

Lígia Márcia da Silveira Viana

**Contribuição à Prevenção de Hemoglobinopatias,
a Partir do Estudo em Gestantes**



CONTRIBUIÇÃO À PREVENÇÃO DE HEMOGLOBINOPATIAS, A PARTIR DO ESTUDO EM GESTANTES



843/99

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas-Genética.

Orientada: Lígia Márcia da Silveira Viana

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum

São José do Rio Preto - SP

1998

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Naoum
Professor Titular do Departamento de
Biologia, da Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"- Campus de São
José do Rio Preto - S.P.



Agradecimentos Gerais

- Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo César Machado, pela orientação, pelo apoio e sempre disponíveis durante todo o desenvolvimento deste trabalho.
- Aos Prof. Dr. Odair Carlos Micheliro e Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilha Rodriguez pela participação nos bancos examinadores.
- À Profa. Dra. Cláudia Regina Fernal Lamingos, pela amizade, pelo auxílio no desenvolvimento e redação deste trabalho, e também pelo carinho especial que sempre teve comigo durante toda a minha vida universitária.
- Às Irmãs Rosi M. Lima, Ana Regina Chinelato, Fátima Souza, Suzia A. Gimenez, Patrícia M. C. Hassan e Valéria C. Ruffo, pelo apoio, incentivo, pela amizade e por todo o apoio.
- À Profa. Dra. Adriana Baileiros Santos pela análise estatística.
- Ao Prof. Dr. Jurema R. Colares pelo auxílio na redação do "Abstract".
- À bibliotecária Maria do Carmo Junqueira pelo auxílio na pesquisa bibliográfica e à Natana H. Mural pelo apoio e pelo carinho durante o desenvolvimento deste trabalho.
- Às Alunas S. Andreia, Ana Carolina C. V. Vidal, Leonilda P. L. Xavier, Luíza M. Camargo, Márcia R. M. S. Chio, Márcia V. Pass, Mari S. Guimarães, Sônia V. Sotomaior, Roberta L. Silva, Valéria L. Camarotto, Sônia R. P. M. Pass e a todos os amigos do Departamento de São José do Rio Preto, pela amizade, paciência e incentivos constantes.
- Ao Prof. Luiz Carlos de Moraes pelas observações que ajudaram a aprimorar este trabalho.

- À Família Adriana, Patrícia, Camila, e às duas irmãs muito especiais, a "Nina" pelo apoio e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

- À Deus e ao Pai-Santo, por tudo que me deu e por tudo que me ajudou a concluir este trabalho.

Dedico este trabalho,
aos meus pais: Alcebiades e Irma,
meus irmãos: Bidinho e José Ricardo e
ao meu esposo Edson,
por todo apoio recebido e por tudo o que
representam para mim.

Agradecimentos Gerais

- Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo César Naoum, pela orientação, pelo apoio e atenção dispensados durante todo o desenvolvimento deste trabalho;
- Aos Prof. Dr. Odair Carlito Michelino e Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, pela participação nesta banca examinadora;
- A Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos, pela amizade, pelo auxílio no desenvolvimento e redação deste trabalho, e também pelo carinho especial que sempre teve comigo durante toda a minha vida universitária;
- À Ana Paula M. Lima, Ana Regina Chinelato, Fátima Souza, Soraia J. Gimenez, Patrícia M. C. Hassan e Valéria C. Rufo, pelo companheirismo, pela amizade e por todo o apoio;
- À Profa. Dra. Adriana Barbosa Santos pela análise estatística;
- Ao Prof. Dr. James R. Coleman pelo auxílio na redação do "Summary";
- À bibliotecária Maria do Carmo Junqueira pelo auxílio na revisão bibliográfica e à Neusa H. Murai pelo apoio e pelo carinho, durante o desenvolvimento deste trabalho;
- À Adelaide S. Andreto, Ana Cristina C V. Vidal, Leonilda F.L. Xavier, Luciana M. Conceição, Márcia R.M.S. Claro, Márcia V. Foss, Marli B. Guimarães, Sandra V. Bolonhesi, Roberta L. Silva, Valéria C. Genáscoli, Sílvia R.P.N. Rosa e a todos os amigos do Hemocentro de São José do Rio Preto, pela amizade, paciência e incentivos constantes;
- Ao Prof. Luiz Carlos de Mattos pelas observações que ajudaram a arrematar este trabalho;
- À Fátima Adriana, Patrícia Caetano, e de uma forma muito especial à "Nilde", pelo apoio e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho;
- À Dirce e Valdir Scaramuzza, Laura R.S. Andrade e à todos os funcionários do Centro de Saúde de Jales e região; de Tanabi e Castelinho (S.J.Rio Preto) pela colaboração na divulgação do programa, na coleta das amostras de sangue, e pela disponibilidade demonstrada durante o desenvolvimento técnico deste trabalho;
- E a todos que de uma forma ou de outra auxiliaram para que este trabalho pudesse ser finalizado.

SUMÁRIO

I - RESUMO.....	2
II - SUMMARY.....	3
III - INTRODUÇÃO	
1. As hemoglobinas Normais.....	4
1.1. Síntese e Ontogenia.....	4
1.2. Fisiologia.....	10
2. Hemoglobinopatias: Variantes de Hemoglobinas e Talassemias.....	13
2.1. Variantes de Hemoglobinas.....	13
2.2. Talassemias.....	15
3. Variantes de Hemoglobinas.....	15
3.1. Hemoglobina S.....	16
3.2. Hemoglobina C.....	22
3.3. Hemoglobina D.....	23
3.4. Hemoglobina E.....	23
3.3. Hemoglobina J.....	24
4. Talassemias.....	25
4.1. Talassemia Alfa.....	27
4.2. Talassemia Beta.....	34
4.3. Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (P.H.H.F.).....	42
5. Distribuição Geográfica e Prevenção das Anemias Hereditárias	44
6. Objetivos.....	48

IV - MATERIAL E MÉTODOS

a. Parte Preventiva.....	49
b) Parte Analítica.....	50
b.1. Testes Seletivos.....	51
b.2. Testes Específicos.....	55
b.3. Testes para Caracterização de Sub-unidades Protêicas	62
b.4. Testes Estatísticos.....	65

V - RESULTADOS

1. Metodologia utilizada para divulgação e conscientização.....	67
2. Análises Laboratoriais.....	69
3. Análise Estatística	79

VI - DISCUSSÃO.....83

VII - CONCLUSÃO.....90

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....92

IX - ANEXOS.....108



Atualmente o controle das hemoglobinopatias em nosso meio tem sido possível através do aconselhamento genético e do diagnóstico precoce. O esclarecimento dos heterozigotos, em especial dos casais de risco, pode contribuir para evitar o nascimento de crianças portadoras de uma patologia genética, muitas vezes letal. Assim, a triagem para hemoglobinas anormais constitui a primeira etapa deste processo. O presente trabalho é uma contribuição para o desenvolvimento de projetos científicos que tenham, entre outros objetivos, o de prestação de serviços à saúde da comunidade e ao controle e prevenção das hemoglobinopatias em nosso meio

I - RESUMO

A população brasileira, reconhecidamente muito miscigenada, devido às características de nossa colonização, e aos processos migratórios e imigratórios, apresenta genes para as hemoglobinas anormais com frequências variáveis, e influenciados por seus grupos raciais formadores. A detecção de portadores destas alterações genéticas é de importância para a saúde pública, pois representam fonte de novos heterozigotos e de possíveis homozigotos. Atualmente, o controle das hemoglobinopatias somente tem sido possível por meio do aconselhamento genético e diagnóstico precoce. O acompanhamento clínico dos homozigotos, o esclarecimento dos heterozigotos e em especial dos casais de risco, pode contribuir para evitar o nascimento de crianças portadoras de uma patologia genética, muitas vezes letal.

Por essas razões o presente trabalho teve como objetivos: a) Avaliar a importância da análise de gestantes para detecção de hemoglobinopatias com os objetivos de detectar a prevalência e efetuar a prevenção, o estudo familiar e a conscientização. Para os casos positivos como casal de risco, orientar para o devido encaminhamento médico; b) Avaliar a resposta ao programa.

Do total de 696 gestantes analisadas, 10,7% apresentaram hemoglobinopatias, com as seguintes prevalências: Talassemia alfa 6,75%; Hb AS 2,01%; Talassemia beta menor 1,29%; Hb AC 0,28%; Hb AJ 0,14%; Hb AS/Tal. alfa: 0,14% e P.H.H.F. 0,14%.

A elevada prevalência de hemoglobinopatias encontrada na população de gestantes estudada, evidencia a necessidade da implantação de exames para hemoglobinopatias na rotina de pré-natais, uma vez que neste período as mães estão mais propensas à se preocuparem com sua própria saúde e à de seu bebê e, quanto mais precoce forem diagnosticadas as alterações das hemoglobinas, melhor e mais adequada será a orientação dada ao casal.



II. SUMMARY

The Brazilian population, recognizedly very mixed, due to the characteristics of our colonization, and to the migratory and immigratory processes, represents genes for abnormal hemoglobins with variable frequencies, which are influenced by the founding racial groups. The detection of carriers of the genetic alterations is important for public health, since they represent sources of new heterozygotes and possible homozygotes. Presently, the control of the hemoglobin pathologies has only been possible by means of genetic counseling and early diagnosis. The clinical attendance of the homozygotes, the orientation of the heterozygotes and especially the couples of risk represent a more effective mode of acting to avoid the birth of children carriers of a genetic disease, frequently lethal.

For these reasons this work had as objectives: a) Evaluate the importance of pregnant women for the detection of hemoglobin pathologies with the objectives of detecting prevalence, realizing prevention, the family study and awareness. For the positive cases such as couples of risk, orient as to appropriate medical attendance; b) Evaluate the response to the program.

Of the total of 696 pregnant women analysed, 10,7% revealed hemoglobin pathologies, with the following rates: alpha Thalassemia 6,75%; Hb AS 2,01%; beta minor Thalassemia 1,29%; Hb AC a,28%; Hb AJ 0,14%; Hb AS/Alpha Thalassemia 0,14% and P.H.H.F. 0,14%.

The high rates of hemoglobin pathologies encountered in the population of pregnant women studied shows the necessity of the implantation of tests for hemoglobin pathologies in the pre-natal routine, since in this period the mothers are more apt to be preoccupied with their own healthy and that of their baby and, however earlier diagnosed the alterations in the hemoglobins, better and more adequate will be the orientations given the the couple.



III - INTRODUÇÃO:

1. AS HEMOGLOBINAS NORMAIS:

1.1. SÍNTESE E ONTOGENIA:

A hemoglobina dos vertebrados é uma molécula globular e tetramérica com peso molecular de 67.000 daltons, cuja função principal consiste no transporte de oxigênio das vias respiratórias para os tecidos e de CO₂ no sentido inverso. Quimicamente, é composta pela conjugação de grupos prostéticos, contendo ferro, denominados heme, com a fração proteica, chamada globina. A fração protéica da molécula de hemoglobina humana é formada por quatro cadeias polipeptídicas com um total de 574 aminoácidos. Duas destas cadeias são constituídas por 141 aminoácidos cada, e denominados tipo alfa (alfa e zeta), e as outras duas com 146 aminoácidos cada, conhecidas como tipo beta (beta, gama, delta e epsilon) (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974).

As cadeias do tipo alfa são elaboradas por genes específicos localizados no braço curto do cromossomo 16 em uma região de aproximadamente 25 Kb (ANTONARAKIS *et al*, 1985). No complexo gênico alfa (Figura 01) existem dois genes estruturais, alfa1 e alfa2, que expressam a síntese da globina alfa, e ambos permanecem em atividade durante toda a vida do indivíduo. Outros genes pertencentes a este complexo gênico são o zeta (de atuação na fase embrionária) e os pseudogenes ψ alfa1 e ψ zeta que possuem sequências homólogas aos genes estruturais ativos, porém contém mutações que inibem sua expressão (WEATHERALL & WAINSCOT, 1985).

As cadeias do tipo beta são produzidas por genes localizados no braço curto do cromossomo 11 (Figura 01), em uma região de aproximadamente 50 Kb. Contidos neste grupo estão também os genes epsilon (fase embrionária), gama-glicina e gama-alanina (fase fetal), beta e



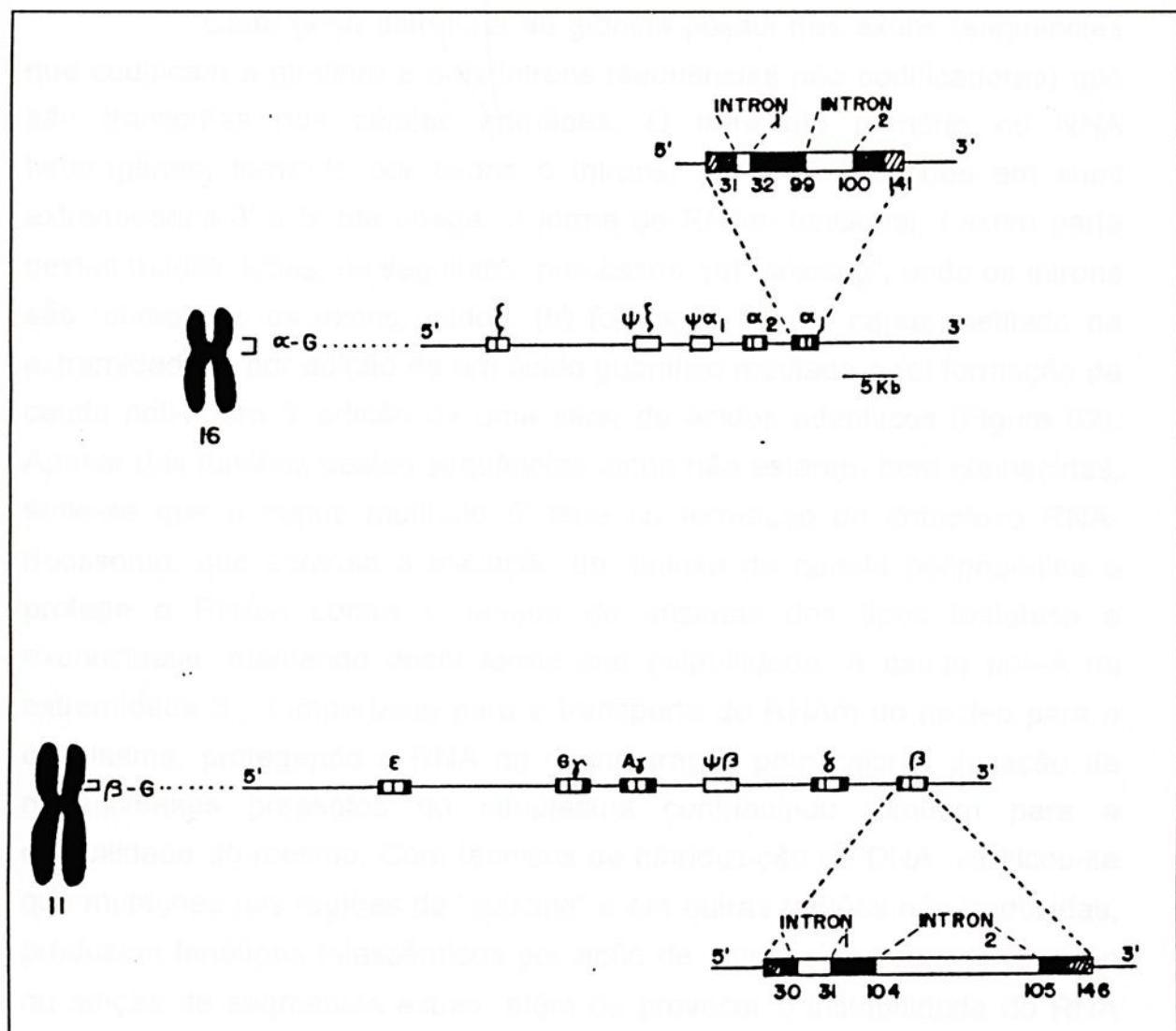


Figura 01: Localização cromossômica dos genes da globina humana. Faixas escuras representam exons e faixas claras os introns; regiões hachuradas representam áreas não transcritas. Os números abaixo dos exons representam a quantidade de resíduos de aminoácidos codificados na sequência primária.

delta (atuantes a partir da fase final do período fetal e com expressividade constante após o sexto mês de vida) (ANTONARAKIS *et al*, 1985).

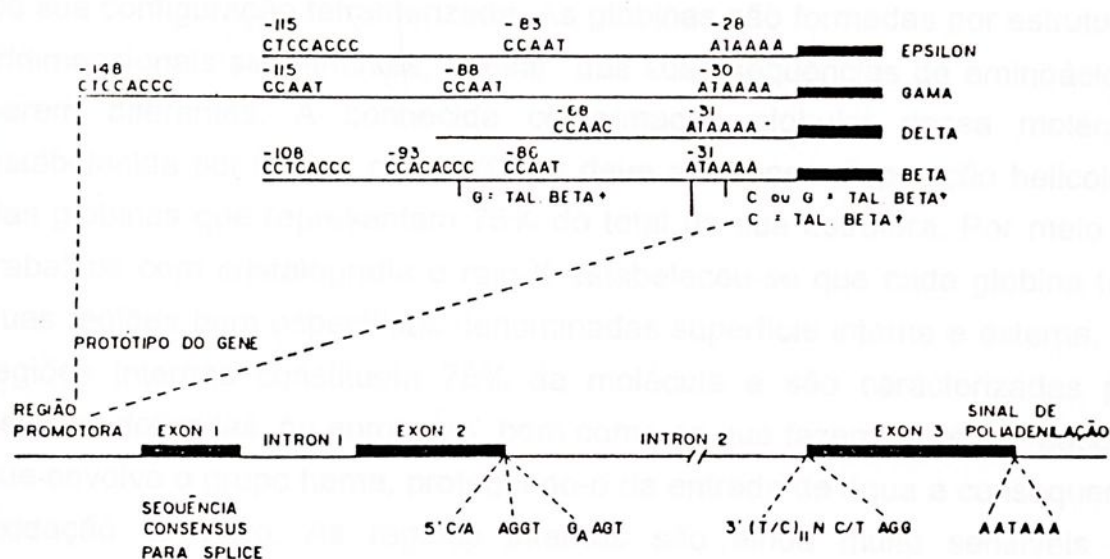
Cada gene estrutural da globina possui três exons (sequências que codificam a globina) e dois introns (sequências não codificadoras) que são transcritas nas células eritróides. O transcrito primário ou RNA heterogêneo, formado por exons e introns, sofre modificações em suas extremidades 3' e 5' até chegar a forma de RNAm funcional. Fazem parte destas modificações, os seguintes processos: (a) "splicing", onde os introns são retirados e os exons unidos, (b) formação de um capuz metilado na extremidade 5' por adição de um ácido guanílico metilado e (c) formação da cauda poli-A em 3' adição de uma série de ácidos adenílicos (Figura 02). Apesar das funções destas sequências ainda não estarem bem conhecidas, sabe-se que o capuz metilado 5' atua na formação do complexo RNA-ribossomo, que controla a iniciação da síntese da cadeia polipeptídica e protege o RNAm contra o ataque de enzimas dos tipos fosfatase e exonuclease, mantendo desta forma sua estabilidade. A cauda poli-A na extremidade 3', é importante para o transporte do RNAm do núcleo para o citoplasma, protegendo o RNA da desnaturação pelo calor e da ação de ribonucleases presentes no citoplasma contribuindo também para a estabilidade do mesmo. Com técnicas de hibridização de DNA, verificou-se que mutações nas regiões de "splicing" e em outras regiões não traduzidas, produzem fenótipos talassêmicos por ação de novos sítios com diminuição ou adição de segmentos extras, além de provocar a instabilidade do RNA processado (LONG *et al*, 1990).

O processo de "splicing" é fundamental para a formação do RNAm final que será traduzido na globina específica. Esse processo ocorre devido ao reconhecimento entre introns e exons de sequências "consensus" como as GU na posição 5'e AG na extremidade 3' dos introns.

Uma notável característica do RNAm da globina é sua alta estabilidade sob condições de intensa síntese, o que contribui para que os reticulócitos continuem a sintetizar hemoglobina por vários dias após a perda do núcleo (HONIG & ADAMS, 1986).



PROMOTORES PARA O GENE DA GLOBINA TIPO BETA HUMANA
A - ESTRUTURA



B - EXPRESSÃO GÊNICA

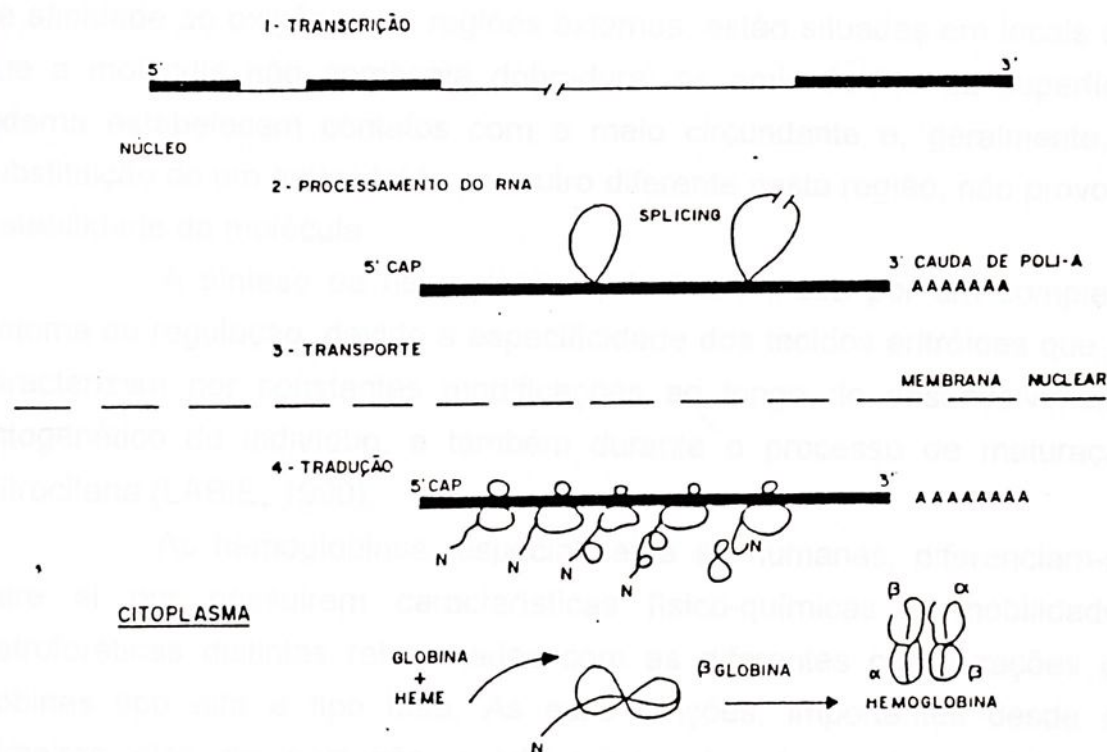


Figura 02: Estrutura dos genes da globina beta humana.

Cada molécula de hemoglobina apresenta em sua estrutura contatos físico-químicos, realizados por aminoácidos que promovem a estabilização de sua configuração tetramerizada. As globinas são formadas por estruturas tridimensionais semelhantes, apesar das suas sequências de aminoácidos serem diferentes. A conhecida conformação globular dessa molécula estabelecida por Perutz em 1970, se deve a extensa disposição helicoidal das globinas que representam 75% do total da sua estrutura. Por meio de trabalhos com cristalografia e raio-X estabeleceu-se que cada globina tem duas regiões bem específicas denominadas superfície interna e externa. As regiões internas constituem 75% da molécula e são caracterizadas por estarem dobradas, ou enroladas, bem como as que fazem parte do “pacote” que envolve o grupo heme, protegendo-o da entrada de água e consequente oxidação do ferro. As regiões internas são ainda muito sensíveis às mutações de um aminoácido por outro diferente, fenômeno que provoca a instabilização e/ou desnaturação da molécula, podendo alterar o processo de afinidade ao oxigênio. As regiões externas, estão situadas em locais em que a molécula não apresenta dobradura; os aminoácidos da superfície externa estabelecem contatos com o meio circundante e, geralmente, a substituição de um aminoácido por outro diferente nesta região, não provoca instabilidade da molécula.

A síntese de hemoglobinas, é determinada por um complexo sistema de regulação, devido a especificidade dos tecidos eritróides que se caracterizam por constantes modificações ao longo do desenvolvimento ontogenético do indivíduo, e também durante o processo de maturação eritrocitária (LABIE, 1990).

As hemoglobinas, especialmente as humanas, diferenciam-se entre si por possuírem características físico-químicas e mobilidades eletroforéticas distintas relacionadas com as diferentes configurações de globinas tipo alfa e tipo beta. As suas funções, importantes desde os primeiros dias de gestação, modificam-se durante o desenvolvimento embrionário e fetal devido a necessidade adaptativa de cada fase, até estabilizar-se por volta dos seis meses após o nascimento (Figura 03).



PERÍODO EMBRIONÁRIO



TIPOS DE Hb

CONCENTRAÇÕES

$\gamma_2\epsilon_2$ - Hb Gower - 1	20 - 40 %
$\gamma_2\epsilon_2$ - Hb Portland	5 - 20 %
$\alpha_2\epsilon_2$ - Hb Gower - 2	10 - 20 %
$\alpha_2\epsilon_2$ - Hb Fetal	5 - 40 %

PERÍODO FETAL

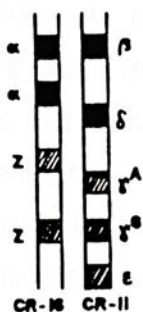


TIPOS DE Hb

CONCENTRAÇÕES

$\alpha_2\gamma_2$ - Hb Fetal	90 - 100 %
$\alpha_2\beta_2$ - Hb A	0 - 10 %
$\alpha_2\delta_2$ - Hb A ₂	0 - 1 %

PERÍODO PÓS-NASCIMENTO (acima de 6 meses)



TIPOS DE Hb

CONCENTRAÇÕES

$\alpha_2\beta_2$ - Hb A	96 - 98 %
$\alpha_2\delta_2$ - Hb A ₂	2,5 - 3,7 %
$\alpha_2\gamma_2$ - Hb Fetal	0 - 2 %

■ GENE ATIVO
 ▨ GENE INATIVO
 CR - CROMOSSOMO

Figura 03: Representação esquemática das hemoglobinas presentes nos diferentes estágios do desenvolvimento (NAOUM, 1987).

A primeira hemoglobina embrionária a se desenvolver é a Hb Gower1 ($\zeta 2\varepsilon 2$), predominante nas quatro primeiras semanas. Presentes até a décima segunda semana estão as Hb Portland ($\zeta 2\gamma 2$) e a Hb Gower2 ($\alpha 2\varepsilon 2$). Ao término desse período a síntese das cadeias ε e ζ é suprimida, embora possam continuar a ser sintetizadas em pequenas quantidades em recém-nascidos normais ou em grandes quantidades em crianças com aberrações cromossômicas, como no caso da trissomia do cromossomo 13 (BROUSSIOUS & BERTLES, 1982; RAMALHO, 1986). Ainda no período embrionário inicia-se a síntese das cadeias gama, que participam da constituição da Hb Fetal ($\alpha 2\gamma 2$), que gradativamente substitui as hemoglobinas embrionárias, atingindo sua produção máxima por volta do terceiro mês de gestação. Há dois tipos de cadeias gama, que diferem entre si por conterem o aminoácido glicina (γ^G) ou alanina (γ^A) na posição 136 da cadeia. Entretanto estas duas variantes são designadas frequentemente sob o nome de Hb Fetal, que representa o principal componente hemoglobínico da vida intra-uterina. A Hb A ($\alpha 2\beta 2$) começa a ser sintetizada à partir da décima semana mantendo-se em níveis não superiores a 10% na trigésima semana. Ao nascer, as concentrações das hemoglobinas A₁ e Fetal estão próximas de 20 e 80% respectivamente, tendo suas sínteses invertidas até estabilizarem-se, em média, no sexto mês de vida. Da mesma forma, a Hb A₂ ($\alpha 2\delta 2$) é sintetizada na fase final do período embrionário e estabiliza-se após o nascimento. O indivíduo com hemoglobinas normais é classificado como portador de Hb AA, com as seguintes concentrações: Hb A = 96,0 a 98,0 %; Hb A₂ = 2,5 a 3,7 % e Hb Fetal = 0,0 a 2,0 % (NAOUM 1998).

1.2. FISILOGIA:

O sangue humano transporta diariamente por meio da hemoglobina cerca de 600 litros de oxigênio dos pulmões para os tecidos. Nessas condições, a hemoglobina no sangue arterial está com saturação de O₂ próxima de 96%, e em sua passagem pelos tecidos libera cerca de um terço do oxigênio que transporta. O transporte de oxigênio pela hemoglobina



está baseado na capacidade dos seus átomos de ferro se combinarem de forma reversível com o oxigênio molecular. Estruturalmente, o grupo heme e o aminoácido histidina com o qual o ferro está ligado são os mesmos em todos os tipos normais de hemoglobinas. As hemoglobinas encontradas nos eritrócitos dos vertebrados têm quatro grupos heme ligados a dois pares de cadeias com tamanhos desiguais e sequências diferentes de aminoácidos (LEHNINGER *et al*, 1995).

O processo de ligação do oxigênio, foi demonstrado por Bohr e colaboradores em 1904, ao descobrir que a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio estava significativamente reduzida na presença de concentrações elevadas de dióxido de carbono. Estudos posteriores revelaram que este efeito se deve à diminuição do pH no interior dos eritrócitos nos tecidos periféricos. Assim, nos pulmões, a expulsão do dióxido de carbono causa um efeito inverso - denominado efeito Bohr alcalino, que resulta no aumento da ligação entre a hemoglobina e o oxigênio. O maior mediador fisiológico da afinidade pelo oxigênio é o 2,3 bifosfoglicerato (2,3 BPG), um fosfato orgânico, intermediário do metabolismo da glicose. Trabalhos realizados por Benesch *et al* em 1968, demonstraram que a remoção de fosfatos orgânicos da hemoglobina provoca um rápido aumento da afinidade pelo oxigênio, independentemente do pH (MATHEWS, 1990).

No processo fisiológico da oxigenação a molécula de hemoglobina desoxigenada se encontra numa primeira etapa, com 2,3 BPG inserido entre as duas cadeias de globina beta (Figura 04).

Inicia-se então a oxigenação dos grupos heme das duas globinas alfa. Ocorre em seguida, o ajustamento da conformação tetramérica provocado pelo processo de oxigenação que ao se completar nos grupos heme das globinas alfa começa a abranger as globinas beta. O movimento de adaptação a este processo é provocado pela aproximação entre as globinas beta, e a desacomodação do 2,3 BPG que é expelido, e finalmente, a oxigenação da molécula de hemoglobina se completa, após a captação de oxigênio por ambos os grupos heme das globinas beta.



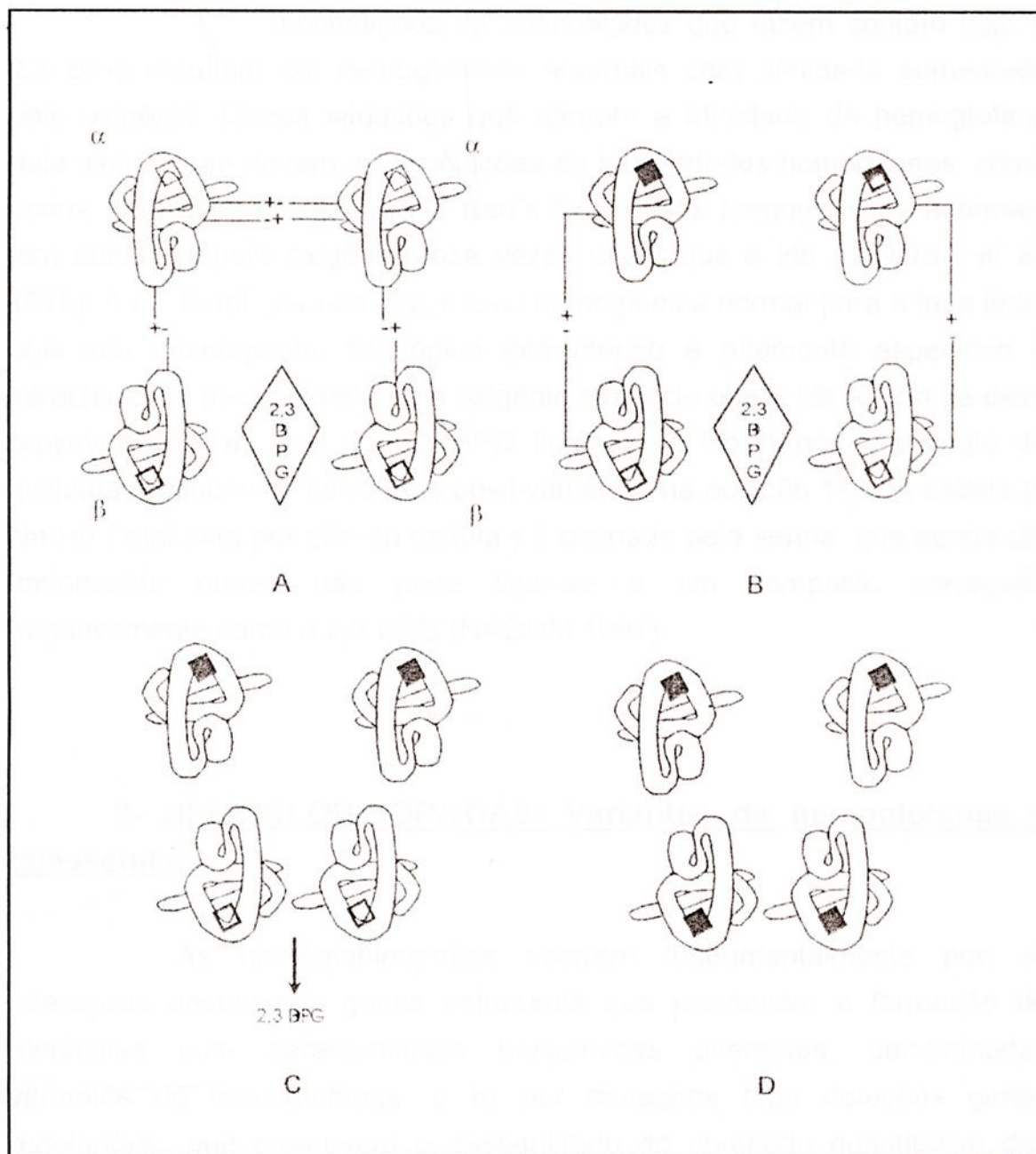


Figura 04: Fases da oxigenação da molécula de hemoglobina. A) Molécula desoxigenada. B) Início da oxigenação dos grupos heme da globina alfa. C) Desacomodação e expulsão da molécula de 2,3-BPG para permitir a oxigenação das globinas beta. D) Oxigenação das globinas beta e finalização do processo. (NAOUM,1997).

Substituições de aminoácidos que fazem contato com o 2,3 BPG resultam em hemoglobinas anormais com afinidade aumentada pelo oxigênio. Outras situações que alteram a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio se devem a associações de subunidades homogêneas, como ocorre com as Hb H (β_4) e Hb Bart's (γ_4). Essas hemoglobinas anormais têm afinidade pelo oxigênio doze vezes maior que a Hb A (ROSA *et al*, 1975). A Hb Fetal, por sua vez, é uma hemoglobina normal para a fase fetal, pois seu desempenho fisiológico intra-uterino é altamente específico e caracterizado por afinidade pelo oxigênio maior do que a Hb A. Isto se deve provavelmente ao fato do 2,3 BPG ligar-se à Hb A por intermédio da histidina (aminoácido carregado positivamente) na posição 143 da cadeia β . Na Hb Fetal esta posição da cadeia γ é ocupada pela serina, que sendo um aminoácido neutro não pode ligar-se a um composto carregado negativamente como o 2,3 BPG (NAOUM, 1997).

2- HEMOGLOBINOPATIAS: Variantes de hemoglobinas e talassemias.

As hemoglobinopatias ocorrem fundamentalmente por: a) alterações envolvendo genes estruturais que promovem a formação de moléculas com características bioquímicas diferentes, denominadas variantes de hemoglobinas, e b) por mutações e/ou deleções genes reguladores que promovem o desequilíbrio do conteúdo quantitativo das cadeias e conseqüentemente das hemoglobinas, originando as talassemias.

2.1 - VARIANTES DE HEMOGLOBINAS:

A maioria das variantes estruturais é originada por simples substituições de aminoácidos, que resultam em mudanças nas sequências



dos nucleotídeos. Alguns casos de variantes estruturais ocorrem por deleção de aminoácidos, produzindo profundas alterações na molécula de hemoglobina, tornando-as instáveis. As alterações estruturais, com consequências nas atividades físico-químicas da molécula, estão na dependência da extensão do processo mutacional e dos locais em que estes ocorrem. Assim, as hemoglobinas anormais podem originar-se por:

a) Substituição de um aminoácido por outro com características diferentes na superfície externa, e que não produzem alterações significativas no comportamento funcional da molécula, com exceção feita à hemoglobina S;

b) Substituição de aminoácidos na superfície interna da molécula, especialmente aqueles que fazem parte do “pacote” do grupo heme e dos contatos $\alpha 1\beta 1$, causando modificações, com formação de hemoglobinas instáveis e/ou de metahemoglobina;

c) Substituição de aminoácidos que participam dos contatos $\alpha 1\beta 2$ das ligações com o 2,3 BPG e do resíduo histidina C-terminal da cadeia beta, promovem a formação de variantes de hemoglobina com alterações na afinidade pelo oxigênio.

d) Adição de um ou mais aminoácidos na posição C-terminal das globinas alfa e beta, as quais manifestam-se como fenótipos talassêmicos;

e) Fusão entre duas cadeias de globinas diferentes, em especial delta-beta (Hemoglobina Lepore) ou beta-delta (Hemoglobina anti-Lepore). Outras fusões têm sido descritas na literatura e todas as ocorrências se devem ao crossing-over desigual no pareamento dos cromossomo (NAOUM 1987).

Em 1996, o IHIC (International Hemoglobin Information Center) publicou uma lista com mais de 700 variantes de hemoglobinas, sendo que poucas dessas variantes, estão associadas à manifestações clínicas e/ou hematológicas. As duas hemoglobinas variantes mais frequentes na população brasileira, são as Hb S e Hb C (NAOUM *et al.*, 1984; DOMINGOS, 1993; ALVARES-FILHO *et al.*, 1995).



2.2 - TALASSEMIAS:

As talassemias representam um grupo heterogêneo de síndromes provocadas pela diminuição geneticamente determinada na síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas, gerando um desequilíbrio entre as subunidades produzidas, dificultando o processo de eritropoiese e causando hemoglobinizacão deficiente dos eritroblastos. A nível periférico, as talassemias expressam-se com quadros morfológicos com alterações de intensidade variável, conforme o tipo de talassemia e o número de genes envolvidos. As talassemias são classificadas, segundo a cadeia polipeptídica produzida em taxa reduzida. Os tipos alfa e beta são os mais frequentes e melhor definidos, mas há também os tipos delta, delta-beta e gama-delta-beta. Existe ainda um outro grupo, que se caracteriza pela manutenção da hemoglobina Fetal em quantidades aumentadas na vida adulta que é designado por Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal - PHHF (HONIG & ADAMS, 1986; THOMPSON *et al*, 1993).

Os mecanismos que determinam as talassemias podem ser agrupados em dois tipos: aqueles que se relacionam às mutações nas porções codificadoras, e os que se devem à alterações em regiões não codificadoras, mas de importância na expressão gênica (KAZAZIAN Jr. *et al*, 1992).

Os tipos de talassemias mais prevalentes em nosso país, com números que variam segundo a origem racial da população analisada, são as talassemias alfa e beta nas suas diferentes formas, heterozigota, homozigota e interativa (RAMALHO, 1986; NAOUM, 1987; DOMINGOS, 1993; NAOUM, 1997).

3 - VARIANTES DE HEMOGLOBINA:

Entre as principais variantes de hemoglobina, as mais comuns, encontradas na população brasileira em ordem decrescente de frequência são: Hb S, Hb C, Hb D, Hb E e Hb J.



3.1 - HEMOGLOBINA S: originada por mutação puntiforme no gene da globina Beta, resultando em alteração estrutural na molécula. Por ser uma anomalia de cadeias beta, as características clínicas do estado homozigoto só serão perceptíveis após a estabilização da produção destas cadeias, o que ocorre por volta dos 4 a 6 meses de idade. No gene da globina S, há a substituição de um códon GAG para GTG, que resulta na troca do ácido glutâmico por valina, na posição 6 da cadeia. A valina é um aminoácido neutro enquanto que o ácido glutâmico é carregado negativamente e esta alteração resulta em mobilidade mais lenta da Hb S quando comparada com a Hb A, em eletroforese em pH alcalino. A carga negativa do ácido glutâmico auxilia no afastamento das moléculas de hemoglobina, enquanto que a valina, por ser neutra, favorece a polimerização sob condições de baixo teor de oxigênio. No estado oxigenado, as moléculas de Hb S estão "relaxadas", ou seja, as globinas beta ficam mais próximas. No estado desoxigenado, as moléculas ficam "tensas", e as cadeias beta mais separadas. Esta mudança de estado favorece o contato entre as regiões da desoxihemoglobina, o que não é possível no estado oxigenado. Há regiões de contato tanto laterais quanto axiais e que estão envolvidas na formação do polímero de hemoglobina. Uma vez formado o polímero, a célula passa da forma discóide e flexível, para a forma alongada e mais rígida, característica da Hb S (EDELSTEIN, 1986; FRANCIS & JOHNSON, 1991).

A polimerização da hemoglobina e a falcização da célula são dependentes da concentração de Hb S e podem ser mediados pela perda de oxigênio e desidratação das células, fatos que as tornam mais densas e facilitam o processo de falcização (FABRY *et al*, 1991).

As alterações de membrana resultantes da polimerização podem ser revertidas com a reoxigenação celular, porém, como o processo de falcização é repetitivo, as alterações funcionais aumentam e a célula torna-se irreversivelmente falcizada. Indivíduos homozigotos (Hb SS) possuem de 4 a 44% de eritrócitos falcizados irreversíveis na circulação periférica. Os eritrócitos falciformes irreversíveis são retirados rapidamente



da circulação, sendo 1/3 por hemólise intravascular e 2/3 por fagocitose (EDELSTEIN, 1986).

Dentre as alterações de membrana em eritrócitos falcêmicos, vale destacar os seguintes eventos: a) rearranjo das proteínas espectrina-actina; b) diminuição de glicoproteínas; c) geração de radicais oxidantes (a deficiência de vitamina E no plasma e nos eritrócitos facilita a auto-oxidação) e d) orientação anormal de fosfolípidos (BIERI *et al*, 1983; BLUMENFELD *et al*, 1991; SCHRIER & MOHANDAS, 1992; NAOUM, 1996, DOMINGOS *et al*, 1997).

A alteração celular causada pelo processo de falcização influencia intensamente o fluxo sanguíneo, aumentando sua viscosidade. Os eritrócitos falciformes irreversíveis têm capacidade aumentada de adesão ao endotélio vascular, devido principalmente, à alta viscosidade do sangue e elevação dos níveis de fibrinogênio, que ocorre como resposta natural à infecções. A deposição de eritrócitos alterados na superfície endotelial pode reduzir ou eventualmente obstruir totalmente a luz dos capilares, podendo causar estase venosa, com consequente hipóxia tecidual e trombozes. Os tecidos com deficiência de irrigação sofrem infartos com necrose e formação de fibroses, principalmente no baço, medula óssea e placenta (WAGNER *et al*, 1985; FABRY *et al*, 1992).

3.1.1 - Doença Falciforme (Hb SS): Termo genérico utilizado para determinar um grupo de alterações genéticas que incluem a Hb S, sendo usado tanto para o homozigoto (Hb SS) como para as interações com síndromes talassêmicas e outras hemoglobinas anormais (W.H.O., 1982)

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



Outras síndromes genéticas que associam a Hb S à diferentes hemoglobinas anormais e/ou talassemias, produzem estados clínicos que variam de moderada a acentuada, semelhante à desenvolvida pela anemia falciforme (Hb SS) (HONIG & ADAMS, 1986). Dentre as doenças falciformes com clínica mais grave destacam-se as resultantes de heterozigose (Hb S/Hb C, Hb S/Hb D; HbS/Hb O Arábia), onde a formação de cristais é facilitada pela presença das hemoglobinas anormais, favorecendo a modificação do eritrócito. A frequência de acidentes vasculares, comuns na anemia falciforme, estão diminuídos nos duplos heterozigotos (LAROS Jr. *et al*, 1971; RODGERS *et al*, 1986; POWARS *et al*, 1986; LAWRENCE *et al*, 1991; RIEDER *et al*, 1991).

A associação da Hb S com talassemias, promove melhora clínica ao portador, quando comparada com a anemia falciforme (Hb SS), devido ao fato da concentração de Hb S ser menor (SONATI *et al*, 1991). Em recente estudo efetuado por Lima, 1997, numa população de 89 pacientes com interação Hb S/talassemia alfa, observou-se que a alfa talassemia representa um modulador de parâmetros bioquímicos e clínicos relacionados à hemólise e ao comprometimento hepático na anemia falciforme, apresentando um efeito benéfico aos doentes falcêmicos. O portador de Hb S/Talassemia beta^o apresenta as hemoglobinas S, Fetal e A₂ e na talassemia beta⁺/ Hb S, verificam-se as presenças de hemoglobinas A, S (esta com maior concentração em relação à Hb A), Fetal e A₂. Assim, diminuição na concentração da Hb S minimiza a clínica da doença, com episódios de crise mais espaçados (COSTA *et al*, 1989; RIEDER *et al*, 1991). Homozigotos para o gene beta S associados a talassemia alfa (HbSS/talassemia alfa), ou com presença significativa de Hb Fetal apresentam curso clínico benigno, com expectativa de vida aumentada (RODGERS *et al*, 1986; HONIG & ADAMS, 1986; STEIMBERG, 1991; MAIER-RIDELSPERGER *et al*, 1994).

Segundo Chang *et al* em 1995, os níveis de Hb Fetal em indivíduos adultos com anemia falciforme (Hb SS) são variáveis e dependentes de fatores genéticos ou não, como idade, sexo, número de



genes da globina alfa envolvidos, haplótipos da globina beta^S e um locus ligado ao cromossomo X que regula a produção de células F (Production of Cell Fetal - FCP). À partir de estudos realizados em uma população de portadores de Hb SS na Jamaica, foi proposto ser o locus FCP responsável por mais de 40% desta variação, sendo que dentro de cada fenótipo FCP, a modificação é modulada por fatores associados com os três haplótipos de globina beta^S mais comuns na região (Senegal>Benin>Car) além de outros fatores ainda não identificados.

Tais observações incentivaram estudos nos genes responsáveis pela hemoglobina Fetal (gama glicina e gama alanina) na tentativa de ativar estes genes, pouco funcionantes nos indivíduos adultos, com o objetivo de aumentar a produção de Hb Fetal e assim, minimizar as consequências clínicas das alterações ligadas à Hb S (BALLAS *et al*, 1991, LANCOS *et al*, 1991; ELION *et al*, 1992).

Há duas características fisiopatológicas importantes relacionadas à anemia falciforme, a anemia hemolítica crônica e a vaso oclusão resultando em danos teciduais. A anemia hemolítica é causada pelas propriedades anormais da Hb S e/ou destruição precoce das células. A lesão tecidual é principalmente produzida por hipóxia oriunda da obstrução de vasos por acúmulo de eritrócitos falcizados. Sofrem maior risco os órgãos com "sinus" venoso onde a circulação do sangue é lenta e a tensão de oxigênio e pH são baixas (Ex: rins, baço, fígado e medula óssea) ou aqueles com limitada suplementação de sangue arterial (Ex: olhos; cabeça do fêmur) (POWARS, 1990).

Os sintomas de hipóxia também podem ser agudos com crises dolorosas, ou insidiosas, e os efeitos dos danos teciduais agudos ou crônicos, podem em último caso, resultar na falência do órgão, principalmente em pacientes com idade avançada. Um problema adicional e menos reconhecido nos pacientes falciformes é sua vida sob condições de estresse psicossocial, pois além do fato de serem portadores de doença crônica, convivem com o problema da natureza de sua doença, cuja repetição incomum afeta sua atuação tanto na escola quanto no trabalho e



reduz potencialmente seu senso de auto estima (TAVARES NETO, 1981; CHARACHE *et al*, 1991).

A detecção efetiva de diversas formas de síndromes falcêmicas requer diagnóstico laboratorial preciso, baseado principalmente em técnicas eletroforéticas, hemogramas e dosagem de Hb Fetal. Muitas vezes, a associação de eletroforeses alcalina e ácida é decisiva para o correto diagnóstico. Entretanto, há casos em que o padrão eletroforético da anemia falciforme é similar ao de algumas associações (Ex: Hb S/ Talassemia beta) e nessas situações, as análises laboratoriais devem ser específicas, já que o quadro clínico do paciente pouco difere em cada uma delas. Nos casos de suspeita de Hb S/P.H.H.F., a pesquisa da distribuição intraeritrocitária de Hb Fetal deverá ser realizada (CHARACHE *et al*, 1991). A associação de Hb SS com talassemia alfa ocorre com frequência de 32,6% entre os doentes com diagnóstico clínico de anemia falciforme.

3.1.2 - Traço Falciforme (Hb AS): Caracteriza o portador assintomático, heterozigoto da Hb S. Não padece de doença e nem possui anormalidades no número de eritrócitos. Nessa condição heterozigota, ocorre herança de um gene normal (beta A) e outro anormal (beta S), resultando na produção de cadeias beta normais e anormais, sempre com predomínio de Hb A. O diagnóstico laboratorial é realizado através de técnicas eletroforéticas.

O traço falciforme pode estar associado ocasionalmente à condições clínicas que incluem hipostenúria, hematúria, risco aumentado à infecções do trato urinário durante a gravidez e retardo constitucional na puberdade (BRITTO *et al*, 1984; POWARS *et al*, 1986; GONÇALVES & RAMALHO, 1990). Os portadores de Hb AS quando iniciam quadro de hipóxia raramente desenvolvem sintomas relacionados à vaso oclusão. Existem entretanto, relatos de morte súbita e complicações clínicas em portadores de Hb AS expostos à condições de baixa tensão de oxigênio, como anestésias prolongadas e esforços físicos extenuantes (HUTZ *et al*, 1983; SULLIVAN, 1987; CHARACHE, 1988).



3.1.3 - Biologia Molecular da Hb S: Todos os indivíduos são geneticamente diferentes e muitos produtos gênicos são conservados por várias gerações. Estas diferenças representam variações patológicas ou silenciosas de DNA. As variações silenciosas ou neutras são designadas polimorfismos e podem ser detectadas por duas vias:-

a) Análise sequencial de fragmentos de DNA clonados. Através de técnicas de biologia molecular, é possível hoje isolar determinado gene do restante do genoma humano;

b) Muitas vezes as substituições de nucleotídeos neutros podem remover ou introduzir sítios clivados por endonucleases de restrição. Várias enzimas deste tipo são comercializadas tornando possível a análise de um pequeno fragmento de DNA com diferentes sítios de clivagem para detecção de polimorfismos (ANTONARAKIS *et al*, 1985).

Kan e Dozy, 1978, descreveram o polimorfismo de DNA para o gene beta globínico, através da localização de um sítio de clivagem pela enzima Hpa I e, a frequente associação de sua ausência com o alelo da Hb S foi utilizado pelos autores como ferramenta para o diagnóstico pré-natal. Após esses achados, um grande número de outros sítios polimórficos no gene beta foram identificados.

Grupos gênicos ligados à tais polimorfismos, designados haplótipos, são úteis marcadores para análises genéticas, relacionando os segmentos específicos do cromossomo à população que está sendo avaliada.

As características clínicas da anemia falciforme são marcadas pela diversidade de manifestação entre seus portadores, devido a fatores como concentração de Hb Fetal aumentada, associação entre a Hb S e talassemia alfa, fatores ecológicos (ex.: clima), condições sócio-econômicas e atenção médica. Entretanto, a maioria das diferenças clínicas e hematológicas deve-se a fatores genéticos relacionados a outros genes que podem estar ligados ou não ao gene da globina β^S e que são capazes de modificar a expressão da doença. Portanto, o curso clínico e a gravidade da anemia falciforme (Hb SS) estão relacionados ao haplótipo herdado, que



pode ser caracterizado pela ação de enzimas de restrição. Até o presente, foram identificados cinco haplótipos diferentes para o gene da globina β^S , e existem indícios de que todos originaram-se separadamente. São eles: Árabe-Indiano (Asiático), Senegal, Benin, Bantu ou República Centro Africana (RAC) e Camarões. Os haplótipos Benin e Bantu estão associados ao aumento da gravidade clínica da doença e são os mais freqüentes na população mundial. Os portadores dos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano apresentam níveis de Hb Fetal significativamente elevados, diminuindo assim, as consequências dos processos fisio-patológicos da falcização. Na África, os indivíduos com anemia falciforme são haplotipicamente homozigotos. Nas Américas, devido ao alto grau de miscigenação, os portadores de anemia falciforme são haplotipicamente heterozigotos (ABBES *et al*, 1991; NAGEL & RANNEY, 1991; RIEDER *et al*, 1991). No Brasil, estudos realizados em diferentes regiões, mostraram que a maior frequência do gene da Hb S é proveniente do haplótipo Bantu seguido de Benin, com exceção da Bahia, onde há uma proporção ligeiramente maior do haplótipo Benin. Esses achados mostram concordância com os registros históricos de tráfico de escravos. Entre 1701 e 1816, o Brasil recebeu cerca de 1,9 milhão de escravos, dos quais 68% vieram de Angola (haplótipo Bantu) e os demais da Bacia de Benin (ZAGO, 1993).

3.2 - HEMOGLOBINA C: A Hb C é uma hemoglobina anormal originada pela substituição do ácido glutâmico por lisina na posição 6 da globina beta. Essa troca de um aminoácido de carga negativa por outro de carga positiva altera sensivelmente a mobilidade da hemoglobina, sendo facilmente diferenciável da Hb A em eletroforeses de pH alcalino e ácido. É frequente em povos da África Ocidental, onde atinge valores entre 15 e 30% (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974).

Os heterozigotos (Hb AC) não apresentam anemia ou evidências de diminuição no número de eritrócitos. A análise da morfologia eritrocitária pode demonstrar células em alvo. A identificação desses



portadores é feita por eletroforese de pH alcalino e como outras hemoglobinas anormais migram na mesma posição neste pH, devido a semelhança entre seus pontos isoelétricos, a caracterização deve ser realizada por eletroforese em pH ácido ou focalização isoelétrica. O diagnóstico dos portadores heterozigotos é fundamental para a realização do aconselhamento genético, já que a associação dessa variante com Hb S, talassemias, ou em homozigose (Hb CC), apresentam alterações clínicas. No Brasil a prevalência da Hb AC é de 0,6 a 1% em diversas regiões, sendo as formas interativas mais raras (NAOUM *et al*, 1984; DOMINGOS, 1993; NAOUM, 1997).

3.3 - HEMOGLOBINA D: É uma variante de cadeia beta que demonstra a mesma mobilidade eletroforética da Hb S em pH alcalino, diferenciando-se entretanto por eletroforese em ágar pH ácido. Além disso, não apresenta falciformação dos eritrócitos e sua solubilidade é semelhante à da Hb A. O portador heterozigoto (Hb AD), é assintomático e a fração anormal constitui cerca de 35 a 50% da hemoglobina total. A homozigose para a Hb D é de ocorrência muito rara, sendo sempre importante a análise familiar para os casos suspeitos de homozigose que apresentam discreto grau de anemia e são assintomáticos (HONIG & ADAMS, 1986).

Entre as variantes de hemoglobinas, cinco foram classificadas como Hb D, apesar de serem bioquimicamente diferentes: Hb D Los Angeles ou Punjab, D Bushman, D Ouled Rabah, D Iran e D Ibadan. Dentre estas a mais prevalente é a Hb D Los Angeles ou Punjab, sendo sua frequência próxima a 3% entre os habitantes do noroeste da Índia. No Brasil, a Hb D Los Angeles ou Punjab tem sido observada na razão de 1 caso para 5 mil pessoas analisadas (NAOUM, 1997).

3.4 - HEMOGLOBINA E: É uma variante de cadeia beta onde o aminoácido lisina da posição 26 é substituído por ácido glutâmico. Em eletroforese de pH alcalino migra na mesma posição de Hb C, e a



diferenciação laboratorial entre estas hemoglobinas é realizada por eletroforese em ágar pH ácido. Nos heterozigotos a fração de Hb E constitui 30 a 45% da hemoglobina. Outra característica interessante dessa variante é a discreta instabilidade molecular observada nos testes de desnaturação ao calor. Os portadores heterozigotos para Hb E são assintomáticos. Os homozigotos, por sua vez, apresentam geralmente esplenomegalia e discreto grau de anemia, com microcitose e células em alvo. Os sinais de hemólise são mínimos, podendo em certas circunstâncias, como por exemplo febre, se tornarem mais evidentes. Nesses pacientes observa-se redução da fragilidade osmótica. Os portadores de Hb E associada às talassemias alfa ou beta, ou com outras variantes, especialmente a Hb S, podem apresentar sintomas clínicos mais importantes. Em algumas regiões da Tailândia, onde a prevalência da Hb E chega a ser de 50%, podem ocorrer formas complexas de interações com talassemia alfa que resultam em interações com talassemia beta, causando anemia. Entretanto é possível que seja detectado em imigrantes e descendentes de pessoas provenientes do Extremo Asiático (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974; NAOUM, 1997).

3.5 - HEMOGLOBINA J: Forma variante com mobilidade eletroforética bem característica em pH alcalino, movendo-se ligeiramente mais rápida que a Hb A. Em eletroforese em ágar de pH ácido, a mobilidade é semelhante à da Hb A. Os portadores heterozigotos (Hb AJ), são assintomáticos e apresentam valores hematológicos normais. Os casos descritos de associação entre Hb J e beta talassemia revelam discreto grau de anemia. Foram relatados vários tipos de Hb J, todos apresentando as mesmas características de mobilidade da hemoglobina nos pH alcalino e ácido. Entretanto, por meio de eletroforese de cadeias polipeptídicas, é possível diferenciar alguns tipos de Hb J mais frequentes. O fingerprint de péptidos permite caracterizá-las estruturalmente. Entre os vinte e três tipos de Hb J, destacam-se três variantes que tem sido identificadas em diferentes regiões do Brasil, no estado de heterozigose: Hb J Oxford: α^{15}



Gli $\rightarrow$ Asp; J Baltimore: $\beta 16$ Gli $\rightarrow$ Asp; e Rovigo: $\alpha 53$ Ala $\rightarrow$ Asp (NAOUM *et al*, 1984; DOMINGOS, 1993). A forma J Oxford e J Rovigo, por serem mutantes de cadeia alfa, permitem identificar, além da fração J, um menor componente, o J2, oriundo do tetrâmero $\alpha_2^J \delta_2^A$, entre as posições de Hb A₂ e Hb S. A Hb J Baltimore, por ser mutante de cadeia beta, não apresenta este componente menor. Uma outra propriedade que permite diferenciar essas três variantes, é determinada pela concentração de Hb AJ nos portadores heterozigotos. Apesar da Hb J Rovigo ser uma variante de cadeias alfa, sua fração apresenta quantidades variáveis entre 35 e 40%, enquanto que a Hb J Oxford, também uma alfa variante, tem concentrações entre 15 e 20%. No Brasil, a prevalência de Hb AJ, independente do tipo, é próxima de um caso para 2 mil pessoas analisadas (NAOUM, 1997).

4 - TALASSEMIAS:

O termo talassemia foi usado pela primeira vez em 1936 por Whipple e Bradford, para designar uma anemia altamente incidente na região do mar mediterrâneo, e que havia sido descrita por Cooley e Lee em 1925, em crianças descendentes de italianos, gregos e sírios. Continuou sendo chamada também de anemia de Cooley em homenagem a este autor que primeiro a descreveu e caracterizou com uma entidade clínica. Dentre as características observadas por Cooley, podemos citar, anemia hemolítica grave com aumento no volume do fígado e baço, alterações ósseas, resistência osmótica dos eritrócitos aumentada e leucocitose (WHEATHERAL *et al*, 1981).

Através de estudos sobre as alterações hemoglobínicas relacionadas às talassemias, estas foram classificadas entre as hemoglobinopatias hereditárias, e a talassemia clássica passou a ser designada talassemia beta. As outras formas foram classificadas segundo a alteração da respectiva cadeia. A diferenciação das talassemias é complexa



considerando-se o amplo espectro de variações nas manifestações clínicas dos diferentes alelos afetados e a associação destes com outras hemoglobinopatias. De modo geral, a classificação inicial segundo o tipo de cadeia afetada pode hoje ser designado pelo tipo de alteração genética que o originou sendo caracterizadas molecularmente centenas de subtipos de talassemias. Até 1992, estimava-se mais de 150 diferentes pontos de mutação que causavam talassemia beta sem contar inserções e deleções, e acredita-se que com o avanço cada vez maior da tecnologia para a análise molecular, centenas de outras mutações que causam talassemias serão encontradas (HUISMAN, 1990; HUISMAN, 1992; JANKOVIC *et al*, 1992; KOO *et al*, 1992, CAI *et al*, 1992).

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

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

Embora seja conveniente classificar separadamente as condições talassêmicas daquelas em que resultam a P.H.H.F., há evidências de que muitos desses casos são formas de delta-beta talassemias. A maioria das



talassemias podem ser definidas laboratorialmente por estudos hematológicos, eletroforese de hemoglobinas, e quantificação de hemoglobinas A₂ e Fetal. A determinação molecular é uma técnica altamente específica que permite a caracterização dos diferentes tipos de alteração. Os tipos de talassemias mais prevalentes em nosso país, com números que variam segundo a origem racial da população analisada, são as talassemias alfa e beta, e que se manifestam geneticamente através das formas heterozigota, homozigota e interativas (RAMALHO, 1986; DOMINGOS, 1993; NAOUM, 1997).

4.1 - TALASSEMIA ALFA:

Em 1955 foi descrita pela 1ª vez nos Estados Unidos e Grécia, uma nova hemoglobina rápida denominada Hb H, com características instáveis, formando corpúsculos de inclusão nos eritrócitos quando submetidos à incubação e coloração vital. A identificação de que a Hb H era composta por tetrâmeros de cadeia beta, foi realizada por técnicas de hibridização e por análises bioquímicas, sugerindo que se tratava de uma patologia causada por defeito nos genes alfa. Os portadores dessa patologia, denominada doença de Hb H, apresentavam anemia com graus variáveis, diminuição da fragilidade osmótica, e presença de Hb H nos eritrócitos e em eletroforese (WILLIAMS *et al*, 1976).

Em 1965 tornou-se possível medir a taxa de síntese de cadeias alfa e beta e visualizou-se então um progressivo decréscimo de cadeias alfa nos portadores de talassemia alfa, doença de Hb H e hidropsia fetal, respectivamente. Indivíduos normais possuem 4 destes genes e as formas de talassemia alfa são resultantes da deficiência de 1,2,3, e 4 genes alfa. Análises por técnicas de hibridização mostraram posteriormente que os quatro genes alfa encontram-se, dois em cada cromossomo 16 (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974).

As talassemias alfa são caracterizadas por células hipocrômicas e microcíticas. Não há eritropoiese ineficiente porque as



cadeias em excesso formam tetrâmeros, γ_4 (Hb Bart's), β_4 (Hb H) e δ_4 (HIGGS *et al*, 1989).

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

4.1.1 - Classificação das Talassemias Alfa:

a) *Portador Silencioso*: Apresenta 3 genes funcionais para a globina alfa; é a forma mais comum, e está amplamente difundida pelo mundo, sendo originada geralmente por uma deleção de 3,7 Kb (LIEBHABER, 1989; KAZAZIAN Jr., 1990). Sua detecção somente é possível por meio de análises de DNA. Alguns trabalhos efetuados no Brasil, indicam que sua prevalência é variável entre 10 e 20% (LIMA, 1997)

b) *Traço de Talassemia Alfa*: Caracteriza-se por discretas alterações hematológicas e por repercussão clínica nula à moderada. Essa condição resulta em geral, da heterozigose para o determinante alfa zero, bem como da homozigose ou dupla heterozigose para a talassemia alfa mais (originada por deleção ou não). A forma mais frequente para este tipo de talassemia alfa é a homozigose para a deleção de 3,7 Kb resultando na perda de 2 genes alfa. A Hb H aparece em eletroforese com concentrações baixas (<2%), e pode também ser visualizada em aproximadamente 60% dos indivíduos portadores por pesquisa citológica detalhada (LIEBHABER, 1989; KAZAZIAN Jr., 1990). Sua prevalência na população brasileira é variável de 3 a 5% (NAOUM, 1997; LIMA, 1997).

c) *Doença de Hemoglobina H*: Resulta mais frequentemente da disfunção de 3 genes alfa, ou também associação de dois determinantes talassêmicos alfa mais, oriundos de mutações do tipo "não deleção" desses



genes. Clinicamente, apresenta-se por anemia, icterícia e hepato e esplenomegalia. Os níveis de Hb H e Bart's são variáveis e os de Hb A₂ reduzidos (KATTAMIS *et al*, 1988; HIGGS *et al*, 1989). É considerada a forma mais expressiva de talassemia alfa compatível com a vida. A heterogeneidade genética da doença está diretamente relacionada à sua gravidade clínica. A forma de deleção mais comum ($--/-\alpha$) é raramente sintomática. A perda de expressão de gene alfa 1 (classificação do gene segundo sua localização no cromossomo) por não deleção também é moderadamente sintomática. No entanto, a perda do gene alfa2 por não deleção resulta em fenótipo mais grave, com muitos pacientes dependentes de transfusão (LIEBHABER, 1989). Sua frequência no Brasil é de 1 caso em cada 5000 análises (NAOUM, 1997).

d) *Síndrome de hidropsia Fetal*: É a forma mais grave de talassemia alfa, determinada pela herança de dois genes talassêmicos alfa zero. Em geral a morte dos indivíduos com esta afecção ocorre ainda no útero ou poucos dias após o nascimento. O feto ou o recém-nato apresenta-se pálido, edemaciado, com sinais de problemas cardíacos e de anemia intra-uterina prolongada. A Hb Bart's compõe cerca de 80% da hemoglobina total e não exerce qualquer função no transporte de oxigênio (HIGGS *et al*, 1989). Em algumas partes do mundo, como no sudoeste da Ásia, esta é uma importante causa de morte perinatal, envolvendo também considerável morbidade e mortalidade materna. No Brasil ainda não se tem conhecimento da constância dessa patologia (NAOUM, 1997).

4.1.2 - Base Genética das Talassemias Alfa: O complexo de genes globínicos alfa humanos, localiza-se na extremidade do cromossomo 16, na região 16 p.13.3 e inclui os genes alfa propriamente ditos, que aparecem em duplicata, um gene embrionário o zeta2, três pseudogenes - psi zeta2, psi alfa2 e psi alfa1, e um gene com função ainda não muito bem determinada - o teta 1. Todos estão arrançados na sequência 5'-3', conforme ilustra a figura 05 (HIGGS *et al*, 1989).



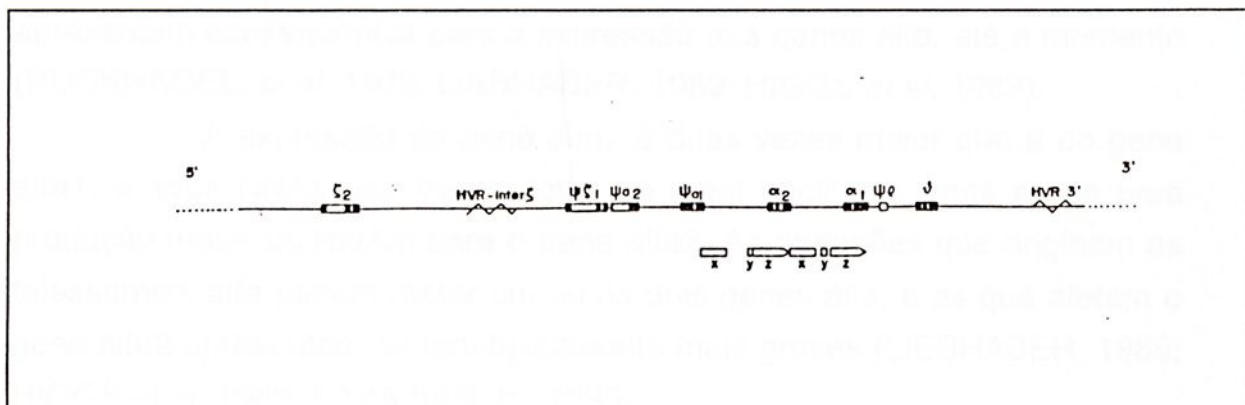


Figura 05: Arranjo gênico alfa no cromossomo 16 (HIGGS et al, 1989)

Os genes funcionais alfa e zeta apresentam 58% de homologia em seus 141 aminoácidos. Por outro lado, os genes alfa1 e alfa2, são altamente homólogos, e codificam proteínas idênticas, diferindo somente no intron2 na sua região não codificadora 3', sendo essa divergência de aproximadamente 17% (HIGGS et al, 1989).

Em geral, os genes globínicos são compactos e divididos em 3 exons, e 2 introns. As posições dos introns, são conservadas em todos os genes globínicos e refletem eventos evolutivos para chegar à proteína funcional. O exon 2 por exemplo, é responsável pela codificação de toda a região de ligação ao grupo heme e pelos contatos alfa1 e beta2; o exon 3 codifica os contatos alfa1 e beta2 (HIGGS et al, 1989).

Existem 5 regiões que separam os genes que fazem parte do complexo gênico alfa, e são estruturalmente hipervariáveis (HVRs - Hypervariable regions). Cada uma dessas regiões é composta de múltiplos segmentos repetitivos de pequenas sequências ricas em GC, com tamanho variando de 17 a 57 pb. Múltiplos alelos de cada uma dessas regiões HVR são identificados por técnicas de alta resolução e são altamente polimórficos em algumas populações, mas estes polimorfismos são neutros, e não

apresentam consequência para a expressão dos genes alfa, até o momento (RUCKNAGEL, *et al*, 1978; LIEBHABER, 1989; HIGGS *et al*, 1989).

A expressão do gene alfa2 é duas vezes maior que a do gene alfa1, e seus RNAs são traduzidos com igual eficiência, mas existe uma produção maior do RNAm para o gene alfa2. As mutações que originam as talassemias alfa podem afetar um ou os dois genes alfa, e as que afetam o gene alfa2 apresentam-se fenotipicamente mais graves (LIEBHABER, 1989; HIGGS *et al*, 1989; KAZAZIAN Jr., 1990).

4.1.3 - Defeitos Moleculares das Talassemias Alfa: A talassemia alfa é mais comumente causada por deleção de um ou ambos genes alfa. Este processo pode ser causado por vários mecanismos, diferindo do que ocorre na talassemia beta onde predominam os defeitos moleculares originados por não deleção. Assim, alguns tipos de talassemia alfa são característicos de determinados grupos raciais.

a) *Deleção de um único gene alfa:* Resulta especialmente na perda de 3,7 Kb ou de 4,2 Kb de DNA, ambos resultantes de recombinação desigual dos homólogos (Figura 06)

b) *Deleção de ambos os genes alfa:* Essas deleções variam de 5,2 até a remoção do todo o complexo. Os mecanismos que originam estas grandes deleções não estão muito bem esclarecidos (LIEBHABER, 1989).

c) *Talassemia alfa devido a não deleção:* Há aproximadamente 15 mutações que resultam em talassemia alfa, o exemplo mais comum é a mutação de uma única base no códon de terminalização do gene alfa2, que origina a Hb Constant Spring. Uma variedade de outras mutações têm sido descritas para o complexo gênico alfa e muitas delas afetam passos críticos para a expressão gênica (HSIA *et al*, 1988; LIEBHABER, 1989; KAZAZIAN Jr., 1990; WAYE *et al*, 1992).

A gravidade dos fenótipos de talassemia alfa estão diretamente relacionados à perda de síntese do gene alfa e três grandes fatores podem estar envolvidos: número de genes afetados, grau de decréscimo na expressão (parcial ou total) e quanto o gene afetado contribui para a síntese



da globina alfa (alfa1 ou alfa2). De forma geral, pode-se dizer que a perda de um único gene alfa pode resultar em diminuição leve, moderada ou grave da síntese de globina alfa dependendo de como ocorreu esta perda gênica (processos deletionais ou não) e qual "locus" estava envolvido (LIEBHABER, 1989; HIGGS *et al*, 1989; KAZAZIAN Jr., 1990).

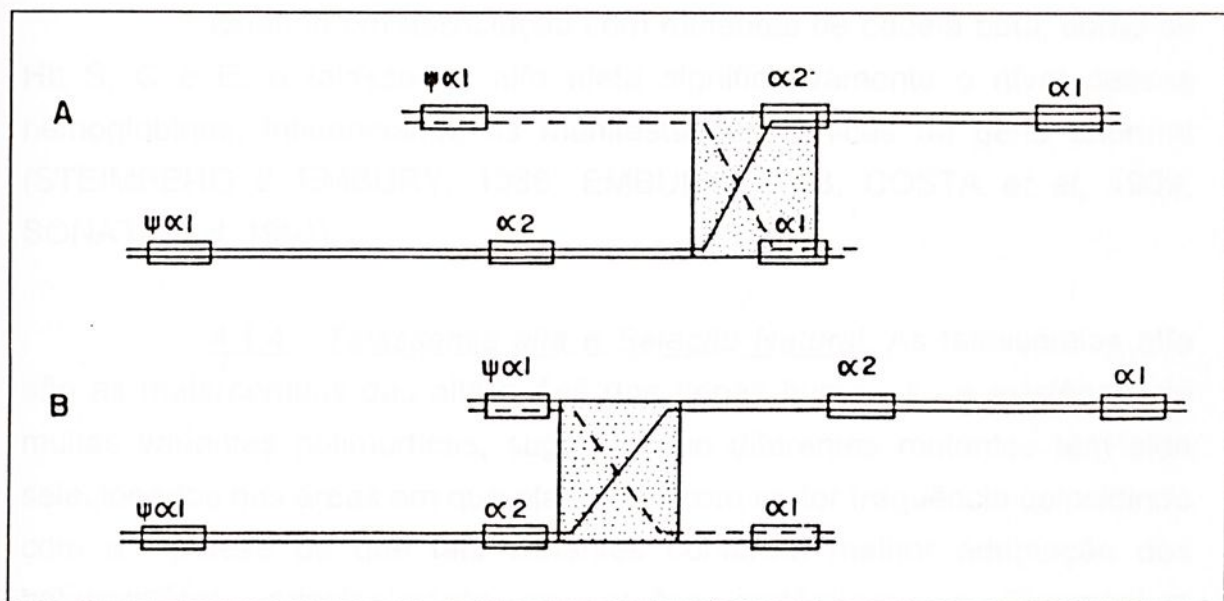


Figura 06: Deleção de um único gene alfa. Crossin-over desigual originando deleções de 3,7Kb (A) e 4,2 Kb (B). (KAZAZIAN Jr., 1990).

A talassemia alfa pode estar associada com outras doenças, principalmente anormalidades da medula, como as doenças linfó e mieloproliferativas e em alterações hematológicas como eritroleucemia, leucemia mielóide crônica e aguda, anemia sideroblástica entre outras, sendo consideradas talassemias alfa adquiridas (FLINT *et al*, 1986; GOMES *et al*, 1988). Nas doenças de Hb H adquiridas, a anormalidade de síntese de cadeia globínica parece ser de origem clonal, isto é, duas populações de

eritrócitos nos indivíduos afetados, uma com conteúdo de Hb normal e a outra com marcada hipocromia e deficiência na síntese de cadeia alfa (LIEBHABER, 1989).

Existem alguns relatos de talassemia alfa associada à retardo mental, podendo estar relacionadas à deleções que envolvam todo o complexo alfa e anormalidades citogenéticas que incluem o braço curto do cromossomo 16 (WEATHERALL *et al*, 1985 ; LIEBHABER, 1989; GIBBONS *et al*, 1992).

Quando em associação com mutantes de cadeia beta, como as Hb S, C e E, a talassemia alfa afeta significativamente o nível dessas hemoglobinas, influenciando as manifestações clínicas do gene anormal (STEIMBERG & EMBURY, 1986; EMBURY, 1988; COSTA *et al*, 1989; SONATI *et al*, 1991).

4.1.4 - Talassemia alfa e Seleção Natural: As talassemias alfa são as mais comuns das alterações dos genes humanos,. a existência de muitas variantes polimórficas, sugerem que diferentes mutantes têm sido selecionados nas áreas em que ela ocorre com maior frequência coincidindo com a hipótese de que tais variantes conferem melhor adaptação dos heterozigotos, principalmente na regiões endêmicas ao Plasmodium falciparum, e a dispersão desses genes deve-se, em grande parte, aos processos de colonização e migração das populações portadoras (W.H.O., 1987; COSTA *et al*, 1989; SONATI *et al*, 1991).

4.1.5 - Análise Crítica da metodologia laboratorial da talassemia alfa: Os métodos utilizados para o diagnóstico das talassemias alfa apresentam suas limitações, e muitas vezes o estudo familiar e análise de DNA são necessários para a determinação do tipo de alteração correto e adequado aconselhamento genético. A microcitose é característica das talassemias, mas no caso das talassemias alfa, muitas vezes a morfologia dos eritrócitos apresenta-se normal. A Hb A₂ está geralmente normal ou discretamente diminuída. Os valores de ferro sérico são de grande valia



para o diagnóstico, pois esclarece a situação de anemia por ferropenia. Outro fator que pode auxiliar o diagnóstico de talassemia alfa são os valores de VCM que esclarecem sobre a microcitose. A observação de corpos de inclusão de Hb H requer a prática do analista e tempo disponível, além do fato de que formas diferentes de talassemias alfa podem apresentar padrões de precipitação semelhantes, e a ausência desses corpos não exclui a talassemia alfa.

Para análises populacionais e aconselhamento genético, é necessário que se faça uso de métodos diagnósticos simples e úteis que contribuam para a melhoria da saúde pública em países em desenvolvimento. O teste de resistência globular osmótica fornece dados sobre a microcitose e constitui o primeiro teste seletivo para talassemias, quando associado à análise da morfologia eritrocitária. A eletroforese em pH alcalino, dosagem de Hb A₂ e pesquisa de agregados intraeritrocitários de Hb H auxiliam no diagnóstico das talassemias alfa (W.H.O., 1987; NAOUM, 1997).

Métodos de análise de DNA, diferenciam os tipos de alterações que causam a talassemia alfa, mas são difíceis de serem utilizados como rotina, principalmente em países de terceiro mundo (W.H.O., 1987).

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

4.2 - TALASSEMIA BETA:

As talassemias beta constituem um grupo de alterações genéticas da síntese de hemoglobina extremamente diverso e que resulta na diminuição da produção de cadeias de globina beta. Clinicamente há grande variabilidade com relação a sintomas e manifestações clínicas, e essas condições são resultantes de fatores genéticos e adquiridos. O complexo



gênico das cadeias do tipo beta, compreende uma extensão de aproximadamente 50 kb, incluindo cinco genes funcionais e dois pseudogenes, arranjados na sequência 5'-3', na mesma ordem em que são ativados durante as fases do desenvolvimento humano. Nas talassemias beta, as cadeias alfa combinam-se com cadeias delta e gama, contribuindo para o aumento das hemoglobinas A₂ e Fetal, respectivamente. Esses índices alterados são importantes para o diagnóstico das talassemias beta. A porcentagem de Hb A₂, apresenta-se elevada em cerca de 95% dos casos de talassemia beta heterozigota (BEUTLER, 1988), enquanto a Hb Fetal está sempre elevada na talassemia beta maior.

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

Há dois tipos principais de talassemias beta, identificadas por beta mais e beta zero, que refletem a redução ou a ausência de síntese das cadeias beta. As variações quantitativas na síntese da cadeia beta da globina, e conseqüentemente, na síntese da hemoglobina A e cadeias alfa livres, são responsáveis por parte da variabilidade clínica. A taxa normal de síntese de cadeias alfa resulta no seu acúmulo nos glóbulos vermelhos durante a eritropoiese, entretanto elas tornam-se insolúveis, instáveis precipitando dentro das células e danificando a membrana, pela destruição prematura dos glóbulos vermelhos, o que provoca a anemia. Tentando equilibrar esta perda, a eritropoiese é aumentada na medula, mas grande parte do processo é ineficaz, e os glóbulos vermelhos são destruídos ainda na fase de desenvolvimento, sem terem sido liberados para a circulação periférica (WEATHERALL *et al*, 1985).



O modo de herança das talassemias, assim como de outras alterações genéticas da hemoglobina, é autossômica, e o termo dominante ou recessivo é difícil de ser aplicado porque, alguns heterozigotos apresentam claros distúrbios clínicos ao passo que outros não. No entanto, a talassemia beta é considerada de herança autossômica recessiva porque são necessários dois genes anormais da globina beta para produzir o fenótipo clinicamente detectável. Têm sido identificadas, entretanto, formas dominantes de talassemia beta, as quais resultam em fenótipos de talassemia intermédia, para portadores de um único gene alterado. (THEIN, 1992; KAZAZIAN Jr. *et al*, 1992).

4.2.1 - Talassemia Beta Homozigota:

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



O padrão de hemoglobinas nos pacientes com talassemia beta homozigota é variável, caracterizando-se pelo aumento de Hb Fetal, com concentrações que variam de 60 a 90%. A Hb A₂ pode estar normal ou elevada e a Hb A aparece somente nos casos de deficiência parcial da síntese de cadeias beta (NAOUM, 1997). As crianças que não recebem tratamento adequado desenvolvem o quadro clínico típico da talassemia beta maior, que inclui, além da anemia grave, deformidades ósseas devidas à hiperplasia medular, hepatoesplenomegalia, pigmentação marrom da pele, distúrbios cardíacos e endócrinos, atraso no crescimento e na maturação sexual, infecções recorrentes e deficiência de ácido fólico. Por isso, para garantir a sobrevivência dos pacientes, é necessário um tratamento contínuo que consiste em transfusões sanguíneas regulares, as quais mantêm um nível de hemoglobina adequado e no uso de quelantes do ferro para ajudar a eliminar o excesso desse metal no organismo (CAO *et al*, 1990).

4.2.2 - Talassemia Beta Heterozigota:

O estado heterozigoto da talassemia beta é caracterizado geneticamente pela herança de um único componente alterado. Nas formas beta zero e beta mais, a redução da taxa de síntese da globina beta é menor, mas o suficiente para causar discreto grau de anemia microcítica e hipocrômica com aumento de resistência osmótica dos eritrócitos. Muitas vezes a doença não é diagnosticada corretamente e os pacientes são tratados inadequadamente como se apresentassem anemia por deficiência de ferro. Laboratorialmente, as formas de talassemia beta mais ou beta zero caracterizam-se pelo aumento de Hb A₂, cuja concentração varia de 3,8 a 7,5%, alterações morfológicas dos eritrócitos, principalmente microcitose e hipocromia, resistência globular osmótica aumentada, diminuição da hemoglobina corpuscular média (HCM) e volume corpuscular médio (VCM). Segundo RUND *et al*, 1992, o grau de redução dos valores de VCM está diretamente relacionado ao tipo de mutação, ou seja, talassemia beta mais ou beta zero. A hemoglobina Fetal pode estar normal ou discretamente



aumentada. As manifestações clínicas, como palidez, cansaço e baço palpável quando presentes, variam entre os diferentes grupos raciais (LEWIS *et al*, 1982). Os níveis de ácido fólico e vitamina B12 plasmáticas apresentam-se dentro dos limites normais em talassêmicos beta heterozigotos (SILVA & VARELLA-GARCIA, 1989).

4.2.3 - Talassemia Intermédia:

As formas clínicas denominadas talassemia intermédia, são resultantes de diferentes interações genéticas, cujos portadores apresentam um quadro clínico mais ameno que o da talassemia beta maior e não são dependentes de transfusão sanguínea. A talassemia beta intermédia pode decorrer da interação das talassemias alfa e beta, com redução concomitante de ambas as cadeias globínicas, o que diminui o número de cadeias desemparelhadas e propicia a redução na taxa de destruição dos eritrócitos em comparação com as formas graves de talassemias. Pode decorrer também em decorrência de interações da talassemia beta com alguns tipos de hemoglobinas variantes, particularmente a Hb S, Hb C e Hb E (WHEATHERALL *et al*, 1985).

4.2.4- Base Molecular:

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

Mais de 80 pontos de mutação causando talassemia beta foram bem caracterizados, resultando num déficit de cadeias beta que varia de mínima (alelos beta mais) à ausência completa (alelos beta zero). Heterozigotos, incluindo os portadores de alelos beta mais e beta zero, são clinicamente assintomáticos, ao passo que os homozigotos, ou portadores de componentes heterozigotos associados apresentam sintomas evidentes,



acompanhados de quadros hematológicos muito alterados, e são dependentes de transfusão (THEIN, 1992).

Grande parte das talassemias beta é determinada por mutações que interferem na transcrição, processamento, transporte, estabilidade e tradução do RNAm, ocorrendo também, casos de variantes de cadeias polipeptídicas (ANTONARAKIS *et al*, 1985; KAZAZIAN Jr., 1990; HUANG *et al*, 1991; TRIFILLIS *et al*, 1991). Em 1984 ORKIN e KAZAZIAN estabeleceram as principais mutações talassêmicas no gene beta da globina (Figura 07), e dessa relação, quatro pontos têm sido descritos na população brasileira: 13,22,26 e 27.

4.2.5- Hemoglobinas diretamente envolvidas na interpretação laboratorial das Talassemias Beta:

a) Hemoglobina Fetal (alfa2 gama2):

Em indivíduos normais, é uma mistura de duas espécies moleculares, onde as cadeias gama podem possuir na posição 136 o resíduo glicina ou alanina. Variações são observadas também, na taxa de síntese de cadeias gama glicina e gama alanina, em diferentes grupos raciais, e em associação com outras hemoglobinopatias, influenciando seus fenótipos (WEATHERALL *et al*, 1985).

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



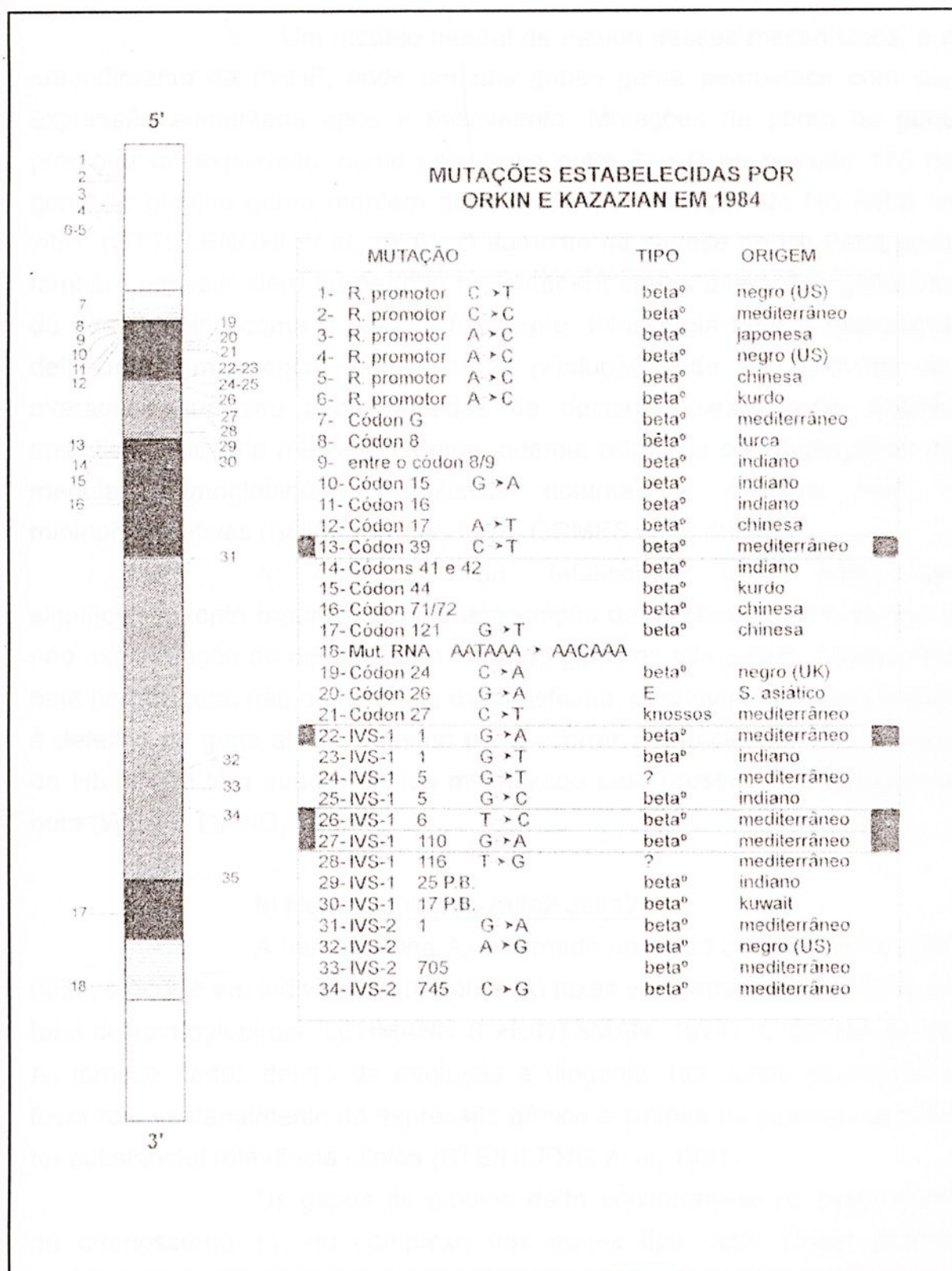


Figura 07: Mutações estabelecidas por ORKIN & KAZAZIAN, 1984

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

A gravidade da talassemia beta pode ser significativamente modificada pela associação de talassemia alfa, devido a não exacerbação do desequilíbrio entre as globinas alfa e beta. Talassemia beta homozigota, não dependente de transfusão, geralmente está associada a defeitos no gene alfa. O mesmo pode ocorrer em pacientes com doença de Hb H que têm quadro clínico minimizado pela presença de talassemia beta (WEN & LIANG, 1992).

b) Hemoglobina A₂ (alfa2 delta2):

A hemoglobina A₂ é formada por duas cadeias alfa e duas delta, e ocorre em indivíduos normais com taxas variáveis entre 2 e 3,5% do total de hemoglobinas (LEHMANN & HUNTSMAN, 1974). O estudo da Hb A₂ fornece dados dentro da evolução e filogenia dos genes globínicos e favorece o entendimento da expressão gênica e síntese de globina, além de ter substancial relevância clínica (STEINBERG *et al*, 1991).

Os genes de globina delta encontram-se no braço curto do cromossomo 11, no complexo dos genes tipo beta. Existe grande homologia entre os genes delta e beta, com relação à composição de aminoácidos (apenas 10 aminoácidos diferentes entre uma cadeia e outra),



e a estabilidade dessas duas moléculas parece ser idêntica. Entretanto a meia vida dos RNAm para cadeia delta é uma vez e meia menor que a do RNAm para cadeia beta (HONIG & ADAMS, 1986), sugerindo que a taxa de transcrição do gene delta é menor que a do gene beta (STEINBERG, 1991).

As propriedades funcionais da Hb A₂ são semelhantes à da Hb A, com relação à afinidade ao oxigênio, efeito Bohr e cooperatividade, e resposta ao 2,3 BPG. A estabilidade térmica é maior que a da Hb A e a Hb A₂ inibe a polimerização da Hb S. A cadeia delta da Hb A₂ possui duas cargas positivas adicionais quando comparadas à cadeia beta da Hb A, fato que facilita sua separação por métodos eletroforéticos e cromatográficos. A porcentagem da A₂ pode ser afetada por fatores genéticos, ambientais e secundários a determinadas patologias. Entre os ambientais destaca-se a deficiência de ferro, e entre as doenças adquiridas sobressaem a malária, hipertireoidismo, Doença de Chagas, e diabetes (ISAACS, 1972; ALPERIN *et al*, 1977; CODRINGTON *et al*, 1990; DOMINGOS *et al*, 1991).

Sob o ponto de vista hereditário, aumentos nos níveis de Hb A₂ são característicos de talassemias beta, interações de talassemias com Hb S, nas hemoglobinas instáveis e em alguns grupos raciais. A diminuição geralmente está associada à deficiência de ferro e a redução das taxas de síntese do gene delta (talassemia delta), sendo que os fatores que influenciam essa redução podem estar atuando em vários pontos como por exemplo, na iniciação da cadeia, como é o caso da talassemia alfa (STEINBERG *et al*, 1991).

4.3 - PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA DE HEMOGLOBINA FETAL (P.H.H.F.):

Compreende um grupo de condições nas quais são encontrados níveis elevados de hemoglobina Fetal em adultos, na ausência de estresse eritropoiético. As formas mais comuns estão associadas com grandes deleções que ocorrem dentro do grupamento das globinas beta. Entretanto, parece ainda inexplicado o motivo pelo qual deleções aparentemente similares determinam, ora uma talassemia delta-beta, ora



uma P.H.H.F. (ORKIN & KAZAZIAN, 1984) Uma possibilidade é que a união de sequências de DNA normalmente distantes, decorrentes dessas deleções, possa criar novas relações funcionais neste grupamento gênico, alterando a expressão dos genes de globina restantes. Esta hipótese é fundamentada nos achados de deleções nas PHHF que tendem a estender-se bem mais além da extremidade 3' do gene de globina beta, do que as deleções que determinam as talassemias delta-beta (HONIG & ADAMS, 1986). Outra hipótese é a de que essas deleções possam alterar a conformação da cromatina e interferir na expressão do gene para a globina gama. Neste caso, diferentes deleções teriam um ou outro efeito, segundo suas posições e tamanho. Nas formas oriundas de deleção, a expressão continuada de Hb Fetal ocorre em todos os eritrócitos durante a vida adulta (P.H.H.F. pancelular), enquanto na talassemia delta-beta o fenótipo talassêmico mostra-se mais pronunciado, e está associado à expressão clonal dos genes de globina fetal durante a vida adulta (SCHWARTZ *et al*, 1988, THOMPSON *et al*, 1993). Nesses tipos de P.H.H.F. os adultos heterozigotos apresentam níveis de Hb F entre 5 e 30%, enquanto que os homozigotos para variante Negro podem expressar até 100%, desta hemoglobina (WHEATHERALL, 1983).

Em outra classe de P.H.H.F. os níveis de Hb Fetal são mais baixos, e sua distribuição intraeritrocitária é irregular (P.H.H.F. heterocelular). Trabalhos sobre caracterização molecular identificaram substituições de uma única base nas regiões promotoras dos genes gama alanina, as quais são atribuídos os fenótipos característicos (DONALD *et al*, 1988). Para alguns tipos de P.H.H.F. heterocelular permanece desconhecida e/ou contraditória a determinação da alteração molecular que lhes deram origem. A P.H.H.F. do tipo suíço que determina um nível de Hb Fetal de 1 a 3% é um exemplo bastante discutido, e ocorre com frequências de 1 a 2% em diferentes populações. A partir das análises de ligação da P.H.H.F. do tipo suíço com talassemia beta e com a Hb S, foi proposto que os genes reguladores dessa condição estão ligados, mesmo que de forma não muito estreita, ao complexo gênico de globinas beta, enquanto muitos outros



estudos sugerem uma grande distância do mesmo, no próprio cromossomo 11 ou em outro qualquer. Existe também, fortes evidências de um padrão de herança dominante e ligado ao cromossomo X, nesta condição (MYIOSHI *et al*, 1988).

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

5. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E PREVENÇÃO DAS ANEMIAS HEREDITÁRIAS.

A população brasileira apresenta alto grau de mistura racial como resultado de imigrações. A população indígena nativa, originalmente de 1,5 milhões de pessoas, está na maior parte extinta e concentrada no norte e nordeste do país. Durante a colonização, verificada nos séculos 16 a 19, o Brasil recebeu em torno de 800 mil portugueses e 3,5 milhões de negros, estes últimos chegaram para trabalhar como escravos vindos principalmente de dois grupos africanos, Bantu e Sudaneses. Em adição, outros 5 milhões de imigrantes, entre italianos, portugueses, espanhóis, alemães, japoneses e árabes participaram da composição étnica da nossa população, especialmente após o início do século XIX. Todos esses grupos sofreram mistura inter-racial contribuindo para determinar a nossa população miscigenada, com distribuição étnica diferenciada em várias



regiões geográficas do país. A frequência de anemia hereditária reflete esta diversidade de origens raciais e os diferentes graus de mistura entre brasileiros de cada região do país. Hemoglobinopatias, especialmente síndromes falcêmicas, hemoglobina C e talassemias são comuns no Brasil (SALZANO & TONDO, 1982; NAOUM *et al*, 1983; ZAGO & COSTA, 1985; TEIXEIRA & RAMALHO, 1994; SONATI *et al*, 1996). Além disso, tem sido recomendado pela Organização Mundial de Saúde (W.H.O., 1983), a implantação de programas para prevenção e controle de hemoglobinopatias na América Latina e principalmente no Brasil (PENCHSZADEH, 1993).

O sucesso de um programa de hemoglobinopatias depende da receptividade da população para este tipo de estudo. É importante para avaliar os resultados, o conhecimento de fatores socio-econômicos, psicológicos e sociais. Segundo Bowman (1991), programas populacionais são frequentemente concebidos para um mundo teórico e idealizado. Na prática, entretanto, é muito diferente, e a implantação de programas preventivos deste gênero é muito difícil de ser conseguida, pois depende inclusive da disponibilidade e interesse da população alvo. A linguagem utilizada na comunicação dos resultados e aconselhamento genético é de fundamental importância, não se esquecendo que a opinião da pessoa que recebe a informação é decisiva para a eficácia de tais programas. Geralmente programas preventivos utilizados principalmente na Itália, incluem educação à nível populacional, familiar e profissional, aconselhamento genético dos portadores e casais de risco, com acompanhamento clínico adequado à cada caso (DOMINGOS, 1993). Neste aspecto, é possível que programas de prevenção para alterações hereditárias realizados com gestantes tenham boa aceitação, pois estas já possuem um programa de avaliações laboratoriais e clínicas e de acompanhamento gestacional no pré-natal e, além disso, diante da gravidez, as mulheres estão mais propensas a cuidar de sua própria saúde e a de seus filhos (TEIXEIRA & RAMALHO, 1994).

Anormalidades herdadas na estrutura ou síntese de hemoglobinas resultam em anemia materna e outras complicações na gravidez. Estudos realizados em populações brasileiras revelaram a possibilidade de que hoje existam aproximadamente no Brasil, 10 milhões de pessoas com hemoglobinopatias, e que anualmente nasçam cerca de 3 mil pessoas com a forma homozigota (NAOUM, 1997).



Os efeitos das hemoglobinopatias em adultos variam de anemia assintomática até alterações que causam morbidade e mortalidade, como em portadores de Hb S na forma homozigota (Hb SS) e talassemia beta maior. Gestação com o consequente aumento do consumo de oxigênio, da viscosidade e da massa de eritrócitos, pode estar associada com morbidade em mulheres com falcemia heterozigota. Dependendo do tipo do defeito herdado, o feto pode morrer no útero (talassemia alfa homozigota), ou não sobreviver além da puberdade caso não tenha acompanhamento médico adequado desde o nascimento (talassemia beta homozigota e Hb SS). Estudos preventivos de hemoglobinopatias têm sido realizados nos países onde sua incidência alcança frequências marcantes para a saúde pública, como são os casos da Itália, Grécia, Chipre e Tailândia, cada um enfocando da melhor forma, a sua população e o tipo de hemoglobinopatia que a acomete (W.H.O., 1989).

Histórico e exame clínico são importantes para o diagnóstico de hemoglobinopatias. Talassemia beta é encontrada em quase todas as populações, mas os grupos de maior risco são pessoas oriundas do Mediterrâneo, norte da África, Sudeste Asiático, Índia ou Paquistão. Hemoglobina S é característica de africanos e pessoas com ancestrais africanos. Hemoglobina C ocorre em pessoas especialmente do oeste africano, mas também em povos de países do Mediterrâneo. Outras hemoglobinas também ocorrem em populações de alto risco para talassemia beta, em geral, italianos, gregos e Indianos, e Hb E em pessoas do sudeste asiático (NAOUM, 1987).

A organização de um programa preventivo requer suporte de órgãos oficiais de saúde, diagnóstico realizado por pessoal capacitado e aconselhamento genético de pacientes e casais de risco. O suporte clínico e de puericultura é importante para o bom andamento dos programas de screening e de prevenção (CAO *et al*, 1991).

O estudo das hemoglobinopatias no Brasil vem sendo realizado desde a década de 40 dando ênfase sobretudo à variante S. No entanto, outras variantes, talassemias e associações, têm sido encontradas, sendo mais prevalentes a Hb S e as talassemias alfa e beta (NAOUM, 1987; DOMINGOS, 1993).

Segundo Vullo *et al*, 1992, os motivos pelos quais um programa de hemoglobinopatias é necessário, são de ordem social e econômica.



Social, porque uma doença congênita que não tem cura, é inaceitável pela grande maioria dos casais de risco, e de ordem econômica, porque o programa de terapia para homozigotos, requer uma quantia relevante para ser realizado. O programa de prevenção é a forma adotada em diferentes centros médicos, especialmente na Grécia, Chipre e Itália, para reduzir ou eliminar o número de nascimentos de crianças homozigotas (W.H.O., 1983).

Um meio de triagem de grande importância é aquele realizado com base em diagnóstico pré-natal, neonatal e em gestantes, encontrando possíveis portadores e orientando para o tratamento adequado à cada caso, minimizando, assim, os graves problemas clínicos, psico-sociais e financeiros relacionados à doença (LOADER *et al*, 1991; ROWLEY *et al*, 1991).



6. OBJETIVOS:

Uma vez que a compreensão de uma doença, em especial as de origem hereditária, quando monitoradas no período pré-natal resulta em gravidez normal, com melhor sobrevida dos recém-nascidos, estabelecemos os seguintes objetivos:

- Avaliar a importância da análise de gestantes para hemoglobinopatias com os objetivos de detectar a prevalência, e efetuar a prevenção, o estudo familiar e a conscientização em um grupo de gestantes de São José do Rio Preto e região, através de programas preventivos. Para os casos positivos como casal de risco, orientar para o devido encaminhamento médico;
- Determinar os genótipos das variantes de hemoglobinas em gestantes;
- Avaliar a receptividade ao programa;



IV. MATERIAL E MÉTODOS:

a) - Parte Preventiva:

A parte preventiva do presente projeto foi composta pelas seguintes atividades:

1) Abordagem das gestantes: foi realizada com o intuito de sensibilizar as gestantes para participarem do projeto através de: divulgação aos médicos com clínicas particulares especializadas em Ginecologia e Obstetrícia, à Secretaria da Saúde de São José do Rio Preto e os respectivos Centros de Saúde, à Divisão Regional de Saúde de São José do Rio Preto (D.I.R.XXII) e algumas cidades de sua abrangência, e também, utilizando os meios de comunicação disponíveis, como rádio, televisão, jornais e cartazes;

2) Comunicação dos resultados positivos diretamente à gestante, utilizando para isso cartas explicativas;

3) Convite às gestantes portadoras de hemoglobinopatias para encaminharem cônjuges, filhos e parentes próximos para realizarem os exames;

4) Com os resultados das análises das famílias foi possível a realização de aconselhamento genético específico para cada caso de hemoglobinopatia;

5) Verificação do retorno das comunicações dos resultados positivos relacionando-os especialmente com escolaridade, renda familiar, e atenção dos centros de saúde;

6) Sensibilização dos órgãos da saúde para inclusão da pesquisa de hemoglobinopatias em programas materno-fetal destinados às gestantes, com base nos resultados verificados.



b) Parte Analítica:

O material utilizado para atingir os objetivos propostos neste trabalho, referem-se a análise de sangue de gestantes encaminhadas por centros de saúde e clínicas particulares de municípios que fazem parte de Divisão Regional de Saúde de São José do Rio Preto.

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa utilizando E.D.T.A. a 5% como anticoagulante e triadas para hemoglobinopatias, utilizando as seguintes técnicas:

b.1) Testes Seletivos:

- Eritrograma;
- Resistência osmótica a 0,36%;
- Análise da morfologia eritrocitária;
- Eletroforese em acetato de celulose pH=8.6 (Qualitativa)

b.2) Testes Específicos:

- Eletroforese em acetato de celulose pH=8.6 (Quantitativa)
- Eletroforese em ágar pH=6.2;
- Dosagem de Hb Fetal;
- Pesquisa intraeritrocitária de Hb H;
- Coloração intra-eritrocitária de Hb Fetal;
- Focalização Isoelétrica;

b.3) - Teste para Caracterização de Sub-unidades Protêicas:

- Eletroforese de cadeias polipeptídicas.

b.4) - Testes Estatísticos:

- Estatísticas Descritivas;
- Intervalo de Confiança;
- Teste t de Student;
- Teste Qui-Quadrado



b.1) TESTES SELETIVOS:

b.1.1) ERITROGRAMA

Utilizou-se o contador de células Coulter Counter, mod.:CBC para determinar as concentrações de Hemoglobina e Glóbulos Vermelhos, e Microcentrífuga Centrimicro Fanen, mod. 211 para obtenção dos valores de Hematócrito através da utilização de capilares.

b.1.2) RESISTÊNCIA GLOBULAR OSMÓTICA EM CLORETO DE SÓDIO A 0,36% (SILVESTRONI & BIANCO, 1975)

Princípio:

Técnica utilizada para triar talassemia beta principalmente na forma heterozigota, pois nesses casos os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise nesta solução. A resistência globular não é específica para talassemia beta heterozigota, já que resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e outras hemoglobinopatias, como os heterozigotos para hemoglobina C. Cerca de 97% dos portadores de talassemia beta heterozigota apresentam positividade para esse teste.

Reagentes:

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

Cloreto de Sódio	10,0 g
Fosfato dibásico	1,36g
Fosfato monobásico hidratado	0,28g
Água destilada q.s.p	100ml

Solução NaCl a 0,36%

Cloreto de Sódio a 10%	36 ml
Água destilada q.s.p	1000ml

Procedimento

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



Interpretação

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

b.1.3) ANÁLISE A FRESCO DA MORFOLOGIA ERITROCITÁRIA

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

Os resultados devem ser divulgados da seguinte maneira:

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

b.1.4) ELETROFORESE EM ACETATO DE CELULOSE - pH alcalino (MARENGO-ROWE, 1965)

Princípio:

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



Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO, pH 8,5

Tris hidroximetil aminometano 10,2g

Ácido etilenodiaminotetracético 0,6g

Ácido Bórico 3,2g

Água destilada q.s.p 1000ml

Corantes:

Negro de amido

Negro de amido 10B 0,5g

Álcool metílico 45,0ml

Ácido acético glacial 5,0ml

Água destilada 45,0ml

Ponceau

Ponceau S 0,5g

Ácido tricloroacético 5,0g

Água destilada q.s.p 100ml

Solução descorante de ácido acético

Ácido acético glacial. 100ml

Metanol 50ml

Água destilada q.s.p 1000ml

Procedimento:

Embeber as fitas de acetato de celulose por 15 minutos no mínimo e no máximo por 6 horas, em tampão TEB pH 8,5; secar as fitas entre duas folhas de papel absorvente e colocá-las na cuba de eletroforese, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos através de tiras de papel mata-borrão.

- Aplicar as amostras de hemoglobinas a 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo e passar 300 volts por 40 minutos.

- Analisar as frações sem coloração e posteriormente corar com Negro de amido ou Ponceau, embebendo as fitas em um dos corantes por 15 minutos, e posteriormente em solução descorante por 30 minutos, com agitação da vasilha.



Interpretação:

Consultar mapa de diferenciação eletroforética na Figura 8.

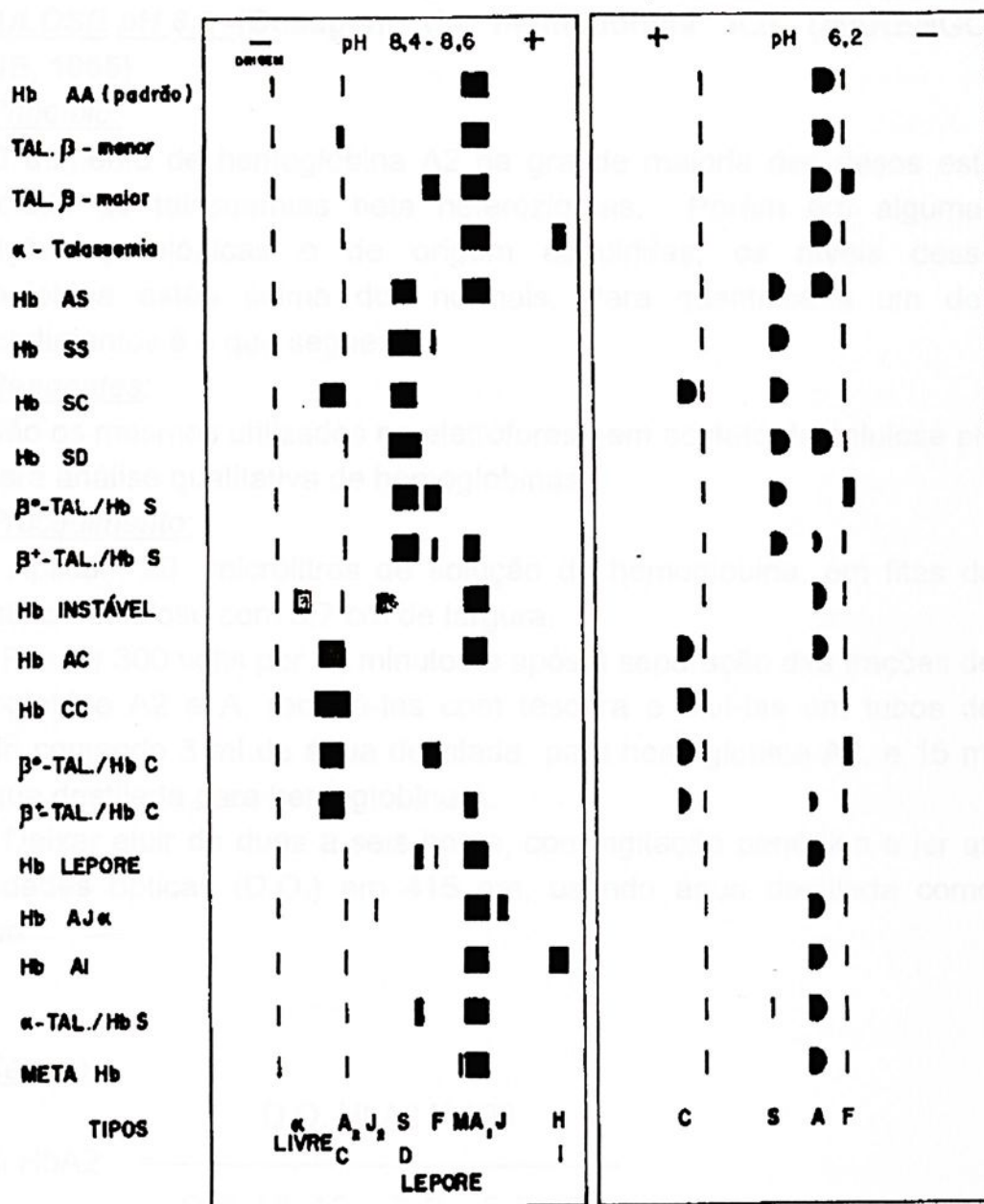


Figura 08:. Disposição da mobilidade eletroforética de hemoglobinas humanas em pH alcalino e ácido. Segundo NAOUM *et al*, 1979.

b.2) TESTES ESPECÍFICOS:

b.2.1) ELETROFORESE QUANTITATIVA EM ACETATO DE CELULOSE pH 8,6 -(Dosagem de hemoglobina A2) (MARENGO-ROWE, 1965)

Princípio:

O aumento de hemoglobina A2 na grande maioria dos casos está associado às talassemias beta heterozigotas. Porém em algumas condições patológicas e de origem adquiridas, os níveis dessa hemoglobina estão acima dos normais. Para quantificá-la um dos procedimentos é o que segue:

Reagentes:

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

Procedimento:

- Aplicar 20 microlitros de solução de hemoglobina, em fitas de acetato de celulose com 5,7 cm de largura.

- Passar 300 volts por 40 minutos e após a separação das frações de hemoglobina A2 e A, recortá-las com tesoura e eluí-las em tubos de ensaio contendo 3 ml de água destilada para hemoglobina A2, e 15 ml de água destilada para hemoglobina A.

- Deixar eluir de duas a seis horas, com agitação periódica e ler as densidades ópticas (D.O.) em 415 nm, usando água destilada como branco.

Cálculo:

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

valores normais: de 2,5 a 3,7%



b.2.2) ELETROFORESE DE DIFERENCIAÇÃO EM ÁGAR-FOSFATO - pH 6,2 - (VELLA, 1968).

Princípio:

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

Reagentes:

Tampão Fosfato pH 6,2

Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel.

Na₂HPO₄ 2,02g

NaH₂PO₄.H₂O 7,66g

Água destilada q.s.p 1000ml

Gel de Ágar-Fosfato

Ágar (Difco) 200mg

Tampão fosfato pH 6,2 20ml

Procedimento:

- Em um erlenmeyer de 250 ml aquecer os componentes do gel de ágar-fosfato até completa dissolução e pipetar 3,5 ml do gel em lâminas de microscópio. Deixar gelificar à temperatura ambiente e aplicar as amostras próximo à porção média da lâmina.

- Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos usar folha dupla de papel de filtro e passar 100 volts por 20 minutos.

- Analisar inicialmente sem corar, e para melhor interpretação das frações corar com Ponceau ou Negro de Amido.

Interpretação:

Consultar o mapa de diferenciação das disposições de hemoglobinas em eletroforese ácida (Figura 08).



b.2.3) **DOSAGEM DE HEMOGLOBINA FETAL - (BETKE et al. 1959)**

Princípio:

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

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

Reagentes:

Solução de ferricianeto de potássio (Drabkin)

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

Solução de hidróxido de sódio 1,2N

Hidróxido de sódio	48,0g
Água destilada q.s.p	1000ml

Solução saturada de sulfato de amônio

Sulfato de Amônio	500g
Água destilada q.s.p	500ml

Procedimento:

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

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

- Ao final de 2 minutos exatos, adicionar 4 ml da solução saturada de sulfato de amônio. Homogenizar por inversão e deixar em repouso por 5 a 10 minutos, no máximo. Filtrar o conteúdo do tubo "Hb F" em duplo papel de filtro.

- Preparar a solução padrão, colocando em um tubo de ensaio de 1,4 ml da solução de hemoglobina diluída, 0,6 ml de água destilada e 2



ml da solução saturada de sulfato de amônio. Transferir 1 ml desta solução para outro tubo e juntar 9 ml de solução de Drabkin. A solução de hemoglobina total é 10 vezes mais diluída que a solução de hemoglobina alcali-resistente.

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

Cálculo:

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

Interpretação:

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

b.2.4) PESQUISA DE AGREGADOS DE HEMOGLOBINA H
(PAPAYANNOPOULOS & STAMATAYANNOPOULOS, 1974).

Princípio:

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

Reagentes:

Solução salina

Cloreto de sódio 0,9g

Água destilada q.s.p 100ml

Solução citrato

Citrato de sódio 2,2g

Água destilada q.s.p 100ml

Solução de azul cresil brilhante

Azul cresil brilhante 1,0g

Solução salina 100ml

Solução citrato 25ml



Procedimento:

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

- Incubar o material a 37°C por 30 minutos, fazer esfregaços e examinar ao microscópio em objetiva de imersão.

Interpretação:

A presença de hemoglobina H nos eritrócitos aparece como fina granulação distribuída homogeneamente.

b.2.5) COLORAÇÃO INTRA-ERITROCITÁRIA DE HEMOGLOBINA FETAL: (KLEIHAUER, 1974).

Princípio:

Baseado na diferença que existe entre a capacidade de dissociação das subunidades da Hb A e Hb Fetal, em pH abaixo de 4,0. A Hb Fetal é ácido-resistente e por isso não é eluída nas células, corando-se facilmente com eritrosina ou similar, enquanto outros tipos de hemoglobinas por serem eluídas não fixam o corante.

Reagentes:

A) Tampão citrato-fosfato pH 3,3

Ácido cítrico 0,1M 100 ml

Fosfato di-sódico hidratado 0,2 M 30ml

Solução aquosa de eritrosina a 0,1%

Solução de etanol a 80%

Procedimento:

- Fazer esfregaços finos, obtidos de sangue sem anticoagulante, e fixá-los com etanol a 80%, por 5 minutos. Lavar, a seguir, com água corrente e secar ao ar.

- Introduzir os esfregaços em vasilha-suporte de lâminas contendo tampão citrato-fosfato pH 3,3 previamente aquecido a 37°C, por 5 minutos. Lavar com água corrente e secar ao ar. Corar com eritrosina a 0,1% por 5 minutos. Lavar novamente em água corrente e secar ao ar.

- Examinar em microscópio com aumento de 400x.



Interpretação:

- Os eritrócitos contendo Hb Fetal aparecem corados internamente, enquanto os outros que não a contêm permanecem sem coloração interna.

- A coloração é homogênea quando todos os eritrócitos aparecem uniformemente corados e podem ser encontrados em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos e de portadores de persistência hereditária de Hb Fetal.

- A coloração é heterogênea quando existem duas populações eritrocitárias distintas, ou seja, uma corada e outra sem coloração, e esses são os casos principalmente das diferentes formas de talassemias beta maior - com exceção dos portadores do genótipo talassêmico $\beta^{\circ}\delta/\beta^{\circ}\delta$.

b.2.6) FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM GEL DE AGAROSE (NAOUM, 1990)

Princípio:

Método específico projetado para o fracionamento de espécies moleculares que diferem somente nas suas quantidades de cargas. Assim, desde que a separação não é devida a qualquer efeito seletivo do tamanho da molécula, o seu transporte através do meio se faz com ótima resolução, separando as macromoléculas por seu ponto isoelétrico com diferenças de unidades de pH de até 0,01.

Reagentes:

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

Anfolinas pH 5 - 8

Anfolinas pH 6,5 - 9

Anfolinas pH 3 - 1

Solução anódica

Ácido Fosfórico.....3,8 ml

Água deionizada.....50,0 ml

Solução catódica

NaOH.....4 g

Água deionizada.....100 ml



- Preparação do gel:

Pesar 22 mg de agarose em um erlenmayer de 25 ou 50 ml, e adicionar 13,2 ml de água deionizada. Colocar o erlenmayer dentro de um becker de 100 ml com água em ebulição e rolhas de borracha no fundo e observar constantemente a dissolução da agarose que deverá ocorrer dentro de 5 a 10 minutos. Após este período adicionar as anfolinas nas seguintes proporções: 0,8 ml de pH 5-8; 0,8 ml de pH 6,5-9 e 0,4 ml de pH 3-10. A seguir, o gel é rapidamente colocado em placas de vidro. Enquanto o gel se solidifica, as amostras devem ser preparadas.

Preparação da solução de hemoglobinas:

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

- Pré-focalização:

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

- Aplicação das amostras:

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

- Focalização:

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

- Fixação, secagem e coloração:

As placas de agarose devem ser fixadas com ácido tricloro acético 20% por 3 minutos. A seguir, a placa deve ser lavada em água destilada por aproximadamente 1 minuto. Para secagem, envolver a placa em



papel de filtro umedecido com água destilada e deixar à temperatura ambiente por 12 a 15 horas. A coloração pode ser feita com Ponceau ou Negro de Amido por 10 a 15 minutos, e a descoloração, em água destilada.

- Interpretação:

Após o fracionamento é possível visualizar numa amostra normal as hemoglobinas A, A2 e A1c, essa última com migração mais rápida que a Hb A. A resolução dessa técnica é superior à dos métodos eletroforéticos convencionais, permitindo a separação de metemoglobinas A sulfoemoglobinas A, entre outras.

b.3)TESTES PARA CARACTERIZAÇÃO DAS SUB-UNIDADES PROTÊICAS:

b.3.1) ELETROFORESE DE CADEIAS POLIPEPTÍDICAS:
(SCHINEIDER, 1974).

Princípio:

- A caracterização estrutural das hemoglobinas anormais é realizada em condições muito especiais devido ao seu custo operacional e às dificuldades inerentes aos métodos utilizados. Desta forma, para dar seqüência ao estudo de uma hemoglobina anormal não identificável pelos métodos de qualificação e quantificação, utiliza-se inicialmente, a eletroforese de cadeias polipeptídicas. A separação eletroforética de cadeias polipeptídicas anormais constitui-se em uma análise pré-molecular, muitas vezes conclusiva para o diagnóstico de hemoglobina anormal, sem que haja necessidade de se aplicar métodos de disposição bidimensional de peptídeos e análises de aminoácidos.

Reagentes:

A) Tampão Tris-EDTA-borato pH 8,4

B) Corante Ponceau

C) Uréia

D) 2-mercaptoetanol

Procedimento:

- No dia anterior ao teste preparar o tampão trabalho, misturando 72 g de uréia e 140 ml de tampão Tris-EDTA-borato pH 8,4 (Tampão Tris-



uréia), em um "becker". Homogeneizar a solução em agitador magnético, até o momento do uso, à temperatura ambiente.

- Misturar 50 μ l do tampão Tris-Uréia, 50 μ l de 2-mercaptoetanol e 50 μ l de solução de hemoglobina em um pequeno tubo. Deixar em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente.

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

- Retirar o excesso da solução tampão do acetato com papel de filtro e esticá-lo na cuba de eletroforese.

- Aplicar as amostras na porção média do acetato.

- Passar 150 volts por 80 minutos.

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

Controle:

- É importante realizar esse processo eletroforético comparando a amostra a ser testada com cadeias polipeptídicas de hemoglobina normal, e de hemoglobinas variantes conhecidas. por exemplo: Hb AS, Hb AC, ou Hb SC.

Interpretação:

- O mapa de disposição de cadeias polipeptídicas, representado na figura 09, facilita a interpretação dos tipos mais freqüentes de hemoglobinas variantes. Esse mapa mostra a disposição de 33 variantes diferentes, como por exemplo a Hb J Baltimore de Hb J Oxford, entre outras.

Precauções:

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

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

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



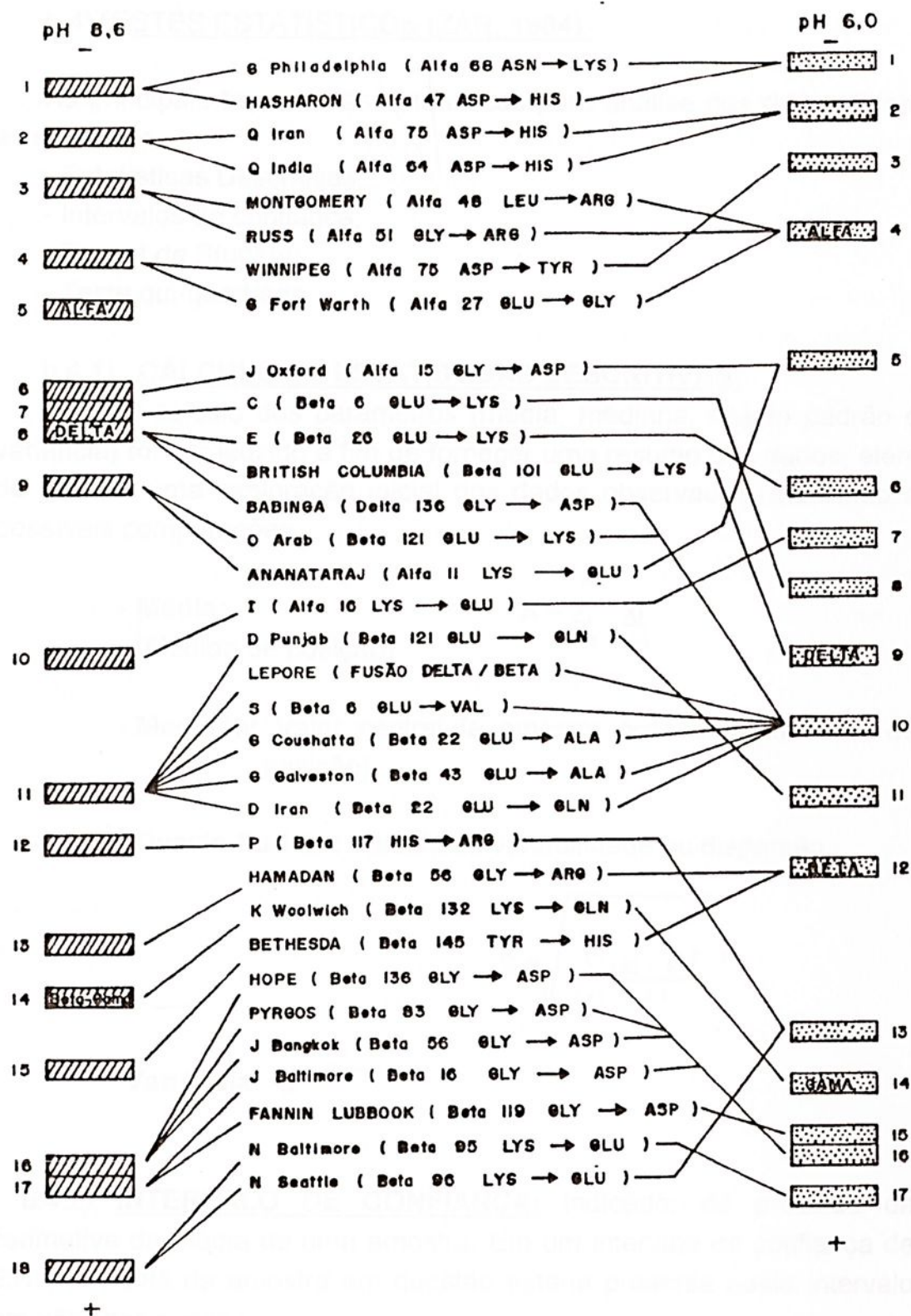


Figura 09: Disposição das mobilidades eletroforéticas das cadeias polipeptídicas das globinas alfa, beta, gama e delta em acetato de celulose (SCHNEIDER, 1974)

b.4) TESTES ESTATÍSTICOS (ZAR, 1984):

As principais ferramentas estatísticas para análise dos dados foram as seguintes:

- Estatísticas Descritivas;
- Intervalos de confiança;
- Teste t de Student;
- Teste qui-quadrado.

b.4.1) . CÁLCULO DE ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS:

O cálculo dos parâmetros (média, mediana, desvio padrão e variância) foi introduzido a fim de fornecer uma resumo dos dados, além de permitir uma exploração inicial dos dados observados, induzindo a possíveis comparações.

- **Média:**

(Medida de posição)

$$X = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n-1}$$

- **Mediana:** Valor central da amostra ordenada (mediana de posição)

- **Desvio Padrão:** Medida de variabilidade ou dispersão

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

-**Variância:** S^2

b.4.2) INTERVALO DE CONFIANÇA: Indicador de precisão da estimativa da média de uma amostra. Em um intervalo de confiança de 95%, a média da amostra em questão estaria presente neste intervalo em 95% dos casos.



b.4.3) **TESTE t DE STUDENT:** Utilizado para comparação da média entre 2 populações, no presente trabalho, este destinou-se à comparação dos valores médios de Glóbulos vermelhos (GV), Hematócrito (Ht), Hemoglobina (Hb) e Hemoglobina Corpuscular média (HCM) entre gestantes caucasóides e negróides.

b.4.4) **TESTE QUI-QUADRADO (X^2):** Utilizado para verificar muitas vezes, se a frequência com que um determinado acontecimento é observado em uma amostra se desvia significativamente ou não da frequência com que ele é esperado. Outras vezes é imprescindível para comparar a distribuição de certos acontecimentos em diferentes amostras, a fim de avaliar se as proporções observadas desses acontecimentos não mostram diferenças significativas (são casuais) ou se as amostras diferem significativamente quanto às proporções destes acontecimentos. Utilizado neste trabalho, para determinar se entre as gestantes com Hemoglobinopatias há diferença significativa quanto à origem caucasóide ou negróide

$$X^2 = \sum_{ei} \frac{(oi - ei)^2}{ei} \text{ onde:}$$

oi = frequência observada

ei = frequência esperada



V. RESULTADOS:

No período de janeiro a dezembro de 1996, foram analisadas amostras de sangue de 696 gestantes provenientes de centros de saúde de São José do Rio Preto, Catanduva, Dirce Reis, Nova Granada, Jales, Pontalinda, Santa Albertina, Tanabi, Urânia e Vitória Brasil, de clínicas particulares e também de algumas gestantes que procuraram por iniciativa própria o Centro de Referência de Hemoglobinas da UNESP de São José do Rio Preto. Às portadoras de hemoglobinas anormais foram enviadas cartas contendo folhetos explicativos sobre o seu tipo de anemia hereditária, possibilidades de transmissão aos seus filhos, e um convite para que seu esposo ou companheiro e demais familiares procurassem o Centro de Referência de Hemoglobinas para receberem esclarecimentos e efetuar coleta de sangue para estudo familiar.

1) - METODOLOGIA UTILIZADA PARA DIVULGAÇÃO E CONSCIENTIZAÇÃO DO PROGRAMA:

O programa foi dividido em quatro etapas:

Divulgação: Em uma primeira etapa, procurou-se divulgar o programa para ginecologistas de São José do Rio Preto por meio de cartas explicativas (em anexo) sobre as hemoglobinopatias em geral, e sobre o "Programa de prevenção de anemias hereditárias em gestantes", nome utilizado para a divulgação da pesquisa. Foram feitos a seguir, contatos com a Divisão Regional de Saúde de São José do Rio Preto (DIR. XXII) sobre a implementação do programa junto aos centros de saúde, como parte dos exames pré-natais. A divulgação foi realizada também por meio de rádio, televisão, jornais e cartazes que foram afixados em centros de saúde, hospitais, universidades, consultórios e ônibus urbanos de São José do Rio Preto, visando informar a população sobre as anemias hereditárias e convidando as gestantes a participarem da pesquisa.

Coleta de sangue: optou-se pela coleta por punção venosa de 3 ml de sangue e armazenamento em tubos contendo 50 μ l de E.D.T.A. a 5,0 %, sendo a gestante previamente identificada em ficha (em anexo) contendo



nome completo, idade, cor da pele, procedência, número de filhos, ocorrência de abortos, grau de escolaridade e renda familiar. Algumas fichas de identificação de amostras encaminhadas para o nosso serviço por centros de saúde, estavam com dados incompletos, o que dificultou a análise estatística dos resultados. As amostras foram colhidas no Centro de Referência de Hemoglobinas, Instituto Adolfo Lutz e centros de saúde de São José do Rio Preto, Tanabi, Jales e região. Independente do local da coleta, foram seguidos os mesmos critérios de identificação e armazenamento das amostras.

Análise das amostras: Os testes foram efetuadas num período máximo de 24 horas após a coleta, e compreenderam três etapas: a) técnicas seletivas para detecção de hemoglobinopatias; b) técnicas específicas para detecção de hemoglobinas anormais e c) técnicas para caracterização de sub-unidades protéicas. Todas as amostras foram submetidas aos testes seletivos e aquelas que apresentaram alterações foram separadas para estudos complementares.

As amostras que exibiram anormalidades no processo seletivo, foram submetidas aos seguintes testes segundo suas alterações: eletroforese em ágar-fosfato pH 6,2 identificando as Hb S e Hb C, nas combinações mais freqüentes AS e AC; as amostras que apresentaram aumento das hemoglobinas A2 e Fetal foram avaliadas quantitativamente, e, no caso específico de aumento da hemoglobina Fetal foi realizada também a coloração intra-eritrocitária de hemoglobina Fetal para diferenciar talassemia beta da Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF). A coloração vital com azul de crezil brilhante, método específico para detecção de Hb H, em portadores de talassemia alfa, foi realizado como teste confirmatório, uma vez que a Hb H obtida por fracionamento eletroforético é em geral visualizada com dificuldade em portadores "silenciosos". Nos casos em que foram detectados formas variantes de hemoglobinas, não qualificáveis pelos métodos anteriores, as amostras foram submetidas à eletroforese de globinas em acetato de celulose, usando tampão TRIS-EDTA-BORATO com uréia 6M e 2-mercaptoetanol 0,05%M nos pH 6,0 e 8,9, e Focalização Isoelétrica.

Comunicação dos resultados às portadoras de hemoglobinopatias: A cada portadora de hemoglobina anormal foi enviado folheto explicativo (em anexo) sobre o tipo de anemia hereditária encontrada, cuidados básicos e



probabilidade de transmissão do caracter aos seus descendentes (em anexo). Foram realizadas reuniões com exposição dos conceitos básicos das anemias hereditárias, aconselhamento genético, elucidações de possíveis dúvidas das gestantes portadoras e dos profissionais dos centros de saúde e principalmente, feito o convite para que seus companheiros, filhos e familiares também realizassem as análises. Aos familiares que se dispuseram a participar do programa foram enviados os resultados e procedido o aconselhamento adequado.

Do total de 800 cartas enviadas a médicos, profissionais da saúde, entidades sociais, entre outros, 30 foram devolvidas pelo correio principalmente por mudança de endereço, e como resposta à nossa divulgação, houve um retorno de 696 gestantes interessadas em participar do programa.

A grande maioria, 85% das gestantes atendidas pelo programa, tinham apenas o 1o Grau (sendo este nem sempre completo) e aproximadamente 88% possuía renda familiar entre 1 e 4 salários mínimos.

2) - ANÁLISES LABORATORIAIS:

Foram analisadas 696 amostras de sangue de gestantes, das quais 75 (10,77%), apresentaram hemoglobinas anormais (Figura 10). Do total de gestantes analisadas, a cidade de Jales foi a que encaminhou o maior número, 282 gestantes (40,53% do total analisado). São José do Rio Preto, cidade que recebeu maior fluxo de divulgação por contar com expressivo contingente de ginecologistas e obstetras, encaminhou apenas 144 gestantes (20,69% do total). A tabela 01 mostra o número de gestantes por local de procedência. O número de gestantes analisadas com hemoglobinas normais e hemoglobinopatias de acordo com o local de procedência está demonstrado na tabela 2.

Os sete genótipos observados, todos na forma heterozigota, incluem talassemia beta, talassemia alfa, Hb AS, Hb AC, Hb AJ, Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF), e interação entre Hb AS e talassemia Alfa, conforme ilustra a tabela 3.



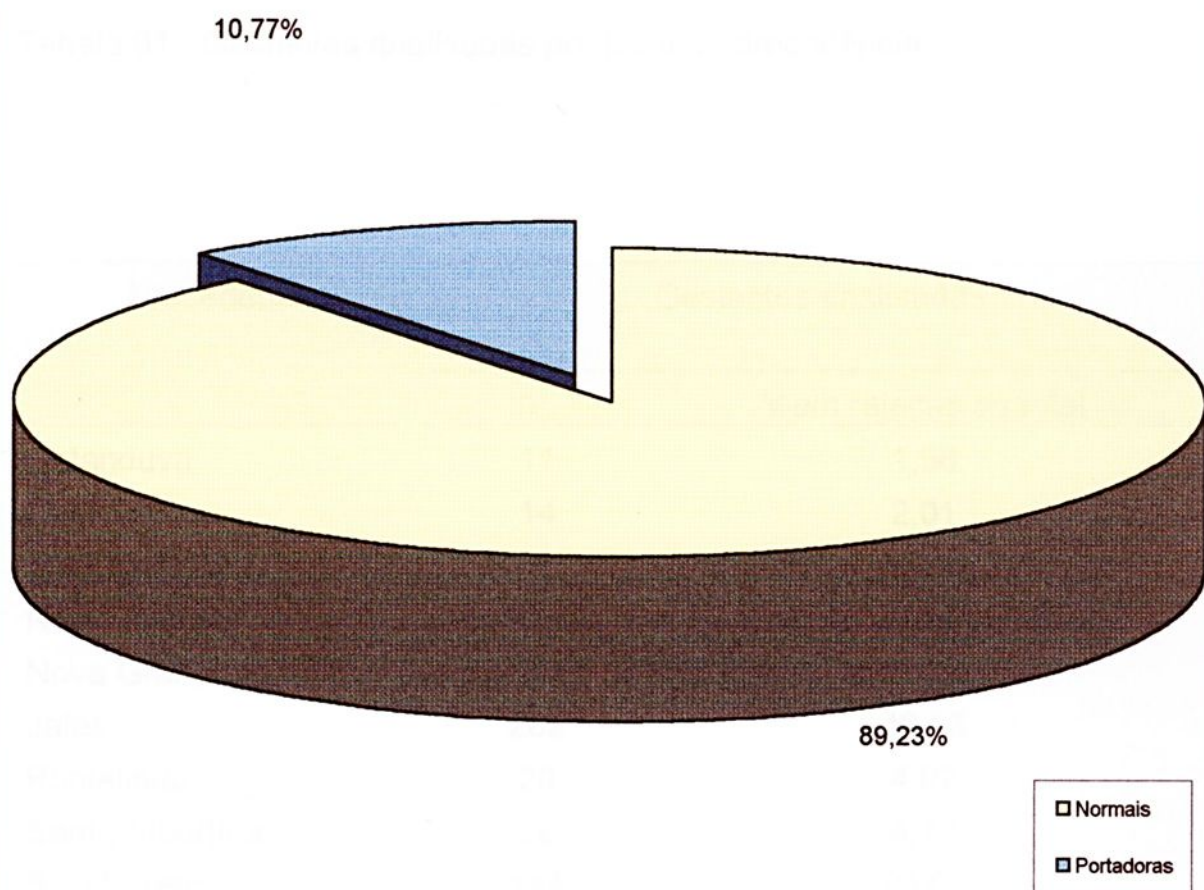


Figura 10: Percentagem das gestantes analisadas.

Tabela 01 - Gestantes analisadas por local de procedência:

Procedência	Gestantes analisadas	
	nº	%em relação ao total
Catanduva	11	1,58
Dirce Reis	14	2,01
José Bonifácio	1	0,14
Nova Aliança	1	0,14
Nova Granada	5	0,72
Jales	282	40,53
Pontalinda	28	4,02
Santa Albertina	29	4,17
S.J.R Preto	144	20,69
Tanabi	99	14,22
Urania	75	10,78
Vitória Brasil	7	1,01
Total	696	100,00



Tabela 02 - Número de gestantes analisadas com hemoglobinas normais e hemoglobinopatias, segundo o local de procedência:

Procedência	Hemoglobinas normais		com Hemoglobinopatias		Total analisado	
	n°	(%)	n°	(%)	n°	(%)
Catanduva	8	(1,15)	3	(0,43)	11	(1,58)
Dirce Reis	13	(1,87)	1	(0,14)	14	(2,01)
José Bonifácio	-		1	(0,14)	1	(0,14)
Nova Aliança	-		1	(0,14)	1	(0,14)
Nova Granada	5	(0,72)	-		5	(0,72)
Jales	257	(36,93)	25	(3,59)	282	(40,52)
Pontalinda	27	(3,88)	1	(0,14)	28	(4,02)
Santa Albertina	22	(3,16)	7	(1,01)	29	(4,17)
S.J.R Preto	125	(17,96)	19	(2,73)	144	(20,69)
Tanabi	91	(13,07)	8	(1,15)	99	(14,22)
Urania	66	(9,48)	9	(1,30)	75	(10,78)
Vitória Brasil	7	(1,01)	-		7	(1,01)
Total	621	(89,23)	75	(10,77)	696	(100)



Tabela 03 - Distribuição dos sete genótipos de hemoglobinopatias qualificados em 696 gestantes analisadas, e suas prevalências entre o total de alterações observadas:

Procedência	Tipos de Alterações							Total
	Tal. α	Tal. β	Tal. α / HbAS*	P.H.H.F **	Hb AS	Hb AC	Hb AJ	
	n° (%)	n°(%)	n°(%)	n°(%)	n°(%)	n°(%)	n°(%)	
Catanduva	2(0,29)	-	1(0,14)	-	-	-	-	3 (0,43)
Dirce Reis	1(0,14)	-	-	-	-	-	-	1(0,14)
Jales	14(2,01)	3(0,43)	-	1(0,14)	6(0,86)	1 (0,14)	-	25(3,59)
José Bonifácio	-	-	-	-	-	-	-	-
Nova Aliança	1(0,14)	-	-	-	-	-	-	1(0,14)
Nova Granada	1(0,14)	-	-	-	-	-	-	1(0,14)
Pontalinda	1(0,14)	-	-	-	-	-	-	1(0,14)
Santa Albertina	5(0,72)	-	-	-	2(0,29)	-	-	7(1,01)
S. J. Rio Preto	10(1,44)	5(0,72)	-	-	4(0,58)	-	-	19(2,73)
Tanabi	5(0,72)	1(0,14)	-	-	-	1(0,14)	1(0,14)	8(1,15)
Urania	7(1,01)	-	-	-	2(0,29)	-	-	9(1,30)
Vitória Brasil	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	47(6,75)	9(1,29)	1(0,14)	1(0,14)	14(2,02)	2(0,29)	1(0,14)	75(10,77)

* : Interação entre Hemoglobina AS e Talassemia α

** : Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal

Vale ressaltar que a divulgação da pesquisa incluiu centros de saúde e clínicas particulares, mas a procura por gestantes atendidas em clínicas particulares foi de apenas 10 pessoas. Portanto a pesquisa foi realizada em sua quase totalidade por gestantes atendidas em centros públicos de saúde.

O tipo de hemoglobinopatia mais freqüente entre o total das hemoglobinopatias identificadas, foi a talassemia alfa (6,75%), seguida de falcemia heterozigota ou Hb AS(2,02%), e talassemia beta heterozigota (1,29%), conforme ilustra a Figura 11.

De uma forma geral a prevalência de hemoglobinopatias entre as 696 gestantes analisadas foi 10,77% (75 casos), com a identificação de sete genótipos. Os três genótipos mais freqüentes foram a talassemia alfa, a Hb AS e a talassemia beta menor que somadas representam 10,06% e são esses os genótipos passíveis de causarem patologias graves quando combinados em homozigoses e entre si. A tabela 4 mostra a prevalência dos sete genótipos

O retorno dos familiares das gestantes portadoras de hemoglobinopatias foi de 42,2% por parte dos filhos, de apenas 26,7% por parte dos companheiros. Dos 75 companheiros esperados, apenas 20 (26,7%) atenderam ao convite e as análises de hemoglobinas revelaram que todos apresentavam hemoglobinas normais. Apesar da orientação passada para as mães realizarem os exames nos recém-natos após os 6 meses de idade, até a data da elaboração desta dissertação, recebemos amostras de sangue de apenas duas crianças das 75 esperadas, apresentando ambas, resultados normais para a idade.

Do total de 45 filhos catalogados entre as gestantes portadoras de hemoglobinopatias, excetuando-se os recém-natos, apenas 19 (42,2%) retornaram para estudo familiar, e destes, cinco mostraram o mesmo tipo de hemoglobinopatia da mãe, 3 portadores de talassemia alfa e 2 portadores de Hb AS conforme apresentado na figura 12.

Na tentativa de avaliar as concentrações de Hb A2 e Fetal em gestantes, com a finalidade de observar se ocorria interferência na produção destas hemoglobinas durante a gestação, quantificamos as referidas hemoglobinas em 50 gestantes portadoras de hemoglobinas normais. A avaliação da hemoglobina A2 resultou em valores entre 1,12 a 3,7 %, com média de 2,8, enquanto que a hemoglobina Fetal variou de 0,11 à 2,0%, com média de 0,92, conforme demonstrado na Figura 13.



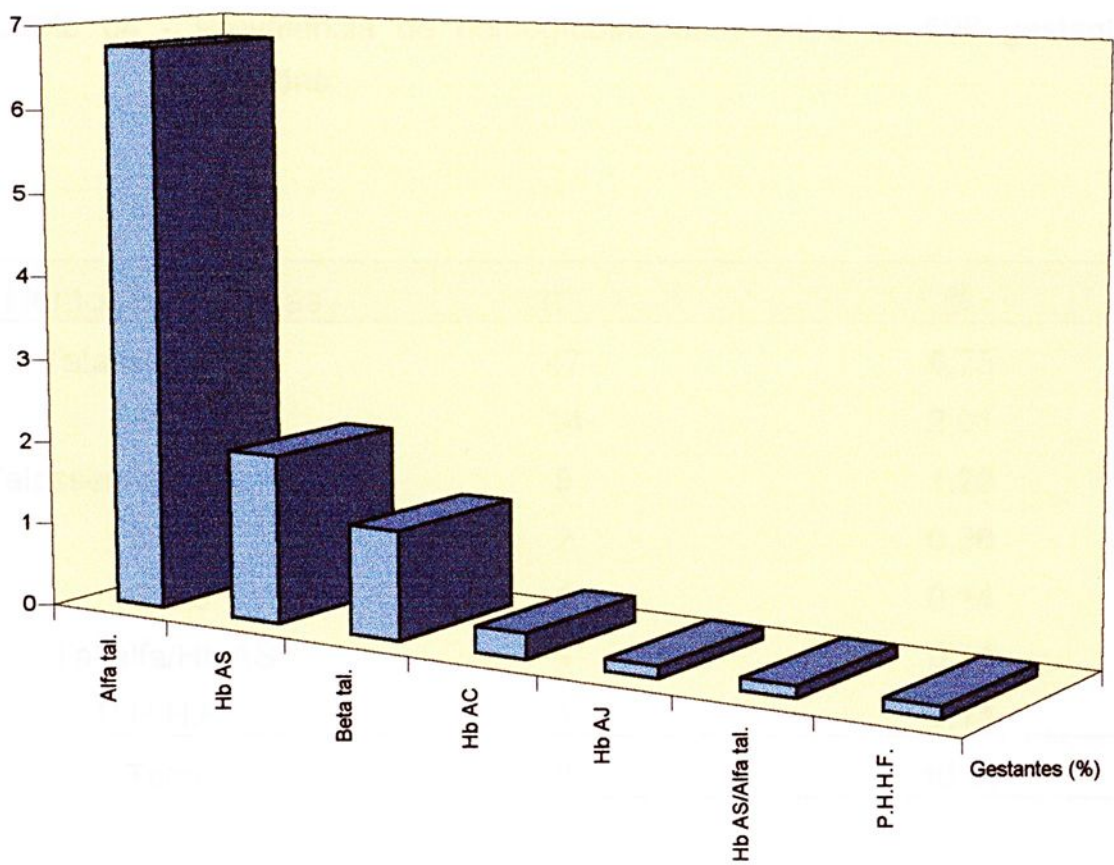


Figura 11: Hemoglobinopatias em gestantes

Tabela 04 - Prevalência de hemoglobinopatias entre as 696 gestantes analisadas:

Hemoglobinopatias	n°	%
Talassemia alfa	47	6,75
Hb AS	14	2,01
Talassemia beta menor	9	1,29
Hb AC	2	0,28
Hb AJ	1	0,14
Tal.alfa/Hb AS	1	0,14
P.H.H.F.	1	0,14
Total	75	10,47



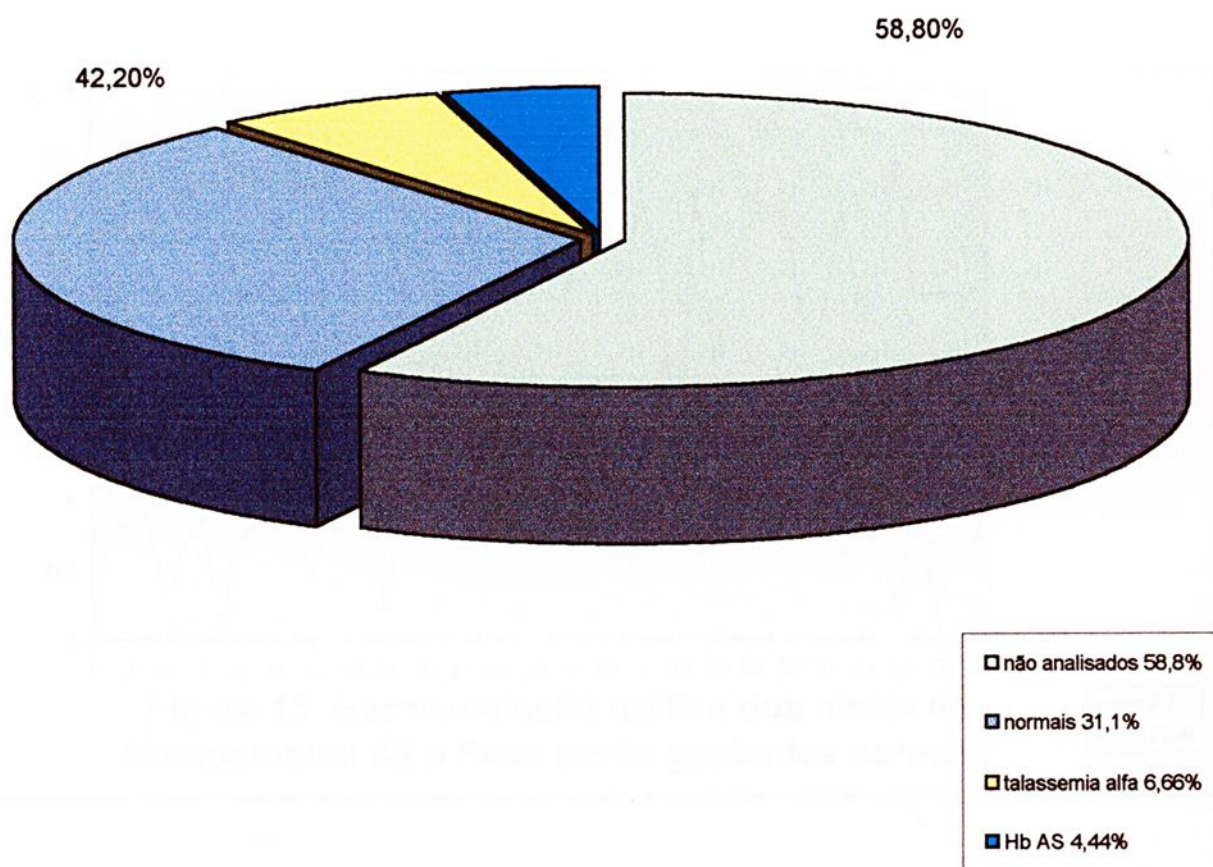
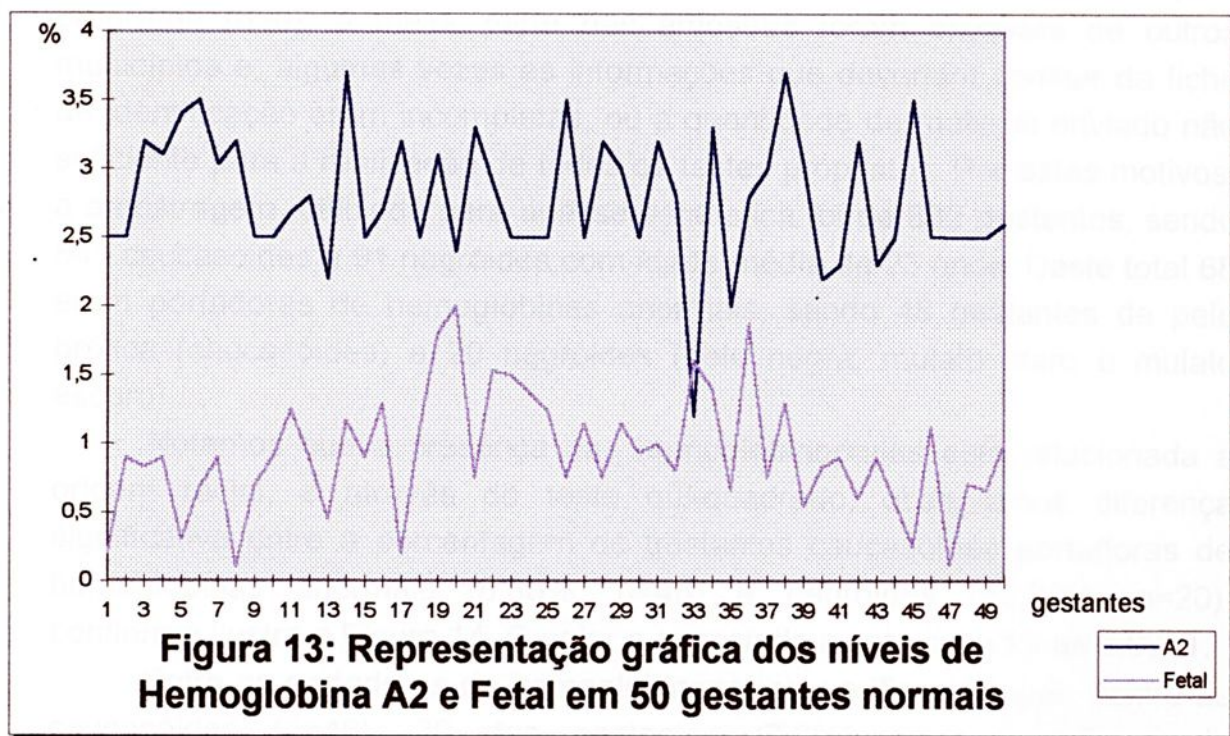


Figura 12: Filhos de gestantes portadoras de hemoglobinopatias

3) ANÁLISE ESTATÍSTICA



3) - ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A análise estatística dos resultados foi efetuada com o objetivo de determinar a prevalência de hemoglobinopatias em gestantes, relacionando-a com os valores de glóbulos vermelhos, hematócrito, concentração de hemoglobina e hemoglobina corpuscular média, empregando-se para tanto, o teste t de Student, teste qui-quadrado e estatísticas descritivas, conforme padronizado no departamento de estatística da UNESP (ZAR, 1984).

Como já citado anteriormente, do total de gestantes analisadas pelo programa (696), a maior parte das amostras foram enviadas de outros municípios e, algumas vezes as informações que deveriam constar da ficha de identificação eram incompletas, ou a quantidade de material enviado não suficiente para a realização de todos os testes propostos. Por estes motivos, a amostragem utilizada para análise estatística foi de 632 gestantes, sendo 541 caucasóides e 91 negróides, com idade média de 23 anos. Deste total 68 eram portadoras de hemoglobinas anormais, sendo 48 gestantes de pele branca (caucasóides) e 20 negróides (pele negra, mulato claro e mulato escuro).

Notamos que a presença das hemoglobinopatias está relacionada à origem racial, e através do teste qui-quadrado, observamos diferença significativa entre a porcentagem de gestantes caucasóides portadoras de hemoglobinas anormais (8,86%, n=48) e negróides (22,22%, n=20), conforme ilustra a Figura 14. O valor p associado a este caso foi de 0,0001.

Entre as portadoras de hemoglobinopatias, verificou-se que, dentre as caucasóides (n=48), 39 das gestantes (7,2%) eram portadoras de talassemia, sendo 32 (5,9%) do tipo alfa e 7 (1,3%) do tipo beta, 6 (1,11%) com Hb AS e 3 (0,55%) eram portadoras de qualquer outra hemoglobina variante (Hb AC, Hb AJ e interação entre AS/tal alfa). Já entre as negróides (n=20), 11 (12,22%) eram portadoras de talassemia, sendo, 10 (11,11%) do tipo alfa e 1 (1,11%) do tipo beta, 8 (8,89%) de Hb AS e em apenas uma gestante negróide foi encontrada hemoglobina Fetal com características de Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (1,11%) conforme demonstrado na Figura 15. A prevalência de portadoras de talassemia entre as negróides foi elevada, superando o traço falciforme (Hb AS), característico de descendentes de africanos.



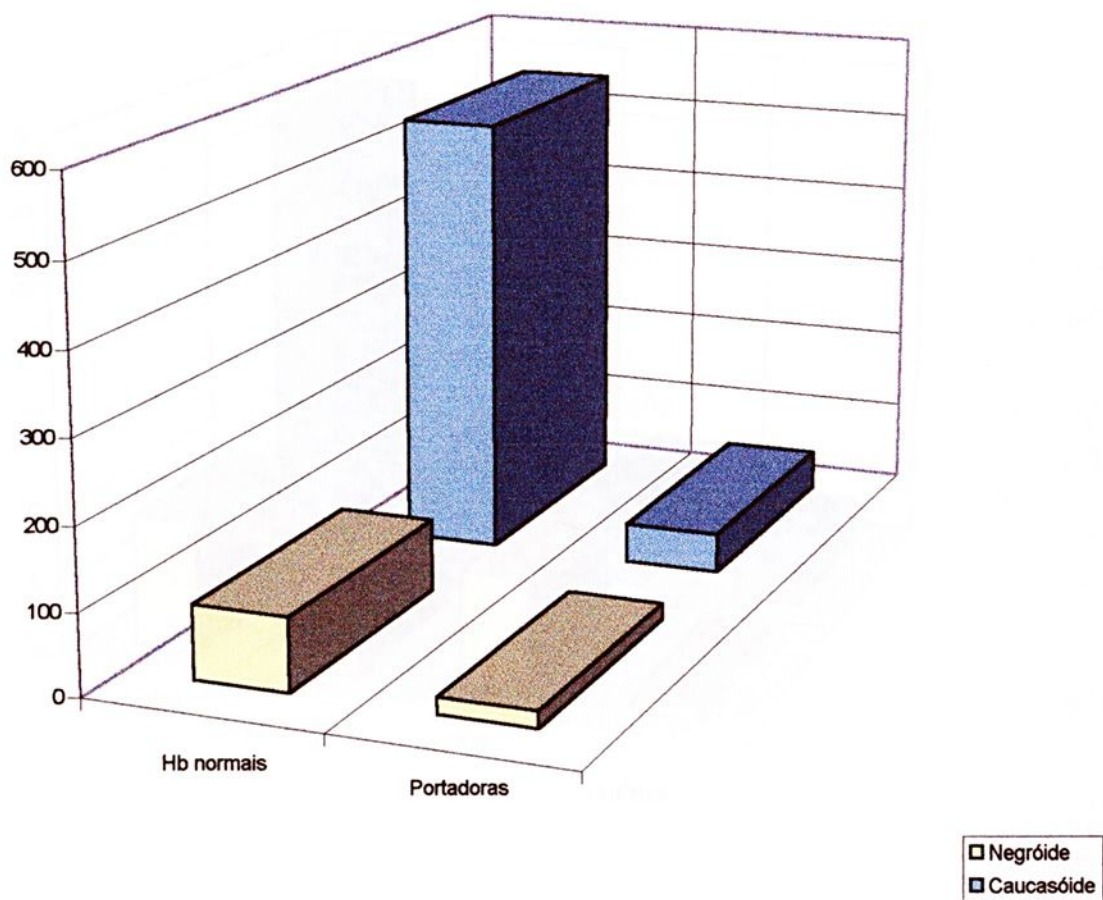


Figura 14: Distribuição gráfica da origem racial de gestantes portadoras de Hbs normais e com Hemoglobinopatias.

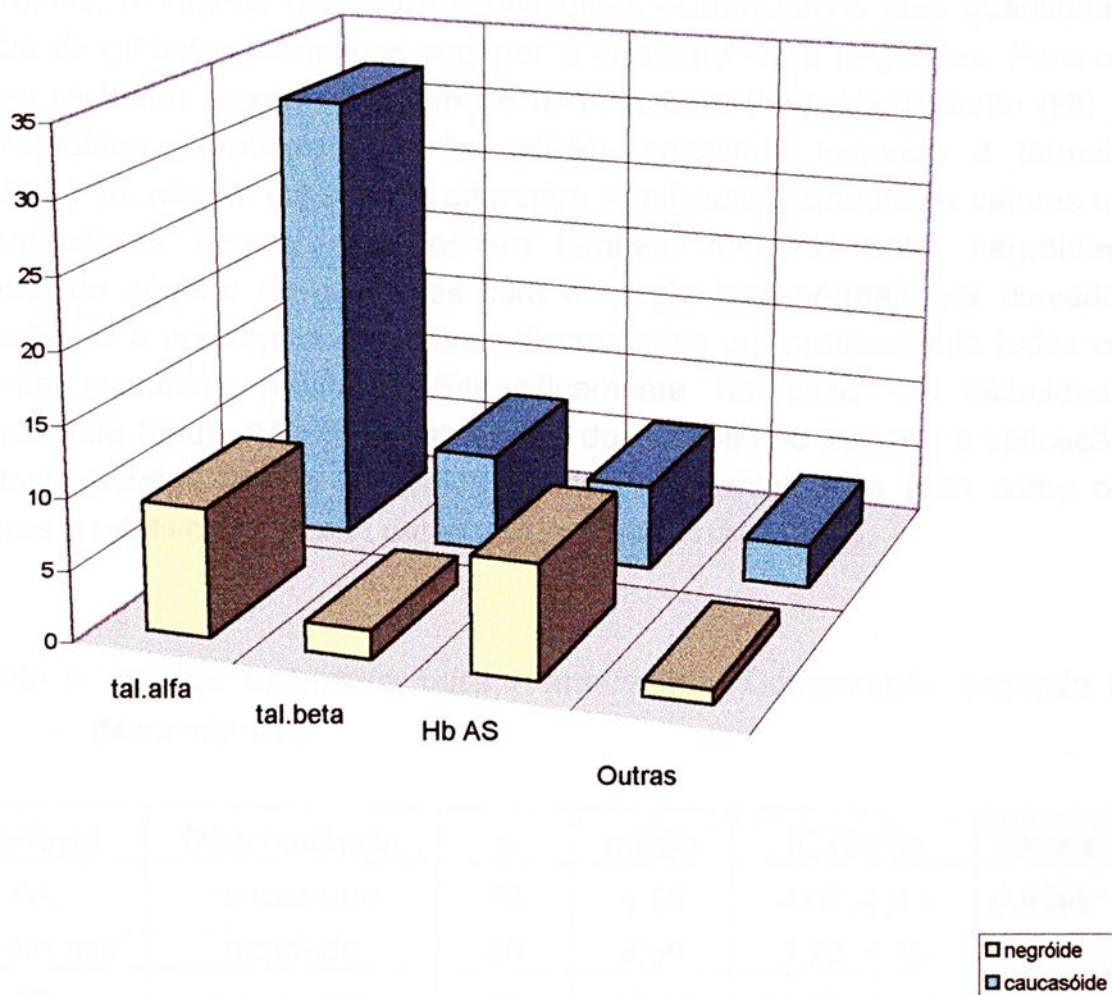


Figura 15: Representação gráfica dos tipos de hemoglobinopatias em gestantes por origem racial.

Com relação à hematimetria (glóbulos vermelhos, hematócrito e hemoglobina), verificou-se que só houve diferença significativa entre caucasóides e negróides para a quantidade média de glóbulos vermelhos . O valor p pelo teste t de Student foi de 0,0269 e os intervalos de confiança calculados foram (4,07; 4,43) para caucasóides e (3,70; 4,10) para negróides, revelando que entre caucasóides evidenciamos uma quantidade média de glóbulos vermelhos superior à existente entre negróides. Para os testes restantes, como dosagem de hemoglobina (Hb), Hematócrito (Ht) e Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), calculada segundo a fórmula (Hb/GV).10, não foi constatada diferença significativa, embora os valores de hematócrito e hemoglobina fossem também menores entre negróides. Apesar do número de gestantes com hemoglobinas normais ser elevado, percebe-se a ocorrência de valores discrepantes em praticamente todos os índices avaliados medidos. Especificamente no caso da Velocidade Corpuscular Média (VCM), a distribuição dos dados não permitiu a aplicação do teste estatístico. Os intervalos de confiança estimados bem como os valores p relativos ao teste t estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Análise estatística para Hematimetria. Comparação segundo a descendência:

Variável	Descendência	n	média	IC (95%)	valor-p
GV milhões mm ³	caucasóide	48	4,25	4,07; 4,43	0,0269*
	negróide	20	3,90	3,70; 4,10	
Hb g/dl	caucasóide	48	11,55	11,19; 11,90	0,0928
	negróide	20	10,97	10,36; 11,58	
Ht %	caucasóide	48	36,60	35,64; 37,56	0,0692
	negróide	20	34,80	32,99; 36,60	
HCM pg.	caucasóide	48	27,48	26,50; 28,46	0,8452
	negróide	20	27,65	26,36; 28,94	

* valor significativo ao nível de 5%.



IV. DISCUSSÃO:

As primeiras comunicações sobre prevalência de hemoglobinopatias no Brasil datam do início da década de 40. Dessa época até o final dos anos 60 as análises dispunham de tecnologia limitada, e certamente por este motivo, as hemoglobinas anormais descritas tenham sido apenas Hb AS, Hb AC, Hb SS e Hb SC, nas populações examinadas. Nos trabalhos publicados neste período quase nada se refere às talassemias. Evidências mais consistentes à respeito de hemoglobinopatias no Brasil podem ser encontradas nos trabalhos de Monteiro Marinho, em 1970, sobre Hb S no Rio de Janeiro; Naoum & Cury, em 1983, a respeito de hemoglobinopatias no Estado de São Paulo, Culpi e Salzano em 1984, abordando hemoglobinopatias no Estado do Paraná; Domingos em 1993, sobre distribuição de hemoglobinopatias no Brasil e; Alvares Filho et al em 1995, sobre a distribuição de Hb S no Brasil. Em nosso país a prevalência de hemoglobinas anormais é extremamente variável e influenciada por fatores ecológicos e raciais, conforme a região analisada. Porém, a estimativa média de hemoglobinas anormais no Brasil é de 4%, sem considerar a talassemia alfa por um ou dois genes afetados (SALZANO, 1979, ZAGO *et al*, 1983, NAOUM *et al*, 1983, NAOUM *et al*, 1984, RUIZ *et al*, 1986, MEDEIROS *et al*, 1992, DOMINGOS, 1993).

O presente trabalho descreve uma situação em que divulgamos os resultados da prevalência de hemoglobinas anormais em gestantes de alguns municípios que fazem parte da DIR XXII, analisadas com técnicas laboratoriais padronizadas no Centro de Referência de Hemoglobinas.

As gestantes constituem um grupo pouco estudado no Brasil para procedimentos preventivos de hemoglobinopatias. É de fundamental importância destinar atividade relativa à prevenção de anomalias hereditárias por meio da conscientização a respeito das alterações e do aconselhamento genético. Implantar um programa preventivo para esta patologia em gestantes tem pontos é válido, pois estas já possuem uma rotina de exames pré-natal, junto aos quais pode ser anexada a pesquisa de hemoglobinopatias, e durante a gestação, a mulher está mais propensa a se preocupar com a sua própria saúde e a de seus filhos. Quanto mais precoce o diagnóstico, principalmente nos casos de homozigose, um



acompanhamento médico adequado poderá ser iniciado, visando melhorar a sobrevida do paciente.

Um importante aspecto a ser discutido à respeito deste assunto, foi o interesse nitidamente diferenciado entre os dois grupos propostos, clínicas particulares e Centros de Saúde, para um programa de Saúde para voluntários. O esperado seria que pessoas com melhor renda familiar, geralmente relacionado ao melhor grau de instrução, aceitassem o programa e se interessassem pela pesquisa do que pessoas com menor renda familiar, baixo nível de instrução e que se utilizam de centros públicos de saúde.

Em geral, os serviços públicos de saúde possuem assistentes sociais ou educadores, que desenvolvem um trabalho de conscientização das mães sobre os mais diversos assuntos relacionados à saúde e ao planejamento familiar, além de fazer contatos com as gestantes e seus familiares. Outra vantagem observada diz respeito à coleta dos exames pré-natais que foram realizadas no próprio Centro de Saúde, assim, as fichas de identificação e as amostras de sangue para a pesquisa eram colhidas junto com o restante dos exames, sendo logo em seguida, enviados para o Centro de Referências de Hemoglobinas.

Para as gestantes provenientes de clínicas particulares, credita-se o baixo número de análises à falta de esclarecimento por parte dos médicos. Entretanto, alguns deles nos revelaram que suas pacientes foram esclarecidas sobre o programa, mas as mesmas procuraram laboratórios particulares para realizarem os exames. Desta forma, os resultados obtidos nestes laboratórios não nos foram repassados, explicando assim, o número discrepante entre gestantes de atendimento público e particular.

Programas para hemoglobinopatias em gestantes realizados em países como Estados Unidos da América (ROWLEY *et al*, 1991) e no Brasil, na cidade de Araras-SP (TEIXEIRA & RAMALHO, 1994), mostram resultados satisfatórios. Entretanto, programas desenvolvidos no Hemisfério Norte incluem diagnóstico pré-natal do feto, com possíveis terapêuticas abortivas em seus objetivos, notadamente para casais de risco, objetivos estes, não considerados em nossa pesquisa, pois esta apenas relacionava a probabilidade de nascimento de uma criança homozigota ou heterozigota para hemoglobinopatia visando a conscientização e acompanhamento.



As vantagens e desvantagem de programas pré-natais com objetivos "eugênicos*"¹ para hemoglobinopatias são discutidos por BOWMAN (1991), pois além de todo um trabalho de suporte para o diagnóstico fetal, acompanhamento pré e pós aborto, há problemas legais e religiosos diferentes para cada local ou país.

O índice de heterozigotos para hemoglobinopatias observado entre as gestantes que participaram do nosso trabalho foi de 10,77%. Estudos realizados no Brasil para detecção de hemoglobinopatias em gestantes revelaram que a prevalência de hemoglobinas anormais foi de 3,6% (TEIXEIRA & RAMALHO, 1994). A discrepância entre este valor e o obtido em nosso trabalho (10,77%) deve-se ao fato de termos identificado a presença de talassemia alfa por fracionamento eletroforético e avaliação citológica da presença de precipitações intraeritrocitárias de Hb H. Outra expectativa nossa, se relacionava às análises dos esposos ou companheiros no sentido de detectar a existência de "casais de risco". "Casal de risco" é uma terminologia utilizada quando ambos são portadores de algum tipo de hemoglobina anormal. Essas condições podem resultar no nascimento de crianças com formas graves de hemoglobinopatias. Assim, ao realizarmos tal programa notamos que a adesão por parte do esposo ou companheiro ficou abaixo do esperado, o que pode ser explicado por pelo menos uma das três possibilidades abaixo:

a) gestantes, casadas ou não, morarem separadas dos companheiros, o que dificultaria o contato com o pai;

b) o desinteresse, ou o receio de descobrir ser portador de uma alteração genética que até no momento não lhe trouxe problema de nenhum tipo;

c) mudança de endereço ou este incompleto, fato que impossibilitou o nosso contato.

Não foi aplicado nenhum teste estatístico para verificar se haviam diferenças significativas ou não nas duas populações estudadas (gestantes atendidas em clínicas particulares e Centros públicos de Saúde), uma vez

¹*"Eugenia" é a ciência que interage com todas as influências que melhoram a qualidade congênita da raça humana particularmente através do controle de fatores hereditários. Pode ser dividida em Eugenia Negativa (minimizando a transmissão de genes considerados deletérios) ou Positiva (maximizando a transmissão de genes considerados convenientes).¹



que esta diferença era muito clara e cálculos com base em uma população de 10 indivíduos comparados a outra de 682 poderiam ficar distorcidos. Em Teixeira & Ramalho, 1994 não houve diferença significativa entre as duas populações estudadas porém a procura por parte dos esposos encaminhados por serviços públicos, foi significativamente maior, fato justificado por ser um o serviço médico que promoveu o trabalho e a coleta de amostras. Os resultados demonstram, portanto, que altos níveis escolares e sócio-econômicos não são fatores que favoreçam o interesse nestes programas, como seria de se esperar. De acordo com Ramalho *et al*, 1992, freqüentemente o interesse ou a "sensibilidade" das pessoas contam mais no campo genético do que o seu grau de instrução.

As análises efetuadas possibilitaram detectar 75 portadoras de hemoglobinas anormais, caracterizando um total de 7 genótipos, na forma heterozigota: AS, AC, AJ, PHHF, talassemias alfa e beta e interação entre Hb S e talassemia alfa, destacando-se as Hb AS e Hb AC como as mais freqüentes entre as variantes de hemoglobinas, e a talassemia alfa dentre as talassemias, evidenciando que os resultados gerais obtidos apresentam-se similares aos da literatura.

Dos 45 filhos de gestantes portadoras esperados, 19 (42,2%) procuraram o nosso serviço para a realização dos exames, sendo que cinco apresentaram o mesmo tipo de hemoglobinopatia da mãe, três com talassemia alfa e dois com Hb AS, e a procura por parte dos recém-natos, foi de . 0,2%. Teixeira & Ramalho, 1994, relatam a procura de 55,3% dos outros filhos e de 50% dos recém-natos, número maior do que o encontrado em nossa pesquisa, provavelmente por ser um o serviço médico quem realizou a pesquisa e a coleta das amostras, sendo que tanto em nossa pesquisa, quanto na realizada na cidade de Araras, foram convidados para estudo familiar somente os companheiros e filhos de gestantes portadoras de hemoglobinopatias.

Nas dosagens de Hb A2 e Fetal, na sub-amostra de 50 gestantes não foram encontrados valores diferentes dos encontrados na população não gestante da literatura, o que nos leva a crer que esta condição não provoca alterações na produção destas hemoglobinas.

De acordo com a análise estatística, houve diferença significativa entre portadoras de hemoglobinopatias de acordo com a origem racial. Das 68 gestantes portadoras 48 (8,86) eram caucasóides de uma total 541 e 20



(22,22%) eram negróides de um total de 91 negróides analisadas, demonstrando claramente a influência da origem racial na prevalência das hemoglobinopatias. Entre as caucasóides houve predomínio de talassemia alfa, provavelmente devido à influência de povos oriundos do Mediterrâneo em nossa região. Entre as negróides os tipos de hemoglobinas anormais mais prevalentes foram talassemia alfa e traço falciforme. O esperado seria um número maior de portadoras de traço falciforme, uma vez que a mutação que originou a Hb S ocorreu na África, porém em nossa população, é grande a miscigenação racial produzindo variação nas prevalências originais esperadas (SALZANO & TONDO, 1982).

Segundo dados da literatura sobre hematimetria na população brasileira, devido à características inerentes à raça, os valores negróides encontram-se por volta de 5% mais baixos, quando comparados com a população caucasóide, estando nossos resultados de acordo (NAOUM, 1998).

Sob o ponto de vista da contribuição deste trabalho relativo aos efeitos fisio-patológicos de determinadas hemoglobinopatias, com destaque para o traço falciforme (Hb AS), talassemia alfa e talassemia beta menor durante a fase gestacional, é necessário enfatizar alguns dos principais efeitos causados pela Hb S e pelo desbalanceamento entre a síntese de globinas alfa e beta, respectivamente.

O heterozigoto falciforme possui em média 40% de Hb S e 60% de Hb A, e como esta última tem a capacidade de inibir a polimerização da Hb S, a morbidade é muito baixa. Estudos realizados na Jamaica (ASHCROFT & DESAI, 1976) mostraram que não há diferença entre os portadores de hemoglobinas normais quanto à mortalidade e à presença de hematúria, quando comparados com portadores de Hb AS e que o desenvolvimento somático e sexual também não está comprometido. Outros autores, no entanto, acreditam haver maior incidência de hematúria e embolia pulmonar (BRITO, 1984). O comportamento em cirurgias é normal, desde que bem oxigenados. Foram relatados casos de morte após intenso esforço físico, com desidratação (BEUTLER, 1983), da mesma forma que são bem documentados episódios de infartos esplênicos em altitudes acima de 2000 metros. Diante do exposto, o presente trabalho, enbasado na alta prevalência de traço falciforme em gestantes, sugere que se faça as seguintes análises periódicas nas portadoras desta alteração:



- controle hematológico periódico;
- exame de urina tipo 1, com cuidadosa análise quantitativa de hemáceas para determinar o grau de hematúria, quando presente;
- oxigenação durante e após qualquer procedimento cirúrgico que requeira anestésicos;
- evitar altitudes acima de 2000 metros, desidratação e esforços físicos que causem extenuação.

Entre as diferentes formas de talassemia, as do tipo alfa são provavelmente a alteração genética mais comum na espécie humana, com distribuição mundial e maior prevalência em populações do continente asiático, principalmente em algumas regiões da China, Tailândia, Birmânia, Malásia e África. No Brasil, a prevalência da talassemia alfa mínima, caracterizada por alteração de um ou de dois genes alfa, atinge até 12% da população (NAOUM, 1997). O portador de talassemia alfa mínima é assintomático, e geralmente a avaliação do eritrograma mostra valores situados no limite inferior da normalidade. No presente trabalho identificou-se talassemia alfa em 11,1% das gestantes negróides e em 5,9% das caucasóides. Por outro lado, a talassemia beta menor, ou talassemia beta heterozigota, causa anemia microcítica e hipocrômica de grau leve, com fadigabilidade e dores nas pernas. Em alguns portadores do traço beta talassêmico, a anemia se torna moderada, com presença de cálculo biliar e alterações ósseas (CANÇADO, 1997). No presente estudo observou-se que 1,3% e 1,1% das gestantes caucasóides e negróides, respectivamente, eram portadoras de talassemia beta menor ou heterozigota. Diante desses resultados é fundamental que se faça análises para detecção de talassemias em gestantes, bem como o controle periódico da série vermelha. Às gestantes portadoras de talassemias alfa e beta recomenda-se:

- dosagem de ferro sérico e ferritina;
- contagem de reticulócitos;
- evitar esforços físicos que causem fadiga;
- suplementação de ferro e ácido fólico (se houver recomendação médica).

Finalmente, restam as perguntas: "Qual a importância de um programa desta natureza na comunidade?" e "Qual o nível de colaboração da própria comunidade para realizá-lo?".



Com relação à primeira questão observa-se que pelo menos uma em cada dez gestantes é portadora de algum tipo de hemoglobinopatia, que apesar de não causarem doenças graves podem influenciar no grau de morbidade, caracterizada principalmente por anemia, fraqueza, cansaço, presença de cálculos biliares, hematúria, e até risco de oclusão vascular, em portadores de traço falcêmico submetidos a anestésias sem a devida suplementação de oxigênio. Permite também a detecção do casal de risco para gerar crianças com formas graves de hemoglobinopatias, notadamente a talassemia beta maior e a anemia falciforme. Outro benefício de programas similares a este refere-se à identificação de hemoglobinopatias em outros familiares da gestante (pais, filhos, irmãos, primos, tios e avós).

A segunda questão revela dois aspectos básicos:

- 1) a educação, a disponibilidade e o interesse de uma comunidade, incluindo as próprias gestantes, os médicos, e demais integrantes relacionados aos cuidados com a saúde da comunidade;
- 2) a competência e eficiência do poder público relacionado à saúde.

A educação da comunidade e a eficiência e a competência do poder público relacionado à saúde certamente estão inter-relacionados dentro de uma comunidade, e baseado neste argumento é possível entender o porque de cidades como Catanduva, José Bonifácio, Nova Aliança, Nova Granada, e mesmo São José do Rio Preto terem participado com número de gestantes aquém da nossa expectativa.



V. CONCLUSÃO:

1) A quase totalidade das gestantes analisadas nesta pesquisa foi de procedência de centros de saúde, perfazendo 686 das 696 gestantes analisadas. Apenas 10 gestantes foram provenientes de clínicas particulares, apesar da ampla divulgação efetuada sobre o programa para os centros de saúde, clínicas particulares, hospitais, ginecologistas, etc.

2) Das 696 gestantes analisadas, 75 delas (10,7%) apresentaram hemoglobinopatias, com as seguintes prevalências específicas:

- Talassemia alfa : 47 gestantes (6,75%);
- Hb AS : 14 gestantes (2,01%);
- Talassemia beta menor : 9 gestantes (1,29%);
- Hb AC : 2 gestantes (0,28%);
- Hb AJ : 1 gestante (0,14%);
- Hb AS/Talassemia alfa : 1 gestante (0,14%);
- P.H.H.F. : 1 gestante (0,14%);

3) Dos 75 companheiros das gestantes com hemoglobinopatias, que foram convidados a realizarem as análises para identificação de hemoglobinas, apenas 20 (26,7%) compareceram. Em nenhum desses detectou-se hemoglobinopatias.

4) Dos 45 filhos das gestantes com hemoglobinopatias que foram convidados a realizarem as análises para identificação de hemoglobinas, somente 19 (42,2%) atenderam ao convite. Desses, 5 apresentaram hemoglobinopatias iguais às da mãe, 3 portadores de alfa talassemia e 2 de Hb AS.

5) A análise da prevalência de hemoglobinopatias por cor da pele e outras características raciais (cabelo, formato do nariz, etc) mostrou que 22,2% do grupo de gestantes negróides eram portadoras de hemoglobinopatias, enquanto que entre as gestantes brancas a prevalência foi de 8,8%.



6) A prevalência de tipos de hemoglobinopatias entre gestantes, diferenciadas por grupo racial, mostrou que a talassemia alfa foi mais prevalente nos dois grupos do que as outras hemoglobinopatias. No grupo negro, a prevalência de talassemia alfa foi de 11,1%, e no caucasóide de 5,5%. A Hb AS foi mais prevalente no grupo negro (8,8%) que no caucasóide (1,1%). A prevalência de talassemia beta menor foi igual entre ambos os grupos (1,3% no caucasóide e 1,1% no negro).

7) Diante dos resultados obtidos, sugere-se que as análises laboratoriais para detecção de hemoglobinopatias façam parte dos exames pré-natais. No caso de serem portadoras de anemia hereditária, entre as análises laboratoriais de rotina periódica das gestantes, deverão ser avaliados o hemograma, dosagens de ferro e ferritina, e contagem de reticulócitos. Recomenda-se especificamente para as gestantes com traço falciforme o que se segue:

a) exame de urina tipo 1, com cuidadosa análise quantitativa de hemáceas para determinar o grau de hematúria, quando presente,

b) oxigenação durante e após qualquer procedimento cirúrgico que requeira anestésicos,

c) evitar altitudes acima de 2000 metros, desidratação e esforços físicos que causem extenuação.

Recomenda-se também, para as portadoras de talassemias alfa e beta heterozigotas, ou menor:

a) hemograma periódico durante o período de gestação;

b) dosagens de ferro e ferritina;

c) suplementação de folatos, sob recomendação médica.



VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABBES, S. et al. Sick cell anemia in the Tunisian population: haplotyping and Hb F expression. *Hemoglobin*, v.15, n.1, p.1-9, 1991.

ALLISON, A.C. Polymorphism and natural selection in the human populations. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, v. 29, p. 137-149, 1964.

ALPERIN, J.B. et al. Hemoglobin A2 levels in health and various hematologic disorders. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.6, p. 219-226, 1977.

ALVARES-FILHO, F. et al. Distribuição geográfica etária y racial de la hemoglobina S en Brasil. *Sangre*, v.40, n.2, p.97-102, 1995.

ANNUAL MEETING OF THE W.H.O. WORKING GROUP ON THE FEASIBILITY STUDY ON THE HEREDITARY DISEASE COMUNITY CONTROL PROGRAMES, 3 1987, Herakleiton . Report of 3th annual meeting of the WHO Working group on the feasibility study on the hereditary disease comunity control programes. Herakleiton, W.H.O., 1987.

ANNUAL MEETING OF THE W.H.O. WORKING GROUP ON THE FEASIBILITY STUDY ON THE HEREDITARY DISEASE COMUNITY CONTROL PROGRAMES (HEREDITARY ANAEMIAS), 5, 1989, Cagliari. Report of 5th annual meeting of the WHO Working group on the feasibility study on the hereditary disease comunity control programes (hereditary anaemias). Cagliari, W.H.O. 1989.

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



ASHCROFT, M.T., DESAI, P. Mortality and mobility in Jamaican adults with sickle-cell trait and with normal hemoglobin followed up for twelve years. *Lancet*. v.9, p.784-786, 1976.

BALLAS, S.K. et al. The XMNI site (-158,C-T)5' to the gama G globin gene: correlation with the Senegalense haplotype and gama G globin expression. *Hemoglobin* , v.15, n.5, p.393-405, 1991.

BETKE, K., MARTI, N.R. , SCHLICHT,I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature*, v.184, n.2134, p.1877, 1959.

BEUTLER, E. The sickle cell diseases and related disorders. In: HEMATOLOGY. 3.ed. New York: Mc Graw Hill, 1983, p.583-609.

BEUTLER, E. The common anemias: review. *J. Amer. Med. Assoc.*, v.259, n.16, p.2433-2437, 1988.

BIERI, J.G., CORASH, L., HUBBARD, V.S. Medical uses of vitamin E. *New England J. Med.*, v. 308, p. 1063-1071,1983.

BLUMENFELD N., et al. Trans membrane mobility of phospholipids in sickle erythrocytes: effect of deoxygenation on diffusion and assymetry. *Blood*, v.77, n.4, p.849-854, 1991.

BOWMAN, J.E. Prenatal screening for hemoglobinopathies. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 48, n. 3, p. 433-438, 1991.

BRITTO, M.M.S., ALVES, A.F.P., RABELO, M.M. Alterações do desenvolvimento somático e sexual na anemia falciforme e traço falcêmico. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v.29, n.4, p.111-114, 1984.

BROUSSIOUS, T., BERTLES, J.F. Simultaneous expression of globin genes for embryonic and adult hemoglobins during mammalian ontogeny. *Science*, v.218, n.4578, p.1225-1227, 1982.



CAI, S.P. et al. Two novel beta thalassemia mutations in the 5' and 3' noncoding regions of the beta globin genes. *Blood*, v.79, n.5, p.1342-1346, 1992.

CANÇADO, R.D. Talassemias - manifestações clínicas e tratamento . In: NAOUM, P.C..*Hemoglobinopatias e talassemias*. São Paulo: Sarvier, p.120-136, 1997.

CAO, A. et al. Recomendações para o tratamento de talassemia beta. Trad. de Durval Fernando Tricta. São Paulo: 1990.

CAO, A. et al. Talassemias in Sardinia: molecular pathology phenotype-genotype correlation and prevention. *Am. J. Pediatr. Hem. Onc.*, v.13, n.2, p.179-188,1991

CHANG, Y.C., et al. An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, β -globin haplotypes, α -globin gene number, gender, and age. *Blood*, v.85, n.4, p.1111-1117, 1995.

CHARACHE, S. Sudden death in sickle trait. *Am. J. Med.*, v.84, p. 459-461, 1988.

CHARACHE, S., LUBIN, B., REID, C.D. Management and therapy of sickle cell disease. Washington: Department of Healt and Human Services, 1991.

CODRINGTON, J.F. et al, Observations on the levels of Hb A2 in patients with different beta thalassemia mutations and a delta chain variant. *Blood*, v.76, n.6,p.1246-1249, 1990.

COLLINS, F.S. et al. Gama G beta+ hereditary persistence of fetal hemoglobin: cosmid cloning and identifications of a specific mutation 5' to the gama G gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.,v.81, p. 4894-4898, 1984.



- COOLEY, T.B. *et al.* A serie of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. *Trans. Am. Pediatr. Soc.* v.37, p.29-30, 1925.
- COSTA, F.F., TAVELLA, M.H., ZAGO, M.A. Deletion type alpha thalassemia among brazilian pacientes with sickle cell anemia. *Rev. Bras. Genet.*, v.12, n.3, p.605-611, 1989.
- CULPI, L., SALZANO, F.M. Migration, genetic markers and race admixture in Curitiba, Brazil. *J. Biosc. Sci.*, v.16, p.127-135, 1984.
- DOMINGOS, C.R.B. *et al.* Hemoglobinopatias e haptoglobinas em portadores de doença de Chagas. *Rev. Bras. Pat. Clin.* v.27, n.3, p.80-88, 1991.
- DOMINGOS, C.R.B., *Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil: diversidade genética e metodologia laboratorial.* São José do Rio Preto, 1993. 231 p. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, 1993.
- DOMINGOS, C.R.B. *et al.* Hemoglobina S - Uma revisão. *Uniciências*, v.1, n.1, p.1-8, 1997.
- DONALD, J.A., LAMMI, A., TRENT, R.J. Hemoglobin F production in heterocellular hereditary persistence of foetal hemoglobin and its linkage to the beta globin gene complex. *Hum. Genet.*, v.80, p.69-74, 1988.
- EDELSTEIN, S.J. *The sickled cell: - from myths to molecules.* Cambridge: Haward University Press, 1986, p.197.
- ELION, J. *et al.* DNA sequences variation in a negative control region 5' to the beta globin gene correlates with the phenotypic expression of the beta S mutation. *Blood*, v.79, n.3, p.787-792, 1992.
- EMBURY, S.H. The different types of alpha thalassemia 2: genetic aspects. *Hemoglobin*, v.12, p.509-517, 1988.



- FABRY, M.E., et al. Rapid increased in red blood cell density driven by K:Cl cotransport in a subset of sickle cell anemia reticulocytes and discocytes. *Blood*, v.78, n.1, p.217-225, 1991.
- FABRY, M.E. et al. Demonstration of endothelial adhesion of sickle cell in vivo: a distinct role for deformable cell discocytes. *Blood*, v.79, n.6, p.1602-1611, 1992.
- FLINT, J. et al. High frequencies of alpha thalassemia are the result of natural selection by malaria. *Nature*, v.321, n.6072, p.744-750, 1986.
- FRANCIS Jr., R.B., JOHNSON, C.S. Vascular occlusion in sickle cell disease: current concepts and unanswered questions. *Blood*, v. 77, n.7, p.1405-1414, 1991.
- GIBBONS, R.J. et al. X-linked alpha thalassemia/mental retardation (ATR-X) syndrome: localization to Xq12-q21.31 by X inactivation and linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.*, v.51, p.1136-1149, 1992.
- GOLDFARB, A. et al. High incidence of cholelithiasis in older patients with homozygous beta thalassemia. *Acta Haematol.*, v.83, p.120-122, 1990.
- GOMES, C.T., NAOUM, P.C., ANGULO, I.L. Talassemia alfa adquirida nas doenças linfó e mieloproliferativas. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, v.24, n.3, p.98-101, 1988.
- GONÇALVES, M.S., RAMALHO, A.S. Frequency and glomerular or post-glomerular origin of hematuria in brazilian patients with sickle cell syndromes. *Rev. Bras. Genet.*, v.13, n.4, p. 841-848, 1990.
- GONZALES-REDONDO, J.M. et al. Clinical and genetic heterogeneity in black patients with homozygous beta thalassemia from the southeastern United States. *Blood*, v.72, n.3, p.1007-1014, 1988.
- HIGGS, D.R. et al. A review of the molecular genetics of the human alpha globin gene cluster. *Blood*, v.73, n.5, p.1081-1104, 1989.



- HONIG, G.R., ADAMS III, J.G.. *Human hemoglobin genetics*. NewYork: Springer, 1986. 236 p.
- HSIA, Y.E. et al. The different types of alpha thalassemia: pratical and genetical aspects. *Hemoglobin*, v.12, p.465-484, 1988.
- HUANG, S.Z. et al. Diagnosis of thalassemia using cDNA amplifucaion of circulating erythroid cell MRNA with the polymerase chain reaction. *Blood*, v.78, n.9, p.2433-2437, 1991.
- HUISMAN, T.H.J. Beta thalassemia repository. *Hemoglobin*, v.14, n.6, p.661-675, 1990.
- HUISMAN, T.H.J. The beta and delta thalassemia repository. *Hemoglobin*, v.16, n.4, p.237-258, 1992.
- HUTZ, M.H., SALZANO, F.M., ADAMS, J. Hb F levels, longevity of homozygotes and clinical course of sickle cell anemia in Brazil. *Am. J. Med. Genet.*, v.14, p.669-676, 1983.
- IHC (International Hemoglobin Information Center). Alphabetical list of variants hemoglobin. *Hemoglobin*, v.20, n.3, p.313-335, 1996.
- ISAACS, A. The influence of malaria and the Hb S gene on Hb A2 synthesis. *Clin. Chim. Acta*, v.36, p.27-31, 1972.
- JANKOVIC, L. et al. Mutation at (DS 82123 C-G) observed in a Yugoslavian family with a heterozygosity for beta thalassemia. *Hemoglobin*, v.16, n.4, p.291-294. 1992.
- KAN, Y.W., DOZZY, A. M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human geta globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.75, p.5631-5635, 1978.
- KATTAMIS, C. et al. Correlation of clinical phenotype to genotype in haemoglobin A disease. *Lancet*, v.27, p.442-444, 1988.



- KAZAZIAN, H.H., Jr. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin. Hematol.*, v.27, n.3, p.209-228, 1990.
- KAZAZIAN, H.H., Jr. et al. Dominant thalassemia like phenotypes associated with mutations in Exon 3 of the beta globin gene. *Blood*, v.79, n.11, p.3014-3018, 1992.
- KLEIHAUER, E. Determination of fetal hemoglobin: Elution technique. In: Standardization of laboratory reagents and methods for the detection of hemoglobinopathies. Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, 1974.
- KOO, M.S. et al. Beta thalassemia mutation found in Korea. *Hemoglobin*, v.14, n.4, p.313-320, 1992.
- LABIE, L. La commutation (switch) perinatale de l'hémoglobine. *Med. Sci.* v.6, p.572-573, 1990.
- LANCOS, K.D., et al. Sequence variations in the 5' flanking and IVS-II regions of the gamma G and gamma A globin genes of the beta S chromosomes with five different haplotypes. *Blood*, v.77, n.11, p.2488-2496, 1991.
- LAROS, R.K., Jr. FACOG, J., KALSTONE, C.E. Sick cell beta thalassemia and pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, v.37, n.1, p.71-76, 1971.
- LAWRENCE, C, FABRY, M.E., NAGE., R.L. The unique red cell heterogeneity of SC disease: crystal formation dense reticulocytes, and unusual morphology. *Blood*, v.78, n.8, p.2104-2112, 1991.
- LEHMANN, H, HUNTSMAN, R.G. *Man's haemoglobin*. Amsterdam: North Holland, 1974, 478 p.



LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX. M.M. A estrutura tridimensional das proteínas. In: --- *Princípios de bioquímica*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995, p.118-146.

LEWIS, D., STOCHKLEY, R.J., CHANARIN, I. Changes in the mean corpuscular red cell volume in women with beta thalassemia trait during pregnancy. *Br. J. Haematol.*, v.50, p.423-425, 1982.

LIEBHABER, S.A., Alpha thalassemia: invited review. *Hemoglobin*, v.13, p.685-713, 1989.

LIMA, J.C.S. *Interação de anemia falciforme e alfa talassemia: aspectos moleculares, clínicos, hematológicos e bioquímicos, um estudo na população brasileira*. Rio de Janeiro, 1997. 166p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, modalidade médica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LOADER, S.et al. Prenatal screening for hemoglobinopathies. I. evaluation of counseling. *Am. J. Hum. Genet.*, v.48, n.3, p.447-451, 1991

LONG, J.C. et al. Phylogeny of human beta globin haplotypes and its implications for recent human evolution. *Am. J. Phys. Anthropol.*, v.81, p.113-130, 1990.

MAIER-RIDELSPERGER, M., et al. Variation in fetal hemoglobin parameters and predicted hemoglobin S polymerization in sickle cell children in the first two years of life: parisian prospective study on Sickle Cell Disease. *Blood*, v.84, n.9, p.3182-3188, 1994.

MAGRO, S. et al. Hypothyroidism in patients with thalassemia syndrome. *Acta Haematol.*, v.84, p.72-76, 1990.

MARENGO-ROWE, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. *J. Clin. Pathol.*, v.18, p. 790-792, 1965.



MATHEWS, C.K. and van HOLDE, K.E. . Biochemistry. Benjamin.Cummings Publishig, 1990.

MEDEIROS, T.M.D., BEZERRA,F.L., GOUVEIA, J.B.B. Tipos de hemoglobinas em escolares da cidade de Natal, RN. *Rev. Bras. Anal. Clin.* v.24, p.79-80,1992.

MELIS, M.A. et al. Phenotypic effect of heterozygous and beta⁰-thalassemia interation. *Blood*, v.62, p.226-229, 1983.

MONTEIRO-MARINHO, H. Hemoglobinopatia S. Doença eritrofalcêmica. Rio de Janeiro: Secretaria da Saúde. Centro de Estudos, Treinamento e Aperfeiçoamento, 1970. (Publicações Técnicas)

MYIOSHI, K., et al. X-linked dominant control of F cells in normal adult life: characterization of the Swiss type as hereditary persistence of fetal hemoglobin regulates dominantly by gene(s) on S chromosome. *Blood*, v.72, n.6, p.1854-1860, 1988

NAGEL, R.L., RANNEY, H.M. Genetic epidemiology of structural mutations of the beta globin genes. *Semin. Hematol.*, v.27, n.4, p.342-359, 1990.

NAGEL, R.L. et al. The Senegal DNA haplotype is associated with the amelioration of anemia in African American sickle cell anemia patients. *Blood*, v.77, n.6, p.1371-1375, 1991.

NAOUM, P.C. et al. Concentration of haemoglobin A2 and Fetal in Brazilian Indians relationship between these haemoglobins an malaria. *Ciênc. Cult.*, v.31, n.2, p.188-190, 1979.

NAOUM, P.C., CURY, P.R.. Hemoglobinopatias no Estado de São Paulo: Distribuição geográfica e polimorfismos. *Bol. Sanit. Panam.*, v.101, p.88-95, 1983.

NAOUM, P.C., et al. Hemoglobinas anormais em uma população do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, v.19, n.3, p.86-89, 1983.



- NAOUM, P.C., MATTOS, L.C., CURY, P.R. Prevalence and distribution of abnormal hemoglobins in state of Sao Paulo, Brazil. *Bull. Pan Am. Health Organ.*, v.18, p.127-138, 1984.
- NAOUM, P.C. *Diagnóstico das hemoglobinopatias*. São Paulo, Sarvier, 1987. 212p.
- NAOUM, P.C. *Eletroforese, técnicas e diagnósticos*. São Paulo, Santos, 1990. 174p.
- NAOUM, P.C. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. *Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemot.*, v.18, p.75-81, 1996.
- NAOUM, P.C. *Hemoglobinopatias e talassemias*. São Paulo, Sarvier, 1997. 168p.
- NAOUM, P.C. *Hemograma. Análise e interpretação*. São Paulo, UNESP, 1998. 155p. (Comunicação Pessoal).
- NIENHUIS, A.W., ANAGNOU, N.P., LEY, T.J. Advances in the thalassemia research. *Blood*, v.63, n.4, p.738-758, 1984.
- ORKIN, S.T., KAZAZIAN, H.H. The mutation and polymorphism of the human beta globin gene and its surrounding DNA. *Ann. Rev. Genet.*, v.18, p.131-171, 1984.
- OTTOLENGHI, S. et al. Regulation of gama globin expression in hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.612, p.191-195, 1990.
- PAPAYANNOPUOLOS, R., STAMATAYANNOPOULOS, G. Stains for inclusions bodies. In: *Standartizations of laboratory reagents and methods for detection of haemoglobinopathies*. Hew publications, (CDC) Atlanta, Georgia, 1974.



PENCHSZADEH, V. Genetics services for hemoglobinopathies in Latin-America. Joint W.H.O. In: MEETING ON PREVENTION AND CONTROL OF HEMOGLOBINOPATHIES, 1993, Nicosia, Cyprus, p. 3-7.

PERUTZ, M.F. Structure and mechanism of hemoglobin. *British Medical Bulletin*, v.32, n.2, p.195-208, 1970.

POWARS, D.R., et al. Pregnancy in sickle cell disease. *Obstetrics and Gynecol.*, v.67, n.2, p.217-228, 1986.

POWARS, D.R. Sickle cell anemia and major organ failure. *Hemoglobin*, v.14, n.6, p.573-598, 1990.

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

RIEDER, R.F. et al. Effect of β -globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. *Am. J. Hematol.*, v.36, p.184-189, 1991.

RODGERS, G.P., et al. Hemoglobin SC disease and alpha thalassemia. *Am. J. Med.*, v.180, p.746-750, 1986.

ROSA, J. et al. Testing for hemoglobins with abnormal oxygen affinity curves. In: *Abnormal haemoglobins and thalassaemia: diagnostic aspects*. Academic Press. 1975.

ROWLEY, P.T. et al. Prenatal screening for hemoglobinopathies. I. A prospective regional trial. *Am. J. Hum. Genet.*, v.48, n.3, p.439-446, 1991.

RUCKNAGEL, D.L., et al. Polymorphism in the number of hemoglobin alpha-chain loci and mechanisms governing the balance of chain synthesis. In: BEWER, G.J. (Ed.). *The red cell*. New York, Liss, 1978. p.63.



- RUIZ, M.A., GUERRA, C.C.C., NAOUM, P.C. Detecção de hemoglobinas anormais em sangue de cordão de recém-nascidos na cidade de Santos, São Paulo, através de eletroforese em gel de agar-amido. *Boletim SBHH*, VII, v.137, p.8-13, 1986.
- RUND, D. et al. Mean corpuscular volume of heterozygotes for beta thalassemia correlates with the severity of mutations. *Blood*, v.79. n.1. p.238-243, 1992.
- SALZANO, F.M. A, Abnormal hemoglobins studied and counseling in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF SICKLE CELL DISEASE: A WORLD HEALTH PROBLEM, 1, 1979, Washington. Proceedings of the first international conference of sickle cell disease. Washington: Howard University, 1979.
- SALZANO, F.M., TONDO, C.V. Hemoglobin types in Brazilian population. *Hemoglobin*, v. 6, p. 85-97, 1982.
- SCHNEIDER, R.G. Differentiation of electrophoretically hemoglobins - such as S, D, G and P or A2, C, E and O - by electrophoresis of the globin chains. *Clinical Chemistry*, v.20, p.1111-1115, 1974.
- SCHRIER, S.L., MOHANDAS, N. Globin chain specificity of oxidations induced changes in red blood cell membrane properties. *Blood*, v.79, n.6, p.1586-1592, 1992.
- SCHWARTZ, E., COHEN, A., SURREY, S. Overview of the beta thalassemias: genetic and clinical aspects. *Hemoglobin*, v.12, p.551-564, 1988.
- SHIMIZU, K. et al. Elevated haemoglobin F in juvenile and adult chronic myelogenous leukaemia. *Acta Haematol.* v.80, p.28-33, 1988.
- SILVA, A. E., VARELLA-GARCIA, M. Plasma folate and vitamin B12 levels in beta thalassemia heterozygotes. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.22, p.1225-1228, 1989.



SILVESTRONE, E. , BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. *Am. J. Hum. Genetic*, v. 27, n.2, p. 198, 1975.

SONATI, M.F. et al. High prevalence of alpha thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin*, v.15, n.4, p.309-311, 1991.

SONATI, E. et al, Hereditary hemoglobinopathies in a population from Southeast Brazil. *Hemoglobin*, v.20, n.2, p.175-179, 1996.

SPRITZ, R.A., FORGET, B.G. The thalassemias: molecular mechanisms of the human genetic disease. *Am. J. Hum. Genet.*, v.35, p.333-361, 1983.

STEIMBERG, M.H., EMBURY, S.H. Alpha thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood*, v.68, n.5, p.985-990, 1986.

STEIMBERG, M.H. Review: thalassemia - molecular pathology and manageament. *Am. J. Med. Sci.*, v.296, n.5, p.308-321, 1988.

STEIMBERG, M.H. The interaction of alpha thalassemia with hemoglobinopathies. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, v.5, n.3, p.453-473. 1991.

STEIMBERG, M.H, ADAMS III, J.G.. Hemoglobin A₂: origin, evolution and aftermath. *Blood*, v.78, n.9, p.2165-2177. 1991.

SULLIVAN, L.W. The riscs of sickle cell trait. *New England J. Med.*, v.24, p.830-831, 1987.

TAVARES NETO, J. A hemoglobinopatia S: um problema de saúde pública e ocupacional. *Bol. Sanit. Panam.*, v.90, n.3, p.229-238, 1981.



- TEIXEIRA, R.C., RAMALHO, A.S. Genetics and public health: response of a Brazilian population to a optional hemoglobinopathy program. *Rev. Bras. Genet.*, v. 17, n. 4, p. 435-438, 1994.
- THEIN, S.L. Dominant beta thalassemia molecular basis and pathophysiology. *Br. J. Haematol.*, v.80, p.273-277, 1992.
- THOMPSON, M.W., McINNES, R.R., WILLARD, H.F. As hemoglobinopatias: Modelos de doença molecular. In: --- Thompson & Thompson genética Médica. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c.. cap.11, p.167-185.
- TRIFILLIS, P. et al. Identifications of four novel delta globin gene mutations in Greek Cypriots using polymerase chain reaction and automated fluorescent based DNA sequence analysis. *Blood*, v.78, n.12, p.2398-3305, 1991.
- VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. *Am. J. Clin. Path.*, v.49, p.440, 1968.
- VULLO, C., LUCCI, M., TOFFOLI, C. La prevenzione dell'omozigosi beta talassemia. *Recent. Progr. Med.*, v.83, n.1, p.47-55, 1992.
- WAGNER, G.M., SCHWARTZ, R.S., CHUI, D.T.Y. Membrane phospholipid organization and vesiculations of erythrocytes in sickle cell anemia. *Clin. Haematol.*, v.14, p.183-200, 1985.
- WASI, P. et al. Thalassemia in the southeast Asia: determination of different degree of severity of anemia in thalassemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.445, p.119-126, 1985.
- WAYE, J.S., ENG, B., CHUI, D.H.K. Identification of an extensive alpha globin gene deletion in a Chinese individual. *Br. J. Haematol.*, v.80, p.378-380, 1992.



WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B. The thalassemia syndromes. 3. ed. New York : Blackwell, 1981. 875p.

WEATHERALL, D.J. The thalassemias. In: WILLIAMS, W.J., BEUTLER, E., ERSLEV, A.J., LICHTMAN, M.A. (Ed.) *Hematology*. New York: Mac Graw Hill, 1983. p. 493-521.

WEATHERALL, D.J. WAINSCOT, J.S. The molecular pathology of thalassemia. In: HOFFBRAND, A.V. eds. *Recent Advances in Haematology*. Oxford, England. Churchill Livingstone, p.63-88, 1985.

WEN, X.J., LIANG, S. Mild Hb Constant Spring Hb H disease with beta° thalassemia trait. *Hemoglobin*, v.16, n.4, p.321-323, 1992.

WHIPPLE, G.H. et al. Mediterranean disease thalassemia (erythroblastic anemia of Cooley). *J. Pediatr.*, v.9, p.279-280, 1936.

W.H.O. WORKING GROUP. Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, diagnosis and treatment. *Bull. W.H.O.*, v.60, n.5, p.643-661, 1982.

W.H.O. Memorandum from a W.H.O. meeting.. *Bull: W. H. O.*, v. 61, p. 63-80, 1983.

WILLIAMS, W.J. et al. *Hematologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. 1160p.

WILLIAMS, W.J. et al The sickle cell diseases and related disorders. In: *Hematology*. 3.ed. New York: Mc Graw Hill, 1983, p. 583-609.

ZAGO, M.A., et al. Hereditary hemoglobins disorders in a brazilian population. *Human. Hered.* v.33, p.125-129, 1983.

ZAGO, M. A., COSTA, F.F. Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 79, p. 385-388, 1985.



ZAGO, M. A. Origem e heterogeneidade da anemia falciforme. *Boletim*, v.15, n.162, p.3-8, 1993.

ZAR. J.H. Biostatistical analysis, 2^a ed. Prentice Hall, New Jersey, 1984.

ZURLO, M.G. et al. Survival and causes of death in thalassemia major. *Lancet*, p.27-29, 1989.



ANEXOS



São José do Rio Preto, 05 de fevereiro de 1996.

Doutor (a):

Temos satisfação de comunicar a V.S. a realização do programa de apoio a gestante concernente à prevenção de anemia hereditária. Esse programa será desenvolvido à partir de fevereiro, com a participação de três instituições: a UNESP, o Instituto Adolfo Lutz e o CDA laboratórios. Os exames serão gratuitos, e a escolha do local de coleta de sangue e análises ficará por livre opção da gestante.

Solicitamos a V.S. a colaboração para este programa que tem o apoio do Ministério de Saúde e da Organização Mundial de Saúde.

Informações adicionais poderão ser encontradas nas folhas anexas.

Colocamo-nos a sua disposição para os esclarecimentos necessários e apresentamos os nossos mais elevados votos de estima e consideração.



Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum
Coordenador do Programa

"RELEASE" PARA DIVULGAÇÃO DE INTERESSE PÚBLICO

PROGRAMA DE APOIO À GESTANTE

Prevenção da anemia hereditária

A partir de fevereiro o IBILCE, o Instituto Adolfo Lutz e o CDA Laboratórios, de São José do Rio Preto, estarão promovendo a realização de exames **gratuitos** para detecção de anemias hereditárias em gestantes de Rio Preto e região. O programa visa a prevenção da anemia hereditária, a orientação dos cuidados básicos para os portadores, e o encaminhamento correto dos casos que merecem atenção médica.

O programa, que tem o apoio do Ministério da Saúde e da Secretaria Municipal de Saúde de São José do Rio Preto, prevê a realização de mil testes até o final do primeiro semestre deste ano. Os resultados de cada análise serão enviados às gestantes. Em caso de positividade para anemia hereditária, serão efetuadas análises **gratuitas** nos membros da família da gestante.

Locais de coleta e realização de análises:

IBILCE/UNESP: Centro de Referência de Hemoglobinas, fone: 224-4966

R. 260. Dias de coleta 3ª e 5ª feiras das 8:00 às 11:00 hs, à Rua: Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazaré.

ERSA: Diariamente das 8:00 às 10:00 hs. Fone: 224-2602, à Rua: Alberto Sufredini, 2325.

CDA Laboratórios: Diariamente das 8:00 às 12:00 hs. Fone: 227-7058, à Av: Brigadeiro Faria Lima. 5332.

Coordenação:

Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum

Drª. Cláudia Regina Bonini Domingos

Drª. Regina Alexandre Pagliusi

Bióloga: Lígia Márcia da Silveira Viana



"RELEASE" PARA DIVULGAÇÃO DE INTERESSE PÚBLICO

O QUE É ANEMIA HEREDITÁRIA

Anemia hereditária é um tipo de anemia que é transmitida de pais para filhos. Esse tipo de anemia pode passar por muitas gerações. A anemia hereditária se manifesta de duas formas básicas: a imperceptível e a perceptível.

A forma imperceptível é caracterizada por anemia de grau muito leve, e somente é identificada por métodos laboratoriais muito específicos.

A forma perceptível, tem anemia grave e é facilmente percebida devido à palidez acentuada, muita fraqueza, mal estar geral, e icterícia em alguns casos.

Um em cada trinta brasileiros é portador da forma imperceptível, enquanto um em cada cinco mil é portador da forma grave.

A possibilidade de transmissão de anemia hereditária pela mãe com anemia imperceptível é de 50%. Se o casal, pai e mãe, têm as formas imperceptíveis, existe a chance de gerar filhos com a forma grave.

CENTRO DE REFERÊNCIA DE HEMOGLOBINAS
IBILCE/UNESP
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP

PROGRAMA DE APOIO À GESTANTE

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

NOME: _____

IDADE: _____ SEXO: _____ DESCENDÊNCIA: () CAUCASÓIDE () NEGRÓIDE

ENCAMINHADO POR: _____

DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Hb: _____ Ht: _____ GV: _____ RETICULÓCITOS: _____ OUTROS: _____

FERRITINA: _____ FERRO SÉRICO: _____ OBS: _____

INFORMAÇÕES GERAIS:

É a primeira gravidez? Sim () , Não () Quantos filhos? _____ Teve algum aborto? _____

Esta com quantos meses de gravidez? _____ Expectativa da data de nascimento: _____

Tem anemia? Sim () , Não () Há quanto tempo? _____

RENDIA FAMILIAR: (salários mínimos) 1 a 5 () ; 6 a 10 () ; acima de 10 ()

ESCOLARIDADE: Primeiro grau () ; Segundo Grau () ; Superior ()

PESQUISA DE HEMOGLOBINAS:

TESTE	REFERÊNCIA NORMAL
Eletroforese alcalina	AA
Eletroforese acida	AA
Morfologia Eritrocitária	Normocitose
Resistência Globular(0,36%)	Negativo
Dosagem de Hb Fetal	0 a 1,2%
Dosagem de Hb A2	2,5 a 3,9%
Pesquisa de Hb H	Ausente
CONCLUSÃO:	

ESTUDO FAMILIAR:

ESPOSO:

FILHOS:

RECÉM-NASCIDO:

HEMOGLOBINA C

Prezada Gestante:

Venho por meio desta informá-la que, durante as análises efetuadas em seu sangue, observamos um tipo de anemia hereditária, ou seja, uma forma de anemia que a pessoa tem mas não percebe. A anemia que identificamos em você é conhecida por Hemoglobina C.

Essa anemia não é observada em exame de sangue (hemograma). Somente com métodos especiais é possível identificá-la.

A pessoa que tem essa anemia é normal. Não afeta o desenvolvimento físico, nem o mental ou sexual. Não há nenhuma proibição à prática de esportes, alimentação ou medicamentos para quem tem este tipo de anemia. O importante é que seu companheiro e filhos façam também este exame, para saber se também são portadores de anemia hereditária, pois existe a possibilidade de que seus filhos tenham uma anemia grave, caso seu companheiro também tenha anemia hereditária.

Favor comparecer para maiores esclarecimentos no endereço abaixo de 2ª à 6ª feira das 8:00 às 17:00. E se possível traga seu companheiro e filhos para a realização do exame gratuitamente

CENTRO DE REFERÊNCIA DE HEMOGLOBINAS

UNESP - São José do Rio Preto

Rua Cristóvão Colombo, 2265

CEP: 15054-000 Fone: 2212392



FALCEMIA HETEROZIGOTA

A Falcemia Heterozigota é o nome dado a um tipo de anemia hereditária imperceptível presente numa pessoa aparentemente sã.

Essa pessoa é, portanto, um portador assintomático (não doente) de uma alteração na hemoglobina, que é uma proteína que se encontra no interior dos glóbulos vermelhos.

A pessoa que tem a Falcemia Heterozigota é normal, com resultados quantitativos de glóbulos vermelhos e de hemoglobina dentro dos padrões de normalidade.

O portador de falcemia heterozigota não deve, entretanto, fazer uso de drogas ou medicamentos que "queimam oxigênio", por exemplo: inalação de éter, lança-perfume e anestesia geral sem oxigenação suplementar. Também os exercícios físicos muito intensos devem ser evitados, pois "queimam o oxigênio" com extrema rapidez. Da mesma forma, devem ser evitados o mergulho prolongado e a prática de natação em águas muito frias.

Todos esses cuidados estão relacionados com a diminuição de oxigênio, pois quando falta quantidade suficiente deste gás em pessoa que tem Falcemia Heterozigota, os glóbulos vermelhos se deformam, mudando sua forma globular para a de "foice" ou "meia-lua", daí o nome falciforme. Com a forma alterada, os glóbulos vermelhos além de não desempenhar com eficiência a sua função, que é o transporte de oxigênio, provocam, também, alteração na circulação do sangue. É necessário dizer que esses efeitos são muito discretos no portador de Falcemia Heterozigota, mas podem se tornar perigosos se a "queima de oxigênio" ocorrer por longo período (anestesia geral sem suplementação de oxigênio) ou se ocorrer de forma aguda (cheiro de éter ou lança-perfume).

Outro fato muito importante é o seguinte: quando você for se casar ou optar por ter filhos, há necessidade que seu noivo ou noiva faça o exame para saber se ele ou ela é portador de anemia hereditária imperceptível. No caso dos dois terem esse tipo de anemia, existe a possibilidade de nascer uma criança que poderá receber as partes anêmicas do pai e da mãe e assim aparecerá uma anemia muito grave.

A identificação de Falcemia Heterozigota é realizada por meio de análises laboratoriais específicas.

Para um melhor esclarecimento procure um serviço médico especializado, que lhe dará informações mais detalhadas.

Serviço de Atenção ao Portador de Anemia
Hereditária

CENTRO DE REFERÊNCIA DE HEMOGLOBINAS

UNESP - SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Rua Cristóvão Colombo 2265

CEP: 15054-000 Tel (0172) 244966 Ramal 74

São José do Rio Preto-SP



TALASSEMIA HETEROZIGOTA OU TALASSEMIA MENOR

A Talassemia Heterozigota, ou Talassemia Menor, é o nome dado a um tipo de anemia hereditária presente numa pessoa aparentemente sadia. Essa pessoa, é portanto, um portador assintomático (não doente) de uma alteração da hemoglobina, que é uma proteína que se encontra no interior dos glóbulos vermelhos.

Nessa alteração, o portador de Talassemia Heterozigota tem seus glóbulos vermelhos com o tamanho diminuído, em relação a outra pessoa sem talassemia. A diminuição do tamanho dos glóbulos vermelhos reduz a quantidade de hemoglobina dentro dessas células no sangue. Como se sabe, todo oxigênio que respiramos é transportado pela hemoglobina e distribuído por todo o organismo. O oxigênio é nossa principal fonte de energia. Assim, quando ocorre diminuição da quantidade de hemoglobina - e na Talassemia Heterozigota esse fato acontece de forma discreta - o oxigênio transportado também diminui. Sendo o oxigênio a principal fonte de energia, sua diminuição embora pequena nesse caso, pode causar periodicamente cansaço, dores musculares nas pernas e palidez discreta.

A Talassemia Heterozigota pode provocar discreto grau de anemia, entretanto, sua identificação somente é feita por análises laboratoriais específicas.

A pessoa que é portadora de Talassemia Heterozigota tem um desenvolvimento físico, sexual e intelectual normal. O maior cuidado porém, é quando se decide ter filhos. Nesse caso é de fundamental importância que o seu parceiro faça esse exame para saber se é portador de anemia hereditária imperceptível. No caso dos dois terem anemia hereditária imperceptível existe a possibilidade de gerar uma criança que poderá receber as partes alteradas do pai e da mãe, provocando uma anemia muito grave.

Para melhor esclarecimento procure um serviço médico especializado, que lhe dará explicações detalhadas.

O seu tipo de Talassemia Heterozigota identificado em nosso laboratório é: _____

Serviço de Atenção ao Portador de Anemia
Hereditária

CENTRO DE REFERÊNCIA DE HEMOGLOBINAS

UNESP - SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Rua Cristóvão Colombo 2265

CEP:15054-000 Tel (0172)244966 Ramal 74





unesp