo	1,00
B196	+	++	A2aumFH	AF	5,00	1,00	6,40	1,70	Presente	1,00
B197	+	+	A2aumFH	AF	5,00	0,00	6,60	0,50	Presente	1,50
B209	-	++	A2aumFH	AF	4,00	1,50	4,40	2,70	Presente	1,00
B210	-	++	A2aumFH	AF	4,50	4,50	5,50	1,10	Presente	1,00
B214	+	+	A2aumFH	AF	4,00	1,00	4,50	1,50	Presente	2,00
B215	+	++	A2aumFH	AF	5,00	1,00	5,20	3,20	Presente	2,00
B216	-	++	A2aumFH	AF	5,00	1,00	5,70	1,20	Presente	2,00
B217	+	++	A2aumFH	AF	5,00	1,00	4,80	1,30	Presente	1,00
B220	+	+	A2aumFH	AF	4,00	0,00	4,60	0,60	Presente	2,00
B221	+	++	A2aumFH	AF	4,50	4,00	7,00	5,30	Presente	1,00
B222	+	+	AA2H	AA	4,00	0,80	4,50	1,00	Presente	1,00
B223	-	+	AA2H	AA	4,00	0,50	4,50	0,50	Presente	1,00
B224	-	+	AA2H	AA	4,00	0,00	4,00	0,00	Presente	1,00
B227	+	+	A2aumFH	AF	5,00	1,00	6,50	1,20	Presente	2,00
B228	-	+	AA2H	AA	4,50	0,00	4,50	0,00	Presente	1,00
B229	+	++	A2aumFH	AF	5,00	2,00	6,50	2,40	Presente	2,00
B231	+	+	AA2H	AA	4,00	0,00	4,10	0,90	Presente	1,00
B232	-	+	AA2H	AA	4,00	0,00	4,50	0,50	Presente	1,00
B236	+	+	A2aumFH	AF	4,00	0,50	5,80	1,12	Presente	2,00
B240	+	+	A2aumFH	AF	5,00	1,00	6,10	1,10	Presente	1,00
B241	+	+	AA2H	AA	4,50	0,00	4,50	0,50	Presente	1,00
B242	-	+	AA2H	AA	4,50	0,00	4,80	0,30	Presente	1,50
B243	+	+	AA2H	AF	5,00	2,00	6,10	2,10	Presente	1,50
B244	+	+	AA2H	AA	4,50	0,00	4,50	0,50	Presente	1,00
B246	-	+	A2aumFH	AF	4,00	1,00	4,50	1,50	Presente	1,00
B247	-	+	A2aumFH	AF	4,50	1,00	4,80	1,00	Presente	1,00
B249	-	+	AA2H	AA	4,00	0,00	4,80	0,80	Presente	1,50
B252	+	+	A2aumFH	AF	4,50	1,00	5,00	1,50	Presente	1,50
B253	+	+	A2aumFH	AF	5,00	1,00	5,50	1,50	Presente	1,50
B254	+	+	AA2H	AA	5,00	0,50	5,40	0,80	Presente	2,00
B256	+	+	AA2H	AA	4,50	0,50	5,00	1,00	Presente	1,00
B260	+	+	AA2H	AA	3,50	0,00	3,50	0,40	Presente	1,00
B261	-	+	A2aumFH	AF	4,50	1,00	5,50	2,00	Presente	2,00

## ANEXO 10

TABELA 15 – RELAÇÃO DAS AMOSTRAS COM PERFIL DE TALASSEMIA BETA HETEOZIGOTA RASTREADAS PARA MUTAÇÃO DE HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA (HH)

Código	Metodologia	Hemocromatose
B002	Fenol	HetC282Y/Normal
B003	Gemomic	Não Amplificou
B005	CETAB	Normal/HomH63D
B006	Fenol	Não Amplificou
B009	Gemomic	- /HetH63D
B011	Gemomic	- /Normal
B013	Fenol	Normal/Normal
B014	Gemomic	Não Amplificou
B018	Gemomic	Não Amplificou
B021	InstaGene	Normal/Normal
B022	Gemomic	Normal/Normal
B023	Genomic	Não Amplificou
B024	Gemomic	Não Amplificou
B032	Genomic	-/Het H63D
B033	InstaGene	Normal/Normal
B034	Fenol	Normal/Normal
B036	Gemomic	Normal/HetH63D
B037	Gemomic	Não Amplificou
B039	CETAB	Normal/HetH63D
B042	Gemomic	Normal/HetH63D
B045	Fenol	Não Amplificou
B048	Gemomic	- / Normal
B050	Gemomic	Não amplificou
B054	InstaGene	Normal/Normal
B058	Gemomic	Não Amplificou
B059	Fenol	Normal/HomH63D
B061	Gemomic	Não Amplificou
B063	Gemomic	Normal/Normal
B064	Gemomic	Normal/Normal
B066	Gemomic	Normal/Normal
B068	CETAB	Normal/Normal
B070	Gemomic	Não Amplificou
B073	Gemomic	Não Amplificou
B075	Gemomic	Não Amplificou
B076	Gemomic	Não Amplificou
B080	CETAB	Normal/Normal
B081	Fenol	Não Amplificou
B083	Gemomic	- /Normal
B084	Gemomic	- /Normal

## Continuação do Anexo 10

Código	Metodologia	Hemocromatose
B085	Gemomic	- /Normal
B089	Fenol	Não Amplificou
B091	Fenol	Não Amplificou
B092	Fenol	Normal/Normal
B097	Fenol	Normal/Normal
B098	Fenol	Normal/Normal
B099	Fenol	Não Amplificou
B100	Fenol	- /Normal
B102	Fenol	Não Amplificou
B103	Gemomic	Normal/Normal
B106	Fenol	Não Amplificou
B107	Fenol	Não Amplificou
B108	Fenol	- /Normal
B109	Gemomic	- /Normal
B110	Gemomic	- /Normal
B114	Fenol	Não Amplificou
B116	Fenol	- /Normal
B118	Fenol	Normal/Normal
B119	Gemomic	- /Normal
B120	Gemomic	Não Amplificou
B122	Gemomic	- /Normal
B123	Fenol	Não Amplificou
B125	Fenol	Não Amplificou
B126	Fenol	Não Amplificou
B136	Fenol	- /Normal
B140	Fenol	Normal/HetH63D
B141	Fenol	Não Amplificou
B147	Fenol	Normal/Não Amplificou
B148	Fenol	Normal/HetH63D
B149	Fenol	Normal/HetH63D
B150	Fenol	Não Amplificou
B155	Fenol	HetC282Y/HetH63D
B156	Fenol	Normal/HetH63D
B158	Fenol	Normal/Normal
B160	Fenol	-/HetH63D
B171	CETAB	Normal/Normal
B176	CETAB	Normal/Normal
B178	CETAB	Normal/Normal
B195	CETAB	Normal/Normal
B198	CETAB	HetC282Y/Normal
B199	CETAB	Normal/Normal
B200	CETAB	Normal/Normal
B201	CETAB	Normal/Normal
B202	CETAB	Normal/Normal
B203	CETAB	Normal/Normal
B204	CETAB	Normal/Normal

Continuação do Anexo 10

Código	Metodologia	Hemocromatose
B205	CETAB	Normal/HetH63D
B206	CETAB	Normal/Normal
B207	CETAB	Não amplificou
B208	CETAB	Normal/HetH63D
B237	CETAB	Normal/Normal
B238	CETAB	Normal/Normal

## ANEXO 11

TABELA 16 - RELAÇÃO DAS AMOSTRAS COM PERFIL DE TALASSEMIA DO TIPO ALFA/BETA RASTREADAS PARA MUTAÇÃO DE HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA (HH)

Código	Metodologia	Hemocromatose
B001	Genomic	- /HetH63D
B012	InstaGene	Normal/Normal
B020	Genomic	Não amplificou
B026	Genomic	Normal/Normal
B027	Genomic	Não amplificou
B030	Genomic	HetC282Y/Normal
B035	Genomic	- / Normal
B040	Genomic	Não Amplificou
B041	Genomic	- / Normal
B044	Genomic	- /Normal
B046	Genomic	Normal/Normal
B047	Genomic	- / Normal
B052	InstaGene	Normal/Normal
B053	Genomic	Normal/Normal
B057	Genomic	Não Amplificou
B060	Fenol	Normal/HetH63D
B121	Fenol	Normal/HetH63D
B209	Fenol	- /Normal

Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

Lya Bueno de Carvalho