

Claudia R. Bonini Domingos

**Prevalência de Hemoglobinas Anormais,
Fenótipos de Haptoglobinas e Quantificação
de Hemoglobinas A² e Fetal em Portadores
da Doença de Chagas**



"PREVALENCIA DE HEMOGLOBINAS ANORMAIS, FENOTIPOS DE HAPTOGLOBINAS
E QUANTIFICAÇÃO DE HEMOGLOBINAS A₂ E FETAL EM PORTADORES
DA DOENÇA DE CHAGAS"

Claudia R. Bonini Domingos

Dissertação apresentada para a
obtenção do grau de mestre em
Genética no Curso de Pós-Gradua-
ção em Ciências Biológicas, Área
de Concentração em Genética, do
Instituto de Biociências, Letras
e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mes-
quita Filho" - Campus de São José
do Rio Preto - S.P.

São José do Rio Preto

1990



T-446/90



Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum
Professor Titular do Departamento de
Biologia, da Universidade Estadual
Paulista, Campus de São José do Rio
Preto, S.P.



Dedico este trabalho

Aos meus pais, Waldemar e Nadir e aos meus irmãos, Claudio e Cristina, exemplos de dedicação, amor e carinho.

Ao Luis Henrique companheiro inseparável de todos os momentos.

A Ana Carolina, fruto de um grande amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum pela orientação, amizade e incentivo.

Aos Professores do Departamento de Biologia pelos ensinamentos e amizade.

Aos Professores Dra. Adelina Buzini da Costa Silva e Dr. João Batista Arantes pelas valiosas sugestões durante a análise da Proforma.

Ao Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira pela amizade, apoio e auxílio na realização da técnica de Haptoglobinas, na Faculdade de Farmácia - UNESP - Araraquara, S.P.

A Margarida Georgina Bassi do Laboratório de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz - Regional de São José do Rio Preto pela realização dos testes para doença de Chagas.

A Cleuzenir Toschi Gomes, do Centro Diagnóstico de Anemias de São José do Rio Preto pela realização da Hematimetria.

Ao Prof. Antonio José Manzato pela assessoria estatística.

Ao Prof. Dr. James Robert Coleman pela colaboração na redação do Summary.

Ao Dr. Reginaldo Gama pelo auxílio na obtenção das amostras junto ao Hospital de Base de São José do Rio Preto.

Aos colegas Sheila Adami Vayego, Rubiani de Cássia Pagotto e Willian Deodato Izique, estagiários do Centro de Referência de Hemoglobinas pela amizade e auxílio na coleta de material e análises laboratoriais.



Aos demais estagiários do Centro de Referência de Hemoglobinas pela constante colaboração.

Ao Prof. Dr. Firmino Alvarez Filho, grande amigo, pelo apoio sempre presente.

Ao colega Marcelo Ferreira Lourenço, amigo e incentivador, pela digitação e impressão deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pela convivência sempre agradável.

Aos funcionários do IBILCE pela constante colaboração.

Aos Professores Dr. Antonio Espada Filho e Dr. Samir Felício Barcha da Direção do IBILCE - UNESP, pelo empenho na obtenção de recursos para a impressão desta Dissertação.

A Maria Aparecida Azevedo de Marchi pelo auxílio na encadernação deste trabalho.

Aos pacientes que fazem parte desta amostragem sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

INDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Hemoglobinas.....	1
I.1.1. Estrutura, função e ontogenia das hemoglobinas humanas normais.....	1
I.1.2. Hemoglobinopatias e talassemias.....	2
I.1.3. A hemoglobina A ₂	12
I.1.4. A hemoglobina Fetal.....	14
I.1.5. Distribuição geográfica das hemoglobinopatias e talassemias.....	15
I.1.6. Hemoglobinas anormais e doenças.....	17
I.2. As haptoglobinas.....	18
I.2.1. Estrutura e função.....	18
I.2.2. Genética e metabolismo das haptoglobinas.....	19
I.2.3. Distribuição geográfica e correlação com pato- logias.....	22
I.3. Doença de Chagas.....	23
I.3.1. Introdução.....	23
I.3.2. Agente etiológico.....	24
I.3.3. Vetor.....	26
I.3.4. Mecanismos de transmissão.....	27
I.3.5. Evolução da doença.....	31
I.3.6. Diagnóstico e Achados Imunológicos.....	34
I.3.7. Epidemiologia e controle da Doença.....	38
I.4. Marcadores Genéticos e Doenças.....	45
II. OBJETIVOS.....	47
III. MATERIAL E METODOS.....	48
III.1. Material.....	48
III.2. Coleta.....	49
III.3. Métodos.....	49
A. Detecção de Doença de Chagas.....	49
A.1. Hemaglutinação Passiva.....	49
A.2. Reação de Imunofluorescência.....	52
A.3. Fixação de Complemento.....	53



B. Para Diagnosticar Hemoglobinas Anormais.....	56
B.1. Testes seletivos.....	56
B.1.1. Resistência globular osmótica.....	56
B.1.2. Eletroforese em Agar-Amido.....	57
B.1.3. Análise da Morfologia Eritrocitária.....	59
B.2. Testes Específicos.....	59
B.2.1. Eletroforese em Acetato de Celulose.....	59
B.2.2. Eletroforese quantitativa em Acetato de Celulose.....	62
B.2.3. Eletroforese de diferenciação em Agar-Fosfato.....	63
B.2.4. Dosagem de Hemoglobina Fetal.....	64
B.2.5. Dosagem de Hemoglobina A ₂ por Microcromatografia em Coluna.....	66
B.2.6. Pesquisa de Agregados de Hemoglobina H.....	68
C. Para Caracterização de Fenótipos de Haptoglobinas.....	69
C.1. Eletroforese em gel de amido.....	69
D. Hematimetria.....	72
D.1. Contagem de eritrócitos.....	72
D.2. Dosagem de hemoglobina.....	72
D.3. Hematócrito.....	73
D.4. Índices hematimétricos.....	73
IV. RESULTADOS.....	74
V. DISCUSSÃO.....	116
VI. RESUMO.....	121
VII. CONCLUSÕES.....	123
VIII. SUMMARY.....	126
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hemoglobinas

1.1.1. Estrutura, função e determinação das hemoglobinas humanas normais

Em meados de agosto de 1986 recebemos para análise de hemoglobinopatias uma amostra de sangue que revelou o aumento da concentração da HbA_2 sem, entretanto, apresentar nenhum indicio de talassemia beta heterozigota - a principal causa de elevação desta fração hemoglobínica. Ao solicitarmos a presença da pessoa analisada, verificamos que a mesma era portadora de doença de Chagas. Este fato nos despertou interesse para realizarmos semelhante teste em outros chagásicos. Os resultados seguintes vieram comprovar que uma porcentagem apreciável de chagásicos apresentava níveis de HbA_2 aumentados. A partir desta evidência inicial idealizamos um projeto de pesquisa que resultou no presente trabalho.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Hemoglobinas

I.1.1. Estrutura, função e ontogenia das hemoglobinas humanas normais.

A hemoglobina é uma proteína globular e oligomérica, presente nos eritrócitos de vertebrados, tendo como principal função o transporte de oxigênio para os tecidos. Quimicamente é composta por um pigmento, o grupo heme, e uma proteína, a globina. O heme é formado por um átomo de ferro situado no interior de uma estrutura porfirínica que o mantém no estado ferroso e lhe dá a cor vermelha, característica da hemoglobina. O transporte de oxigênio pela hemoglobina está baseado na capacidade dos seus átomos de ferro combinarem reversivelmente com o oxigênio molecular. Estruturalmente o grupo heme e o aminoácido ao qual o ferro está ligado são os mesmos em todos os tipos normais de hemoglobinas, mas suas afinidades ao oxigênio podem ser afetadas quando ocorrem contatos anormais entre as subunidades alfa e beta que constituem a molécula de hemoglobina (BELLINGHAM, 1976).

A globina é formada por dois pares de cadeias polipeptídicas que totalizam 574 aminoácidos (a.a.). Duas das cadeias que formam o tetrâmero, com 141 a.a. são denominadas de tipo alfa (α , ζ) e as outras duas com 146 a.a., conhecidas por tipo beta (β , γ , δ , ϵ). As combinações entre as cadeias do tipo alfa e do tipo beta resultam em moléculas de hemoglobinas distintas, e que são sintetizadas em diferentes fases do desenvolvimento humano (BAGLIONI, 1962; MANIATIS e cols., 1980).



Ontogeneticamente, na espécie humana, as primeiras moléculas de hemoglobinas embrionárias são produzidas nas ilhotas sanguíneas que se desenvolvem no saco vitelínico, precedendo o desenvolvimento da circulação sanguínea e estabelecendo as trocas gasosas que são realizadas através da placenta.

A síntese dos diferentes tipos de hemoglobinas: embrionárias, fetal e adultas, obedecem a um controle genético que envolve genes tipo alfa ativos, presentes no cromossomo 16, e genes tipo beta ativos, presentes no cromossomo 11. As hemoglobinas embrionárias são sintetizadas até atingirem o seu máximo, que acontece por volta da décima segunda semana do desenvolvimento intra-uterino (Figura 1a). Após este período não ocorre mais síntese de hemoglobinas embrionárias, sendo estas substituídas pela síntese de hemoglobina Fetal (HbF), após o terceiro mês de gestação, e que predomina entre 90 e 100% (Figura 1b).

A hemoglobina A (HbA) começa a ser sintetizada a partir da décima semana, mantendo-se em níveis não superiores a 10% até a trigésima semana. Ao nascimento, as hemoglobinas Fetal e A atingem 80% e 20% respectivamente, e a hemoglobina A₂ (HbA₂) atinge o seu nível ideal próximo ao nascimento. A partir do sexto mês após o nascimento as hemoglobinas A, F e A₂ chegam às suas concentrações normais (Figura 1c).

I.1.2. Hemoglobinopatias e talassemias

Anomalias genéticas podem afetar a síntese de uma ou mais cadeias globínicas. Pelo fato da HbA apresentar a maior concentração no adulto, mutações que afetem a produção, estrutura ou função das cadeias alfa e beta podem causar doenças com alterações fisiopatológicas importantes, e que são diferenciadas em duas categorias: as **hemoglobinas variantes**, onde proteínas anormais são produzidas pela substituição de um ou mais aminoácidos nas cadeias polipeptídicas; e as **talassemias**, em que a síntese de uma das cadeias é parcial ou está totalmente suprimida, sem que a estrutura seja afetada.

Estes dois grupos de alterações moleculares são causadas por mutações recessivas e são herdadas de acordo com as leis mendelianas. O indivíduo homozigoto apresenta o gene alterado em ambos cromossomos, e os heterozigotos, em apenas um dos cromossomos. Porta-

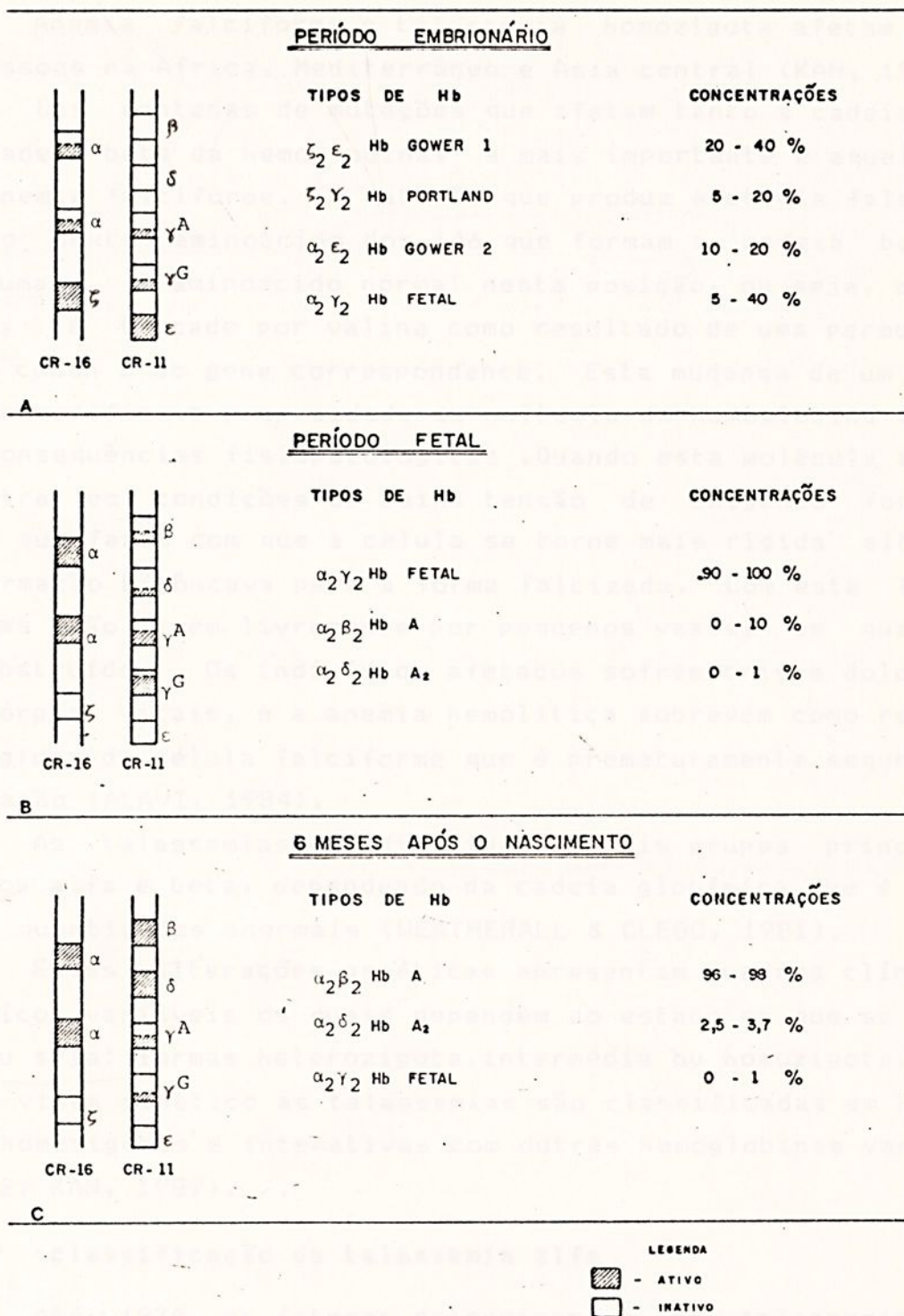


Figura 1. Formação das hemoglobinas humanas nos diferentes períodos do desenvolvimento.

dores heterozigotos não apresentam os sintomas da doença e são detectados por testes específicos.

Anemia falciforme e talassemia homozigota afetam milhares de pessoas na África, Mediterrâneo e Ásia central (KAN, 1989).

Das centenas de mutações que afetam tanto a cadeia alfa como a cadeia beta da hemoglobina, a mais importante é aquela que causa a anemia falciforme. A mutação que produz a célula falciforme ocorre no sexto aminoácido dos 146 que formam a cadeia beta da globina humana. O aminoácido normal nesta posição, ou seja, o ácido glutâmico, é trocado por valina como resultado de uma permuta de bases no codon 6 do gene correspondente. Esta mudança de um único aminoácido modifica a propriedade da molécula da hemoglobina e causa sérias consequências fisiopatológicas. Quando esta molécula anormal se encontra em condições de baixa tensão de oxigênio formam-se fibrilas que fazem com que a célula se torne mais rígida alterando sua conformação bicôncava para a forma falcizada. Com este formato as células não fluem livremente por pequenos vasos, os quais se tornam obstruídos. Os indivíduos afetados sofrem crises dolorosas, danos em órgãos vitais, e a anemia hemolítica sobrevém como resultado da rigidez da célula falciforme que é prematuramente sequestrada da circulação (ALAVI, 1984).

As talassemias são divididas em dois grupos principais, denominados alfa e beta, dependendo da cadeia globínica que é sintetizada em quantidades anormais (WEATHERALL & CLEGG, 1981).

Estas alterações genéticas apresentam quadros clínicos e hematológicos variáveis os quais dependem do estado em que se manifestam, ou seja: formas heterozigota, intermédia ou homozigota. Sob o ponto de vista genético as talassemias são classificadas em heterozigotas, homozigotas e interativas com outras hemoglobinas variantes (WHO, 1982; KAN, 1989).

-classificação da talassemia alfa

Até 1970 os fatores determinantes da talassemia alfa podiam ser definidos somente em termos de seus efeitos no quadro hematológico, (VCM- Volume Corpuscular Médio, HCM- Hemoglobina Corpuscular Média, taxa de síntese de cadeias alfa e beta). A partir desta data outras técnicas foram introduzidas, especialmente a síntese de globina, permitindo a diferenciação em portadores sãos de talassemia alfa, de doença de hemoglobina H, e com síndrome de

hidropsia fetal (Quadro 1). Hoje é possível oferecer uma classificação mais específica, já que alguns dos defeitos moleculares básicos foram identificados (Quadro 2).

A nomenclatura para as talassemias alfa que não permitem produção total de cadeia alfa pelos genes alfa são referidas como α^0 -talassemias, e aquelas nas quais a síntese é reduzida são denominadas por α^+ -talassemias, tornando a classificação das talassemias alfa semelhante à das talassemias beta. Tanto α^0 quanto α^+ talassemias poderão ser futuramente subdivididas dentro de tipos com deleção e não-deleção (WHO, 1987).

O haplótipo normal da globina alfa é representado por $\alpha\alpha$, sendo os genes α^2 e α^1 respectivamente. Um indivíduo normal tem o genótipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. Uma deleção envolvendo um ($-\alpha$) ou ambos ($--$) genes alfa pode ser identificada pelo tamanho do segmento envolvido assim $-\alpha^{3.7}$ indica uma deleção de 3,7 Kb de DNA incluindo o gene alfa. Quando o tamanho da deleção não está bem estabelecido, se utiliza da origem individual ou geográfica do portador. Assim $--_{med}$ define uma deleção que envolve os dois genes alfa, identificada inicialmente em indivíduos de origem Mediterrânea.

Haplótipos de talassemias alfa com os dois genes intactos são indicados por $\alpha\alpha^T$. Quando o defeito molecular é conhecido como no caso da Hb Constant Spring, a representação deve ser mais completa, (WHO, 1987).

Conclui-se então, que tanto mutações com deleção como as sem deleção causam alteração na expressão dos genes alfa da globina, e que são muito comuns. Deleções parecem ocorrer frequentemente por "crossing over" desigual. O triplo gene alfa não apresenta vantagem seletiva, e sua ocorrência relativamente frequente indica alta incidência de "crossing over" desigual entre os dois loci do gene alfa (WHO, 1987).

-classificação das talassemias beta

As talassemias beta são mais heterogêneas que as talassemias alfa. Muitas delas são hoje bem conhecidas a nível molecular e estão resumidas no Quadro 3.

De maneira geral são divididas em β^0 -talassemias, onde não há síntese de globina, e β^+ -talassemias, onde a produção de

Quadro 1. Característica dos principais tipos de talassemia alfa.

Fenótipo	No. de genes alfa funcionantes	níveis de Hb Bart ao nascimento (%)	Corpos de inclusão de Hb H (%)	VCM	HCM	Taxa de síntese de globina α/β	Haplótipos	genótipos mais freq.
NORMAL	4	0	NENHUM	85-100	~28	~1,0	α/α	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
α^+ TALASSEMIA (traço)	3	0 - 2	RAROS	75-85	~24	~0,8	α^+/α	$-\alpha/\alpha\alpha$
α^0 TALASSEMIA (traço)	2	2 - 8	OCASIONAL	65-75	~20	~0,6	α^0/α^+ α^+/α^+	$--/\alpha\alpha$ $\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$ $-\alpha/-\alpha$
DOENÇA DE Hb H	1	10-40	MUITOS	55-65	~20	~0,3	α^0/α^+ α^+/α^+	$--/-\alpha$ $\alpha\alpha^T/\alpha\alpha^T$ $--/\alpha\alpha^T$
HIDROPSIA FETAL	0	80	PRESENTES	110-120	reduzido	0,0	α^0/α^0	$--/--$ $--/\alpha\alpha^T$

Modificado de WHO - 1987

Quadro 2. Classificação molecular das talassemias alfa.

Classificação	Haplótipo	Heterozigoto
Normal	$\alpha \alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
α^0 Talassemias: sem produção de		
cadeias alfa	- -	--/ $\alpha\alpha$
- ambos os genes alfa		
deletados-7 tipos	- -	--/ $\alpha\alpha$
- somente um gene alfa		
deletado - 2 tipos	$-(\alpha)^{\frac{20.5}{3.7}}$	$-(\alpha)/\alpha\alpha$
α^+ talassemias: - síntese reduzida		
de produção	- α	$-\alpha/\alpha\alpha$
- por deleção: (1 gene alfa		
deletado)		
- alfa 1 deletado	$-\alpha^{4.2}$	$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$
- alfa híbrido	$-\alpha^{3.7}$	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
- outra	$-\alpha^{3.5}$	$-\alpha^{3.5}/\alpha\alpha$
- por não delegão		
- gene alfa intacto	$\alpha\alpha^T$	$\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$

Modificado de WHO, 1987

Quadro 3. Base molecular para as hemoglobinopatias beta melhor caracterizadas.

No.	Tipo de Talassemia ou Hb Anormal	Frequência	Base Molecular	IM
1	Persistência $\gamma^g \gamma^a$ tipo 1	raro	delegação de $\beta + \sigma + 4000$ pares de bases	+
	Hereditária $\gamma^g \gamma^a$ tipo 2	raro	delegação de $\beta + \sigma + 9000$ pares de bases	+
	de HbF (FHf) Hb Kenya	raro	fusão de γ^a com β	+
2	Talassemia $\gamma^g \gamma^a$	raro	delegação de $\beta + 1/2 \sigma$	+
	delta, beta σ^g	raro	delegação de genes $\beta, \sigma_e \gamma^a$	+
	σ^g	raro	inversão de γ por segmento de $\sigma + 2$ Delegões	+
3	Hb Lepore			
	Hollandia	raro	fusão 50 $\sigma \beta$	+
	Baltimore	raro	fusão 86 $\sigma \beta$	+
	Boston	raro	fusão 116 $\sigma \beta$	+
4	Talassemia			
	beta com A_2			
	normal,			
	branda	raro	não conhecida	-
5	Talassemia			
	beta com A_2			
	normal,			
	severa	raro	não conhecida	+
6	Talassemia β^0			
	branda Indiana	raro	delegação de 600 pares de bases no final do gene a 5'	
7	Talassemia β^0			
	branda Britânica	raro	atraso na iniciação da síntese de RNAm β -	
8	Talassemia β^0			
	severa Italiana	comum	liberação do sítio de "splice" ao final do grande intron	+

Quadro 3 (continuação). Base molecular para as hemoglobinopatias beta melhor caracterizadas.

No.	Tipo de Talassemia ou Hb Anormal	Frequência	Base Molecular	IM
9	Talassemia β^0			
	severa	Italiana, Gregas	comum β^{39} final da mutação (sem sentido)	+
10	Talassemia β^0			
	severa	Chineses "Sardinian"	comum β^{17} Lys final da mutação (sem sentido)	+
11	Talassemia β^0	comum na		
	severa	Ferrara	localidade atraso no fator de iniciação da proteína β	+
12	Talassemia β^0		Sítio de "splice" adicional gerado no pe-	
	severa	Mediterrânea	comum queno intron	+
13	Talassemia β^{++}	moderadamente		
	branda	Negro	comum Não conhecida	-
14	Hb E	comum na	26 β GLU - LYS	
		localidade	(+ mutação talassêmica)	+
15	Hb S	comum	6 β GLU - VAL	+
16	Hb C	comum na		
		localidade	6 β GLU - LYS	?

* I.M.: Identificação Molecular

Modificado de WHO (1987)

cadeias está reduzida. Alguns estudos definiram os sub grupos de talassemias β^0 e β^+ , onde o nível de hemoglobina A_2 é normal nos heterozigotos (KATTAMIS e cols., 1981). Existem também algumas formas raras de talassemias beta que só podem ser definidas em estudo familiar, ou populacional, devido a sua particularidade regional (WHO, 1982).

Geralmente o homozigoto, ou os portadores do estado heterozigoto das talassemias β^0 , e das formas graves de talassemia β^+ , apresentam anemia acentuada que os tornam dependentes de transfusão de sangue na primeira infância, mas alguns pacientes apresentam manifestações moderadas ou leves, sendo classificados clinicamente como portadores de talassemia intermédia.

A clássica talassemia beta maior (a talassemia homozigota) geralmente apresenta anemia grave nos primeiros anos de vida. As alterações decorrentes de uma talassemia beta maior se caracterizam por anemia com taxa de hemoglobina abaixo de 7,0g/dl, atraso no crescimento, anorexia, urina escura, sonolência, febre e vômito. A hepatoesplenomegalia pode ou não estar presente, mas geralmente aparece progressivamente. Há casos em que ocorrem alterações na medula óssea, fraturas patológicas e sobrecarga de ferro de origem gastrointestinal. A morte em crianças com 1 a 6 anos é geralmente devida a infecções ou insuficiência cardíaca. Os eritrócitos apresentam visível variação na forma e no tamanho, hipocromia, células nucleadas e reticulocitose.

O padrão de tipos de hemoglobinas no homozigoto β^0 consiste de predomínio de HbF (92-98%), HbA₂ em níveis reduzidos, normais ou elevados, e ausência de HbA. Para os homozigotos β^+ a concentração de HbA varia de 10-25% e a de HbF entre 70 e 95%; na forma β^{++} (negro) aparece anemia com valores de hemoglobina entre 7,0 e 11,0 g/dl, com 20-40% de HbF, HbA₂ em níveis normais ou discretamente aumentados e HbA 60-80%.

Os heterozigotos para talassemia beta são muito heterogêneos e a caracterização por um único método deve ser excluída. Entretanto, com raras exceções todos os heterozigotos apresentam as seguintes características: anemia de grau discreto que varia com o tipo do traço talassêmico; baixos índices hematimétricos, nos quais o HCM é o mais significativo (Quadro 4); alterações moderadas na morfologia eritrocitária, especialmente devido a eritrócitos microcíticos e hipocrômicos; aumento da resitência globular osmótica em

Quadro 4. Dados hematológicos da clássica talassemia beta heterozigota.

VCM	76 ± 6
HCM	22 ± 2
A ₂	5 ± 1
α / β	$>1,20$

solução NaCl a 0,36%, teste seletivo que é positivo em 97% dos casos de talassemia beta heterozigota (SILVESTRONI-BIANCO, 1975); outros valores adicionais, incluindo a biosíntese de globinas, poderão ser observados no Quadro 5.

I.1.3. A hemoglobina A₂

A hemoglobina A₂ (HbA₂) foi identificada em 1955 como um componente hemoglobínico normal que se apresentava em quantidades mínimas (KUNKEL & WALLENIUS, 1955). Atualmente sabe-se que esta hemoglobina é composta por um tetrâmero formado por duas cadeias alfa e duas cadeias delta ($\alpha_2 \delta_2$) e começa a ser sintetizada na espécie humana no período fetal, atingindo seu ápice próximo ao nascimento (WOOD e cols., 1978). Após o sexto mês de vida seus níveis se estabilizam entre 2,5 a 3,7%.

Nos casos de talassemia beta heterozigota, os aumentos de HbA₂ têm sido verificados em 93% dos portadores, cujas concentrações variam de 3,5 a 7,0% (WHO, 1982).

O decréscimo de HbA₂ é observado em algumas patologias como: anemia por deficiência crônica de ferro; leucemia; anemia aplástica devido à exposição crônica ao benzeno; em crianças com parasitemia frequente por malária, geralmente por *Plasmodium falciparum*, onde esta patologia induziria a uma deficiência de ferro pelas constantes crises hemolíticas (WASI e cols., 1971; AKSOY e cols., 1972; ALPERIN e cols., 1977; WEATHERALL & CLEGG, 1981; WHO, 1982; WILLCOX e cols., 1985; HERCBERG e cols., 1986).

O aumento na concentração da HbA₂ tem sido observado nas seguintes patologias: anemia megaloblástica devido à deficiência de folato ou vitamina B 12 ; em alguns casos de: mielofibrose, hepatite viral, esquistossomose, malária por *Plasmodium vivax*, eritroleucemia, hipertireoidismo e em receptores de tecido hematopoiético fetal (LIE-INJO e cols., 1971; ALPERIN e cols., 1977; VAN ROSS e cols., 1978; NAOUM e cols., 1979; KRISHNAMOORTHY e cols., 1982).

Para muitas destas situações, a relação entre o aumento da HbA₂ e o tipo de patologia ainda permanece obscura. Especialmente com referência à malária, a elevação da concentração de HbA₂ poderia ser indicativo de uma reação mais generalizada do organismo contra o processo infeccioso, incluindo outros sintomas além do imunológico. Outra possibilidade seria a preferência seletiva dos parasitas da

Quadro 5. Tipos mais comuns de talassemia beta.

TIPO DE TALASSEMIA	HOMOZIGOTO	HETEROZIGOTO
β^0	talassemia maior Hb F = 92 - 98% ; Hb A ₂ = 2-8%	talassemia menor Hb A ₂ = 3,5 - 7,0% $\alpha / \beta = 2/1$
β^+ (Mediterrâneo)	talassemia maior Hb F = 70-95%	talassemia menor Hb A ₂ = 3,5 - 7,0% $\alpha / \beta = 2 / 1$
β^{++} (negro)	talassemia intermédia Hb F = 20-40% Hb A ₂ = 2-5 %	talassemia menor Hb A ₂ = 3,5-7,0 % $\alpha / \beta = 1,2 - 2,0 / 1$
β^+ (Hb A ₂ normal, tipo 1; silenciosa)	talassemia intermédia branda Hb F = 10 - 30 % Hb A ₂ = 5 %	normal $\alpha / \beta = 1,2 - 1,5 / 1$
β^+ ou β^0 (Hb A ₂ normal tipo 2)	provavelmente talassemia maior	talassemia menor Hb A ₂ normal $\alpha / \beta = 2 / 1$

malária por células com baixa quantidade de HbA₂ (ARENDES, 1975).

I.1.4. A hemoglobina Fetal

A hemoglobina Fetal (HbF) é formada por duas cadeias alfa e duas gama ($\alpha_2 \gamma_2$).

Os genes duplicados de cadeia gama no homem produzem dois tipos de polipeptídeos que diferem por um simples aminoácido: glicina (γ^g) ou alanina (γ^a) na posição 136 da cadeia (SCHROEDER e cols., 1963).

No período fetal a proporção dos dois tipos de HbF (γ^g e γ^a) é 7:3; ao nascimento é de 3:1 e após os seis meses, a proporção está em torno de 2:3. Aproximadamente um terço dos indivíduos mantém a proporção do nascimento na vida adulta (WEATHERALL & CLEGG, 1982). As análises das relações γ^g/γ^a em várias condições adquiridas e herdadas, associadas com aumento de HbF na vida adulta, têm mostrado variações, sem entretanto, estabelecer um padrão.

A HbF apresenta níveis normais de 0 a 1%. Aumentos desta concentração até 5% têm sido observados em alguns casos de talassemia beta heterozigota (Quadro 5), e aparece bastante aumentada nos casos de talassemia beta homozigota. Valores elevados são também verificados na persistência hereditária de hemoglobina Fetal (PHHF), onde a produção de HbF permanece após o período neonatal, sem causar danos hematológicos e fisiopatológicos para o seu portador (CHARACHE & CONLEY, 1969). Há evidências de que a persistência hereditária de hemoglobina Fetal seja uma forma muito discreta de talassemia, onde ocorre um desequilíbrio mínimo entre as cadeias sintetizadas e uma compensação quase completa da cadeia beta deficiente pela produção de cadeias gama, originando o aumento de HbF (TUAN e cols., 1980).

A síntese de Hb F pode persistir além do período neonatal, também em casos de talassemia beta homozigota, Hb SS e Hb S/talassemia beta.

A produção pode ser reativada em algumas doenças adquiridas, como anemia aplástica, leucemia mieloide crônica juvenil, anemia refratária com hiperplasia de medula, hemoglobinúria paroxística noturna, mieloma múltiplo, leucemia linfoblástica aguda, e malária por *Plasmodium falciparum* (SHIMIZU e cols., 1988).

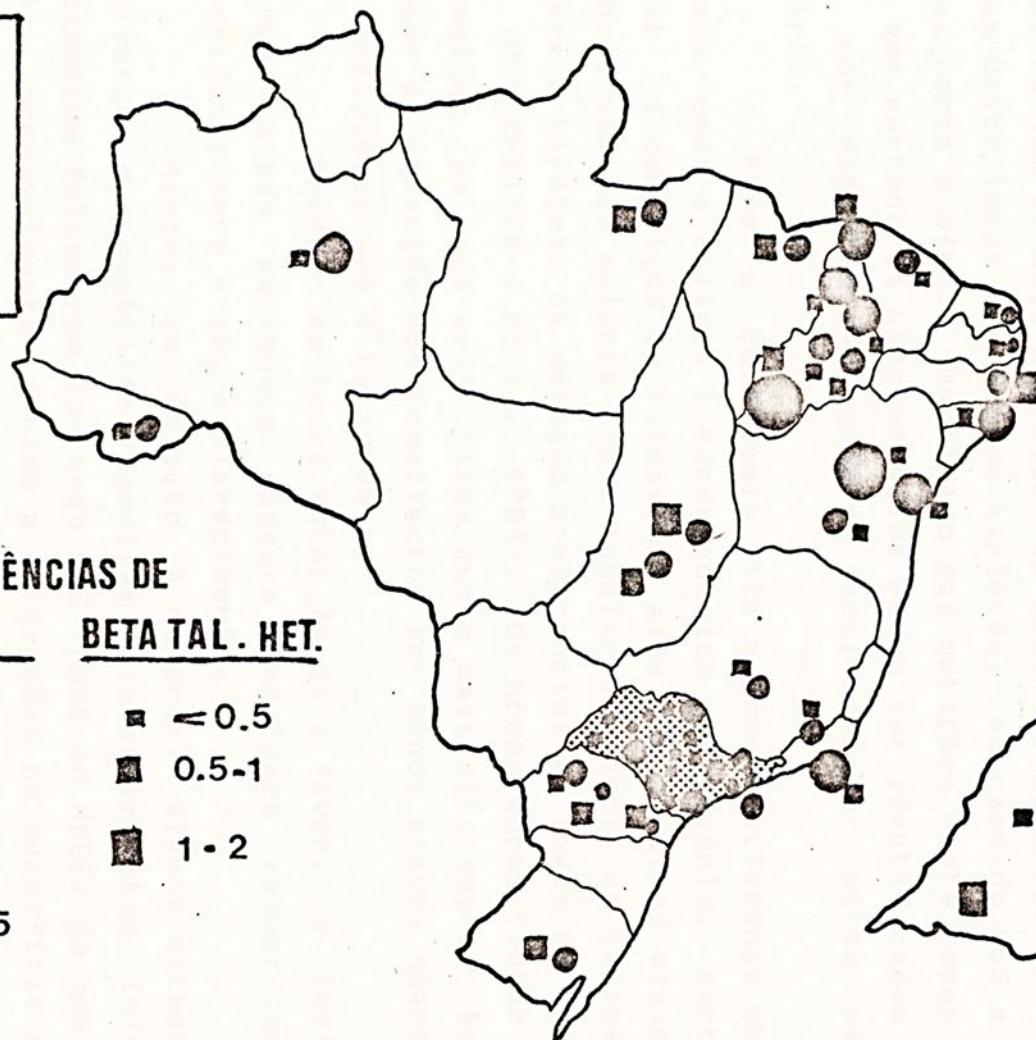
I.1.5. Distribuição geográfica das hemoglobinopatias e talassemias

Uma característica das hemoglobinas humanas é sua distribuição heterogênea em diferentes populações do mundo. Entre as hemoglobinas variantes destacam-se os tipos S, C, E e D. As hemoglobinas S e C são encontradas com maior frequência na África, enquanto as diferentes formas de talassemias predominam na região do mar Mediterrâneo (tipo beta) e nos povos asiáticos, mediterrâneos e negros africanos (tipo alfa).

As populações latino americanas compreendem cerca de 440 milhões de habitantes com variações étnicas oriundas dos cruzamentos entre índios e colonizadores, espanhóis e portugueses, e posteriormente com o negro africano. Analisando-se separadamente cada país distingue-se claramente as influências caucasóides dos colonizadores ou negróides dos escravos. Desta forma distingue-se os diferentes tipos de hemoglobinas que são mais prevalentes dependendo da miscigenação do país.

As populações brasileiras caracterizam-se por apresentar grande heterogeneidade genética derivada da contribuição que lhes deram seus grupos raciais formadores, também muito diversificados, e dos diferentes graus de intercruzamentos nas várias regiões do país. Desta maneira a distribuição das hemoglobinas anormais no Brasil está intimamente relacionada às etnias que compõem nossa população, já que análises realizadas em indígenas "puros" mostrou ausência de hemoglobinopatias (SALZANO & FREIRE MAIA, 1967; NAOUM e cols., 1979).

Estudos realizados em 82.357 pessoas de 40 cidades dos Brasil, tendo como objetivo determinar a prevalência de hemoglobinas anormais, mostraram que as frequências deste tipo de patologia hereditária foram de 3,68% na população total analisada; sendo 2,61% em caucasóides e 6,35% em negróides. Entre as 3.030 hemoglobinas anormais identificadas 90,09% foram variantes moleculares e 9,90% talassemias (NAOUM e cols., 1986) (figura 2).



BRASIL



ESTADO DE SÃO PAULO

AMOSTRAS TESTADAS	82.357
CIDADES ESTUDADAS	40
FREQUÊNCIAS DE	%
HB AS	2,1
TAL. BETA HET.	1,0
HB AC	0,4
OUTRAS	0,2
TOTAL	3,7

FREQUÊNCIAS DE

HB AS

BETA TAL. HET.

• < 2

■ < 0.5

• 2-3

■ 0.5-1

• 4-6

■ 1-2

• 7-15

FIGURA 2: PREVALÊNCIA DE HEMOGLOBINAS ANORMAIS
NO BRASIL (NAOUM E COLS. 1986)

I.1.6. Hemoglobinas anormais e doenças

A distribuição geográfica das talassemias e falcemias, já há algum tempo, têm induzido à especulação de que forneceriam alguma vantagem seletiva contra malária. Altas prevalências de HbS, talassemia beta e talassemia alfa que ocorrem quase que exclusivamente dentro do "cinturão da malária" suportam a hipótese de que a proteção contra esta doença parasitária constitui o fator responsável pela presença aumentada destas alterações (ALLISON, 1964; FLINT e cols., 1986).

Os homozigotos para hemoglobinas anormais morrem prematuramente acarretando um equilíbrio na perda de genes. Os heterozigotos tornam-se mais adaptados ao ambiente malarígeno. A existência de um único locus por genoma haplóide, no caso da HbS e talassemia beta, torna o efeito fenotípico das mutações neste locus tão drástico que portadores heterozigotos podem ser identificados sem equívoco, por este motivo torna-se fácil associar estas patologias à malária.

Para a talassemia alfa a grande diferença observada em locais onde a malária é hiperendêmica por exemplo, norte da Nova Guiné (com 81,0% de talassemia alfa) e em ilhas vizinhas onde a transmissão da malária não é regular (ausência de talassemia alfa) sugere a hipótese da seleção preferencial ao invés da deriva genética (OPPENHEIMER e cols., 1984). Os homozigotos tinham uma taxa de parasitas em seus eritrócitos muito mais alta que os heterozigotos apesar da infecção nos homozigotos ser menos grave, quando comparada com indivíduos sem a talassemia.

Apesar de todos estes fatos à favor, o coeficiente de seleção ainda permanece obscuro e portanto requer estudos mais específicos para o seu esclarecimento.

Ainda, em relação à malária, alguns estudos *in vitro* mostraram que monócitos fagocitam mais eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* contendo HbE (HbAE ou HbEE) do que aqueles com HbAA, provavelmente devido a alterações na superfície da membrana. *In vivo* poderia dar aos portadores de HbE uma vantagem sobre os não portadores, o que poderia contribuir para balancear polimorfismos do gene anormal (BUNYARATVEJ e cols., 1986).

Vários estudos têm sido feitos tentando relacionar fenô-

tipos de hemoglobinas a algumas doenças, como Chagas e hanseníase, mas sem dados significantes estatisticamente (AZEVEDO e cols., 1979; RAMALHO, 1983; OLIVEIRA e cols., 1988).

I.2. As haptoglobinas

I.2.1. Estrutura e função

As haptoglobinas (Hp) são proteínas plasmáticas com capacidade de se combinar com a hemoglobina, ou com a globina livre, aumentando a atividade peroxidásica da hemoglobina.

A haptoglobina é constituída por cerca de 20% de glicídeos e sua parte proteica é formada por dois pares de cadeias polipeptídicas que se diferenciam pelo tamanho e composição dos aminoácidos (BLACK e cols., 1970). A parte proteica é representada por duas cadeias alfa (α), ou leves (L), e por duas cadeias beta (β), ou pesadas (P), unidas entre si por pontes dissulfeto.

As cadeias beta apresentam algumas semelhanças quanto ao tamanho e composição de seus aminoácidos, com um total de 245 resíduos (CLEVE e cols., 1967). As cadeias alfa são heterogêneas em sua estrutura e podem ser diferenciadas em dois tipos, sendo alfa 1 constituídas por 83 aminoácidos e alfa 2 com 142 aminoácidos.

Das combinações entre as cadeias alfa 1, alfa 2 e beta originaram-se os tipos mais comuns das haptoglobinas humanas: Hp 1-1 ($\alpha^1 \beta$); Hp 2-2 ($\alpha^2 \beta$) e Hp 2-1 ($\alpha^1 \alpha^2 \beta$) (JAYLE & MORETTI, 1962).

Estes três tipos de haptoglobinas foram inicialmente caracterizados por suas migrações em gel de amido; utilizando-se posteriormente gel de amido/uréia-mercaptoetanol constatou-se que a cadeia alfa 1 apresentava duas frações diferentes, uma lenta: alfa 1S (Slow) e outra rápida, alfa 1F (Fast), subdividindo-se a Hp 1-1 em Hp 1F-1F, Hp 1F-1S e Hp 1S-1S; e a Hp 2-1 em: Hp 2-1S e Hp 2-1F. A diferenciação das cadeias alfa 1F e alfa 1S se dá em um único aminoácido na posição 53 - lisina na cadeia alfa 1F e ácido glutâmico na cadeia alfa 1S. Os diferentes tipos de haptoglobinas, portanto, estariam condicionados estruturalmente aos polipeptídeos da cadeia alfa, já que os da cadeia beta são estruturalmente homogêneos.

Além dos tipos comuns de haptoglobinas foram observados outros que apresentam pequenas modificações na migração eletroforé-

tica e apareceram em decorrência de possíveis mutações. Entre eles citam-se as Hp 2-1 modificadas (2-1 M), Hp Johnson (Hp J) e a Hp Carlberg (Hp Ca) (GALATIUS-JENSEN, 1958 ; GIBLETT, 1959, 1961).

A principal função das haptoglobinas é a de impedir a perda de hemoglobina plasmática pelos rins, pois o complexo Hp-Hb é uma estrutura grande que não passa pelo glomérulo renal. Por este processo os átomos de ferro hemoglobínicos são reaproveitados, no fígado, evitando a siderose renal (ALLISON & REES, 1957).

A biosíntese de haptoglobina em uma pessoa normal com aproximadamente 3,0 litros de plasma é cerca de 0,6 a 1,0 grama por dia, dos quais aproximadamente 50% é utilizado na ligação com a hemoglobina intravascular proveniente da destruição eritrocitária diária. No entanto, dos 6 gramas de hemoglobina degradadas diariamente em um indivíduo normal, somente 0,6 a 1,2 gramas seguem a via da hemólise intravascular. Assim apenas uma parte da hemoglobina catabolizada é controlada pela haptoglobina e o restante controlado por outros mecanismos que retêm o grupo heme, como a formação de hemopexina e metaemalbumina.

A haptoglobina combina-se com qualquer tipo genético ou tóxico de hemoglobina, exceto a hemoglobina H e Bart. Não faz ligação também com o heme e com a mioglobina (PINTERA, 1971).

A formação do complexo Hp-Hb se dá através de ligações entre as cadeias alfa e beta da molécula de hemoglobina e as cadeias pesadas da haptoglobina; as cadeias alfa não participam da formação do complexo (BERNINI & BORRI-VOLTATTORNI, 1970).

I.2.2. Genética e Metabolismo das haptoglobinas

As variações hereditárias dos três tipos distintos de haptoglobina dependem do comportamento de dois possíveis alelos codominantes e autossômicos Hp^1 e Hp^2 . Os homozigotos para Hp^1 codificam os polipeptídeos da cadeia alfa 1 ($hp^1 \alpha$) e da cadeia beta ($hp \beta$), sendo o seu genótipo, $Hp^1 - Hp^1$; os homozigotos para Hp^2 codificam polipeptídeos para a cadeia alfa 2 ($hp^2 \alpha$) e cadeia beta ($hp \beta$) e o seu genótipo é representado por $Hp^2 - Hp^2$; os heterozigotos sintetizam para cadeias alfa 1, alfa 2 e beta, e seu genótipo representado por $Hp^1 - Hp^2$. Para as cadeias alfa 1 que apresentam os subtipos alfa 1S e alfa 1F correspondem genes Hp^{1S} e Hp^{1F} , alelos de Hp^1 , sendo portanto caracterizado para as haptoglobinas a

presença de três alelos autossômicos comuns Hp^1S , Hp^1F e Hp^2 . A cadeia beta é codificada de modo idêntico para os três genes.

Os fenótipos raros, evidenciados eletroforeticamente, provavelmente são consequência de alterações genéticas. A $Hp\ 2-1\ M$ é observada em populações negróides, e tem certa semelhança com a $Hp\ 2-1$ na separação eletroforética, mas com uma concentração relativa bem maior na fração de migração eletroforética mais rápida. Um outro fenótipo, caracterizado pela ausência de haptoglobina (anaptoglobinemias ou $Hp\ 0-0$) é observado em muitos grupos negróides e raramente em caucásios sendo atribuído a ele origem genética quando são excluídos processos patológicos, fisiológicos ou estruturais (PARKER & BEARN, 1963). Fenótipos mais raros ainda são os da $Hp\ Carlberg$ ($Hp\ Ca$) e $Hp\ Johnson$ ($Hp\ J$).

Os padrões de migração eletroforética dos fenótipos de haptoglobina podem ser visualizados na figura 3.

A síntese das haptoglobinas ocorre nas células parenquimatosas do fígado principalmente, podendo ocorrer síntese adicional pelas células do sistema retículo endotelial do baço, gânglios linfáticos e timo (MOREIRA, 1987).

As concentrações de haptoglobinas séricas apresentam valores normais entre 30 e 190 mg/100 ml sendo dependentes do fenótipo. Indivíduos $Hp\ 1-1$ têm valores maiores e indivíduos $Hp\ 2-2$, menores, sendo os valores intermediários para os portadores do fenótipo $Hp\ 2-1$. A maioria dos recém-nascidos (70 a 80%) não possuem quantidades detectáveis de haptoglobinas, mas após 1 ano de idade a taxa é semelhante à do adulto. Em idosos não se observa modificações significativas na quantidade de haptoglobina. Em indivíduos normais, os níveis de haptoglobinas permanecem praticamente constantes sendo qualquer aumento ou diminuição de importância clínica. Vários fatores, no entanto, influenciam na produção desta proteína, e atuam como reguladores. Os níveis séricos das haptoglobinas estão sob a influência de hormônios sendo que os andrógenos, paratireoideano e corticosterona os aumentam e os estrógenos os diminuem, sendo então, as concentrações mais elevadas nos homens que nas mulheres.

Outro fator atuante na regulação da haptoglobina são os possíveis mensageiros tissulares, que agem aumentando seus níveis em resposta a estímulos inflamatórios ou frente a necrose tissular (POWANDA e cols., 1980). Pode-se pensar ainda em um possível mecanismo de autorregulação da síntese hepática e do consumo da haptoglobina.

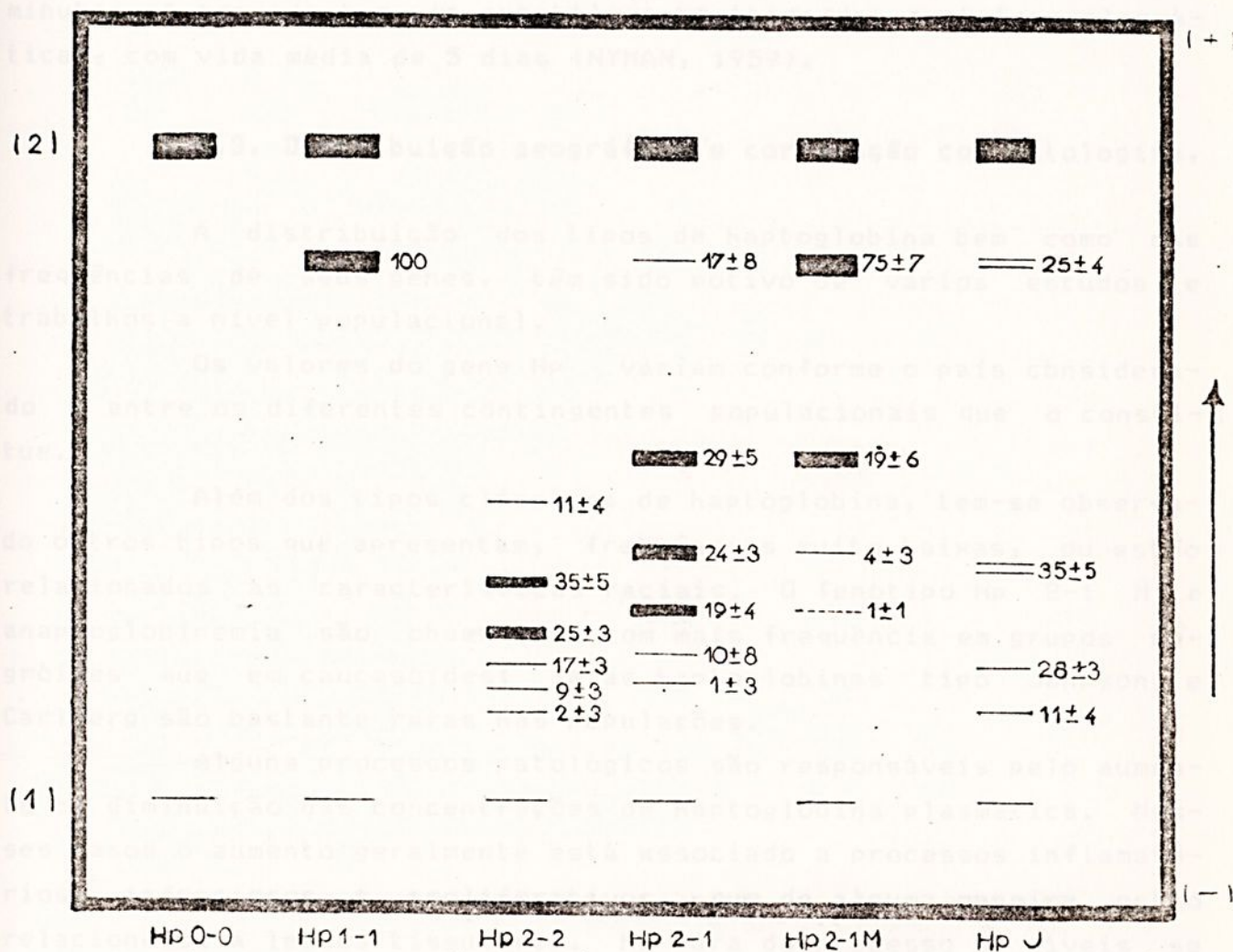


Figura 3. Concentrações relativas das frações dos diferentes fenótipos das haptoglobinas após eletroforese em gel de amido/Tris-EDTA-Borato, pH 8,6.
(1) Ponto de aplicação; (2) Hemoglobina livre (segundo PARKER & BEARN, 1963).

globina, o que existe desde que esta proteína começou a ser descrita.

A haptoglobina apresenta duas vias catabólicas, a primeira é a eliminação através do complexo Hb-Hp, formado por hemoglobina livre e catabolizada normalmente. Este complexo tem vida média de 20 minutos. A segunda é a via catabólica hepática das proteínas plasmáticas, com vida média de 5 dias (NYMAN, 1959).

I.2.3. Distribuição geográfica e correlação com patologias.

A distribuição dos tipos de haptoglobina bem como das frequências de seus genes, têm sido motivo de vários estudos e trabalhos a nível populacional.

Os valores do gene Hp variam conforme o país considerado e entre os diferentes contingentes populacionais que o constituem.

Além dos tipos clássicos de haptoglobina, tem-se observado outros tipos que apresentam, frequências muito baixas, ou estão relacionados às características raciais. O fenótipo Hp 2-1 M e anaptoglobinemias são observados com mais frequência em grupos negróides que em caucásides; já as haptoglobinas tipo Johnson e Carlberg são bastante raras nas populações.

Alguns processos patológicos são responsáveis pelo aumento ou diminuição das concentrações de haptoglobina plasmática. Nesses casos o aumento geralmente está associado a processos inflamatórios, infecciosos e proliferativos, que de alguma maneira estão relacionados a lesões tissulares. Na cura do processo os níveis se normalizam em 4 semanas (MUNIZ-DIAZ e cols., 1985).

Nas inflamações, o aumento de Hp estaria relacionado à inibição de uma enzima proteolítica liberada nestas situações (cathepsina B), bem como à incorporação de prolina na hidroxiprolina do colágeno. Deste modo, este processo não só protegeria o tecido da ação enzimática proteolítica, como também auxiliaria na regeneração tecidual. Em inflamações crônicas e tuberculose pulmonar, a involução das lesões é seguida pela queda da haptoglobina até valores normais. Nas cardiopatias isquêmicas, a haptoglobina que no início está discretamente aumentada, sofre elevações no momento do infarto. Em processos tumorais suas concentrações se relacionam com a extensão do tumor. Em leucemias e linfomas seu acompanhamento permite

aquilatar recaídas e remissões. A diminuição de haptoglobina está relacionada a problemas de sua síntese hepática ou a processos hemolíticos ou hiperesplênicos. As doenças hemolíticas são frequentemente acompanhadas de baixos níveis de haptoglobina, geralmente em processos hemolíticos das hemácias, anemias hemolíticas imunes e hemoglobinopatias (MOREIRA, 1987).

Muitos são os esforços em tentar associar os diferentes fenótipos de haptoglobinas a diversas patologias, tentando estabelecer correlações entre elas.

BECKMAN e cols, 1986 analisando pacientes com adenocarcinoma pulmonar, notaram que a frequência do fenótipo Hp 2-2 foi baixa quando comparada com grupo controle, e observou um correspondente aumento dos tipos Hp 1-1 e Hp 2-1 nos pacientes. A diferença encontrada foi mais pronunciada entre as mulheres com adenocarcinoma.

Já PRABHA e cols., 1987 encontraram que indivíduos que apresentavam fenótipo Hp 2-2, mostravam mais alto risco para hipertensão arterial e hipertensão associada a isquemia cardíaca.

Muitas doenças têm sido estudadas para suas associações com fenótipos de haptoglobinas: o aumento de Hp 1-1 evidencia anemias hemolíticas, Hp 2-2 é frequente em deslocamento de retina; o tipo Hp 2-1 aparece com maior frequência em esquizofrenia e aneurisma abdominal aórtico.

A associação de haptoglobina com algumas doenças pode também ser explicada com base na resposta imunológica. A diminuição da resposta imune de indivíduos Hp 1-1 pode ser responsável pela alta frequência do fenótipo 1-1 em leucemias (PRABHA e cols., 1987).

O predomínio do tipo Hp 1-1 em pacientes com talassemia beta maior e anemia falciforme foi constatado por MOREIRA em 1987, cuja relação poderia ser devido aos constantes processos hemolíticos que ocorrem nestas patologias.

I.3. A Doença de Chagas

I.3.1. Introdução

A doença de Chagas, originalmente uma enzootia, exclusiva de animais silvestres, veio a se tornar uma "nova entidade mórbida para o homem", conforme descreveu originalmente, Carlos Chagas, em 1909, devido a um certo grau de desagregação do ambiente natural.



Nesse processo foi determinante a ação predatória do homem, que levou ao deslocamento dos insetos vetores da doença de seus ecótopos primitivos. Alterada a biocinese em que viviam os barbeiros estabeleceu-se o ciclo domiciliar da transmissão da doença, uma vez que a habitação humana apresentava condições favoráveis à colonização por esses triatomíneos (SILVEIRA, 1983).

Constitui, pela sua vasta distribuição, altos índices de prevalência e gravidade de evolução, um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil, bem como em vários países Sul Americanos.

A doença é considerada como uma das infecções tropicais mais marcantes para o homem, pela sua alta letalidade, principalmente em crianças de zonas endêmicas, por sua condição de inutilidade do indivíduo para atividades vitais, e por ser importante fator de degeneração humana.

Quando crianças são infectadas, geralmente ocorre morte por ataque cardíaco ou do sistema nervoso, tendo portanto, na primeira infância um prognóstico sombrio. Em adolescentes a doença aguda é na maioria dos casos vencida, passando ao estado crônico, com comprometimento de alguns órgãos. Em adultos a doença é raramente mortal, induzindo formas agudas graves, e com tendência a não evoluir para o estado crônico.

A maioria dos infectados não vive além dos 50 anos, sendo esta parasitose a afecção que determina as mais altas taxas de morte súbita.

As variações da mortalidade, a gravidade da moléstia e a porcentagem de doentes que apresenta comprometimento dos órgãos devido à infecção, parece depender das regiões geográficas onde incide, das cepas de tripanosomas inoculados e da possibilidade de reinfecções.

Os prejuízos econômicos causados pela doença de Chagas são grandes, principalmente em doentes com a forma crônica, que ficam incapacitados, em sua fase mais produtiva, e com maior intensidade na zona rural, onde o trabalho exige grande esforço físico; além dos gastos com hospitalização e reabilitação dos doentes.

1.3.2. Agente Etiológico

O agente causal da doença de Chagas é o **Trypanosoma cruzi**, protozoário da Classe **Mastigophora**, ordem **Kinetoplastida**,



família *Trypanosomatidae*. Apresenta-se sob as formas flagelada (epimastigota e tripomastigota) e aflagelada (amastigota). No homem e demais vertebrados, o tripomastigota tem por "habitat" o meio circulante e o amastigota, a intimidade dos tecidos. Nos invertebrados, além das formas amastigotas e dos tripomastigotas metacíclicos, observa-se uma forma de transição, epimastigota, encontrada também no homem, na fase de transição de amastigota para tripomastigota.

A forma tripomastigota é a mais alongada e com maior capacidade de infectar o hospedeiro, mesmo sem se dividir (SOUZA & SOUTO-PADRON, 1983). Os tripomastigotas são alongados e medem cerca de 20 micra de comprimento por 2 ou mais micra de largura; o núcleo se situa próximo à extremidade anterior; as formas delgadas apresentam movimentos rápidos, enquanto que as formas mais largas apresentam movimentos mais lentos. Após coloração os tripomastigotas apresentam-se com a forma de um C ou de um S.

Os amastigotas são arredondados ou ovais, sem movimentação, e com cerca de 1,5 a 4 micra de diâmetro; se agrupam, em número variável, formando os chamados ninhos parasitários. Os epimastigotas, têm dimensões variáveis. O habitat normal das formas em tripomastigota é o sangue; das formas em amastigota é o tecido muscular estriado, onde se reproduzem por divisão binária para formar os ninhos parasitários (PESSOA & MARTINS, 1982).

Na membrana do parasito se encontram macromoléculas (glicoproteínas, glicolipídeos, etc) que induzem a resposta imune por parte do hospedeiro; apresenta também "componentes do complemento", que são substâncias que não permitem a destruição do animal pelos elementos do plasma sanguíneo (SOUZA & SOUTO-PADRON, 1983).

Existem várias cepas de *Trypanosoma cruzi* que foram classificadas primeiramente, de acordo com sua afinidade por determinado tecido, sendo portanto, cepas miotrópicas, neurotrópicas e reticulotrópicas. Lembrando o conceito de que a espécie não é estática, mas constitui uma população mendeliana ou um grupo de populações, poderia-se admitir que o *Trypanosoma cruzi* se diferencie em subespécies geograficamente diferentes. Este fato foi demonstrado nos estudos realizados no Chile, onde os casos de doença de Chagas apresentaram características distintas em diferentes locais e diferiram consideravelmente dos casos clínicos de outras partes das Américas (APT e cols., 1987).



Analisando diferentes padrões de enzimas separadas eletroforeticamente podemos identificar várias linhagens de *T. cruzi*, sugerindo também que os tripanosomas são diplóides e que geraram padrões heterozigotos (TAIT, 1980; APT e cols., 1987).

A estrutura populacional do *Trypanosoma cruzi* parece ser multiclonal e complexa. Os clones naturais evidenciados por análises de isoenzimas são numerosos e mostram grande variação de genótipo em uma estrutura não hierárquica. A variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* reflete uma longa evolução isolada, de múltiplos clones (TIBAYRENC & AYALA, 1988).

A neuramidase (sialidase, acilneuramil hidrolase, EC. 3.2.1.18) extraída e purificada da linhagem Y de *Trypanosoma cruzi* foi testada em reações imunológicas indicando que esta enzima constitui um fator de virulência em *Trypanoxona cruzi* (HART e cols., 1987).

O estudo dos tipos de isoenzimas nas diferentes cepas, o tipo de população, semelhanças morfológicas entre distintas formas de *Trypanosoma cruzi*, as possíveis variações antigênicas que sofrem os tripanosomas ao passar por seus distintos estágios evolutivos, e o comportamento atípico de determinada cepa frente ao hospedeiro, provavelmente sejam os fatores responsáveis pela complexa resposta imune que provocam no hospedeiro, originando variações na doença de ordem geográfica e individual (ANDRADE e cols., 1983; BASSO e cols., 1984; MULLER e cols., 1987; TYBAYRENC & AYALA, 1988).

1.3.3. O Vetor

É um inseto da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae.

Já foram descritas cerca de 100 espécies de triatomíneos silvestres e domiciliares encontrados em todos os países do continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina; fora das Américas foram assinaladas cerca de 10 espécies, porém nenhuma naturalmente infectada. Geralmente prevalece em cada região uma espécie. Na América do Sul, os de maior importância epidemiológica são o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*; na América Central e México, *Triatoma protacta*, *Triatoma pallidipennis* e *Triatoma phyllosoma*. *Triatoma rubrofasciata* é uma espécie cosmopolita.

Estas espécies exercem hematofagismo obrigatório que se inicia nas primeiras fases do desenvolvimento, podendo entretanto, resistir a longos períodos de jejum.

Os triatomíneos domiciliados são encontrados com frequência em casas de pau-a-pique, em frestas de parede, nos colchões, atrás de móveis e quadros, e em peridomicílios (paiol, galinheiro, curral). A noite, ou mesmo durante o dia, em ambientes escuros, saem de seus locais para sugar os indivíduos nas partes descobertas do corpo, emitindo dejeções durante ou logo após o repasto; a picada é indolor.

Recebem vários nomes vulgares, dependendo do local de origem, com barbeiro, chupanga, chupão, fincão, bicudo e procotó, no Brasil; vinchuca e chinche em países de língua espanhola e Kissing bug e cone nosed bug nos Estados Unidos (RASSI e cols., 1982).

O desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi* nos triatomíneos é cíclico, extracelular e se processa no trato gastrointestinal, onde são encontradas as três formas cíclicas infecciosas (amastigota, epimastigota e tripomastigota) que são depositadas com as fezes na pele do vertebrado, na ocasião da picada. A Figura 4 mostra o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.

1.3.4. Mecanismos de Transmissão

O mecanismo habitual de transmissão da doença de Chagas se faz pelo contato das dejeções do inseto vetor infectado com as mucosas ou a pele do hospedeiro vertebrado. As mucosas mesmo íntegras não oferecem barreira à penetração do *T. cruzi*, ao passo que a pele necessita de uma solução de continuidade para se deixar atravessar, o que pode ser representado pela própria picada do inseto, ou por escarificações causadas pelo indivíduo ao coçar-se (RASSI e cols., 1982).

Esta forma de transmissão da doença de Chagas é a que realmente responde pela manutenção da endemia. A distribuição mundial da doença corresponde as áreas onde são encontrados vetores que entram em contato com o homem. A interrupção da transmissão via vetor invertebrado tem-se dado através de programas de controle e combate ao triatomíneo.

Além da desestruturação do ambiente natural com derrubada de matas e invasão destas áreas, a condição da casa também é impor-

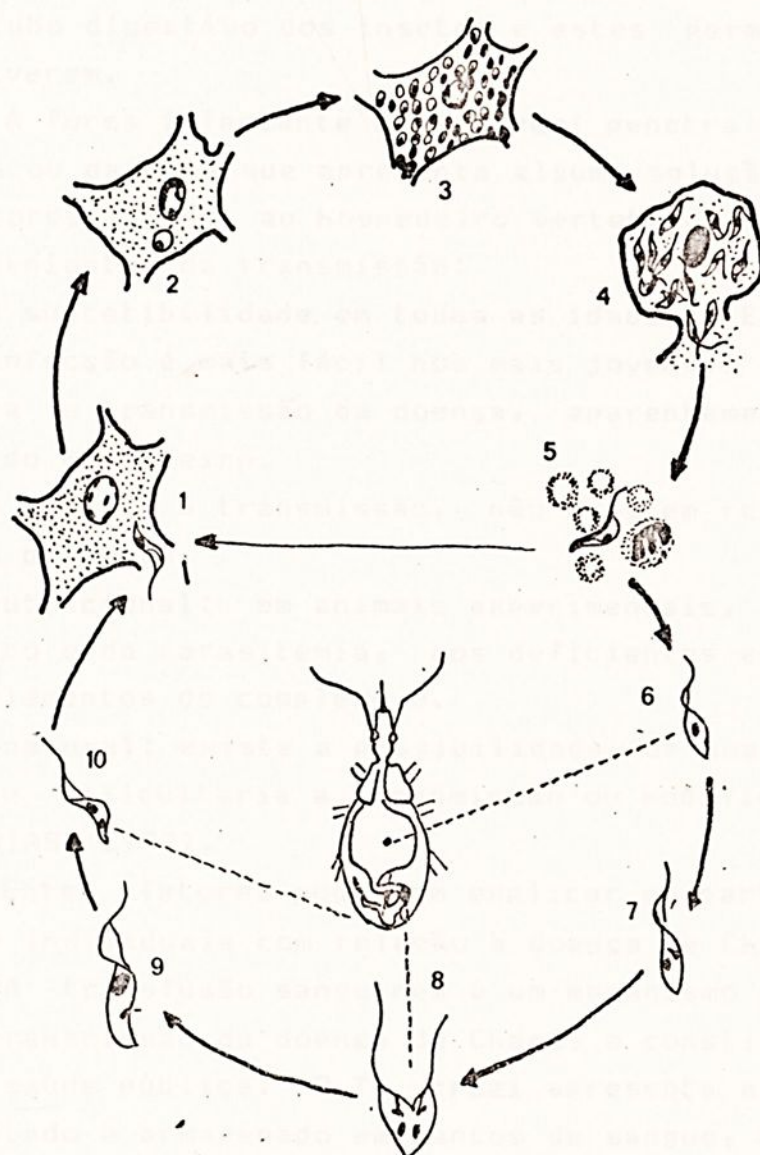


Figura 4. Ciclo do *T. cruzi*. 1) Penetração tripomastigota metacíclico (ou tripomastigota sanguíneo) em uma célula; 2) transformação do tripomastigota em amastigota; 3) essa forma multiplica-se intensamente por divisão binária dentro da célula; 4) rompimento da célula parasitada, liberando formas tripomastigotas; 5) formas tripomastigotas no sangue circulante; podem penetrar em outra célula (1) ou serem ingeridas pelo triatômico (6); 6) formas tripomastigotas no estômago do triatômico; 7) transformação da forma tripomastigota em epimastigota no intestino posterior do inseto; 8) formas epimastigotas em multiplicação por divisão binária; 9) formas epimastigotas transformam-se em formas tripomastigotas metacíclicas no reto do inseto; 10) formas tripomastigotas metacíclicas, nas fezes do triatômico, aptas a penetrarem em células do hospedeiro mamífero.

tante na domiciliação do inseto vetor.

O triatomíneo normalmente adquire a infecção ao sugar sangue contaminado pelo *T. cruzi*; os flagelados se desenvolvem ao longo do tubo digestivo dos insetos e estes permanecem infectados enquanto viverem.

A forma infectante do *T. cruzi* penetra ativamente através de mucosas ou da pele que apresenta alguma solução de continuidade. Vários fatores ligados ao hospedeiro vertebrado podem ser citados como intervenientes da transmissão:

-**Idade:** Há suscetibilidade em todas as idades. Em animais de laboratório a infecção é mais fácil nos mais jovens.

-**Sexo:** para a transmissão da doença, aparentemente não há relação com o sexo do hospedeiro.

-**Raça:** com relação à transmissão, não existem referências quanto à preferência de raças.

-**Condição nutricional:** em animais experimentais, há agravamento do curso clínico e da parasitemia, nos deficientes em proteínas, vitaminas A e elementos do complexo B.

-**Imunidade natural:** existe a possibilidade de uma imunidade natural parcial que dificultaria a transmissão ou modificaria o curso da infecção (DIAS, 1979).

Estes fatores poderiam explicar em parte as diferenças regionais e individuais com relação à doença de Chagas.

A transfusão sanguínea é um mecanismo artificial importante na transmissão da doença de Chagas e constitui um sério problema de saúde pública. O *T. cruzi* apresenta alta resitência no sangue coletado e armazenado em bancos de sangue, sendo a transfusão o segundo mecanismo de infecção ao homem depois da transmissão natural pelos vetores, principalmente quando boa parte dos doadores vêm de regiões endêmicas (DIAS, 1979; RASSI e cols, 1982; GUHL, 1987). A taxa de risco de contaminação via transfusão sanguínea depende de alguns fatores tais como, parasitemia do doador; cepa do *T. cruzi* transfundida; quantidade de sangue transfundido; resistência ou suscetibilidade do receptor e número de transfusões (DIAS, 1979).

A profilaxia da transmissão via transfusional pode ser feita tomando-se as seguintes medidas: seleção e exclusão de doadores chagásicos em bancos de sangue e hospitais, mediante cadas-

tramento atualizado que se baseie em sorologia fidedigna e a adição de drogas tripanosomicidas às amostras suspeitas. O uso de violeta de genciana em amostras de sangue de áreas endêmicas diminui muito a transmissão da doença de Chagas via transfusão sanguínea. O uso de outras drogas que lisam algumas cepas específicas de *T. cruzi*; associadas à violeta de genciana, diminuem a infectibilidade a quase zero. O maior inconveniente à utilização da violeta de genciana às bolsas de sangue é a sua cor arroxeada que impressiona o receptor, daí uma necessidade urgente de substituir a violeta de genciana como fator profilático em bancos de sangue, mas as drogas desenvolvidas contra doenças tropicais são extremamente caras (DIAS, 1981; HAMMOND e cols., 1986).

A transmissão congênita foi suspeitada inicialmente por Carlos Chagas e posteriormente comprovada por vários autores em animais experimentais e no homem. Acredita-se que a transmissão se dê ao nível da placenta e do leite materno.

Nas autópsias de natimortos na Bahia, 2% apresentavam doença de Chagas; na Bolívia a incidência da doença por esta via de transmissão chega a 5% e a prevalência de grávidas chagásicas é de 51% com idades variando de 15 a 44 anos (DIAS, 1979; RASSI e cols, 1982; AZOGUE e cols., 1985).

Outras formas de transmissão porém com menor importância epidemiológica são os seguintes:

-**Via oral:** por ingestão de ratos e triatomíneos infectados. Os estudos foram realizados com gambá e a taxa de infecção foi de 60% para ingestão de ratos e 83,3% para ingestão de triatomíneos, mostrando mais uma vez que as mucosas estão sempre prontas para a entrada dos parasitos (RIBEIRO e cols., 1987).

-**por outros insetos hematófagos:** como alguns Cimicídeos, pulgas, ácaros e culicídeos que podem albergar o *T. cruzi*, sendo este transmitido através da picada (DIAS, 1979).

-**transmissão acidental em laboratório.**

-**transmissão pelo coito:** conseguido apenas experimentalmente (DIAS, 1979).

-**transplante de órgãos:** principalmente rim de pacientes infectados.



I.3.5. Evolução da doença

Após entrar na corrente sanguínea o parasita, sob a forma tripomastigota, migra para os tecidos, e estabelece contato, com a superfície da célula, esta por sua vez absorve o parasita para seu interior, onde viverá algum tempo dentro de um vacúolo intra-celular.

Dentro da célula o *T. cruzi* sofre o ataque de conteúdo hidrolítico dos lisossomos, mas o parasita não sofre dano algum nesta forma. Os epimastigotas não possuem mecanismos de proteção contra os efeitos lesivos dos lisossomos e são rapidamente destruídos, talvez por este motivo não seja capaz de infectar o hospedeiro vertebrado. No interior do vacúolo a forma tripomastigota transforma-se em amastigota. Com o rompimento do vacúolo o parasita entra em contato com os componentes do citoplasma da célula do hospedeiro. Praticamente não sofre alterações durante 234 horas; somente sintetiza DNA e RNA. Após este período divide-se em dois a cada 14 horas, de tal maneira que em alguns dias a célula encontra-se repleta de amastigotas; e assim, de um parasita origina-se cerca de 400 novos protozoários, ao final de 5 dias (SOUZA & SOUTO-PADRON, 1983).

Em determinado momento estas formas começam a se alongar, transformando-se em tripomastigotas semelhantes aos da infecção inicial. Estas formas têm movimentação intensa e após algumas horas destroem a célula hospedeira e são lançados no espaço intercelular. A partir daí, caem na corrente circulatória e podem então atingir diferentes regiões do organismo e penetrar em células de vários tipos de preferência macrófagos e células musculares. Nestas células o ciclo de infecção é repetido, levando à destruição celular (SOUZA & SOUTO-PADRON, 1983).

O mecanismo que permite a sobrevivência de alguns micro-organismos e parasitas dentro de macrófagos é conhecido. Em certas ocasiões, a fusão lisossômica está ausente após fagocitose como indicado para *Mycobacterium tuberculosis*. Na doença de Chagas, exames dos macrófagos nas primeiras horas de invasão celular, mostram que as formas metacíclicas do parasita inibem fortemente a formação de lisossomos secundários, quando comparados com as formas epimastigotas. Provavelmente certas substâncias secretadas pelos parasitas podem inibir a fusão lisossômica, como por exemplo, a amônia e

poliaminas (OSUNA e cols., 1986).

Como resposta a este processo o sistema imunológico é ativado gerando um processo inflamatório que é o principal responsável pelo quadro clínico da doença de Chagas. Se o processo ocorrer no coração, teremos como consequência a cardiopatia chagásica crônica, se ocorrer no tubo digestivo teremos as formas "mega", que são dilatações principalmente do esôfago e colon. Estas são as formas mais comuns de alteração que ocorrem na fase crônica da doença (SOUZA & SOUTO-PADRÓN, 1983; KIRCHHOFF e cols., 1987b).

A doença de Chagas é dividida em fases que são bem definidas. A fase aguda, que se instala após curto período de incubação, se caracteriza por apresentar alto parasitismo tissular ou sanguíneo, e manifestações clínicas como sinais de porta de entrada do parasita, edema, alterações eletrocardiográficas e aumento da área cardíaca. A forma aguda pode ser "inaparente" em alguns pacientes, onde estes apresentam discretas manifestações que podem passar despercebidas e dificultar o diagnóstico nesta fase da doença.

Alguns casos agudos podem evoluir para um quadro grave, mas geralmente, essa fase tende a desaparecer espontaneamente após alguns poucos meses (BRENER, 1983).

Gradativamente o paciente passa à fase crônica, durante a qual os parasitos são raros no sangue circulante e nos tecidos.

Da fase aguda às manifestações da fase crônica se passam alguns anos ou décadas, em que o indivíduo pode ou não apresentar algum sintoma clínico, e a doença pode ser detectada por testes sorológicos. É a chamada forma indeterminada da doença de Chagas (FIDC). Pode durar 10 ou 20 anos e em alguns casos o paciente permanece nesta forma da doença a vida toda, num equilíbrio entre parasita e hospedeiro (COURA, 1978).

Após este período de latência, o indivíduo pode manifestar alguns sintomas clínicos da fase crônica.

A forma indeterminada da doença de Chagas tem sua importância na alta prevalência de zonas endêmicas e na faixa etária em que aparece - a grande maioria entre 20 e 40 anos. Dentre os indivíduos rotulados como FIDC é possível identificar grupos exibindo leve comprometimento cardíaco, e função esofágica anormal em 100% deles. É importante ressaltar que todos os distúrbios detectados sempre foram de pequena magnitude (BARRETO & AMATO-NETO, 1986; OLIVEIRA Jr e cols., 1986; DAVILA e cols., 1987).



Indivíduos com FIDC foram tratados com drogas tripanossomicidas e acompanhados por alguns anos, e a observação destes casos não mostrou alterações na evolução da doença (MACEDO e cols., 1985).

A doença de Chagas evolui com maior ou menor intensidade de acordo com o inóculo, virulência, tropismo e patogenicidade da cepa infectante, raça e sexo do hospedeiro, estado nutricional e intensidade do quadro clínico na fase aguda (NUMESMAIA & AZEVEDO, 1973; COURA, 1978; AZEVEDO e cols., 1979; OLIVEIRA JR e cols., 1986). A evolução clínica dos pacientes na fase crônica da doença de Chagas é variável, alguns manifestam, após o período da fase indeterminada da doença, clínica correspondente à chamada forma cardíaca da doença, com alterações características. Uma porcentagem menor dos indivíduos com FIDC passam a manifestar sintomas da forma digestiva da doença.

Algumas considerações sobre as formas crônicas da doença de Chagas:

-Cardiopatía Chagásica Crônica (CCC)

Sob o aspecto clínico e funcional é apresentada como uma síndrome congestiva associada às alterações do ritmo cardíaco e à condução do estímulo elétrico; apresenta também peculiaridades de ordem patológica (AMORIM e cols., 1979).

Dos indivíduos que apresentam os testes para sorologia de doença de Chagas, a maioria desenvolve cardiomiopatia, e esta é uma das causas do maior índice de morte súbita em nosso país. A faixa etária mais afetada se encontra entre 25 e 45 anos (MENDIVIL e cols., 1984; DIAS e cols., 1985; ESPINOSA e cols., 1985; LOPES e cols., 1986).

A natureza do processo patológico responsável pelo desenvolvimento das alterações cardíacas ainda não é bem conhecida. Entretanto, a participação de um mecanismo imunopatológico na gênese dessas lesões tem sido mencionado por vários autores, ao sugerir que as lesões cardíacas e digestivas da doença de Chagas resultariam de sensibilizações auto imunes induzidas pelo *T. cruzi* (GATTAS e cols., 1986).

Apesar dos indivíduos de áreas endêmicas estarem sujeitos a mais de uma infecção, trabalhos realizados indicam que a primeira infecção confere um certo grau de imunidade às infecções subsequên-



tes, não sendo observados agravamentos dos quadros clínicos nas lesões miocárdicas, nas infecções recorrentes (PESSOA & MARTINS, 1982).

-Megacolon e Megaesôfago (MCC-MEC)

As alterações que ocorrem no trato digestivo como resultado da infecção pelo *T. cruzi* são atribuídas à destruição das células nervosas do sistema neurovegetativo. Os plexos intramurais são as estruturas mais atingidas, em virtude do parasitismo das camadas musculares vizinhas, e estão localizados na parede das vísceras. O sistema neurovegetativo integra e coordena as diferentes funções viscerais, então a denervação intrínseca repercute na fisiologia dos órgãos atingidos.

A motilidade do trato digestivo, depende da integridade da inervação autônoma para que se realize de maneira ordenada. Nos casos de megacolon e megaesôfago, ocorre degeneração do plexo mioentérico e consequente dilatação destes órgãos pela falta de estímulos (RESENDE, 1979).

Megacolon e megaesôfago são relativamente comuns em alguns estados brasileiros: Goiás, Minas Gerais e São Paulo e, nestes casos seguramente de origem chagásica. As diferenças regionais e individuais são aqui também observadas e possivelmente devido à cepa do *T. cruzi* além de outros fatores como a raça, condições nutricionais e resistência natural a infecções.

A esofagopatia acomete de 7 a 10% dos chagásicos adultos, geralmente inicia-se após os 20 anos e 50% destes indivíduos têm cardiopatia associada. Megacolon acomete 10% dos chagásicos e a faixa de ocorrência é após os 30 anos (PESSOA & MARTINS, 1982; RASSI e cols., 1982; DIAS e cols., 1985).

Além destas formas crônicas classificadas podemos encontrar a forma nervosa da doença de Chagas, que é bastante polimórfica e produz principalmente encefalomielite aguda e há presença de parasitas no sistema nervoso central, sobretudo nas células microgliais e neurônios (PESSOA & MARTINS, 1982).

1.3.6. Diagnóstico e Achados Imunológicos.

O diagnóstico baseia-se em dados epidemiológicos (procedência do paciente, contato com triatomíneos e tipo de habitação) e



em um conjunto de manifestações mais ou menos características tanto para as formas agudas como para as formas crônicas.

Para o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas dispõem-se de processos diretos e indiretos para demonstração do parasita bem como de métodos imunológicos.

Entre os processos diretos citamos o **exame a fresco** do sangue periférico e observa-se a presença do **T. cruzi** no sangue já nas primeiras semanas de infecção. FEILIJ e cols. (1983) descreveram que realizando-se um microhematócrito do sangue do paciente com doença de Chagas na forma aguda, chega-se mais rápido ao diagnóstico, devido a maior concentração dos eritrócitos e dos parasitas.

Outros recursos para a demonstração direta do parasito são as análises de biópsias do chagoma, do linfonodo satélite e de músculo esquelético (RASSI e cols., 1982).

Dentre os processos indiretos de demonstração do **T. cruzi** destaca-se o **Xenodiagnóstico**, que consiste em fazer com que triatomíneos criados em laboratório se alimentem do sangue de pessoas que suspeitem ter a doença, e após 30 ou 60 dias analisa-se o conteúdo intestinal dos insetos. Devido às alergias causadas pelas picadas do triatomíneo no hospedeiro durante o xenodiagnóstico, desenvolveu-se métodos artificiais dos quais o que apresentou maior semelhança com o natural foi o feito com tripa de gado e sangue heparinizado. As reações alérgicas são mais acentuadas em países onde predomina o **R. prolixus** como vetor (CEDILLOS e cols., 1982).

A inoculação de animais sensíveis é positiva na grande maioria dos casos agudos, mas não nos crônicos. O mesmo ocorre com a **hemocultura** onde o meio mais usado atualmente é o LIT.

Vários métodos imunológicos para o diagnóstico da doença de Chagas foram descritos, e muitos não são usados na prática, sendo três os rotineiramente empregados: reação de fixação do complemento, imunofluorescência, e reação de hemaglutinação. Estes métodos apresentam alto grau de sensibilidade e especificidade, com resultados concordantes entre si e realizáveis através de técnicas qualitativas e quantitativas (RASSI e cols, 1982).

Muitas áreas endêmicas para doença de Chagas são também endêmicas para leishmaniose visceral e infecção por **T. rangeli**, podendo dar reações cruzadas nos testes sorológicos, por este motivo são necessários testes específicos com grande margem de segurança e pelo menos dois testes devem ser positivos para indicar um diagnós-



tico sorológico positivo para *T. cruzi*. Para estudos da doença de Chagas na fase crônica utiliza-se as reações de imunofluorescência, com 100% de positividade e de hemoaglutinação com 96,5% de positividade (CAMAROTA & STORINO, 1986; LEMESRE e cols., 1986). Estudos realizados com imunoeletroforese e dupla difusão também têm se mostrado representativos (AGUILERA e cols., 1986).

Na doença de Chagas crônica a presença de *T. cruzi* nos tecidos é rara e não é demonstrada por métodos de coloração histológica rotineiros (Hematoxilina-eosina), porém as técnicas de imunoperoxidase têm se mostrado mais eficientes e úteis para identificar reações cruzadas entre o antígeno de *T. cruzi* e o tecido do hospedeiro (BARBOSA e cols., 1986; LANDMAN e cols., 1986).

Os vários componentes da resposta imune entram em ação toda vez que um antígeno (Ag) é introduzido no organismo. Estes componentes podem agir independentemente ou interagir de maneira sinérgica ou antagônica. A resposta final depende do tipo de Ag, bem como de sua quantidade e via de inoculação. As reações de imunidade celular são mediadas exclusivamente por linfócitos T, havendo no decorrer do processo recrutamento de novas células, principalmente macrófagos. A produção de anticorpos (Ac) para o linfócito B pode requerer a participação ativa e inicial dos linfócitos T.

Os animais de sangue frio e as aves são refratários à infecções pelo *T. cruzi*, e esta imunidade natural é devida à existência de fatores líticos no soro destes vertebrados, fatores do complemento ativados pela via alternativa. Os mamíferos possuem pouca resistência natural, e desenvolvem mecanismos de imunidade que modulam as reações hospedeiro-parasito. A fagocitose é o principal mecanismo de defesa contra o *T. cruzi* onde os tripanosomas de baixa virulência seriam prontamente destruídos por macrófagos, e os de alta virulência sobreviveriam e multiplicar-se-iam no citoplasma dos macrófagos. Estudos experimentais em camundongos mostraram a fagocitose do *T. cruzi* muito aumentada por soro de Chagásicos crônicos, apresentando anticorpos líticos (LA), os quais estão associados com a resistência e infecção ativa, bem como a "Anticorpos sorológicos convencionais" (LSA) que são imunoglobulinas envolvidas na positividade dos testes sorológicos (LAGES-SILVA e cols., 1987).

Fagócitos mononucleares participam de lesões inflamatórias da doença de Chagas crônica humana, e alterações na capacidade



de gerar PCA (Activity procoagulant) foi mostrada em muitas patologias humanas e atribuídas a diferentes mecanismos. Um grupo de pacientes chagásicos analisado mostrou claras diferenças em sua habilidade de gerar PCA quando comparado com uma população de cardiopatas sem doença de Chagas e controles normais, segundo FERREIRA Jr e cols. (1986).

Os pacientes infectados por *T. cruzi* são hábeis para formar uma resposta imune celular e humoral contra o parasita, e evidências da autoimunidade concomitante têm sido apresentadas. Quando analisados como um grupo, pacientes chagásicos e controle não mostram diferenças quanto a linfócitos circulantes, mas há evidências de distribuição heterogênea das taxas de T4/T8 no grupo chagásico onde a variação é muitas vezes mais alta que no grupo controle. Os fenômenos imunoregulatórios, operando para o estabelecimento da cronicidade da doença e durante a fase crônica são complexos e alterações nos dois subtipos de linfócitos tem sido descritas em várias doenças (GATTAS e cols., 1984). Estudos com células T (fenótipo helper) em camundongo também mostram que estas células podem mediar algumas patologias associadas à doença de Chagas (JOSKOWICZ-HONTEBEYRIE e cols., 1987).

A formação de complexos imune circulantes (CIC) ocorre cada vez que um antígeno reage com seu específico anticorpo. Este é um fenômeno normal. Em circunstâncias particulares os CIC conduzem a manifestações patológicas. MARTIN e cols. (1987) mostraram um aumento significativo de CIC em chagásicos agudos e nos infectados crônicos, quando estudados em conjunto. No entanto, ao analisarem os cardiopatas separadamente contra grupo controle, não obtiveram diferenças significativas. Segundo CORRAL e cols. (1987), analisando pacientes chagásicos, encontraram que 100% dos agudos foram CIC-IgG e somente 68% dos crônicos foram CIC-IgG positivos. CIC-IgM não foi encontrado em pacientes chagásicos crônicos e pode ser considerado como um marcador imunológico da infecção aguda.

Proteínas que regulam a ativação do complemento estão presentes no plasma e na membrana de muitas células do sangue. O primeiro sítio de regulação da ativação do complemento são as convertases C da via clássica e alternativa.

Formas tripomastigotas do *T. cruzi* apresentam na superfície celular componentes que interferem com a ativação do complemen-



to e que podem ser removidos por tratamento enzimático, e sua atividade pode ser bloqueada por IgG específicas ou fragmentos destes anticorpos. Essas substâncias são chamadas de TDAF (trypomastigote decay accelerating factor) são consideradas importantes mecanismos de proteção contra a lise e podem explicar a resistência das formas tripomastigotas à lise pela via alternativa na ausência de anticorpo específicos, ou por anticorpos monoclonais específicos, que são algumas vezes, hábeis para ativar a via clássica (KIPNIS e cols., 1986).

MARTIN e cols. (1986) demonstraram a presença de valores aumentados de IgE específica e total em pacientes com doença de Chagas aguda e crônica sugerindo a existência de mecanismos de proteção mediados por esta imunoglobulina, semelhantes aos que ocorrem em outras parasitoses.

1.3.7. Epidemiologia e controle da doença

A tripanosomíase americana era, inicialmente, uma enzootia exclusiva de animais silvestres e transmitida por triatomíneos silvestres. Com o correr do tempo e com a desagregação do ambiente natural, e contato do homem com focos naturais, tornou-se uma zoonose. Ocorreu então a invasão domiciliar e adaptação de algumas espécies de triatomíneos aos domicílios levando com eles o *T. cruzi*, formando ecótopos artificiais. Em consequência da grande susceptibilidade do homem e de certos animais domésticos, principalmente cão e gato, e da grande proliferação dos triatomíneos nos ecótopos artificiais, o parasitismo humano se difundiu e o ciclo domiciliar da infecção assumiu extraordinária importância.

Hoje a doença de Chagas constitui um dos maiores problemas de saúde pública em nosso país e também em outros países Sul-Americanos, provavelmente pela ampla distribuição, altos índices de prevalência e gravidade de evolução. Embora constitua problema urbano, a doença de Chagas é principalmente uma endemia rural. Quando se fala em doença de Chagas logo relacionamos precária condição sócio-econômica e cultural, problemas de habitação, saneamento e educação, sendo também um problema social.

Para que a domiciliação do barbeiro se processe, dois fatores são necessários.

1o. redução da fauna silvestre, forçando os barbeiros a procurarem novas fontes de alimentação.

2o. existência de um tipo de habitação humana que ofereça aos insetos condições de colonização.

A doença de Chagas é a segunda doença mais prevalente, depois da malária, e uma das mais antigas também. Foram encontrados vestígios de doença de Chagas em 35 múmias exumadas, no deserto chileno, com datação de 470 a 600 AC (ROTHHAMMER e cols., 1985).

A doença de Chagas segue uma linha de distribuição dos vetores e da fauna silvestre que constitui o reservatório natural do *T. cruzi* (figura 5). Existem áreas em que a transmissão ainda não se estabeleceu, mas são potencialmente chagásicas porque ocorre a domiciliação dos vetores, porém não infectados (AMORIM, 1979).

No Brasil, a presença de triatomíneos atinge extensa faixa territorial que vai do Maranhão ao Rio Grande do Sul e daí para o centro-oeste em mais de 1200 municípios; na região Amazônica são encontrados em seus ecótopos naturais. A área de dispersão dos triatomíneos cobre cerca de 2 milhões de quilômetros quadrados em áreas descontínuas (figura 6).

A endemia é prevalente em 16 estados brasileiros, e basicamente onde há triatomíneos domiciliados (DIAS, 1981). Segundo CAMARGO (1984) e SILVEIRA (1983), a estimativa da doença de Chagas nos estados brasileiros é a constante no quadro 6 e a prevalência média no Brasil é de 4,2%.

Uma sinopse de distribuição geográfica no nosso continente, é apresentada abaixo:

Estados Unidos: não há domiciliação do triatomíneo e os casos de infecção humana são esporádicos, com índice de 0,43% (BARRETO, 1979).

México: grande número de triatomíneos domiciliados, e os casos se distribuem pelo país com evidências variáveis, indicando áreas endêmicas e também resultados no controle aos triatomíneos. O índice de infecção estimado foi de 8,5% (BARRETO, 1979; GOLDSMITH e cols., 1985; CORTEZ e cols., 1986; TAY e cols., 1986).

América Central: ocorre em todos os países e os casos de infecção humana aumentam à medida que as pesquisas se intensificam. Na Guatemala o índice global é de 14,02%; El Salvador, 7 a 14% na área urbana e 17-47% na área rural; Belize tem índice de 2,7%;

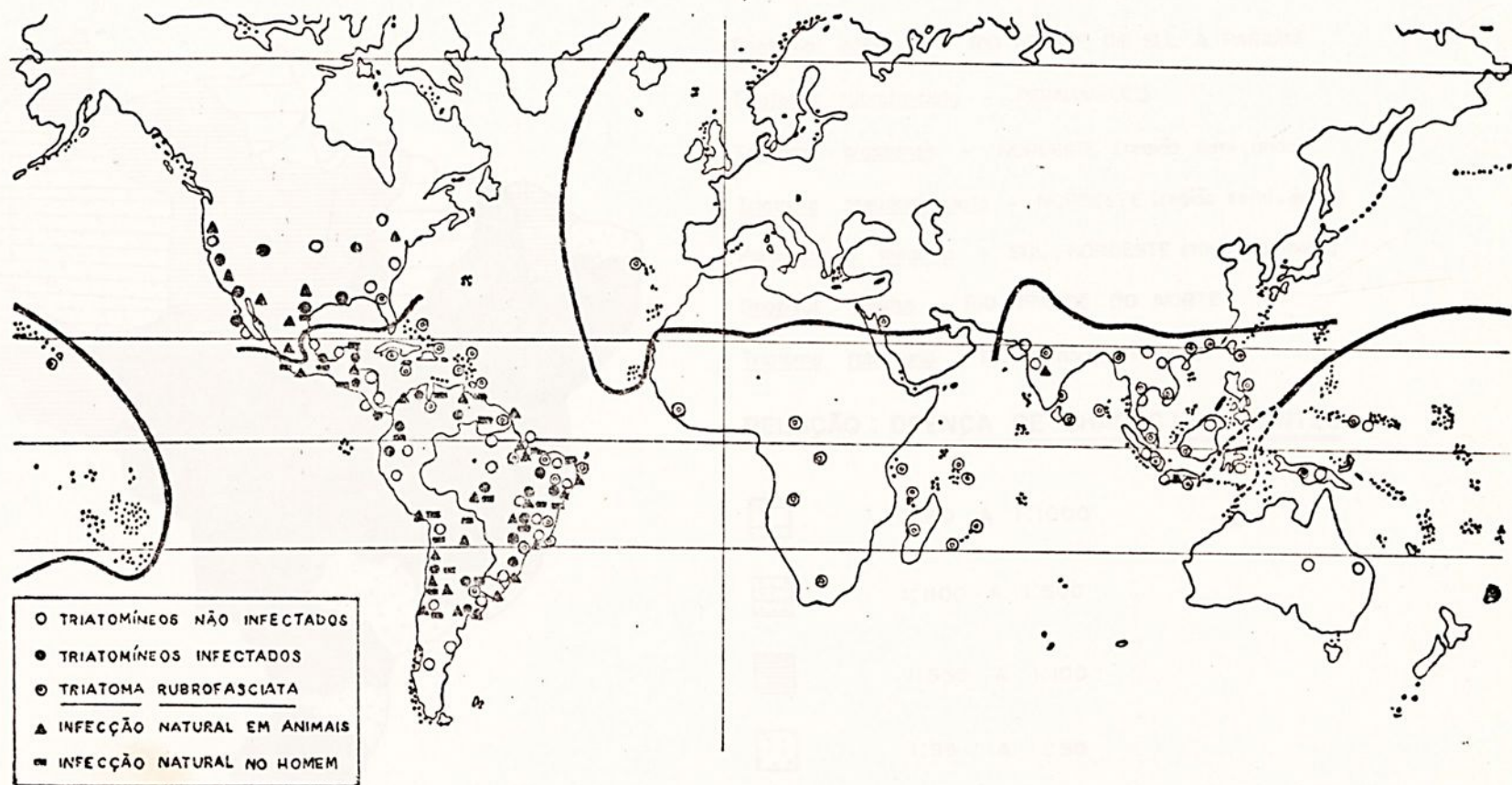


FIGURA 5. Distribuição geográfica da doença de Chagas



FIGURA 6. Distribuição da doença de Chagas no Brasil

PRINCIPAIS VETORES - REGIÕES DE DISPERSÃO

Triatoma infestans - RIO GRANDE DO SUL À PARAÍBA

Triatoma rubrofasciatu - PERNAMBUCO

Triatoma brasiliensis - NORDESTE (região semi-árida)

Triatoma pseudomaculata - NORDESTE (região semi-árida)

Panstrongylus megistus - SUL, NORDESTE (zona da mata)

Rhodnius nasutus - RIO GRANDE DO NORTE

Triatoma rubrovaria - RIO GRANDE DO SUL

RELAÇÃO : DOENÇA DE CHAGAS : HABITANTES

	ZERO A 1:1000
	1:1100 A 1:500
	1:550 A 1:100
	1:99 A 1:50
	1:49 A 1:10

Quadro 6- Porcentagem de doença de Chagas nos estados brasileiros

Unidade da federação	prevalência de doença de Chagas (%)
Amapá	0,0
Maranhão	0,1
Roraima	0,3
Espírito Santo	0,3
Rondônia	0,4
Pará	0,5
Ceará	0,8
Santa Catarina	1,4
Rio de Janeiro	1,7
Rio Grande do Norte	1,8
Amazonas	1,9
Acre	2,4
Alagoas	2,5
Mato Grosso do Sul	2,5
Pernambuco	2,8
Mato Grosso	2,8
Paraíba	3,5
Paraná	4,0
Piauí	4,0
Bahia	5,4
Sergipe	6,0
Distrito Federal	6,1
Goiás	7,4
Minas Gerais	8,8
Rio Grande do Sul	8,8
São Paulo	12,3

Modificado de SILVEIRA (1983)

Honduras há prevalência de 28 a 36,8%; Nicarágua, prevalência de 10% entre os moradores periurbanos e, chega a 40% nas áreas mais pobres e rurais; e Costa Rica com índices de infecção de 11,70% (BARRETO, 1979; KIRCHHOFF e cols., 1987a).

Panamá: a infecção chagásica ocorre em quase todo o país sendo mais frequente em zonas rurais, e os índices de infecção variam muito, sendo o global de 1,86% (BARRETO, 1979).

Colômbia: a infecção ocorre em quase todo o país sendo mais frequente na região de Catumbá e planícies da região leste; nas regiões do Atlântico e do Pacífico é menos comum e praticamente inexistente na região sul (BARRETO, 1979).

Venezuela: atinge principalmente a zona rural e o índice global de infecção é de 45,25% (BARRETO, 1979).

Equador: prevalência de 14,2% (BARRETO, 19679).

Peru: a área de maior proporção endêmica coincide com a área de distribuição do *Triatoma infestans* e o índice global é de 24,2% (BARRETO, 1979).

Bolívia: 23% de resultados positivos nos inquéritos sorológicos tendo como principal vetor o *T. infestans* (BARRETO, 1979).

Paraguai: os índices são variáveis entre 2 e 33% e atinge sobretudo a área rural (BARRETO, 1979).

Uruguai: taxa de positividade de reações de 25,2% (BARRETO, 1979).

Argentina: muitas investigações sorológicas têm sido feitas na Argentina e um amplo controle de triatomíneos também. A doença existe em praticamente todo o território sendo maior nas províncias do norte e noroeste. A incidência de animais domésticos infectados também é grande, e segundo dados de 1981 a porcentagem da doença humana no país é de 5,78%, tendo-se obtido um bom resultado com o programa de controle da doença (BARRETO, 1979; SEGURA e cols., 1985; WISNIVESKY-COLLI e cols., 1985; GÜRTLER e cols., 1987).

Chile: a doença de Chagas neste país tem sido muito estudada e sua distribuição é ampla, sendo endêmica na área central e nordeste. A taxa de infecção global do país é de 34,3% (BARRETO, 1979; APT e cols., 1983; APT & REYES, 1986).

Novas tecnologias estão sendo usadas para estudos epidemiológicos de tripanosomíases, especialmente o estudo de isoenzimas

como marcadores genéticos, a análise de DNA e anticorpos monoclonais. São exploradas à diferentes níveis de investigação epidemiológica como por exemplo, formas de diagnóstico, determinação de diferenças clínicas na doença, que podem ser devido à variações no parasita, elucidação dos ciclos de transmissão, e investigação das relações taxonômicas (GIBSON, 1985).

A estratégia da luta contra a doença de Chagas é a interrupção do ciclo de transmissão com a eliminação do triatomíneo. Usa-se borrifação com inseticidas e posterior controle, com a participação da comunidade. Programas de esclarecimento e educação também são realizados visando a melhoria das condições de vida. Os programas de controle da doença de Chagas têm-se mostrado eficientes e conseguiu-se reduzir o índice de infecção em áreas endêmicas à níveis controláveis, tanto no Brasil como em outros países da América Latina (PETANA; 1980; DIAS & DIAS, 1983; ACQUATELLA e cols., 1987).

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de descobrir drogas eficazes na cura da doença de Chagas (destruição do parasita) mas com poucos efeitos colaterais. Antigamente utilizava-se derivados quinolênicos como primaquina, pentaquina e outros, mas todos ineficazes. Os nitrofuranos foram bem tolerados e na fase aguda da doença fazem desaparecer a parasitemia e às vezes negativam a sorologia. Nos casos crônicos a sorologia é sempre positiva; no entanto, apresentam reações colaterais. Estudos com DL-alfa-difluorometilornitina, inibidor da biossíntese de poliaminas, foi testado em pacientes infectados por *T. gambiensi*s e mostrou resultados satisfatórios e sem tantos efeitos colaterais. O uso de clomipamina na fase aguda da doença atua na motilidade de formas epimastigotas e tripomastigotas. O Benzonidazol mostrou bons resultados mas com bastante efeitos colaterais alérgicos. Estudos sobre o efeito mutagênico do Benzonidazol sobre linfócitos humanos não foram positivos, e portanto as duas drogas efetivas contra a doença de Chagas na fase aguda são nifurtimox (nitrofurano) e Benzonidazol, apesar dos efeitos tóxicos relacionados à biotransformação nitrorredutora (PRATA, 1978; PESSOA & MARTINS, 1982; BRENER, 1984; AGUILAR e cols., 1987; BARIOGLIO e cols., 1987; TAELEMAN e cols., 1987; SANTOS & TAKAHASHI, 1988). Ambos os medicamentos mostraram efeitos clastogênicos durante tratamento, com elevada porcentagem de micronúcleos e sítios frágeis



em populações estudadas (MOYA & TROMBOTTO, 1988).

I.4. Marcadores genéticos e doenças

Vários polimorfismos conhecidos no sangue humano, são usados como marcadores genéticos de algumas patologias, bem como para elucidar problemas genéticos.

A "utilidade" de um polimorfismo corresponde à probabilidade que ele tem de distinguir os indivíduos escolhidos ao acaso; é medida como um menos a soma dos quadrados das frequências fenotípicas, que é, evidentemente, a probabilidade de que duas amostras ao acaso não tenham o mesmo fenótipo (THOMPSON & THOMPSON, 1981).

As informações que os marcadores genéticos gradativamente nos fornece, nos dão provas objetivas sobre origem de populações, migrações, mistura de raças e genes. Estas informações podem ser obtidas inclusive em alguns trabalhos realizados na população brasileira, a qual é produto de fusão de distintos elementos raciais (FRANCO e cols., 1982; HAMEL e cols., 1984; FRANCO & SALZANO, 1985; HAAS e cols., 1985; CONCEIÇÃO e cols., 1987).

Os marcadores genéticos podem também estar associados a doenças, e neste caso usa-se tanto os mais conhecidos como grupo sanguíneo e fator Rh como os marcadores genéticos do soro. A glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) é altamente polimórfica e tem sido associada a alguns tumores (BEUTLER, 1980).

A fosfatase alcalina está ligada a carcinoma hepatocelular e a fosfatase alcalina intestinal é mais frequente no soro de indivíduos do grupo sanguíneo O ou B do que no soro de pessoas do grupo sanguíneo A (TASWELL & JEFFERS, 1963; WARNOCK & REISMAN, 1969; HIGASHINO e cols., 1972; BAYER e cols., 1980).

Marcadores como grupos sanguíneos, haptoglobinas, hemoglobinas, HLA e G6PD são usados em algumas doenças como esquizofrenia e distúrbios afetivos, na tentativa de estabelecer um modo de herança para essas doenças; e em outras como diabetes, malária e câncer de pulmão, determinar alguns marcadores mais frequentes (JOLLY e cols., 1969; SANTOS e cols., 1983; RUDDUCK e cols., 1984; BALGIR, 1986; BECKMAN e cols., 1986; MC GUFFIN & STURT, 1986).

Em geral, o padrão de proteínas séricas, identificado por eletroforese e cromatografia pode ser usado na identificação de diferentes estágios de doenças. Não há variação no padrão básico



controlado a nível gênico. A quantidade pode estar alterada em casos particulares onde o substrato ou o produto final do gene foi afetado. A correlação de um genótipo particular com uma determinada doença é rara, desde que o genótipo estabelecido não origine defeitos maiores ou letalidade (SWAIN e cols., 1980).

Há três explicações possíveis para associações entre um marcador genético e uma determinada doença:

- Estratificação étnica: A doença poderia ser mais comum em determinados grupos étnicos.

- Causa direta: A suscetibilidade à doença poderia ser uma consequência direta da presença do alelo em particular.

- Desequilíbrio de ligação: A suscetibilidade para a doença poderia ser determinada por um alelo em um locus próximo, que apresente desequilíbrio de ligação com o locus do marcador associado à doença (THOMPSON & THOMPSON, 1981).

II. OBJETIVOS

Os vários aspectos da relação entre hospedeiro e parasita, na doença de Chagas, que culminam com a instalação de uma doença polimórfica, com vários graus de gravidade, ainda permanecem obscuros. Soma-se ainda o fato do desenvolvimento do quadro da doença ser diferente entre os chagásicos. Estas variações de ordem individual com prevalências geográficas nitidamente diferenciáveis também são observadas nos polimorfismos genéticos, notadamente entre hemoglobinas anormais e tipos de haptoglobinas.

Alguns tipos de hemoglobinas aparecem mais frequentemente aumentadas em determinadas patologias, como malária, hepatite viral, eritroleucemia, mieloma múltiplo, entre outras, podendo ser associadas a elas.

O presente trabalho tem por objetivos:

1. Determinar a frequência de hemoglobinas normais e anormais em portadores da doença de Chagas comparados com grupo controle.
2. Estabelecer os valores de hemoglobinas A_2 e Fetal nos portadores de Chagas, em comparação com indivíduos sem a doença.
3. Determinar a frequência de fenótipos de haptoglobinas em um grupo chagásico comparando os valores com um grupo sem esta patologia.

III. MATERIAL E METODOS

III.1. MATERIAL

O presente trabalho foi elaborado duas fases distintas. Na primeira procuramos estabelecer prevalências gerais das hemoglobinas anormais, talassemias e quantificação de hemoglobinas A_2 e Fetal em portadores de doença de Chagas. Na segunda fase realizamos testes específicos necessários para comprovação de alguns resultados obtidos na fase anterior.

Durante a primeira fase foram analisadas 1.607 amostras provenientes do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto. Deste total 247 eram portadores de doença de Chagas, previamente comprovados por testes sorológicos, e 1.360 não eram portadores de Chagas. Analisou-se, também, 1.000 amostras de sangue de estudantes de segundo grau das escolas oficiais de São José do Rio Preto.

A segunda fase consistiu da análise de pacientes com doença de Chagas, diferenciados conforme o tipo de manifestação da patologia: **forma crônica**, caracterizada em portadores de miocardiopatia (31 amostras), e portadores da forma digestiva (29 amostras); **forma indeterminada**, caracterizada por aqueles pacientes com sorologia positiva para Chagas, sem manifestação clínica da doença (30 amostras).

Para efeito de comparação de resultados analisou-se um grupo controle constituído por 42 pessoas portadores das mesmas manifestações patológicas (miocardiopatia, megacolon e megaesôfago), porém com sorologia para doença de Chagas negativa.

Em todos estes 132 pacientes foram realizadas triagens completas para hemoglobinas anormais, talassemias, dosagens de

hemoglobina A₂ e fetal, hematimetria e eletroforese para verificação de fenótipos de haptoglobinas.

III.2. Coleta

Foram retirados de cada pessoa 10 ml de sangue por punção venosa dos quais 5 ml foram colocados em tubos contendo EDTA a 10% e os outros 5 ml em tubo sem anticoagulante. Dos frascos sem anticoagulante foi separado o soro utilizado nos testes sorológicos de imunofluorescência (ALVAREZ e cols, 1958), hemaglutinação (NEAL & MILES, 1970) e fixação de complemento (FREITAS, 1951) e também para fenótipos de haptoglobinas. As amostras com anticoagulante foram encaminhadas ao Centro de Referência de Hemoglobinas para triagens de hemoglobinas anormais e talassemias. Das amostras analisadas (portadores e não-portadores de Chagas) foram separados aleatoriamente 50 pessoas de cada grupo para verificação dos níveis de hemoglobinas A₂ e Fetal.

III.3. Métodos

A. Detecção de doença de Chagas

Os portadores de doença de Chagas foram confirmados pelos testes de hemaglutinação passiva, imunofluorescência e fixação de complemento.

A1. HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA (CAMARGO e cols., 1973)

Este teste geralmente é utilizado para triagem em Bancos de Sangue.

Consiste de:

a. Formolização de Hemácias

Usar hemácias tipo O Rh negativo, estabilizadas em Alsever. Lavar três vezes com solução salina 0,85%, e após a última lavagem, ressuspender a papa de hemácias a 10% em solução tamponada de fosfatos pH 7,3 (PBS). Adicionar lentamente e com constante agitação, igual volume de formalina a 10% em PBS. Esta mistura é mantida a 37° C por 15 a 18 horas.



Após este período as hemácias são lavadas com tampão PBS três vezes para a retirada do formaldeído, e a papa de hemácias é ressuspensa em PBS (contendo formalina a 4%), de modo a obter uma suspensão final a 20%.

b. Sensibilização de hemácias formolizadas com antígeno protéico de *T. cruzi*.

b.1. Reagentes:

1. Ácido tânico P.A.

Solução a 1:15000 em solução fisiológica

2. Solução fosfatada tamponada (PBS) 0,15 M pH 6,4

NaCl	4,250 g
Na ₂ HPO ₄ anidro	3,80 g
KH ₂ PO ₄ anidro	6,60 g
H ₂ O dest. q.s.p.	1000 ml

Dissolver os sais em água destilada, medir o pH e completar o volume.

3. Solução fisiológica

NaCl a 0,15 M

4. Solução estabilizante a 2,7%

glicina	4,0 g
mertiolato	0,1 g
tioglicolato	0,1 g
leite molico	2,5 g
glutamato sódio	2,0 g
PBS 0,15 M - pH 6,4	100 ml

Após dissolver os reagentes, deixar a suspensão à temperatura ambiente durante 1 hora, para estabilizar e centrifugar a 5000 rpm durante 15 minutos.

5. Glutaraldeído (Merck)

Solução a 0,1% em solução fisiológica.

b.2. Sensibilização:

1a. etapa: taninização das hemácias

A partir da suspensão de hemácias formolizadas a 20%, preparar uma suspensão a 2%. Lavar as hemácias formolizadas por 3

vezes com solução fisiológica ou PBS pH 7,2 para retirar a formalina. A um volume de hemácias a 2%, adicionar o mesmo volume de solução de ácido tânico a 1:15000, incubar em banho-maria a 56° C durante 10 minutos, com agitação, e lavar 3 vezes com solução fisiológica.

2a. etapa: sensibilização da hemácia com antígeno.

Ao sedimento de hemácias obtido na 1a. etapa adicionar o mesmo volume de extrato diluído de antígeno protéico de *T. cruzi* (o antígeno deve ser diluído em PBS 0,15 M - pH 6,4). Incubar em banho-maria a 37° C por 50 minutos com agitação. Adicionar o mesmo volume de glutaraldeído a 0,1%, manter com agitação a 37° C por 20 minutos e lavar 2 vezes com solução fisiológica.

b.3. Procedimento do teste:

- Em placa de microtitulação, distribuir 0,025 ml de tampão diluidor em cada cavidade de duas fileiras para cada soro em exame.
- Com a alça microtituladora, retirar 0,025 ml de soro e colocar na primeira cavidade das duas fileiras.
- Com a alça diluidora, homogenizar bem e transferir uma gota (0,025 ml) da primeira cavidade para a segunda e assim sucessivamente até a oitava cavidade, obtendo-se deste modo diluições de 1:2; 1:4; 1:8 até 1:256 em ambas as fileiras.
- Adicionar 0,025 ml de hemácia sensibilizada com antígenos em todas as cavidades da primeira fileira e 0,025 ml de hemácias controle em todas as cavidades da segunda fileira.
- Agitar a placa delicadamente.
- Incubar em local firme e nivelado à temperatura ambiente por 1 a 2 horas.
- Efetuar a leitura, lembrando sempre de colocar testemunhos positivos e negativos. O resultado é considerado não reagente se ocorrer sedimentação como um botão no fundo da placa.

Os soros positivos aglutinam as hemácias e estas sedimentam como rede cobrindo todo o fundo do orifício.

Os anticorpos para esta reação, aparecem 6 a 12 semanas após a infecção pelo *T. cruzi*. Os títulos até 1:16 são interpretados como negativos. Títulos de 1:16 a 1:64 devem ser testados com outras provas sorológicas para Chagas. Títulos acima de 1:64 indicam infecção.

A.2. Reação de Imunofluorescência para tripanosomíase americana (ALVAREZ e cols., 1958, modificado).

Esta técnica é utilizada para o diagnóstico da doença de Chagas em grande parte dos laboratórios clínicos.

a. Reagentes:

a.1. Meio de cultura líquido, para *Trypanosoma cruzi* (L.I.T.)

Componentes:

1. Infusão de fígado (Difco)	6,0 g
triptose	10,0 g
NaCl	8,0 g
KCl	0,8 g
Na ₂ HPO ₄ anidro	13,0 g
Dextrose	2,0 g

2. Soro de vitela

3. Solução de hemoglobina (hemácias de boi)

Lavar por três vezes com solução salina e lisar o volume de papa com nove volumes de água. Centrifugar por 20 minutos a 2.000 rpm. Conservar distribuída e congelada.

Preparo:

Dissolver separadamente, em volumes de cerca de 700 ml de água, a infusão de fígado e a triptose. A parte dissolver os sais; misturar as três soluções e completar o volume para 2.000 ml. Adicionar 100 a 200 ml de soro de vitela, aquecer a mistura a 56° C por uma hora, agitando algumas vezes, e deixar esfriar. Adicionar 40 ml da solução de hemoglobinas, ajustar o pH a 7,2, e conservar congelado. Para uso, esterilizar por filtração em Seitz, e fazer teste de esterilidade por 48 horas a 37° C.

a.2. Preparo de Antígeno

Cultivar *T. cruzi* durante 10 dias em meio líquido (LIT), e lavar por 3 vezes em PBS. O sedimento é suspenso em formalina a 2% em PBS e mantido por 24 horas em temperatura ambiente. Após este período centrifuga-se, suspende-se em dextran a 6% em salina, distribui-se em frascos e liofiliza-se.

b. Procedimento:

- Reconstituir o antígeno liofilizado adicionando 1 ml de água destilada.
- Preparar lâminas, depositando pequenas gotas da solução de antígenos sobre as regiões demarcadas. Retirar o excesso de líquido, deixando apenas uma película sobre a lâmina. Secar ao ar, montar com glicerina e lamínula e observar ao microscópio. As lâminas devem conter cerca de 10 a 30 flagelados por campo. As lâminas que não forem usadas poderão ser guardadas em congelador e aquecidas à temperatura ambiente no momento do uso.
- Inativar os soros 30 minutos a 56° C e diluí-los a 1/20 em PBS.
- Incubar por 30 minutos a 37° C as diluições dos soros sobre as áreas antigênicas, em câmara úmida.
- Remover os soros das lâminas por uma lavagem rápida e depois mais duas de 10 minutos, em PBS.
- Enxugar o excesso de líquido das áreas antigênicas com papel de filtro e secar as lâminas com jatos de ar quente.
- Em cada área antigênica colocar 0,02 ml de conjugado contendo Azul de Evans a 1 mg%. Incubar a 37° C por 30 minutos em câmara úmida.
- Escorrer o excesso de conjugado e lavar as lâminas rapidamente por imersão e depois, duas vezes por 10 minutos, em PBS.
- Montar os preparados com glicerina alcalina e lamínula. Observar ao microscópio de fluorescência. As reações positivas se traduzem por fluorescência dos parasitas, localizada principalmente na periferia, tanto dos corpos quanto dos flagelos dos tripanosomas. Nas reações negativas os parasitas não mostram fluorescência, discretamente corados de vermelho, ou apresentam discretas fluorescências de localização intracelular e não periférica.

A.3. Fixação de Complemento (KOLMER e cols., 1951, modificado)

Reação utilizada para diagnóstico sorológico de casos suspeitos de moléstia de Chagas.

Princípio: O soro de doentes com moléstia de Chagas contém anticorpos específicos, que em presença do antígeno de *T cruzi* formam um complexo que fixa o complemento, tendo como



54
resultado a ausência de hemólise em face ao sistema hemolítico.

Reagentes:

- a. Antígeno **T. cruzi**
 - b. Glóbulos vermelhos de carneiro - suspensão de hemácias a 2%.
 - c. Hemolisina - geralmente soro de coelho ou outro animal, contra hemácias de carneiro.
 - d. Complemento - obtido de cobaio
 - e. Tampão veronal pH 7,4
- preparar diluição da hemolisina a 1:1.000 à partir da solução estoque:

tampão veronal pH 7,4	94 ml
fenol 5% em tampão veronal pH 7,4	4 ml
hemolisina glicerinada	2 ml

- Proceder à titulação da diluição de hemolisina a 1:1.000 que deverá ser empregada na reação numa diluição de 5 unidades em 0,5 ml.
- Proceder a titulação do complemento à partir de uma diluição de 1:30, adicionar o antígeno de **T. cruzi** observando a quantidade de hemólise das hemácias, para obter as unidades necessárias de complemento requeridas para a técnica.

Reação qualitativa

- a. Colocar 12 tubos em estante metálica e numerá-los.
- b. Os tubos 1 e 2 serão os tubos da reação propriamente dita, sendo o tubo de No.2 o controle do soro em exame.
- c. Tubos de Números 3 a 12 são controles do sistema hemolítico, do antígeno diluído, do complemento usado em várias unidades, dos soros reagentes e não-reagentes.
- d. Distribuir solução fisiológica tamponada com veronal pH 7,4 nos tubos.
- e. Distribuir soro do paciente, soro reagente e não-reagente.
- f. Distribuir o antígeno diluído de acordo com seu título.
- g. Homogenizar os tubos e deixar em repouso por 10 minutos; distribuir o complemento diluído, de acordo com seu título.
- h. Agitar e levar a banho maria, 37° C por 1 hora e 30 minutos.
- i. Distribuir 0,5ml de sistema hemolítico em todos os tubos (hemáceas de carneiro a 2% mais hemolisina diluída, volumes iguais, preparados 20 minutos antes do uso).

j. Agitar e levar ao banho maria 37°C por 30 minutos.

l. Fazer leitura da hemólise ou turvação dos tubos.

Os passos d,e,f,e g devem seguir o esquema do quadro 7.

Quadro 7. Reação de Fixação de Complemento

Tubos de Reação				Tubos de Controle							
		Sistema hemolítico		antígeno diluído	Controles do complemento				Controle +	Controle -	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Solução tampão Veronal (ml)											
-	0,25	0,85	0,1	0,25	0,48	0,60	0,73	-	0,25	-	0,25
Soro (ml)											
0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1
Antígeno * diluído(ml)											
0,25	-	-	0,25	-	-	-	-	0,25	-	0,25	-
Complemento diluído**											
0,5	0,5	-	0,5	0,5	0,37	0,25	0,17	0,5	0,5	0,5	0,5
Sistema hemolítico***											
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

* Deixar em repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente

** Agitar e levar ao banho maria a 37°C por 90 minutos; preparar o sistema hemolítico 20 minutos antes do uso

*** Agitar e levar ao banho maria 30 minutos 37°C

OBS: Modificação da técnica original.

Resultado e interpretação:

- a. O tubo testemunho do soro deve dar hemólise total.
 - b. O tubo testemunho do sistema hemolítico não deve apresentar hemólise.
 - c. O tubo testemunho do antígeno deve dar hemólise total.
 - d. Controle do complemento.
 - Tubo com 2,0 U de complemento - hemólise total
 - Tubo com 1,5 U de complemento - hemólise total
 - Tubo com 1,0 U de complemento - hemólise total
 - Tubo com 0,5 U de complemento - hemólise parcial ou ausência de hemólise.
- * Os soros fracamente reagentes ou reagentes devem ser titulados pela diluição do soro a 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; etc.

B. Para diagnosticar hemoglobinas anormais.

As amostras encaminhadas ao Centro de Referência de Hemoglobinas, foram submetidas a testes seletivos e específicos para hemoglobinas anormais.

B.1. Testes seletivos.

Os testes seletivos utilizados para a triagem de hemoglobinopatias e talassemias foram, eletroforese em agar-amido pH 8,6; resistência globular em NaCl a 0,36%; e análises da morfologia eritrocitária; descritos à seguir.

B.1.1- Resistência globular osmótica em cloreto de sódio a 0,36% (SILVESTRONI-BIANCO-1975).

Princípio:

É uma técnica utilizada para detectar talassemia beta principalmente na forma heterozigota, pois nestes casos os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise em solução de cloreto de sódio a 0,36%. A resistência globular não é específica para talassemia beta heterozigota, já que resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e outras hemoglobinopatias, como os heterozigotos para hemoglobina C. Cerca de 97% dos portadores de talassemia beta heterozigota apresentam positividade para

este teste.

Reagentes:

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

NaCl	9,0g
Na ₂ HPO ₄	1,36g
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	0,28g
H ₂ O q.s.p.	100ml

Solução trabalho

NaCl 10%	36ml
H ₂ O q.s.p.	1000ml

Procedimento

Em tubo de ensaio pequeno colocar 1,5 ml de solução de NaCl a 0,36% e 10 µl de sangue total. Agita-se por inversão, suavemente, e aguarda-se 10 minutos para leitura.

Interpretação

O tubo de ensaio com a amostra na solução de NaCl a 0,36% é colocado a 2,0 cm de uma folha branca com linhas negras. A resistência aumentada à hemólise torna a amostra opaca e as linhas negras não são visíveis. Em amostras com resistência à hemólise normal, as linhas são facilmente visualizadas através da solução.

As amostras com resistência aumentada são submetidas à exames posteriores para o diagnóstico da talassemia beta heterozigota, já que este é um teste seletivo.

B.1.2- Eletroforese em agar-amido, pH 8,6

(NAOUM e cols-1980)

Princípio: Esta técnica foi adaptada para estudos populacionais, pois possibilita a análise de 90 a 100 amostras por vez. Visualiza-se perfeitamente frações de hemoglobinas variantes, aumento de hemoglobinas A₂ e Fetal e a presença de metahemoglobina.

Reagentes:

Tampão Borato, pH 8,6

Solução estoque

Acido Bórico	18,6g
Hidróxido de Sódio	3,4g
Água destilada q.s.p	1000ml

Solução Trabalho *

Solução estoque	125ml
Água destilada	500ml

* Usado para os compartimentos eletrolíticos

Tampão Tris-Edta-Borato (TEB); pH 8,8

Solução estoque

Tris-hidroximetil-aminometano	10,1g
Acido Etileno diamino tetracético	1,0g
Acido Bórico	0,76g
Água destilada q.s.p	100ml

Solução trabalho: *

Solução estoque	4ml
Água destilada q.s.p	40ml

* Utilizado no preparo do gel

Gel de Agar-amido

Bacto Agar (Difco)	300mg
Arrozina	600mg
Maizena	600mg
Tampão TEB pH 8,8 (sol. trabalho)	40ml

Corante de Piramido

Piramido a 5% em etanol	5ml
Acido acético a 30%	5ml
Peróxido de hidrogênio (10 volumes)	2ml

Procedimento:

Em um erlenmeyer de 250ml aquecer os componentes do gel, em bico de bunsen até total dissolução do material, com ebulições

suaves. Distribuir o conteúdo em placa de gel própria, pr^e fixada com garras, em um suporte. Deixar em repouso até adquirir consistência.

Aplicar as amostras no gel, iniciando a 1,5 cm do cátodo e 1,0cm da extremidade esquerda da placa, com lâmina de aplicação. A quantidade de amostra introduzida no gel é de aproximadamente 0,2µl. O aplicador deve ser limpo em papel absorvente após cada aplicação.

Transferir a placa com as amostras aplicadas para a cuba de eletroforese e conectá-las ao tampão dos compartimentos eletrolíticos por meio de "perfex" triplo. Passar 300 Volts(50mA) por 30 a 40 minutos, a temperatura ambiente. Após a corrida eletroforética, analisar as frações sem e com coloração. Identificar os tubos cujas amostras apresentam alterações eletroforéticas. Para a identificação das frações alteradas consultar o mapa de disposição de hemoglobinas em eletroforese alcalina. (Figura 7)

B.1.3. Análise da morfologia eritrocitária

Em esfregaço sanguíneo, analisou-se o tamanho a forma e a coloração dos eritrócitos.

Os indivíduos portadores de talassemia beta heterozigota apresentam moderada anisopoiquilocitose com prevalência da microcitose e hipocromia facilmente visualizadas ao microscópio óptico.

Os Resultados foram divulgados da seguinte maneira:

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

B.2. Testes Específicos

Para melhor caracterização das hemoglobinas variantes e talassemias foram feitos testes específicos que serão descritos a seguir:

B.2.1. Eletroforese em acetato de celulose, pH8,6. (Método de MARENGO & ROOWE, 1965)

Técnica utilizada para qualificação e quantificação de



RELATIVE MOBILITIES OF HEMOGLOBINS ON CELLULOSE ACETATE (T.E.B. pH 8.6)

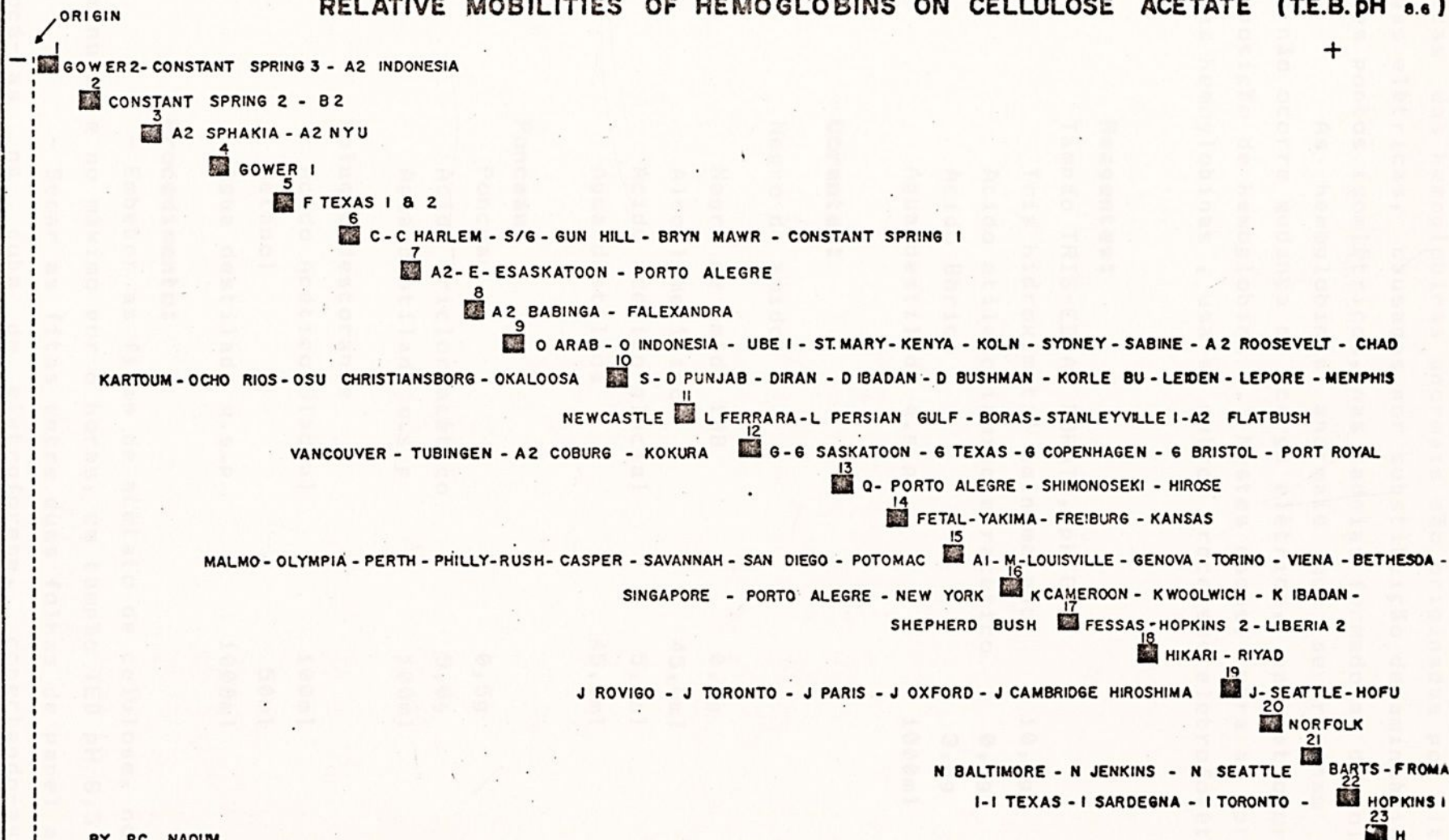


FIGURA 7 - Mobilidades relativas de 118 tipos de hemoglobinas humanas em eletroforese alcalina (T.E.B., pH = 8,6) em ágar - amido e acetato de celulose (NAOUM, 1979).

hemoglobinas normais e anormais. As diferentes mobilidades eletroforéticas das hemoglobinas anormais são originadas por alterações de cargas elétricas, causadas por substituição de aminoácidos de diferentes pontos isoelétricos, nas cadeias formadoras da molécula.

As hemoglobinas anormais que se originam de mutações onde não ocorre mudança de carga elétrica, na eletroforese, migram na posição de hemoglobina A. Nestes casos, para a caracterização destas hemoglobinas, usa-se outros processos eletroforéticos.

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA- BORATO, pH 8,5

Tris hidroximetil aminometano	10,2g
Acido etilenodiaminotetracético	0,6g
Acido Bórico	3,2g
Agua destilada q.s.p	1000ml

Corantes:

Negro de amido

Negro de amido 10B	0,6g
Alcool metílico	45,0ml
Acido acético glacial	5,0ml
Agua destilada	45,0ml

Ponceau

Ponceau	0,5g
Acido Tricloroacético	5,0g
Agua destilada q.s.p	100ml

Solução descorante

Acido Acético Glacial	100ml
Metanol	50ml
Agua destilada q.s.p	1000ml

Procedimento:

- Embeber as fitas de acetato de celulose, no mínimo por 15 minutos e no máximo por 6 horas, em tampão TEB pH 8,5
- Secar as fitas entre duas folhas de papel absorvente e colocá-las na cuba de eletroforese, conectando-as com os

compartimentos eletrolíticos através de tiras de papel mata-borrão.

- Aplicar as amostras de hemoglobinas a 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo.
- Passar 300 volts por 40 minutos.
- Analisar as frações sem coloração e posteriormente corar com negro de amido ou Ponceau, embebendo as fitas em um dos corantes por 15 minutos. Para descorá-las, embebê-las na solução descorante por 30 minutos, com agitação da vasilha.

Interpretação:

Consultar mapa de disposição de hemoglobinas em eletroforese alcalina. (Figura 7)

B.2.2- Eletroforese quantitativa em acetato de celulose, pH 8,5 (dosagem de hemoglobina A₂ - Método de MARENGO & ROWE 1965)

Princípio:

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

Reagentes:

São os mesmos utilizados na eletroforese em acetato de celulose pH 8,5, para análise qualitativa de hemoglobinas.

Procedimento:

- Aplicar 20 µl de solução de hemoglobinas com concentração entre 8 e 12 g%, em fitas de acetato de celulose com 5,7 cm de largura.
- Passar 300 volts por 40 minutos.
- Após a separação das frações de hemoglobina A₂ e A₁, 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 por duas a seis horas, com agitação periódica.
- Ler as densidades ópticas (D.O.) em 415 nm, usando á-



gua destilada como branco.

Cálculo:

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

Interpretação:

Os valores normais de hemoglobina A₂ situam-se na faixa de 2,5 a 3,7%

B.2.3- Eletroforese de diferenciação em Agar-Fosfato, pH 6,2. (Método de VELLA 1968)

Princípio:

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

Reagentes:

Tampão Fosfato, pH 6,2

Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel.

Na ₂ HPO ₄	2,02g
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	7,66g
Água destilada q.s.p	1000ml

Gel de Agar-Fosfato

Agar (Difco)	200mg
Tampão fosfato pH 6,2	20ml

Procedimento:

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

- Pipetar 3,5 ml do gel em lâminas de microscópio. Dei-

var gelificar à temperatura ambiente.

- Aplicar as amostras próximo à porção média da lâmina.
- Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos usar folha dupla de papel de filtro.
- Passar 100 volts por 20 minutos
- Analisar inicialmente sem corar.
- Para melhor interpretação das frações corar com Ponceau ou Negro de Amido.

Interpretação:

Consultar o mapa de diferenciação das disposições de hemoglobinas em eletroforese ácida. (Fig. 8)

B.2.4- Dosagem de hemoglobina Fetal (Método de BETKE e col., 1959)

Princípio:

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

Este método é sensível para detectar pequenas quantidades de hemoglobina Fetal. Concentrações acima de 1% refletem aumento de hemoglobina Fetal. Em sangue de cordão umbilical a quantidade da hemoglobina Fetal é aproximadamente 70 a 90%. Em indivíduos com anemia de Cooley e Ferrara a taxa desta hemoglobina oscila entre 70 a 98%; na interação talassemia/anemia falciforme, o valor varia entre 0,5 a 21,2%. Em 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

RELATIVE MOBILITIES OF SOME HEMOGLOBINS ON PHOSPHATE AGAR

pH 6.2

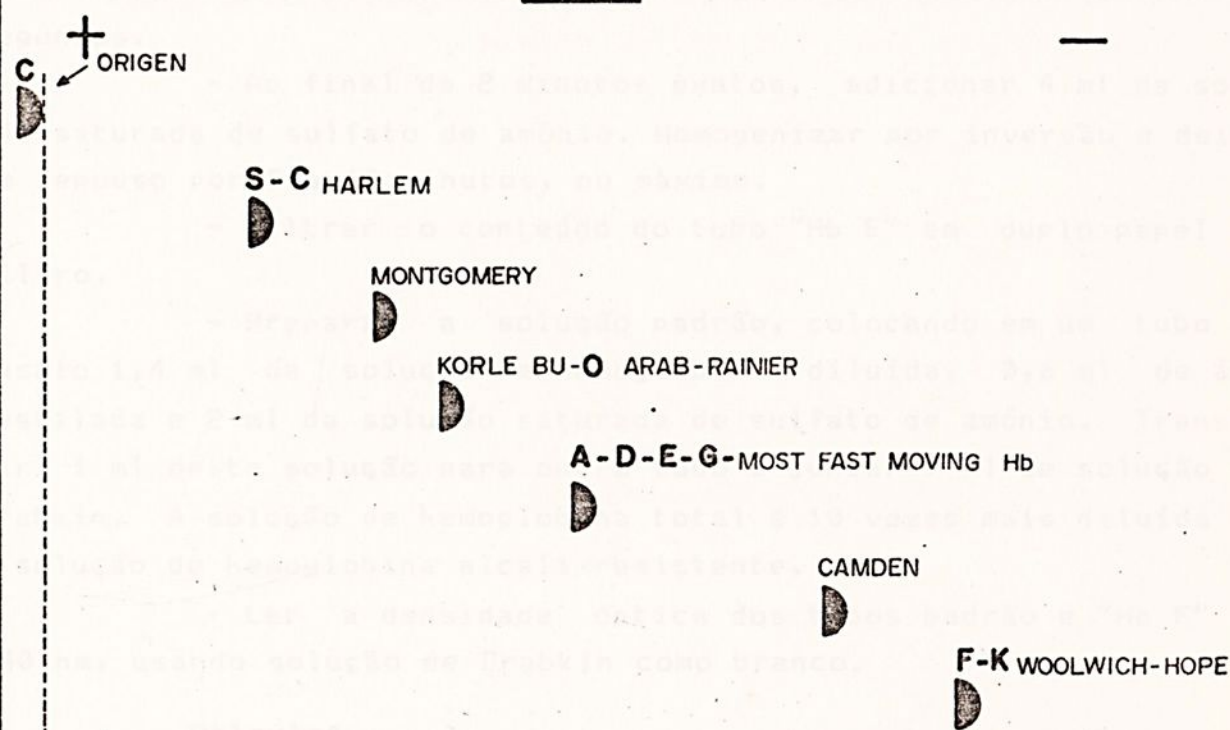


FIGURA 8 Mobilidades relativas dos tipos de hemoglobinas humanas que são diferenciáveis por eletroforese ácida, em ágar - fosfato, pH = 6,2 (NAOUM, 1979)

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 5,6ml da solução de hemoglobina diluída em um tubo rotulado "Hb F". Adicionar 0,4ml 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 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:

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

Interpretação:

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

B.2.5. Dosagem de hemoglobina A₂ por microcromatografia em coluna (SCHIMIDT 1976)

Princípio:

Em determinados sistemas tamponados, a interação de grupamentos carregados da molécula de hemoglobina permite a separação das diferentes frações que a compõem, quando submetida a



cromatografia de troca iônica.

Reagentes:

Tampão TRIS/KCN pH 8,3

TRIS	6,1g
KCN	0,1mg
Água Bi-destilada q.s.p	1000ml

Resina - DE-52 - celulose (Whatman)

DE-52	50g
Água Bi-destilada/tampão	600ml

Procedimento:

Preparo da celulose

Lavar a resina DE-52 celulose 2 vezes com água bi-destilada e 3 vezes com tampão TRIS/KCN, com pH não ajustado.

Ajustar o pH da resina preparada e do tampão em 8,3 com ácido acético glacial

Microcolunas:

As colunas devem ser de vidro com 1 cm de diâmetro e 20 cm de altura, confeccionadas como pipetas Pasteur. Na constricção colocar um chumaço de lã de vidro e montar a coluna de resina com 6 cm de altura.

Preparo do hemolisado diluído para a cromatografia

hemolisado	100 μ l
tampão TRIS/KCN pH 8,3	500 μ l

Cromatografia:

Deve ser realizada à temperatura ambiente.

Aplicar cuidadosamente no topo da coluna, 500 μ l de hemolisado diluído, e esperar absorção.

Colocar cuidadosamente na coluna, tampão TRIS/KCN, pH 8,3.

Coletar 10 ml do eluato, contendo a Hb A₂, já que esta é rapidamente separada da Hb A, e elui nos primeiros 10 ml.

Medir a absorbância do eluato (D.O.E) a 418 nm contra a absorbância do hemolisado total (D.O.T), preparado com 50 μ l do



hemolisado diluído em 10 ml do tampão TRIS/KCN pH 8,3

Cálculo:

$$\% \text{HbA}_2 = \frac{\text{D.O. E} \times 100}{\text{D.O. E} + (10 \times \text{D.O. T})}$$

Interpretação:

Os valores normais de hemoglobinas A₂ por este método situam-se na faixa de 1,8 a 2,9%

B.2.6- Pesquisa de agregados de hemoglobina H (Método de PAPAYANNOPOULOUS & STAMATAYANNOPOULOUS, 1974)

Princípio:

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

Regentes:

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 crezil brilhante

Azul cresil brilhante	1.0g
Solução salina	100ml
Solução citrato	25ml

Procedimento:

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

- Incubar o material a 37° C por 30 minutos.

- Fazer esfregaços finos e examinar ao microscópio em objetiva de imersão.

Interpretação:

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

C. Para caracterização de fenótipos de haptoglobinas

C.1. Eletroforese em gel de amido (Método de SMITHIES, 1955, modificado)

Princípio :

Um excesso de hemoglobina A, em concentração de 10g/%, é adicionado ao soro do paciente para formar o complexo haptoglobina - hemoglobina (Hp-Hb). Esta amostra é submetida a eletroforese em gel de amido, pH alcalino e após migração, os complexos dos diferentes fenótipos de HP-Hb, bem como a hemoglobina livre, são evidenciados por orto-dianisidina.

Reagentes

Solução tampão TRIS - EDTA - BORATO 1,42 M, pH 8,6 - usado para o preparo do gel de amido.

Tris	109,02g
EDTA	5,84g
Acido Bórico	30,92g
Água Destilada	1000ml

Solução trabalho (diluição 1:40)

Tampão TEB 1,42 M	7,5ml
Água Destilada q.s.p	300ml

Solução tampão borato 0,36M, pH 8,6 - usado para os compartimentos eletrolíticos

NaOH 1M	14ml
Água Destilada	1.750ml

Deixar dissolver até o dia seguinte.

Acertar o pH 8,6 com NaOH 1M.

Completar com água destilada para 2000 ml.

Preparo do amido

- utilizar amido hidrolisado da Refinações de Milho Brasil (Penetrose 30)

Realizar lavagens sucesivas de 20 minutos cada uma, à temperatura ambiente, na quantidade de 1 Kg de amido por litro de

solução:

Cloreto de Sódio	1g /l	1 vez
Cloreto de Sódio	0,5g /l	1 vez
água destilada		4 vezes
Acetona		3 vezes

- Após cada lavagem filtrar em funil de Buchner contendo papel de filtro e acoplado a bomba de vácuo. Trocar o papel sempre que necessário.

- Colocar em estufa a 60° C por 24 horas.

- Moer o amido com moinho de bola ou por rolagens de uma garrafa.

Solução reveladora de Orto-Dianizidina.

Orto- Dianizidina em Etanol a 1 g/%

Acido Acético até pH 4,0 ou 5,0

Água oxigenada 10 volumes (gotas)

Preparar esta solução no momento de uso.

Procedimento:

Preparo do gel de amido

- Utilizar amido 13 g/% em tampão TEB 1,42 M, pH 8,6, diluído 1:40

Dissolver bem o amido e levar diretamente a chama do bico de Bunsen com agitação constante. Após a gelificação da solução continuar o aquecimento, com agitação, por mais ou menos 4 minutos

- Retirar as bolhas de ar contidas no gel por meio de bomba de vácuo

- Despejar o gel ainda quente na ponte apropriada

- Após esfriar o gel a temperatura ambiente, cobrir o mesmo com papel celofane e deixar em geladeira até o dia seguinte.

Dimensões da ponte

A ponte é constituída por uma placa de vidro de 21,2cm x 15,2 cm x 0,3 cm, onde eram justapostas e fixadas com fita adesiva, duas molduras de acrílico de 1,2 cm de largura por 0,3 cm de espessura e cobrindo todas as laterais da placa de vidro. A área útil para o gel de amido é de 18,8 cm x 12,8 cm x 0,6 cm.

Preparo da amostra

Soro do paciente 0,15ml

Hemolisado normal a 10% 5 µl



Homogeneizar e levar a estufa a 37° C por uma hora, para facilitar o choque entre as moléculas de hemoglobina e haptoglobina na formação do complexo Hp-Hb.

Eletroforese

- Retirar a placa com o gel da geladeira e realizar fendas no gel de amido com lâminas de aço, de 14 mm de largura por 6 mm de profundidade, espaçadas umas das outras por 0,5 cm e distantes 3 cm da extremidade que fará contato com o polo negativo. A mais ou menos 7 cm da distância destas fendas, realizar outra série igual a esta.

- Embeber tiras de papel de filtro WHATMAN No. 3 de 14 mm x 6 mm na amostra e colocar as tiras nas fendas.

- Fazer conexão da ponte com os compartimentos eletrolíticos por intermédio de PERFEX duplo.

- Cobrir a placa com celofane para evitar evaporação

- Realizar eletroforese com 250 Volts por 5 horas em geladeira

Revelação

- Após corrida eletroforética, retirar as tiras de papel de filtro e cortar o gel de amido no sentido horizontal por meio de um fio de aço fino.

- Separar as frações do gel seccionado

- Corar a parte inferior com solução de Orto-Dianizidina por mais ou menos 10 minutos. As frações são inicialmente castanhas e passam a marrom escuro.

Transparentização

O gel de amido com as frações evidenciadas pode ser guardado em cuba de vidro com água por vários dias, ou ser transparentizado e conservado por muito tempo. A transparentização é realizada prensando-se o gel corado entre duas folhas de celofane incolor, colocado num bastidor e deixado secar em temperatura ambiente por 3 ou 4 dias.

Interpretação

Após separação eletroforética em gel de amido em pH alcalino e coloração das frações, podemos diferenciar os três fenótipos de haptoglobinas mais comuns (Figura 3).

Na anaptoglobinemia não se evidenciam frações de



haptoglobina.

D. Hematimetria

D.1. Contagem de eritrócitos

Realizamos contagem de eritrócitos (GV) por contador eletrônico (modelo - CC 200 Prb Cbsmos, com Diluidor DL 200) cujos valores normais para o sexo masculino estão entre 4,6 e 6,2 milhões e para o sexo feminino, 4,2 a 5,5, e dosagem de hemoglobinas (Hb), hematócrito (Ht), Volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), conforme o que segue:

D.2. Dosagem de hemoglobinas pelo método de cianometahemoglobina

Princípio: O ferricianeto de potássio transforma a hemoglobina em cianometahemoglobina. Todos os tipos de hemoglobinas exceto a sulfo hemoglobina, transformam-se em cianometahemoglobina.

Reagentes:

- Solução de Drabkin modificada

KH_2PO_4	0,14g
KCN	0,05g
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	0,20g
Água destilada q.s.p	1000ml

Método:

Colocar em tubo de ensaio 13 x 100 mm, 5 ml da solução de Drabkin

Acrescentar 0,02 ml de sangue, homogenizar o tubo por inversão e deixar em repouso por 10 minutos

Ler em 540 nm a absorbância da hemoglobina em solução.

Aplicar a fórmula:

$$\text{Hb g/dl} = \frac{F \times A_{540} \times 64,500}{44,0 \times d \times 10}$$

onde: F = fator de diluição = 250

A 540 = absorbância da solução em 540 nm

64,500 = peso molecular da hemoglobina

44,0 = E 540 (coeficiente de extinção milimolar da hemoglobina)

d = espessura em cm da solução na cubeta de leitura, com precisão de 3 decimais

10 = fator de conversão de 1 litro a 100 ml

valores normais: homens 14-18 g/dl; mulheres 12-16g/dl

D.3. Hematocrito (Ht): é realizado por leitura do tubo capilar após centrifugação em microcentrifuga à 5.000 rpm.

valores normais: homens 42-52%;

mulheres 37-47%

D.4. Índices hematimétricos: são encontrados segundo as fórmulas:

Volume Corpuscular Médio (VCM)

$$VCM = \frac{Ht}{GV} \times 10$$

valores normais: 82-92 fl

Hemoglobina Corpuscular média (HCM)

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

valores normais: 27-31 Pg

Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

$$CHCM = \frac{Hb}{Ht} \times 100$$

Valores normais: 30 - 35 g/dl



Tabela 1. Prevalência de hemoglobinas normais e anormais em portadores da doença de Chagas e nos grupos controle, detectadas por eletroforese.

IV. RESULTADOS

Foram analisadas um total de 2.739 amostras de sangue, sendo 337 obtidas de portadores de doença de Chagas comprovados por testes laboratoriais; 1.402 provenientes do grupo controle "A" formado por usuários do Instituto Adolfo Lutz, com testes sorológicos negativos para a doença de Chagas, e 1.000 amostras procedentes de estudantes de segundo grau de São José do Rio Preto, que constituem o grupo controle "B".

Os resultados globais da análise de prevalência de hemoglobinas normais e anormais obtidas por técnicas eletroforéticas, nos três grupos estudados, estão inseridos na tabela 1. Observa-se que nos portadores de doença de Chagas a presença de hemoglobinas anormais apresentou frequência de 16,62%, enquanto que no grupo controle "A" foi de 4,07%, e no grupo controle "B" de 1,4%.

A análise específica dos tipos de hemoglobinas anormais nos três grupos estudados revelaram que a HbA_2 com concentração aumentada foi aquela que representou maior grau de diferença, sendo estatisticamente significativa entre os chagásicos quando comparada com os grupos controle "A" e "B" ($\chi^2_0 = 85,45$; $\chi^2_{5\%} = 5,991$). A figura 9 exibe uma representação tridimensional das hemoglobinas anormais nestes três grupos estudados, revelando a alta prevalência de HbA_2 aumentada no grupo de portadores da doença de Chagas.

Tabela 1. Prevalência de hemoglobinas normais e anormais em portadores da doença de Chagas e nos grupos controle, detectadas por eletroforese.

Tipos de hemoglobinas	Portadores de doença de Chagas		Grupos Controle			
	nº	%	A*		B*	
			nº	%	nº	%
AA	281	(83,38)	1345	(95,93)	986	(98,6)
AS	5	(1,48)	27	(1,92)	5	(0,5)
AC	6	(1,78)	11	(0,78)	2	(0,2)
SS	-	-	1	(0,07)	-	-
CC	1	(0,29)	1	(0,07)	-	-
A2 aumentada	28	(8,30)	17	(1,21)	7	(0,7)
F aumentada	5	(1,48)	-	-	-	-
B2	1	(0,29)	-	-	-	-
AH	3	(0,89)	-	-	-	-
Total**	337	(100,00)	1402	(100,00)	1000	(100,00)

* grupo controle "A" - usuários do Instituto Adolfo Lutz, com sorologia negativa para doença de Chagas.

grupo controle "B" - estudantes de segundo grau de São José do Rio Preto.

** total analisado - 2.739 amostras.

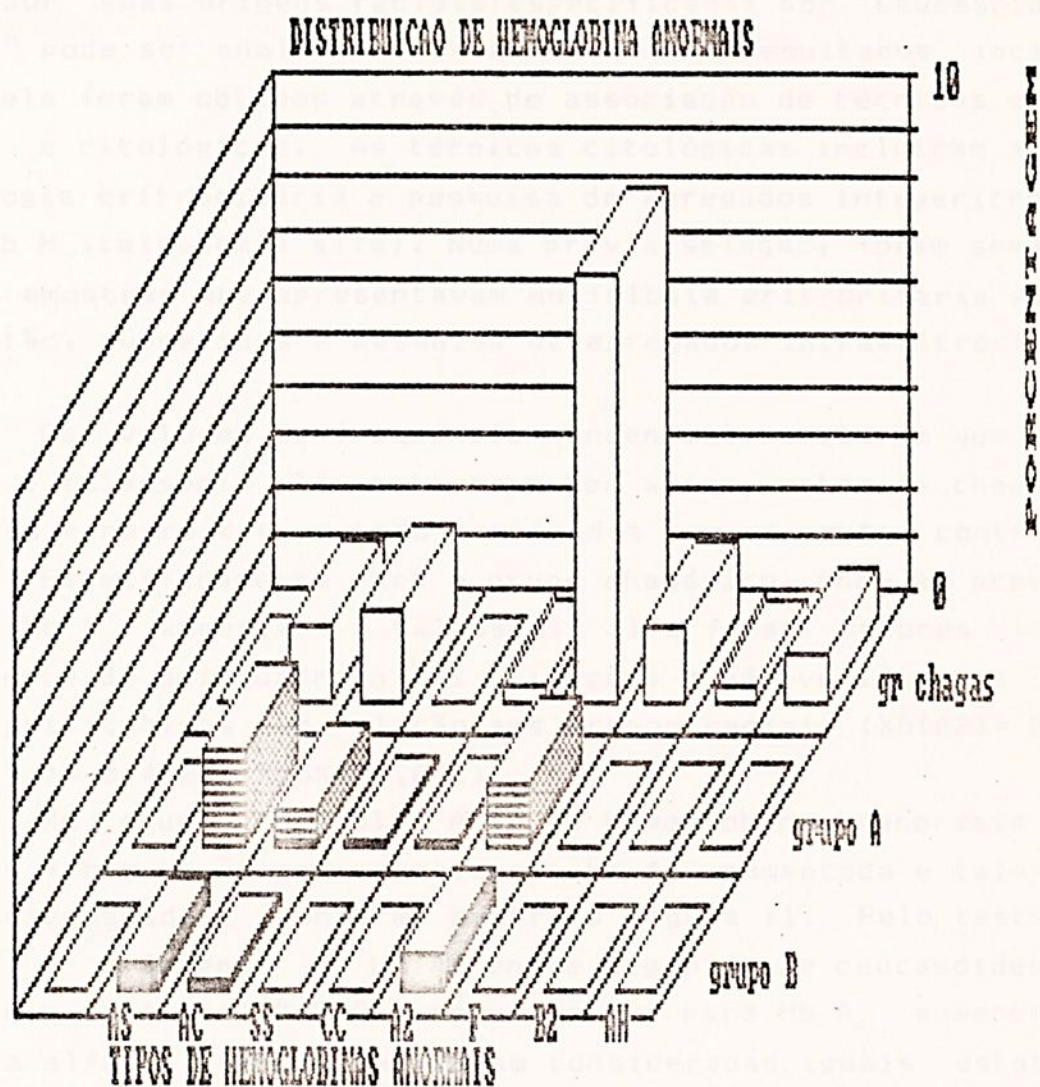


Figura 9. Representação gráfica de prevalência de hemoglobinas anormais nos três grupos estudados.

A diferenciação dos resultados obtidos da prevalência de hemoglobinas normais e anormais nos três grupos estudados, caracterizados por suas origens raciais especificadas por "Caucasbide" e "Negróbide" pode ser analisada na tabela 2. Os resultados incluídos nesta tabela foram obtidos através de associação de técnicas eletroforéticas e citológicas. As técnicas citológicas incluíram análise da morfologia eritrocitária e pesquisa de agregados intraeritrocitários de Hb H (talassemia alfa). Numa prévia seleção, foram separadas apenas as amostras que apresentavam morfologia eritrocitária alterada e, então, submetidas à pesquisa de agregados intraeritrocitários de Hb H.

Os valores de frequência percentual revelaram que Hb A₂ aumentada e talassemia alfa estiveram bem acima, entre os chagásicos caucasbides e negróbides, quando comparados com os grupos controles.

Especificamente para o grupo chagásico, onde as prevalências de Hb A₂ aumentada e talassemia alfa foram maiores (figura 10), o teste de Qui-quadrado foi utilizado e não verificamos diferenças significativas com relação aos grupos raciais ($\chi^2(A_2) = 2,225$; $\chi^2(\text{tal. alfa}) = 0,4525$; $\chi^2_{5\%} = 3,841$).

No grupo controle "A", as hemoglobinas anormais mais frequentes foram Hb AS nos negróbides, Hb A₂ aumentada e talassemia alfa nos caucasbides, conforme mostra a figura 11. Pelo teste Qui-quadrado, a diferença de Hb AS entre negróbides e caucasbides foi significativa ($\chi^2(AS) = 17,723$), enquanto que para Hb A₂ aumentada e talassemia alfa as frequências foram consideradas iguais estatisticamente nos dois grupos ($\chi^2(A_2) = 1,197$; $\chi^2(\text{tal. alfa}) = 1,093$; $\chi^2_{5\%} = 3,841$).

Tabela 2. Prevalência de hemoglobinas normais e anormais em portadores de doença de Chagas e grupos controle (A e B) diferenciados por origem racial (caucasóide e negróide).

Tipos de Hemoglobinas	Portadores da Doença de Chagas				Grupo Controle "A"				Grupo Controle "B"			
	caucasóide		negróide		caucasóide		negróide		caucasóide		negróide	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
AA	126	(79,24)	44	(70,96)	750	(97,78)	294	(92,74)	874	(98,42)	109	(97,32)
AS	4	(2,51)	-	(-)	5	(0,63)	15	(4,73)	4	(0,45)	1	(0,89)
AC	2	(1,25)	-	(-)	5	(0,63)	1	(0,31)	1	(0,11)	1	(0,89)
SS	-	(-)	-	(-)	-	(-)	1	(0,31)	-	(-)	-	(-)
CC	-	(-)	1	(1,61)	-	(-)	1	(0,31)	-	(-)	-	(-)
A2 aumentada	15	(9,73)	10	(16,12)	10	(1,27)	2	(0,63)	6	(0,67)	1	(0,89)
F aumentada	2	(1,25)	10	(16,12)	10	(1,27)	2	(0,63)	6	(0,67)	1	(0,89)
B2	1	(0,62)	-	(-)	-	(-)	-	(-)	-	(-)	-	(-)
AH	2	(1,25)	1	(1,61)	-	(-)	-	(-)	-	(-)	-	(-)
α talassemia	7	(4,40)	4	(6,45)	13	(1,66)	3	(0,94)	3	(0,33)	-	(-)
TOTAL *	159	(100)	62	(100)	783	(100)	317	(100)	888	(100)	112	(100)

Obs: Os indivíduos que não tiveram sua cor catalogada foram excluídos da tabela.

*: Total catalogado = 2321 indivíduos

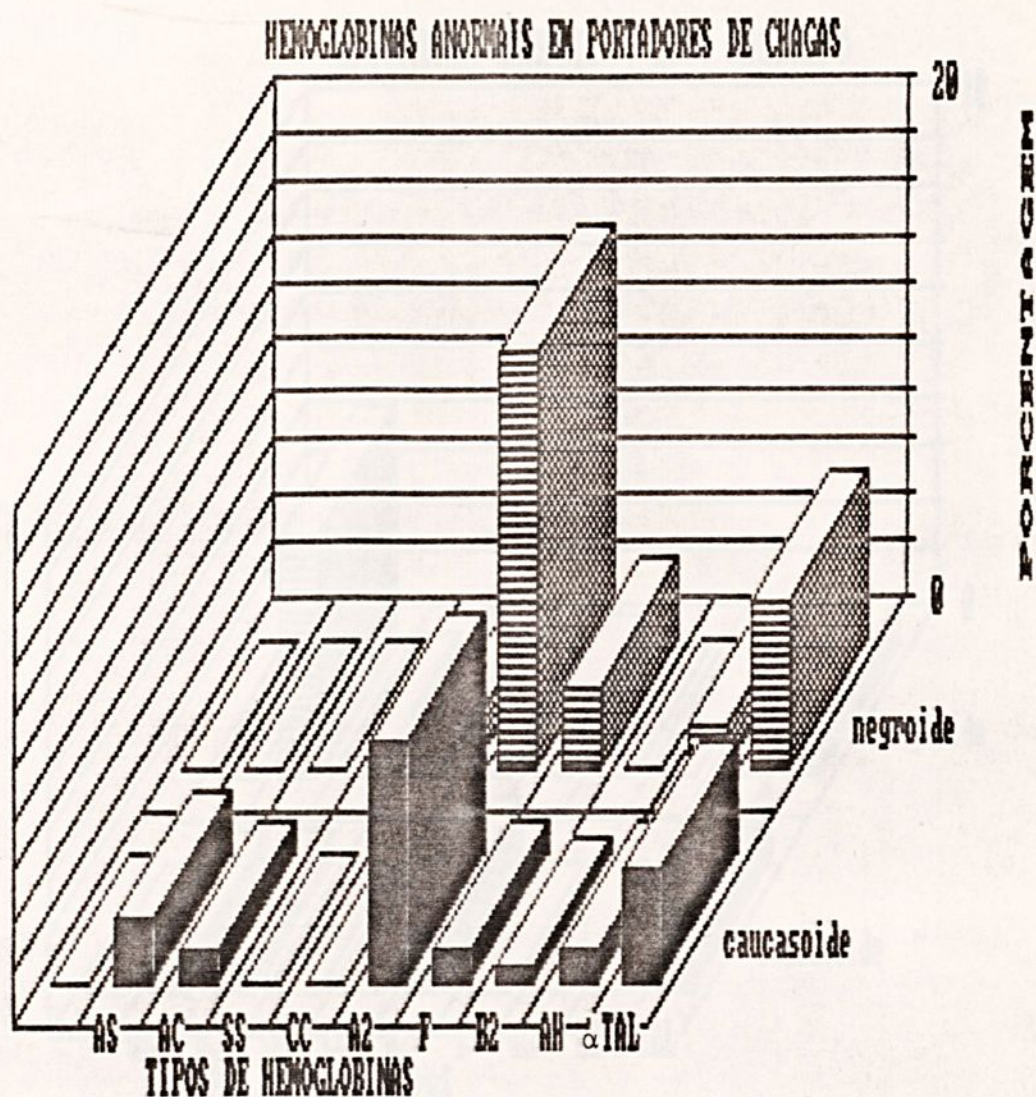


Figura 10. Distribuição dos fenótipos de hemoglobinas anormais em chagásicos separados por origem racial (caucasóide e negroide).

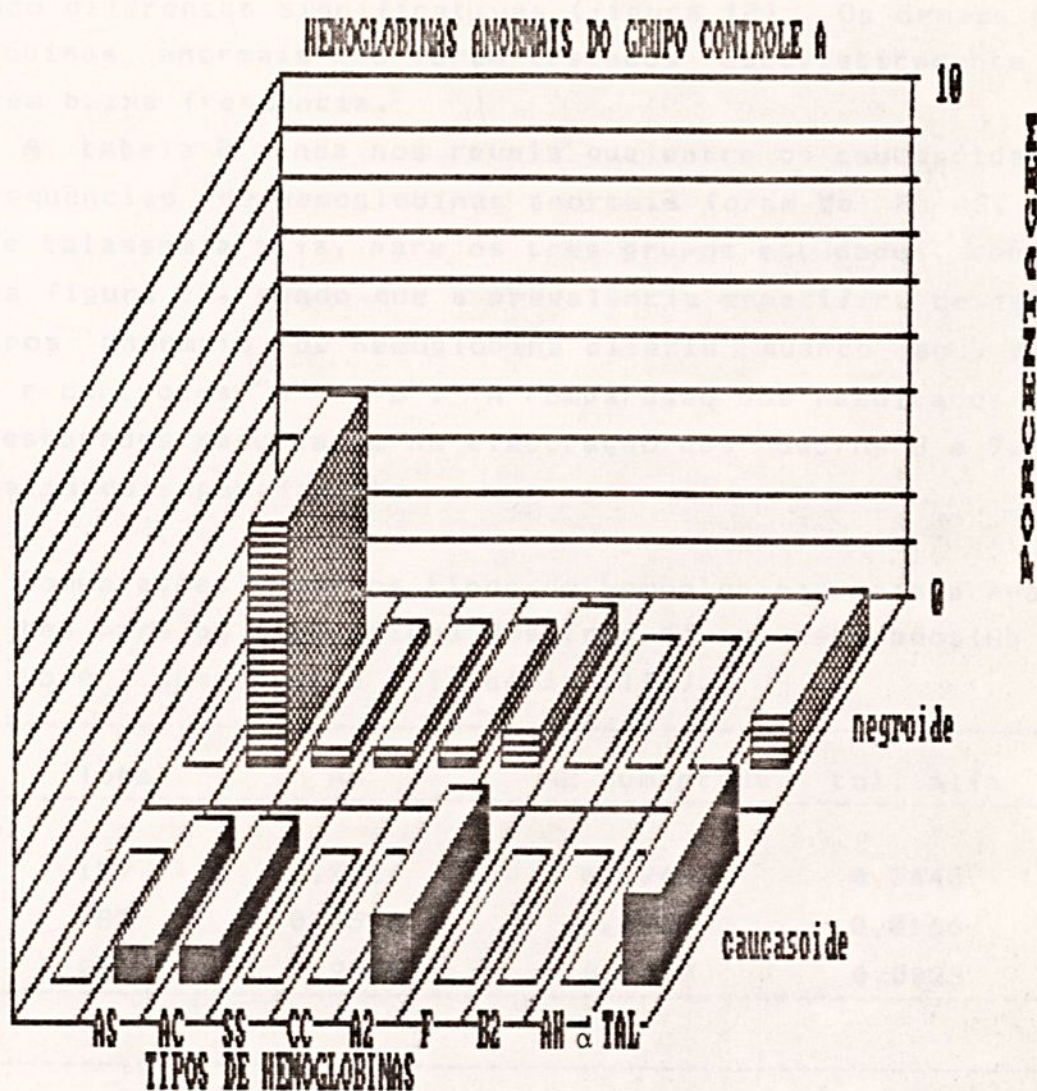


Figura 11. Distribuição dos tipos anormais de hemoglobinas encontradas no grupo controle "A" estudado. Este grupo é formado por usuários do Instituto Adolfo Lutz com sorologia negativa para doença de Chagas.

Para o grupo controle "B" a prevalência dos tipos de hemoglobinas anormais foi semelhante nos caucasóides e negróides não apresentando diferenças significativas (figura 12). Os demais tipos de hemoglobinas anormais não foram testados estatisticamente por apresentarem baixa frequência.

A tabela 2 ainda nos revela que entre os caucasóides as maiores frequências de hemoglobinas anormais foram de Hb AS, HbA₂ aumentada e talassemia alfa, para os três grupos estudados, conforme evidencia a figura 13, sendo que a prevalência específica de cada um destes tipos anormais de hemoglobina diferiu quanto aos grupos chagásicos e controles "A" e "B". A comparação dos resultados entre os grupos estudados resultaram na elaboração dos quadros 8 e 9. A Hb AS será analisada separadamente.

Quadro 8. Comparações entre os tipos de hemoglobinas mais prevalentes para os caucasóides dos três grupos estudados (Hb AA, Hb A₂ aumentada e talassemia alfa).

Grupo	Total	AA	A2 aumentada	tal. alfa
chagásico	159	0,7924	0,0943	0,0440
controle A	783	0,9578	0,0127	0,0166
controle B	888	0,9842	0,0067	0,0033
hipótese	$\chi^2_{(AA)}$	$\chi^2_{(A2)}$	$\chi^2_{(tal. alfa)}$	$\chi^2_{5, \%}$
Ho: pch=pA=pB	107,122	51,213	47,338	5,991

Conclusão: a proporção de incidência das Hb A₂ aumentada e talassemia alfa nos três grupos estudados não é a mesma.

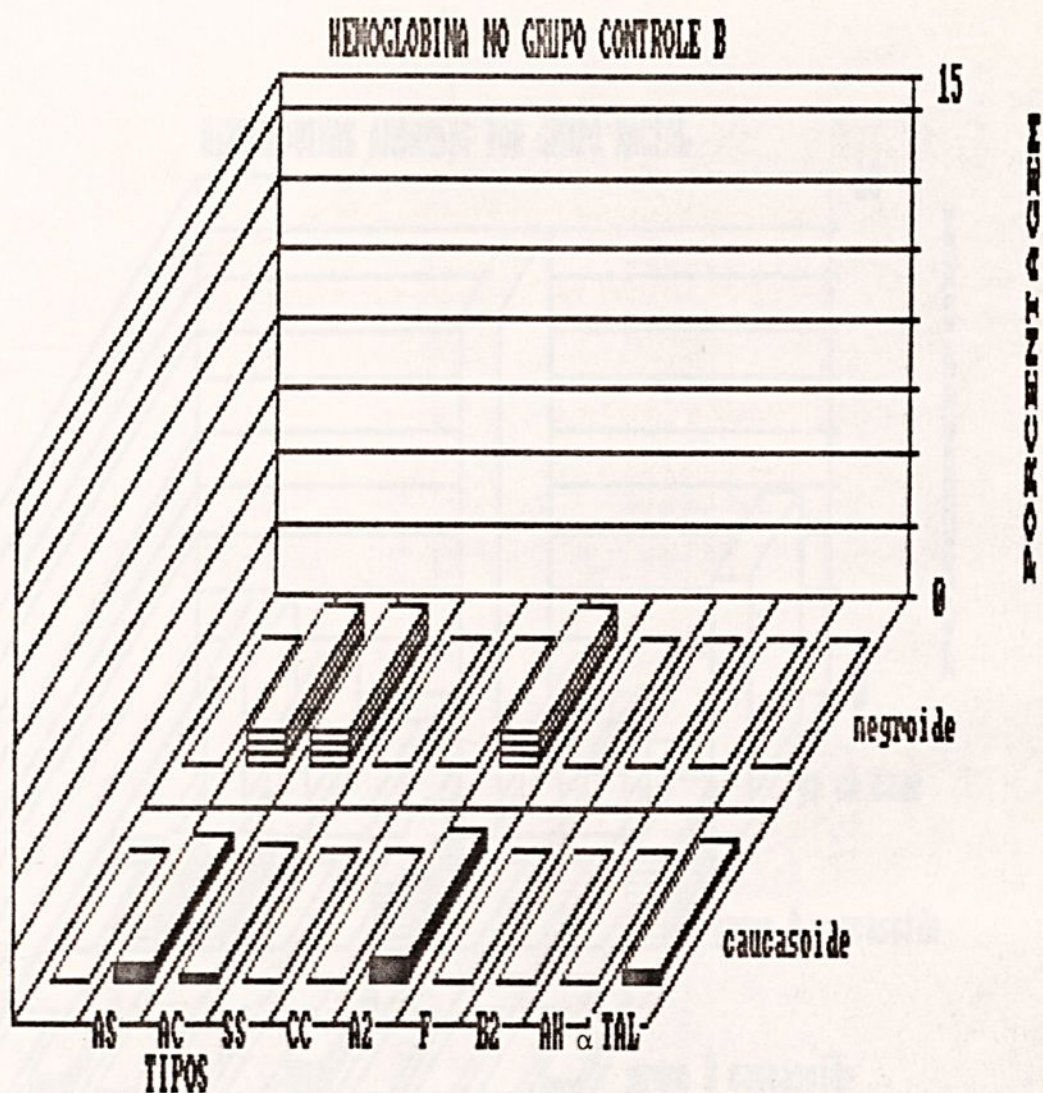


Figura 12. Distribuição dos tipos anormais de hemoglobinas no grupo controle "B" formado por estudantes de segundo grau de São José do Rio Preto-SP.

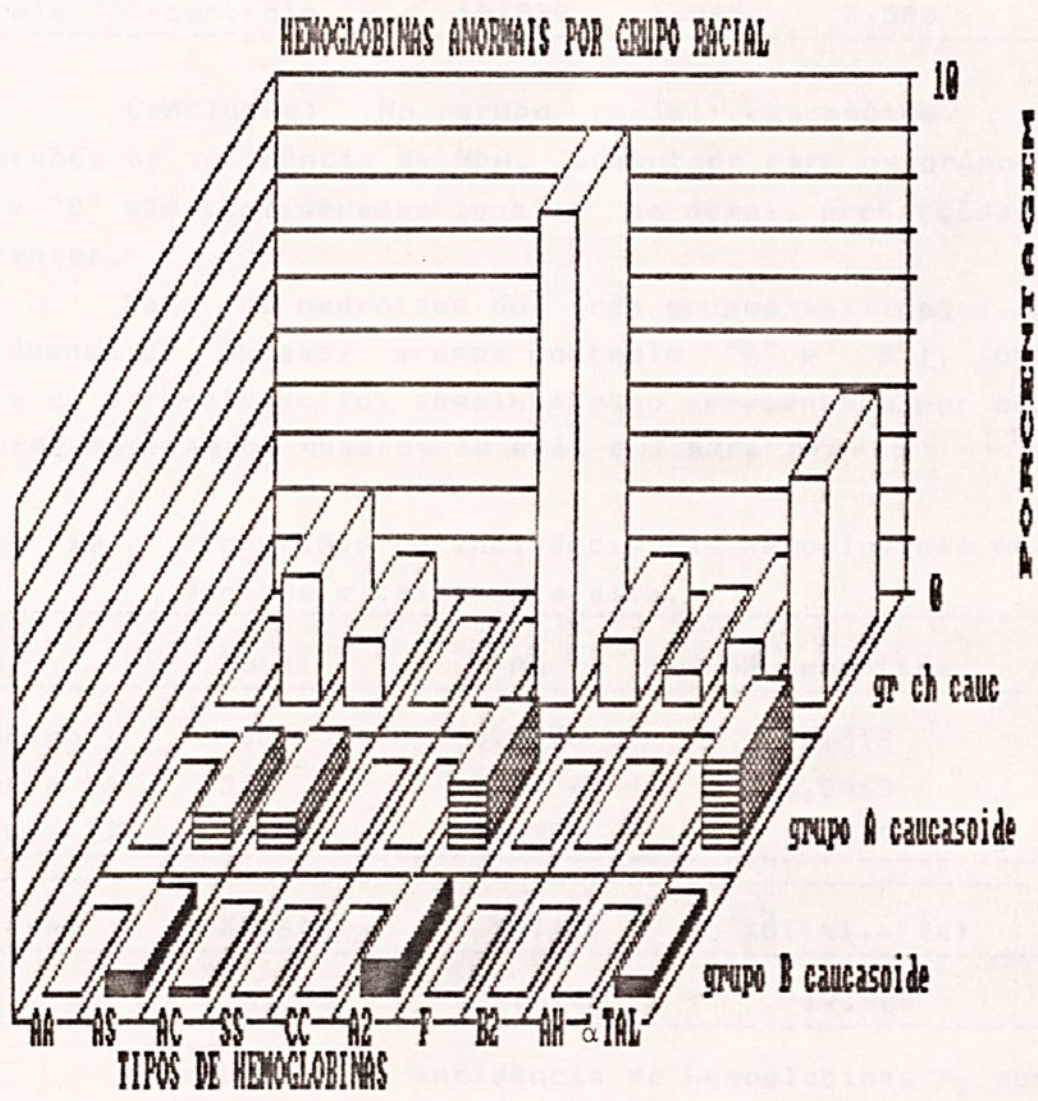


Figura 13. Prevalência de hemoglobinas anormais encontradas nos caucasóides dos três grupos estudados (Chagásicos e Controles "A" e "B")- o número de portadores de hemoglobina AA foi suprimido para melhor visualização dos outros tipos de hemoglobinas que se encontram em menor número.

Quadro 9. Comparação dos grupos dois a dois.

comparações	χ^2 (AA)	χ^2 (A2)	χ^2 (tal.alfa)	$\chi^2_{0,5\%}$
chagas- controle "A"	58,944	30,967	6,017	3,841
chagas- controle "B"	97,043	41,890	18,777	3,841
controle "A"-controle "B"	10,339	1,565	7,500	3,841

Conclusão: No grupo racial caucasóide, somente as proporções de incidência da HbA₂ aumentada para os grupos controles "A" e "B" são consideradas iguais; as demais proporções são todas diferentes.

Para os negróides dos três grupos analisados (portadores da doença de Chagas, grupos controle "A" e "B"), obtidos da tabela 2, o resultado foi semelhante ao apresentado por caucasóides, conforme mostram os quadros 10 e 11 e figura 14.

Quadro 10 . Proporções de incidência das hemoglobinas AA, A₂ aumentada e talassemia alfa.

Grupo	Total	AA	A2 aumentada	tal.alfa
Chagásico	62	0,7096	0,1612	0,0645
Controle "A"	317	0,9274	0,0063	0,0094
Controle "B"	112	0,9732	0,0089	0

Hipótese	χ^2 (AA)	χ^2 (A2)	χ^2 (tal.alfa)	$\chi^2_{0,5\%}$
H ₀ :p _{ch} = p _A = p _B	33,885	32,574	19,980	5,991

conclusão: A incidência de hemoglobinas A₂ aumentada e talassemia alfa nos três grupos estudados não é a mesma.

Quadro 11. Comparação por contrastes dois a dois.

Comparações	χ^2 (AA)	χ^2 (A2)	χ^2 (tal.alfa)	$\chi^2_{0,5\%}$
chagásicos-controle"A"	30,255	29,599	8,083	3,841
chagásicos-controle"B"	22,650	12,965	5,791	3,841
controle"A"-controle"B"	4,763	0,096	40,713	3,841

conclusão: foram consideradas iguais somente as proporções de incidência de HbA₂ aumentada nos controles "A" e "B". As demais proporções são estatisticamente significantes.

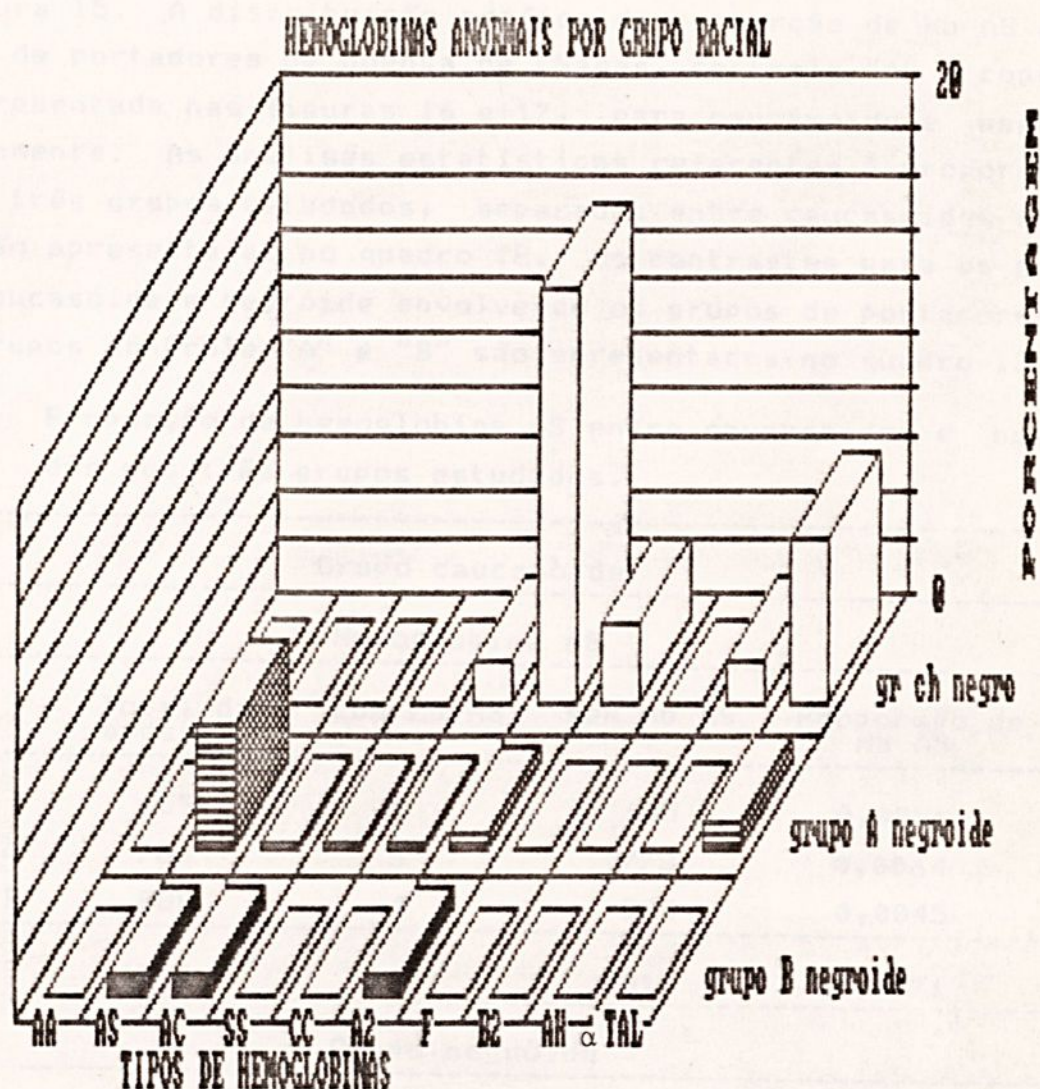


Figura 14. Prevalência de hemoglobinas anormais em negróides dos três grupos estudados (Chagásicos, controles "A" e "B"). Os grupos apresentando hemoglobina AA foram suprimidos para melhor visualização do gráfico.

A análise específica da prevalência de Hb AS entre caucasóides e negróides, mostrou que a proporção de incidência difere entre os grupos raciais ($\chi^2_0 = 20,39$; $\chi^2_{5\%} = 3,841$), conforme caracteriza a figura 15. A distribuição gráfica de proporção de Hb AS entre os grupos de portadores de doença de Chagas, controle "A" e controle "B" é apresentada nas figuras 16 e 17, para caucasóide e negróide respectivamente. As análises estatísticas referentes à proporção de HbAS nos três grupos estudados, separados entre caucasóides e negróides são apresentadas no quadro 12. Os contrastes para os grupos raciais caucasóide e negróide envolvendo os grupos de portadores de Chagas, grupos controle "A" e "B" são apresentados no quadro 13.

Quadro 12. Proporção de hemoglobina AS entre caucasóides e negróides nos três grupos estudados.

Grupo caucasóide				
Hemoglobina AS				
Grupo	Total da amostra	com Hb AS	sem Hb AS	Proporção de Hb AS
chagásico	159	4	155	0,0251
controle "A"	783	5	778	0,0064
controle "B"	888	4	884	0,0045
Total	1830	13	1817	0,0071
Grupo negróide				
Hemoglobina AS				
Grupo	Total da amostra	com Hb AS	sem Hb AS	Proporção de Hb AS
chagásico	62	-	62	0
controle "A"	317	15	302	0,0473
controle "B"	112	1	111	0,0089
Total	491	16	475	0,0326

Para o teste de igualdade de proporção de Hb AS entre caucasóides e negróides temos :

$$H_0: P_n = P_c \quad \text{vs} \quad H: P_n \neq P_c$$

onde: P_n = proporção de negróides e P_c proporção de caucasóides

O valor de Qui-quadrado observado foi de 20,30 e o χ^2 crítico 5% = 3,841.

Concluimos então que a proporção de incidência de Hb AS em caucásios é diferente da proporção de incidência de Hb AS em negróides ($P_n > P_c$).

Quadro 13. Contrastes para grupo caucásio, com Hb AS.

comparações	χ^2	$\chi^2_{5\%}$	significância
chagásico-controle "A"	4,88	3,841	S
chagásico-controle "B"	7,55	3,841	S
controle "A"-controle "B"	0,28	3,841	NS

Por estes dados concluimos que entre os caucásios com Hb AS, o grupo chagásico difere dos grupos controles "A" e "B", mas os controles "A" e "B" são considerados estatisticamente iguais.

Para o grupo negróide com Hb AS, supomos a hipótese:

H_0 : $P_{\text{chagásicos}} = P_{\text{controle "A"}} = P_{\text{controle "B"}}$ vs H_1 : existe pelo menos uma proporção diferente.

Os valores de qui quadrado obtidos $\chi^2_0 = 6,256$ e $\chi^2_{5\%} = 5,991$, mostram que as proporções de HbS nos negróides dos três grupos estudados (chagásicos, controle "A" e controle "B") são diferentes. A ocorrência esporádica de Hb AS dificultou a realização dos contrastes, mas graficamente estas diferenças podem ser observadas (figura 17).

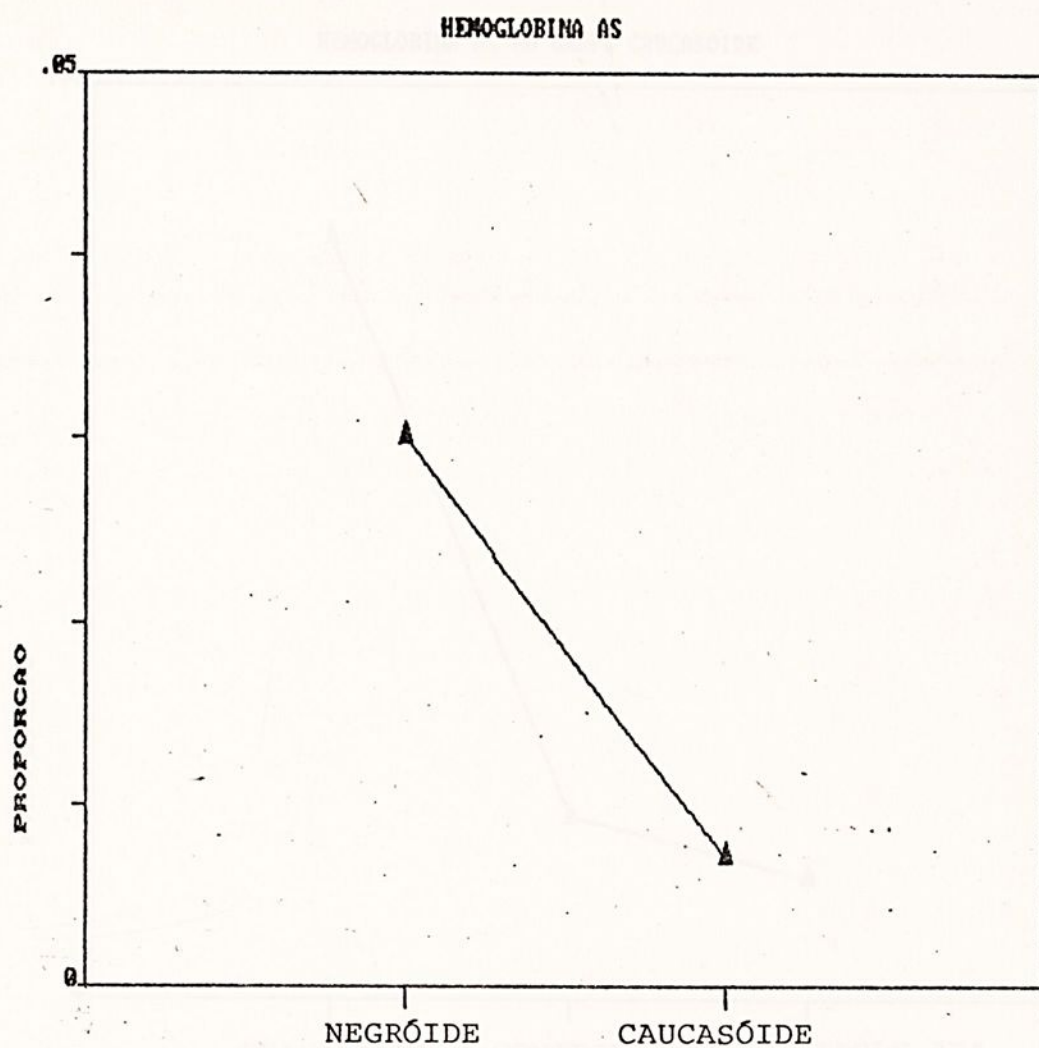


Figura 15. Propoção de hemoglobina AS em negróides e caucasóides dos três grupos estudados (chagásicos, controle "A" e controle "B").

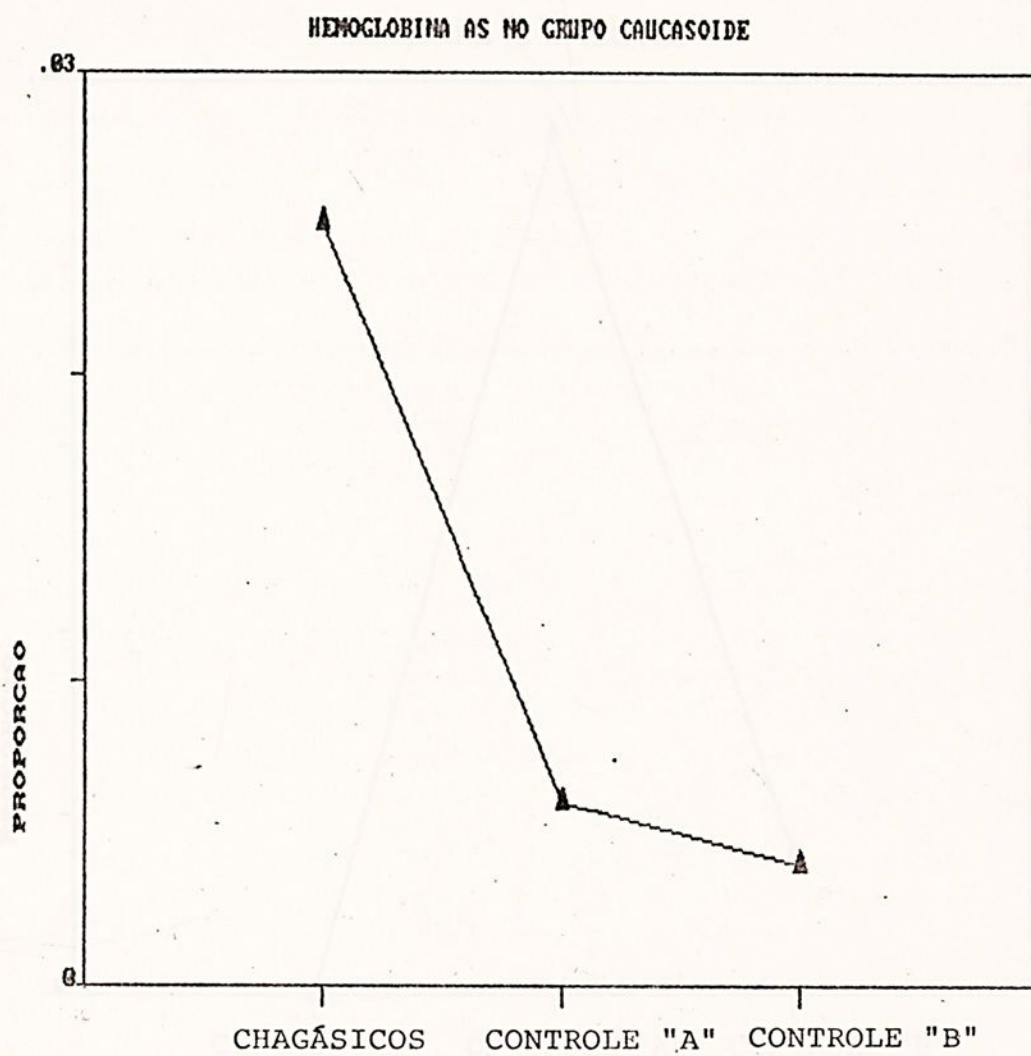


Figura 16. Proporção de hemoglobina AS nos caucasóides dos três grupos estudados.

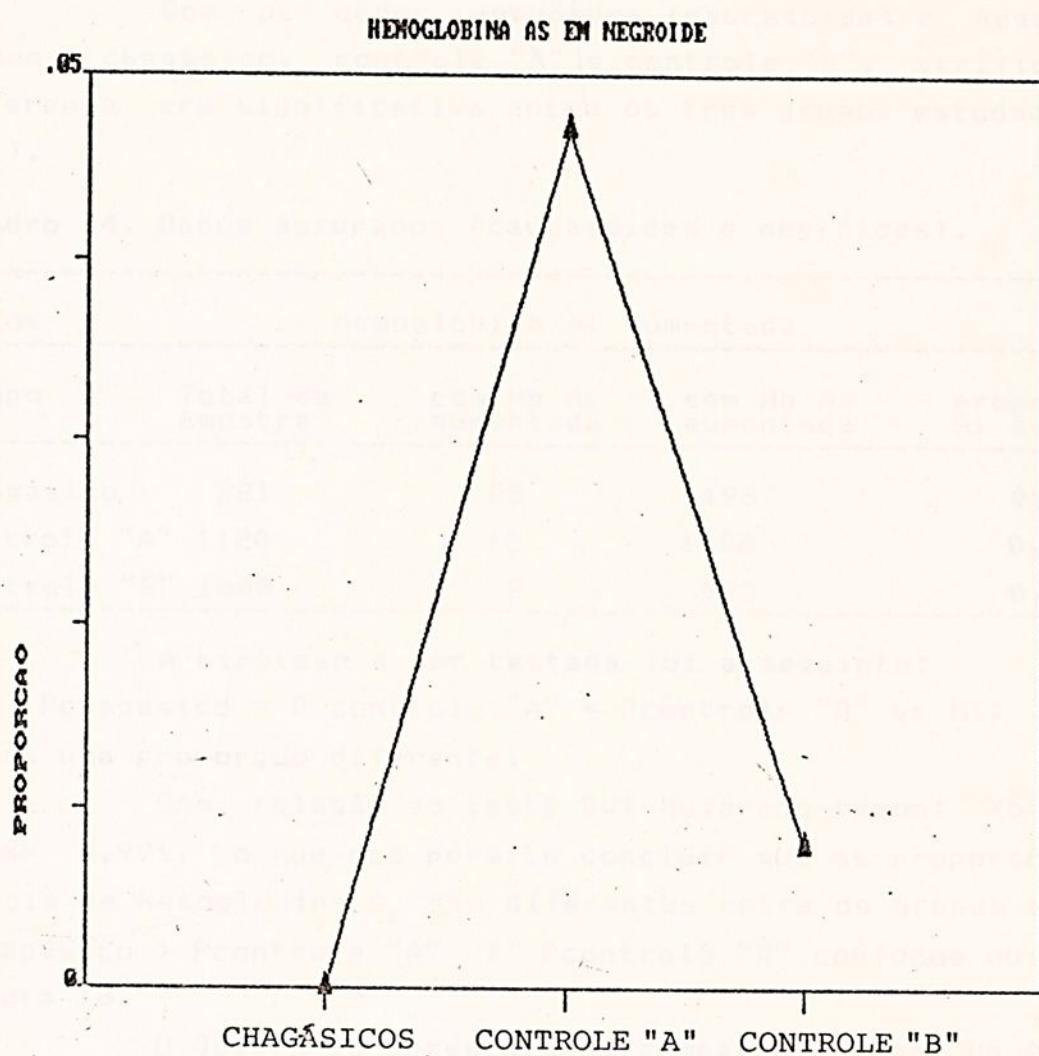


Figura 17. Proporção de hemoglobina AS em negróides dos três grupos estudados.

Para a tabela 2 consideramos ainda que os testes de igualdade de proporção de incidência de HbA₂ aumentada e talassemia alfa para os grupos caucasóide e negróide não foram significativos.

Com os dados agrupados (caucasóides e negróides) nos grupos chagásico, controle "A" e controle "B", verificamos se a diferença era significativa entre os três grupos estudados (Quadro 14).

Quadro 14. Dados agrupados (caucasóides e negróides).

Dados		Hemoglobina A ₂ aumentada		
Grupo	Total da amostra	com Hb A ₂ aumentada	sem Hb A ₂ aumentada	proporção de Hb A ₂ aumentada
chagásico	221	25	196	0,1131
controle "A"	1120	12	1108	0,0107
controle "B"	1000	7	993	0,0070

A hipótese a ser testada foi a seguinte:

H₀: P_{chagásico} = P_{controle "A"} = P_{controle "B"} vs H₁: existe pelo menos uma proporção diferente.

Com relação ao teste Qui-quadrado temos: $X^2_0 = 14,48$ e $X^2_{5\%} = 5,991$, o que nos permite concluir que as proporções de incidência de hemoglobina A₂ são diferentes entre os grupos estudados. A $P_{\text{chagásico}} > P_{\text{controle "A"}} > P_{\text{controle "B"}}$ conforme observa-se na figura 18.

O Quadro 15 apresenta as comparações para Hb A₂ aumentada nos grupos de portadores de Chagas e controles A e B.

Quadro 15. Contrastes para Hb A₂ aumentada nos três grupos estudados.

comparações	X^2_0	$X^2_{5\%}$	significância
chagásico-controle "A"	64,447	3,841	S
chagásico-controle "B"	79,861	3,841	S
controle "A"-controle "B"	0,820	3,841	NS

Com os dados do Quadro 15 concluímos que o grupo chagásico difere significativamente dos controles "A" e "B", e que os grupos controles são estatisticamente iguais.

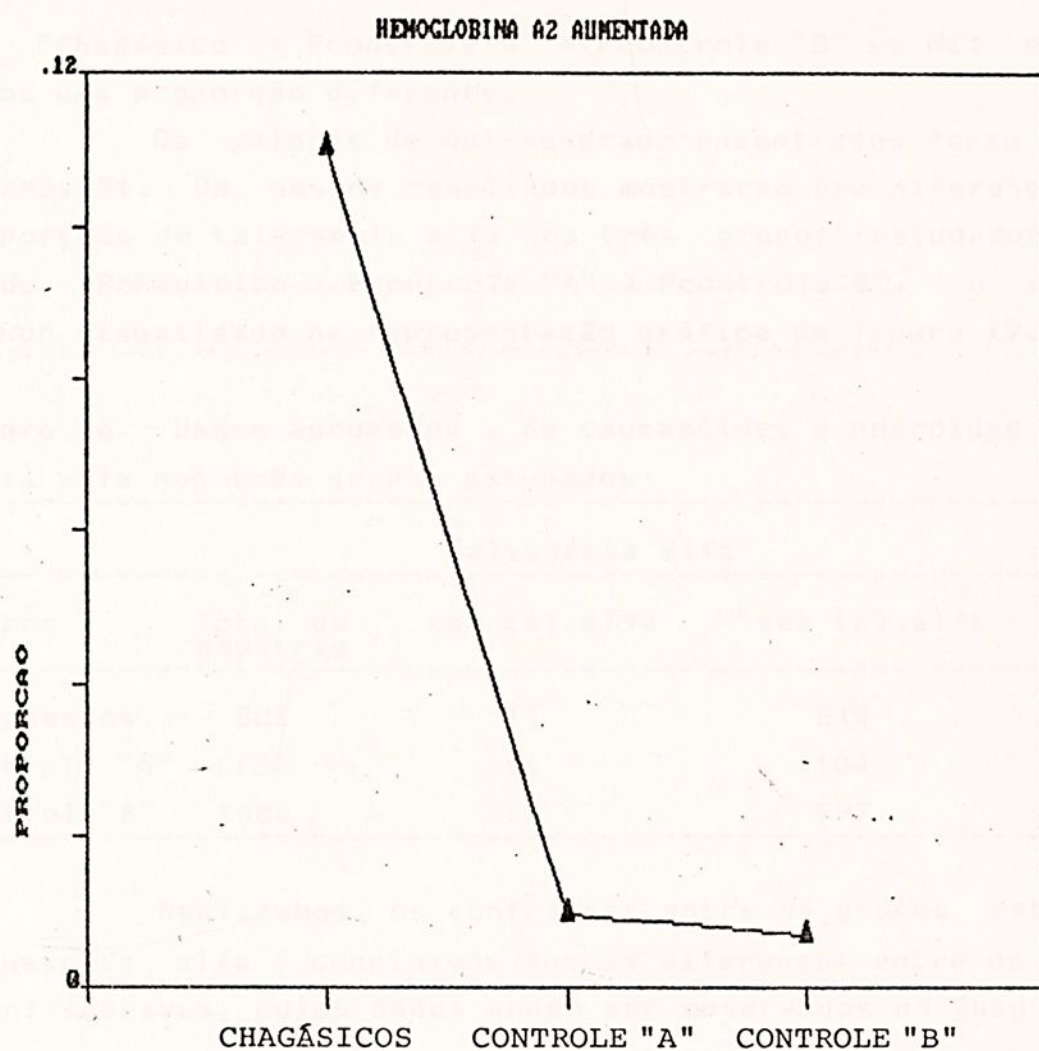


Figura 18 . Proporção de hemoglobina A₂ em chagásicos, grupo controle "A" e grupo controle "B".

Para talassemia alfa os dados agrupados para caucasóide e negróide são apresentados no Quadro 16, e a hipótese de interesse foi:

H_0 : $P_{\text{chagásico}} = P_{\text{controle "A"}} = P_{\text{controle "B"}}$ vs H_1 : existe pelo menos uma proporção diferente.

Os valores de Qui-quadrado encontrados foram $\chi^2_0 = 31,61$ e $\chi^2_{5\%} = 5,991$. Os nossos resultados mostraram uma diferença entre as proporções de talassemia alfa nos três grupos estudados, sendo $P_{\text{chagásico}} > P_{\text{controle "A"}} > P_{\text{controle "B"}}$, o que pode ser melhor visualizado na representação gráfica da figura 19.

Quadro 16. Dados agrupados, de caucasóides e negróides para talassemia alfa nos três grupos estudados

Talassemia alfa				
Grupos	Total de amostras	com tal.alfa	sem tal.alfa	proporções
chagásicos	221	11	210	0,0497
controle "A"	1120	16	1104	0,0143
controle "B"	1000	3	997	0,0030

Realizamos os contrastes entre os grupos estudados, para talassemia alfa e concluímos que as diferenças entre os grupos são significativas, cujos dados podem ser observados no Quadro 17.

Quadro 17. Contrastes para talassemia alfa nos três grupos estudados.

Comparações	χ^2_0	$\chi^2_{5\%}$	significância
chagásico-controle "A"	11,74	3,841	S
chagásico-controle "B"	32,38	3,841	S
controle "A"-controle "B"	7,65	3,841	S

A alta prevalência de talassemia alfa entre os chagásicos nos estimulou a repetir a pesquisa citológica dos agregados intraeritrocitários de Hb H em 121 pacientes, com doença de Chagas independente da prévia análise da morfologia eritrocitária.

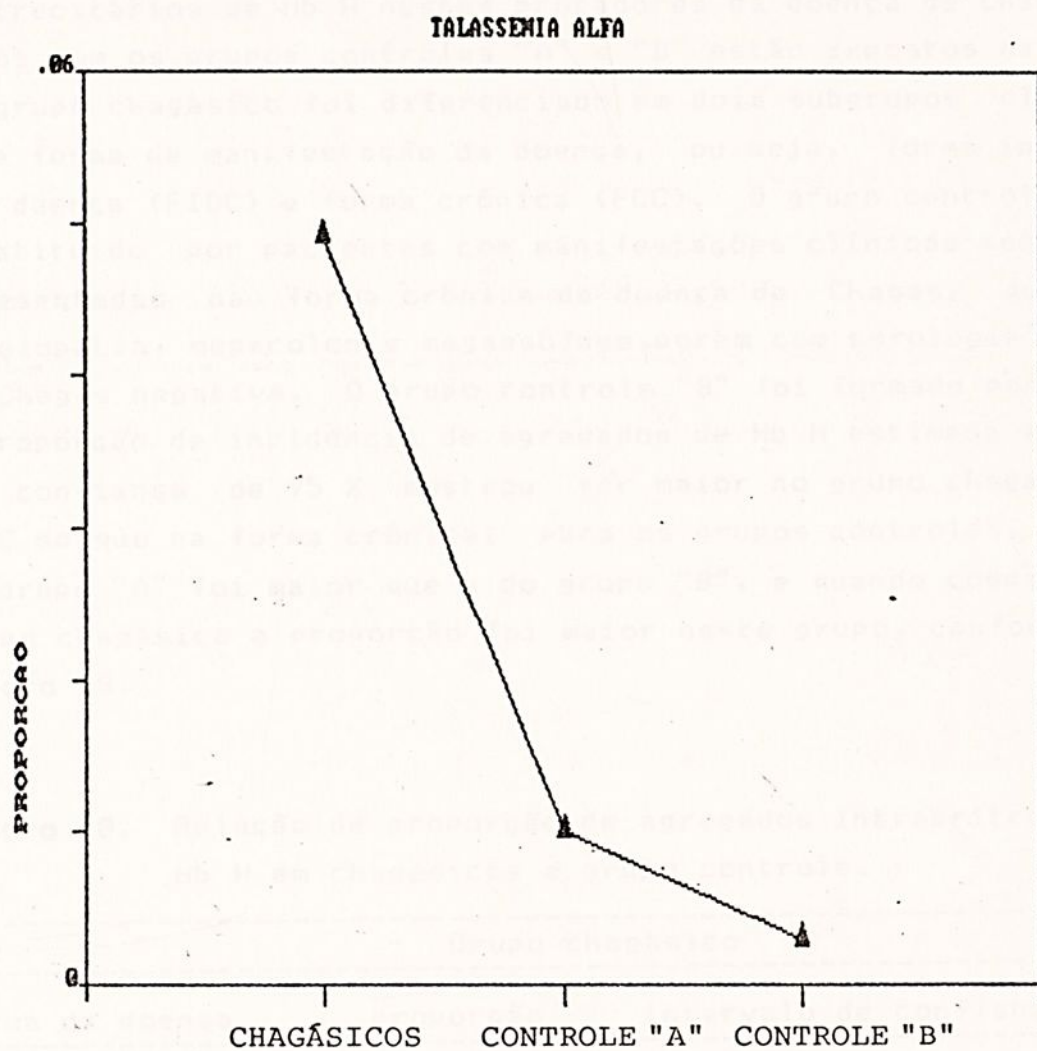


Figura 19. Proporção de talassemia alfa em chagásicos, grupo controle "A" e grupo controle "B".

Os resultados relativos à prevalência de agregados intraeritrocitários de Hb H nestes portadores da doença de Chagas, comparados com os grupos controles "A" e "B" estão expostos na tabela 3. O grupo chagásico foi diferenciado em dois subgrupos classificados pela forma de manifestação da doença, ou seja, forma indeterminada da doença (FIDC) e forma crônica (FCC). O grupo controle "A" foi constituído por pacientes com manifestações clínicas semelhantes às apresentadas na forma crônica da doença de Chagas, quais sejam, cardiopatia, megacolon e megaesôfago, porém com sorologia para doença de Chagas negativa. O grupo controle "B" foi formado por escolares. A proporção de incidência de agregados de Hb H estimada a intervalos de confiança de 95 % mostrou ser maior no grupo chagásico com a FIDC do que na forma crônica; para os grupos controles, a proporção do grupo "A" foi maior que a do grupo "B", e quando comparados com o grupo chagásico a proporção foi maior neste grupo, conforme mostra o Quadro 18.

Quadro 18. Relação de proporção de agregados intraeritrocitários de Hb H em chagásicos e grupo controle.

Grupo chagásico		
Forma da doença	proporção	intervalo de confiança [p: 95%]
FIDC	0,2295	[0,1236; 0,3355]
FCC	0,1166	[0,0354; 0,1978]
Grupo controle		
A	0,0952	[0,0065; 0,1839]
B	0,0300	[0 ; 0,0634]

Tabela 3. Prevalência de agregados intraeritrocitários de hemoglobina H em portadores da doença de Chagas, comparados com grupos controle.

Forma clinica da doença	número de analisados	agregados de Hb H intraeritrocitários	
		n	%
FIDC	61	14	22,95
FCC*	60	7	11,66
TOTAL	121	21	17,35
Grupo controle "A" **	42	4	9,52
Grupo controle "B" ***	100	3	3,00

* A forma crônica da doença de Chagas inclui os pacientes com Cardiopatia, Megacólon e Megaesôfago puros e também aqueles com associação entre as cronicidades.

** O grupo controle "A" foi formado por pacientes com cardiopatia, megacólon e megaesôfago mas com sorologia para doença de Chagas negativa.

*** Grupo controle "B" foi formado por escolares, sem cardiopatia, megacolon e megaesôfago.

A determinação da prevalência de Hb A₂ aumentada nos portadores de doença de Chagas, diferenciados pelas formas de manifestação clínica foram agrupadas em FIDC e doentes crônicos (CCC, MCC, MEC, e CM).

Observou-se que as prevalências de HbA₂ aumentada foram altas em ambos os grupos conforme mostra a tabela 4.

Tabela 4. Prevalência de Hb A₂ aumentada em chagásicos agrupados em FIDC (forma indeterminada da doença de Chagas) e doentes crônicos.

Grupo	número total	com Hb A ₂ aumentada	%
FIDC	61	5	8,1
crônicos*	60	5	8,3

* os doentes crônicos incluem aqueles com cardiopatia, megacolon e megaesôfago chagásicos.

Outro parâmetro pesquisado foi relativo à morfologia eritrocitária, comparando-a entre os portadores de doença de Chagas diferenciados em FIDC, CCC, MCC, MEC, e CM, e os grupos controles "A" e "B".

Observa-se pelos resultados da tabela 5 que 66% dos chagásicos apresentam alterações em seus eritrócitos, predominando aquelas com classificação discreta (figura 20).

Quando analisamos o grupo chagásico, em relação aos grupos controles "A" e "B" notamos uma distribuição semelhante entre chagásicos e o grupo controle "A", visualizado pela figura 21, e confirmado pelos testes estatísticos (quadro 19).

Quadro 19. Testes estatísticos para morfologia eritrocitária em doença de Chagas.

Hipótese	χ^2_0	$\chi^2_{0,5\%}$
Ho: Pmoderada (Chagas)=		
Pmoderada (controle "A")	0,159	3,841
Ho: Pdiscreta (Chagas)=		
Pdiscreta (controle "A")	0,076	3,841

Por estes testes de igualdade de proporções, concluímos que tanto para o grupo chagásico quanto para o grupo controle "A" consideramos as distribuições de morfologia eritrocitária iguais.

Tabela 5. Alterações morfológicas caracterizadas por anisopoiquilocitose e hipocromia, em 121 portadores da doença de Chagas, e grupos controle.

Doença de Chagas		Morfologia Eritrocitária **							
		normal		discreta		moderada		acentuada	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Forma indeterminada		18	(43,90)	40	(54,79)	3	(50,00)	0	(0)
C.C.C. *		13	(31,70)	17	(23,28)	1	(0,16)	0	(0)
megacólon		7	(17,07)	7	(9,58)	0	(0)	0	(0)
megaesôfago		1	(2,41)	5	(6,64)	1	(0,16)	1	(100,0)
cronicidade mista		2	(4,87)	4	(5,47)	1	(0,16)	0	(0)
TOTAL		41	(33,84)	73	(60,33)	6	(4,95)	1	(0,06)
Grupos Controle	A	18	(42,85)	73	(60,33)	0	(0)	0	(0)
***	B	96	(96,00)	2	(2,00)	2	(2,00)	0	(0)

*Cardiopatia chagásica crônica.

**Considerou-se alteração discreta a presença de 2 a 4 células com morfologias anormais; moderada, de 5 a 10 células; acentuada, acima de 10 células, média por campo analisado.

***Os 42 indivíduos utilizados como controle no grupo "A" apresentavam cardiopatia, megacólon e megaesôfago, mas sorologia para doença de Chagas negativa.

O grupo controle "B" foi formado por 100 estudantes de segundo grau sem megacólon, megaesôfago e cardiopatia e com sorologia para Chagas negativa.

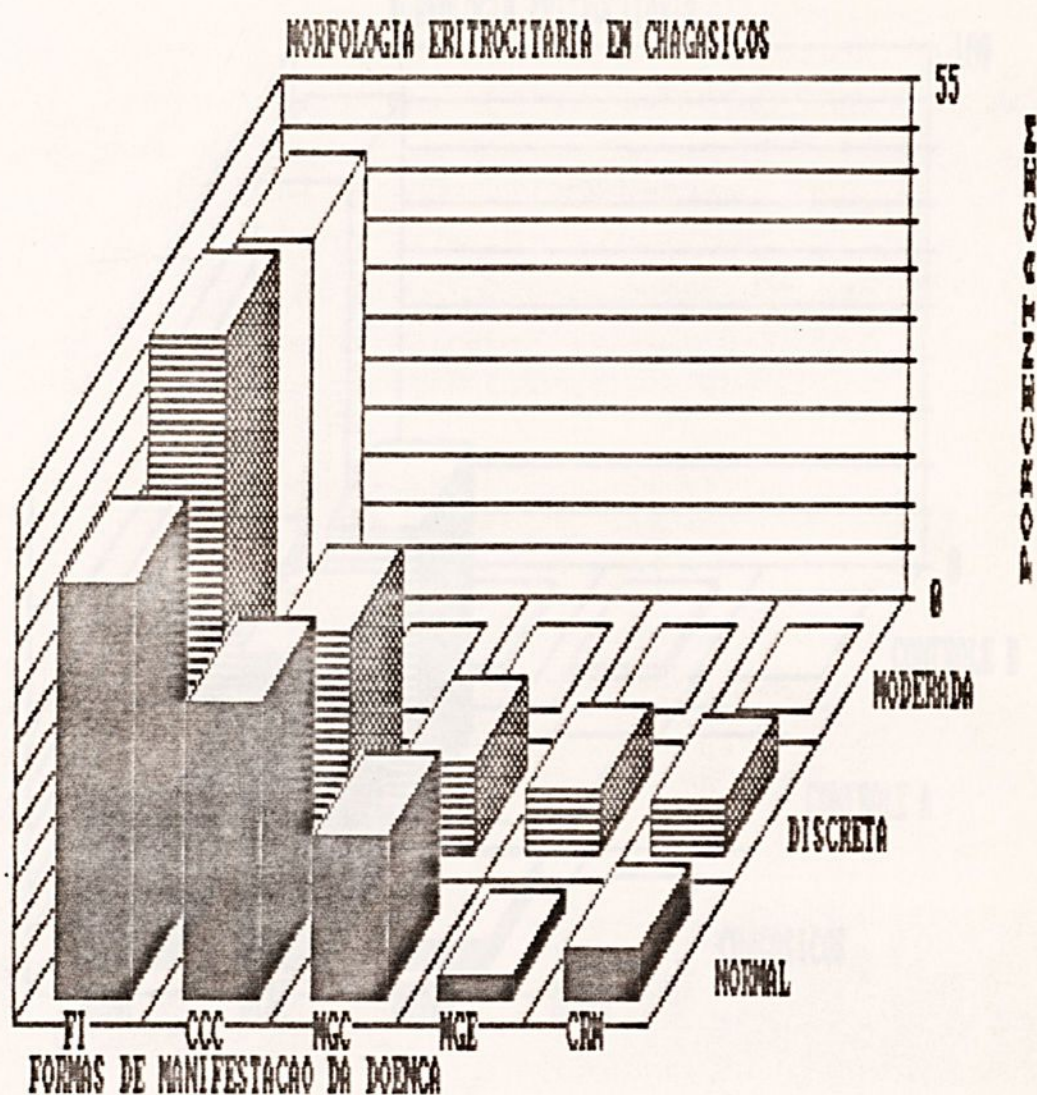


Figura 20. Distribuição da morfologia eritrocitária em chagásicos separados por formas de manifestação da doença; FIDC - forma indeterminada; CCC -cardiopatia chagásica crônica; MCC-megacólon chagásico ; MEC - megaesôfago chagásico; CM - cronicidade mista.

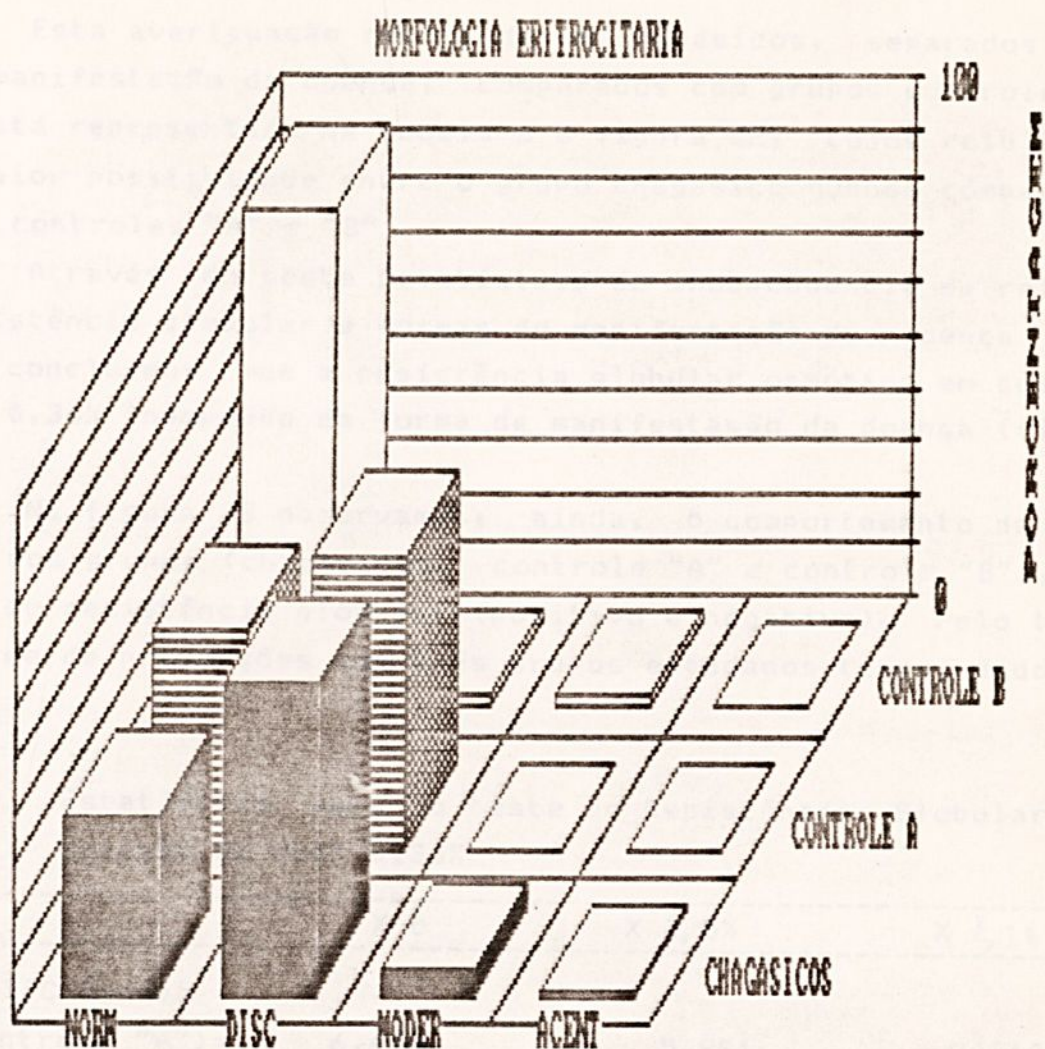


Figura 21. Morfologia eritrocitária entre os grupos estudados (Chagásicos, controle "A" e "B").

Outra análise efetuada foi a da resistência globular osmótica, em solução de NaCl 0,36%.

Esta averiguação realizada em chagásicos, separados por forma de manifestação da doença, comparados com grupos controle "A" e "B", está representada na tabela 6 e figura 22, cujos resultados mostram maior positividade entre o grupo chagásico quando comparado com os controles "A" e "B".

Através do teste estatístico de independência de relação para resistência globular e formas de manifestação da doença ($\chi^2 = 0,0626$), concluímos que a resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36% independe da forma de manifestação da doença (figura 23).

Na figura 22 observamos, ainda, o comportamento da distribuição dos grupos (chagásicos, controle "A" e controle "B"), por categoria de resistência globular (positivo e negativo). Pelo teste de igualdade de proporções nos três grupos estudados temos, dados do quadro 20.

Quadro 20. Estatística para o teste de Resistência Globular em Solução de NaCl 0,36%

Hipótese	χ^2_0	$\chi^2_{5\%}$	$\chi^2_{1\%}$
$H_0: P_{\text{normal}}(\text{Chagas}) =$			
$P_{\text{normal}}(\text{controle "A"}) =$	6,458	5,991	9,210
$P_{\text{normal}}(\text{controle "B"})$			

Portanto ao nível de 1%, aceitamos a hipótese de igualdade de proporções nos três grupos estudados; entretanto, ao nível de 5% esta hipótese é rejeitada.

Tabela 6. Relação de positividade do teste de Resistência Globular em solução de Cloreto de Sódio 0,36% em chagásicos e não chagásicos.

Chagásicos		Resistência Globular em solução de NaCl 0,36%				TOTAL
		positivo		negativo		
		No.	%	No.	%	
forma indeterminada		13	(44,82)	48	(52,17)	61
cardiopatia		5	(17,24)	26	(28,26)	31
megacólon		4	(13,79)	10	(10,86)	14
megaesôfago		3	(10,34)	5	(5,43)	8
cronicidade mista		4	(13,79)	3	(3,26)	7
TOTAL		29	(23,96)	92	(76,03)	121
Grupos	A*	3	(7,14)	39	(92,85)	42
Controle	B**	16	(16,00)	84	(84,00)	100

* Pacientes com cardiopatia, megaesôfago e, megacólon mas com sorologia para Chagas negativa.

** População de escolares.

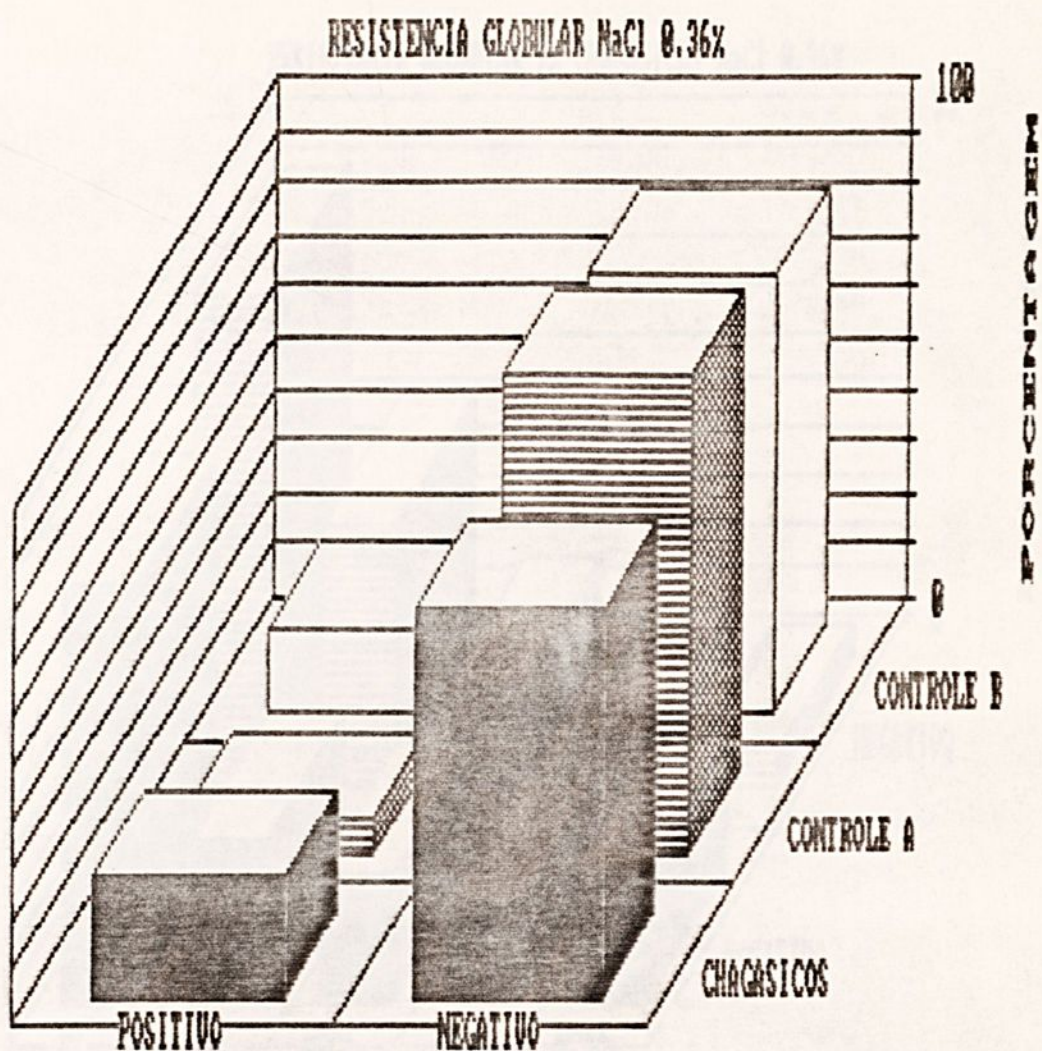


Figura 22. Distribuição da resistência globular em solução de NaCl 0,36% nos grupos estudados (Chagásicos, controles "A" e "B").

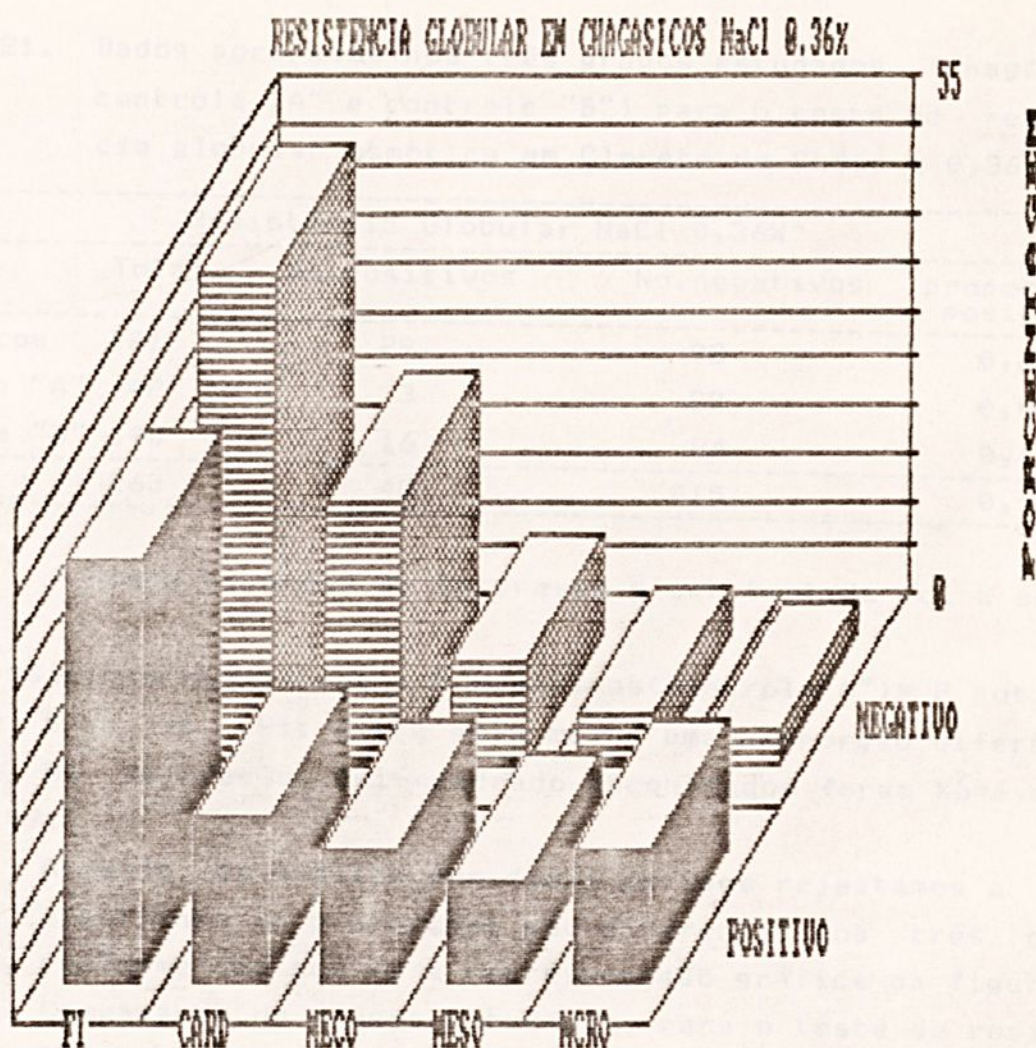


Figura 23. Teste de resistência globular em solução de NaCl a 0,36% no grupo chagásico separado por formas de manifestação da doença - FIDC - forma indeterminada; CCC - cardiopatia chagásica crônica; MCC - megacólon chagásico; MEC - megaesôfago chagásico; CM cronicidade mista.

Para o caso da relação de positividade do teste de resistência globular osmótica em solução de NaCl 0,36% apresentamos os resultados do quadro 21:

Quadro 21. Dados agrupados nos três grupos estudados (chagásicos, controle "A" e controle "B") para o teste de resistência globular osmótica em Cloreto de Sódio a 0,36%.

Resistência Globular NaCl 0,36%				
Grupo	Total	No. positivos	No. negativos	proporção de positivos
Chagásicos	121	29	92	0,2396
controle "A"	42	3	39	0,0714
controle "B"	100	16	84	0,1600
TOTAL	263	48	215	0,1825

A nossa hipótese de interesse a ser testada foi a seguinte:

$H_0: P \text{ positivos(chagásicos)} = P \text{ positivos(controle "A")} = P \text{ positivos(controle "B")}$ vs $H_1: \text{existe pelo menos uma proporção diferente.}$

Os valores de Qui-quadrado encontrados foram $\chi^2_0 = 6,458$ e $\chi^2_{5\%} = 5,991$

Através da análise dos dados obtidos rejeitamos a hipótese H_0 , e portanto as proporções são diferentes nos três grupos estudados, conforme nos mostra a representação gráfica da figura 24.

Comparando os grupos estudados, para o teste de resistência globular obtivemos os dados do Quadro 22.

Quadro 22. Contrastes para o teste de resistência globular osmótica em NaCl 0,36%.

Comparações	χ^2_0	$\chi^2_{5\%}$	significância
chagásicos- controle "A"	5,59	3,841	S
chagásicos- controle "B"	2,139	3,841	NS
controle "A"-controle "B"	2,003	3,841	NS

Assim, podemos concluir que o grupo de portadores de doença de Chagas diferem do grupo controle "A", mas não do grupo controle "B", e os grupos controles "A" e "B" são considerados iguais estatisticamente para o teste de resistência globular osmótica em solução de NaCl 0,36%.

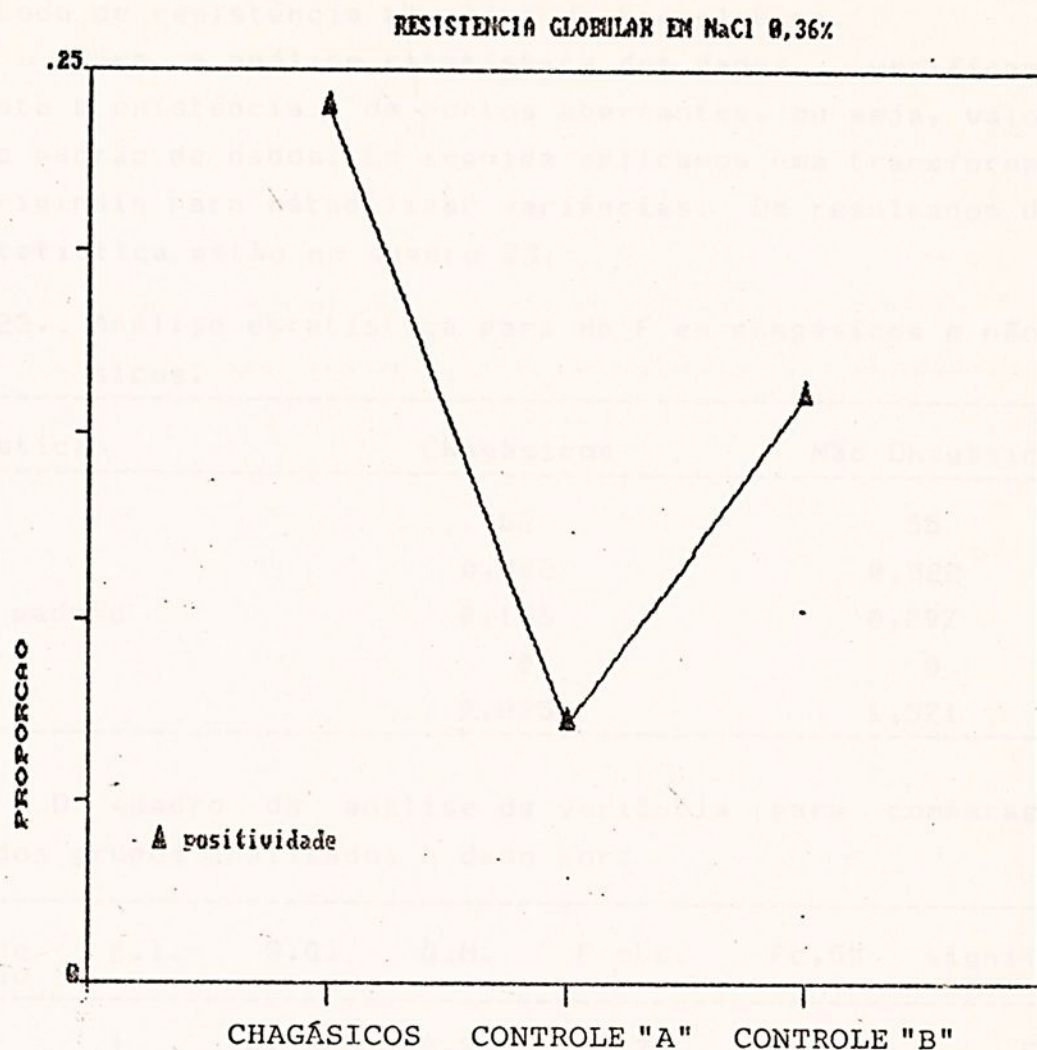


Figura 24. Proporção de positividade do teste de Resistência Globular em Solução de NaCl 0,36% em chagásicos, grupo controle "A" e grupo controle "B".

Para a verificação dos valores de hemoglobina Fetal (HbF) em chagásicos, analisamos em média 50 chagásicos e 50 não chagásicos pelo método de resistência alcalina da hemoglobina.

Para a análise estatística dos dados, verificamos primeiramente a existência de pontos aberrantes, ou seja, valores que fogem ao padrão de dados. Em seguida aplicamos uma transformação nos dados originais para estabilizar variâncias. Os resultados da análise estatística estão no quadro 23.

Quadro 23. Análise estatística para Hb F em chagásicos e não chagásicos.

Estatística	Chagásicos	Não Chagásicos
N	52	55
média	0,402	0,522
desvio padrão	0,156	0,297
mínimo	0	0
máximo	0,835	1,571

O quadro da análise de variância para comparação das médias dos grupos analisados é dado por:

Fonte de variação	g.l.	S.Q.	Q.M.	F obs.	Fc,5%	significância
Grupos	1	0,3825	0,3825	6,71	3,90	S
Resíduos	105	5,9892	0,0570			
TOTAL	106	6,3716				

Concluimos portanto que a média de Hb F em chagásicos é menor que a média de Hb F em não chagásicos, sendo esta diferença significativa.

Para a quantificação de Hb A₂ tomamos ao acaso 50 chagásicos e 50 não chagásicos em média, e verificamos a quantidade de Hb A₂ por eletroforese quantitativa. Os resultado nos levaram a realizar novas quantificações desta fração hemoglobínica por outro método mais sensível, a microcromatografia em coluna, sempre comparando os valores obtidos em chagásicos, com os encontrados em não chagásicos.

Como os dados aqui tratados são provenientes de dois grupos, chagásicos e não chagásicos, e a porcentagem de Hb A₂ obtida por dois métodos distintos, eletroforese e microcromatografia, trata-se de um experimento cruzado com efeitos fixos, cujo objetivo é verificar o efeito de método e o de grupo. Após análise estatística preliminar, com eliminação dos pontos discrepantes e o balanceamento do experimento, utilizamos o seguinte modelo:

$$y_{ijr} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{(ij)} + e_{ijr}$$

onde: α_i : mede o efeito de grupo

β_j : mede o efeito de método

$\alpha\beta_{(ij)}$: mede o efeito da interação grupo/método

O resumo dos dados estatísticos estão no quadro 24.

Quadro 24. Análise estatística da Hb A₂ para chagásicos e não chagásicos.

Grupo/Método				
Estatística	Ch/elet.*	ñ Ch/elet.*	Ch/crom.**	ñ Ch/crom.**
N	57	57	57	57
média	3,640	3,196	3,015	2,631
desvio padrão	0,891	0,907	0,633	0,868
mínimo	1,850	1,200	1,550	0,900
máximo	6,090	6,190	4,560	4,500

* Ch/elet. = chagásicos quantificados por eletroforese

ñCh/elet. = não chagásicos quantificados por eletroforese

**Ch/crom. = chagásicos quantificados por microcromatografia

ñCh/crom. = não chagásicos quantificados por microcromatografia.

O quadro de análise de variância é dado por :

Fonte de variação	g.l.	S.Q.	Q.M.	Fobs.	Fc,5%	significância
Grupo	1	8,124	8,124	13,723	3,84	S
Método	1	14,439	17,439	29,458	3,84	S
Interação	1	0,003	0,003	0,003	3,84	NS
Resíduo	224	131,980	0,589			
TOTAL	227	157,546				

Pelo resultado do teste de análise de variância observamos que existe efeito de grupo de método, mas não existe efeito de interação método / grupo.

Através da figura 25 verificamos que a porcentagem de Hb A₂ obtida por eletroforese é maior que a porcentagem de Hb A₂ obtida por cromatografia, sendo que a porcentagem média de Hb A₂ nos chagásicos é maior que a encontrada nos não chagásicos.

Os contrastes para comparações dos grupos dentro dos métodos são dados abaixo:

Eletroforese

comparação	contraste Cj	Ic[Cj;95%]	significância
Chagásico-não chagásico	0,444	[0,162;0,726]	S

Cromatografia

comparação	contraste Cj	Ic[Cj;95%]	significância
Chagásico-não chagásio	0,384	[0,102;0,666]	S

Com estes resultados concluímos que a diferença entre as médias é significativa, ou seja, o grupo chagásico apresenta maior porcentagem de Hb A₂ tanto por eletroforese como por cromatografia.

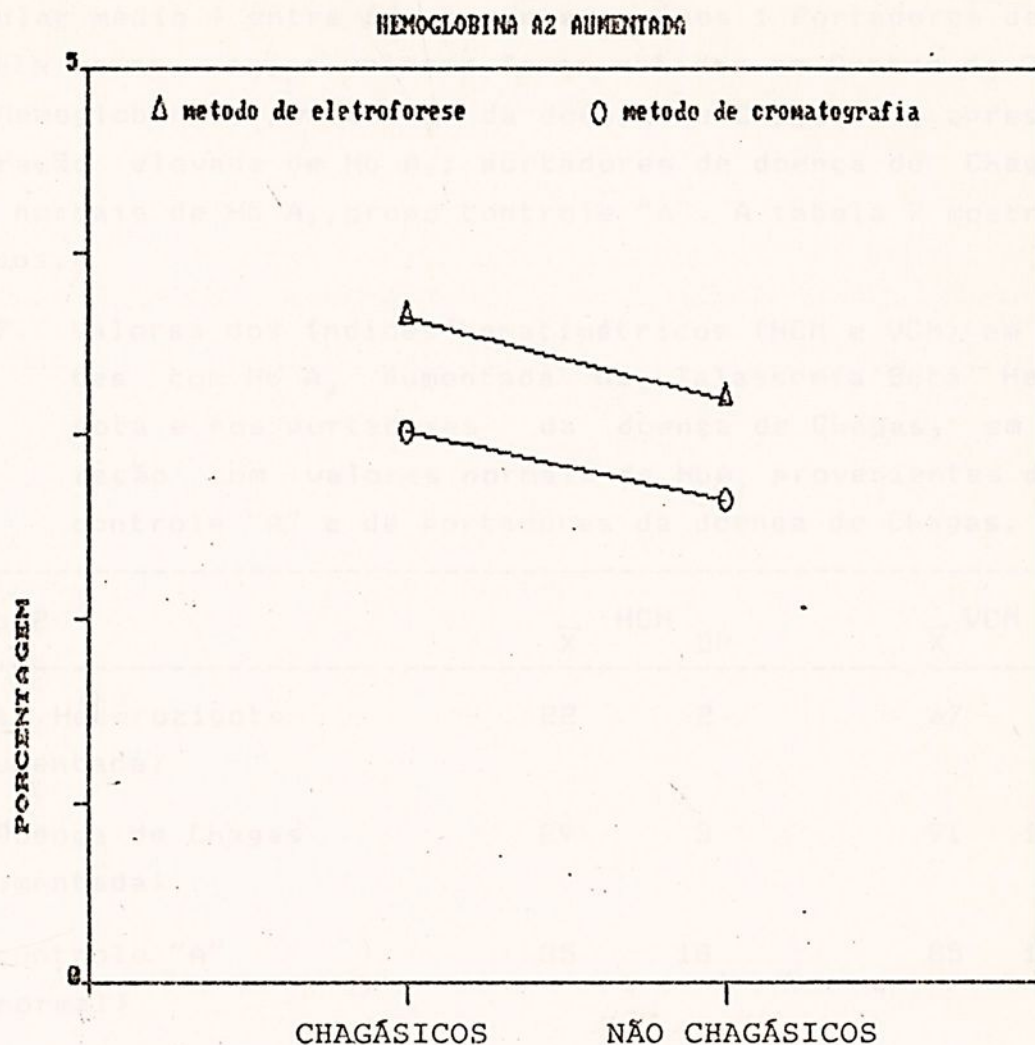


Figura 25. Porcentagem de hemoglobina A₂ aumentada analisada por eletroforese e cromatografia em chagásicos e não chagásicos.

Os valores de Hb A₂ foram comparados com os índices hematimétricos HCM (hemoglobina corpuscular média) e VCM (volume corpuscular médio) entre os seguintes grupos : Portadores de talassemia beta menor, cujos valores foram obtidos no Centro de Referência de Hemoglobinas; portadores da doença de Chagas que apresentaram concentração elevada de Hb A₂; portadores de doença de Chagas com valores normais de Hb A₂, grupo controle "A". A tabela 7 mostra estes resultados.

Tabela 7. Valores dos índices hematimétricos (HCM e VCM) em pacientes com Hb A₂ aumentada na Talassemia Beta Heterozigota e nos portadores da doença de Chagas, em comparação com valores normais de HbA₂ provenientes do Grupo controle "A" e de portadores da doença de Chagas.

HbA ₂	HCM		VCM	
	$\bar{X}$	DP	$\bar{X}$	DP
Tal.Beta Heterozigota (aumentada)	22	2	67	6
Port. Doença de Chagas (aumentada)	29	3	91	10
Grupo controle "A" (normal)	35	18	85	19
Port. Doença de Chagas (normal)	32	9	89	14

A relação entre fenótipos de haptoglobinas (Hp) e portadores da doença de Chagas envolveu a análise de 86 amostras de soro, cujos resultados foram confrontados com o grupo controle "A" constituído por 54 pessoas com as mesmas características clínicas (Miocardiopatia, megacolon, e megaesôfago) porém com sorologia negativa para a doença e com grupo controle B formado por 52 estudantes de segundo grau, sem doença de Chagas e sem manifestações clínicas. A tabela 8 mostra os valores obtidos para os três fenótipos de haptoglobinas : Hp 1-1 , Hp 2-1 e Hp 2-2 . Pelos resultados apresentados verifica-se que o fenótipo Hp 2-1 foi o mais fre-

quente em todos os grupos estudados , seguido do fenótipo Hp 2-2. Os testes estatísticos foram realizados entre os grupos Chagásico e controle A, por apresentarem as mesmas características clínicas. O grupo controle B representa a população normal. Aplicando-se o teste de homogeneidade de Qui-quadrado entre os dois grupos, chagásicos e controle A, e para os três fenótipos de haptoglobinas , obtivemos: $\chi^2_{obs} = 1,219$ e $\chi^2_{crítico} 5\% = 0,103$. Pelo fato do $\chi^2_{5\%}$ ser menor que o χ^2_{obs} , rejeitamos a hipótese de igualdade das duas distribuições , conforme evidencia a figura 26.

Tabela 8. Tipos de Haptoglobinas no grupo chagásico comparado com grupo controle: A - com as mesmas características (cardiopatia, megacólon e megaesôfago), mas sem machado guerreiro positivo; B - estudantes de segundo grau sem doença de Chagas e alterações clínicas.

	Tipos de Haptoglobinas						TOTAL
	Hp 1-1	%	Hp 2-1	%	Hp 2-2	%	
Grupo chagásico	18	(20,93)	38	(44,18)	30	(34,88)	86
Grupo controle A	9	(16,66)	29	(53,70)	16	(29,62)	54
Grupo controle B	9	(17,30)	25	(48,07)	16	(30,76)	52
TOTAL	36		92		62		

As prevalências dos diferentes fenótipos de haptoglobinas foram relacionadas com as diversas formas de manifestação clínica da doença de Chagas. Entre os 86 chagásicos, as formas indeterminada da doença de Chagas (FIDC) e cardiopatia chagásica crônica (CCC) foram as mais predominantes, conforme mostra a figura 27. Na tabela 9 estão expostas as prevalências específicas dos fenótipos de haptoglobina relacionados com as diversas formas da doença de Chagas. As análises estatísticas revelaram que o valor de $\chi^2_{obs} = 5,793$, e o coeficiente de contingência corrigido é igual a 0,3076. Por estes dados concluímos que os fenótipos de haptoglobinas independem das formas de manifestação da doença .

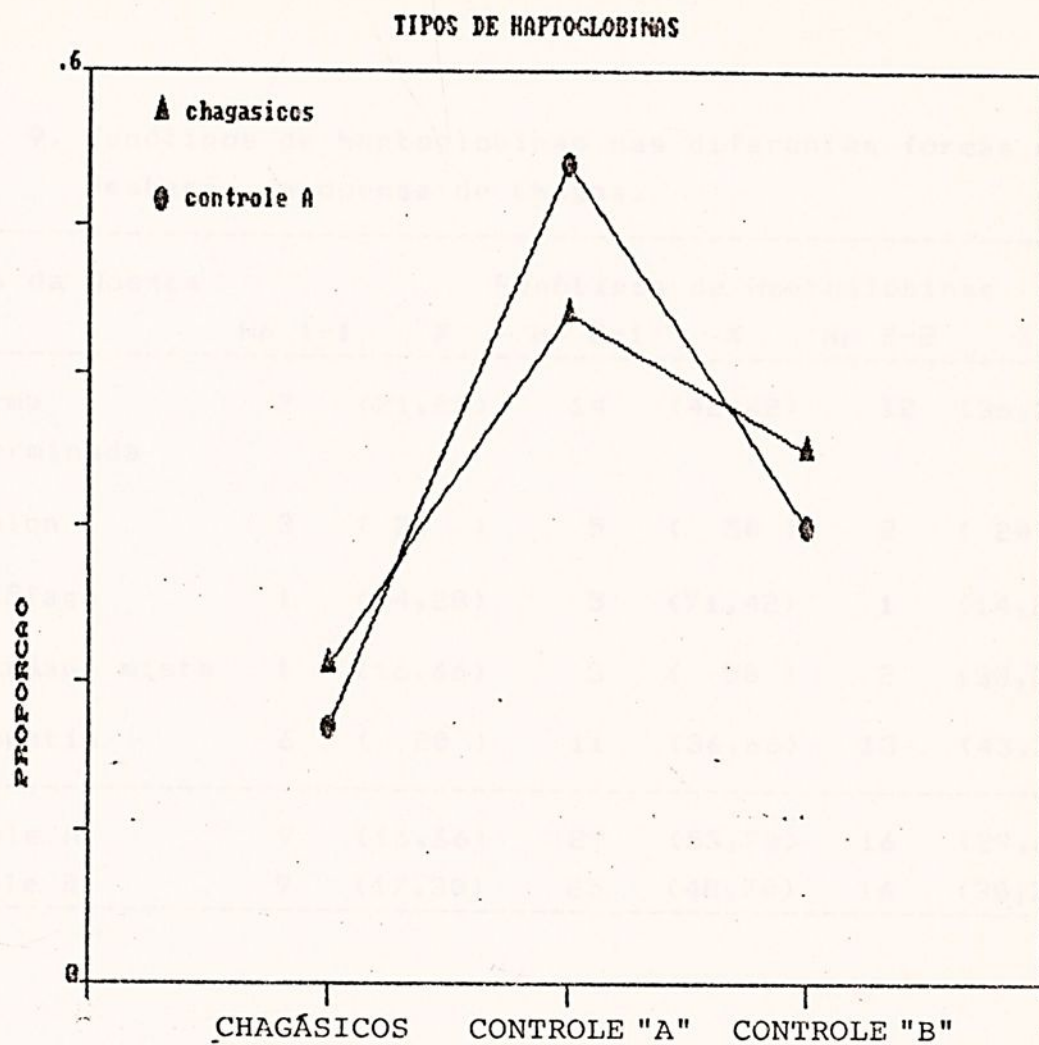


Figura 26. Proporção dos fenotipos de haptoglobinas em chagásicos e grupo controle "A".

Tabela 9. Fenótipos de haptoglobinas nas diferentes formas de manifestação da doença de Chagas.

Formas da Doença	Fenótipos de Haptoglobinas						TOTAL
	Hp 1-1	%	Hp 2-1	%	Hp 2-2	%	
forma indeterminada	7	(21,21)	14	(42,42)	12	(36,36)	33
megacólon	3	(30)	5	(50)	2	(20)	10
megaesôfago	1	(14,28)	5	(71,42)	1	(14,28)	7
cronicidade mista	1	(16,66)	3	(50)	2	(33,33)	6
cardiopatía	6	(20)	11	(36,66)	13	(43,33)	30
controle A	9	(16,66)	29	(53,70)	16	(29,62)	54
controle B	9	(17,30)	25	(48,70)	16	(30,76)	52

FORMAS DA DOENÇA

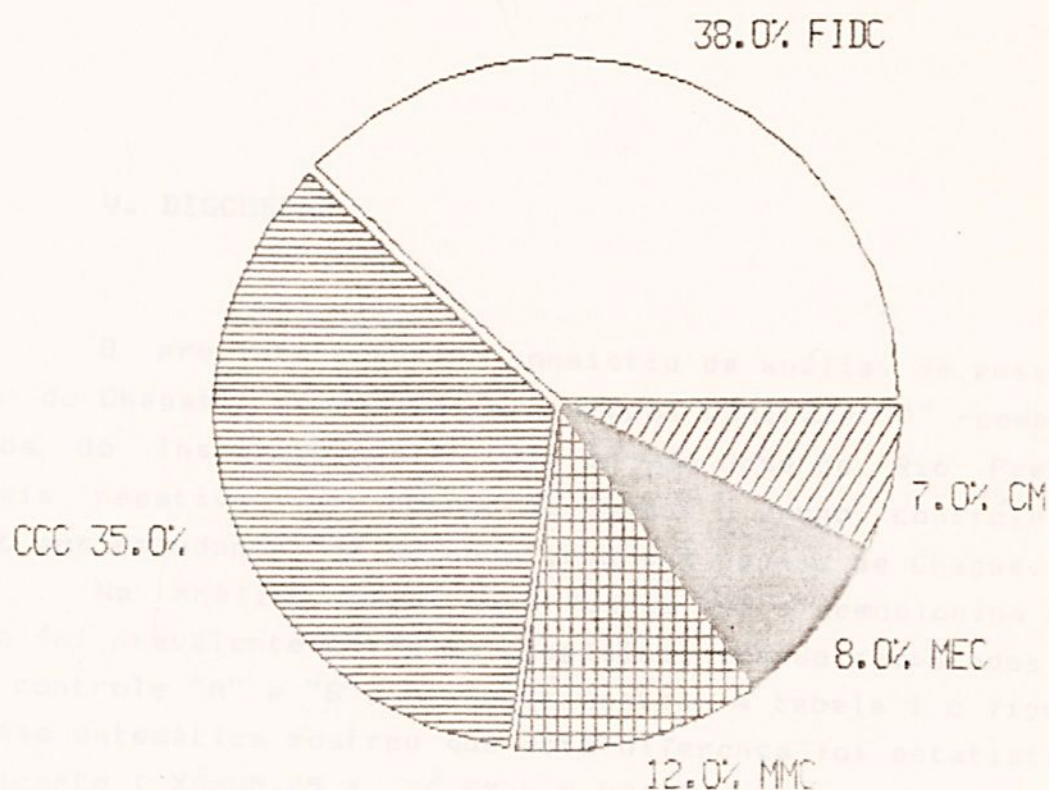


Figura 27. Porcentagem de chagásicos separados por formas de manifestação da doença.

FIDC -forma indeterminada da doença de Chagas

CCC -Cardiopatia chagásica crônica

MMC -Megacólon chagásico

MEC -Megacólon chagásico

CM -Cardiopatia mista

V. DISCUSSÃO

O presente trabalho consistiu da análise de pessoas com doença de Chagas, comparadas com grupos controle "A" -composto por usuários do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto, com sorologia negativa para doença de Chagas e grupo controle "B" - formado por estudantes de segundo grau sem doença de Chagas.

Na análise geral observou-se que a hemoglobina A_2 aumentada foi prevalente entre os chagásicos quando comparados com os grupos controle "A" e "B", conforme mostram a tabela 1 e figura 9, e a análise matemática mostrou que esta diferença foi estatisticamente significativa ($X^2=85,45$; $X^2_{0,5\%} = 5,991$)

Para afastar a possibilidade de que o aumento de hemoglobina A_2 estivesse relacionado à talassemia beta heterozigota nos portadores de doença de Chagas, realizamos análises hematimétricas que incluíram a contagem de eritrócitos, a dosagem de hemoglobinas, o hematócrito e a determinação dos índices hematimétricos HCM e VCM, reconhecidos pela OMS como dados referenciais no diagnóstico laboratorial das talassemias beta heterozigotas (WHO,1982).

Outras análises indicadas pela OMS para confirmar laboratorialmente o portador de talassemia beta heterozigota são os testes de resistência globular osmótica em solução de NaCl 0,36%, e a morfologia eritrocitária, os quais foram realizados em 121 portadores da doença de Chagas classificados segundo a forma de manifestação da doença, ou seja, FIDC (forma indeterminada da doença de Chagas), CCC (cardiopatia chagásica crônica), MCC (megacolon chagásico), MEC (megaesôfago chagásico) e CM (cronicidade mista). Entretanto, devido ao pequeno número das formas de manifestações

crônicas (CCC, MCC, MEC e CM) reunimos estes dados em dois grupos gerais: FIDC e crônicos. Nestes dois grupos as prevalências de hemoglobina A_2 aumentada foram respectivamente 8,1 e 8,3%, mostrando que a elevação dos valores de hemoglobina A_2 não estão relacionados com a manifestação clínica da doença.

As alterações na morfologia eritrocitária foram predominantemente discretas nos portadores da doença de Chagas, diferindo bastante das alterações características observadas na talassemia beta heterozigota. Alterações discretas na morfologia eritrocitária são comuns em nossa população e geralmente decorrem da deficiência alimentar, parasitoses e infecções.

No teste de resistência globular em solução de NaCl 0,36% verificou-se que 23,96% dos portadores de doença de Chagas apresentam positividade em comparação com os grupos controle "A" (7,14%) e "B" (16%). Este teste é seletivo para talassemia beta heterozigota onde 97% dos portadores apresentam positividade, mas também é positivo em outras situações que causam depleção de ferro. A análise conjunta das alterações da morfologia eritrocitária e teste de resistência globular osmótica sugere que estes resultados podem ser devido às baixas condições sócio-econômicas dos portadores da doença de Chagas, além da somatória de alterações físiopatológicas que se evidenciam nas formas crônicas desta doença.

Diante destes resultados concluímos que o aumento da concentração da hemoglobina A_2 nos portadores da doença de Chagas não se deve a talassemia beta heterozigota, sugerindo portanto, uma condição adquirida. Com esta suposição presumimos que outros fatores, provavelmente exógenos, poderiam estar alterando a síntese de hemoglobina A_2 nestes pacientes, entre os quais não podemos deixar de considerar a influência dos medicamentos utilizados.

Condições adquiridas de Hb A_2 aumentada têm sido relatadas em algumas patologias como a malária causada por *Plasmodium vivax*, anemia megaloblástica, mielofibrose, hepatite viral, esquistossomose, entre outras (LIE-INJO e cols, 1971; ALPERIN e cols, 1977; VAN ROSS e cols, 1978; NAUM e cols, 1979; KRISHNAMOORTHY e cols, 1982).

As presenças de outras hemoglobinas anormais entre os três grupos estudados revelaram os seguintes fenótipos: AS, AC, SS, CC, Hb F aumentada, Hb AB2 e Hb AH. A análise da frequência destas hemoglobinas anormais não se mostraram significativas entre os por-

tadores da doença de Chagas e os grupos controle "A" e "B".

Um outro objetivo do nosso trabalho foi estabelecer os valores quantitativos de Hb Fetal e Hb A₂ em portadores da doença de Chagas, uma vez que estas hemoglobinas aparecem aumentadas em algumas patologias, como por exemplo, Hb Fetal em leucemias, e Hb A₂ na malária (SHIMIZU e cols, 1988; ARENDS, 1975).

Quantificamos a Hb Fetal em 50 portadores da doença de Chagas e 50 não chagásicos pelo método de Betke, e concluímos que a média de HbF em portadores da doença de Chagas é menor que a média encontrada em não chagásicos, sendo a diferença estatisticamente significativa ($X^2 = 6,71$; $X^2_{0,5\%} = 3,90$).

Para determinar os valores quantitativos da Hb A₂ analisamos amostras de sangue de 50 portadores da doença de Chagas e 50 não portadores, sendo que as quantificações desta hemoglobina foram efetuadas por dois métodos, Eletroforese em Acetato de Celulose e Microcromatografia em coluna. Por tratar-se de um experimento cruzado, onde os dados provêm de dois grupos (chagásicos e não chagásicos), e realizados por dois métodos (eletroforese e cromatografia), procurou-se analisar o efeito de método e dos grupos para constatar se haveria diferenças com relação aos métodos utilizados e entre os grupos estudados. Pelos resultados encontrados concluímos que a porcentagem de Hb A₂ obtida por eletroforese é maior que a verificada por cromatografia. Apesar disto, independente da metodologia utilizada, confirmamos que a média de Hb A₂ encontrada nos chagásicos é maior que a média de Hb A₂ obtida em não chagásicos (figura 25), sendo as diferenças estatisticamente significantes.

O estudo específico por origem racial, classificada em caucasóides e negróides, mostrou que para os portadores da doença de Chagas as hemoglobinas anormais mais frequentes foram Hb A₂ aumentada e talassemia alfa, sem entretanto apresentar diferenças estatisticamente significativas (figura 10 e tabela 2), ($X^2(A_2)=2,225$; $X^2(tal. alfa)=0,4525$; $X^2_{0,5\%}=3,841$). Para o grupo controle "A" as alterações mais frequentes foram Hb AS, Hb A₂ aumentada e talassemia alfa (figura 11), sendo a diferença estatisticamente significativa somente para Hb AS nos negróides ($X^2(AS)=17,723$; $X^2(A_2)=1,197$; $X^2(tal. alfa)=1,093$; $X^2_{0,5\%}=3,841$). No Grupo controle "B" a ocorrência dos diferentes fenótipos de hemoglobinas não mostrou diferenças entre negróides e caucasóides (figura 12).

Observando separadamente os caucasóides dos três grupos estudados, as Hb AS, Hb A₂ aumentada e talassemia alfa foram as alterações mais frequentes (figura 13), sendo considerada estatisticamente igual somente a proporção de Hb A₂ aumentada entre os grupos controle "A" e "B"; as demais proporções mostraram diferenças estatisticamente significantes (quadro 9).

Entre os negróides tanto para a frequência de hemoglobinas anormais quanto para os dados estatísticos houve coincidência com os caucasóides, conforme mostra os quadros 10 e 11 e figura 14.

Especificamente no caso da Hb AS, notamos diferença na proporção de incidência sendo esta maior entre negróides que em caucasóides (figura 15) ($\chi^2=20,39$; $\chi^2_{0,5\%}=3,841$), valores que estão de acordo com os dados obtidos em análises populacionais para prevalências de hemoglobinopatias na população brasileira (NAOUM e cols 1986). Para os três grupos estudados (chagásicos e controles "A" e "B"), ocorreu diferença na proporção de incidência de Hb AS entre negróides e caucasóides, sendo que para os portadores da doença de Chagas a maior incidência se deu em caucasóides, diferindo dos grupos controle "A" e "B" (figura 16 e quadro 13). Embora estes dados difiram daqueles obtidos por AZEVEDO e cols (1979) onde a incidência de Hb AS foi alta entre os negróides que morreram por doença de Chagas, devemos considerar que estas análises foram efetuadas na Bahia, onde a prevalência de Hb AS é muito alta (NAOUM e cols, 1986).

A identificação de agregados de Hb H em eritrócitos é significativo de talassemia alfa e apresenta frequência de 3,9% em nossa população (CASTILHO e cols, 1987; PEDROLLO, 1988). Nas análises efetuadas no presente trabalho constatamos que o grupo controle "B", constituído por escolares, apresentou prevalência de 3,0% desta alteração genética. Entretanto o grupo formado por portadores da doença de Chagas, e grupo controle "A", composto por pacientes com cardiopatia, megacolon e megaesôfago, mas com sorologia negativa para doença de Chagas, apresentaram prevalência de 17% e 9% respectivamente. A análise da proporção de incidência de agregados de Hb H estimada a intervalos de confiança de 95% mostrou ser maior no grupo chagásico, seguidos dos controles "A" e "B". No estudo da prevalência de agregados intraeritrocitários de Hb H realizado entre os pacientes chagásicos, diferenciados pela forma de manifestação da doença (FIDC e crônicos) os resultados mostraram que aque-

les com FIDC apresentaram prevalência duas vezes superior (22,95%) em comparação com os pacientes com a forma crônica (11,16%). É provável que neste caso, a formação de agregados de Hb H se deva a forma adquirida. Semelhantes evidências foram obtidas em estudos realizados em pacientes leucêmicos e com doenças linfó e mieloproliferativas (BEAVEN e cols, 1963; ANAGNON e cols, 1983; GOMES e cols, 1988). Admite-se que a forma adquirida de agregados de Hb H esteja relacionada a quimioterapia nestes pacientes (GOMES e cols, 1988), e para o presente estudo supomos que a alta prevalência seja devida a outros fatores, uma vez que a maioria dos pacientes com FIDC não recebem tratamento específico, por não apresentarem sintomas clínicos, enquanto que os crônicos são submetidos a tratamento diferenciado conforme o tipo de cronicidade desenvolvida.

A ocorrência de polimorfismos no locus da haptoglobina tem estimulado numerosas investigações no sentido de se verificar possíveis associações entre a haptoglobina e diferentes patologias (VOGEL, 1970; WIENER, 1970; MOREIRA, 1987). No presente estudo analisamos 86 amostras de soro de portadores da doença de Chagas, confrontados com o grupo controle "A" formado por pacientes com as mesmas características clínicas, mas sem doença de Chagas, e grupo controle "B" formado por estudantes de segundo grau. A tabela 8 mostra que o fenótipo mais frequente foi o Hp 2-1. Comparando-se os chagásicos e controle "A" estatisticamente os três fenótipos encontrados (Hp 1-1, Hp 2-1, Hp 2-2) diferem tanto no grupo de portadores da doença de Chagas, quanto no controle "A" ($\chi^2 = 1,219$; $\chi^2_{0,5\%} = 0,103$), cuja visualização gráfica pode ser melhor avaliada na figura 26.

Na tentativa de estabelecer relações entre os fenótipos de haptoglobinas e as formas de manifestação da doença de Chagas observamos que, pelos dados expostos na tabela 9, a ocorrência dos três fenótipos mais comuns de haptoglobinas independe da forma de manifestação da doença de Chagas.

VI - RESUMO

A endemia chagásica é uma das doenças tropicais mais difundidas e graves, tornando-se um problema de saúde pública de primeira ordem nas Américas do Sul e Central. As condições básicas para a transmissão da doença por si só indicam que esta endemia é característica de áreas rurais de baixo nível sócio-econômico. A evolução da doença manifesta-se diferentemente entre os indivíduos e, também, regionalmente. Diferenças de ordem individual e regional são igualmente observadas em alguns tipos de hemoglobinas anormais e haptoglobinas.

No decorrer deste trabalho analisamos 2.739 amostras de sangue divididas em três grupos: Portadores da doença de Chagas (337); grupo controle "A" - formado por usuários do Instituto Adolfo Lutz sem doença de Chagas (1.402); grupo controle "B" constituído por estudantes de segundo grau de São José do Rio Preto (1.000).

Os objetivos do trabalho constavam da:

- a) Análise da prevalência de hemoglobinas anormais no grupo chagásico.
- b) Estabelecimento dos valores quantitativos de Hb A₂ e Hb Fetal nos portadores da doença de Chagas.
- c) Determinação da frequência de fenótipos de haptoglobinas no grupo chagásico.

Todos os parâmetros foram comparados com os grupos controle "A" e "B".

Na análise geral de hemoglobinas anormais observou-se que a Hb A₂ aumentada foi a mais prevalente entre os chagásicos, tanto na forma indeterminada da doença de Chagas (FIDC) quanto na Forma crônica. Análises posteriores comprovaram que este fato não se deve

à associação da doença de Chagas com talassemia beta heterozigota, principal causa de aumento desta hemoglobina, e sim a condições adquiridas, que nos estimula na continuação desta pesquisa.

Uma outra alteração que apareceu com alta prevalência entre os portadores da doença de Chagas, foi a presença de agregados intraeritrocitários de Hb H, que é patognomônico de talassemia alfa. Foi mais prevalente entre os portadores da doença de Chagas com a forma indeterminada da doença (FIDC). Neste caso também, esta alta prevalência provavelmente seja devido à forma adquirida, semelhantemente ao que ocorre em portadores de doenças linfo e mieloproliferativas. Este fato deverá ser melhor analisado já que os portadores da FIDC, em geral, não fazem uso de medicamentos ou drogas que poderiam estar atuando na alta incidência destes agregados.

As presenças de outras hemoglobinas anormais não mostraram diferenças significativas entre os portadores da doença de Chagas e grupos controle "A" e "B".

Com relação à estimativa dos valores quantitativos de Hb Fetal e Hb A₂ em portadores de Chagas, concluímos que, para a Hb Fetal a média foi menor em portadores de Chagas quando comparados com o grupo sem esta patologia e a diferença encontrada foi significativa. Para a Hb A₂, a média em chagásicos foi maior que a média encontrada em não chagásicos sendo as diferenças estatisticamente significativas.

Na análise dos fenótipos de haptoglobina, dos três mais frequentes (Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2) o mais prevalente tanto em chagásicos quanto nos grupos controle "A" e "B" foi o Hp 2-1 seguido de Hp 2-2 e Hp 1-1, sendo as diferenças entre os grupos de portadores da doença de Chagas e não portadores da patologia estatisticamente significantes. Os chagásicos quando analisados separadamente com relação à forma de manifestação da doença, não mostraram relação de dependência com o tipo de haptoglobina encontrado.

Um melhor estudo das altas prevalências de Hb A₂ aumentada e agregados de Hb H em portadores de Chagas deverá ser realizado, na tentativa de esclarecer possíveis interações da parasitose influenciando na síntese de globina.

VII. CONCLUSÕES

1. a) Observou-se alta prevalência de Hb A₂ aumentada em chagásicos, e este fato não se deve à associação com talassemia beta heterozigota, conforme comprovação diagnóstica orientada pela OMS.

b) A alta prevalência de Hb A₂ aumentada é cerca de 8 vezes maior que a obtida na análise da população normal (grupo controle B), e 6,6 vezes nos usuários do Instituto Adolfo Lutz (grupo controle A).

c) Quando separados por forma de manifestação da doença, os chagásicos com forma indeterminada da doença de Chagas (FIDC) não mostraram diferenças com relação aos crônicos (cardiopatias-CCC; megacolon-MCC; megaesôfago-MEC e cronicidade mista-CM), para este tipo de hemoglobina alterada.

d) Provavelmente este aumento de Hb A₂ em chagásicos se deva a condições adquiridas, entre as quais poderíamos citar os medicamentos utilizados. Por outro lado é paradoxal que os pacientes com FIDC, que na grande maioria não recebem tratamento específico por não apresentarem sintomas clínicos, apresentassem valores de prevalência de Hb A₂ aumentada semelhantes àqueles com as formas crônicas da doença. Neste caso podemos considerar que algum fator resultante da interação da parasitose poderia influenciar na síntese de globina.

2. As presenças de outras hemoglobinas anormais cujos fenótipos encontrados foram AS, AC, SS, CC, Hb F aumentada, Hb AB2 e Hb AH, não mostraram diferenças significativas entre os portadores de Chagas e os grupos controle "A" e "B".

3. A quantificação de Hb Fetal nos portadores da doença de Chagas mostrou média menor quando comparada com o grupo de não chagásicos, sendo a diferença estatisticamente significativa.

4. Para a Hb A₂ a verificação dos valores quantitativos foi realizada por dois métodos, eletroforese e cromatografia, nos grupos de chagásicos e não chagásicos. Concluímos que a Hb A₂ estava aumentada nos chagásicos, em ambos os métodos.

5. Com relação ao estudo das hemoglobinas anormais nos três grupos estudados, classificados por origem racial em caucasóides e negróides, as hemoglobinas mais frequentes foram:

a) No grupo chagásico - Hb A₂ aumentada e talassemia alfa, sem apresentar diferenças significativas entre negróides e caucasóides

b) No grupo controle "A" - Hb AS, Hb A₂ aumentada e talassemia alfa, sendo a diferença significante somente para a ocorrência de Hb AS em negróides.

c) No grupo controle "B", a ocorrência dos diversos fenótipos de hemoglobinas não mostrou diferenças estatísticas entre negróides e caucasóides.

6. a) Para a Hb AS a proporção de incidência foi maior em negróides que em caucasóides, valores que estão de acordo com os dados de análise em nossa população.

b) Para o grupo chagásico, a maior incidência de Hb AS foi encontrada entre caucasóides, diferindo dos grupos controles "A" e "B". Estes dados diferem daqueles obtidos em outras análises onde a incidência de Hb AS foi maior em chagásicos negros, provavelmente por ter sido analisada uma população negróide com alta incidência de Hb AS.

7. Encontramos, também, alta prevalência de agregados intraeritrocitários de Hb H em chagásicos.

a) A proporção em chagásicos é 5,6 vezes maior que a encontrada no grupo controle "B" e 1,8 vezes maior que no grupo controle "A".

b) Quando os portadores de doença de Chagas foram analisados separadamente pela forma de manifestação da doença, a maior preva-

lência foi encontrada em portadores da FIDC (forma indeterminada da doença de Chagas).

c) Esta alta prevalência de agregados de Hb H provavelmente seja devido a formas adquiridas e não hereditárias como no caso da talassemia alfa, fato semelhante ao que ocorre nas doenças linfó e mieloproliferativas.

d) Os fatores que estariam atuando na elevação da porcentagem de agregados de Hb H em chagásicos devem ser melhor esclarecidos, já que os pacientes na FIDC quase não fazem uso de medicamentos, os quais poderiam influenciar no aparecimento da Hb H.

8. Com relação ao estudo dos fenótipos de haptoglobinas em portadores da doença de Chagas, concluímos que:

a) O fenótipo mais prevalente foi o Hp 2-1 seguido de Hp 2-2 e Hp 1-1. O mesmo ocorreu nos grupos controle "A" e "B".

b) A diferença de proporção de incidência nos grupos estudados foi estatisticamente significativa.

c) Chagásicos classificados pela forma de manifestação da doença não mostraram relações de dependência com o fenótipo de haptoglobina encontrado.

VIII. SUMMARY

Endemic Chagas disease is one of the most widespread and serious tropical diseases, being a public health problem of the first order in South and Central America. The basic conditions for the transmission of this disease only indicate that it is characteristically endemic in rural areas of low social economic levels. The evolution of the disease manifest itself differently among different regions. Differences of an individual or regional order are also observed in some types of abnormal hemoglobins and haptoglobins.

In this work we analyzed 2.739 blood samples divided in three groups: carriers of Chagas disease (337); control group "A", composed of patients of the Instituto Adolfo Lutz without Chagas disease (1.402); control group "B", composed of secondary school students of São José do Rio Preto (1.000).

The objectives of this work are:

- a) Analyze the frequency of abnormal hemoglobins in the group with Chagas disease.
- b) Establish the quantitative values of the HbA₂ and Hb Fetal in the carriers of Chagas disease.
- c) Determine the frequency of phenotypes of haptoglobins in the group with Chagas disease .

Are the parameters were compared with control groups "A" and "B".

In the general analysis of abnormal hemoglobins it was observed that increased Hb A₂ was most prevalent among suffers of Chagas disease, both in the indeterminate (FIDC) and the chronic forms of disease. Later analyses proved that this fact was not due

to the association of Chagas disease with heterozygotic Beta Thalassemia, principal cause of the increase of this hemoglobin, but instead to acquired conditions, which stimulated the continuation of this research.

Another alteration which is aggregates of Hb H, which is pathognomonic of Alpha Thalassemia. This was most prevalent among the carriers with the indeterminate form of the disease (FIDC). In this case, similar to that which occurs in carriers of lymphatic and mieloproliferative diseases, the high prevalence is probably due to the acquired form. This fact should be better analysed since the carriers of FIDC, in general, do not use medication or drugs which could be responsible for the high incidence of these aggregates.

The presence of other abnormal hemoglobins does not show significant differences between carriers of Chagas disease and control groups.

With relation to the estimate of the quantitative values of Hb Fetal and HbA₂ in carriers of Chagas, we conclude that the mean was lower in carriers of Chagas for Hb Fetal when compared with the group without this pathology and that the difference encountered was significant. For Hb A₂, the mean in sufferers of Chagas was larger than the mean encountered in non sufferers, the differences being statistically significant.

In the analysis of the phenotypes of haptoglobin, of the three most frequent (Hp1-1, Hp2-1 and Hp2-2) the most prevalent, both in sufferers of Chagas and in the control group "A" and "B", was Hp2-1 followed by Hp2-2 and Hp1-1, the differences between the groups of carriers, of Chagas disease and non carriers of the pathology being statistically significant. The sufferers of Chagas, when analysed separately with relation to the form in which the disease was manifested, revealed no dependence relation with the type of haptoglobin encountered.

A better study of the high prevalences of increased Hb A₂ and aggregates of Hb H in carriers of Chagas should be realized in an attempt to clarify possible interactions of the infection which influences the synthesis of hemoglobin.



IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACQUATELLA, H.; CARALIOTI, F.; GOMEZ-MANCEBO, J.R.; DAVALOS, V. & VILLALOBOS, L. - Long term control of Chagas' disease in Venezuela: effects on serologic findings, eletrocardiographic abnormalities, and clinical outcome. **Circulation**, 76 (3): 556, 1987.
- AGUILAR, E.G.; KOLDOBSKY, C.; TORANZO, E.G.D. & CASTRO, J.A. - Species and sex differences in the liver microsomal nitroreductive biotransformation of nifurtimox and benzinidazole. **Ach. Int. Pharm.**, 287(2): 181-187, 1987.
- AGUILERA, X.; RETAMAL, C.; APT, W. & SANDOVAL, J. - Evaluation de las reacciones de doble difusion e inmunolectroforesis en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Parasitol Al Día**, 10: 4-7, 1986.
- AKSOY, M.; ERDEM, S.; DINGOL, G. & DINGOL, K. - Decreased in the concentration of hemoglobim A₂, in various acquired hematologic disorders. **Abstracts of the XIV International Congress of Hematology**, July 1972; pp 393.
- ALAVI, J. - Sickle cell anaemia. Pathophysiology and treatment. **Med. Clin. N. Am.**, 68: 545-556, 1984.
- ALLISON, A.C. - Polymorphism and natural selection in human populations. **Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.**, 29 : 137-149, 1964.

- ALLISON, A.C. & REES, W. - The binding of haemoglobin by Plasma protein (haptoglobins). It's bearing on the "renal threshold" for haemoglobin and the aetiology of haemoglobinuria. **Br. Med. J.**, 2: 1137-1142, 1957.
- ALPERIN, J.B.; DOW, P.A. & PETTENAY, M.B. - Hemoglobin A₂ levels in health and various hematologic disorders - **Am. J. Clin. Pathol.**, 67: 219-226, 1977.
- ALVAREZ, M.; CERISOLA, J.A. & ROHWEDDER, R.W. - Test de inmunofluorescencia para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Bol. Che. Paras.**, 23 : 4-9, 1958.
- AMORIM, D.S. - Chagas' disease. Chapter 11. In: **Progress Card**, 8: 235-279, 1979.
- AMORIM, D.S.; MANÇO, J.C.; GALLO-Jr, L. & MARIN-NETO, J.A. - Clínica: forma crônica cardíaca: In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z. (Eds.), **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979, cap. 8, p. 265-311.
- ÁNAGNOU, N.P.; LEY, J.; CHESCRO, B.; WRIGHT, G.; KITCHENS, C.; LIEBHABER, S.; NIENHUISIA, W. & DEISSERROTH, A.B. - Acquired - alfa thalassemia in preleukemia is due to decreased expression of all four - alfa globin genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, 80: 6051-6055, 1983.
- ANDRADE, V.; BRODSKYN, C. & ANDRADE, S.G. - Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 77(6): 796-799, 1983.
- APT, W.; ARRIBADA, A.; CABRERA, L. & SANDOVAL, J. - Natural history of Chagasic cardiopathy in Chile. Follow up of 71 cases after 4 years. **J. Trop. Med. Hyg.**, 86: 217-222, 1983.
- APT, W. & REYES, H. - Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Chile. I: Distribucion Geográfica, indices de infeccion en vetores y en humanos. **Parasitol. Al Dia**, 10: 94-101, 1986.

- APT, W.; ARRIBADA, A.; AGUILERA, X. & SANDOVAL, J. - Chagas cardiopathy and *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Chile. *Paho. Bull.*, 21(4): 358, 1987.
- AREND, T. - Increased levels of Hb Fetal or A₂ in Venezuelan subjects, In: SCHIMIDT, R.M., *Abnormal haemoglobins and thalassaemia*. Academic Press, Inc. London, 1975, 229-246 p.
- AZEVEDO, E.S.; TAVARES-NETO, J.; CARVALHO, R.E. & ALVES, M.G.H. - Further Studies on the association of Chagas disease and race. *Ciência e Cultura*, 31(6): 671-675; 1979.
- AZOGUE, E.; FUENTE, C. & DARRAS, C.H. - Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79: 176-180, 1985.
- BAGLIONI, C. - The fusion of two polypeptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48: 1880-1885, 1962.
- BALGIR, R.S. - Serological Markers in Unipolar and bipolar affective disorders. *Hum. Hered.*, 36 : 250-253, 1986.
- BARBOSA, A.J.A.; GOBBI, H.; LINO, B.T.; LAGES-SILVA, E.; RAMIRES, L.E.; TEIXEIRA, U.P.A. & ALMEIDA, H.O. - Estudo comparativo entre o método convencional e o método da peroxidase anti-peroxidase na pesquisa do parasitismo tissular na cardiopatia chagásica crônica. *Rev. Inst. Med. Trop. S.P.*, 28(2): 91-96, 1986.
- BARIOGLIO, S.R.; LACUARA, J.L. & OLIVA, P.P. - Effects of ciomipramine upon motility of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, 73(2): 452-454, 1987.
- BARRETO, A.C.P. & AMATO-NETO, V. - Subsídios para nova conceituação da forma indeterminada da doença de Chagas. *Rev. Hosp. Clin. Med. S.P.*, 41(6): 249-253, 1986.
- BARRETO, M.P. - Epidemiologia. In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z. (Eds.). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979, p.89-151.



- BASSO, B.; MORETTI, E.R. & VOTTERO-CIMA, E. - Comportamento antigênico del *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* y del *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli*. *Medicina*, 44(516): 475, 1984.
- BAYER, P.M.; HOTSCHER, H. & KNOTH, E. - Intestinal alkaline phosphatase and the ABO blood group system - A new aspect. *Clin. Chim. Acta.*, 108: 81-87, 1980.
- BEAVEN, G.H.; STEVENS, B.L.; DANCE, N. & WHITE, J.C. - Occurrence of haemoglobin H in leukaemia. *Nature*, 199: 1297-1298, 1963.
- BECKMAN, G.; EKLUND, A.; FROLANDER, N.; STJERNBERG, N. - Haptoglobin group and Lung cancer - *Hum. Hered.*, 36: 258-260, 1986.
- BELLINGHAM, A.J. - Hemoglobins with altered oxygen affinity. *Br. Med. Bull.*, 32: 234-238, 1976.
- BERNINI, L.F. & BORRI-VOLTATTORNI, C. - Studies on the structure of human haptoglobin. I. Spontaneous refolding after extensive reduction and dissociation. *Biochim Biophys Acta*, 200: 203-19, 1970.
- BETKE, K.; MARTI, N.R. & SCHLICHT, I. - Estimation of Small percentages of foetal haemoglobin. *Nature*, 184: 1877, 1959.
- BEUTLER, E. - G6PD as a genetic marker. *Hemoglobin*, 4(5-6): 761-767, 1980.
- BLACK, J.A. e cols. - Gene action in the human haptoglobins. III Isolation of the alfa chains as single gene products. Isolation molecular weight; and amino acid composition of alfa and beta chains. *Can. J. Biochem.*, 48: 123-32, 1970.
- BRENER, Z. - Infecção e doença de Chagas. *A Saúde no Brasil*, 1(4): 219-223, 1983.
- BRENER, Z. - Recent advances in the chemotherapy of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (R.J.)*, 79: 149-155, 1984.
- BUNYARATVEJ, A.; BUTTHEP, P.; YUTHAVONG, Y.; FUCHARDEN, S. & KHUSMITH, S. - Increased phagocytosis of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes with haemoglobin E by peripheral blood monocytes - *Acta Haemat.*, 76: 155-158, 1986.

- CAMARGO, M.E.; HOSHINO-SHIMIZU, S. & SIQUEIRA, G.R.V. Hemmagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. *Rev. Inst. Med. Trop. S.P.*, **15**: 81-85, 1973.
- CAMARGO, M.E.; SILVA, G.R.; CASTILHO, E.A. & SILVEIRA, A.C. - Inquérito sorológico da prevalência de infecção Chagásica no Brasil 1975/1980. *Rev. Inst. Med. Trop. S.P.*, **26**: 192-204, 1984.
- CAMMAROTA, H.E. & STORINO, R.A. - Estudio de la respuesta Immune humoral en el paciente afectado de miocardiopatía chagásica crónica. *Prens. Med. Arg.*, **73**: 559, 1986.
- CASTILHO, E.M.; NAOUM, P.C.; GRACIANO, R.A.S. & SILVA, R.A. - Prevalência de talassemia alfa em pacientes com anemia e em pessoas sem anemia. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, **23**: 131-34, 1987.
- CEDILLOS, R.A.; TORREALBA, J.W.; TONN, R.J.; MOSCA, W. & ORTEGON, A. - El Xenodiagnóstico artificial en la enfermedad de Chagas. *Bol. Ofic. Sanit. Panm.*, **93**(3): 240, 1982.
- CHAGAS, C - Nova espécie, morbida do homem, produzida por um tripanozoma (*Tripanozoma cruzi*). *Brazil-Med.*, **23**: 161, 1909.
- CHARACHE, S. & CONLEY, C.L. - Hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **165**: 37, 1969.
- CLEVE, H.; GORDON, S.; BOWMAN, B.H. & BEARN, A.G. - Comparision of the tryptic peptides and aminoacid composition of the beta polipeptide chains of the three common haptoglobin phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.*, **19**: 713-721, 1967.
- CONCEIÇÃO, M.M.; SALZANO, F.M.; FRANCO, M.J.L.P.; WEIMER, T.A. & KRIEGER, H. - Demography genetics, and race admixture in Aracajú, Brazil : *Rev. Bras. Genet.*, **X**(2): 313-331, 1987.
- CORRAL, R.; FREILIJ, H. & GRINSTEIN, S. - Specific circulating Immune complexes in acute Chaga's disease. *Rev. Inst. Med. Trop. S.P.*, **29**(1): 26-32, 1987.
- CORTEZ, J.M.; GONZALES-HERMOSILLO, J.A.; REYES, P.A.; RIOS, M.A.M.; CASTREJON, O.U. & DELATORRE, M.R. - La miocardiopatía chagásica en México. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.*, **56**: 499-505, 1986.

- COURA, J.R. - Características da doença de Chagas. *Anais da quinta Reunião Anual sobre Pesquisa básica em doença de Chagas, Caxambú* - 9/11/1978, p. 35-43.
- DAVILA, H.; BELOSCAR, J.S.; BOTASSO, O.A. & MORINI, J.C. - Alteraciones electrocardiográficas en individuos infectados con *Trypanosoma cruzi*, con distinto tiempo de residência en áreas de alta endemicidade - *Medicina (B.A.)*, 47: 154-158, 1997.
- DIAS, J.C.P. - Mecanismos de transmissão. In BRENER, Z. & ANDRADE, Z. (Eds.). "*Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas"; Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979; p. 152-174.
- DIAS, J.C.P. - Aspectos previdenciários da doença de Chagas no Brasil. *Boletim dos Centros de Estudos - INAMPS MG*, 3(12): 13-24, 1981.
- DIAS, J.C.P. & DIAS, R.B. - Participação da comunidade no controle da doença de Chagas. *A Saúde no Brasil*, 1(4): 205, 1983.
- DIAS, J.C.P.; LOYOLA, C.C.P. & BRENER, Z. - Doença de Chagas em Minas Gerais: Situação atual e perspectivas. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 37: 7-28, 1985.
- ESPINOSA, R.; CARRASCO, H.A.; BELANDRIA, F.; FUENMAYOR, A.M.; MOLINA, C.; GONZALES, R. & MARTINEZ, O. - Life expectancy analysis in patients with Chagas disease; prognosis after one decade (1973-1983). *Int. J. of Cardiol.*, 8: 45-56, 1985.
- FEILIJ, H.; MULLER, L.; CAPPA, S.M.G. - Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *Journal of Clin. Microb.*, 10(2): 327-333, 1983.
- FERREIRA Jr., O.C.; ALBANESI Fo., F.M. & BARCINSKI, M.A. - Monocyte procoagulant activity induced by concanavalin A in decreased in a population of chronic chagasic patients. *Bras. J. Med. Biol. Res.*, 19: 699-706, 1985.
- FLINT, J.; HILL, A.V.S.; BOWDEN, D.K.; OPPENHEIMER, S.J.; SILL, P.R.; SERJEANTSON, S.W.; VANA-KOIKI, J.; BHATIA, K.; ALPERS, M.P.; BOYCE, A.J.; WEATHERALL, D.J. & CLEGG, J.B. - High frequencies of alfa thalassaemia are the result of natural selection by malária. *Nature*, 321(19): 744, 1986.

FRANCO, M.H.L.P.; WEIMER, T.A. & SALZANO, F.M. - Blood polymorphisms and racial admixture in two Brazilian populations. *Am. J. Phy. Anthropol.*, **58**: 127-132, 1982.

FRANCO, M.H.L.P. & SALZANO, F.M. - A comparative study of albumin variants found in Brazil. *Hum. Hered.*, **35**: 34-38, 1985.

GALATIUS-JENSEN, F. - Rare phenotype in the Hp System. *Acta Genet.*, **8**: 248-255, 1958.

GATTAS, C.R.; ALBANESI Fo, F.M. & BARCINSKI, M.A. - Lymphocytes subpopulations in chronic Chagas' disease. *Immunol. Letters*, **8(5)**: 289-292, 1984.

GATTAS, C.R.; ALBANESI Fo, F.M. & BARCINSKI, M.A. - Caracterização das subpopulações de linfócitos T definidos por anticorpos monodonais na cardiopatia Chagásica crônica. *Arq. Bras. Card.*, **47(4)**: 237-242, 1986.

GIBLETT, E.R. - Haptoglobin types in American negroes. *Nature*, **103**: 192-193, 1959.

GIBLETT, E.R. - Haptoglobin: a review. *Vox Sang*, **6**: 513-524, 1961.

GIBSON, W.C. - Application of new technologies to epidemiology. *Brit. Med. Bull.*, **41(2)**: 115-121, 1985.

GOLDSMITH, R.S.; ZARATE, R.J.; ZARATE, L.G.; KAGAN, I. & JACOBSON, L.B. - Clinical and Epidemiologic studies of Chagas' disease in rural communities in Oaxaca State, Mexico, and a seven - year follow-up: I. Cerro del Aire. *Paho Bull.*, **19(2)**: 1 20, 1985.

GOMES, C.T.; NAOUM, P.C. & ANGULO, I. - Talassemia alfa adquirida na doenças linfo e mielo proliferativas. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, **24(3)**: 98-101, 1988.

GUHL, F.; JARAMILLO, C.; MOGOLLON, J.H.; RODRIGUES, J.; SANCHES, N. & MARINKELLE, J.C. - Rastreo soroepidemiológico de donantes de sangue chagásicos en una zona endêmica (Norte de Santandre - Colombia) - *Rev. Latino Americana de Microb.*, **29(1)**: 63-66, 1987.

- GURTLE, R.E.; WISNIVESKY COLLI, C.; SOLARZ, N.D.; LAURICELLA, M. & BUJAS, M.A. - Dynamics of transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of Argentina: II: Household infection patterns among children and dogs relative to the density of infected *Triatoma infestans*. *Paho Bull.*, **21**(3): 280, 1987.
- HAAS, E.J.C.; SALZANO, F.M.; ARAUJO, H.A.; GROSSMAN, F.; BARBETTI, A. WEIMER, T.A.; FRANCO, M.H.L.P.; VERRUNO, L.; NASSIF, O.; MORALES, V.H. & ARIENTI, R. - HLA antigens and other genetic markers in the Mapuche indians of Argentina. *Hum. Hered.*, **35**: 306-313, 1985.
- HAMEL, M.L.H.; SALZANO, F.M. & FREITAS, M.J.M. - The Gm polymorphism and racial admixture in six amazonian populations. *J. Hum. Evol.*, **13**: 517-529, 1984.
- HAMMOND, D.J.; CROFT, S.L.; HOGG, J. & GUTTERIDGE, W.E. - Strategy for the prevention of the transmission of Chagas' disease during blood transfusion. *Acta Tropica*, **43**: 367-368, 1986.
- HART, G.; HAIDARIS, C.G. & SO, M. - Neuranimidases from *Trypanosoma cruzi*: Analysis of enhanced expression of the enzyme in infections forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 8320-8324, 1987.
- HERCBERG, S.; CHAULIAC, M.; GALAN, P.; DEVANLAY, M.; ZOHOUN, I.; AGBOTON, V.; SOUSTRE, Y.; BORIES, C.; CHRISTIDES, J.P.; POTIER DE COURCY, G.; MASSERAIMBAULT, A.M. & DUPIN, H. - Relation ship between anaemia, Iron and Folic acid deficiency Haemoglobinopathies and parasitic infection. *Human Nutrition Clinical*, **40C**: 371-379, 1986.
- HIGASHINO, K.; HASHINOTSUME, M.; KANG, K.Y.; TAKAHASHI, Y. & YAMAMURA, Y. - Studies on a variant alkaline phosphatase in sera of patients with hepatocellular carcinoma. *Clin. Chim. Acta.*, **40**: 67-81, 1972.
- JAYLE, M.F. & MORETTI, J. - Haptoglobin: Biochemical, Genetics and physiopathologic aspects. *Progr. Hematol.*, **3**: 342-359, 1962.
- JOLLY, J.G.; SARUP, B.M. & AIKAT, B.K. - Diabetes mellitus and blood groups. *J. Indian. M. A.*, **52**(3): 104-107, 1969.



- JOSKOWICZ-HONTEBEYRIE, M.; SAID, G.; MILON, G.; MARCHAL, G. & EISEN, H. - L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed - type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur. J. Immunol.*, **17**: 1027-1033, 1987.
- KAN, Y.N. - New methods for the diagnosis of genetic diseases. In "MARX, J.L. (Eds.) - *A revolution in Biotechnology* - Cambridge University Press - New York - p.172-173;. 1989.
- KATTAMIS, C.; EFREMOV, G. & POOTRAKUL, S. - The heterogeneity of normal Hb A₂ - Beta Thalasaemia in Greece. *J. Med. Genet.*, **18**: 266-270, 1981.
- KIPNIS, T.L.; TAMBOURGI, D.V.; SUCUPIRA, M. & DIAS DA SILVA, W. - Effect of *Trypanosoma cruzi* membrane components on the formation of the classical pathway C3 convertase. *Bras. J. Med. Biol. Res.*, **19**: 271-278, 1986.
- KIRCHHOFF, L.V.; GAM, A.A. & GILLIAM, F.C. - American Trypanosomiases (Chagas' disease) in Central American Immigrants. *The Am. J. of Med.*, **82**: 915-9, 1987a.
- KIRCHHOFF, L.V.; GAM, A.A.; GUSMÃO, R.O.; GOLDSMITH, R.S.; REZENDE, J.M. & RASSI, A. - Increased specificity of serodiagnosis of Chagas' disease by detection of antibody to the 72 and 90 kilodalton glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Infectious Disease*, **155**(3): 561-564, 1987b.
- KOLMER, J.A.; SPAUDING, E.H. & ROBSON, H.W. - *Approved laboratory technic*. 5a. ed. New York. Appleton, 1951.
- KRISHNAMOORTHY, R.; ELION, J.; KUHN, J.M.; LAGRANGE, J.L.; ROCHETTE, J.; LUTON, J.P.; BRICAIRE, H. & LABIE, D. - Haemoglobin A is elevated in hyperthyroid patients. *Nov. Rev. Fr. Haematol.*, **24**: 39-40, 1982.
- KUNKEL, H.G. & WALLENIUS, D.J. - New hemoglobin in normal adult blood. *Science*, **122**: 288-290, 1955.



- LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L.E.; KRETTLI, A.C. & BRENER, Z. - Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis rate of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. *Parasite Immunol*, 9: 21-30, 1987.
- LANDMAN, G.; ALVES, A.C.; MENDES, N.F. & MENDES, E. - Identification of *Trypanosoma cruzi* in human tissues using an immunoperoxidase method: Study of acute Chagas' disease, congenital form. *Allergol et Immunopathol*, 14(6): 509-513, 1986.
- LEMESRE, J.L.; AFCHAIN, D.; OROZCO, O.; LOYENS, M.; BRENIERE, F.S.; DESJEUX, P. CARLIER, Y.; MARTIN, U.; NOGUEIRA-QUEIROZ, J.A.; LERAY, D. & CAPRON, A. - Specific and sensitive Immunological diagnosis of Chagas' disease by competitive antibody anzyme Immunoassay using a *Trypanosoma cruzi*-specific monoclonal antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35(1): 86-93, 1986.
- LIE-INJO, L.E.; LOPES, C.G. & LOPES, M. - Hemoglobin A₂ and pathologies. *Trans. Roy. Soc. Med. Hyg.*, 65: 480-485; 1971.
- LOPES, N.M.P.; MOLL-FILHO, J.; ACBANESI FILHÔ, F.M.; BENCHIMOL, C.B. & GOMES-FILHO, J.B. - Correlação entre os achados da ecocardiografia bidimensional e a cineventriculografia esquerda na lesão apical do ventrículo esquerdo na cardiopatia chagásica crônica. *Arq. Bras. Card.*, 46(2): 105-113, 1986.
- MACEDO, V.; SILVEIRA, C.A.N. & MAVES, W.R. - Influência da terapêutica específica na evolução da forma indeterminada da doença de Chagas - *Anais do XXI Congresso da Soc. Bras. Med. Trop.*, 3-8 Fev. 1985, p. 40-41.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; LAVER, J. & LAWN, R.M. - The molecular genetics of human hemoglobins. *Ann. Rev. Genet.*, 14: 145-178, 1980.
- MARENGO-ROWE, A.J. - Rapid electrophoresis and quantitation of hemoglobin on cellulose acetate. *J. Clin. Pathol.*, 18: 790-792, 1965.
- MARTIN, U.O.; AFACHAIN, D.; CESBRON, J.Y.; ARIAS, E. & CAPRON, A. - Immunoglobulina E y enfermedad de Chagas. *Medicina (B.A.)*, 46: 262-266, 1986.



- MARTIN, U.O.; AFCHAIN, D.; MARTELEUR, A.; LEDESMA, O. & CAPRON, A. - Complejos inmunes circulantes en los distintos estados evolutivos de la enfermedad de Chagas. **Medicina (B.A.)**, **47**: 159-162, 1987.
- MCGUFFIN, P. & STURT, E. - Genetic markers in Schizophrenia. **Hum. Hered.**, **36**: 65-88, 1986.
- MENDIVIL, G.T.; FINKIELMAN, S.; GORODNER, J.O.; BUSTAMANTE, A.; GHILLERON, C.D.; TERCELAN, R.; GATTI, G. & GONZALEZ, R. - Evidência epidemiológica de enfermedad cardiaca no relacionada con el *Trypanosoma cruzi* en zonas endemicas para la enfermedad de Chagas. **Medicina (B.A.)**, **44**: 489-494, 1984.
- MOREIRA, H.W. - Frequência dos fenótipos de haptoglobinas em portadores de hemoglobinas normais e anormais, especialmente falcemias e talassemias. Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética do IBILCE-UNESP, para obtenção do grau de doutor em ciências. São José do Rio Preto, SP, p.1-104, 1987.
- MOYA, P.R. & TROMBOTTO, G.P. - Enfermedad de Chagas: efecto clastogenico de nifurtimox y benznidazol en niños. **Medicina (B.Aires)**, **48(5)**: 487-491, 1988.
- MULLER, L.A.; ISOLA, E.L.D.; QUINTANA, R.D. & GONZALEZ CAPPA, E.M. - Caracterizacion inmunobiologica de una cepa presuntamente atípica de *Trypanosoma cruzi*. **Medicina**, **47**: 139-144, 1987.
- MUNIZ-DIAZ, E. e cols. - Haptoglobina: revisión y nuevas perspectivas. **Sangre**, **30**: 337-47, 1985.
- NAOUM, P.C.; MACHADO, P.E.A.; MICHELIM, O.C.; CURY, R.R. & PIO DA SILVA, M. - Concentration of haemoglobins A₂ and Fetal in Brazilian indians: relationship between these haemoglobins and malaria. **Ciência e Cultura**, **31**: 188-190, 1979.
- NAOUM, P.C.; MOURA CAMPOS, M.C.R.; PARENTI, M.F. & SYZMANSKI, A.M. - An improved eletrophoretic method for a screening program for haemoglobinopathies. **Experientia**, **36**: 875-876, 1980.
- NAOUM, P.C.; DOMINGOS, C.R.B.; MAZZIERO, P.A.; CASTILHO, E.M. & GOMES, C.T. - Hemoglobinopatias no Brasil. **Boletim**, **VIII (141)**: 180, 1986.



- NUMESMAIA, H.G. & AZEVEDO, E.S. - Unusual frequency of negro admixture in necropsies of Chagas' disease cases in Bahia, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. S.P.*, 15: 10-13, 1973.
- NYMAN, M. - Serum haptoglobin: methodological and clinical studies. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 11: (supple 39): 1-169, 1949.
- OLIVEIRA Jr., W.; SALAZAR, L.F.; MALTA, J. & ASSI, M. - Análise crítica da forma indeterminada da doença de Chagas - *Arq. Bras. Card.*, 47(4): 283-288, 1986.
- OLIVEIRA, V.E.G.; MESTRINER, M.A.; KRIEGER, H. & ACERO, P.H.C. - Estudo de marcadores genéticos eritrocitários e doença de Chagas. Desequilíbrio gamético. *Anais da 40a. União da SBPC, Ciência e Cultura*, 40(7): 832-833, 1988.
- OPPENHEIMER, J.; HIGGS, D.R.; WEATHERALL, D.J.; BARKER, J. & SPARK, R.A. - Alpha-thalassaemia in Papua New Guinea. *Lancet*, 1: 424-426, 1984.
- OSUNA, A.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. & RUIZ-PEREZ, L.M. - Inhibition of lysosomal fusion by *Trypanosoma cruzi* in peritoneal macrophages. *Int. J. of Parasitol.*, 16(6): 629-632, 1986.
- PAPAYANNOPOULOUS, R. & STAMATAYANNOPOULOUS, G. - Stains for inclusion bodies. In "Standardization of laboratory reagents and methods for detection of haemoglobinopathies". Hew Publications (CDC) Atlanta, Georgia, 1974.
- PARKER, W.C. & BEARN, A.G. - Control gene mutation as a possible explanation of certain haptoglobin phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.*, 15: 159-181, 1963.
- PEDROLLO, E. - Detecção de hemoglobina Bart e frequência de talassemia alfa em uma população de neonatos de Porto Alegre. Tese apresentada à UFRGS para obtenção do grau de mestre em genética p. 31-37; Porto Alegre; 1988.
- PESSOA, S.B. & MARTINS, A.V. - *Parasitologia Médica* - 11a. Ed. Guanabara Koogan- RJ - 1982.



- PETANA, W.B. - La importancia de los efectos clínicos, psicológicos y sociales experimentados por pacientes con tripanosomiasis Americana (enfermedad de Chagas). **Bol. of Sann. Panam.**, 88(3): 214-217, 1980.
- PINTERA, J. - The Biochemical, Genetic and clinico-pathological aspects of haptoglobin. **Ser. Haematol.**, 4: 1-183, 1971.
- POWANDA, M. e cols. - Phagocytosis and the metabolic sequelae of infection. **J. Reticuloendothel. Soc.**, 27: 67-82, 1980.
- PRABHA, P.S.; PADMA, T. & RAMASWAMY, M. - Haptoglobin patterns in essential hypertension and associated conditions - increased risk for Hp 2-2. **Hum. Hered.**, 37: 345-348, 1987.
- PRATA, A. - Possibilidade de tratamento na doença de Chagas - **Rev. Ass. Med. Bras.**, 24(4): 140-142, 1978.
- RAMALHO, A.S. - Talassemia e hanseníase. **A Folha Médica**, 80(6), 1983.
- RASSI, A.; TRANCHESI, J. & TRANCHESI, B. - Doença de Chagas - In VERONESI, R., "Doenças Infecciosas e Parasitárias". Guanabara Koogan - RJ - p. 674-712; 1982.
- REZENDE, J.M. - Clínica: manifestações digestivas. In: BRENER, Z & ANDRADE, Z. (ed.) "Trypanosoma cruzi a doença de Chagas". Rio de Janeiro, Guanabara Koogan; p. 312-361; 1979.
- RIBEIRO, R.D.; RISSATO E GARCIA, T.A. & BONOMO, W.C. - Contribuição para o estudo dos mecanismos de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas. **Rev. Saúde Publ.**, 21(1): 51-54, 1987.
- ROTHHAMMER, F.; ALLISON, M.J.; NUNEZ, L.; STANDEN, V. & ARRIAZA, B. - Chagas' disease in pré-Columbian South-América. **Am. J. Phys. Anthropol.**, 68: 495-498, 1985.
- RUDDUCK, C.; FRAZEN, G.; LOW, B. & RORSMAN, B. - HLA Antigens and clinical subgroups of Schizophrenia, **Hum. Hered.**, , 34: 18-26, 1984.
- SALZANO, F.M. & FREIRE MAIA, N. - Populações brasileiras: aspectos demográficos genéticos e antropológicos. São Paulo Co Ed. Nacional, 177 p.; 1967.



- SANTOS, S.E.B.; SALZANO, F.M.; FRANCO, M.H.L.P. & FREITAS, M.J.M. - Mobility, genetic markers, susceptibility to malaria and race admixture in Manaus, Brasil. **J. Hum. Evol.**, 12: 373-381, 1983.
- SANTOS, S.J.; TAKAHASHI, C.S. - Avaliação do antichagásico Rochagan (Benzonidazol) quanto ao seu potencial clastogênico sobre linfócitos humanos (in vitro) - Resumos 40a Reunião Anual SBPC. **Ciência e Cultura**, 40(7): 756; 1988.
- SCHIMIDT, R. - Basic Laboratory methods of hemoglobinopathies detection. US department of Health education and Welfare Public health Service. **Center for disease control**, Atlanta, Georgia. 1976.
- SCHROEDER, W.A.; SHELTON, J.B.; CORMACK, J. & JONES, R.T. - The amino acid sequence of the gama chain of human hemoglobin. **Biochemistry**, 2: 992, 1963.
- SEGURA, E.L.; PERES, A.C.; YANOUSKY, J.F.; ANDRADE, J. & WYNNE DE MARTINI, G.J. - Decreased in the prevalence of infection by *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease) in young men of Argentina. **Paho Bull**, 19(3): 252, 1985.
- SHIMIZU, K. e cols. - Elevated haemoglobin F in Juvenile and adult cronic myelogenous Leukaemia. **Acta Haemat.**, 80: 28-33, 1988.
- SILVEIRA, A.C. - Epidemiologia e controle da doença de Chagas. **A Saúde no Brasil**, 1(4): 212-18, 1983.
- SILVESTRONI, E. & BIANCO, I. - Screening for microcytemia in Italy: Analysis of data collected in the past 30 years. **Am. J. Hum. Genet.**, 27: 198, 1975.
- SMITHIES, O. - Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochem. J.**, 61: 629-641, 1955.
- SOUZA, W. & SOUTO-PADRON, T. - *Trypanosoma cruzi*- retrato de um invasor. **Ciência Hoje**, 1(4): 42-49, 1983.
- SWAIN, B.K.; TALUKDER, G. & SHARMA, A. - Genetic variations in serum proteins in relation to diseases. **Med. Biol.**, 58: 246-263, 1980.

- Taelman, H.; Schechter, P.J.; Marcelis, L.; Sonnet, J.; Kazyumba, G.; Dasnoy, J.; Hhegele, K.D.; Sjoerdsma, A. & Wery, M. - Difluoromethylornithine an effective new treatment of Gambian Trypanosomiasis - *The Amer. J. of Med.*, 82: 607, 1987.
- Tait, A. - Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. *Nature*, 287(9): 536-538, 1980.
- Taswel, H.F. & Jeffers, D.M. - Isoenzymes of serum alkaline phosphatase in hepatobiliary and skeletal disease. *Am. J. Clin. Pathol.*, 40(4): 349-356, 1963.
- Tay, J.; Schettino, P.M.S.; Ontivero, A.; Jimenez, J.; Artiaga, I.H.; Yanez, Y.G. & Quiroz, M.G. - Epidemiologic Study of Chagas' disease in a town in Oaxaca México. *Paho Bull*, 20(4): 358, 1986.
- Thompson, J.S. & Thompson, M.W. - *Genética Médica*. Cap. 9 - Grupos Sanguíneos e outros marcadores genéticos, p. 189-212, 3a. edição, Ed. Interamericana - RJ. 1981.
- Tibayrenc, M. & Ayala, F.L. - Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution*, 42(2): 277-292; 1988.
- Tuan, D.; Murmane, M.J.; Riel, J.K. & Forget, B.G. - Heterogeneity in the molecular basis of hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Nature*, 285: 335, 1980.
- Van Ross, G.; Moors, A.; De Vlieger, M. & De Groof, E. - Hemoglobin A₂ levels in malaria patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27(4): 659-663, 1978.
- Vella, F. - Acid agar-gel electrophoresis of human hemoglobins. *Am. J. Clin. Pathol.*, 49: 440, 1968.
- Vogel, F. - ABO blood groups and diseases. *Am. J. Hum. Genet.*, 22: 464-475, 1970.
- Wasi, P.; Kruatrachue, M.; Piankiyagum, A. & Pravattmeung, P. - Hemoglobins A₂ and E levels in malaria. *J. Med. Assoc. of Thailand*, 54(8): 559-562, 1971.

- WARNOCK, M.L. & REISMAN, R. - Variant Alkaline phosphatase in human hepatocellular cancers. **Clin. Chim. Acta**, 24: 5-11, 1969.
- WEATHERALL, D.J. & CLEGG, J.B. - **The Thalassemia Syndromes** - 3a. ed. Blackwell Scientific Publications, p. 859, Oxford, 1981.
- WIENER, A.S. - Blood groups and diseases. **Am. J. Hum. Genet.**, 22: 476-483, 1970.
- WILLCOX, M.C.; BJORKMAN, A. & BROHULT, J. - The effect of persistent malarial infections on haemoglobin A₂ levels in Liberian children. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 79: 242-244, 1985.
- WISNIVESKY-COLLI, C.; GURTNER, E.R.; SOLARZ, O.N.; LAURICELLA, M.A. & SEGURA, E.L. - Epidemiological role of humans dogs and cats in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a area central of Argentina. **Rev. Inst. Med. Trop. S.P.**, 27(6): 346-352, 1985.
- WOOD, W.G.; OLD, K.M.; ROBERTS, A.V.S.; CLEGG, J.B. & WEATHERALL, D.J. - Human Globin gene expression: Control of beta, gama and delta-beta chain production. **Cell**, 15: 437-446, 1978.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WORKING GROUP - Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, dignosis and treatment. **OMS Bull.- (WHO)**, 60(5): 643-660, 1982.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - Report of the Vth Annual meeting of the WHO Working Group on the feasibility study on hereditary disease community control programmes (Hereditary anaemias: Alpha thalassaemia). **Hereditary diseases Programe Division of noncommunicable diseases. HERAKLEION (CRETE)** - p. 5-6; 1987.

