

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO” UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

CELSA RAQUEL VILLAYERDE MELGAREJO

BETA TALASSEMIA MENOR: ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

ARARAQUARA

2015

CELSA RAQUEL VILLAVERDE MELGAREJO

BETA TALASSEMIA MENOR: ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Antiquera Leite

ARARAQUARA

2015

Dedico à minha mãe por todo apoio dado durante a trajetória e finalização do curso.

À minha irmã por acreditar sempre em meu potencial.

Ao meu marido pela constante ajuda, incentivo, apoio, dedicação e paciência.

Em especial à minha filha, minha real fonte de motivação que faz me crer que cada dia é um novo começo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor orientador, Dr. Amauri Antiquera Leite pelos ensinamentos, paciência e dedicação ao trabalho.

À professora Dr^a. Regina Célia Vendramini que serviu de guia para o início deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp que me auxiliaram com as pesquisas em banco de dados e possibilitaram a realização de formatação do trabalho seguindo as normas técnicas estabelecidas.

A todos os amigos e familiares que direta e indiretamente apoiaram e colaboraram de alguma forma com a finalização do curso.

Epígrafe

Não Precisa ser fácil, só precisa ser possível.

Bethany Hamilton

RESUMO

As alterações que afetam as hemoglobinas estão relacionadas à síntese estrutural ou quantitativa dos aminoácidos que compõem as diferentes cadeias globínicas (α/β). Existem inúmeras causas que podem resultar nessas alterações, dentre elas as mutações. A talassemia é um dos distúrbios genéticos mais frequentes do homem e mais difundidos no mundo. Fatos históricos, como imigração e colonização populacionais de diferentes partes do mundo, contribuíram para a difusão da patologia em outras localidades, incluindo o Brasil. A forma de manifestação clínica e laboratorial da talassemia do tipo beta menor (BTT), foi objeto de estudo nesta revisão bibliográfica, pois embora seja uma patologia que não mostra claramente manifestações sintomáticas, seus aspectos clínicos e laboratoriais são muito relevantes. A importância do diagnóstico laboratorial das anemias microcíticas e hipocrômicas presentes, tanto em indivíduos portadores de deficiência de ferro como em beta talassêmicos menor, é um ponto chave quando nos referimos a esses parâmetros, pois os índices HCM e VCM apresentam-se com valores extremamente reduzidos (<24 pg e <70 fL) e a quantidade de glóbulos vermelhos muito aumentados ($> 5,0$ milhões/ μ L), na beta talassemia menor em comparação à deficiência de ferro. Portanto os valores contidos no hemograma bem como a presença da inclusão citoplasmática ponteados basófilos e morfologia das hemácias observadas em análise de extensões sanguíneas coradas, é de grande valia na suspeita da beta talassemia menor, tornando-se ponto importante na sugestão da realização de eletroforese de hemoglobina para confirmação do diagnóstico da beta talassemia menor, devido ao aumento quantitativo da Hb A₂.

PALAVRAS CHAVE: Beta talassemia menor, diagnóstico, aspectos laboratoriais, anemia microcítica e hipocrômica.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura da hemoglobina. A- Arranjo das cadeias alfa (roxo) e beta (verde) e o grupo heme (marrom).B- Estrutura quaternária da hemoglobina em diferentes conformações	19
Figura 2- Estrutura molecular do grupo heme	19
Figura 3- Tipos de globinas produzidas em diferentes fases da vida.	21
Figura 4- Ilustração esquemática dos clusters da α e da β globina, mostrando cromossomo 16 e 11 respectivamente e seus sítios regulatórios, HS-40 e LCR.	23
Figura 5- Estrutura do gene beta (β), indicando elementos regulatórios na região promotora, dinucleotídeos (GT-AG), sinal de poliadenilação, códon iniciador (TAA), códon finalizador (P), sítio de adição cauda poli (A).	25
Figura 6- Diferentes mecanismos que causam a β - talassemia	34
Figura 7- Locais onde ocorrem mutações e tipo de fenótipo produzido na β -talassemia.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cadeias e hemoglobinas produzidas conforme desenvolvimento	20
Tabela 2. Classificação e caracterização das β - talassemias	40
Tabela 3. Principais características de portadores de beta talassemia	40
Tabela 4- Valores de referências no Eritrograma	44
Tabela 5. Valores de referência para ferritina	48
Tabela 6. Anemia por deficiência de ferro <i>Versus</i> Beta Talassemia menor (BTT)	55
Tabela 7- Porcentagem de pacientes portadores de beta talassemia menor (BTT) do sexo feminino, agrupados de acordo com valores de número de eritrócitos	56
Tabela 8- Porcentagem de pacientes portadores de beta talassemia menor (BTT) do sexo masculino, agrupados de acordo com valores de número de eritrócitos	56

LISTA DE ABREVIATIURAS E SIGLAS

A	Adenina
α	Alfa
ABRASTA	Associação Brasileira de Talassêmicos
β	Beta
β^+	Beta mais
β^0	Beta zero
β tal	Talassemia beta
C	Citosina
CD	Códon
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Médio
δ	Delta
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EKLF	<i>Erythroid Kruppel-like factor</i>
ϵ	Épsilon
Fil	Filadelphia
GATA-1	<i>Globin transcription Factor-1</i>
G	Guanina
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
Hb A ₂	Hemoglobina A ₂
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Hb Fetal	Hemoglobina Fetal
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Hm	Hemácias
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HS-40	<i>Hipersensitivity Site</i>
Ht	Hematócrito
IVS	<i>Intervening Sequence</i>
LCR	<i>Locus Control Region</i>
Med	Mediterrânea

μl	Microlitros
NF-E2	<i>Nuclear factor-erythroid derived 2</i>
Nt	Nucleotídeo
φβ	Pseudo beta
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pg	Picogramas
PHHF	Persistência hereditária de Hemoglobina Fetal
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNA m	RNA mensageiro
sTfR	Receptor Transferrina Solúvel
T	Timina
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ε	Epsilon
μ	Micro
®	Marca registrada
ζ	Zeta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
OBJETIVOS.....	15
GERAIS	15
ESPECÍFICOS.....	15
JUSTIFICATIVA.....	16
METODOLOGIA.....	17
DISCUSSÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	18
SÍNTESE DE HEMOGLOBINA	18
REGULAÇÃO DA SÍNTESE DAS CADEIAS GLOBÍNICAS.....	22
FATORES ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NO <i>cluster</i> DA BETA GLOBINA	26
ELEMENTOS CIS	26
ELEMENTOS TRANS OU FATORES DE TRANSCRIÇÃO.....	27
AS TALASSEMIAS.....	28
TIPOS DE TALASSEMIA	29
ALFA TALASSEMIA	30
BETA TALASSEMIAS.....	31
BASES MOLECULARES DA BETA TALASSEMIA.....	32
MUTAÇÕES QUE INTERFEREM NO PROCESSO DE TRANSCRIÇÃO.....	34
MUTAÇÕES QUE INTERFEREM O PROCESSO DE <i>SPLICING</i> - PROCESSAMENTO DE RNAm.....	35
MUTAÇÕES QUE AFETAM A TRADUÇÃO	36
MUTACÃO NONSENSE	36
MUTACÃO FRAMESHIFT	36
MUTACÃO NO CÓDON DE INICIAÇÃO	37
CLASSIFICAÇÃO DAS BETA TALASSEMIAS	38
Beta Talassemia <i>major</i> ou maior (BTM).....	38
Beta Talassemia intermédia ou intermediária (BTI)	38
Beta Talassemia <i>minor</i> ou menor (BTT)	38
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	39
METODOLOGIA PARA INVESTIGAÇÃO DE ANEMIAS MICROCÍTICAS E HIPOCRÔMICAS	41
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ANEMIAS.....	41

HEMOGRAMA	41
ERITROGRAMA	41
ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS	42
CURVA DE FRAGILIDADE OSMÓTICA.....	44
QUANTIFICAÇÃO DAS DIFERENTES FRAÇÕES DE HEMOGLOBINA.....	45
ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA	45
HPLC – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	46
PCR – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	46
FERRO SÉRICO E FERRITINA.....	47
BETA TALASSEMIA MENOR: ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS.....	48
ANEMIAS MICROCÍTICAS E HIPOCRÔMICAS: COMO DIFERENCIAR ANEMIA POR DEFICIÊNCIA DE FERRO DE BETA TALASSEMIA MENOR?	50
O PAPEL DO RDW NA DEFERENCIAÇÃO ANEMIA FERROPRIVA E β - TALASSEMIA MENOR.....	52
CONTAGEM DE GLÓBULOS VERMELHOS: UM ÍNDICE RELEVANTE NA DIFERENCIAÇÃO.....	55
A ANÁLISE DE ESFREGAÇO SANGUÍNEO: A IMPORTÂNCIA DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS.....	57
CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61

INTRODUÇÃO

A partir dos pulmões o suprimento de oxigênio aos tecidos é realizado através de uma molécula altamente especializada que está contida no interior dos glóbulos vermelhos, a hemoglobina. Cada glóbulo vermelho contém um valor aproximado de 300 milhões de moléculas da hemoglobina e corresponde a 35% do peso do eritrócito ou glóbulo vermelho. A hemoglobina tem sido considerada um importante objeto de estudo sob o ponto de vista fisiológico, bioquímico e principalmente genético (34).

Alterações na síntese da molécula de hemoglobina sejam estas de forma quantitativa ou qualitativa, podem resultar em doenças hereditárias cuja gravidade poderá estar classificada de acordo com o tipo de alteração ou dano que a hemoglobina possa vir a sofrer (39).

Dentre elas podemos destacar as doenças denominadas de talassemias, resultante de uma redução ou ausência na produção de elementos que compõem as moléculas de hemoglobinas, sendo as globinas de cadeias α (alfa) ou β (beta) (29). Diversos estudos realizados no país vêm demonstrando grande variação na proporção de indivíduos portadores da talassemia alfa e beta no Brasil e no mundo (6,21,24,36).

A beta talassemia é a forma mais importante dentre as talassemias devido ao grau de morbidade e mortalidade causadas pela intensidade de anemia hemolítica. Está amplamente distribuída em todos os continentes, com significativa prevalência na Itália, Grécia e países do Oriente Médio, locais onde a prevalência do gene que origina a beta talassemia varia entre 1% a 30%. Dentre as diversas formas da beta talassemia, a forma denominada menor varia entre 0,5% e 1,5% no Brasil (1).

OBJETIVOS

GERAIS

Proporcionar através deste trabalho, um melhor conhecimento da beta talassemia e suas formas de ocorrência, em especial, a beta talassemia menor, bem como seus aspectos clínicos e laboratoriais.

ESPECÍFICOS

Levando em consideração as variadas formas da beta talassemia, reconhecer cada uma delas se torna necessário principalmente dentre profissionais da área da saúde atuantes em centros de diagnósticos.

O aspecto clínico e laboratorial é de grande importância, principalmente no que se refere à beta talassemia menor, visto que pode ser confundido com outras patologias e até mesmo dificultar a sua classificação das demais beta talassemias, em geral.

JUSTIFICATIVA

A talassemia é um dos distúrbios genéticos mais freqüentes encontrados no mundo, inclusive no Brasil. A forma de manifestação clínica e laboratorial da talassemia do tipo beta menor (BTT), torna-se objeto de estudo nesta revisão bibliográfica, pois embora seja uma patologia que não mostre claramente manifestações sintomáticas, seus aspectos clínicos e laboratoriais são de grande importância, uma vez que ela pode ser confundida com as demais classificações de beta talassemias assim como outros distúrbios sanguíneos, como por exemplo, a anemia por deficiência de ferro. É necessário então reconhecê-la e diferenciá-la a partir de índices hematológicos específicos obtidos através de exames e testes apropriados.

A partir dos aspectos clínicos e laboratoriais tais como, eritrograma e esfregaço sanguíneo, é possível alcançar resultados característicos presentes na BTT e estimar com confiança a presença da patologia, anteriormente ao fechamento do diagnóstico da mesma.

METODOLOGIA

Artigos científicos sobre a temática foram pesquisados nas bases de dados, Scielo, Pubmed, Medline publicados entre os anos de 2004 a 2014, nos idiomas português, espanhol e inglês. Os artigos consultados foram os originais, de revisão e editoriais.

A pesquisa bibliográfica também incluiu livros de hematologia e clínica médica, além da pesquisa de teses e dissertações de mestrado e doutorado em bibliotecas virtuais das Universidades: Unicamp, USP, UGF, UNESP, UFGRS.

Os termos aplicados para a busca do tema no levantamento bibliográfico foram: beta talassemias, beta talassemia menor, diagnóstico da beta talassemia menor.

A normativa utilizada para referenciar os dados consultados foi a 6023 da ABNT que dispõe sobre os elementos a serem incluídos e orienta a compilação e produção das referências. Todos os dados coletados foram utilizados exclusivamente para a finalidade científica.

DISCUSSÃO E REVISÃO DA LITERATURA

SÍNTESE DE HEMOGLOBINA

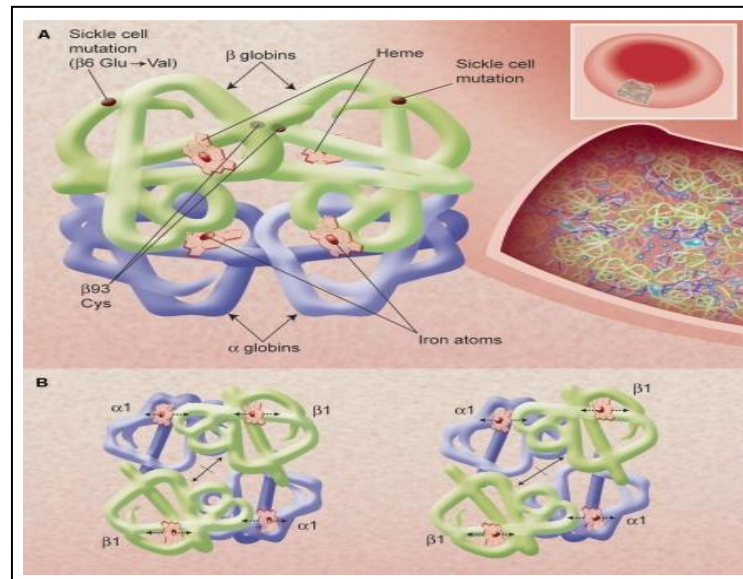
A hemoglobina é composta estruturalmente por quatro cadeias polipeptídicas, denominadas de globinas, sendo que duas são do tipo α (alfa) e outras duas do tipo β (beta) além do grupamento prostético designado de grupo heme. Essa estrutura confere à molécula de hemoglobina o formato de um tetrâmero de aspecto globular. Cada cadeia de globina é produzida de forma simultânea e em quantidades iguais, mantendo-se em equilíbrio constantemente (2).

Tanto nas cadeias beta como alfa, os aminoácidos que as compõe, está estruturado em uma sequência linear, denominada de estrutura primária, sendo que a combinação entre aminoácidos de uma cadeia e outra resultam na formação de outra estrutura, a secundária, a qual assume formato de uma hélice. Esta estrutura helicoidal é mantida por ligações de hidrogênio entre os átomos de ligações peptídicas ao longo das cadeias de globina (3).

Ainda assim, esta estrutura secundária poderá sofrer processo de dobramentos resultando em uma estrutura mais rígida, denominada de estrutura terciária, que por sua vez também é mantida por ligações de aminoácidos entre as cadeias de globina. No entanto, esta estrutura ainda não se mantém firmemente estável, fato que leva à molécula de hemoglobina a assumir um formato globular. Esta forma é um arranjo espacial entre as quatro cadeias de globina que resulta em maior estabilidade da molécula (3).

Esta última descrição do formato da molécula, designada de estrutura quaternária que oferece maior estabilidade à hemoglobina, torna-se importante na compreensão da fisiopatologia da hemólise que ocorrem nas talassemias, pois quaisquer alterações na etapa do processo de síntese de globinas resultam em desequilíbrio destas cadeias culminando em um aspecto heterogêneo de hemoglobinopatias e síndromes talassêmicas (6).

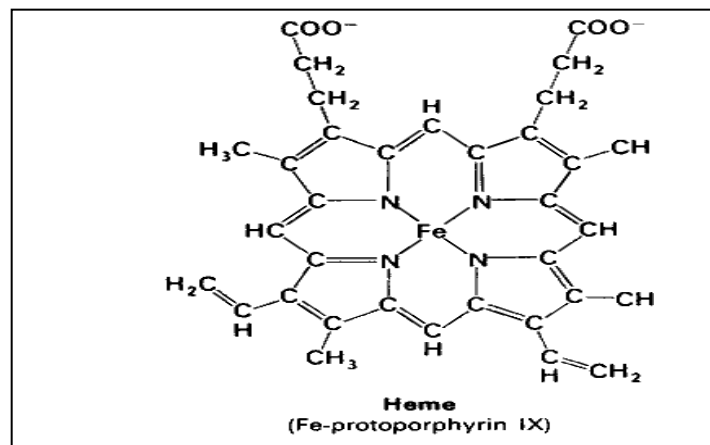
Figura 1- Estrutura da hemoglobina. **A-** Arranjo das cadeias alfa (roxo) e beta (verde) e o grupo heme (marrom). **B-** Estrutura quaternária da hemoglobina em diferentes conformações.



Fonte: SCHECHTER, 2008 (4).

O grupo Heme, formando pelo anel porfirínico, no qual se acomoda um átomo de ferro no centro da molécula, é ligado covalentemente a cada cadeia de globina, no qual pode fazer ligações reversíveis ou irreversíveis com outros átomos, por exemplo, o oxigênio, monóxido de carbono respectivamente dentre outros gases (39).

Figura 2. Estrutura molecular do grupo heme



Fonte: NAOUM, P.C. Hemoglobinopatias, 1997 (39).

Existem três tipos de hemoglobinas no adulto, a saber: a hemoglobina A, composta por um par de cadeias alfa e um par de cadeias beta ($\alpha_2\beta_2$), hemoglobina

A₂, composta por um par de cadeias alfa e um par de cadeias delta ($\alpha_2\delta_2$), hemoglobina Fetal composta por duas cadeias alfa e duas cadeias gama ($\alpha_2\gamma_2$) (4).

As hemoglobinas produzidas durante a vida intrauterina podem ser classificadas conforme a idade gestacional, sendo estas; as hemoglobinas Gower-1 contendo as cadeias $\zeta_2\epsilon_2$, hemoglobinas Gower-2 formadas por cadeias do tipo $\alpha_2\epsilon_2$, hemoglobinas Portland compostas pelas cadeias $\zeta_2\gamma_2$ e a hemoglobina fetal. A hemoglobina Gower-1, Gower-2 e Portland são produzidas no saco vitelino entre a terceira e oitava semana de gestação. Ainda no primeiro mês de gestação, ocorre a produção de cadeias do tipo gama as quais compõem a hemoglobina fetal (4).

Tabela 1. Cadeias e hemoglobinas produzidas conforme desenvolvimento.

GLOBINA				
ALFA	BETA	TETRÂMERO	HEMOGLOBINA	FASE
Zeta	Épsilon	$\zeta_2\epsilon_2$	Gower1	Embrionária
Zeta	Gama	$\zeta_2\gamma_2$	Portland	Embrionária
Alfa	Épsilon	$\alpha_2\epsilon_2$	Gower2	Embrionária
Alfa	Gama	$\alpha_2\gamma_2$	Fetal	Fetal
Alfa	Beta	$\alpha_2\beta_2$	A	Pós nasc.
Alfa	Delta	$\alpha_2\delta_2$	A ₂	Pós nasc.

Fonte: NAOUM, P.C. ;1997 (.39).

A hemoglobina fetal diferentemente das outras hemoglobinas apresenta heterogeneidade estrutural, pois difere em um de seus aminoácidos da posição 136 da cadeia dependendo de quando é produzida. Este tipo de hemoglobina é predominante na fase de vida intrauterina e sofre decaimento de sua produção ao longo da gestação até encontrarmos uma quantidade mínima de produção durante a vida adulta, dando início a substituição para outros tipos de hemoglobinas, dentre elas aquelas produzidas pós-nascimento e de vida adulta, sendo a hemoglobina A, com prevalência no indivíduo adulto, em torno de 96%, a hemoglobina A₂ entre 2 a 3,6 % e a hemoglobina fetal entre 0 a 1% (39).

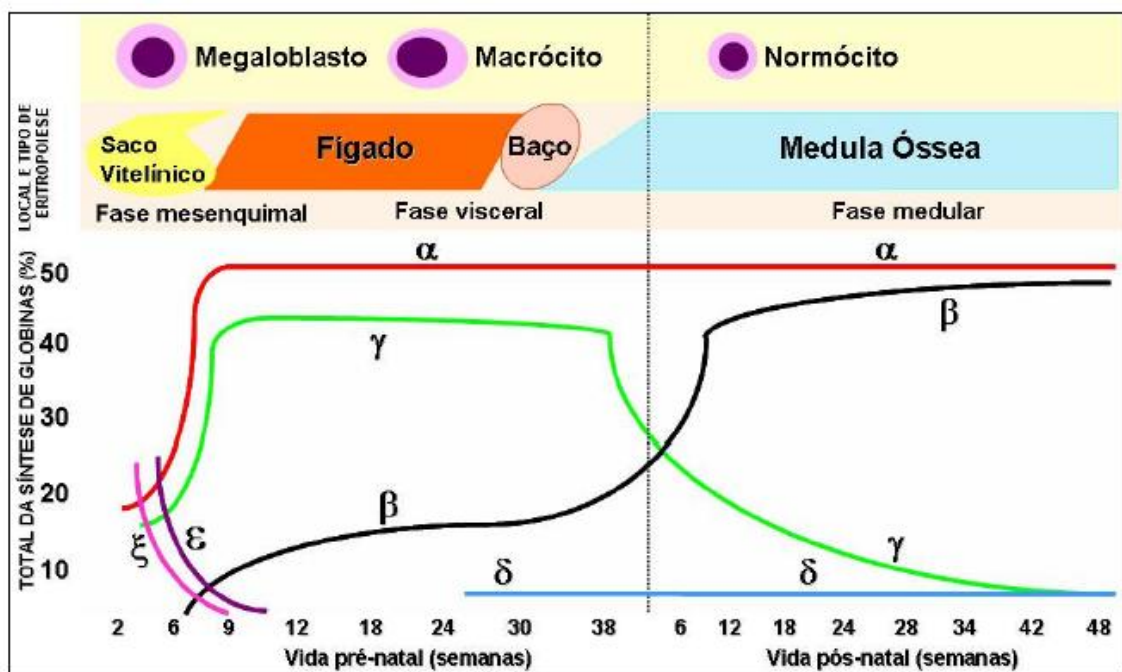
Todas as moléculas de hemoglobinas, considerando as fases de vida intrauterina ou pós-nascimento e adulta, possuem um total de 574 aminoácidos, dos quais 282 estão na composição das cadeias do tipo alfa (141 a.a por globina de

cadeia α) e 292 aminoácidos na composição das cadeias beta (146 a.a por globina de cadeia β) (39).

As interações intermoleculares entre as cadeias alfa e beta, através dos aminoácidos que as compõem, são o que promovem a movimentação das cadeias de globinas fazendo com que ocorra a acomodação da molécula de oxigênio e da molécula de 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG) permitindo o processo de oxigenação e desoxigenação da molécula de hemoglobina (39).

É importante o entendimento da molécula de hemoglobina do ponto de vista estrutural, pois deficiências ou alterações podem resultar em doenças, comprometendo o processo de formação do grupo heme inserido na molécula de hemoglobina, que por sua vez desempenha papel relevante no diagnóstico de variadas enfermidades.

Figura 3. Tipos de globinas produzidas em diferentes fases



Fonte: adaptado de BUNN e FORGET, 1986 (22).

As informações para a síntese de hemoglobina partem de informações contidas no DNA e seguem o mesmo padrão e processos do que a síntese proteica, isto é, replicação, transcrição e tradução fazem parte do mecanismo. Partindo deste pressuposto, o processo tem início no núcleo de DNA onde ocorre a sua replicação que produzirá um pré-RNAm (transcrito inicial), este por sua vez contém sequências de genes inteiros para a formação da hemoglobina (5).

Através do processo chamado *splicing*, são retirados dessa sequência, partes ou regiões (íntrons) que não codificam os aminoácidos para aquela proteína, restando somente sequências que codificará e expressará a molécula da hemoglobina. A região denominada 3' UTR -terminação da fita de DNA- sofre adição de aproximadamente 150 nucleotídeos de Adenina, designada por cauda poli-A. Esta poliadenilação é importante no que diz respeito a estabilidade da molécula em formação (7).

Antes de migrar para o citoplasma, a fita de RNA sofre outro tipo de adição, agora pela guanina, na região 5' dessa fita. Além disto, os dois últimos nucleotídeos sofrem metilação. Tanto o processo de poliadenilação, quanto este último processo descrito, denominado *capping*, confere estabilidade à fita de RNA, para dar início ao processo de tradução no núcleo. Uma vez no citoplasma, o RNA agora processado se liga ao ribossomo através de duas subunidades, assim servirá de molde para a cadeia polipeptídica que será formada. A tradução inicia-se na terminação 5' da fita que corresponde ao grupamento amínico da cadeia de globina e termina na região 3' que corresponde ao grupamento de ácido carboxílico na fita de RNA. Cada sequência de três nucleotídeos corresponde a um aminoácido que será traduzido em cadeias protéicas. Quando o grupo heme é incorporado, a molécula assume seu formato quaternário, dando origem à hemoglobina (5;7).

REGULAÇÃO DA SÍNTESE DAS CADEIAS GLOBÍNICAS

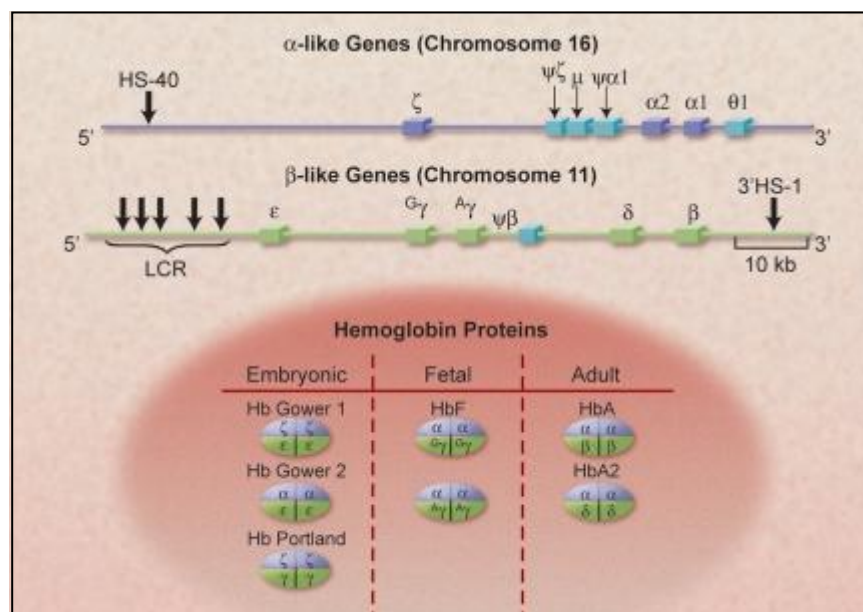
A organização dos genes que codificam as globinas está separada em dois grupos denominados, *clusters*. O primeiro deles inclui os genes que codificam as cadeias zeta e alfa, localizado no cromossomo 16, e o segundo grupo que codificam as cadeias épsilon, gama, delta e beta, localizados no cromossomo 11. Especificamente para o gene da cadeia alfa, próximo ao telômero, região 16 p.13.3 e da cadeia beta, no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5) (8).

Em ambos os clusters, tanto os genes alfa como beta estão arranajados da mesma forma em que são expressos durante o seu desenvolvimento. Todos os genes contêm três (3) éxons e dois íntrons e são regulados por regiões não

codificadoras denominadas de MCS (*Multispecies Conserved Sequences*) e LCR (*Locus Control Region*) (6). Na cadeia alfa, o MCS é composto por quatro sequências não codificantes designadas de MCS-R₁ a MCS-R₄. O MCS-R₂ também denominado de HS-40 (*Hipersensitive Site- 40*) é essencial na regulação da cadeia do tipo alfa e está localizado a 40 Kb antes do gene zeta (8).

A regulação dos genes de beta globina no cromossomo 11 ocorre através de cinco sítios sensíveis a DNase I, denominado de LCR. Esses sítios estão posicionados entre 5 Kb e 25 Kb na extremidade da posição 5' e recebem o nome de HS-1 a HS-5 (9).

Figura 4- Ilustração esquemática dos clusters da α e da β globina, mostrando cromossomo 16 e 11 respectivamente e seus sítios regulatórios, HS-40 e LCR.



Fonte: SCHECHTER, 2008 (4).

Tendo em vista o tema do trabalho proposto, enfocaremos os aspectos de mecanismos de regulação ocorridos na produção das cadeias beta.

Existem dois elementos que estão envolvidos na regulação dos genes da beta globina, um deles é denominado de elemento regulador **cis**, e fazem parte dele sequências dentro ou distantes do próprio gene, tais como promotores, silenciadores e o LCR. Além disto, coexistem os elementos chamados de fatores de transcrição ou elementos **trans**. A regulação é feita a partir da interação dentre esses dois complexos e cada um deles serão descritos posteriormente (10).

O LCR do gene beta assume uma função crítica no que diz respeito à regulação da expressão do gene da beta globina, pois esse complexo é responsável por manter a cromatina na sua forma aberta. Deste modo, os fatores de transcrição conseguem interagir com as seqüências cis e dar início ao processo de transcrição (8).

A seqüência de genes da beta globina contém 146 aminoácidos e 1600 pares de bases, três éxons que representam a região codificadora de aminoácido e dois íntrons, região não codificadora de aminoácidos e que posteriormente é retirado no processo de *splicing*; estes últimos recebem o nome de IVS1 e IVS2. O primeiro íntron está constituído de 122 a 130 pares de bases enquanto que o IVS 2 possui aproximadamente 805 a 904 pares de bases (8).

O IVS1 interrompe a seqüência de genes no códon 30-31 e o IVS 2 interrompe a seqüência de genes nos códons 104-105. Já os éxons 1 e 3 codificam a região que não estará inserido o grupo heme, enquanto que o éxon 2 codifica essa região de inserção do grupamento hemínico na cadeia de beta globina (8).

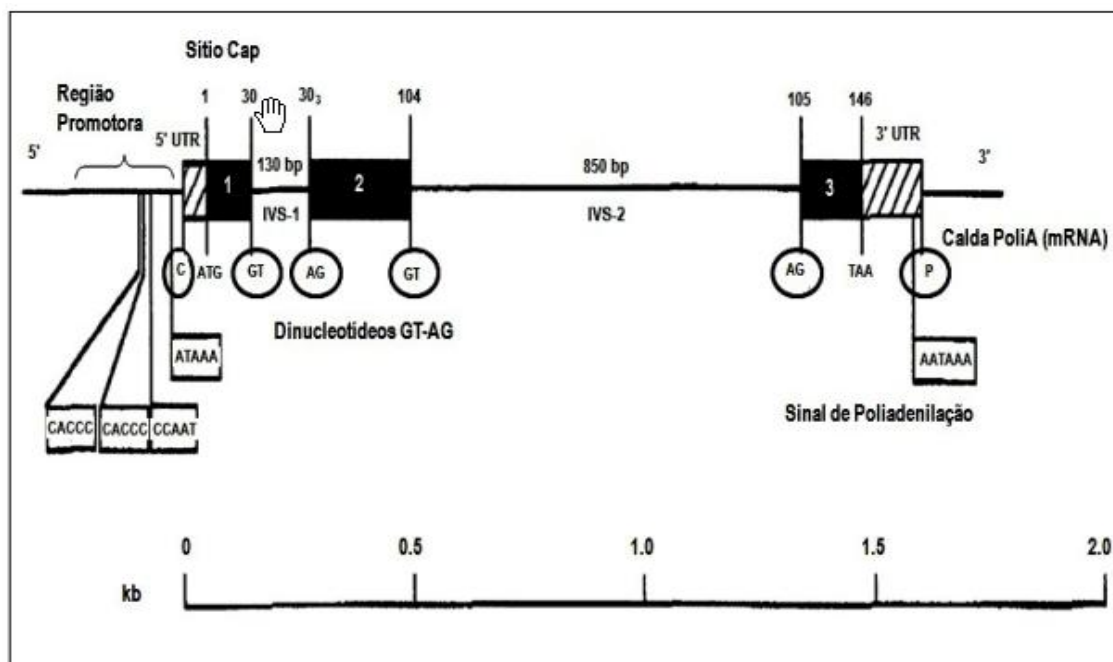
Existem quatro seqüências de nucleotídeos altamente conservadas localizadas na extremidade 5' da região promotora, elas são importantes na expressão do gene da beta globina por desempenharem papel na regulação do processo de transcrição. Essa região é denominada também de boxes e compreende quatro tipos de seqüências. A primeira, em -30nt está presente o TATA Box, seqüência rica em timina e adenina, composta por cinco nucleotídeos, ATAAA; a segunda seqüência em -75 nt é composta por um CAAT box, a terceira e a última são compostas por CACCC em -90 nt e -110 nt respectivamente (9; 11).

Além destas regiões, que são elementos importantes na ativação do gene de beta globina, existem outras regiões que também exercem a função de controlar a expressão do gene β como, por exemplo o LCR mencionado anteriormente, as junções éxon-íntron e a região de terminação 3'UTR situada no final da seqüência de nucleotídeos no RNAm, que não é traduzida (7).

Entre as regiões 5' e 3' da fita do RNAm, estão inseridos os íntrons e os éxons. A região 5' constitui-se de uma região não traduzida assim como o 3', no entanto ocupa um trecho correspondente a cinquenta nucleotídeos, desde a região cap e o códon de iniciação (ATG). A 3' UTR é constituída pela região entre o códon terminador e a cauda poli A. Isto corresponde a 132 nucleotídeos com uma seqüência conservada que servirá de sinalizador de clivagem da fita em 3'. As

junções éxon-íntron que também estão envolvidas na regulação são compostas de sequências invariantes formadas por dinucleotídeos, normalmente guanina e timina. A correta retirada dos íntrons no processo de *splicing* ocorre nas regiões denominadas de sequência consenso e correspondem aos três últimos nucleotídeos dos éxons e aos seis primeiros nucleotídeos dos íntrons em 5' e pelos dez últimos nucleotídeos dos íntrons e o primeiro nucleotídeo do íntron em 3' (2;12).

Figura 5- Estrutura do gene beta (β), indicando elementos regulatórios na região promotora, dinucleotídeos (**GT-AG**), sinal de poliadenilação, códon iniciador (**TAA**), códon finalizador (**P**), sítio de adição cauda poli (A).



Fonte: THEIN, 1998 (11).

FATORES ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NO *cluster* DA BETA GLOBINA

ELEMENTOS CIS

Promotores

Consistem principalmente, de três sequências de genes conservadas, encontradas no TATA box, CCAAT box e CACC box em duplicata. Estas sequências contêm a informação do correto posicionamento dos genes para dar início ao processo de transcrição, além de serem reconhecidas pelos fatores de transcrição, como o GATA-1, por exemplo, descrito a seguir (13).

Silenciadores

Como o próprio nome já sugere, estes elementos podem se ligar à proteínas que reprimem ou suspendem o processo de transcrição. Desta forma eles interferem na atividade dos promotores e podem controlar a expressão da produção de algum gene, como por exemplo, durante a transição da síntese de cadeias fetal e adulta (14).

Acentuadores

Diferentemente dos silenciadores, estes elementos em vez de suprimir, podem acentuar o processo de expressão de determinados genes. Eles podem estar localizados proximamente ao gene quanto no próprio gene (15).

LCR

O **Locus Control Region** é um dos, se não o principal, elemento de regulação da expressão do gene da beta globina. Através de diversos estudos, foi possível explicar seu funcionamento pela abertura da cromatina, tornando-a ativa para o processo de transcrição (16).

Existem duas propostas que confrontam o mecanismo pelo qual o LCR interage com elementos promotores do gene. Um deles defende a teoria de formação de ligação do LCR com os promotores. No entanto outros estudos apontam que o mecanismo que de fato ocorre é através da formação de alças ou *looping*, nos clusters da beta globina (16).

Demarcadores

Estes elementos definem as regiões de abertura e fechamento da cromatina, desta forma determina a conformação mais estável para interação dos elementos de transcrições com outras regiões dos genes, isto é, define o domínio da cromatina no lócus da beta globina. Assim haverá uma expressão de genes específicos para cada estágio de desenvolvimento da cadeia de globina, como as fetais e adultas (17).

ELEMENTOS TRANS OU FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Fatores de transcrição que estão envolvidos na expressão da beta globina são: GATA-1, NF-E2, EKLF, além de alguns fatores específicos dependendo do estágio. Estes elementos detêm o papel de ativador ou repressor de transcrição, dependendo da região de ligação e grau de interação com as demais proteínas (18; 19; 20).

AS TALASSEMIAS

As patologias associadas às hemoglobinas podem ser definidas como hemoglobinopatias, nas quais quaisquer alterações que causem danos à hemoglobina, seja de característica quantitativa ou qualitativa, podem estar inseridas nesta denominação (34).

Entenda-se por danos ou alterações qualitativas da hemoglobina, quando há produção de cadeias de globinas defeituosas estruturalmente, as quais levam a hemoglobina a perder sua capacidade funcional. Este defeito pode estar localizado em um ou mais tipos de cadeias peptídicas que fazem parte da composição da globina, ou também, na maneira como as globinas se agrupam para formar as frações da hemoglobina como um todo (5).

No entanto, quando há redução ou supressão da síntese de hemoglobinas, terão danos quantitativos; uma vez que não ocorrem defeitos na estrutura da hemoglobina, ela apenas deixa de ser ou é pouco sintetizada (34).

A talassemia é então definida como uma condição na qual ocorre a redução ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias de globinas (α/β) que formam a hemoglobina levando ao desequilíbrio, na produção destas cadeias, já que normalmente estão expressas em igual quantidade (21).

Esse desequilíbrio na síntese de cadeias representa o aspecto fisiológico básico das síndromes talassêmicas, tendo como resultado, um excesso relativo de cadeias que está sendo produzida normalmente pelo fato de ocorrer a supressão parcial ou nula da outra cadeia de globina (22).

Na ausência da cadeia complementar com a qual forma-se o tetrâmero na estrutura da hemoglobina, o excesso da cadeia normal torna-se instável e formam-se agregados, os quais precipitam no interior do citoplasma da célula, ocasionando assim uma lesão na membrana e consequentemente resultam em uma destruição prematura dos eritrócitos, culminando em hemólise (22; 23).

A denominação, *Talassemia* vem do grego “Talassa” que significa “mar” e “emia” que significa sangue, isto porque foram evidenciados indivíduos portadores desta alteração hemoglobínica, residentes próximos ao Mar Mediterrâneo, assim surgiu o nome desta patologia. Este nome foi empregado pela primeira vez em 1936 por dois pesquisadores, Bradaford e Whipple. Anos após a sua primeira descrição,

os pesquisadores norte americano, Thomas Cooley e Pearl Lee, também identificaram a doença e assim passou a ser conhecida como anemia de Cooley (24).

A partir daí, várias investigações foram feitas a respeito das hemoglobinas e patologias relacionadas, como por exemplo, as talassemias, que através de Venom Ingram e Anthony Stretton após investigação em portadores com esta síndrome, receberam classificação conforme é utilizado hoje, alfa e beta talassemia (25; 26). Não é incomum encontrar a *talassemia*, difundida hoje em diversos continentes dentre eles asiático e africano e também no americano, havendo assim uma distribuição mundial. No Brasil, a talassemia surgiu pela intensa imigração e miscigenação dos povos que culminou na inclusão da herança genética desta patologia em nossa população (27; 28).

TIPOS DE TALASSEMIA

As talassemias são classificadas e recebem denominação de acordo com a cadeia de globina que é afetada. Sendo assim, podem existir diversos tipos de talassemias. Dentre eles podemos destacar as talassemias alfa (α) no qual a síntese de globina do tipo alfa está reduzida ou suprimida; talassemia beta (β), quando a globina beta está diminuída ou suprimida, e assim para as demais cadeias que compõem a hemoglobina, como a gama (γ), delta (δ), delta/beta ($\delta\beta$), épsilon/gama/delta/beta ($\epsilon\gamma\delta\beta$). No entanto, as mais conhecidas e relevantes clinicamente são as talassemias alfa (α) e beta (β), por estarem associadas a uma maior gravidade da patologia (29).

ALFA TALASEMIA

As α -talassemias são caracterizadas pela redução total ou parcial das cadeias alfa de globina em indivíduos afetados. Elas surgem por deleções de genes que codificam a cadeia alfa (α_1 e α_2) de globina na hemácia. Estas deleções podem estar associadas a uma ou mais cadeias de globina, expressando desta forma as talassemias α^+ e α^0 respectivamente, na qual a α^+ sugere que ainda há produção de cadeias do tipo alfa enquanto que a α^0 , indica que nenhuma globina do tipo alfa está sendo sintetizada (29).

Em sua grande maioria, as lesões ou defeitos moleculares de genes relacionados as alfa talassemias, estão ligadas ao gene que expressa a cadeia α_2 . Isso se deve ao fato de que a síntese deste tipo de globina é maior em relação ao da produção de globina do tipo α_1 . Portanto, o índice de manifestações fenotípicas relacionadas ao gene de α_2 seria mais grave e também mais fácil de ser identificável (29).

Os mecanismos que explicam a deficiência na produção das cadeias de globinas na alfa talassemia são diversos, no entanto podem ser classificados como fatores deletoriais ou não deletoriais, sendo que esta última é menos frequente (5; 29).

Entenda-se por fatores não deletoriais, erros que podem interferir no processamento de RNA, em sua tradução ou até problemas no transcrito, tais como inserções, mutação de ponto dentre outros (9). Porém existem duas principais deleções que originam a alfa talassemia (α^+) e que são mais frequentes, a primeira que envolve a perda de um fragmento de 3,7 Kb no cromossomo de DNA e outra que envolve a perda de um fragmento de 4,2 Kb de DNA (5; 29).

Aquelas deleções que originam a α^0 talassemia, removem o grupamento alfa inteiro e são classificadas fenotipicamente como --^{MED}, --^{FIL}, --^{SEA}, --^{Thai}. Estas denominações referem-se ao local de incidência deste tipo de síndrome talassêmica. Indivíduos considerados normais possuem dois genes α por genoma haplóide, constituindo o genótipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ (28).

Tratando-se de talassemias α^+ , a participação de um alelo na composição da cadeia de hemoglobina ainda está envolvida, sendo assim o indivíduo portador deste tipo de talassemia deverá possuir um genótipo $-\alpha/\alpha\alpha$. Clinicamente, isto implica em

uma patologia mais branda, uma vez que em talassemias do tipo α^0 todos os genes que codificam esta cadeia estão suprimidos, a deleção portanto envolve praticamente todo o grupamento do gene, resultando em um genótipo do tipo $--/\alpha\alpha$ ou $-\alpha/-\alpha$, evidenciando alterações hematológicas mais relevantes (26).

Outros tipos de alfa talassemias também ocorrem, e serão apresentados a seguir:

- Doença da Hemoglobina H (HBH), ocasionada pela ausência de três alelos da globina alfa, indivíduos portadores apresentam genótipo do tipo $--/-\alpha$ e alterações clínicas e laboratoriais importantes (31).
- Hidropsia Fetal, também pode ser denominada de talassemia homozigota, pois nenhuma cadeia de globina alfa (α_1 e α_2) é produzida, o genótipo se apresenta como $--/--$, portanto as hemoglobinas fetais, A e A₂, também se encontram prejudicadas no que diz respeito à sua composição. Esta condição leva a um agravamento da patologia, o qual pode ser considerado incompatível com a vida extrauterina. Dentre os fetos que alcançam o nascimento, em poucos dias chegam a óbito (5; 32).

BETA TALASSEMIAS

Estima-se que a beta talassemia, assim como as outras síndromes ou formas talassêmicas, foi introduzida no Brasil através da intensa ocupação de outros povos, e consequente miscigenação decorrente desta forte imigração forçada em busca de trabalho e melhores condições de vida em nosso país, principalmente por italianos e povos da região do Mediterrâneo, ocorridos em meados do século XIX (32).

Assim como as alfa talassemias, as betas talassemias também são caracterizadas pela supressão parcial ou total na produção de cadeias do tipo β nos eritrócitos de indivíduos afetados, representadas respectivamente por β^+ e β^0 . Isto é, portadores de talassemia beta zero (β^0), não produzem nenhum tipo de cadeia beta, somente a alfa, já portadores caracterizados por ser portador do tipo β^+ produzem

parcialmente este tipo de cadeia. Por se caracterizar de uma patologia genética e hereditária, a beta talassemia pode ocorrer em homozigose ou heterozigose. A talassemia beta é classificada como uma patologia de herança autossômica recessiva, pois são necessários dois genes anormais para se produzir um fenótipo detectável da patologia (33; 34).

Com a redução das cadeias globínicas funcionais do tipo beta, ocorre consequentemente um “acúmulo” das cadeias alfa, que precipitam dentro dos eritrócitos e originam os chamados corpos de inclusão. Estes precipitados causam danos na membrana das hemácias, que levam ao quadro de anemia, uma das principais manifestações clínicas da beta talassemia, uma vez que o ferro não está ligado ao grupo heme e sim livre na circulação sanguínea. Uma aceleração no processo oxidativo ocorre por conta desse ferro livre, não ligado, lesionando ainda mais a membrana dos eritrócitos facilitando a sua destruição precocemente. Este processo de aceleração e destruição precoce da hemácia recebe o nome de eritropoese ineficaz (28; 33).

A gravidade desta doença, portanto, está relacionada também com o nível de desequilíbrio provocado pela redução parcial ou total do gene que expressa a beta globina.

BASES MOLECULARES DA BETA TALASSEMIA

A causa da beta talassemia ou processos responsáveis pelo aparecimento da doença são decorrentes de mutações na sequência da fita de DNA. Estas mutações incluem principalmente a mutação de ponto, grandes deleções e inserções ou simplesmente a inversão ou rearranjo dos nucleotídeos que compõe o gene da beta globina (39).

As deleções e inserções de um ou mais nucleotídeo na sequência gênica é denominada de mutações *frameshift*. Estas mutações interferem nos processos de transcrição, processamento de RNA (*splicing*) e por último ao processo de tradução. Segundo estudos realizados, afirmar que a causa da beta talassemia ocorre por deleção de nucleotídeo é bem rara. Este tipo apresenta-se em casos isolados e a

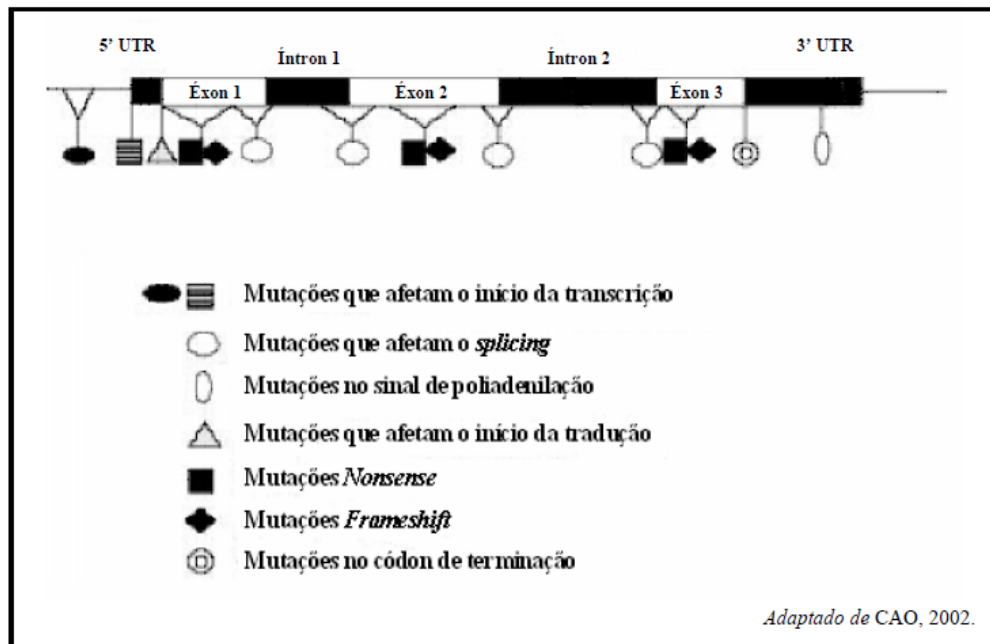
deleção pode ocorrer em qualquer local do gene que codifica a cadeia beta. Desta forma, pode-se dizer que há uma variabilidade no que diz respeito à quantidade de bases afetadas possíveis (40).

Mutações por deleções são divididas em dois grupos dependendo da quantidade de bases afetadas ou deletadas. A primeira pode ser chamada de pequenas deleções, pois ocorrem deleções que acabam excluindo de 7 a 1605 pares de bases, enquanto que o segundo grupo envolve números maiores de exclusão, isto é, a exclusão acontece a partir de 1606 pares de bases. Normalmente este tipo de deleção ocorre proximamente da região 5' e 3' na fita que contém a sequência de gene para a beta globina (40).

Portanto, as mutações não deletérias são as causas mais comuns para a manifestação da síndrome talassêmica, em especial a beta talassemia. As alterações na sequência de gene podem ser observadas ao longo de todo o processo que resultará na produção final da cadeia de globina beta, podendo assim manifestar-se em várias etapas alterando a síntese do produto final (7).

Dentre as mutações mais estudadas da beta talassemia, podemos destacar CD 39, IVS 1-110, IVS 1-6, respectivamente mutação no códon 39 e nos íntrons 1-110 e 1-6 (41). No Brasil, as mutações mais comuns além da CD 39, são as IVS 1-110 (G→A) e a IVS1-6 (T→C) sendo que na região Sul e Sudeste as mais frequentes estão no códon 39 e na região Nordeste as outras duas citadas respectivamente (36). Estas mutações serão detalhadas logo a seguir.

Figura 6- Diferentes mecanismos que causam a β - talassemia



Fonte: CAO, A.; 2002 (102).

MUTAÇÕES QUE INTERFEREM NO PROCESSO DE TRANSCRIÇÃO

Alterações na região promotora ou em elementos promotores como o TATA Box levam a um processo inadequado da transcrição do gene. A dificuldade de interação dos fatores de transcrição (cis) ao LCR causados pela mutação resulta em uma falha no início do processo de transcrição. A taxa desse processo é reduzida de 75% a 80% pela redução da ligação do RNA polimerase na fita de DNA e o fenótipo estabelecido para estes casos geralmente é de β^+ ou β^{++} (42).

Várias substituições são conhecidas na região promotora e 5'UTR, dentre elas a ocorrida na posição -31nt, em que há a troca de uma adenina por guanina (A→G); além de T→C em -30nt, assim como A→C e A→G na posição -28nt. Estas mutações fazem parte da região do TATA Box e o tipo de alelo gerado é β^+ (43). Existem ainda mutações na posição -73nt, denominada de CAT Box, onde ocorre a troca de A→T. Esta mutação tem como resultado uma produção de RNAm de forma levemente reduzida e gera o alelo β^{++} (44).

Já nas sequências em duplicata, CACCC box, são conhecidas mutações nas posições -97 nt e em -101 nt onde há troca de C por T (C→T). Este último é classificado de beta talassemia silenciosa, β^{silent} (10; 45).

MUTAÇÕES QUE INTERFEREM O PROCESSO DE *SPLICING*-PROCESSAMENTO DE RNAm

As mutações que afetam o processamento de RNA que se constituem na retirada de íntrons restando apenas os éxons que são codificados e expressos futuramente em cadeias de globina, é a causa mais comum da beta talassemia (7).

Existem diversos tipos, desde aqueles que afetam a região de junção entre um íntron e éxon, até aqueles que podem ocorrer dentro do próprio éxon, além de mutações nas regiões de clivagem da extremidade 3' UTR. O resultado de um RNAm ineficiente pode surgir pela alteração anormal da emenda de um éxon, pois o RNAm não emendando será degradado no interior do núcleo levando a uma β^0 talassemia (9).

A ocorrência da β^+ talassemia ou β^0 talassemia decorre do tipo de nucleotídeo que está sofrendo alteração. Por exemplo, a substituição da Guanina por uma Timina da posição 5 do IVS-1 resulta em β^+ porém severa. Já quando ocorre troca de uma Timina por Citosina na posição 6, o fenótipo é classificado como sendo β^+ talassemia, assumindo uma forma mais branda (7).

Os fenótipos nos locais criados como sendo novos locais de *splicing* dentro dos éxons podem ser classificados como variáveis, pois dependendo de onde ocorre o processamento de RNAm haverá formas diversas de fenótipos a serem considerados. Um exemplo deste tipo de mutação ocorre na posição 110 do IVS-1, onde há a troca de uma Guanina por Adenina e da mutação na posição 116 que resultará em uma β^0 por produção insuficiente de RNAm (7; 45).

Outro fator muito comum relacionado ao novo local de *splicing*, é quando ocorre a substituição de um nucleotídeo que vai alterar toda sequência de genes, fazendo com este “ative” o processamento de RNAm, isto é, ocorre a formação de

sítios denominados críticos, pela mutação de um nucleotídeo dentro de um éxon, que faz com que esse éxon passe a ser visto como um íntron, local onde ocorre o *splicing*, resultando em uma produção anormal de RNAm (9).

As mutações que ocorrem na região 3'UTR ou na sequência AATAAA, são caracterizadas por redução parcial na produção de cadeia beta, desta forma os fenótipos encontrados podem ser classificados como β^+ , β^{++} , e β^{silent} (8).

MUTAÇÕES QUE AFETAM A TRADUÇÃO

As mutações que afetam o processo final que é a tradução podem ser classificadas em três tipos:

MUTAÇÃO NONSENSE

Este tipo de mutação, também conhecido como mutação sem sentido, é resultante da troca de uma base de um códon por outra base que faça com que o processo de tradução não prossiga. Isto é, através dessa troca é gerado um códon finalizador (*stop códon*) no RNAm. É no códon 39 que esta mutação ocorre com a troca de uma Citosina por Timina (CAG→TAG) (7; 11; 45; 46; 47; 48).

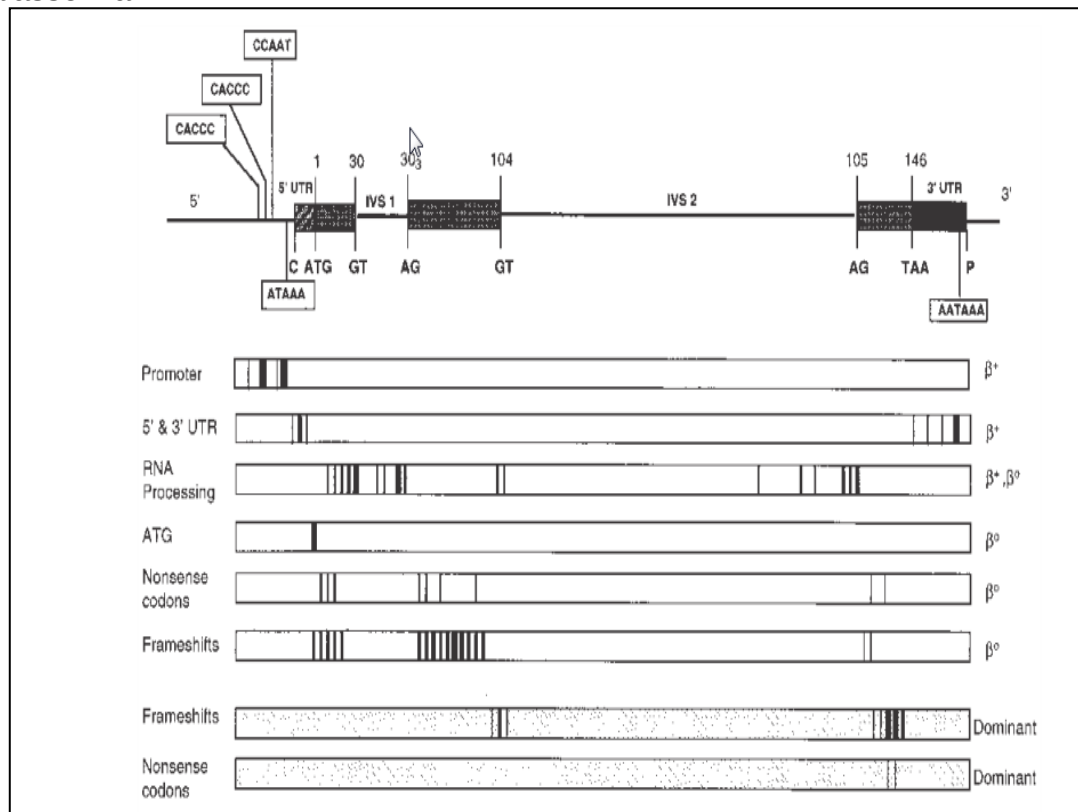
MUTAÇÃO FRAMESHIFT

A mutação *frameshift* culmina na terminação prematura da transcrição, porém em vez de haver uma troca entre bases, há uma inserção ou deleção de nucleotídeos na região codificadora. Isto faz com que ocorra uma mudança no códon que será expresso ou traduzido posteriormente, interferindo na leitura da fita erroneamente (7, 45).

MUTAÇÃO NO CÓDON DE INICIAÇÃO

Este tipo de mutação é importante visto que o processo de transcrição não tem início, já que o sinal para que ocorra a iniciação foi perdido (7; 48).

Figura 7- Locais onde ocorrem mutações e tipo de fenótipo produzido na β -talassemia.



Fonte: HO P.J, THEIN, S.L.; 2000 (8)

A ocorrência da beta talassemia segue padrões genéticos e moleculares, conforme descrito anteriormente. As alterações na produção de cadeia de beta globina estão associadas às mutações em diferentes genes reguladores e de expressão gênica, dentre outros (33).

Desta forma, a beta talassemia pode receber três tipos de classificações clínicas, as quais são descritas brevemente a seguir.

CLASSIFICAÇÃO DAS BETA TALASSEMIAS

Beta Talassemia *major* ou maior (BTM)

É conhecida como a forma grave da doença e ocorre em homozigose ou heterozigose, podendo ser classificadas como sendo do tipo β^+ ou β^0 . Na β^+ ocorre herança de dois complexos gênicos acometendo falhas parciais no gene que codifica este tipo de cadeia, enquanto que na β^0 a falha ocorre totalmente nesse gene. Sem tratamento apropriado, indivíduos portadores deste tipo de beta talassemia, necessitam normalmente de transfusões sanguíneas, pois são dotados de anemia severa causada por hemólise intramedular que pode levar a alterações orgânicas e tóxicas causando sérios danos à saúde culminando até em morte (7).

Beta Talassemia intermédia ou intermediária (BTI)

As características deste tipo de beta talassemia se classificam como apresentando um quadro clínico mais ameno em relação à beta talassemia maior, não implicando numa grande frequência de transfusões sanguíneas, porém se mostra mais sintomática do que a menor. As formas mais prevalentes do tipo de talassemia intermediária são do tipo β^+/β^+ (33).

Beta Talassemia *minor* ou menor (BTT)

Também é denominado de traço talassêmico por se mostrarem clinicamente assintomáticos e normalmente não necessitam de tratamentos, embora apresentem

índices hematológicos alterados (7). Os alelos β^+ e β^{++} estão associados a este tipo de beta talassemia, também denominado de heterozigoto (35).

O fato das regiões Sul e Sudeste serem prevalentes quanto à incidência de portadores de beta talassemia, está associado aos movimentos migratórios ocorridos no Brasil em meados do século XIX. Maciços contingentes de imigrantes, principalmente italianos, que vieram ao Brasil nos anos de 1880 aproximadamente ocuparam estas regiões dando prevalência a estas doenças (28).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As principais características observadas em indivíduos portadores de beta talassemia maior são anemia grave desde o nascimento, hepato e esplenomegalia, febre, vômitos, atraso no crescimento, anorexia, colúria. No eritrograma observamos anemia microcítica e hipocrômica, anisocitose, poiquilocitose, células em alvo, esquizócitos e algumas formas raras das hemácias. Na beta talassemia intermédia as manifestações clínicas são variadas, vão desde quadros graves a brandos, não necessitando de transfusões sanguíneas recorrentes. Anomalias morfológicas, além de esplenomegalia e alterações esqueléticas também podem ser observadas na talassemia intermédia (5).

Tabela 2. Classificação e caracterização das β - talassemias

Nº de alelos	Denominação clínica	Caracterização
1 alelo	B-tal. menor ou traço talassêmico ou heterozigótico, β/β^+	Anemia assintomática com hipocromia e microcitose, elevação de Hb A2
2 alelos	B tal. Intermediária, β^+ , síndrome β^0/β^+	Anemia de gravidade mediana, não dependente de transfusões. Síntese de cadeia β reduzida; Hb A2 diminuída.
2 alelos	B-tal. Maior, anemia de Cooley, talassemia β^0 ou síndrome β^0/β^0	Ausência de produção de cadeia β ; Hb A ausente; HbFetal aumentada

Fonte: Adaptado NUSSBAUM, R.; 2008

Tabela 3. Principais características de portadores de beta talassemia.

	SINTOMAS	ERITROGRAMA	TESTES ESPECÍFICOS	DEMAIS TESTES
B TALASSEMIA MENOR	Fraqueza, cansaço	Anemia microcítica e hipocrômica. Redução dos valores de Hb, VCM, HCM, com aumento de GV.	Hb A2 aumentada (4 a 7%) Hb fetal normal ou levemente aumentada	Resistência osmótica (NaCl 0,36%) positivo em 90 % dos casos. Ferritina normal ou discretamente elevada. Ferro sérico normal
B TALASSEMIA MAIOR	Anemia grave ao nascer. Hepatomegalia. Atraso no crescimento.	Anemia hipocrômica marcante. Valores extremamente baixos de: GV, Hb, Ht	Hb fetal aumentada. Eletroforese de Hb: Hb AF; Hb F	Resistência osmótica (NaCl 0,36%) positivo. Ferritina e ferro sérico muito aumentados

Fonte: Adaptado Manual de doenças Eritrócitos, Ciências News, Naoum, PC

Os aspectos clínicos e laboratoriais da beta talassemia menor são clinicamente menos severas do que as demais retratadas aqui, no entanto, as descrições desses aspectos não deixam de ser irrelevantes e será abordada mais detalhadamente a seguir, como parte temática do referido trabalho.

METODOLOGIA PARA INVESTIGAÇÃO DE ANEMIAS MICROCÍTICAS E HIPOCRÔMICAS

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ANEMIAS

As várias formas encontradas de anemias podem ser diagnosticadas através de diferentes metodologias laboratoriais associadas aos estudos clínicos. As técnicas para obter diagnóstico podem ser divididas em análises hematológicas, bioquímicas e genéticas. As mais utilizadas são: hemograma com o eritrograma e índices hematimétricos; pesquisa ou análise de características morfológicas das hemácias no esfregaço sanguíneo corado; curva de fragilidade osmótica; eletroforese de hemoglobina em pH ácido e alcalino com quantificação das frações de hemoglobinas; a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC; entre outras.

HEMOGRAMA

O hemograma é um exame laboratorial que analisa quantitativa e qualitativamente elementos que compõe o sangue, os chamados elementos figurados. O exame compreende três partes a serem avaliadas, o eritrograma, leucograma e plaquetograma.

ERITROGRAMA

Constitui o estudo da série vermelha podendo contribuir com informações importantes relacionadas às alterações nos eritrócitos. Faz parte do eritrograma a contagem de glóbulos vermelhos, a determinação da hemoglobina e hematócrito, os

índices hematimétricos e análise dos caracteres morfológicos e tintoriais dos eritrócitos em distensão sanguínea corada.

A contagem de hemácias, até alguns anos atrás, era feita manualmente através da técnica de contagem em câmara de Neubauer, que fornece a quantidade de hemácias por microlitros de sangue, o que acarretava um erro muito alto. Na atualidade são utilizadas as contagens de hemácias provenientes de contadores eletrônicos, com um grau de acerto muito bom (58).

Na determinação de hemoglobina é medida a concentração deste pigmento vermelho que transporta o oxigênio presente no interior do glóbulo vermelho, sendo um dos testes mais realizados nos laboratórios clínicos por sua importância clínica, pois valores encontrados abaixo da referência (considerando sexo e idade) podem sugerir quadros de anemias e valores superiores aos normais podem considerar uma policitemia ou eritrocitose (61).

O hematócrito exprime a proporção de hemácias presentes por volume total de sangue e está correlacionado com o tamanho e números de glóbulos vermelhos. O resultado de exame é expresso em porcentagem e quando assume valores abaixo do normal pode indicar um quadro de anemia por perda sanguínea aguda ou crônica, ou destruição aumentada de eritrócitos e carências nutricionais (58).

ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS

Com os valores obtidos do número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, podem-se calcular os índices hematimétricos como o Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

V.C.M – Volume Corpuscular médio (Hematócrito/nº hemácias)

Relaciona um determinado volume de hemácias (hematócrito) com o número total de células contida nesse mesmo volume e expresso em fentolitros. A sua determinação é útil para a orientação diagnóstica nos diferentes tipos de anemias conforme variação de seu valor, diferenciando-as entre anemias do tipo microcítica

(eritrócito de pequeno volume), normocítica (eritrócitos de volume normal) ou macrocíticas (eritrócito de grande volume) (63).

H.C.M – Hemoglobina Corpuscular Média (Hb/hemácia)

Representa o conteúdo médio de Hb presente em cada hemácia expresso em picogramas. Portanto correlaciona a quantidade total de hemoglobina com o número de hemácias, ou seja, indica a quantidade de hemoglobina em cada eritrócito, informando: hipocromia (eritrócito com pouca hemoglobina) e hipercromia (eritrócito com muita hemoglobina) (61).

C.H.C.M – Concentração de Hemoglobina Corpuscular média (Hb/hematócrito)

É a porcentagem média que a Hb ocupa do volume total do glóbulo vermelho expresso em porcentagem. Define a concentração média de hemoglobina nos glóbulos vermelhos. Mede a relação entre o peso da hemoglobina e o volume do eritrócito (25). Este parâmetro permite avaliar a hipocromia presentes nas hemoglobinas quando ocorre anemia. Quando diminuída, têm-se hemácias denominadas hipocrômicas e quando aumentadas, hemácias hipercrômicas (61; 66).

Todos estes parâmetros mencionados até o momento podem ser realizados manualmente, no entanto atualmente com avanços tecnológicos a contagem de células não somente da séria vermelha como o hemograma completo (plaquetograma, leucograma) vem sendo realizados por contadores eletrônicos e automatizados, os quais oferecem resultados com maior rapidez e confiabilidade elevando a margem de segurança na expressão de resultados, especialmente quando se trata de valores hematimétricos (64). Além disto, a análise automatizada permite a detecção de células anormais por meios de alertas, os chamados “flags” e a partir disto é possível confirmar a informação que o aparelho emite através da análise microscópica dos esfregaços sanguíneos corados (65).

Com os contadores eletrônicos outros índices passaram a ser disponibilizados para aumentar o número de informações do eritrograma. Um dos mais importantes é o RDW.

RDW – Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos

Pode-se dizer que este é um novo parâmetro que foi incorporado ao hemograma e somente pode ser obtido pelos contadores eletrônicos. O índice RDW ou Red Cell Distribution Width ou Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos, corresponde ao índice de variação do tamanho dos eritrócitos e em outras palavras demonstra a existência de anisocitose ou variação de tamanho entre os glóbulos vermelhos. Seu valor aumentado está relacionado com o desenvolvimento de quadro de anemia e evidencia uma anisopoiquilocitose, antes mesmo de se confirmar no parâmetro do VCM, pois quanto maior for o valor do RDW maior será a variação no tamanho dos eritrócitos, ou seja, maior será a anisocitose (65).

Tabela 4- Valores de referências no Eritrograma

SEXO	Hb (g%)	Ht (%)	Eritrócitos (/µL)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	RDW (%)
FEMININO	11,5-16	36 - 47	4,0- 5,5	82-98	27-32	32-36	11,5-14,5
MASCULINO	13-17	38-52	4,5- 6,0	82-98	27-32	32-36	11,5-14,5

Fonte: Centro de Referência diagnóstica Prof. Antonio Longo-Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da UNESP.

Deve-se levar em conta que a determinação de hemoglobina, do hematócrito e o número de eritrócitos variam com a idade, o sexo, a altitude do local, além de outros fatores (61).

CURVA DE FRAGILIDADE OSMÓTICA

Dentre várias nomenclaturas, esta técnica também é amplamente conhecida como Prova de Resistência Osmótica, Curva de Resistência Globular ou ainda somente Curva de hemólise. Esta última nomenclatura traduz o objetivo do teste,

que é avaliar a capacidade dos glóbulos vermelhos de incorporar água em seu interior sem que sofra lise quando expostos á soluções salinas hipotônicas decrescentes (50).

Para melhor avaliação do teste, os resultados são expressos e plotados em gráficos, no qual os valores de porcentagem de hemólise e concentração da solução salina são distribuídos nos eixos das ordenadas e abscissas respectivamente. Isso resulta em uma curva sigmoide que representa a distribuição da frequência acumulativa frente à fragilidade osmótica dos eritrócitos (50).

QUANTIFICAÇÃO DAS DIFERENTES FRAÇÕES DE HEMOGLOBINA

ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA

A eletroforese de hemoglobina em pH alcalino é sem dúvida um dos métodos de diagnóstico de grande importância pois ele é tido como um teste confirmatório nas hemoglobinopatias e talassemias. Esta técnica permite a separação dos diferentes tipos de hemoglobina presentes nos indivíduos, incluindo as normais e as variantes anormais de hemoglobina. A sua avaliação é do tipo qualitativa e quantitativa permitindo identificar e quantificar as diferentes frações de hemoglobinas presentes. A separação está baseada nos diferentes tipos de mobilidades da hemoglobina que é uma molécula carregada eletricamente, onde as substituições de aminoácidos nas cadeias globínicas causam alteração de carga elétrica, gerando assim a mobilidade (7).

A eletroforese em pH alcalino, quando realizada em acetato de celulose, permite a visualização das diferentes hemoglobinas através de bandas pigmentadas e os resultados são comparados a uma amostra do tipo normal. Entretanto na caracterização dos tipos de hemoglobinas este método se torna um pouco confuso e dificultoso, pois segundos dados da literatura pode haver diferentes tipos de hemoglobinas ocupando uma mesma posição e banda. Nesses casos recomenda-se

a realização de eletroforese em pH ácido como meio de diferenciação, decorrente da alteração da migração das bandas de hemoglobina no pH ácido (54).

HPLC – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência ou comumente chamada de HPLC do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*, é um método que separa e detecta vários tipos de hemoglobina pela variação do tempo de retenção específico de cada uma delas presente na amostra ao passar pelas colunas cromatográficas. Essas frações de hemoglobina são separadas com base nas interações iônicas com a coluna catiônica sob alta pressão, tendo como resultado um cromatograma com as porcentagens de eluição e tempo de retenção na coluna de cada fração da molécula (52,53).

A técnica de HPLC além de ser de fácil preparo e precisa na quantificação das variantes de hemoglobina é bastante utilizada em programas de prevenção e investigação de hemoglobinopatias, pois é possível obter um resultado aceitável dentro dos limites de detecção pré-determinados, a uma velocidade razoavelmente rápida e com pouca quantidade de amostra. (51; 52). Tem o inconveniente de necessitar de equipamentos específicos e ter alto custo.

PCR – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A técnica de PCR visa detectar mutações ocorridas nos genes das globinas e para isso são utilizados conjuntos de sondas ou *primers* que sejam complementares a sequência da mutação no gene. Esta técnica é feita através da amplificação de fragmentos de DNA, na região onde as mutações ocorrem com mais frequência. Porém esta técnica requer recursos elaborados além de ter custo elevado, desta forma são mais difíceis de serem utilizados na rotina clínica e nem

todas as talassemias cursam com alteração no gene que codifica as cadeias de globina (7; 55).

FERRO SÉRICO E FERRITINA

O principal componente das hemoglobinas, o ferro, pode ser utilizado no auxílio do diagnóstico das betas talassemias, por ser um fator excludente da doença uma vez que este componente do sangue circulante apresenta-se com valores normais, diferindo assim da anemia ferropriva acompanhada da deficiência de ferro, principal distúrbio sanguíneo causador de anemias do tipo microcítica e hipocrômica, característica presente também na beta talassemia menor (58; 66; 67).

Da mesma forma que o ferro, a avaliação das síndromes talassêmicas, em especial as beta talassemias, a partir de exames de quantificação de ferritina no organismo, pode proporcionar um método de confirmação ou exclusão da beta talassemia. Isto é, a dosagem da ferritina, uma proteína responsável pelo estoque de ferro na sua forma férrica (Fe^{3+}), pode ser considerada um marcador fidedigno da sua quantidade no organismo por correlacionar distúrbios do metabolismo de ferro, havendo sobrecarga ou deficiência do mineral (58; 67; 69).

A deficiência de ferro, principal causador das anemias em todo o mundo, constitui um problema de saúde pública no ramo da hematologia e na prática clínica, pois a anemia é resultante de várias condições patológicas, sendo que a do tipo microcítica e hipocrômica ($\text{VCM} < 80 \text{ fL}$ e $\text{HCM} < 27 \text{ pg}$) são as mais prevalentes no país (70;71). Esta patologia é derivada de distúrbios do metabolismo do ferro consequentemente da deficiência de ferro, porém esta deficiência pode estar associada a varias origens, dentre elas a beta talassemia, anemia ferropriva e anemia de doença crônica (72).

O diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas é muito complexo e de custo elevado. Devido a este fato, frequentemente os índices hematimétricos e o hemograma são de grande valia para diagnosticar ou definir o tipo de anemia e em virtude da variabilidade e frequência destes tipos, a sua diferenciação torna-se muito importante (71).

Contudo, ainda é possível observar diagnósticos ou condutas errôneas com relação à patologia causadora das anemias microcíticas e hipocrômicas, baseadas somente em resultados dos parâmetros obtidos em contadores eletrônicos principalmente no que diz respeito às síndromes talassêmicas, em especial a beta menor. Sendo assim, preconiza-se uma minuciosa análise de esfregaço sanguíneo devido a achados de alterações morfológicas característicos da patologia em questão, além das informações do eritrograma somado a alguns exames específicos como a eletroforese de hemoglobina, que irão complementar a avaliação hematológica nas betas talassemias (72; 73).

Tabela 5. Valores de referência para ferritina

FERRITINA SÉRICA	
HOMENS	MULHERES
30 - 400ng/mL	13 - 150 ng/mL

Fonte: Laboratório de Análises Clínicas São Lucas- Araraquara

BETA TALASSEMIA MENOR: ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

De acordo com uma estimativa feita em 2008, 4,5% da população mundial que corresponde a aproximadamente 250 milhões de pessoas no mundo, apresentam defeito no gene da beta globina, culminando em talassemia heterozigota (65; 75; 76). No que diz respeito ao nosso país, estudo feito em 16 estados e 65 cidades, na mesma época (2008), existiam aproximadamente 2,7 milhões de brasileiros portadores de talassemia menor (79).

O maior problema da beta talassemia heterozigota, também denominado de beta talassemia menor, é a questão da dificuldade diagnóstica a um primeiro momento de sua investigação. Em contraste com a intensa sintomatologia característica da beta talassemia maior, indivíduos com beta talassemia menor podem passar anos sem saber que são portadores da doença, pois geralmente são assintomáticos e não apresentam sérias complicações (77).

Embora o diagnóstico da beta talassemia menor seja feito através de exames laboratoriais, basear-se em apenas um só método, torna seu diagnóstico

inconclusivo e falho, acarretando um tratamento à base de ingestão de ferro desnecessário e prejudicial à saúde do portador (77). É de extrema importância o diagnóstico correto das betas talassemias do tipo menor, mesmo que esta patologia curse de forma benigna na maioria dos casos, visto que possa ter uma evolução comprometedora, uma vez que um casal portador deste tipo de talassemia carrega 25% de probabilidade de gerar um filho portador de talassemia do tipo major, forma mais grave da doença dentre as betas talassemias (91).

Diferentemente das características clínicas e sintomas de portadores da beta talassemia menor, o tipo maior se caracteriza pela hipertrofia dos ossos frontais, devido ao aumento da hematopoese e ao processo hemolítico; déficit de crescimento e desenvolvimento, além do aumento da pigmentação cutânea, em virtude do aumento de depósito de ferro em órgãos vitais. Estes pacientes se não tratados podem apresentar icterícia e esplenomegalia ainda na infância (78; 80).

Os aspectos laboratoriais que definem um portador da β talassemia heterozigota (menor) incluem concentração de hemoglobina inferior ao normal correspondente para determinada faixa etária e sexo, geralmente 1 a 3 g abaixo da referência (78); redução do volume corpuscular médio (VCM) uma vez que a quantidade de glóbulos vermelhos está aumentada, não acompanhada pelo valor do hematócrito (Ht), que pode se apresentar normal ou com ligeira redução e a deficiência de hemoglobinação também contribui para valores baixos de HCM (39). Na morfologia eritrocitária é possível observar a presença principalmente de células em alvo, hipocromia e ponteados basófilos. Um aumento compensatório do número de eritrócitos ou glóbulos vermelhos, geralmente acima de 5,0 milhões/ μ L (49).

Estudos na literatura apontam o RDW como um diferencial no diagnóstico da beta talassemia acompanhado da avaliação de outros parâmetros. O índice RDW tende a ter um valor normal na beta talassemia menor, diferentemente do que na anemia ferropriva. Isso será mais bem discutido logo adiante.

A eletroforese de hemoglobina mostra um aumento da Hb A₂ na grande maioria dos casos, podendo haver discreta elevação na hemoglobina do tipo fetal, HbF, diferentemente da beta talassemia maior onde em todos os casos a HbF se mostra aumentada (39; 55).

A prova de resistência osmótica é útil na triagem para detectar a beta talassemia menor, pois as hemácias caracterizadas como microcíticas, são mais resistentes à hemólise, apresentando um valor positivo no teste (7).

Todas estas alterações evidenciadas, embora observadas e identificadas isoladamente, devem estar associadas umas às outras para classificar um indivíduo como portador de BT Menor (49).

ANEMIAS MICROCÍTICAS E HIPOCRÔMICAS: COMO DIFERENCIAR ANEMIA POR DEFICIÊNCIA DE FERRO DE BETA TALASSEMIA MENOR?

Utilizando os exames hematológicos é possível observar microcitose e hipocromia, com níveis reduzidos dos índices hematimétricos VCM e HCM relacionados com o quadro de ambas as anemias, além de moderada reticulocitose.

Na beta talassemia menor a microcitose é decorrente da formação deficiente de hemoglobina, pela redução da produção das cadeias de beta globina e consequente aumento da concentração das cadeias do tipo alfa, que acabam precipitando, levando à destruição precoce dos eritrócitos, culminando então com o achado freqüente de anemia (81; 83). A partir da identificação destes parâmetros, o indivíduo portador sofre sério risco de ser tratado com suplementação ou medicamentos à base de ferro cujo tratamento é prolongado, podendo resultar em um acúmulo de ferro no organismo, principalmente no músculo cardíaco, podendo acarretar insuficiência cardíaca, visto que pacientes beta talassêmicos têm uma maior absorção de ferro no trato gastrointestinal em comparação com indivíduos normais (85).

Embora a microcitose e hipocromia sejam características comuns na beta talassemia menor, elas nem sempre estão associadas a uma queda ou redução da concentração de ferro. As dosagens de ferro e ferritina se encontram com valores normais ou ligeiramente elevados (81; 82).

Um aumento nos níveis de concentração de hemoglobina do tipo A₂ é o principal achado laboratorial e uma importante característica na diferenciação do portador de beta talassemia menor. Este aumento está relacionado com a redução

da síntese de cadeias do tipo beta e presença de cadeias do tipo alfa na forma livre, favorecendo a formação de dímeros $\alpha\delta$ resultando em tetrâmeros de hemoglobina do tipo A_2 (83; 84).

A avaliação dos índices hematimétricos como o VCM e HCM repercute no provável diagnóstico das patologias que cursam com uma anemia microcítica e hipocrômica. Segundo Saénz et al.(1998)(86) valores muito baixos de HCM do que CHCM, tende a identificar um portador de beta talassemia menor em relação à um portador de anemia ferropriva. Este fato também é descrito por Ebrahim Miri-Moghaddam et al. (2014)(99) em um estudo feito com 100 pacientes portadores de BTT (beta talassemia menor) e com 77 pacientes portadores de ADF (anemia por deficiência de ferro). Todos os parâmetros hematológicos, incluindo o VCM e HCM estão mais reduzidos do que naqueles pacientes portadores de ADF, segundo estudo.

No Brasil, Henneberg (2003)(95), com o objetivo de estabelecer padrões eritrocitários de caracterização e diferenciação entre três grupos específicos de patologias diferentes (deficiência de ferro, traço falciforme e beta talassemia menor), através da comparação de valores eritrocitométricos e presença de inclusões citoplasmáticas em distensões sanguíneas coradas, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista (Unesp), observou que 100% dos beta talassêmicos estudados em sua pesquisa (n=75) apresentaram microcitose e hipocromia com VCM próximos ou menores que 70fL e HCM abaixo de 24pg enquanto que o valor de corte para identificar portadores de deficiência de ferro foram abaixo de 82 fL para VCM e 27 pg para HCM, porém apenas 28,3% do grupo de ferropênicos (N=123) apresentaram valores desses índices semelhantes aos observados nos portadores beta talassêmicos.

Portanto, para fazer o diagnóstico correto da beta talassemia menor é necessário distingui-la da anemia por deficiência de ferro, cujas características se confundem por apresentarem uma anemia microcítica e hipocrômica. Torna-se necessário então, o conhecimento dos valores de concentração de ferro e ferritina e principalmente da quantificação de hemoglobina A_2 , pois tais parâmetros excluem uma das duas patologias. Porém, os exames para identificar esses parâmetros são processos lentos e necessitam de um laboratório especializado, principalmente no que tange à quantificação de Hb A_2 . Outro tipo de exame que também requer metodologia complexa e específica é a dosagem de protoporfirina eritrocitária na sua

forma livre ou ligada ao zinco, como forma de definir se a anemia microcítica e hipocrômica é da deficiência de ferro ou da beta talassemia menor, por estar aumentada apenas na primeira patologia (86).

Complementando a solicitação de exames para diferenciação e diagnóstico das anemias por deficiência de ferro é comum encontrarmos o pedido avaliação do metabolismo do ferro, tais como, a capacidade total de ligação do ferro (CTFL), índice de saturação da transferrina (IST), níveis de ferritina, ferro sérico e receptor solúvel de transferrina (sTfR), possibilitando a diferenciação das betas talassemias menores (70).

A fim de otimizar e orientar o diagnóstico das anemias microcíticas e hipocrômicas, reconhecidas em três patologias distintas, das quais, a anemia ferropriva, anemia de doença crônica e a beta talassemia menor, um estudo feito por Matos et al.(2008)(72), no departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a partir de 159 pacientes portadores de anemia do tipo microcítica e hipocrômica, foi possível constatar que em pacientes que apresentavam níveis séricos de ferro e ferritina dentro dos valores de referência, mas com elevação na quantidade de hemoglobina do tipo A₂, seriam classificados como indivíduos portadores de beta talassemia menor, uma vez que estes parâmetros estabelecem relação importante para um possível fechamento do diagnóstico desta patologia (72).

Saénz et al.(1998)(86) relataram que outro fato importante, retirado de estudos em literatura, é a relação dos níveis de hemoglobina com relação à hipocromia e microcitose, onde é retratado que valores de hemoglobina encontrados abaixo de 10g/dL, associados à microcitose e hipocromia, sugerem beta talassemia menor e não uma deficiência de ferro.

O PAPEL DO RDW NA DEFERENCIAÇÃO ANEMIA FERROPRIVA E β -TALASSEMIA MENOR

O índice RDW, amplitude de distribuição eritrocitária, também é bastante utilizado como um meio de diferenciar a beta talassemia da anemia por deficiência

de ferro. Embora haja controvérsia sobre seus resultados, muitos autores e pesquisadores de hemoglobinopatias o descrevem como uma ferramenta útil no diagnóstico da beta talassemia menor. Segundo Bessman et.al. (1983) (87) o RDW poderia melhorar a classificação dos tipos de anemias com base na heterogeneidade de distribuição do tamanho dos eritrócitos, isto é, se o parâmetro no contador eletrônico mostrasse hemácias heterogêneas, isto definiria uma anemia por deficiência de ferro e se mostrasse hemácias homogêneas seria um indício de beta talassemia do tipo menor. A comprovação deste fato segundo esses pesquisadores foi ao notar que o RDW tende a ter um valor sempre aumentado na anemia ferropriva enquanto que na beta talassemia estes valores se encontram inalterados ou com pequena redução (87). Outros autores também descreveram que na beta talassemia menor todos os eritrócitos são microcíticos devido à síntese deficiente de cadeias beta globínicas. Isto é resultado da mutação que ocorre no gene da beta globina, o que repercute igualmente em todas as células precursoras eritrocitárias, tornando o valor de RDW relativamente constante, diferentemente do que acontece na anemia ferropriva, onde células sanguíneas são produzidas normalmente na medula óssea, não afetada por mutações, isto fornece uma coexistência de células de tamanhos normais e anormais, ocasionando uma anisocitose, ou seja, é observada uma "população" variada de eritrócitos (73; 89; 90).

Em contra partida, Green e King (1989)(89), utilizando o RDW no estudo feito para diferenciar a anemia por insuficiência de ferro e beta talassemia menor, relatam que este índice se comportaria dentro dos valores de referência na primeira e estaria aumentado na segunda patologia. Alfadhli et al. (2007)(94) também obteve o parâmetro RDW elevado na beta talassemia menor quando comparado à insuficiência de ferro e o considerou como sendo um índice não confiável na distinção entre estas duas patologias.

De acordo com trabalho realizado por Henneberg et al. (2003)(95), foi possível constatar que do total de portadores beta talassêmicos (n=75) compostos por 31 indivíduos do sexo masculino e 44 do sexo feminino, 90,3% e 81,8%, respectivamente, apresentaram índices de RDW acima de 14,5%, valor adotado como o de referência no referido estudo. No entanto, no grupo de ferropênicos (n=123), apenas 68,5% e 75% ultrapassaram o valor de referência. Estes dados contrapõem diversos estudos, os quais citam o RDW como um marcador ou índice

relevante na diferenciação de diagnóstico entre portadores de beta talassemia menor e de deficiência de ferro.

Ainda, em outro estudo realizado por Matos et al. na Universidade Federal de Minas Gerais (2008)(72,76), valores para o RDW dentre os grupos estudados, 83 com anemia ferropriva e 23 com beta talassemia menor, o valor médio de RDW encontrado foi de 16,4% em pacientes com anemia ferropriva e de 15,6% para os beta talassêmicos menor. Embora tenha havido uma leve tendência de maior RDW na anemia ferropriva, não foram verificadas diferenças estatísticas significantes.

Para avaliar a utilidade e confiabilidade do RDW no diagnóstico diferencial das betas talassemias e deficiência de ferro, Lima et al. (1996)(93), estabeleceram valores de cortes para este parâmetro a fim de obter um resultado mais preciso, baseados na especificidade e sensibilidade desse parâmetro. Foram então avaliados 60 pacientes, 50% com beta talassemia menor e a outra metade com anemia por deficiência de ferro. Levando em conta que os pacientes apresentavam anemia microcítica, assumindo um valor acima de 24% e abaixo de 20% para o RDW, foi possível classificar as patologias sendo como anemia por deficiência de ferro e beta talassemia menor, respectivamente. Ao adotar um valor de corte de 21% para cima ou para baixo em ambas as patologias em questão, foi possível estabelecer que 90% dos pacientes com anemia por deficiência de ferro e 77% portando beta talassemia menor, foram diagnosticadas corretamente utilizando o RDW. No entanto, nesse estudo conclui-se que embora diagnosticado corretamente, o RDW não seria um bom indicador de beta talassemia como parâmetro único, necessitando de mais exames que comprovem a doença.

Podemos utilizar a tabela 6 abaixo como um breve resumo da diferenciação hematológica dos achados mais frequentes e ditos como importante relacionando as características da beta talassemia menor e anemia ferropriva.

Tabela 6. ANEMIA POR DEFICIÊNCIA DE FERRO (ADF) *Versus* BETA TALASSEMIA MENOR (BTT)

	VCM e Hb	RDW	FERRO/FERRITINA	Hb A2	GENÉTICA
ADF	Geralmente menor que 80 fL	Elevado	Geralmente reduzidos	Geralmente baixa (<3,5%)	Ausência de herança genética
BTT	Muito baixo (<70 fL)	Normal	Geralmente normais	Geralmente elevado (>3,5%)	Presença de herança genética

Fonte: Atlas Citológico da Academia de Ciência e Tecnologia de São Jose do Rio Preto- SP

CONTAGEM DE GLÓBULOS VERMELHOS: UM ÍNDICE RELEVANTE NA DIFERENCIAÇÃO

A contagem de glóbulos vermelhos presente no hemograma é outro parâmetro relevante no diagnóstico das anemias microcíticas e hipocrômicas. Pacientes portadores de beta talassemia menor apresentam um número muito elevado de eritrócitos quando comparados a portadores de anemia ferropriva, tendo um mesmo grau de anemia (92, 96).

A elevação em números de glóbulos vermelhos (GV) observada na beta talassemia é decorrente da precipitação em excesso das cadeias globínicas nos precursores eritrocitários circulantes, o que resulta em uma eritropoese ineficaz. Isto faz com que haja uma sinalização para mais produção da eritropoetina, que levará a medula óssea a aumentar a eritropoese, elevando assim o número de hemácias no sangue (93).

Matos et al. (2012)(92), discutem o hemograma como diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas, descrevendo um grupo de 53 pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), classificados como portadores de BTT, que quando avaliados seus dados eritrocitários mostraram que esses pacientes apresentaram um valor aumentado de glóbulos vermelhos, quando o valor de corte assumido foi de 5,0 milhões/ μ L, sendo que para pacientes portadores de anemia ferropriva e de anemia de doença crônica

o valor de corte adotado foi de 4 milhões/ μL e 4,4 milhões/ μL , respectivamente. Isto quer dizer que se um paciente tiver um valor de glóbulos vermelhos acima de 5,0 milhões/ μL , é considerado um beta talassêmico do tipo menor.

Colaborando com o estudo da influência deste parâmetro no diagnóstico da beta talassemia menor, Henneberg et al. (2008)(96), também descreve em seu trabalho que 74,2% dos pacientes masculinos portadores de BTT (n=31), apresentaram na contagem de eritrócitos, um valor acima de 6 milhões/ μL , enquanto que nenhum portador de insuficiência de ferro do mesmo sexo, apresentou valores superiores ao descrito acima. Já no grupo do sexo feminino para BTT (n=44), 66% apresentaram valores de GV acima de 5,3 milhões/ μL , enquanto que no grupo do mesmo sexo classificadas como ferropênicas, somente 4,2% apresentaram esses valores altos para contagem de hemácias.

Ao realizarmos uma análise minuciosa dos dados apresentados nos anexos da pesquisa de Henneberg (2003)(95), comparando os valores de glóbulos vermelhos encontrados entre o grupo controle e dos beta talassêmicos menor, foi possível construir as tabelas 7 e 8 abaixo:

Tabela 7- Porcentagem de pacientes portadores de beta talassemia menor (BTT) do sexo feminino, agrupados de acordo com valores de número de eritrócitos.

Nº eritrócitos / μL	Grupo Controle (n=68)	Grupo β -talassêmicos (n=44)
> 5,0	1,5%	81,8%
> 4,8	5,9%	88,6%
> 4,6	14,7%	90,1%

Fonte: Valores obtidos da análise dos anexos da dissertação de mestrado de Henneberg (2003).

Tabela 8- Porcentagem de pacientes portadores de beta talassemia menor (BTT) do sexo masculino, agrupados de acordo com valores de número de eritrócitos.

Nº eritrócitos / μL	Grupo Controle (n=348)	Grupo β -talassêmicos (n=31)
> 5,6	2,6%	87,1%
> 5,4	6,3%	93,5%
> 5,2	12,4%	96,8%
> 5,0	28,2%	100%

Fonte: Valores obtidos da análise dos anexos da dissertação de mestrado de Henneberg (2003).

Ao fazer a análise das tabelas acima é possível verificar que ao estabelecer um valor de corte maior para o número de eritrócitos, a porcentagem de beta talassêmicos com esta característica (glóbulos vermelhos aumentados) é superior em relação ao grupo controle. Na tabela referente ao grupo feminino (tabela 7), apenas 1,5% dos pacientes do grupo controle possuem eritrócitos acima de 5,0 milhões/ μL , enquanto que no grupo de pacientes com beta talassemia menor, esta proporção chega a atingir 81,8%.

A tabela 8 contendo dados do sexo masculino nos mostra que 100% dos indivíduos beta talassêmicos possuem valores acima de 5,0 milhões de eritrócitos contrapondo a porcentagem de 28,2% dos indivíduos do grupo controle. À medida que se elevam os limites, é possível observar um decaimento acentuado no que se refere à porcentagem de indivíduos normais, dos quais apenas 2,6% possuem um valor acima de 5,6 milhões/ μL de glóbulos vermelhos, contra 87,1% de beta talassêmicos.

Fica evidente que uma eritrocitose está associada a pacientes com beta talassemia menor. A contagem de eritrócitos acima de 5,0 milhões/ μL sugere que é útil a avaliação desse parâmetro no correto diagnóstico da beta talassemia menor (92,95, 96).

A ANÁLISE DE ESFREGAÇO SANGUÍNEO: A IMPORTÂNCIA DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS

As alterações encontradas a partir da observação dos esfregaços sanguíneos de beta talassêmicos menor também incluem a hipocromia e microcitose, além de células em alvo, poiquilocitose e ponteados basófilos (77). Este último achado está relacionado com alterações na síntese de hemoglobina, ou uma mitose acelerada, como ocorre na medula óssea, uma vez que sua atividade está aumentada (91).

O ponteados basófilos e as células em alvos observados em esfregaço sanguíneo, não necessariamente remetem às hemoglobinopatias, porém em

associação ou aparecimento em conjunto com alterações morfológicas tais como a hipocromia e a microcitose, levando a um HCM e VCM baixos, podem ser um forte indício que se tenha uma característica de beta talassemia menor (72).

Com base na pesquisa realizada por Matos et al.(2008)(72), dos 159 pacientes portadores de anemia microcítica e hipocrômica estudados, 60,9% dos pacientes portadores de beta talassemias minor (14 de 23), apresentavam hemácias com ponteados basófilos, sendo que nos portadores de anemia ferropriva e de doença crônica, esta alteração morfológica se mostrou ausente.

Já Henneberger et al (2008)(96) constataram que dos 416 pacientes estudados, divididos em grupos por patologias, 100% daqueles que compunha o grupo de portadores da beta talassemia minor, formados por 75 indivíduos, apresentaram em seu exame morfológico eritrocitário a alteração correspondente ao ponteados basófilos. O ponteados basófilos, presente em todos os indivíduos diagnosticados com beta talassemia menor, traz uma forte evidência da correlação deste parâmetro e a doença em questão (96).

De maneira semelhante, a maior proporção de hemácias em alvo também foi observada em pacientes do grupo de beta talassêmicos, quando comparada aos demais grupos no trabalho realizado por Matos et.al. Em um contexto geral de avaliação clínica de um paciente apresentando microcitose, nível de Hb A2 aumentada, valores de ferro sérico e ferritina normais, podem indicar um indício esclarecedor da etiologia da doença (72).

Alguns fatores como capacidade técnica, qualificação e treinamento adequado de quem realiza o processo de confecção do esfregaço sanguíneo bem como a capacidade do observador em visualizar e reconhecer as possíveis alterações ao microscópio deve ser levado em consideração quando nos referimos às análises morfológicas de extensão sanguínea, pois caso o profissional não esteja bem preparado e não detenha conhecimento prévio sobre o assunto, poderá omitir informações valiosas no diagnóstico e tratamento da patologia (97).

A utilização do tipo de coloração também é outra questão importante a ser analisada, visto que alguns corantes usados em laboratórios de análises clínicas podem influenciar a visualização de inclusões citoplasmáticas, como o ponteados basófilos. Segundo relato de Leite, A. A., um dos autores de Henneberg et al. (2008)(96), a maioria das observações das extensões sanguíneas é realizada

utilizando a coloração de Leishman, que não é tão eficiente na demonstração dessas inclusões.

Na pesquisa de Henneberg (2003)(95), foi relatada a presença de ponteados basófilos de variável intensidade em 100% das lâminas observadas dos portadores da beta talassemia menor, quando utilizada a coloração de May Grünwald- Giemsa e do corante Merck® artigo nº 1.01352.0025. Isto reflete a importância do uso deste corante, garantindo e contribuindo para o ótimo resultado do trabalho, considerando os valores obtidos nas visualizações do ponteados basófilos.

CONCLUSÃO

A partir do levantamento bibliográfico realizado foi possível esclarecer as reais necessidades de interpretação dos parâmetros contidos em um hemograma, colaborando para um diagnóstico acertivo da beta talassemia menor. O uso e avaliação em conjunto dos parâmetros bioquímicos, índices hematimétricos e análise das características morfológicas das hemácias demonstraram ser importantes na diferenciação de algumas patologias hematológicas comumente confundidas na prática clínica.

Embora haja um teste específico e confirmatório da beta talassemia menor, a eletroforese de hemoglobina, uma avaliação anterior dos índices HCM, VCM, quantidade de glóbulos vermelhos e presença de inclusões citoplasmáticas como o penteado basófilo, vêm sendo utilizados como importantes parâmetros para identificar a beta talassemia menor, já que eles se mostram bem característicos para a doença em questão, além de serem citados inúmeras vezes por vários autores, não havendo muita contrariedade em seus estudos.

A importância do diagnóstico laboratorial das anemias microcíticas e hipocrômicas presentes, tanto em indivíduos portadores de deficiência de ferro como em beta talassêmicos menor, é um ponto chave quando nos referimos a esses parâmetros, pois os índices HCM e VCM apresentam-se com valores extremamente reduzidos (<24 pg e <70 fL) e a quantidade de glóbulos vermelhos muito aumentados ($> 5,0$ milhões/ μ L), na beta talassemia menor em comparação à deficiência de ferro.

Portanto os valores contidos no hemograma bem como a presença da inclusão citoplasmática penteado basófilo e morfologia das hemácias observadas em análise de extensões sanguíneas coradas, é de grande valia na suspeita da beta talassemia menor, tornando-se ponto importante na sugestão da realização de eletroforese de hemoglobina para confirmação do diagnóstico da beta talassemia menor.

REFERÊNCIAS

1. SAKAMOTO, T.M. et al. Talassemia β intermediária em gestante; **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 6, p. 498-500, 2008
2. SODEMAN, W.A. **Fisiologia patológica de Sodeman: Mecanismos da doença**. 6. ed. Rio de Janeiro: INTERAMERICANA, 1983. p. 632.
3. NAOUM, P.C. Hemoglobinopatias. Disponível em:
< <http://www.hemoglobinopatias.com.br/>> Acesso em: 14 de Maio de 2014.
4. SCHECHTER, A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v.112, n. 10, p. 3927-3938, 2008.
5. BAIN, B.J. **Hemoglobinopathy diagnosis**. 2. ed. BLACKWELL PUBLISHING: 2006. p. 1-25.
6. RAMALHO A.S. As hemoglobinopatias hereditárias, um problema de saúde pública no Brasil. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão, Preto São Paulo, v. 2. p. 4-6, 1986.
7. VIVIANI, N.M. **Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos associados ao estudo molecular para caracterização da beta talassemia heterozigótica**. 2008. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo, USP, 2008.
8. HO P.J, THEIN, S.L. Gene regulation and deregulation: a β globin Perspective. **Blood Reviews**, v. 14, p. 78–93, 2000.
9. STAMATOYANNOPOULOS, G. & NIENHUIS, A. W. **Hemoglobin switching: Molecular basis of blood diseases**. 2. ed. Philadelphia: SAUNDERS, p. 107-156, 1994.

10. BANK, A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities, **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 6, p. 1470-3, June 2005.
11. THEIN, S.L. β - thalassemia. **Bailliere's Clin. Haematology**, v.11, p. 91-126, 1998.
12. COLLINS F.S.; WEISMANN S.M. The molecular genetics of human hemoglobin. **Progress in Nucleic acid Research and Molecular Biology**, v. 31, p. 315-465, 1984.
13. FORGET, B.G. Developmental control of human globin gene expression. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 352, p. 313-322, 1990.
14. RAICH, N.; PAPAYANNOPOULOU, T.; STAMATOYANNOPOULOS, G.; ENVER, T. Demonstration of a human epsilon-globin gene silencer with studies in transgenic mice. **Blood**, v. 79 n.4, 1992, p. 861-4.
15. WALL, L.; DEBOER, E.; GROSVELD, F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. **Genes Development**, v. 9, p.1089-100, 1988.
16. PATRINOS, G.P. DE KROM, M. DE BOER, E. LANGEVELD, A. IMAM, A.M. STROUBOULIS, J. DE LAAT, W. GROSVELD, F.G. Multiple interactions between regulatory regions are required to stabilize an active chromatin hub. **Genes Development**, v. 18, n. 12, p. 1495-509, 2004.
17. GRIBNOU, J.; DIDERICH, K.; PRUZINA, S.; CALZOLARI, R.; FRASER, P. Intergenic transcription and developmental remodeling of chromatin subdomains in the human beta-globin locus. **Molecular Cell**, v. 5, p. 377-86, 2000.
18. LI, J.; NOGUCHI, C.T.; MILLER, W.; HARDISON, R.; SCHECHTER, A.N. Multiple regulatory elements in the 5'-flanking sequence of the human epsilon-globin gene. **Journal of Biology Chemistry**, v. 273, n. 17, p. 10202-9, 1998.

19. MERIKA, M.; ORKIN, S.H. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 7, p. 3999-4010, 1993.

20. RAICH, N.; CLEGG, C.H.; GROFTI, J.; ROMEO, P.H. STAMATOYANNOPOULOS, G. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human epsilon-globin gene. **Embo Journal**, v. 14, n. 4, p. 801-9, 1995.

21. GIARDINE, B.; VAN BAAL S.; KAIMAKIS P. et al Hb Var databases of human hemoglobin variants and thalassemia mutations: 2007 update. **Human Mutation**, 28:206, 2007.

22. BUNN, H.F.; FORGET, B.G. Molecular Genetics and Biosynthesis of Hemoglobin. In: BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. 1st ed. Philadelphia: SAUNDERS COMPANY, p. 169-222, 1986.

23. HIGGS, D.R. α -Thalassaemia. **Baillière's Clinical Haematology**, v. 6, n. 1, p.117-150, 1993.

24. VARGAS, S.P.; YAMAGUSHI, M.U. Diagnóstico laboratorial para talassemias. **Revista Saúde Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 85-88, jan./abr, 2008.

25. CLARKE, G.M.; HIGGINS, T.N. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1284-1290, 2000.

26. WEATHERALL, D.J. Phenotype-genotype relationships in monogenic diseases: lessons from the thalassemias. **Nature Reviews. Genetics**, v. 2, p. 245-255, 2001.

27. ZAGO, M.A.; COSTA, F.F. Hereditary hemoglobin disorders in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 385-8, 1985.

28. NAOUM, P.C. Investigação laboratorial de hemoglobinopatias. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas Biológicas**, v. 12, p. 213-221, 1979.

29. WAGNER, S.C. **Bases moleculares das hemoglobinas variantes e talassemias no Rio Grande do Sul**. 2010. 113f. Tese (Doutorado em Ciências genética e biologia molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
30. BERNINI, L.F. HARTEVELD, C.L. Alpha-thalassaemia. **Bailliere's Clinical Haematology**, v.11, p.53-90, 1998.
31. HENRY J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por Métodos Laboratoriais**. 19. ed. São Paulo: MANOLE, 1999.
32. NAOUM, P.C. Origem das Anemias Hereditárias no Brasil; Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, SP. Disponível em:
<http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/anemias_imigrantes/imigrantes.pdf> Acessado em: 25/05/14.
33. WEATHERALL, D.J. CLEGG, J.B. **The thalassemia syndromes**. 4. ed. Oxford: BLACKWELL, 2001. p. 846.
34. ZAGO, M.A. Talassemias. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P. PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: ATHENEU, 2004, p. 309-328.
35. THEIN, S.L. Genetic associations studies in β -hemoglobinopathies. **Hematology/ the Education Program of the American Society of Hematology**, p. 354-361, 2013.
36. BONINI-DOMINGOS, C.R. Thalassemia screening in Brazil: results for 20 years. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p.288-9, 2004.
37. CLARCK, B.E.; THEIN, S.L. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. **Clinical Laboratory of Haematology**, v. 26: 159-176, 2004.
38. DIMOVISKY, A.J.; EFREMOV, D.G. A β thalassemia due to a 1605 pb deletion of the 5 β globin gene region. **British Journal of Haematology**, v. 85, p.143, 1993.

39. NAOUM, P.C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: SARVIER, 1997.
40. HUISMAN, T.H.J.; CARVER, M.F.H.; BAYASAL, E.A. **Syllabus of thalassemia mutations**. Atlanta, 1997; The SickleCell Anemia Fundation.
41. CAI et al. A new TATA box mutation detected at prenatal diagnosis for β thalassemia. **American Journal of Human Genetic**, v. 45, p. 112-114, 1989.
42. CHEN, X. et al. A novel mutation of -73 (A→T) in the CCAAT box of the β globin gene identified in a patient with the mild β thalassemia. **Annals of Hematology**, v. 86, p. 653-657, 2007.
43. THEIN, S.L. Genetic modifiers of the β haemoglobinopathies. **British Journal of Haematology**, v. 141, p. 357-366, 2008.
44. RUND, B.; RACHMILEWITZ, E. The β thalassemias. **New England of Journal Medicine**. p. 1135-146, 2005.
45. ORKIN, S.H.; GOFF, S.C. Nonsense and frameshift mutations in β^{0-} thalassemia detected in cloned β -globin genes. **Journal of Biology Chemistry**, v. 256, n. 19, p. 9782-9784, 1978.
46. KAZAZIAN, J.R. et al. Quantification of the close association between DNA haplotypes and specific β thalassemia mutations in Mediterraneans. **Nature**, v. 310. p. 152-154, 1984.
47. MARTINS, C.S.B.; RAMALHO, A.S.; SONATI, M.F.; GONÇALVES, M.S.; COSTA, F.F. Molecular characterization of beta thalassemia heterozygotes in Brazil. **Journal of Medical Genetics**, v. 30, p. 797-798, 1993.
48. CHANG, J.C. et al. β^{0-} thalassemia, a nonsense mutation in a man. **Proceedings of National of Academy Sciences of the United States of America**, v. 76, n.6, p. 2886-2889; 1979.

49. NAOUM, P.C.; Domingos, C.R.B. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. **Revista Brasileira de Hematologia e hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 226-228, 2007.
50. SANT'ANA, V.A.C. Fragilidade osmótica dos eritrócitos de bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.4, p.609-614, 2001.
51. NASCIMENTO, M.L.P.; SILVA, L.L. O Diagnóstico das Hemoglobinopatias e Beta/Talassemias através de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC). Universidade Federal da Bahia. **News Lab**, v. 69, p. 168-188, .2005.
52. MELO, L.M.S. et al. Rastreamento de hemoglobinas variantes e talassemias com associação de métodos de diagnóstico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 1, p. 12-17, 2008.
53. TAVARES, C.F.F. **Estudo dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento das anemias hipocrômicas e microcíticas em crianças na fase escolar**. 2011. 139f. Tese (Doutorado Biociências aplicada à Farmácia)-Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, USP; 2011.
54. VARGAS, S.P; YAMAGUSHI, M.U; Diagnóstico laboratorial para talassemias. **Revista Saúde Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 85-88, jan./abr. 2008.
55. CANÇADO. Talassemias alfa. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p. 81-87, 2006.
56. NAOUM P.C. Doenças do Eritrócito. Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, disponível em:
<<http://www.ciencianews.com.br/index.php/publicacoes/doenca-doseritrocitos/>>
Acesso em: 15/02/15.

57. VIVAS W.P, Manual Prático de Hematologia. Disponível em: <<http://www.aa.med.br/upload/biblioteca/Manual%20de%20Hematologia.pdf>> Acesso em: 25/10/14.
58. MOTTA W. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações.** Aspectos Bioquímicos da Hematologia, v. 13 p. 211.
59. LORENZI, T.F.; D'AMICO, E.A.; DANIEL, M.M.; SILVEIRA, P.A.A.; BUCCHERI, V. **Manual de hematologia:** propedêutica e clínica. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2003.
60. VERRASTRO, T.; LORENZI, T.F.; WENDEL NETO, S. Silvano. **Hematologia e hemoterapia:** fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. São Paulo: ATHENEU, 2005.
61. ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia:** fundamentos e prática. São Paulo: ATHENEU, 2004.
62. MATOS, M.S.; MATOS, P.F. Hematologia clínica. In: MATOS, M.S., MATOS, P.F. (Eds.). **Laboratório clínico médico e veterinário.** São Paulo: ATHENEU, 1995. p. 320.
63. GROTTTO, H.Z.W. O hemograma: importância para a interpretação da biopsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n. 3, p.178-182, 2009.
64. ROSENFELD R. O hemograma. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 4, 2012.
65. BRUM, M.F. **ERITROGRAMA: Novas perspectivas de análise.** 2013. 14f. Artigo de Conclusão da Pós-Graduação (Especialista em Hematologia Laboratorial)- Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, UNIJUI, RS, 2013.

66. FIGUEIREDO, M.S.; VICARI, P. **Diagnóstico Diferencial das Anemias**. In: Lopes A.C. editor. Tratado de Clínica Médica. São Paulo: ROCCA, 2006.p. 1978-82.
67. VICARI, P. et al. Diagnóstico diferencial da deficiência de ferro. Artigo de revisão. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, s. 2, p. 29-31, 2010.
68. PAIVA, A.A.; RONDÓ, P.H.C.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. **Revista de Saúde Pública**, v. 3, n. 4, p. 421-426, 2000.
69. WORWOOD, M. The laboratory assessment of iron status - an update. **Clinica Chimica Acta**, v. 259, p. 3-23, 1997.
70. NAOUM PC. Diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, n. 2, p. 160-162; 2011.
71. MELO, M.R. et al. Uso de índices hematimétricos no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas: Uma abordagem a ser adotada? **Revista de Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 3, p. 222-4, 2002.
72. MATOS, J.F. et al. O papel do RDW, da morfologia eritrocitária e de parâmetros plaquetários na diferenciação entre anemias microcíticas e hipocrômicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 6, p. 463-469, 2008.
73. TRENT, R.J. Diagnosis of the haemoglobinopathies. **The Clinical Biochemistry Review**, v. 27, n. 1, p. 27-38, 2006.
74. TUZMEN, S.; SCHECHTER, A.N. Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating beta-thalassemia mutations. **Blood Reviews**, v. 15, n. 1, p. 19-29, 2001.
75. SARNAIK, S.A. Thalassemia and related hemoglobinopathies. **Indian Journal Pediatrics**, v. 72, n. 4, p. 319-24, 2005.

76. MATOS, J.F., et. al. Índice de anisocitose eritrocitária (RDW): diferenciação das anemias microcíticas e hipocrômicas; **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 2, p. 120-123, 2008.

77. FESSAS, P.; LOUKOPOULUS, D. **Las talasemias beta**. En: Clínica Hematológica (Hemoglobinas Anormales). 2. ed. p. 199-224, 1976.

78. OHENE, F.K.; SCHWARTZ, E. Clinical features of thalassemia. **Pediatric Clinics of North American**, v. 27, p. 403, 1980.

79. REIS, P.R.M. et al. Prevalência de hemoglobinopatias e talassemias em crianças de 6 meses a 7 anos de idade no laboratório escola do departamento de biomedicina (CBB)-UCG. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 1, p. 3-5, 2005.

80. ELGHETANY, M.T.; DAVEY, F.R. **Doenças eritrocitárias**. In: Henry J. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais São Paulo: MANOLE, 1999. p. 617-718.

81. MADAN, N.; SIKKA, M.; SHARMA, S.; RUSIA, U. Haematological parameters and Hb A2 levels in beta-thalassaemia trait with coincident iron deficiency. **Indian Journal of Pathology Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 309-313, 1998.

82. SHINE, J. W. Microcytic Anemia. **American Academy of Family Physician**, v. 55, n. 7, p. 2455-2462, 1997.

83. HARTHOORN-LASTHUIZEN, E.J.; LINDEMANS, J.; LANGENHUIJSEN, M.M.A.C. Influence of iron deficiency anaemia on haemoglobin A2 levels: possible consequences for β -thalassaemia screening. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 59, p. 65-70, 1999.

84. THEIN, S.L. Genetics insights into the clinical diversity of , thalassaemia. **British Journal of Haematology**, v. 124, p. 264-274, 2004.

85. FAILACE, R.; ANTUNES, C. O hemograma no Cell Dyn 4000 no diagnóstico diferencial entre beta talassemia minor e anemia ferropênica. **Laes & Haes**, v. 2, p. 98-114, 2003.
86. SAÉNZ, G.F.; CHAVES, M.; MONTERO, A., JIMENEZ, J. Síndromes de Beta talassemia o Heterocigota II. Aspectos Analíticos-diagnosticos. **Revista Costariquense de Ciencias Médicas**, v. 9, n 1,p. 83- 91, 1988.
87. BESSMAN, J.D.; GILMER, P.R.; Jr. GARDNER, F.H. Improved classification of anemias by MCV and RDW. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 80, n. 3, p. 322-326, 1983.
88. ASLAN, D.; GUMRUK, F.; GURGEY, A.; ALTAY, C. Importance of RDW value in differential diagnosis of hypochrome anemias. **American Journal of Hematology**, v. 69, n. 1, p. 31-33, 2002.
89. GREEN, R.; KING, R. A new red cell discriminant incorporating volume dispersion for differentiating iron deficiency anemia from thalassemia minor. **Blood Cells**, v. 15, n. 3, p. 481-95, 1989.
90. LERMEN, L. et. al. TALASSEMIA BETA MINOR: estudo de caso e revisão da literatura. **Revista Estudos da Biologia**, v. 29, n. 68/69, p. 329-334, jul/dez 2007.
91. MELO, P.R. et al. A importância do diagnóstico precoce na prevenção das anemias hereditárias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p. 149-52, 2006.
92. MATOS, J.F. et al. O hemograma nas anemias microcíticas e hipocrômicas: aspectos diferenciais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 4, p. 255-258, agosto 2012
93. LIMA, C.S, REIS, A.R, GROTO, H.Z, SAAD, S.T, COSTA, F.F. Comparison of red cell distribution width and a red cell discriminant function incorporating volume dispersion for distinguishing iron deficiency from beta thalassemia trait in patients with microcytosis. **São Paulo Medical Journal**, v. 114, n. 5, p. 1265-9, 1996.

94. ALFADHLI, S.M.; AL-AWADHI, A.M.; ALKHALDI, D. Validity assessment of nine discriminant functions used for the differentiation between iron deficiency anemia and thalassemia minor. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 53, n. 2, p. 93-7; 2007.
95. HENNEBERG, R. **Caracterização eritrocitométrica diferencial entre portadores de traço falciforme, beta talassemia menor e deficiência de ferro**. 2003. 96f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2003.
96. HENNEBERG, R.; LEITE, A.A.; NASCIMENTO, A.J. Caracterização eritrocitométrica diferencial entre portadores de anemia por deficiência de ferro, traço falciforme e beta talassemia menor. **Visão Acadêmica**, v. 9, n.2, p. 55-64, Jul-Dez, 2008.
97. GUERRA-SHINOHARA, E.M.; SANTOS, H.G. Estudo morfológico do hemograma: variação inter-observador em um painel de casos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 30, p. 41-44, 1998.
98. CAO, A. Phenotype-Genotype Relationships in Mendelian Disorders: the Example of β -Thalassemias. **Italian Journal of Pediatrics**. v. 28, n. 6, p. 440-452, 2002.
99. MIRI-MOGHADDAM, E.; SARGOLZAIE, N. Cut off Determination of Discrimination Indices in Defferential Diagnosis between Iron Deficiency Anemia and β -Thalassemia Minor. **International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research**, v. 8, n. 2, p. 27-32, 2014.

DADOS FINAIS**Data:****Discente:****Assinatura:****Data:****Orientador:****Assinatura:**