

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA

IDENTIFICAÇÃO DE TALASSEMIA ALFA E OUTRAS HEMOGLOBINOPATIAS NO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Sandrine Comparsi Wagner

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum

Dissertação de Mestrado

2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA

IDENTIFICAÇÃO DE TALASSEMIA ALFA E OUTRAS HEMOGLOBINOPATIAS NO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Sandrine Comparsi Wagner

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum

Dissertação de Mestrado

2002

W135i Wagner, Sandrine Comparsi
Identificação de talassemia alfa e outras hemoglobinopatias no Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Sandrine Comparsi Wagner ; orient. Lúcia Mariano da Rocha Silla ; co-orient. Paulo Cesar Naoum. – 2003.

97 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina : Clínica Médica. Porto Alegre – RS, 2003.

1. Talassemia alfa 2. Hemoglobinopatias 3. Anemia 4. Hospital de Clínicas de Porto Alegre I. Silla, Lúcia Mariano da Rocha II. Naoum, Paulo Cesar III. Título.

NLM: WH 190

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla, minha orientadora, que não hesitou em aceitar este projeto, investindo tempo, carinho e dedicação na sua execução.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum, co-orientador deste projeto, pelo seu entusiasmo e incentivo à pesquisa e por ter acreditado e colaborado neste estudo.

Ao curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, bem como seu corpo docente, funcionários e colegas, pelo auxílio e desenvolvimento que contribuíram para a concretização deste projeto.

À Neuza Laydner, secretária do Serviço de Hematologia Clínica do HCPA, pelos valiosos serviços prestados, pelo estímulo e dedicação.

À bioquímica Ana Estela Goldbeck e demais funcionários do Laboratório de Triagem Neonatal da Faculdade de Farmácia desta Universidade, pela cedência do equipamento de HPLC e pelo apoio na realização dos testes.

Aos Drs. João Ricardo Friedrisch, Flavo Beno Fernandes, Christina Bittar, Laura Fogliatto e Liane Daudt, pela ajuda na seleção e encaminhamento de casos ao projeto.

À Dra. Vânia Hirakata, pela importante colaboração na análise estatística.

Ao Prof. Dr. José Roberto Goldim, pela ajuda nas questões bioéticas implicadas neste projeto.

Aos funcionários da zona 14, pela colaboração na coleta das amostras.

À Profa. Simone Martins Castro, pelo estímulo, apoio e preciosas sugestões.

À Associação dos Amigos da Hematologia do HCPA, pelos recursos financeiros obtidos para a realização de exames laboratoriais.

Ao acadêmico Matheus Silvestri, bolsista deste projeto, pela sua dedicação e empenho.

À acadêmica Débora Zechmeister, pelo auxílio na coleta de amostras e elaboração de painéis.

À Maria Inês Schneider Rodrigues, bioquímica do Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo auxílio na análise das eletroforeses.

À bióloga Andréia Sopelsa, pela colaboração e organização do local de pesquisa.

Aos funcionários do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação (GPPG), em especial à Marta Dotto pela incansável colaboração.

Ao Elmo Cardoso, pela revisão final e editoração do material impresso.

Aos pacientes das zonas 13 e 14, por terem compreendido a importância deste trabalho e concordado com a sua execução.

Ao Laboratório Knijnik, por ter consentido e facilitado as constantes trocas no meu horário de trabalho, o que possibilitou a execução deste projeto.

Às farmacêuticas Elizabeth Mantovani e Olga Valente, colegas de trabalho, pelo incentivo, compreensão, carinho e valerosos conselhos.

Aos meus irmãos, Simone, Marco e Marcius, por terem acreditado em mim e pelas constantes palavras de apoio e estímulo.

Aos meus colegas e amigos que me acompanharam neste período, pela presença, apoio e carinho.

Em especial, à memória da Dra. Fani Job, pelo carinho dedicado ao Serviço de Hematologia deste Hospital, pelo estímulo ao meu desenvolvimento científico e pela oportunidade de conhecer pessoas envolvidas no estudo das hemoglobinas.

À minha família, pelo amor, carinho,
estímulo e compreensão que sempre me dedicaram.

Ao Fábio, pela presença constante
em todas as etapas deste trabalho,
por seu carinho, amor e compreensão.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 8 |
| LISTA DE FIGURAS | 9 |
| LISTA DE TABELAS | 10 |
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| 2.1 A hemoglobina..... | 13 |
| 2.2 Genes da hemoglobina..... | 14 |
| 2.3 Ontogenia da hemoglobina..... | 15 |
| 2.4 Distúrbios hereditários que afetam a estrutura e a síntese da hemoglobina..... | 18 |
| 2.5 Talassemias..... | 18 |
| 2.5.1 Histórico da talassemia..... | 18 |
| 2.5.2 Definição da talassemia..... | 20 |
| 2.5.3 Classificação das talassemias..... | 21 |
| 2.6 Talassemias alfa..... | 21 |
| 2.6.1 Bases moleculares da talassemia alfa..... | 22 |
| 2.6.2 Alterações moleculares..... | 22 |
| 2.6.2.1 Deleções do tipo α^+ | 23 |
| 2.6.2.2 Deleções do tipo α^0 | 26 |
| 2.6.2.3 Talassemias α por defeitos não deletoriais..... | 26 |
| 2.6.2.4 Interação de talassemia α com variantes de cadeia β | 27 |
| 2.6.2.5 Talassemia α adquirida..... | 27 |
| 2.6.3 Determinantes fenotípicos da talassemia α | 28 |
| 2.6.4 Fisiopatologia da talassemia α | 28 |
| 2.6.5 Técnicas laboratoriais para diagnóstico da talassemia α | 30 |
| 2.6.6 Classificação clínica e caracterização laboratorial da talassemia α | 35 |
| 2.6.6.1 Portador silencioso..... | 36 |
| 2.6.6.2 Traço talassêmico α | 37 |
| 2.6.6.3 Doença da Hb H..... | 38 |
| 2.6.6.4 Hidropsia fetal..... | 39 |
| 2.6.7 Diagnóstico diferencial das talassemias..... | 40 |
| 2.6.7.1 Anemia ferropênica..... | 40 |
| 2.6.7.2 Anemia da doença crônica..... | 41 |
| 2.7 Distribuição geográfica das hemoglobinopatias e talassemias..... | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 2.7.1 Talassemia α no Brasil..... | 46 |
| 3 JUSTIFICATIVA..... | 49 |
| 4 OBJETIVOS..... | 49 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |
| Frequency of alpha-thalassemia in a Brazilian anemic population | 58 |
| Freqüência de talassemia α em uma população brasileira anêmica | 75 |
| ANEXOS | 92 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| BCSH | British Committee of Standards in Haematology |
| CE | Contagem de eritrócitos |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| Hb A | Hemoglobina A |
| Hb A ₂ | Hemoglobina A ₂ |
| Hb AC | Heterozigoto: Hemoglobinas A e C |
| Hb AS | Heterozigoto: Hemoglobinas A e S |
| Hb Bart's | Hemoglobina Bart's |
| Hb C | Hemoglobina C |
| Hb Constant Spring | Hemoglobina Constant Spring |
| Hb F | Hemoglobina fetal |
| Hb Gower I | Hemoglobina Gower I |
| Hb Gower II | Hemoglobina Gower II |
| Hb H | Hemoglobina H |
| Hb Portland | Hemoglobina Portland |
| Hb S | Hemoglobina S |
| Hb | Hemoglobina |
| HCPA | Hospital de Clínicas de Porto Alegre |
| HPLC | <i>High pressure liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta pressão) |
| O ₂ | Oxigênio |
| PHHF | Persistência hereditária de hemoglobina fetal |
| RDW | <i>red distribution width</i> |
| RIE | Radioimunoensaio |
| VCM | Volume corpuscular médio |
| VHS | Velocidade de hemossedimentação |

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Localização do complexo gênico das globinas
- FIGURA 2 Ontogenia das cadeias globínicas
- FIGURA 3 Mecanismos para produção das formas mais comuns da talassemia do tipo α^+
- FIGURA 4 Arranjo dos genes do complexo gênico da globina α e algumas deleções que são responsáveis pela talassemia α^0
- FIGURA 5 Fisiopatologia da talassemia α
- FIGURA 6 Precipitados intraeritrocitários de Hb H
- FIGURA 7 Eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino
- FIGURA 8 Ilustração esquemática das principais categorias da talassemia α

LISTA DE TABELAS

- | | |
|----------|---|
| TABELA 1 | Síntese das hemoglobinas normais de acordo com o período de desenvolvimento |
| TABELA 2 | Condições associadas à anemia da doença crônica |
| TABELA 3 | Distribuição da frequência de Hb Bart's em diversas populações |

1 INTRODUÇÃO

As anemias hereditárias estão entre as doenças genéticas mais comuns e compreendem um grupo de condições de variável complexidade. No passado, sua distribuição geográfica residia apenas em áreas tropicais e subtropicais do mundo, uma vez que indivíduos portadores de pelo menos um gene para essas desordens apresentavam algum tipo de proteção contra os efeitos letais da malária. Devido a um aumento de movimentos migratórios ocorridos em diversas regiões, com conseqüente miscigenação, esses genes acabaram se difundindo em áreas antes tidas como não endêmicas, como no continente Americano e no Norte da Europa.

De maneira geral, as anemias hereditárias podem ser divididas em dois grandes grupos: (1) as hemoglobinopatias que se caracterizam pela presença de hemoglobinas estruturalmente anormais e cujo exemplo principal é a hemoglobina S (Hb S) que no seu estado homocigoto é responsável pela anemia falciforme e, (2) as talassemias, caracterizadas pela síntese deficiente de uma ou mais cadeias polipeptídicas das hemoglobinas normais.

As talassemias alfa ocorrem pela síntese deficiente de cadeias alfa globínicas, resultando na produção insuficiente de hemoglobina funcional e o acúmulo de cadeias gama (no período fetal até o nascimento) e cadeias beta (durante a fase adulta) o que é responsável pela retirada acelerada de células vermelhas da circulação e conseqüente anemia. Os métodos laboratoriais utilizados para triagem e identificação das talassemias alfa são: hemograma completo, avaliação da morfologia eritrocitária, dosagem de ferro e ferritina, contagem de reticulócitos, eletroforese de hemoglobina, pesquisa intraeritrocitária de hemoglobina H (Hb H), cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), avaliação do nível de síntese de cadeias globínicas e outras técnicas de biologia molecular.

O presente trabalho se propõe a estudar talassemia alfa em pacientes com anemia não ferropênica a esclarecer e indivíduos normais, fazendo uso de técnicas simples e viáveis financeiramente, que poderão ser incorporadas à rotina de um laboratório de hematologia, resguardando o uso de tecnologia mais avançada (biologia molecular) para os casos selecionados.

Salienta-se que as populações brasileiras oferecem uma excelente oportunidade para a compreensão das interações entre as hemoglobinas anormais devido ao intenso processo de mistura racial que aqui ocorre entre grupos portadores de diferentes tipos de hemoglobinopatias.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A hemoglobina

A hemoglobina é uma proteína conjugada, com um peso molecular próximo a 64.500 Da que tem por principal função carrear oxigênio (O_2) dos pulmões para os tecidos periféricos e transportar dióxido de carbono (CO_2) destes tecidos para os pulmões (Telen, 1998).

A molécula de hemoglobina é grosseiramente esférica, com um diâmetro molecular máximo de cerca de 6,4 nm. É constituída por um tetrâmero formado por dois pares de cadeias polipeptídicas (globinas). Cada par de cadeias está ligado a um grupo prostético fortemente colorido, o heme, que é um complexo de ferro e protoporfirina (Spritz e Forget, 1983; Telen, 1998). Os grupos heme, que contêm ferro na forma ferrosa (Fe^{++}) são responsáveis pela cor vermelha típica das hemoglobinas. A oxidação desse ferro para a forma férrica (Fe^{+++}) leva à formação de metemoglobina, de cor acastanhada, que é um pigmento sem função respiratória (Ramalho, 1986a).

Durante a vida intra-uterina, o oxigênio transportado pelas hemoglobinas é obtido do sangue materno pela placenta. A partir do nascimento, ocorrem profundas modificações respiratórias e o oxigênio passa a ser absorvido nos pulmões, direto do ar atmosférico. Desta maneira, para se adequar a condições respiratórias diversas, existem hemoglobinas diferentes capazes de realizar o transporte de oxigênio de forma eficaz (Ramalho, 1986a).

Para funcionar como um meio primário de troca de oxigênio e gás carbônico, a hemoglobina precisa ser capaz de transportar uma grande quantidade de oxigênio, deve ser altamente solúvel, deve captar e liberar o oxigênio em pressões adequadas e ser um bom sistema tampão. A hemoglobina normal exerce bem essas funções, embora muitas variantes podem apresentar vários graus de alteração funcional (Telen, 1998).

As hemoglobinas normais diferem entre si pela sua globina, existindo seis tipos de cadeias polipeptídicas que podem entrar na sua composição: alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), épsilon (ϵ) e zeta (ζ). Na maioria das hemoglobinas normais, a fração globínica é constituída por duas cadeias alfa e duas cadeias não-alfa (Weatherall, 1981; Ramalho, 1986a; Waye, 2001).

A estrutura da hemoglobina pode ser descrita pela terminologia que descreve os seus quatro aspectos básicos: (1) estrutura primária, ou seqüência linear dos aminoácidos; (2) estrutura secundária, que descreve como os aminoácidos dentro dos segmentos da proteína são organizados espacialmente; (3) estrutura terciária, que se refere às relações estéricas dos domínios de seqüência separados entre si, quando analisados como parte de uma seqüência linear da proteína; e (4) estrutura quaternária, ou o modo através do qual as cadeias polipeptídicas se juntam para formar uma única molécula (Telen, 1998). As cadeias hemoglobínicas isoladas são menos estáveis do que os tetrâmeros, indicando que as regiões de contato entre as cadeias polipeptídicas são importantes na manutenção da estabilidade da molécula de hemoglobina (Ramalho, 1986a).

A composição das cadeias polipeptídicas é completamente conhecida. A cadeia α contém 141 aminoácidos e as cadeias não- α , 146. A cadeia δ difere da cadeia β em 10 aminoácidos, enquanto as cadeias γ e β diferem em 39 aminoácidos (Spritz, 1983; Ramalho, 1986a; Ranney e Sharma, 2001).

2.2 Genes da hemoglobina

Os genes que codificam as cadeias globínicas já foram totalmente identificados e encontram-se organizados em dois grupamentos gênicos ("clusters") separados. No braço curto do cromossomo 16, entre a banda P13.2 e o telômero, situa-se o complexo gênico das globinas tipo alfa que compreende um gene para a cadeia

polipeptídica embrionária ζ , quatro pseudogenes ($\psi\xi_1$, $\psi\alpha_1$, $\psi\alpha_2$, θ_1) e dois genes que determinam o mesmo polipeptídeo α (α_1 e α_2). Este grupamento engloba uma extensão de aproximadamente 30.000 pares de bases nitrogenadas (30 Kb). Na porção terminal do braço curto do cromossomo 11, em uma região com aproximadamente 70 Kb, situa-se o grupamento gênico das globinas tipo beta que inclui os genes para a cadeia épsilon (ϵ) (embrionária), os dois genes para cadeias gama (γ^A e γ^G) (fetal), um pseudogene ($\psi\beta$), um gene para cadeia delta (δ) e um gene para cadeia beta (β) (adultas) (Higgs *et al.*, 1989; Weatherall, 2000; Steinberg e Beinz, Jr., 2000; Weatherall, 2001a). (Figura 1)

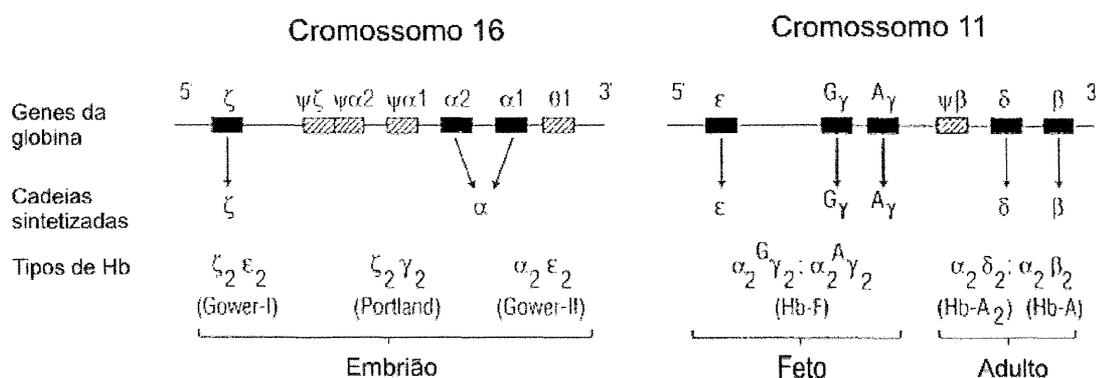


Figura 1. Localização do complexo gênico das globinas tipo alfa no cromossomo 16 e das globinas tipo beta no cromossomo 11. As caixas fechadas representam os genes ativos. Adaptado de Dacie, 1995.

2.3 Ontogenia das hemoglobinas

A síntese de cadeias globínicas sofre uma notável mudança durante a vida pré-natal e pós-natal, adequando-se ao constante desenvolvimento do embrião e do feto sob um rigoroso controle genético (Weatherall, 2001). A tabela 1 apresenta as hemoglobinas normais encontradas nos períodos embrionário fetal e adulto (6 meses após o nascimento), bem como suas concentrações nos referidos períodos.

Tabela 1. Síntese das hemoglobinas normais de acordo com o período de desenvolvimento.

| Período | Hemoglobina | Concentração |
|----------------------------------|--|--------------|
| Embrionário | Gower I ($\zeta_2 \epsilon_2$) | 20-40% |
| | Portland ($\zeta_2 \gamma_2$) | 5-20% |
| | Gower II ($\alpha_2 \epsilon_2$) | 10-20% |
| Fetal | Fetal ($\alpha_2 \gamma_2$) | 90-100% |
| | A ($\alpha_2 \beta_2$) | 5-10% |
| | A ₂ ($\alpha_2 \delta_2$) | traços |
| Adulto (6 meses após nascimento) | A ($\alpha_2 \beta_2$) | 96-98% |
| | A ₂ ($\alpha_2 \delta_2$) | 2-3,5% |
| | Fetal ($\alpha_2 \gamma_2$) | 0-1,0% |

Adaptado de Naoum, 1997a.

A primeira hemoglobina a ser sintetizada durante o período mesoblástico da eritropoese é denominada hemoglobina Gower I (Hb Gower I) e é composta por 2 cadeias zeta e duas cadeias épsilon ($\zeta_2 \epsilon_2$). Logo depois que a Hb Gower I é detectada, inicia-se a síntese de outras duas hemoglobinas embrionárias, as hemoglobinas Gower II (Hb Gower II), composta de 2 cadeias alfa e duas cadeias épsilon ($\alpha_2 \epsilon_2$) e a Portland (Hb Portland), composta de 2 cadeias zeta e duas cadeias gama ($\zeta_2 \gamma_2$). A síntese dessas duas hemoglobinas permanece até mais ou menos a 12^a semana de gestação e, similarmente ao que ocorre com a hemoglobina fetal (Hb F) ($\alpha_2 \gamma_2$), que começa a ser sintetizada após a 4^a semana, expressam uma afinidade maior pelo oxigênio quando comparadas às hemoglobinas adultas, permitindo uma maior captação do oxigênio da circulação materna. A síntese da hemoglobina fetal tem um aumento progressivo, proporcional ao desenvolvimento fetal, sendo que entre a 12^a e a 35^a semana, a proporção relativa de Hb F diminui de cerca de 100 para 85 % e, a partir de então, continua em queda num ritmo de 3 a 4 %

por semana, observando-se um aumento correspondente na síntese na hemoglobina A (Hb A) ($\alpha_2\beta_2$) (Lukens, 1998a). Na época do nascimento, a Hb A corresponde a mais ou menos 10 % da hemoglobina total. A hemoglobina A₂ (Hb A₂), composta por duas cadeias alfa e duas cadeias delta ($\alpha_2\delta_2$), começa a ser sintetizada em quantidades reduzidas no final do período fetal e, após o nascimento essa taxa sofre uma pequena elevação, estabilizando-se após o 6° mês de vida (Naoum, 1997a) (Figura 2).

Como pode ser observado na tabela 1, as cadeias globínicas α são necessárias para a síntese de hemoglobinas presentes na fase fetal e na fase adulta, exercendo importante papel na manutenção da estabilidade destas moléculas. Logo, defeitos que interferem na sua síntese têm repercussão clínica em ambas as fases, diferente das cadeias β , que estão presentes apenas no componente hemoglobínico adulto maior, a Hb A (Chui e Wayne, 1998; Wayne e Chui, 2001).

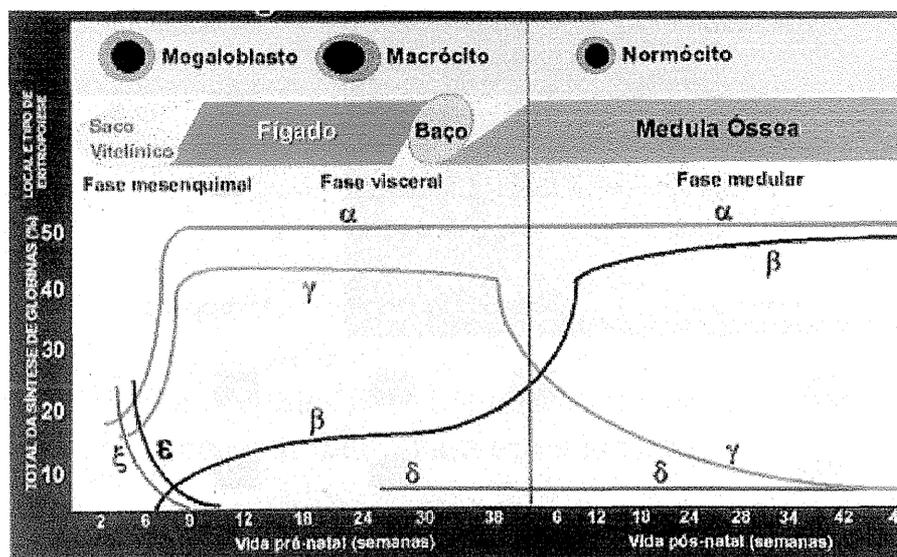


Figura 2. Ontogenia das cadeias globínicas. Adaptado de Weatherall, 1981a.

2.4 Distúrbios hereditários que afetam a estrutura e a síntese de hemoglobina

Durante o desenvolvimento da espécie humana, houve mutações que atingiram a síntese tanto estrutural (qualitativa) como quantitativa das cadeias globínicas. O primeiro grupo é chamado de hemoglobinopatias estruturais e o segundo, de talassemias. Um terceiro grupo consiste na herança de ambas as mutações (uma estrutural e outra qualitativa). Além destes, existe um quarto grupo caracterizado pela síntese aumentada de hemoglobina fetal na vida adulta, chamado de persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF) (Weatherall, 1981b).

Nas hemoglobinopatias estruturais são observadas alterações na composição da fração globínica da hemoglobina. Este defeito pode estar localizado em um ou mais tipos de cadeias polipeptídicas. Logo, representam um conjunto de hemoglobinas anômalas, que diferem das hemoglobinas normais não apenas pela sua composição, mas sobretudo, pelas suas propriedades físico-químicas (Ramalho, 1986b). Até 1998, 750 hemoglobinas variantes já haviam sido descritas, sendo que mais de 75 % delas ocorrem pela substituição de um único aminoácido na cadeia polipeptídica. Outras alterações existentes são devidas a produção de cadeias globínicas híbridas, deleções ou inserções de aminoácidos ou cadeias com duas substituições de aminoácidos (Weatherall, 1999).

Já nas talassemias o que ocorre é uma diminuição geneticamente determinada da síntese de um ou mais tipos de cadeias polipeptídicas da hemoglobina, na ausência de defeito estrutural evidente nas mesmas (Ramalho, 1986b).

2.5 Talassemias

2.5.1 Histórico da talassemia

O termo talassemia é de origem grega e é formado pela união entre duas palavras: thalassa (mar) e aima (falta de sangue), indicando um tipo de anemia reconhecida em indivíduos oriundos de localidades banhadas pelo mar Mediterrâneo.

Foi empregada pela primeira vez como entidade clínica em 1925, quando Thomaz Cooley, um pediatra de Detroit, descreveu uma síndrome observada entre crianças de descendência italiana caracterizada por uma anemia profunda, esplenomegalia e deformidades ósseas (Cooley e Lee, 1925). Segundo Weatherall, na década de 40, Caminopetros, na Grécia, e Neel e colaboradores, nos Estados Unidos, demonstraram que a condição era herdada como um traço recessivo mendeliano. Na década seguinte a doença da hemoglobina H e a síndrome da hidropsia fetal, as duas principais condições clínicas da talassemia alfa, foram reconhecidas através da associação de hemoglobinas anormais (Hb H e Hb Bart's) com anemia hipocrômica e microcítica com níveis normais de ferro (Weatherall e Clegg, 1999).

Métodos para análise de RNA mensageiro e em seguida DNA foram empregados nos anos 70. Estes mostraram que as talassemias α resultavam de deleções nos genes para globina α , o que representou a primeira demonstração direta de uma deleção como base para uma doença genética no homem. Posteriormente, estudos empregando técnicas de hibridização, Southern blotting, clonagem direta e seqüenciamento dos genes para cadeias de globina α e β , tornaram possível definir as diferentes mutações presentes nas talassemias (Weatherall, 1999). Atualmente, as talassemias representam as doenças monogênicas mais comuns no homem (Weatherall, 1997; Borges *et al.*, 2001).

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de caracterizar as talassemias, tanto na parte clínica como laboratorial, visando encontrar testes de rastreamento menos laboriosos e suficientemente eficazes que permitam um diagnóstico correto e a conseqüente melhora na qualidade de vida para os indivíduos afetados (Marengo-Rowe, 1965; Zago *et al.*, 1984; Zago e Paçó-Larson, 1989; Ribeiro e Araújo, 1992; Skogesboe *et al.*, 1992; Flint *et al.*, 1993; Baysal e Huisman, 1994;

Foglietta *et al.*, 1996; Chui e Waye, 1998; Villegas *et al.*, 1998; Prudêncio *et al.*, 2000; Sonati, 2000; Lafferty *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2001).

2.5.2 Definição da talassemia

Talassemia pode ser definida como uma condição na qual a ausência ou redução da taxa de síntese de uma ou mais cadeias globínicas leva ao desequilíbrio na síntese das cadeias globínicas, acarretando uma produção ineficiente de hemoglobina e dano aos eritrócitos (hemólise) ou aos seus precursores (eritropoese ineficaz) devido aos efeitos da persistência das subunidades globínicas (cadeias solteiras) que estão sendo produzidas em excesso relativo (Weatherall, 1999). O aspecto básico da talassemia é portanto quantitativo, contrastando com as alterações qualitativas das hemoglobinopatias estruturais (Lukens, 1998b).

Como a lesão primária em todas as formas de talassemias é a síntese reduzida ou ausente de uma ou mais cadeias globínicas, as manifestações clínicas após o nascimento ocorrem apenas quando estas atingem as cadeias globínicas α e β , necessárias para a síntese de Hb A ($\alpha_2 \beta_2$). Lesões severas na síntese de outras cadeias (γ , ϵ ou ζ) provavelmente são letais ainda no período intra-uterino (Forget, 2000).

Pelo apresentado anteriormente (Figura 2), a Hb F ($\alpha_2 \gamma_2$) é a hemoglobina que se encontra em maior concentração na época do nascimento. Embora o declínio da síntese de cadeias γ e o aumento da síntese de cadeias β iniciem antes do nascimento, a mudança na composição hemoglobínica no sangue periférico ocorre mais tardiamente, devido ao longo tempo médio de vida dos eritrócitos (120 dias). Desta maneira a Hb F é então trocada lentamente pela Hb A. As conseqüências fisiopatológicas são que as lesões que atingem as cadeias α tendem a ser

sintomáticas já no período uterino, enquanto àquelas que atingem a síntese de cadeias β aparecem em torno do 6º mês de vida (Forget, 2000).

2.5.3 Classificação das talassemias

As talassemias podem ser classificadas de acordo com a (s) cadeia (s) globínica (s) cuja síntese está afetada. Assim, a síntese de α -globina está reduzida ou suprimida na talassemia alfa, a síntese de β -globina está diminuída ou suprimida na talassemia beta, a síntese de δ e β -globinas estão diminuídas ou suprimidas na talassemia $\delta\beta$ e assim por diante (WHO Working Group, 1982; Weatherall, 2000).

Possivelmente devido a diferenças nos complexos gênicos das globinas α e β , a patologia molecular das talassemias alfa (ou síndromes alfa talassêmicas) e beta (ou síndromes beta talassêmicas) são completamente diferentes. A maioria das talassemias alfa resulta de deleções gênicas totais ou parciais, enquanto que o conjunto das talassemias beta é causado por mutações de ponto dentro ou adjacentes aos genes de globina β , podendo afetar a expressão ou a regulação destes (Higgs *et al.*, 1989; Weatherall, 1999).

2.6 Talassemias alfa

As talassemias alfa são caracterizadas pela deficiência parcial ou completa da síntese da cadeia alfa nas hemácias de indivíduos afetados (Spritz e Forget, 1983; Baysal e Huisman, 1994; Chui e Waye, 1998; Waye e Chui, 2001). Elas surgem, principalmente, por defeitos herdados na expressão do (s) genes (s) que codifica (m) a cadeia α embora defeitos nesta síntese também podem ocorrer de forma adquirida (Weatherall, 1978; Liebhaber, 1989; Calvo *et al.*, 1994; Bernini e Hartevelde, 1998).

2.6.1 Bases moleculares da talassemia alfa

Existem, normalmente, quatro genes alfa (α) por genoma humano (dois herdados do pai e dois herdados da mãe) (Spritz e Forget, 1983; Chui e Waye, 1998; Lafferty *et al.*, 2000). O indivíduo normal para a produção de globina alfa tem seu genótipo representado pelos dois haplótipos $\alpha\alpha$ ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (Higgs *et al.*, 1989; Weatherall, 1997; Villegas *et al.*, 1998). As lesões moleculares mais frequentemente encontradas em indivíduos afetados são as deleções de um a quatro dos genes alfa. Essas deleções podem atingir ambos os genes para globina α , sendo representadas pelo símbolo α^0 ou abreviado como (--). Neste caso, a produção de cadeias α neste haplótipo está totalmente suprimida. As deleções em que envolvem um dos dois genes para globina α , implicando apenas na redução parcial da produção de cadeias α deste haplótipo, são representadas pelo símbolo α^+ ou abreviadas como ($-\alpha$) (Weatherall, 1997). Além disto, existem mutações sem deleções que envolvem um dos dois genes α , limitando a sua expressão, sendo representados por ($\alpha\alpha^T$), e variantes estruturais dos genes para globina α que podem produzir o fenótipo α^+ , devido às reduzidas velocidades de síntese ou instabilidade. A variante mais comum que provoca este quadro é a hemoglobina Constant Spring (Hb Constant Spring) ($\alpha\alpha^{CS}$) (WHO Working Group, 1982; Weatherall, 1999).

2.6.2 Alterações moleculares

A grande maioria das talassemias alfa (ou síndromes alfa talassêmicas), clinicamente significativas resulta de deleções de um (α^+) ou dois (α^0) genes α globina, enquanto processos por não deleção podem ocasionar tal quadro mas em frequência muito menor (15-20%) (Higgs *et al.*, 1989; Borges *et al.*, 2001). Embora os genes α (α_1 e α_2) codifiquem o mesmo polipeptídeo, a maioria das lesões moleculares foi descrita no gene α_2 . Foi sugerido que este predomínio deva-se ao fato de que a taxa de

síntese deste gene é 2,6 vezes superior à do gene α_1 , logo, apresentando maior impacto sobre a síntese de cadeias α . Desta maneira, defeitos no gene α_2 apresentariam manifestações fenotípicas mais graves e, portanto, seriam mais facilmente identificadas (Higgs *et al.*, 1989; Liebhaber, 1989; Waye e Chui, 2001). Cabe ressaltar que além dos processos de deleção e não-deleção, a talassemia α também pode ocorrer de forma adquirida (Weatherall, 1978; Bernini e Harteveld, 1998). Estes processos serão discutidos a seguir.

2.6.2.1 Deleções do tipo α^+

A análise da seqüência de DNA mostrou que os genes α_1 e α_2 , dentro do complexo gênico da globina α , estão ancorados em dois segmentos duplicados de alta homologia. Estes segmentos foram posteriormente subdivididos em três pequenos segmentos homólogos, X, Y e Z, separados por regiões de não homologia I, II e III (Figura 3A) (Higgs *et al.*, 1989; Kazazian, 1990; Baysal e Huisman, 1994; Weatherall, 2001a). A presença destas regiões de alta homologia favorece o alinhamento incorreto dos cromossomos durante a meiose, levando a um crossing over desigual (Liebhaber, 1989), podendo originar cromossomos com 1 ($-\alpha$) ou 3 ($\alpha\alpha\alpha$) genes para cadeia α (Higgs *et al.*, 1989; Weatherall, 1999).

Existem duas deleções principais que resultam na talassemia α^+ : uma que envolve a perda de um fragmento de 3,7 Kb de DNA (deleção $-\alpha^{3,7}$) e outra que envolve a perda de um fragmento de 4,2 Kb de DNA (deleção $-\alpha^{4,2}$) (Baysal e Huisman, 1994; Foglietta *et al.*, 1996; Borges *et al.*, 2001).

A deleção $-\alpha^{3,7}$ é a deleção mais comumente observada e ocorre devido a um crossing over desigual entre as regiões homólogas Z (Z_1 e Z_2) de cada cromossomo. Neste tipo de crossing over, uma região de 3,7 Kb de DNA é perdida (essa região corresponde exatamente à distância entre α_1 e α_2) de um cromossomo e adicionada a

outro, dando origem a dois produtos: um único gene α e um agrupamento triplicado de genes α , representados pelos símbolos $(-\alpha^{3,7})$ e $(\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7})$, respectivamente (Kazazian, 1990; Foglietta, 1996; Bernini e Harteveld, 1998; Weatherall, 2001a). (Figura 3B). Atualmente, no mínimo três diferentes deleções $\alpha^{3,7}$ já foram descritas. Dependendo da exata posição da recombinação na região Z, elas são designadas por: $(-\alpha^{3,7\text{I}})$, $(-\alpha^{3,7\text{II}})$ e $(-\alpha^{3,7\text{III}})$ (Baysal e Huisman, 1994; Bernini e Harteveld, 1998).

A segunda deleção mais comum é a deleção $(-\alpha^{4,2})$, na qual as regiões envolvidas no crossing over desigual são as X_1 e X_2 . Neste caso, a região perdida tem um tamanho de 4,2 Kb e inclui todo o gene α_2 . Da mesma forma que na deleção $(-\alpha^{3,7})$, dois produtos são formados: um único gene α $(-\alpha^{4,2})$ e um agrupamento triplicado $(\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4,2})$ (Kazazian, 1990; Foglietta, 1996; Bernini e Harteveld, 1998; Weatherall, 2001a). (Figura 3C).

Devido à posição relativa do bloco X em relação ao bloco Z no complexo gênico da globina α , no sentido 5' - 3' (Figura 3A), a deleção $(-\alpha^{3,7})$ é designada como "deleção à direita" e a deleção $(-\alpha^{4,2})$ como "deleção à esquerda" (Higgs *et al.*, 1989; Liebhaber, 1989; Bernini e Harteveld, 1998; Borges *et al.*, 2001).

Além das deleções acima citadas, outras deleções raras envolvendo o gene α_1 $(-\alpha^{3,5})$ ou o gene α_2 $[(\alpha)\alpha^{5,3}]$ já foram descritas (Lacerra *et al.*, 1991; Foglietta, 1996).

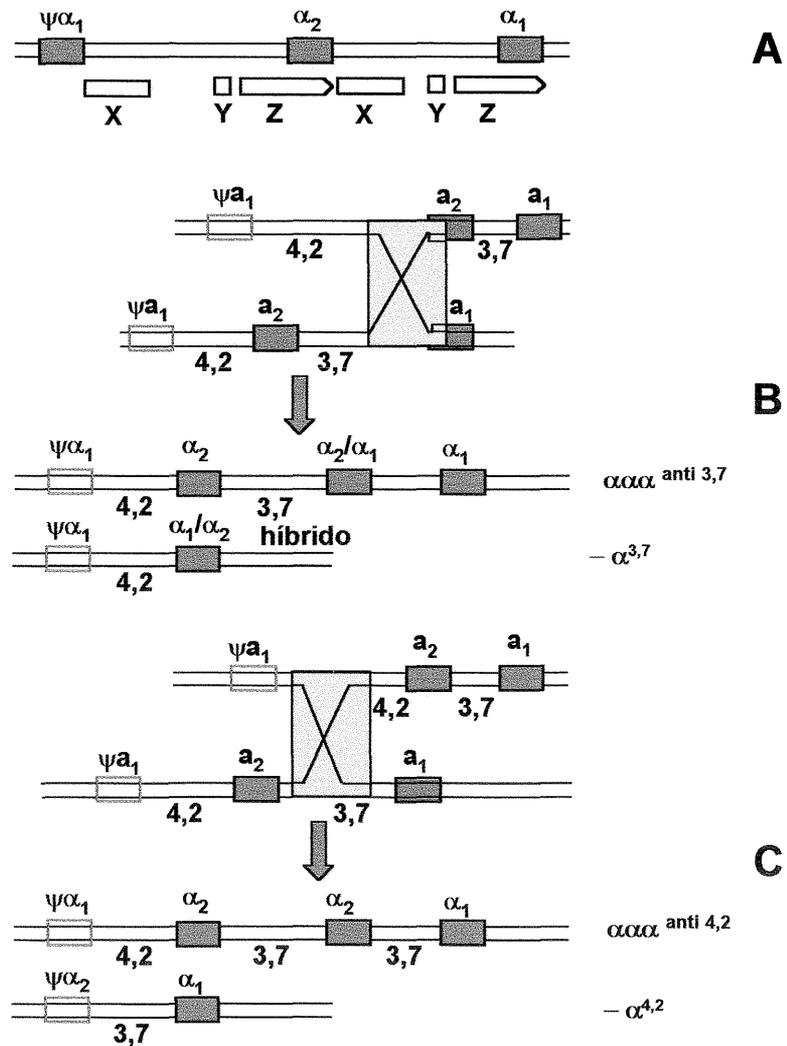


Figura 3. Os mecanismos para a produção das formas mais comuns de talassemia do tipo α^+ : (A) o complexo gênico α mostrando as regiões de homologia X, Y e Z; (B) crossing over desigual no bloco Z gerando uma deleção de 3,7 kb e um cromossomo com 3 genes α ; (C) crossing over desigual no bloco X gerando uma deleção de 4,2 kb e um cromossomo com 3 genes α . Adaptado de Naoum, 1997b e Weatherall, 2001a.

2.6.2.2 Deleções do tipo α^0

Adicionalmente às deleções mais freqüentes ($-\alpha^{3,7}$) e ($-\alpha^{4,2}$), uma grande variedade de deleções mais extensas, embora menos freqüentes, ocorrem dentro do complexo gênico da globina α afetando a sua expressão (Liebhaber, 1989). Até o ano de 1998, 17 deleções que envolvem ambos os genes α (α_1 e α_2), logo abolindo a produção de cadeias α no cromossomo afetado, já haviam sido descritas (Weatherall, 1999). Elas variam desde pequenos fragmentos ($-\alpha^{5,2}$) até aquelas que removem o agrupamento inteiro ($--^{Fil}$, $--^{SEA}$, $--^{Thai}$) (Higgs *et al.*, 1989; Chui e Waye, 1998; Bernini e Hartevelde, 1998). (Figura 4).

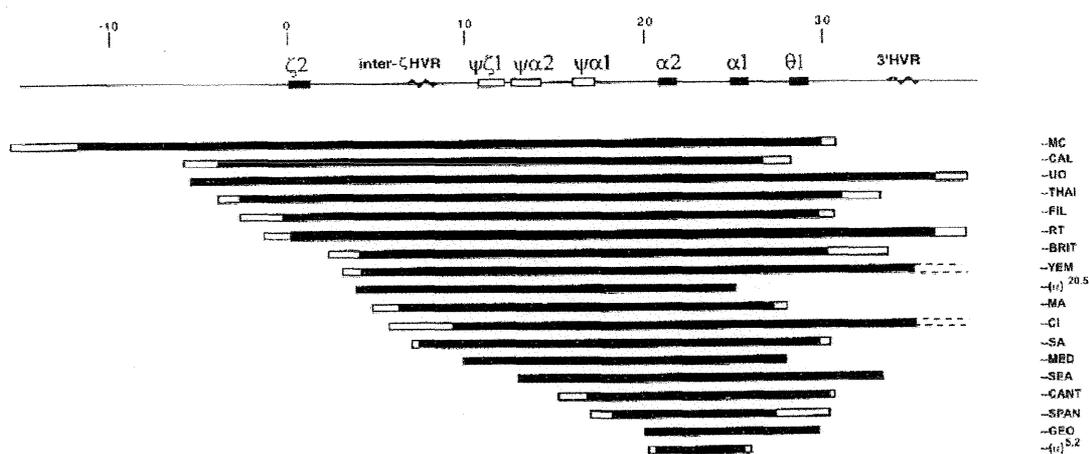


Figura 4. Arranjo dos genes do complexo gênico da globina α e algumas deleções que são responsáveis pela talassemia α^0 . Weatherall, 2001a.

2.6.2.3 Talassemias α por defeitos não delecionais

As formas não delecionais da talassemia α , que são representadas pelos símbolos ($\alpha^T\alpha$) ou ($\alpha\alpha^T$), resultam de mutações de ponto que interferem na transcrição dos genes α , no processamento primário dos produtos ou na produção de cadeias globínicas α instáveis (Weatherall, 1999).

A mutação não deletional mais comum e mais estudada que condiciona um fenótipo de talassemia α é ($\alpha\alpha^{CS}$) (WHO Working Group, 1982; Weatherall, 1999). Ela ocorre devido a uma única substituição no códon de terminação do gene α_2 , situado imediatamente ao códon para o aminoácido 141. Essa substituição, (UAA→CAA), permite que a leitura continue até o próximo códon de terminação, resultando em uma cadeia de globina α com 31 aminoácidos adicionais, denominada de hemoglobina Constant Spring (Hb CS). Além desta, outras variantes estruturais da hemoglobina que condicionam o fenótipo da talassemia α devido a mutações no códon de terminação estão descritas: a Hb Icaria, a Hb Koya Dorya e a Hb Seal Rock (Weatherall, 1981c; Spritz e Forget, 1983).

2.6.2.4 Interação de talassemia α com variantes de cadeia β

O efeito da associação da talassemia α e variantes de cadeia β , por exemplo a Hb S e Hb C, pode alterar a quantidade de hemoglobina variante presente nos casos de heterozigose (Hb AS e Hb AC). Nota-se nestes casos que a concentração da hemoglobina variante (Hb S e Hb C) decresce proporcionalmente ao número de genes α afetados, sendo mais acentuado nos casos de talassemia α^0 . Esta diminuição pode ser devido ao fato das cadeias β presentes na Hb A estarem carregadas negativamente e formarem dímeros mais facilmente do que aquelas carregadas mais positivamente pela mutação sofrida: as cadeias β^S (Glu⁻→Val⁰) e as cadeias β^C (Glu⁻→Lis⁺) (Liebhaber, 1989; Naoum, 1997b).

2.6.2.5 Talassemia α adquirida

Contrastando com a maioria das formas hereditárias, as formas adquiridas não estão relacionadas com deleções dos genes α . As talassemias α podem ser

adquiridas em associação com uma variedade de anormalidades da medula óssea, na qual a síntese de cadeias α alterada parece ter origem clonal (Weatherall *et al.*, 1978).

Os primeiros casos descritos ocorreram na década de 60 em três indivíduos com eritroleucemia. Posteriormente, casos de doenças mieloproliferativas crônicas e agudas foram relatados, apresentando características semelhantes: a existência de duas populações de eritrócitos no sangue de indivíduos afetados, uma com conteúdo normal de hemoglobina e outra apresentando deficiência de síntese de cadeias α ; presença intraeritrocitária de Hb H precipitada (até 95% dos eritrócitos); concentração de Hb H de 10 a 65 % (consideravelmente mais alta do que as encontradas nos indivíduos com Doença de Hb H de origem genética) e; redução na síntese de cadeias α (Weatherall, 1978; Calvo *et al.*, 1984). Weatherall *et al* sugerem que a forma adquirida de talassemia alfa resulta de um clone anormal de precursores eritróides, provavelmente como parte da transformação leucêmica.

2.6.3 Determinantes fenotípicos da talassemia α

A severidade do fenótipo da talassemia α está diretamente relacionada à perda da síntese de cadeias α (Lafferty *et al.*, 2000). Existem três principais fatores que contribuem para o quadro fenotípico (Liebhaber, 1989):

1. o número de genes afetados;
2. o grau no qual a deleção afeta a expressão do gene (perda total ou parcial);
3. o grau no qual o gene afetado normalmente contribui para a síntese de cadeias α .

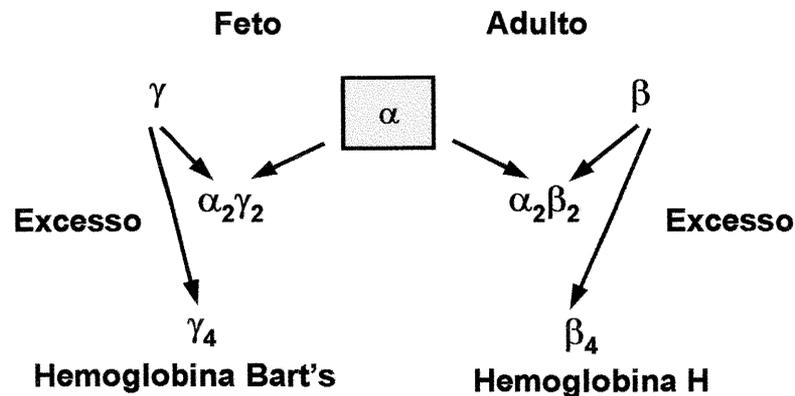
2.6.4 Fisiopatologia das talassemias alfa

Como apresentado anteriormente, as cadeias globínicas α são necessárias para a síntese de hemoglobinas presentes na fase fetal e na fase adulta (Chui e Wayne,

1998). Na fase fetal, a deficiência de cadeias α leva a um excesso relativo de cadeias γ e, na fase adulta, a um excesso relativo de cadeias β . O excesso de cadeias γ e β permite a formação de tetrâmeros destas (γ_4 e β_4), denominadas de Hemoglobina de Bart (Hb Bart's) e Hemoglobina H (Hb H), respectivamente. A fisiopatologia da talassemia α é condicionada, justamente, pela formação destes tetrâmeros, que são instáveis e fisiologicamente inúteis (WHO Working Group, 1982; Weatherall, 2000).

Os tetrâmeros de cadeias γ e β são solúveis nos precursores eritróides e não precipitam em grau significativo dentro da medula, logo as talassemias α não se caracterizam por uma eritropoiese ineficaz severa. Entretanto, os tetrâmeros de cadeias β precipitam no interior de eritrócitos maduros, formando corpos de inclusão. Desta maneira, a anemia presente nas talassemias α ocorre devido à diminuição do tempo de vida destas células (morte celular prematura), consequência da fagocitose aumentada pela microvasculatura esplênica, devido à presença dos corpos de inclusão. Além disso, pelo defeito na síntese de quantidades normais de hemoglobina, os eritrócitos apresentam-se microcíticos e hipocrômicos (Villegas *et al.*, 1998; Weatherall, 2001a; Borges *et al.*, 2001).

Existe outro fator que acentua a hipóxia tecidual na talassemia α . Tanto a Hb Bart's como a Hb H não promovem a interação físico-química entre os grupos heme e tem a curva de dissociação de oxigênio hiperbólica, apresentando alta afinidade pelo oxigênio (mais de 10 vezes, quando comparadas com a Hb A). Assim, elas não são capazes de liberar oxigênio em condições fisiológicas, não sendo adequadas para o transporte deste (Weatherall, 2001a). A Figura 5 esquematiza a fisiopatologia da talassemia α .



Alta afinidade ao oxigênio - Hipoxia
 Instabilidade de homotetrâmeros, corpos de inclusão. Dano da membrana.
 Sobrevivência reduzida das hemácias - Hemólise
 Esplenomegalia - Hiperesplenismo

Figura 5. Fisiopatologia da talassemia α . Adaptado de Weatherall, 2000.

2.6.5 Técnicas laboratoriais para diagnóstico da talassemia α

A avaliação dos índices hematológicos e utilização de técnicas de citologia, eletroforeses, bioquímicas, avaliação de solubilidade, além de técnicas especiais tais como focalização isoelétrica, cromatografia líquida de alta pressão (HPLC- High Pressure Liquid Chromatography) e reação da cadeia polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction), entre outras, têm sido empregadas no diagnóstico da talassemia α e de outras hemoglobinopatias e talassemias (Ribeiro e Araújo, 1987; Sonati *et al.*, 1991; Skogesboe *et al.*, 1992; Sonati e Costa, 1994; Baysal e Huisman, 1994; Sonati *et al.*, 1996; Fucharoen *et al.*, 1998; Villegas *et al.*, 1998; Sonati *et al.*, 2000). A principal etapa consiste em determinar se o paciente é portador de talassemia ou de outro distúrbio hematológico que se assemelhe fenotipicamente à talassemia (Lukens, 1998b), tais como a anemia ferropriva ou outra desordem genética que afeta a síntese de hemoglobina (Weatherall, 1981d). Dentre as técnicas laboratoriais utilizadas,

algumas apresentam suas limitações e muitas vezes é necessário realizar a investigação familiar e o estudo de DNA para determinação correta do genótipo presente na talassemia α (Naoum, 1997b).

Os índices hematológicos podem sofrer alteração na presença de hemoglobinopatias estruturais, além de serem, muitas vezes, determinantes no diagnóstico das talassemias. Os principais índices incluem: dosagem de hemoglobina (Hb), contagem de eritrócitos (CE), volume corpuscular médio (VCM) e distribuição das células vermelhas (Red Distribution Width - RDW) (Clarke e Higgins, 2000). Tais índices são obtidos de contadores hematológicos automatizados que apresentam alta precisão e acurácia. Destaca-se que em alguns casos onde ocorrem apenas a deleção de um único gene α , os índices hematológicos podem se encontrar dentro das faixas de normalidade (Chan *et al.*, 2001).

A pesquisa intraeritrocitária de Hb H apresenta-se bastante útil na caracterização da talassemia α . Os eritrócitos mostram numerosas inclusões de Hb H precipitada após incubação com agentes oxidantes, tais como o azul de cresil brilhante e o azul de metileno (Lin *et al.*, 1990; Baysal e Huisman, 1994; Bain *et al.*, 1994). Estas inclusões conferem aos eritrócitos um aspecto típico denominado de “bola de golfe” (Clarke e Higgins, 2000). A Figura 6 apresenta células com tais inclusões.

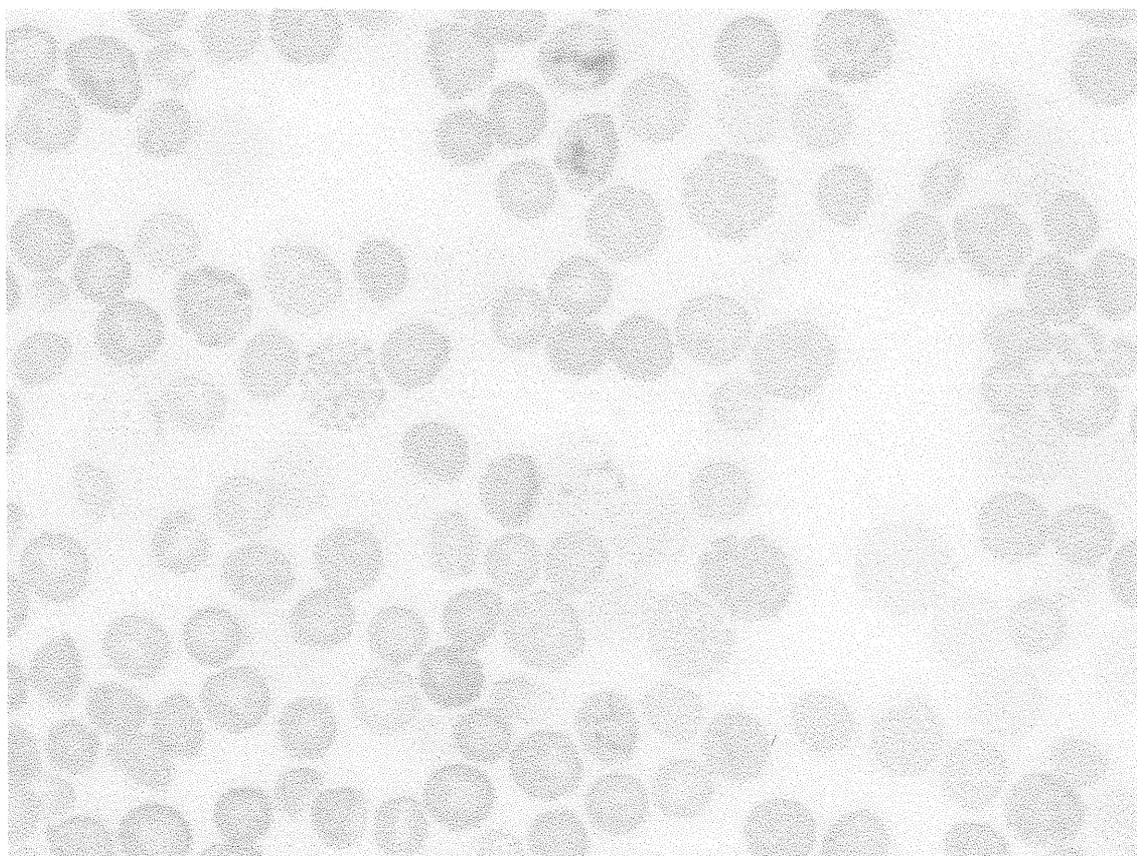


Figura 6: precipitados intraeritrocitários de Hb H em sangue de paciente com Doença de Hb H. Os precipitados assemelham-se a bolas de golfe. Fonte: autora.

As eletroforeses de hemoglobina, em especial as alcalinas e as neutras, constituem-se na principal forma de identificação das hemoglobinas variantes além de desempenhar um papel importante no diagnóstico das talassemias (Weatherall, 1981; Bain *et al*, 1994). O emprego de acetato de celulose como suporte destina-se às análises qualitativas das hemoglobinas em pH alcalino e neutro, além de possibilitar a quantificação da Hb A, A₂, S, C e outras frações presentes (Marengo-Rowe, 1965; Weatherall, 1981c; Bain *et al*, 1994; Naoum, 1997c; Clarke e Higgins, 2000). Nas talassemias α , as Hb H e Hb Bart's podem ser identificadas pelo uso de eletroforese em pH alcalino, na qual a Hb H migra mais rapidamente do que a Hb A e apresenta mobilidade similar à Hb I. A Hb Bart's migra também mais rapidamente do que a Hb A,

mas mais lentamente do que a Hb H em direção ao pólo positivo (Figura 7) (Weatherall, 1981c). Salienta-se que a eletroforese não pode ser realizada com hemolisados preparados a partir de solventes orgânicos, como por exemplo, o clorofórmio, uma vez que a Hb H é extremamente instável frente a estas substâncias (Ribeiro, 1992).

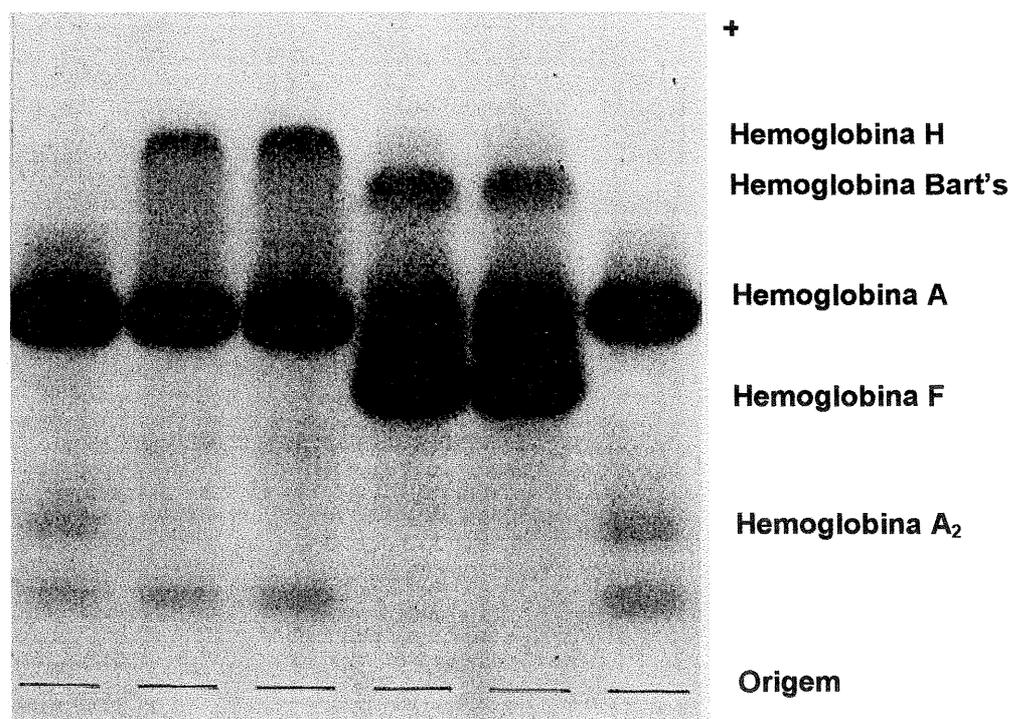


Figura 7. Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino. Weatherall, 1981c.

Além das eletroforeses de hemoglobina, a focalização isoeétrica e a cromatografia líquida de alta pressão são sistemas automatizados muito sensíveis que permitem a identificação e a quantificação das frações hemoglobínicas (Papadea e Cate, 1996; Clarke e Higgins, 2000).

A identificação dos portadores de talassemia α também pode ser realizada através da análise da síntese de cadeias polipeptídicas e por Southern blot. Ambos os procedimentos são relativamente complexos e laboriosos além de utilizarem reagentes

radioativos durante a sua execução (Galanello *et al.*, 1998). Nos últimos anos, vários métodos baseados na reação em cadeia da polimerase foram desenvolvidos, objetivando a detecção dos tipos mais freqüentes de talassemia α (delecionais e não-delecionais) (Baysal e Huisman, 1994; Foglietta *et al.*, 1996; Galanello *et al.*, 1998). Alguns destes testes têm apresentado problemas de reprodutibilidade, principalmente aqueles que envolvem a deleção ($-\alpha^{3,7}$). Estes problemas podem ser devidos a diferenças no conteúdo dos nucleotídeos GC presentes nas junções das várias deleções e também da considerável homologia dentro do complexo gênico da globina α (Chong *et al.*, 2000).

Cabe ressaltar que a identificação das hemoglobinas presentes é muitas vezes presumível, baseado na mobilidade eletroforética ou outras características, tal como a origem étnica. Em alguns casos a identificação e, portanto, o diagnóstico das hemoglobinopatias, requer o uso de técnicas de análise de DNA ou o sequenciamento direto do DNA após amplificação seletiva dos genes envolvidos. Além disso, estudos familiares podem colaborar na elucidação da natureza das desordens de síntese de hemoglobina (Bain *et al.*, 1998).

Finalmente, a determinação dos níveis de ferritina sérica é de grande valor na detecção da deficiência de ferro, sendo o método de escolha para avaliar os estoques deste componente (Brittenham, 2000). Embora sendo uma medida indireta, ela tem a vantagem, em relação aos procedimentos de biópsia, de ser um método mais quantitativo, menos invasivo, mais barato e mais aceito pelos pacientes (Lee, 1998a). Com exceção da deficiência de ferro, as únicas condições que podem diminuir os valores de ferritina são o hipotireoidismo e a deficiência de ascorbato. Aumentos nos níveis de ferritina podem indicar aumento dos estoques de ferro, embora a presença de algumas doenças crônicas também pode elevar estes níveis independentemente do aumento destes estoques (Brittenham, 2000). A determinação dos valores de

ferritina é realizada através de métodos imunológicos, tais como os radioimunoensaios (RIE) e os ensaios absorventes ligados a enzimas (ELISA) (Worwood, 1995).

2.6.6 Classificação clínica e caracterização laboratorial da talassemia α

Como já mencionado, é possível classificar as talassemias α em quatro categorias, diferenciando-se de acordo com o nível de expressão dos genes alfa: (1) uma forma assintomática ou portador silencioso, com perda de um único gene ($-\alpha/\alpha\alpha$); (2) o traço alfa talassêmico, no qual há perda de dois genes alfa de um único cromossomo ($--/\alpha\alpha$) ou de um gene α de ambos os cromossomos ($-\alpha/-\alpha$); (3) a doença da hemoglobina H, na qual apenas um gene alfa é funcional ($--/-\alpha$) e (4) a hidropsia fetal, caracterizada pela ausência dos quatro genes alfa ($--/--$) (Kazazian, 1990; Pedrollo *et al.*, 1990; Naoum, 1997b; Chui e Wayne, 1998; Lafferty *et al.*, 2000;). A Figura 8 apresenta uma representação das talassemias α .

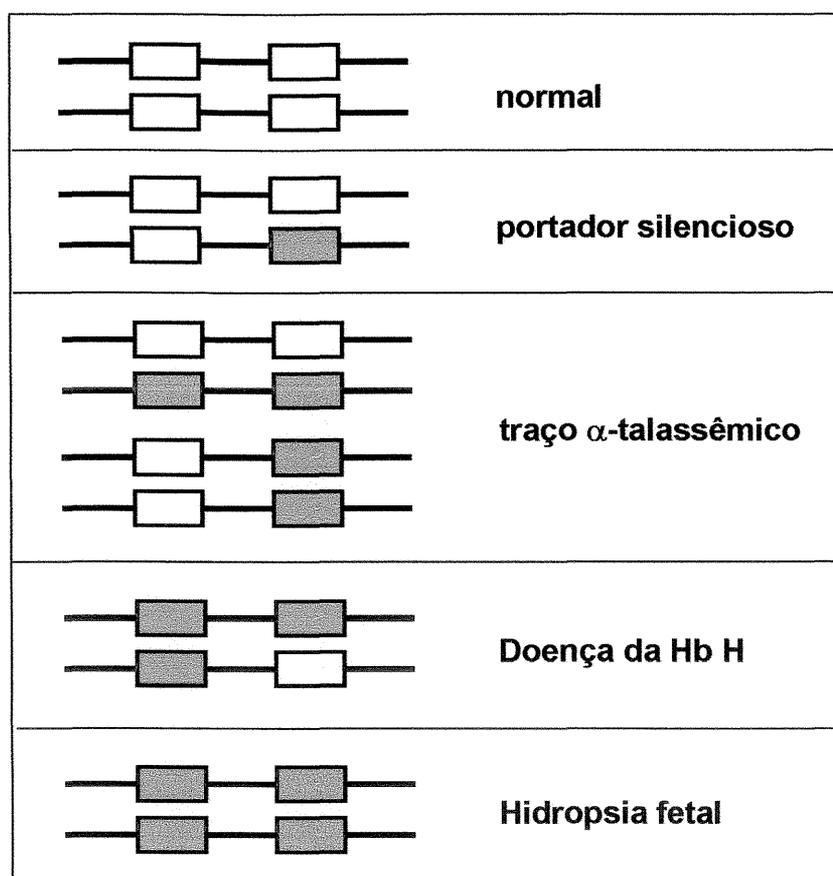


Figura 8. Ilustração esquemática das principais categorias da talassemia α . Adaptado de Weatherall, 1981c.

Destaca-se que a possibilidade de comprometimento parcial dos genes α pode acarretar em uma sobreposição entre os grupos acima descritos, baseada no amplo espectro dentro de cada grupo, refletida pela imensa variedade de interações genéticas possíveis (Liebhaber, 1989).

2.6.6.1 Portador silencioso

O termo “portador silencioso” designa o genótipo $-\alpha/\alpha\alpha$. É o tipo mais comum entre as talassemias α . Os indivíduos que possuem esse genótipo são clinicamente assintomáticos. Os parâmetros hematológicos, tais como concentração de hemoglobina, número de eritrócitos e concentração de hemoglobina corpuscular

média, assim como os valores de Hb A₂ e a concentração de Hb F estão dentro dos limites normais. A morfologia celular é geralmente normal, podendo apresentar microcitose em alguns eritrócitos e discreta anisocitose (Naoum, 1997b; Lafferty, 2000). A eletroforese de hemoglobina lisada com saponina a 1% pode demonstrar a presença de traços de Hb H em sangue de indivíduos com mais de 6 meses de idade. A mesma técnica realizada em sangue de cordão umbilical ou de recém-nascidos pode revelar banda correspondente à Hb Bart's (Naoum, 1997b). A pesquisa de precipitados de Hb H intraeritrocitária, realizada em sangue incubado com azul cresil brilhante pode apresentar uma célula positiva a cada 1000 ou 2000 eritrócitos pesquisados (Bain *et al.*; 1994).

2.6.6.2 Traço alfa-talassêmico

O traço alfa talassêmico caracteriza-se pelo comprometimento de dois genes α ($-\alpha/\alpha$ ou $-\alpha\alpha$). A causa mais freqüente se deve à herança da homozigose para a deleção $-\alpha^{3,7}$ ($-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$), mas o genótipo $-\alpha\alpha$ também pode ser identificado (Liebhaber, 1989). Visto que cada deleção pode causar um diferente nível de redução na síntese de cadeias α , o traço alfa talassêmico inclui o espaço desde o indivíduo assintomático até o portador de doença H (Higgs *et al.*, 1989).

Os indivíduos com traço alfa talassêmico podem relatar fraqueza, cansaço e dores nas pernas além de apresentarem palidez. Este quadro usualmente está associado com as seguintes alterações laboratoriais (Naoum, 1997b):

- microcitose;
- eritrocitose;
- níveis de Hb A₂ normais ou baixos;
- altas concentrações de Hb Bart's em sangue de cordão umbilical (5-10%);

- concentração de Hb H entre 2 e 5% em sangue de indivíduos com mais de 6 meses de idade;
- pesquisa intraeritrocitária de Hb H positiva em até 65% dos casos (geralmente 1 célula positiva em cada 250-500 eritrócitos pesquisados).

2.6.6.3 Doença de Hb H

A doença de Hb H é a síndrome clínica mais severa da talassemia α compatível com a vida. Ela ocorre, geralmente, pela deleção de três genes α ($--/\alpha$), embora as associações do tipo ($--/\alpha^T\alpha$) são também identificadas (Waye e Chui, 2001). Sua maior freqüência está presente no sudeste da Ásia e na bacia do Mediterrâneo (Liebhaber, 1989).

Clinicamente, os bebês afetados têm um aspecto aparentemente normal no período do nascimento, mas posteriormente apresentarão anemia e esplenomegalia, resultado da deficiência de Hb A e da formação de tetrâmeros instáveis. Durante o crescimento, a clínica será marcada pela presença de icterícia e hepatoesplenomegalia. Aproximadamente 1/3 dos pacientes apresentam deformações esqueléticas devido à expansão da cavidade medular (Lukens, 1998b). O grau de anemia presente é bastante variável, podendo acentuar-se durante a gravidez, infecções e após a exposição a medicamentos oxidantes (Waye e Chui, 2001). Outras complicações incluem úlceras de perna, cálculos biliares e deficiência de ácido fólico (Higgs *et al.*, 1989).

Laboratorialmente, o fenótipo usual apresenta (Higgs *et al.*, 1989; Bain *et al.*, 1994):

- acentuada microcitose;
- grau variado de hemoglobina (2,6-13,3 g/dl);

- concentração de Hb Bart's entre 20 a 40% em sangue de cordão umbilical;
- concentração de Hb H entre 10 a 20% em sangue de indivíduos adultos;
- pecilocitose, com a presença de pontilhado basófilo, células em alvo e dacriócitos;
- pesquisa intraeritrocitária de Hb H positiva (30 a 100% das células pesquisadas).

2.6.6.4 Hidropsia fetal

A síndrome clínica mais severa da talassemia α é a hidropsia fetal, que resulta da perda de todos os quatro genes α . A ausência destes genes impede a formação de Hb F e Hb A. O maior componente hemoglobínico presente é a Hb Bart's que, como vista anteriormente, não é capaz de liberar oxigênio aos tecidos, é relativamente instável e pode precipitar no interior dos eritrócitos, causando a retirada prematura destas células da circulação (Chui e Waye, 1998). Aproximadamente 50% dos fetos morrem antes do nascimento, enquanto que os remanescentes sobrevivem apenas algumas horas após (Liebhaber, 1989). Estes bebês geralmente são pálidos, grandes e edemaciados, apresentando angústia cárdio-respiratória e hepatoesplenomegalia significativas. A placenta encontra-se edemaciada e friável e a morte resulta de uma hipóxia severa (Chui e Waye, 1998). Transfusões totais seriadas no período intra-uterino ou imediatamente após o nascimento e quelação de ferro têm sido empregadas nestes pacientes com o objetivo de prolongar o tempo de vida (Lorey, 2001).

Os principais achados laboratoriais incluem (WHO Working Group, 1982; Liebhaber, 1989; Naoum, 1997b; Chui e Waye, 1998):

- eritroblastose com reticulocitose;
- anemia severa;
- pecilocitose, com células em alvo e fragmentação eritrocitária;
- hipocromia;
- VCM geralmente elevado, devido à presença de eritrócitos nucleados e reticulócitos;
- concentrações elevadas de Hb Bart's;
- presença de Hb H e Hb Portland em concentrações variáveis.

2.6.7 Diagnóstico diferencial das Talassemias

A microcitose (presença de eritrócitos anormalmente pequenas no sangue), assim como a hipocromia (concentração de hemoglobina diminuída nos eritrócitos) em menor grau, são os principais indícios das anemias geradas por deficiência de síntese de hemoglobina, resultando do descompasso entre a síntese da hemoglobina e a proliferação eritróide. O nível de alteração destes índices relaciona-se à gravidade e/ou à duração do distúrbio subjacente (Lee, 1998a).

Além das talassemias α e β , existem outras anemias que se caracterizam pela presença de microcitose e hipocromia, destacando-se as anemias por deficiência de ferro (ferroprivas) e as anemias de doenças crônicas, que merecem atenção especial no diagnóstico diferencial.

2.6.7.1 Anemia ferropênica

A anemia ferropênica se caracteriza pela quantidade de ferro menor do que a necessária para a formação de hemoglobina, de enzimas metálicas e de outros compostos funcionais de ferro. Essa deficiência de ferro ocorre quando (1) a ingestão de ferro é inadequada para as necessidades; (2) há má absorção de ferro; (3) há

perda aumentada de ferro; ou (4) quando há uma combinação destes fatores. A anemia apresenta-se quando o esgotamento dos estoques de ferro do sistema monocítico-macrofágico leva à redução da síntese do heme e, portanto, à produção reduzida de hemoglobina e de eritrócitos (Bain, 1997).

Geralmente, a deficiência de ferro é resultado de um longo período de balanço negativo deste componente. Inicialmente, a avaliação do hemograma revela uma anemia normocrômica e normocítica, com anisocitose, que precede o desenvolvimento da microcitose e da hipocromia. As alterações morfológicas não costumam ser evidentes até a queda de Hb abaixo de 10-11 g/dl, quando aparece, então, o aspecto característico. A pecilocitose inclui eliptócitos muito estreitos, chamados de células em lápis. O diagnóstico de anemia ferropriva não-complicada pode ser confirmado pelos seguintes achados: (1) ferritina sérica baixa ou (2) ferro sérico baixo e transferrina aumentada. Quando a deficiência de ferro e a inflamação coexistem, pode não haver elevação da transferrina e a ferritina sérica pode estar no limite inferior da normalidade. Nos casos complicados, o teste definitivo é a demonstração da ausência de ferro na medula óssea (Bain, 1997).

2.6.7.2 Anemia da doença crônica

Anemia da doença crônica é o termo usado para descrever a anemia que resulta de uma infecção ou inflamação crônica, ou menos freqüentemente, de uma doença maligna. A característica mais marcante é a ocorrência de ferro sérico baixo, apesar de quantidades abundantes de ferro na medula óssea (Bain, 1997). Como esta anemia ocorre em associação com inúmeras doenças, as manifestações clínicas variam muito. Quando leve, esta anemia se caracteriza pela presença de eritrócitos normocíticos e normocrômicos mas, à medida que se agrava, aparecem eritrócitos microcíticos e hipocrômicos. Na inflamação crônica severa, o grau de microcitose pode ser tão acentuado quanto na deficiência de ferro. Podem estar presentes sinais

indicativos de inflamação crônica, tais como neutrofilia, trombocitose e formação de rouleaux, velocidade de hemossedimentação (VHS) alterada, baixa concentração de albumina e aumento de fibrinogênio. O ferro sérico e a transferrina estão diminuídos e a ferritina sérica pode estar aumentada devido à síntese de apoferritina pelas células inflamatórias (Bain, 1997).

Tabela 2. Algumas condições associadas à anemia da doença crônica. Adaptado de Lee, 1998b.

| | |
|--------------------------------------|--|
| Infecções crônicas | Infecções pulmonares: abscessos, enfisema, pneumonia Endocardite bacteriana subaguda Meningite Infecções crônicas do trato urinário |
| Inflamações crônicas não-infecciosas | Artrite reumatóide Febre reumática Lupus eritematoso sistêmico Lesão por calor |
| Doenças malignas | Carcinoma Leucemias Mieloma múltiplo |
| Diversos | Doença hepática alcoólica Doença cardíaca isquêmica |

2.7 Distribuição geográfica das hemoglobinopatias e talassemias

As anemias hereditárias representam uma das principais doenças genéticas que contribuem de forma expressiva para morbidade e mortalidade infantil em diversos países em desenvolvimento (WHO Working Party, 1982). Em geral, a alta prevalência das hemoglobinopatias e talassemias pode ser decorrente de dois mecanismos: as

mutações são favorecidas nas populações autóctones por força do efeito seletivo da malária, onde os indivíduos afetados são mais resistentes, ou, alternativamente, são inseridas pela imigração de uma população previamente afetada. O primeiro mecanismo, ou seja, a seleção de heterozigotos em áreas com elevada incidência de malária, explica as altas freqüências de hemoglobinopatias e talassemias nos países da região Mediterrânea, no Oriente Médio, Sudoeste da Ásia e na África. Por outro lado, a imigração espontânea ou forçada, é responsável por sua ocorrência nos países do Novo Mundo, incluindo o Brasil. Neste particular, cabe destacar que a introdução da malária no continente americano ocorreu em época relativamente recente, após a chegada dos colonizadores europeus não contribuindo para aumentar a prevalência de hemoglobinopatias e talassemias. Isto explica porque os trabalhos realizados em populações indígenas não miscigenadas demonstram a completa ausência destes distúrbios (Zago, 1986).

Segundo dados da OMS, em torno de 4,5 % da população mundial é portadora de pelo menos um gene para alguma hemoglobinopatia (Angastiniotis, 1995), sendo que a freqüência da talassemia α parece ser bastante variável (Velati *et al.*, 1986; Pedrollo *et al.*, 1990; Efremov, 1992; Baysal e Huisman, 1994; Waye e Chui, 2001). Beutler apresentou a estimativa da prevalência dos diferentes tipos de anemia entre a população americana e sugeriu que a talassemia alfa é, depois da anemia ferropênica, a causa mais freqüente de anemia nestes indivíduos (Beutler, 1988).

Dentre as talassemias α , aquelas com deleções do tipo α^+ são extremamente comuns, sendo que em regiões malarígenas, raramente a sua freqüência é menor de 20%, podendo alcançar mais de 80% em algumas populações (Flint *et al.*, 1993). A deleção $-\alpha^{3,7I}$ é muito difundida, tendo sido diagnosticada em todas as regiões estudadas, com freqüências particularmente maiores em populações Mediterrâneas e Africanas. A deleção $-\alpha^{3,7II}$ foi encontrada em indivíduos da Jamaica e Região

Mediterrânea e Sudeste Asiático, enquanto a deleção $-\alpha^{3,7III}$ foi observada exclusivamente em partes da Oceania (Flint *et al.*, 1993). Outra deleção, a $-\alpha^{4,2}$, é mais freqüentemente encontrada em populações asiáticas (Baysal e Huisman, 1994), embora tenha sido relatada em várias outras populações (Ilhas do Pacífico, Negras e Mediterrâneas, entre outras) (Flint *et al.*, 1993).

As formas de talassemia α não delecionais e as do tipo α^0 são encontradas principalmente em regiões malarígenas do sudeste da Ásia e Mediterrâneo. Dentre as deleções que causam talassemia α^0 , a $--^{SEA}$ tem sido observada em populações da Tailândia, Filipinas, Vietnam e China. Similarmente, a deleção $--^{MED}$ foi relatada em populações banhadas pelo Mediterrâneo, principalmente na Itália, Grécia e Sardenha (Flint *et al.*, 1993). A Hb Constant Spring, a forma não delecional de talassemia α mais difundida, é encontrada em populações do Sudeste da China, Tailândia, Camboja, Vietnam e Laos (Flint *et al.*, 1993; Hartevelde *et al.*, 2001).

Estudos para detecção de Hb Bart's em sangue de cordão umbilical foram realizados em várias populações e os dados estão reunidos na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição da frequência de Hb Bart's em diversas populações. Adaptado de Pedrollo, 1988.

| Local | Amostra (n) | Frequência (%) | Ano |
|------------------------------------|-------------|----------------|------|
| África | | | |
| África do Sul | 1.207 | 3,3 | 1985 |
| Congo | 636 | 17,9 | 1969 |
| Congo | 146 | 23,3 | 1986 |
| Nigéria | 140 | 10,7 | 1960 |
| Nigéria | 700 | 6,0 | 1986 |
| Tanzânia | 325 | 11,0 | 1979 |
| América do Norte | | | |
| Estados Unidos | | | |
| Baltimore (negróides) | 900 | 2,1 | 1963 |
| Filadélfia | 693 | 15,0 | 1974 |
| Mineápolis (negróides e asiáticos) | 1.000 | 12,0 | 1986 |
| América Central | | | |
| Costa Rica | 538 | 1,1 | 1977 |
| Cuba | 2.363 | 4,3 | 1982 |
| Jamaica | 2.191 | 7,0 | 1980 |
| Martinica | 4.635 | 1,7 | 1981 |
| Europa | | | |
| Espanha | 2.003 | 0,2 | 1982 |
| Grécia (cipriotas gregos) | 1.200 | 12,4 | 1979 |
| Grécia (cipriotas turcos) | 132 | 6,8 | 1979 |
| Itália | 2.291 | 12,9 | 1980 |
| Itália (Milão) | 4730 | 3,0 | 1986 |
| Ásia e Oceania | | | |
| Laos | 147 | 42,0 | 1979 |
| China | 500 | 3,0 | 1970 |
| Malásia | 344 | 7,3 | 1982 |
| Melanésia | 236 | 38,5 | 1987 |
| Nova Guiné | 217 | 81,0 | 1984 |
| Tailândia | 287 | 30,7 | 1969 |

2.7.1 Talassemia α no Brasil

No Brasil, o alto grau de miscigenação entre índios nativos e descendentes de africanos e europeus tem produzido elevadas freqüências de distúrbios herdados de hemoglobinas, demonstrando a diversidade racial de cada região do país. De fato, além dos europeus que aqui se fixaram no período colonial, de origem predominantemente portuguesa, o país recebeu cerca de 2,5 a 4 milhões de negros africanos. Posteriormente, no período de pouco mais de um século, entre 1819 e 1947, vieram para o Brasil aproximadamente 5 milhões de imigrantes, principalmente italianos (1,5 milhão), portugueses (1,4 milhão), espanhóis, alemães e japoneses. Ressalta-se a importância deste contingente, uma vez que a população total do país nos anos 40 era cerca de 40 milhões de habitantes (Zago, 1986).

Clinicamente, a Hb S, a Hb C e as talassemias β são as mais importantes, embora a talassemia α^+ tenha sido descrita como a alteração mais freqüente, ocorrendo entre 20 e 25 % em uma população negra do sudeste brasileiro (Sonati *et al.*, 2000).

A caracterização e identificação de indivíduos portadores de hemoglobinopatias e talassemias têm sido realizadas de forma crescente em nosso meio, principalmente nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. Em um dos primeiros estudos populacionais documentados no país para investigação de talassemia α , 606 amostras de cordão umbilical de crianças recém-nascidas não selecionadas do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto foram estudadas. A Hb Bart's foi detectada em 0,7% destas (Zago, 1986). Em outro estudo, a doença de hemoglobina H é descrita em três famílias brasileiras. Em duas destas, os pais dos pacientes eram de origem européia e africana (Zago *et al.*, 1984). Em 1987, Castilho *et al.* identificou, através de técnicas citológicas, cerca de 4% de indivíduos portadores de talassemia α assintomáticos na região de São José do Rio Preto-SP. Esse número tornou-se bastante expressivo (15,8%)

quando foram considerados apenas indivíduos com anemia a esclarecer (Castilho *et al.*, 1987).

Em outra pesquisa, na cidade de Campinas, foram investigados 320 recém-nascidos negróides, dos quais em 38 (11,9%) foi detectada a presença de Hb Bart's (Sonati e Costa, 1990). Com o objetivo de confirmar a alta frequência de talassemia α no país, os mesmos autores investigaram, através de análise de DNA, 47 indivíduos negros doadores de sangue. Os resultados demonstraram que 21,3% destes eram heterozigotos para a condição $(-\alpha/\alpha\alpha)$, 2,1% eram homozigotos $(-\alpha/-\alpha)$ e 6,4% apresentaram a forma triplicada para o gene α ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (Sonati *et al.*, 1991).

Em 2000, uma pesquisa de hemoglobinopatias em populações diferenciadas, realizada por Orlando *et al.*, identificou a presença de talassemia α em 10 % nos recém-nascidos, 26% nos indivíduos com anemia a esclarecer, 5% nos doadores de sangue e em 12,5% dos estudantes analisados (Orlando *et al.*, 2000). No mesmo ano, Leonelli *et al.* descrevem a presença de talassemia α em 76 (15 %) dos 506 indivíduos analisados no Laboratório de Hemoglobinas da UNESP (Leonelli *et al.*, 2000). Ambos os trabalhos foram realizados com o auxílio de técnicas citológicas e eletroforese de hemoglobina.

Em 2001, Viana-Baracioli *et al.* estudando a presença de hemoglobinopatias em gestantes, também através de técnicas citológicas e eletroforese de hemoglobina, identificaram talassemia alfa em 47 (6,75%) das 696 mulheres investigadas (Viana-Baracioli *et al.*, 2001). Ducatti *et al.* publicaram neste mesmo ano, os resultados da presença de Hb Bart's em recém-nascidos no Hospital de Base de São José do Rio Preto. Das 913 amostras analisadas, 40 (4,38%) apresentaram esta hemoglobina (Ducatti *et al.*, 2001).

Em outro estudo publicado também em 2001, Borges *et al.*, estudaram a prevalência de talassemia alfa entre indivíduos adultos com microcitose e hipocromia

através da PCR. Dos 339 indivíduos analisados, 169 (49,9 %) apresentaram talassemia α , sendo que 145 (42,8%) foram classificados como heterozigotos para a deleção $-\alpha^{3,7}$ ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$), 18 (5,3%) foram classificados como homozigotos para esta deleção ($-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$), além de 5 (1,5%) indivíduos com formas não-delecionais e 1 (0,3%) com deleção do tipo α^0 . Neste mesmo estudo, dos 98 negróides investigados, 69 (70,3%) apresentaram talassemia α (Borges *et al.*, 2001).

No estado do Rio Grande do Sul, um dos únicos trabalhos realizados para investigação de talassemia α é o de Pedrollo *et al.*, em 1990. Os autores, utilizando como indicador de talassemia alfa a presença de Hb Bart's no sangue de cordão umbilical em recém-nascidos em Porto Alegre, através de eletroforese de hemoglobina em fita de acetato de celulose, estimaram que a prevalência de talassemia alfa em negróides e caucasóides é de 6% e 2,5% respectivamente (Pedrollo *et al.*, 1990). Esse dado é certamente uma subestimativa, assim como os outros trabalhos realizados com este método, pois nem todas as crianças portadoras do traço talassêmico alfa apresentam Hb Bart's em nível detectável por esta técnica (>1%) no período do nascimento (Higgs *et al.*, 1982).

Em outro trabalho, realizado por Daudt em 2000, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), das 1615 amostras de sangue de recém-nascidos analisadas pela técnica de focalização isoelétrica, em apenas 2 (0,12%) foi identificada a presença de Hb Bart's. Justifica-se este baixo índice pela falha na técnica, uma vez que as amostras foram coletadas em papel filtro e foram processadas, em média, 22 dias após a coletas. Neste meio, as hemoglobinas perdem sua estabilidade decorrente da oxidação do ferro da fração heme e da ação de resíduos de glutamina e asparagina na molécula protéica, prejudicando a identificação de bandas rápidas, tais como a Hb Bart's (Daudt, 2000).

3 JUSTIFICATIVA

Trabalhos como os de Pedrollo (Pedrollo *et al.*, 1990) em Porto Alegre, Castilho (Castilho *et al.*, 1987) em São José do Rio Preto e Sonati (Sonati *et al.*, 1991) em Campinas, revelam a possibilidade da distribuição da talassemia α atingir diversas regiões no país. Considerando a heterogeneidade da população brasileira, em nível de miscigenação, destacando os vastos contingentes migratórios de italianos e africanos, a investigação de talassemia α deve ser realizada em pacientes com anemia microcítica que não respondem a tratamentos com compostos ferrosos e não apresentam evidências da presença de outras doenças de base. Por este motivo, o presente trabalho se propõe a estudar talassemia alfa em pacientes com anemia não ferropênica a esclarecer e indivíduos normais, fazendo uso de técnicas simples e viáveis financeiramente, que poderão ser incorporadas à rotina de um laboratório de hematologia, resguardando o uso de tecnologia mais avançada (biologia molecular) para os casos selecionados. Com o diagnóstico correto, exames de saúde, consultas médicas e, principalmente, administração de ferro desnecessária, serão evitados.

4 OBJETIVOS

- 4.1. Estabelecer a frequência de talassemia α em duas populações atendidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre: pacientes com anemia microcítica não ferropênica e pacientes sem anemia;
- 4.2. Estabelecer a frequência de hemoglobinas variantes e talassemia β nas populações estudadas;
- 4.3. Estabelecer o perfil hematológico das populações estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGASTINIOTIS, M.; MODELL, B.; ENGLEZOZ, P.; BOULYJENKOV, V. Prevention and control of haemoglobinopathies. **Bull WHO**, v.73, n.3, p.375-386, 1995.
- BAIN, B.J.; BHAVNAMI, M.; BROZOVIC, M. *et al.* (BCSH). Guidelines for investigation of the α e β thalassaemia traits. **J. Clin. Pathol.**, v.47, p.289-295, 1994.
- BAIN, B.J.; AMOS, R.J.; BAREFORD, D. *et al.* (BCSH). Guideline – The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. **Br. J. Haematol.**, v.01, p.783-792, 1998.
- BAIN, J.B. Desordens dos eritrócitos e plaquetas. In: BAIN, J.B. (ed.). **Células Sangüíneas – Um guia prático**. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p.204-274.
- BAYSAL, E.; HUISMAN, T.H. Detection of common α -thalassemia-2 determinants by PCR. **Am. J. Hematol.**, v.46, p.208-213, 1994.
- BERNINI, L.F.; HARTEVELD, C.L. Alpha-thalassaemia. **Baillieres Clin. Hematol.**, v.11, n.1, p.53-90, 1998.
- BEUTLER, E. The common anemias. **JAMA**, v.259, n.16, p.2433-2437, 1988.
- BONINI-DOMINGOS, C.R.; TOMÉ-ALVES, R.; MARCHI-SALVADOR, D.P. *et al.* Hemoglobinas AS/Alfa talassemia - importância diagnóstica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.22, n.3, p.388-394, 2000.
- BORGES, E.; WENNING, M.R.S.C.; KIMURA, E.M.; GERVÁSIO, S.A.; COSTA, F.F.; SONATI, M.F. High prevalence of α -thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.34, n.6, p.759-762, 2001.
- BRITTENHAM, G.M. Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload. In: HOFFMAN, R.; BENZ Jr., E.J.; SHATTIL, S.J. *et al.* (eds.). **Hematology – Basic Principles and Practice**. 3.ed. New York, Churchill Livingstone, 2000. p. 397-426.
- CALVO, P.; GONZALES, F.A.; SANTILLANA, T. *et al.* Acquired hemoglobin H disease associated with a myelodysplastic syndrome. **Sangre**, v.39, n.3, p.211-213, 1994.
- CASTILHO, E.M.; NAOUM, P.C.; GRACIANO, R.A.; SILVA, R.A. Prevalência de talassemia alfa em pacientes com anemia e em pessoas sem anemia. **Rev. Pat. Clín.**, v.23, n.5, p.131-134, 1987.

- CHAN, L.C.; MA, S.K.; CHAN, A.Y.Y.; HÁ, S.Y.; WAYE, J.S.; LAU, Y.L.; CHUI, D.H.K. Should we screen for globin gene mutations in blood samples with mean corpuscular volume (MCV) greater than 80 fl in areas with a high prevalence of thalassaemia? **J. Clin. Pathol.**, v.54, p.317-320, 2001.
- CHONG, S.S.; BOEHM, C.D.; HIGGS, D.R.; CUTTING, G.R. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassemia. **Blood**, v.95, p.360-362, p.2000
- CHUI, D.H.K.; WAYE, J.S. Hydrops fetalis caused by α -thalassemia: an emerging health care problem. **Blood**, v.91, n.7, p.2213-2222, 1998.
- CLARKE, G.M.; HIGGINS, T.N. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. **Clinical Chemistry**, v.46, n.8(B), p.1284-1290, 2000.
- COOLEY, T.B.; LEE, P. A series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. **Transactions of the American Pediatric Society**, v.37, p.29-30, 1925.
- DAUDT, L.E. **Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre**. Porto Alegre: UFRGS, 2000. Dissertação (Mestrado em Pediatra) - Faculdade de Medicina, Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria – USP.
- DUCATTI, R.P.; TEIXEIRA, A.E.A.; GALÃO, H.E.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; CONTE, A.C.F. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. **Rev. Bras. Hematol. hemoter.**, v.23, n.1, p.23-29, 2001.
- FLINT, J.; HARDING, R.M.; BOYCE, A.J.; CLEGG, J.B. The population genetics of haemoglobinopathies. **Baill. Clin. Haem.**, v.6, n.1, p.215-262, 1993.
- FOGLIETTA, E.; DEIDDA, G.; GRAZIANI, B.; MODIANO, G.; BIANCO, I. Detection of α -globin gene disorders by a simple PCR methodology. **Haematologica**, v.81, p.387-396, 1996.
- FORGET, B.J. Thalassemia syndromes. In: HOFFMAN, R.; BENZ Jr., E.J.; SHATTIL, S.J. *et al.* (eds). **Hematology – Basic Principles and Practice**. 3.ed. New York, Churchill Livingstone, 2000. p. 485-510.

- FUCHAROEN, S.; WINICHAGOON, P.; WISEDPANICHKIJ, R. *et al.* Prenatal and postnatal diagnoses of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. **Clinical Chemistry**, v.44, n.4, p.740-748, 1998.
- GALANELLO, R.; SOLLAINO, C.; PAGLIETTI, E.; BARELLA, S.; PERRA, C.; DONEDDU, I.; PIRRONI, M.; MACCIONI, L.; CAO, A. α -Thalassemia carrier identification by DNA analysis in the screening for thalassemia. **Am. J. Hem.**, v.59, p.273-278, 1998.
- HARTEVELD, C.L.; TRAEGER-SYNODINOS, J.; RAGUSA, A.; FICHERA, M.; KANAVAKIS, E.; KATTAMIS, C.; GIORDANO, P.; SCHILIRO, G.; BERNINI, L.F. Different geographic origins of Hb Constant Spring [α_2 codon 142 TAA \rightarrow CAA]. **Haematologica**, v.86, p.36-38, 2001.
- HIGGS, D.R.; LAMB, J.; ALDRIDGE, B.E.; CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J.; SEARJEANT, D.J.; SEARJEANT, G.R. Inadequacy of Hb Bart's as an indicator of α -thalassaemia. **Br. J. Haematol.**, v.51, p.177-178, 1982.
- HIGGS, D.R.; VICKERS, M.A.; WILKIE, A.O.M.; PRETORIUS, I.; JARMAN, A.P.; WEATHERALL, D.J. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. **Blood**, v.73, n.5, p.1081-1104, 1989.
- KAZAZIAN, H.H. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. **Semin. Hematol.**, v.27, n.3, p.209-228, 1990.
- LACERRA, G.; FIORETTI, G.; DE ANGIOLETTI, G. *et al.* (Alpha) alpha 5.3: a novel alpha (+)-thalassemia deletion with the breakpoints in the alpha 2-globin and in close proximity to an Alu family repeat between the psi alpha 2- and psi alpha 1-globin genes. **Blood**, v.78, n.10, p.2740-2746, 1991.
- LAFFERTY, J.D.; CROWTHER, M.A.; WAYE, J.S.; CHUI, D.H.K. A reliable screening test to identify adult carriers of the ($--^{SEA}$) alpha⁰-thalassemia deletion. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.114, n.6, 2000.
- LANZKOWSKY, P. **Manual of Pediatric Hematology and Oncology**. 2.ed. New York: Churchill Livingstone, 1995. p. 629-350.
- LEE, R.G. Microcitose e as anemias associadas com síntese prejudicada da hemoglobina. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998a. V.1, p.865-883.

- LEE, R.G. A anemia de doença crônica. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998b. V.1, p. 920-932.
- LEONELI, G.G.; IMPERIAL, R.E.; SALVADOR, D.P.M.; NAOUM, P.C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.22, n.3, p.396-403, 2000.
- LIEBHABER, S. α Thalassemia. **Hemoglobin**, v.13, n.7 & 8, p.685-731, 1989.
- LIN, C.K.; GAU, J.P.; HSU, H.C.; JIANG, M.L. Efficacy of a modified improved technique for detecting red cell hemoglobin H inclusions. **Clin. Lab. Haematol.**, v.12, n.4, p.409-415, 1990.
- LOREY, F.; CHAROENKWAN, P.; WITKOWSKA, H.E.; LAFFERTY, J. *et al.* Hb H hydrops foetalis syndrome: a case report and review of literature. **Br. J. Haematol.**, v.115, p.72-78, 2001.
- LUKENS, J.N. Formação do sangue no embrião, feto e recém-nascido. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998a. V.1, p.79-102.
- LUKENS, J.N. Talassemias e distúrbios afins: distúrbios quantitativos da síntese da hemoglobina. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998b. V.1, p.1206-1255.
- MARENGO-ROWE, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. **J. Clin. Path.**, v.18, p.790-792, 1965.
- NAOUM, P.C.; ALVAREZ, F.; BONINI-DOMINGOS, C.R. *et al.* Hemoglobinopatias anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. **Rev. Bras. Pat. Clín.**, v.23, n.3, p.68-79, 1987.
- NAOUM, P.C.; ISIQUI, W.D.; PAGOTTO, R.S.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Prevalência de hemoglobinopatias em amostras de proveniência diferenciada. **Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.153, n.XI, p.69-72, 1989.
- NAOUM, P.C. Ontogenia das hemoglobinas. In: Naoum, P.C. (eds.). **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Savier, 1997a. p.22-24.
- NAOUM, P.C. Talassemias alfa. In: NAOUM, P.C. (eds.). **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Savier, 1997b. p.96-104.

- NAOUM, P.C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Técnicas laboratoriais para identificação das hemoglobinas normais e anormais. In: Naoum, P.C. (eds.). **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Savier, 1997c. p.144-171.
- O'SHAUGHNESSY, D.F.; HILL, A.V.S.; BOWDEN, D.K. *et al.* Globin genes in Micronesia: origins and affinities of Pacific Island peoples. **Am. J. Hum. Genet.**, v.46, p.144-155, 1990.
- ORLANDO, G.M.; NAOUM, P.C.; SIQUEIRA, F.A.M.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.22, n.2, p.111-1121, 2000.
- PAPADEA, C.; CATE, J.C. Identification and quantitation of hemoglobins A, F, S and C by automated chromatography. **Clinical Chemistry**, v.42, n.1, p.57-63, 1996.
- PEDROLLO, E.; HUTZ, M.H.; SALZANO, F.M. Alpha Thalassemia Frequency In Newborn Children From Porto Alegre, Brazil. **Rev. Brasil. Gen.**, v.13, n.3, p.573-581, 1990.
- PEDROLLO, E. **Detecção de hemoglobina Bart e frequência de talassemia alfa em uma população de neonatos de Porto Alegre**. Porto Alegre: UFRGS, 1988. Dissertação (Mestrado em Genética) – Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- RAMALHO, A.S. Hemoglobinas normais. In: RAMALHO, A.S. (eds.). **As hemoglobinopatias hereditárias – Um problema de saúde pública no Brasil**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1986a. p.3-17.
- RAMALHO, A.S. Hemoglobinopatias hereditárias. In: RAMALHO, A.S. (eds.). **As hemoglobinopatias hereditárias – Um problema de saúde pública no Brasil**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1986b. p.19-24.
- RANNEY, H.M.; SHARMA, V. Structure and function of hemoglobin. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLIER, B.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U. (eds.). **Williams Hematology**. 6.ed. New York, McGraw-Hill, 2001. p.345-353.
- RIBEIRO, V.; ARAÚJO, J. Hemoglobina H: identificação laboratorial. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v.47, n.4, p.176-179, 1992.
- SIQUEIRA, F.A.M.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Diagnóstico de hemoglobinopatias em recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.22, n.1, p.63-64, 2000.

- SKOGESBOE, K.; WEST, S.; SMITH, C.; TERASHITA, S.; LECRONE, C.; DETTER, J.; TAIT, J. Screening for α -Thalassemia - Correlation of Hemoglobin H Inclusions Bodies With DNA-Determined Genotype. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.116, p.1012-1018, 1992.
- SONATI, M.F.; COSTA, F.F. Hemoglobin Bart's in a Brazilian black population. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.23, p.395-396, 1990.
- SONATI, M.F.; FARAH, S.B.; RAMALHO, A.S.; COSTA, F.F. High prevalence of α -Thalassemia in a black population of Brazil. **Hemoglobin**, v.15, n.40, p.309-311, 1991.
- SONATI, M.F.; KIMURA, E.M.; GROTTTO, H.Z.W.; GERVASIO, S.A.; COSTA, F.F. Hereditary hemoglobinopathies in a population from southeast Brazil. **Hemoglobin**, v.20, n.2, p.175-179, 1996.
- SPRITZ, R.; FORGET, B. The thalassemsias: Molecular mechanisms of human genetic disease. **Am. J. Hum. Genet.**, v.35, p.333-361, 1983.
- STEINBERG, M.H.; BENZ, E.J. Jr. Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. In: HOFFMAN, R.; BENZ Jr., E.J.; SHATTIL, S.J. *et al.* (eds.). **Hematology – Basic Principles and Practice**. 3.ed. New York: Churchill Livingstone, 2000. p.356-383.
- TELEN, M.J. O eritrócito maduro. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998. V.1, p.103-138.
- VELATI, C.; SAMPIETRO, M.; BIASSONI, M. *et al.* Alpha Thalassaemia in an Italian population. **Br. J. Haematol.**, v.63, n.3, p.497–501, 1986.
- VIANA-BARACIOLI, L.M.S.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; PAGLIUSI, R.A.; NAOUM, P.C. Prevenção de hemoglobinopatias, a partir do estudo em gestantes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 23, n.1, p. 31-39, 2001.
- VILLEGAS, A.; PORRES, A.; SÁNCHEZ, J. *et al.* Red blood cell phenotypes in α -thalassemias in the Spanish population. **Haematologica**, v.83, p.99-103, 1998.
- WAYE J.S.; CHUI, D.H.K. The α -globin gene cluster: genetics and disorders. **Clin. Invest. Med.**, v.24, n.2, p.103-109, 2001.

- WEATHERALL, D.J.; OLD, J.; LONGLEY, J.; WOOD, W.G.; CLEGG, J.B.; POLLOCK, A.; LEWIS, M.J. Acquired haemoglobin H disease in leukaemia: pathophysiology and molecular basis. **Br. J. Haematol.**, v. 38, p.305-322, 1978
- WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Erythropoiesis. Developmental changes in haemoglobin and red-cell production. The hemoglobinopathies. In: WEATHERALL, D.J.; CLEGG J.B. (eds.). **The thalassaemia syndromes**. 3.ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1981a. p.49-84.
- WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Inherited disorders of haemoglobin. The hemoglobinopathies. In: WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. (eds.) **The thalassaemia syndromes**. 3.ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1981b. p.85-132.
- WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. The α thalassaemias. In: WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. (eds.). **The thalassaemia syndromes**. 3.ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1981c. p.508-612.
- WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. The laboratory diagnosis the thalassaemia syndrome. In: WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. (eds.). **The thalassaemia syndromes**. 3.ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1981d. p.744-769.
- WEATHERALL, D.J. The Thalassaemias. **BMJ**, v.314, p.1675-78, 1997.
- WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Genetic disorders of hemoglobin. **Semin. Hematol.**, v.36, sup. 7, p.24-37, 1999.
- WEATHERALL, D.J.; PROVAN, A.B. Red cells: inherited anaemias. **The Lancet**, v.355, p.1169-75, 2000.
- WEATHERALL, D.J. The thalasseмии. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLER, B.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U. (eds.). **Williams Hematology**. 6.ed, New York: McGraw-Hill, 2001a. p.547-578.
- WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bull WHO**, v.78, n.8, p.704-712, 2001.
- WENNING, M.; KIMURA, E.; SONATI, M.F. As talassemias α : diagnóstico laboratorial e molecular. **News Lab.**, v.40, p.98-111, 2000.

- WENNING, M.; KIMURA, E.; COSTA, F.; SAAD, S.; GERVÁSIO, S.; JORGE, S.; BORGES, E.; SILVA, N.; SONATI, F.M. α -Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, n.9, p.1041-1045, 2000.
- WHO Working Group. Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, diagnosis, and treatment. **Bull WHO**, v.60, n.5, p.643-660, 1982.
- WORWOOD, M. Iron deficiency anaemia. In: DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. 8.ed. London: Churchill Livingstone, 1995. p.437-444.
- ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; BOTTURA, C. Hemoglobin H disease in three Brazilian families. **Rev. Brasil. Genet.**, v.VII, n.1, p.137-147, 1984.
- ZAGO, M.A. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. **Rev. Paul. Méd.**, v.104, n.6, p.300-304, 1986.
- ZAGO, M.A.; PAÇÓ-LARSON, M.L. Hemoglobin H Disease caused by two genes deletions. **Bras. J. Med. Biol. Res.**, v.22, p. 675-681. 1989.

Frequency of alpha-thalassemia in a Brazilian anemic population.

S.C. Wagner¹, M.C. Silvestri², C. Bittar³, J.R. Friedrisch³, P.C. Naoum⁴ and L.M.R. Silla⁵

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica / UFRGS

² Bolsista Iniciação Científica – CNPq / PIBIC

³ Médicos Hematologistas do Centro de atenção global aos portadores de hemoglobinopatias / Serviço de Hematologia Clínica / HCPA

⁴ Professor Titular - UNESP e Diretor da Academia de Ciência e Tecnologia / São José do Rio Preto, SP

⁵ Professora adjunta do Depto. de Medicina Interna / FAMED / UFRGS e do Programa de Pós-graduação em Medicina: Clínica Médica

Research supported by:

FIPE/HCPA; HEMOAMIGOS/HCPA

Correspondence:

wagnersandrine@hotmail.com

Running title

Anemia and alpha-thalassemia

Key words:

Hemoglobinopathies, alpha-thalassemia, hemoglobin H, hemoglobin H disease

Abstract

We evaluated the frequency of alpha-thalassemia in a group of 293 patients: 58 with non-ferropenic microcytic anemia (cases) and 235 non-anemic patients seen at the out patients clinic for other reasons (controls). The presence of thalassemia was defined by alkaline pH cellulose acetate electrophoresis of a 1% saponine red-cell lysate, 1% brilliant cresyl blue for inclusion bodies studies, 0,36% NaCl osmotic resistance test and high-performance liquid chromatography (HPLC). The analysis showed among the cases 63.8% carried hemoglobinopathies: 25.9% of alpha-thalassemia, 32.8% of beta-thalassemia, 3.4% were heterozygous for hemoglobin S (HbAS) and 1.7% were homozygous for hemoglobin C (HbCC). In the control group there were 11.5% of alpha-thalassemia, 0.9% of beta-thalassemia, 1.3% and 0.4% were heterozygous for hemoglobins S and C, respectively, accounting for 14.1% sub-clinical hemoglobinopathies. In conclusion, the techniques utilized for H hemoglobin detection were relatively simple to be carried out by a general hospital clinical pathology laboratory, and able to detect alpha-thalassemia in 25.9% of the cases as well as in 11.5% of controls. To further characterize the remainder non-ferropenic microcytic anemias it would be necessary to run molecular tests such as polymerase chain-reaction or globin chain synthesis analysis, both currently unavailable for routine use in clinical laboratories.

Introduction

The inherited anemia represents the commonest human genetic disorders and comprises a heterogeneous condition of variable complexity (1). In the past, since the carrier of at least one gene for these disorders showed some type of protection against the lethal effects of malaria, their geographic distribution was concentrated in tropical and subtropical areas. Due to an increased migration among several regions, there has been a diffusion of these genes in areas previously known as non-endemic, such as in the American Continent and Northern Europe (2). As a whole, the inherited anemias can be divided into two large groups: (1) the hemoglobinopathies characterized by the presence of structurally abnormal hemoglobin, such as hemoglobin S (Hb S), which is responsible in homozygous state for the sickle-cell anemia, and (2) the thalassemias, characterized by the deficient synthesis of one or more polypeptides chains of the normal human hemoglobin (3). There are two main classes of thalassemia: alpha (α) and beta (β), involving the genes α and β globin, respectively (3). Alpha-thalassemias are characterized by a partial or complete deficiency of the α -chain synthesis in the erythrocytes of the affected individuals (3, 4). The α -globin chains are needed for the synthesis of hemoglobin in the fetal and adult phases, playing an important role in the maintenance of the stability of these molecules. Therefore, defects interfering in their synthesis have clinical influence on both phases, different from β -chains, which are present only in the major adult hemoglobin component, hemoglobin A (Hb A). In the fetus, the α -chain deficiency results in an excess of γ -chains, and in the adult leads to an excess of β -chains. The excess of γ and β chains allows the formation of tetramers (γ_4 and β_4), called Hb Bart's and Hb H, respectively. The α -thalassemia pathophysiology is mainly determined by the formation of these tetramers, which are unstable and thermolabile (1, 5). Alpha-thalassemias develop mainly by defects inherited during the expression of genes that codes for α -chains affecting from 1 to 4 of

these genes (6), although defects in this synthesis can also occur in the acquired form (7, 8). In general, it is possible to classify alpha-thalassemias into four types, according to the level of genes α expression: (1) asymptomatic form or silent carrier, with loss of only one gene ($-\alpha/\alpha\alpha$); (2) α -thalassemic trace, with loss of two genes α from only one chromosome ($--/\alpha\alpha$) or of one gene α from both chromosomes ($\alpha-/ \alpha-$); (3) Hemoglobin H disease, in which only one gene is functional ($--/-\alpha$), and (4) hydrops fetalis, characterized by the absence of the four genes α ($--/--$) (9, 10, 11, 12, 13). Due to a great variety of possible genetic interactions, generated by deletion/non-deletion processes and the presence of structural abnormal hemoglobins, an overlapping can occur among the groups, making difficult their characterization (8). The anemia present in α -thalassemias is caused by a decrease in the erythrocytes lifetime, as a result of premature splenic sequestration due to the presence of inclusion bodies in these cells. Moreover, because of the defect in the synthesis of normal amounts of hemoglobin, the erythrocyte is microcytic and hypochromic (5). The latter is clinically important, since these hematological alterations are commonly interpreted as an indication of iron deficiency or anemia of chronic disease (14). The main purpose of this study was to establish the frequency of alpha-thalassemia and other hemoglobinopathies in two populations seen at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) out patients clinic: carriers of non-ferropenic microcytic anemia (cases) and non-anemic individuals seen for diseases other than hematological ones (controls). To carry out this work, electrophoretic, chromatographic, biochemical and cytological techniques were employed.

Material and Methods

In a case-control study, approved by the CONEP (Research Ethics Committee – 25000.013.250/00-69), samples of peripheral blood from 58 cases and 235 controls

were collected from March to June 2001. For the cases, the inclusion criteria were patients older than 2 years, seen at the HCPA out-patients clinic, with non-ferropenic microcytic anemia. The inclusion criteria for controls were: non anemic patients older than 2 years, seen for non-hematological diseases. The presence of pregnancy, neoplasia or a history of transplantation was exclusion criteria for this study.

The hematological parameters (HCT, RBC, MCV, MCH, MCHC, and RDW), and the hemoglobin concentrations (Hb) were obtained from cell electronic counter (PENTRA-ROCHE®). The reticulocytes count and the Hb H inclusion bodies were searched after incubation for 30 min, of equal parts of total blood and brilliant cresyl blue at 37°C (15). These studies were conducted within a maximum of 12 hs after collection.

The hemoglobin qualitative analysis was carried out by cellulose acetate hemoglobin electrophoresis, at pH 8.6, of red-cell lysates prepared from 50 µl of total blood + 100 µl of saponine at 1%. The confirmation and quantification of Hb A, A₂, F, S and C, added to the identification of Hb H, were performed by an automatic system of high performance liquid chromatography (HPLC) (Bio-Rad VARIANT™ – Beta Thal Short Program) (16, 17). The osmotic fragility-screening test for β-thalassemia was also performed in all samples (5 µl of total blood + 1 ml of 0.36% NaCl solution) (15). Iron storage was evaluated by the serum ferritin measured in a chemiluminescence device (IMMULITE-DPC®). Information, such as age, color, place of birth, family history for anemia, was obtained during the medical interview, by the same observer. The data were analyzed by statistical packages (EPI-INFO version 6.04b and SPSS version 6.0). Chi-square test and Fisher exact test, when necessary, were used to compare the samples among the categorical variables (sex, color, place of origin). T-test and the Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey's Test, were used to

compare the quantitative variables between cases and controls, as well as the presence or absence of α -thalassemia. The level of significance used was $P < 0.05$.

Results

293 cases and controls seen at HCPA, from Porto Alegre and other counties of the State of Rio Grande do Sul, were studied. There were 176 (60.1%) females and 117 (39.9%) males, uniformly distributed into four ages groups (Table 1).

Table 1 – Frequency of cases and controls according to age.

| Age | Cases | Controls |
|--------------|-----------|-------------|
| 2-6 years | 4 (6.8%) | 10 (4.3%) |
| >6-12 years | 7 (12.1%) | 24 (10.2%) |
| >12-18 years | 7 (12.1%) | 28 (11.9%) |
| >18 years | 40 (69%) | 173 (76.6%) |
| Total | 58 (100%) | 235 (100%) |

The presence of anemia and microcytosis was evaluated using hematological parameters, according to sex and age (18). Table 3 summarizes the results of the hemoglobin pattern. Of the 58 cases analyzed, β -thalassemia, diagnosed by the increase of Hb A₂ and by the osmotic globular resistance test in NaCl 0.36%, was identified in 19 (32.8%) samples. Alpha-thalassemia, identified by the presence of Hb H in cellulose acetate electrophoresis and Hb H inclusion bodies research, was found in 15 (25.9%) samples; of these, 12 (80%) presented the Hb AH electrophoretic pattern, and 3 (20%), the Hb ASH electrophoretic pattern. In addition, heterozygous Hb S (Hb

AS) and homozygous Hb C (Hb CC) were identified in 2 (3.4%) and 1 (0.7%) of the samples analyzed, respectively. Thus, of the 58 cases analyzed, 37 (63.8%) showed some type of hemoglobinopathy or thalassemia.

Among the 235 controls analyzed, 202 (85.9%) showed a normal hemoglobin pattern. Of the 33 (14.09%) abnormal samples, 2 (0.9%) showed increased values of Hb A₂, characterizing β -thalassemia, 27 (11.5%) showed Hb H in electrophoresis, characterizing α -thalassemia, 3 (1.3%) showed heterozygous Hb S (Hb AS), and 1 (0.4%) showed heterozygous Hb C (Hb AC). No increase in Hb F was detected in the sample in this group.

The percentage of alpha-thalassemia identified in the cases (25.9%) and controls (11.5%) were significant statistically different ($P=0.0096$; calculated by the chi-square test, with Yates correction) at an odds ratio of 2.69 (I.C. 95% = 1.23-5.83).

Table 2 – Hemoglobin pattern identified in the sample.

| Hemoglobin pattern | Cases (n) | Controls | Total |
|-----------------------|------------|-------------|-------|
| Hb AA | 21 (36.2%) | 202 (85.9%) | 223 |
| Thal β | 19 (32.8%) | 2 (0.9%) | 21 |
| Thal α | 12 (20.7%) | 27 (11.5%) | 39 |
| Hb AS | 2 (3.4%) | 3 (1.3%) | 5 |
| Thal α / Hb AS | 3 (5.2%) | 0 (0%) | 3 |
| Hb AC | 0 (0%) | 1 (0.4%) | 1 |
| Hb CC | 1 (1.7%) | 0 (0%) | 1 |
| Total | 58 (100%) | 235 (100%) | 293 |

Thal β : β -thalassemia; Thal α : α -thalassemia; Hb A₂: hemoglobin A₂

The racial origin was classified according to the five options used by the Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) to distinguish colors or races in the Brazilian population: white, black, yellow, brown and indian (19). The data are assembled in Table 3. A significant statistically difference can be observed, with a higher frequency of black and brown individuals in the cases (36.8%) when compared with controls (19.1%) ($P = 0.007$, calculated by the chi-square test, with Yates correction). When analyzed for the presence (26.2%) or absence (22.0%) of α -thalassemia (table 4), this variable showed no statistical difference ($P=0.69$).

Table 3 - Frequency of different racial origin between cases and controls.

| Racial origin (color) | Cases (n) | Controls (n) | Total |
|-----------------------|------------|--------------|-------|
| White | 35 (61.4%) | 189 (80.4%) | 224 |
| Black/Brown | 21 (36.8%) | 45 (19.1%) | 66 |
| Yellow | 0 (0%) | 1 (0.4%) | 1 |
| Indian | 1 (1.8%) | 0 (0%) | 1 |
| Total | 57 (100%) | 235 (100%) | 292 |

Table 4 - Frequency of different racial origin between patients with and without α -thalassemia.

| Racial origin (color) | α -thal (n) | Non α -thal (n) | Total |
|-----------------------|--------------------|------------------------|-------|
| White | 31 (73.8%) | 193 (77.2%) | 224 |
| Black/Brown | 11 (26.2%) | 55 (22.0%) | 66 |
| Yellow | 0 (0%) | 1 (0.4%) | 1 |
| Indian | 0 (0%) | 1 (0.4%) | 1 |
| Total | 42 (100%) | 250 (100%) | 292 |

α -thal: α -thalassemia

Taking into account the age, the red cell indices showed by patients carrying or not α -thalassemia, were evaluated by the Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey's Test (table 5). In this analysis, the values of HCT, Hb, MCV, MCH and MCHC were lower in the group of α -thalassemic patients in comparison with the group of non α -thalassemic patients, and the following indices were statistically significant different ($P < 0.05$): HCT, HGB, MCV and MCH in patients older than 18 years.

Table 5 – Red blood cell indices from the patients with and without α -thalassemia.

| Red cell indices | Age group | α -thal | | Non α -thal | | P |
|-----------------------------------|-----------|----------------|------|--------------------|-----|--------|
| | | Mean | Sd | Mean | Sd | |
| HCT (%) | 2-6 | 35.2 (5) | 1.1 | 35.8 (9) | 2.0 | 0.54 |
| | 6-12 | 42.0 (1) | 0 | 36.8 (28) | 2.6 | 0.06 |
| | 12-18 | 37.1 (4) | 2.9 | 40.4 (31) | 4.5 | 0.16 |
| | >18 | 38.1 (32) | 5.5 | 40.7 (176) | 4.7 | 0.006* |
| Hb (g/dl) | 2-6 | 11.3 | 0.5 | 11.6 | 0.6 | 0.29 |
| | 6-12 | 13.7 | 0 | 12.0 | 0.9 | 0.08 |
| | 12-18 | 11.7 | 1.1 | 13.0 | 1.6 | 0.12 |
| | >18 | 12.3 | 2.0 | 13.2 | 1.7 | 0.007* |
| RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$) | 2-6 | 4.7 | 0.4 | 4.4 | 0.3 | 0.16 |
| | 6-12 | 4.8 | 0 | 4.4 | 0.4 | 0.34 |
| | 12-18 | 4.8 | 0.3 | 5.0 | 0.6 | 0.51 |
| | >18 | 4.7 | 0.5 | 4.7 | 0.6 | 0.65 |
| MCV (fl) | 2-6 | 75.0 | 4.6 | 81.2 | 3.4 | 0.012* |
| | 6-12 | 87.0 | 0 | 82.5 | 6.8 | 0.51 |
| | 12-18 | 77.5 | 10.3 | 82.4 | 9.4 | 0.34 |
| | >18 | 81.6 | 12.8 | 85.7 | 9.8 | 0.04* |
| MCH (pg) | 2-6 | 24.1 | 2.1 | 26.3 | 1.5 | 0.04* |
| | 6-12 | 28.4 | 0 | 26.9 | 2.5 | 0.56 |
| | 12-18 | 24.8 | 3.5 | 26.5 | 3.4 | 0.34 |
| | >18 | 26.4 | 4.8 | 27.9 | 3.6 | 0.04* |
| MCHC (%) | 2-6 | 32.0 | 1.2 | 32.5 | 0.9 | 0.47 |
| | 6-12 | 32.6 | 0 | 32.6 | 0.8 | 0.97 |
| | 12-18 | 31.5 | 0.5 | 32.2 | 0.7 | 0.07 |
| | >18 | 32.2 | 1.4 | 32.4 | 0.9 | 0.19 |

HCT: hematocrit; Hb: hemoglobin; RBC: red blood cell; MCV: mean cell volume;

MCH: mean cell hemoglobin; MCHC: mean cell hemoglobin concentration.

Discussion

The Brazilian population is characterized by an extremely high genetic heterogeneity due to a significant and progressive race admixture (20, 21). The distribution of hemoglobinopathies and thalasseмии is related to the several racial groups who gave origin to the Brazilian population. According to the IBGE, the Brazilian population is classified into five categories for race or color: white, black, yellow, brown and indian. In the last population surveillance the black or brown color represents 47.5% of the Brazilian population, and 12.7% of the population of the State of Rio Grande do Sul (19). In our group of patients, this category represented 36.8% of the cases and 19.1% of the controls. The higher proportion of patients of this category in our study can be due to a possible selection bias since the HCPA is a federal assigned public hospital for individuals of a lower economy class, with higher number of black and brown people (21). In our patients, the differences in frequencies of black and brown people carrying or not α -thalassemia, 26.2% and 22.0% respectively (Table 4) was not significant statistically. This may suggest a racial admixture process in the population of Porto Alegre, in which the presence of African and European genes is nearly similar (22).

The results presented in this study confirm that thalasseмии and hemoglobinopathies are very frequent in individuals with non-ferropenic microcytic anemia (63.8%). In relation to α -thalassemia, its actual frequency is not defined, since the technology used is unable to detect all carriers (10). Table 6 shows the great variation in the ratio of α -thalassemic individuals in Brazil and worldwide. The variation found in our group of patients could be due to: (1) an actual difference among the populations, and (2) the use of different techniques. In the region of São José do Rio Preto – southeast Brazil, Castilho et al., using cytological techniques, detected a higher prevalence (16%) of carriers of α -thalassemia in individuals with anemia in comparison

with non-anemic individuals (4%) (23). In Campinas – southeast Brazil, of the 47 black blood donors studied by molecular biology, 29.8% showed to be carriers of this same condition (24).

Table 6 - Frequency of alpha-thalassemia in several populations.

| Place of Origin | % | N | Technique | Population | Year | Reference |
|-----------------|-------|------|-------------------------|----------------------------|------|-----------|
| PoA | 3,7 | 599 | Electrophoresis | NB | 1989 | 10 |
| SP | 10 | 100 | Electrophoresis | NB | 1999 | 20 |
| SP | 26 | 50 | Electrophoresis | Anemic patient to clarify | 1999 | 20 |
| SP | 1,9 | 262 | Electrophoresis | Blood donors | 1999 | 20 |
| SP | 12,5 | 112 | Electrophoresis | Students | 1999 | 20 |
| PoA | 0,12* | 1615 | IEF | NB (filter paper) | 2000 | 21 |
| SJRP | 6,75 | 696 | Electrophoresis | Pregnant | 2001 | 25 |
| SJRP | 15,9 | 195 | Electrophoresis | Anemic patients to clarify | 1989 | 26 |
| SJRP | 4,38 | 913 | Electrophoresis | NB (UCB) | 2001 | 27 |
| Italy | 3 | 4730 | Electrophoresis | NB (UCB) | 1986 | 28 |
| Portugal | 10 | 100 | Electrophoresis and PCR | NB (UCB) | 1996 | 29 |
| Zayre | 17,9 | 636 | Electrophoresis | NB (UCB) | 1969 | 10 |
| Nigéria | 6 | 700 | Electrophoresis | NB (UCB) | 1986 | 10 |

PoA: Porto Alegre; SP: São Paulo; SRJP: São José do Rio Preto; IEF: Isoelectric focalization; NB: newborns; PCR: polymerase chain reaction; UCB: umbilical cord blood; 0,12*: false value decreased due to high time of storage (mean 22 days).

The high frequency of α and β -thalassemia identified in the cases can be due to the fact that the Hematology Department of HCPA is a state reference center for the diagnosis and treatment of hematological disorders. On the other hand, the frequency of α -thalassemia in controls can suggest that they are only silent carriers, since they show no hematological alteration. Our studies are consistent with the observation that many carriers of deletions affecting only one gene α show normal hematological parameters (30).

Daudt et al. studying a population of newborns at the HCPA, found 0.12% of Hb Bart's, a much lower frequency that we observed in our study (21). This discrepancy could be explained by technical reasons since in their study the samples were collected in filter paper and processed, on the average, 22 days after the collection, which is possibly disadvantageous for identifying hemoglobins moving faster than Hb A.

By the techniques used in this work, a large number of patients with non-ferropenic microcytic anemia can be diagnosed as carriers of some type of inherited anemia. The main advantage of identifying correctly these individuals is to avoid the unnecessary medical and laboratory examinations and deleterious iron prescription intake. In addition, the presence of non-anemic patients found as silent carriers of α -thalassemia is pointed out.

Finally, although the techniques we employed in this study were able to diagnose about two-thirds of the non-ferropenic anemic patients, the remainder would probably only be diagnosed by utilizing molecular biology techniques not yet available for routine use at a clinical laboratory. As for α -thalassemia, the hemoglobin H detection tools we used are relatively simple, reproducible and of lower financial cost.

Acknowledgments

We thank biochemist Ana Estela Goldbeck and the staff of Screening Neonatal Laboratory of Faculdade de Farmácia – UFRGS, for help with the HPLC determinations and Dr. Vânia Hirakata for the statistical and computational analyses. We also thank Bio-Rad Latin America (U.S.A) and Bio-Oxford Importação (São Paulo, SP, Brazil) for donation of HPLC reagents.

References

1. WHO Working Group. Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, diagnosis, and treatment. Bull WHO, 1982; 60 (5): 643-660.
2. Angastiniotis M, Modell B, Englezos P, Boulyjenkov V. Prevention and control of haemoglobinopathies. Bull WHO, 1995; 73 (3): 375-386.
3. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited disorders of haemoglobin. The hemoglobinopathies. In: Weatherall DJ, Clegg JB, editors. The thalassaemia syndromes. 3 ed. London. Blackwell Scientific Publications, 1981. p. 85-132.
4. Waye JS, Chui DHK. The α -globin gene cluster: genetics and disorders. Clin Invest Med, 2001; 24(2): 103-109.
5. Weatherall DJ. The thalassemys. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. Williams Hematology. 6 ed, McGraw-Hill, 2001. p.547-578.
6. Weatherall DJ, Clegg JB. The α thalassaemias. In: Weatherall DJ, Clegg JB, editors. The thalassaemia syndromes. 3.ed. London. Blackwell Scientific Publications, 1981. p. 508-612.
7. Weatherall DJ, Old J, Longley J, Wood WG, Clegg JB, Pollock A, Lewis MJ. Acquired haemoglobin H disease in leukaemia: pathophysiology and molecular basis. British Journal of Haematology, 1978; 38:305-322.
8. Liebhaber S. α Thalassemyia. Hemoglobin, 1989; 13 (7 & 8): 685-731.
9. Naoum PC. Talassemias alfa. In: Naoum PC, editors. Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Savier Ed. Livros Médicos, 1997, p.96-104.
10. Pedrollo E, Hutz MH, Salzano F. Alpha Thalassemyia Frequency In Newborn Children From Porto Alegre, Brazil. Rev Brasil Gen, 1990; 13 (3): 573-581.
11. Chui DHK, Waye JS. Hydrops fetalis caused by α -thalassemyia: an emerging health care problem. Blood, 91 (7): 2213-2222, 1998.

12. Lafferty JD, Crowther MA, Waye JS, Chui DHK. A reliable screening test to identify adult carriers of the (α -^{SEA}) α ⁰- thalassemia deletion. *Am J Clin Pathol*, 2000; 114(6).
13. Kazazian HH. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol*, 1990; 27(3): 209-228.
14. Brittenham, GM. Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload. In: Hoffman R.; Benz Jr. E.J.; Shattil S.J. *et al.* (eds.). *Hematology – Basic Principles and Practice*. 3.ed. New York, Churchill Livingstone, 2000. p. 397-426.
15. Naoum PC, Bonini-Domingos CR. Técnicas laboratoriais para identificação das hemoglobinas normais e anormais. In: Naoum PC, editors. *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: Savier Ed. Livros Médicos, 1997, p.144-170.
16. Fucharoen S et al. Prenatal and postnatal diagnoses of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. *Clinical Chemistry* 44(4): 740-748, 1998.
17. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clinical Chemistry*, 2000; 46:8(B): 1284-1290.
18. Lanzkowsky P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. 2.ed. New York, Churchill Livingstone, 1995. p. 629-350.
19. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico, 1991. Available from: <http://www.sidra.ibge.gov.br>.
20. Orlando GM, Naoum PC, Siqueira FAM, Bonini-Domingos CR. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2000; 22 (2): 111-1121.
21. Daudt LE. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre. Porto Alegre – UFRGS, 2000. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Curso de Pós- Graduação em Medicina: Pediatria, 2000.

22. Bortolini MC, Silva WAJr, Guerra DS, Remonato G, Mirándola, R, Hutz MH, Weimer TA, Silva MCBO, Zago MA, Sazano FM. African-derived South American populations: A history of symmetrical and asymmetrical matings according to sex revealed by bi- and uni-parental genetic makers. *Am J Hum Biol*, 1999; 11:551-563.
23. Castilho EM, Naoum PC, Graciano RA, Silva RA. Prevalência de talassemia alfa em pacientes com anemia e em pessoas sem anemia. *Rev Pat Clín*, 1987; 23 (5): 131-134.
24. Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, Costa FF. High prevalence of α -Thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin*, 15 (40), 309-311, 1991.
25. Viana-Baracioli LMS, Bonini-Domingos CR, Pagliusi RA, Naoum PC. Prevenção de hemoglobinopatias, a partir do estudo em gestantes. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2001; 23 (1): 31-39.
26. Naoum PC, Isiqui WD, Pagotto RS, Bonini-Domingos CR. Prevalência de hemoglobinopatias em amostras de proveniência diferenciada. *Bol Soc Bras Hematol Hemoter*, 1989; 153 (XI): 69-72.
27. Ducatti RP, Teixeira AEA, Galão HE, Bonini-Domingos CR, Conte ACF. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. *Rev Bras Hematol hemoter*. 2001, 23 (1):23-29.
28. Velati C, Sampietro M, Biassoni M, et al. Alpha Thalassaemia in an Italian population. *Br J Haematol*, 1986; 63 (3): 497 – 501
29. Peres MJ, Carreiro MH, Machado MC, Seixas T, Picanco I, Batalha L, Lavinha J, Martins MC. Neonatal screening of hemoglobinopathies in a population residing in Portugal. *Acta Med Port*, 1996; 9 (4-6):135-9.
30. Chan LC, Ma SK, Chan AYY, Há SY, Waye JS, Lau YL, Chui DHK. Should we screen for globin gene mutations in blood samples with mean corpuscular volume (MCV) greater than 80 fl in areas with a high prevalence of thalassaemia? *J Clin Pathol*, 2001; 54:317-320.

Freqüência de talassemia α em uma população brasileira anêmica

S.C. Wagner¹, M.C. Silvestri², C. Bittar³, J.R. Friedrisch³, P.C. Naoum⁴ and L.M.R. Silla⁵

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica / UFRGS

² Bolsista Iniciação Científica – CNPq / PIBIC

³ Médicos Hematologistas do Centro de atenção global aos portadores de hemoglobinopatias / Serviço de Hematologia Clínica / HCPA

⁴ Professor Titular - UNESP e Diretor da Academia de Ciência e Tecnologia / São José do Rio Preto, SP

⁵ Professora adjunta do Depto. de Medicina Interna / FAMED / UFRGS e do Programa de Pós-graduação em Medicina: Clínica Médica

Apoio financeiro:

FIPE/HCPA; HEMOAMIGOS/HCPA

Endereço para correspondência:

wagnersandrine@hotmail.com

Título abreviado:

Talassemia alfa e anemia

Palavras-chave:

hemoglobinopatias, talassemia alfa, hemoglobina H, doença da hemoglobina H

Resumo

Para estabelecer a frequência de hemoglobinopatias e talassemias em pacientes com anemia não ferropênica atendidos no HCPA – UFRGS foram estudados 58 casos e 235 controles. A presença de hemoglobinopatias foi determinada através de eletroforese de hemoglobina em fita acetato de celulose, pH alcalino, com hemolisado preparado a partir de saponina a 1%, pesquisa citológica de hemoglobina H (Hb H) por coloração com azul de cresil brilhante a 1%, teste de resistência osmótica em NaCl a 0,36% e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Além destes testes, foram realizados hemograma completo e determinação dos valores de ferritina. A análise dos dados realizada no grupo dos casos demonstrou que 63,8% eram portadores de alguma forma de anemia hereditária, assim distribuídos: 25,9% de talassemia α , 32,8% de talassemia β , 3,4% de heterozigose para hemoglobina S (Hb AS) e 1,7% de homozigose para hemoglobina C (Hb CC). No grupo dos controles, foram identificados 14,1% de anemias hereditárias, sendo destas 11,5% de talassemia α , 0,9% de talassemia β , 1,3% de heterozigose para hemoglobina S (Hb AS) e 0,4% de heterozigose para hemoglobina C (Hb AC).

Conclusão: a identificação da Hb H por meio do uso de técnicas de eletroforese e pesquisa citológica é de simples realização e foi capaz de detectar 25,9% de casos portadores de anemia microcítica não ferropênica em investigação e 11,5% de controles. Possivelmente um número maior de pacientes possa ser caracterizado como portador de talassemia α através de técnicas moleculares (sequenciamento e reação da cadeia polimerase) ainda inviáveis para implementação em laboratórios clínicos em larga escala.

Introdução

As anemias hereditárias estão entre as doenças genéticas mais comuns e compreendem um grupo de condições de variável complexidade (1). No passado, sua distribuição geográfica residia apenas em áreas tropicais e subtropicais do mundo, uma vez que indivíduos portadores de pelo menos um gene para essas desordens apresentavam algum tipo de proteção contra os efeitos letais da malária. Devido a um aumento de movimentos migratórios ocorridos em diversas regiões, com conseqüente miscigenação, esses genes acabaram se difundindo em áreas antes tidas como não endêmicas, como no continente Americano e no Norte da Europa (2). De maneira geral, as anemias hereditárias podem ser divididas em dois grandes grupos: (1) as hemoglobinopatias que se caracterizam pela presença de hemoglobinas estruturalmente anormais, tal como a hemoglobina S (Hb S) que no estado homocigoto é responsável pela anemia falciforme e, (2) as talassemias, caracterizadas pela síntese deficiente de uma ou mais cadeias polipeptídicas das hemoglobinas humanas normais (3). Existem duas principais classes de talassemia: alfa (α) e beta (β), envolvendo os genes α e β globina, respectivamente (3). As talassemias α são caracterizadas pela deficiência parcial ou completa da síntese da cadeia α nas hemácias de indivíduos afetados (3, 4). As cadeias globínicas α são necessárias para a síntese de hemoglobinas presentes na fase fetal e na fase adulta, exercendo importante papel na manutenção da estabilidade destas moléculas de hemoglobina. Logo, defeitos que interferem na sua síntese têm repercussão clínica em ambas as fases, diferente das cadeias β , que estão presentes apenas no componente hemoglobínico adulto maior, a hemoglobina A (Hb A). No feto, a deficiência de cadeias α leva a um excesso de cadeias γ e, no adulto, a um excesso de cadeias β . O excesso de cadeias γ e β permite a formação de tetrâmeros destas (γ_4 e β_4), denominadas de Hb Bart's e Hb H, respectivamente. A fisiopatologia da talassemia α é condicionada,

justamente, pela formação destes tetrâmeros, que são instáveis e termolábeis (1, 5). As talassemias α surgem principalmente por defeitos herdados na expressão dos genes que codificam as cadeias α atingindo de um a quatro destes genes (6), embora, defeitos nesta síntese também podem ocorrer de forma adquirida (7, 8). De uma maneira geral, é possível classificar as talassemias α em quatro categorias, de acordo com o nível de expressão dos genes α : (1) uma forma assintomática ou portador silencioso, com perda de um único gene ($-\alpha/\alpha\alpha$); (2) o traço alfa talassêmico, no qual há perda de dois genes alfa de um único cromossomo ($--/\alpha\alpha$) ou de um gene α de ambos os cromossomos ($-\alpha/-\alpha$); (3) a doença da hemoglobina H, na qual apenas um gene alfa é funcional ($--/-\alpha$) e (4) a hidropsia fetal, caracterizada pela ausência dos quatro genes alfa ($---/---$) (9, 10, 11, 12, 13). Devido a grande variedade de interações genéticas possíveis, geradas por processos de deleção, não deleção e hemoglobinas variantes, entre outros, pode ocorrer uma sobreposição entre os grupos acima, dificultando a sua caracterização (8). A anemia presente nas talassemias α ocorre devido à diminuição do tempo de vida dos eritrócitos, consequência dos danos causados pela microvasculatura esplênica, ocorridos pela presença de corpos de inclusão nestas células. Além disso, pelo defeito na síntese de quantidades normais de hemoglobina, os eritrócitos apresentam-se microcíticos e hipocrômicos (5). Estes dados são de relevância clínica, uma vez que estas alterações hematológicas são seguidamente interpretadas como indicadores de deficiência de ferro ou características de anemia de doenças crônicas (14). Este estudo teve por objetivo principal estabelecer a frequência da talassemia α e outras hemoglobinopatias em duas populações atendidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA): portadores de anemia microcítica não ferropênica a esclarecer (casos) e indivíduos sem anemia atendidos por doenças não hematológicas (controles). Para a realização deste trabalho, foram empregadas técnicas de eletroforese, cromatografia, bioquímica e citologia.

Material e Métodos

Em um estudo caso-controle, após aprovação pelo CONEP (Conselho Nacional de Ética em Pesquisa – número: 25000.013.250/00-69), amostras de sangue periférico de 58 casos e 235 controles foram coletadas no período de março a junho de 2001. Os critérios de inclusão para os casos foram: pacientes acima de 2 anos, atendidos no Ambulatório de Hematologia do HCPA, portadores de anemia microcítica não ferropênica a esclarecer. Para os controles, os critérios de inclusão foram: pacientes acima de 2 anos, não portadores de anemia atendidos no HCPA por doenças não hematológicas. Foram excluídos do estudo, pacientes gestantes, com neoplasias e/ou transplantados.

Os índices hematimétricos (HCT, RBC, VCM, HCM, CHCM e RDW) e as concentrações de hemoglobina (Hb) foram obtidos de contador eletrônico de células (PENTRA-ROCHE®). A contagem de reticulócitos e a pesquisa citológica de Hb H no microscópio foram determinadas após a incubação a 37°C durante 30 min, de partes iguais de sangue total e azul de cresil brilhante (15).

A análise qualitativa das frações hemoglobínicas foi realizada em eletroforese em fita de acetato de celulose, pH 8,6, com hemolisado preparado a partir de 50 µl de sangue total + 100 µl de saponina a 1% (7). A confirmação e quantificação das Hb A, A₂, F, S e C, além da identificação, quando possível, de Hb H, foi realizada por um sistema automatizado de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Bio-Rad VARIANT™ – Beta Thal Short Program) (16, 17). O teste de resistência globular osmótica em NaCl 0,36% foi realizado em todas as amostras (5 µl de sangue total + 1 ml de solução de NaCl 0,36%) (15). Os estoques de ferro foram avaliados através da medida de ferritina sérica, em equipamento de quimioluminescência (IMMULITE-DPC®). Informações dos participantes, tais como idade, cor, local de nascimento, história de anemia na família, foram obtidos através de entrevista direta. Os dados

foram analisados usando pacotes estatísticos (EPI-INFO versão 6.04b e SPSS versão 6.0). Para comparação das amostras entre as variáveis categóricas (sexo, cor, procedência), recorreu-se ao teste χ^2 e ao teste exato de Fisher, quando necessário. O Teste t e a análise de variância (ANOVA), seguida do Teste de Tukey, foi utilizado para comparação das variáveis quantitativas entre casos e controles e a presença ou não de talassemia α . O nível de significância utilizado foi $P < 0,05$.

Resultados

Foram estudados 293 casos e controles atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), provenientes deste mesmo município e de outras regiões do Estado do Rio Grande do Sul, sendo que do total, 176 (60,1%) eram do sexo feminino e 117 (39,9%) eram do sexo masculino, uniformemente distribuídos entre 4 faixas etárias (tabela 1).

Tabela 1 - Frequência de casos e controles de acordo com a faixa etária.

| Faixa etária | Casos | Controles |
|--------------|-----------|-------------|
| 2-6 anos | 4 (6,8%) | 10 (4,3%) |
| >6-12 anos | 7 (12,1%) | 24 (10,2%) |
| >12-18 anos | 7 (12,1%) | 28 (11,9%) |
| >18 anos | 40 (69%) | 173 (76,6%) |
| Total | 58 (100%) | 235 (100%) |

A presença de anemia e microcitose foi avaliada através dos índices hematimétricos de acordo com o sexo e a faixa etária dos pacientes (18). Os resultados do perfil hemoglobínico apresentado pelas análises das amostras estão sumarizados na tabela 2. Dentre os 58 casos analisados, a talassemia β , diagnosticada através do aumento de Hb A₂ e do teste de resistência globular

osmótica em NaCl 0,36%, foi identificada em 19 (32,8 %) amostras. A talassemia α , identificada através da presença de Hb H na eletroforese em acetato de celulose e pesquisa intraeritrocitária de Hb H, foi encontrada em 15 (25,9%) amostras, sendo que destas, 12 (80%) apresentaram o padrão eletroforético Hb AH e 3 (20%) apresentaram o padrão eletroforético Hb ASH. Além destas, a heterozigoze para Hb S (Hb AS) e a homozigoze para Hb C (Hb CC) foram identificadas em 2 (3,4%) e 1 (0,7%) das amostras analisadas, respectivamente. Assim, dos 58 casos analisados, 37 (63,8%) apresentaram alguma forma de hemoglobinopatia ou de talassemia.

Entre os 235 controles analisados, 202 (85,9%) apresentaram perfil hemoglobínico normal. Das 33 (14,09%) amostras alteradas, 2 (0,9%) apresentaram valores de Hb A₂ aumentados, caracterizando a talassemia β , 27 (11,5%) apresentaram a Hb H na eletroforese, caracterizando a talassemia α , 3 (1,3%) apresentaram a Hb S em heterozigoze (Hb AS) e 1 (0,4%) apresentou a Hb C em heterozigoze (Hb AC). Nenhum caso de aumento de Hb F foi identificado na amostra.

Estatisticamente a talassemia α identificada entre os casos (25,9%) e os controles (11,5%) apresentou diferença significativa ($P=0,0096$, calculado pelo Teste de χ^2 , com correção de Yates) com uma razão de chances de 2,69 (I.C. 95%= 1,23-5,83).

Tabela 2 - Perfil hemoglobínico identificado nas amostras analisadas

| Perfil Hemoglobínico | Casos (n) | Controles | Total |
|----------------------|------------|-------------|-------|
| Hb AA | 21 (36,2%) | 202 (85,9%) | 223 |
| Tal β | 19 (32,8%) | 2 (0,9%) | 21 |
| Tal α | 12 (20,7%) | 27 (11,5%) | 39 |
| Hb AS | 2 (3,4%) | 3 (1,3%) | 5 |
| Tal α / Hb AS | 3 (5,2%) | 0 (0%) | 3 |
| Hb AC | 0 (0%) | 1 (0,4%) | 1 |
| Hb CC | 1 (1,7%) | 0 (0%) | 1 |
| Total | 58 (100%) | 235 (100%) | 293 |

Tal β : talassemia beta; Tal α : talassemia alfa; Hb A₂: hemoglobina A₂

A origem racial foi classificada segundo critérios do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no qual estabelece 5 opções para cores ou raças na nossa população: branca, preta, amarela, parda e índia (19). Os dados encontram-se agrupados na tabela 3. Através da análise destes dados observamos uma diferença estatística significativa entre casos e controles, com uma maior frequência de casos de cor preta e parda (36,8%) quando comparados com os controles (19,1%) (P=0,007, calculado pelo Teste de χ^2 , com correção de Yates). A mesma variável quando analisada com relação à presença ou não de talassemia α , 26,2 % e 22,0%, respectivamente (tabela 4), não apresentou diferença estatística (P=0,69).

Tabela 3 - Frequência da população analisada relativa à origem racial

| Origem racial (cor) | Casos (n) | Controles (n) | Total |
|------------------------|------------|---------------|-------|
| Branco | 35 (61,4%) | 189 (80,4%) | 224 |
| Negro/Pardo | 21 (36,8%) | 45 (19,1%) | 66 |
| Amarelo | 0 (0%) | 1 (0,4%) | 1 |
| Índio | 1 (1,8%) | 0 (0%) | 1 |
| Total | 57 (100%) | 235 (100%) | 292 |

Tabela 4 – Frequência da origem racial entre pacientes com e sem talassemia α .

| Origem racial (cor) | tal α (n) | Sem tal α (n) | Total |
|------------------------|------------------|----------------------|-------|
| Branco | 31 (73.8%) | 193 (77.2%) | 224 |
| Negro/pardo | 11 (26.2%) | 55 (22.0%) | 66 |
| Amarelo | 0 (0%) | 1 (0.4%) | 1 |
| Índio | 0 (0%) | 1 (0.4%) | 1 |
| Total | 42 (100%) | 250 (100%) | 292 |

Os índices hematimétricos apresentados pelos pacientes com e sem talassemia α foram avaliados através da análise de variância (ANOVA), seguida do Teste de Tukey, considerando a faixa etária ao qual pertenciam (tabela 5). Nesta análise, os valores de HCT, Hb, VCM, HCM e CHCM foram menores no grupo de pacientes com talassemia α quando comparados com o grupo de pacientes sem talassemia α , apresentando diferença estatística significativa ($P < 0,005$) os seguintes índices: HCT, Hb, VCM e HCM em pacientes > 18 anos.

Tabela 5 - Perfil hematológico dos pacientes classificados como portadores de talassemia α e não portadores de talassemia α .

| Índices | Faixa etária | Pacientes com Tal α | | Pacientes sem Tal α | | P |
|---------------------------|--------------|----------------------------|------|----------------------------|-----|--------|
| | | Média | Sd | Média | Sd | |
| HCT (%) | 2-6 | 35,2 (5) | 1,1 | 35,8 (9) | 2,0 | 0,54 |
| | 6-12 | 42,0 (1) | 0 | 36,8 (28) | 2,6 | 0,06 |
| | 12-18 | 37,1 (4) | 2,9 | 40,4 (31) | 4,5 | 0,16 |
| | >18 | 38,1 (32) | 5,5 | 40,7 (176) | 4,7 | 0,006* |
| Hb (g/dl) | 2-6 | 11,3 | 0,5 | 11,6 | 0,6 | 0,29 |
| | 6-12 | 13,7 | 0 | 12,0 | 0,9 | 0,08 |
| | 12-18 | 11,7 | 1,1 | 13,0 | 1,6 | 0,12 |
| | >18 | 12,3 | 2,0 | 13,2 | 1,7 | 0,007* |
| ERI ($\times 10^6/\mu$) | 2-6 | 4,7 | 0,4 | 4,4 | 0,3 | 0,16 |
| | 6-12 | 4,8 | 0 | 4,4 | 0,4 | 0,34 |
| | 12-18 | 4,8 | 0,3 | 5,0 | 0,6 | 0,51 |
| | >18 | 4,7 | 0,5 | 4,7 | 0,6 | 0,65 |
| VCM (fl) | 2-6 | 75,0 | 4,6 | 81,2 | 3,4 | 0,012* |
| | 6-12 | 87,0 | 0 | 82,5 | 6,8 | 0,51 |
| | 12-18 | 77,5 | 10,3 | 82,4 | 9,4 | 0,34 |
| | >18 | 81,6 | 12,8 | 85,7 | 9,8 | 0,04* |
| HCM (pg) | 2-6 | 24,1 | 2,1 | 26,3 | 1,5 | 0,04* |
| | 6-12 | 28,4 | 0 | 26,9 | 2,5 | 0,56 |
| | 12-18 | 24,8 | 3,5 | 26,5 | 3,4 | 0,34 |
| | >18 | 26,4 | 4,8 | 27,9 | 3,6 | 0,04* |
| CHCM (%) | 2-6 | 32,0 | 1,2 | 32,5 | 0,9 | 0,47 |
| | 6-12 | 32,6 | 0 | 32,6 | 0,8 | 0,97 |
| | 12-18 | 31,5 | 0,5 | 32,2 | 0,7 | 0,07 |
| | >18 | 32,2 | 1,4 | 32,4 | 0,9 | 0,19 |

Tal α : talassemia alfa; HCT: hematócrito; Hb: hemoglobina; ERI: eritrócitos;

VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

Discussão

A população brasileira se caracteriza por apresentar uma grande heterogeneidade genética e um nível de miscigenação significativo e progressivo (20, 21). A distribuição das hemoglobinopatias e talassemias se relaciona com os diversos grupos raciais que participaram na formação da população brasileira. O IBGE estabelece 5 opções para cor ou raça na nossa população: branca, preta, amarela, parda e índia. Os dados do censo realizado em 1991, apresentam a classificação da população brasileira de acordo com esta variável. A cor preta ou parda representa 47,5% da população brasileira, enquanto esta mesma categoria no Estado do Rio Grande do Sul representa 12,7% (19). No grupo estudado, identificamos a presença de 36,8% de casos e 19,1% de controles classificados nesta categoria. Esta proporção maior de pacientes desta categoria com relação ao Estado do Rio Grande do Sul pode ser devido à possível seleção da população que procura assistência médica no HCPA, onde predomina o atendimento pelo Sistema Único de Saúde, de indivíduos economicamente menos favorecidos, onde o número de pretos e pardos é maior (21). Quando verificamos a frequência da cor preta e parda com e sem talassemia α na amostra analisada, observamos 26,2% e 22,0% (tabela 4), respectivamente nestas categorias, sendo esta diferença estatística não significativa. Isto pode sugerir um processo de mistura racial na população de Porto Alegre, na qual a presença de genes africanos e europeus é aproximadamente semelhante (22).

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que as talassemias e as hemoglobinopatias são muito frequentes em populações de indivíduos com anemia microcítica não ferropênica (63,8%). Com relação a talassemia α , a sua frequência verdadeira não é definida, uma vez que a tecnologia utilizada não é capaz de detectar todos os portadores (10). A tabela 6 mostra a grande variação na proporção de indivíduos com talassemia α no Brasil e no Mundo. Esta variação encontrada nas

populações estudadas pode ser devido a: (1) real diferença nas populações e (2) uso de técnicas diferentes. Na região de São José do Rio Preto, Castilho et al identificaram, através de técnicas citológicas, uma prevalência maior (16%) de portadores de talassemia α em indivíduos com anemia a esclarecer quando comparada com indivíduos sem anemia (4%) (23). Em Campinas, dos 47 doadores de sangue negros estudados através de biologia molecular, 29,8% demonstraram ser portadores desta mesma condição (24).

Tabela 6 - Frequência de tal α em várias populações.

| Local | % | N | Técnica | População | Ano | Referência: |
|----------|-------|------|--------------------|--------------------------|------|-------------|
| Poá | 3,7 | 599 | Eletroforese | RN | 1989 | 10 |
| SP | 10 | 100 | Eletroforese | RN | 1999 | 20 |
| SP | 26 | 50 | Eletroforese | Anêmicos a esclarecer | 1999 | 20 |
| SP | 1,9 | 262 | Eletroforese | Doadores sangue | 1999 | 20 |
| SP | 12,5 | 112 | Eletroforese | Estudantes | 1999 | 20 |
| Poá | 0,12* | 1615 | IEF | RN (papel filtro) | 1999 | 21 |
| SJRP | 6,75 | 696 | Eletroforese | Gestantes | 2001 | 25 |
| SJRP | 15,9 | 195 | Eletroforese | Anêmicos a esclarecer | 1989 | 26 |
| SJRP | 4,38 | 913 | Eletroforese | RN (SC) | 2001 | 27 |
| Itália | 3 | 4730 | Eletroforese | RN (SC) | 1986 | 28 |
| Portugal | 14 | 100 | Eletroforese e PCR | RN (SC) | 1996 | 29 |
| Zaire | 17,9 | 636 | Eletroforese | RN (SC) | 1969 | 10 |
| Nigéria | 6 | 700 | Eletroforese | RN (SC) | 1986 | 10 |

PoA: Porto Alegre; SP: São Paulo; SJRP: São José do Rio Preto; IEF: isoelectric focalization (focalização isoeletrica) isoeletrica; RN: recém-nascidos; PCR: polymerase chain reaction (reação da cadeia polimerase); SC: sangue de cordão; 0,12*: valor falsamente diminuído devido ao uso de amostra de sangue em papel de filtro e alto tempo de estocagem (média de 22 dias após a coleta).

A alta frequência de talassemias α e β identificadas entre os casos pode ser devido ao Ambulatório de Hematologia do HCPA constituir-se em centro de referência no Estado para diagnóstico e tratamento de distúrbios hematológicos. Além disto, a deficiência de ferro e as anemias de doenças crônicas, causas de microcitose, foram excluídas através de exames laboratoriais e consultas médicas. Já a frequência de talassemia α entre os controles pode sugerir que estes sejam apenas portadores silenciosos, uma vez que não apresentam alterações em nível hematológico. Nossos resultados são consistentes com a observação de que muitos portadores de deleções que atingem um único gene α possuem estes índices nos níveis de normalidade (30).

Quando analisamos os resultados obtidos por Daudt em 1999 (tabela 6) (0,12% de Hb Bart's em recém-nascidos no HCPA), verificamos que este valor é bastante inferior ao encontrado neste trabalho (21). Justifica-se este baixo índice pela falha na técnica, uma vez que as amostras foram coletadas em papel filtro e foram processadas, em média, 22 dias após a coleta, o que possivelmente prejudica a identificação de hemoglobinas com mobilidade mais rápida do que a Hb A.

Com as técnicas utilizadas na realização deste trabalho, um grande número de pacientes com anemia microcítica não ferropênica a esclarecer pode ser diagnosticado como portador de algum tipo de anemia hereditária, destacando as talassemias α e β . A principal vantagem da identificação correta destes indivíduos é evitar a administração desnecessária e deletéria de ferro, além de exames laboratoriais e consultas médicas. Destaca-se, porém, a presença de pacientes sem anemia, logo, com índices hematimétricos normais, classificados como portadores silenciosos de talassemia α .

Embora as técnicas aplicadas neste estudo tenham sido capazes de diagnosticar dois terços de pacientes com anemia não ferropênica, o restante dos pacientes apenas será diagnosticado através do uso de técnicas de biologia

molecular, ainda não disponíveis para uso na rotina da maioria dos laboratórios clínicos. Para a talassemia α , a identificação de Hb H realizada através das técnicas empregadas neste trabalho, se mostrou útil, relativamente simples, reprodutível e de baixo custo.

Agradecimentos

Agradecemos à Bioquímica Ana Estela Goldbeck e demais funcionários do Laboratório de Triagem Neonatal da Faculdade de Farmácia – UFRGS, pelo auxílio nas determinações realizadas no equipamento de HPLC, e à Dra. Vânia Hirakata pelo auxílio na análise estatística. Agradecemos também à Bio-Rad Latin America (E.U.A.) e Bio-Oxford Importação (São Paulo / SP) pela doação de reagentes utilizados no equipamento de HPLC.

Referências

1. WHO Working Group. Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, diagnosis, and treatment. Bull WHO, 1982; 60 (5): 643-660.
2. Angastiniotis M, Modell B, Englezos P, Boulyjenkov V. Prevention and control of haemoglobinopathies. Bull WHO, 1995; 73 (3): 375-386.
3. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited disorders of haemoglobin. The hemoglobinopathies. In: Weatherall DJ, Clegg JB, editors. The thalassaemia syndromes. 3 ed. London. Blackwell Scientific Publications, 1981. p. 85-132.
4. Waye JS, Chui DHK. The α -globin gene cluster: genetics and disorders. Clin Invest Med, 2001; 24(2): 103-109.
5. Weatherall DJ. The thalassemys. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. Williams Hematology. 6 ed, McGraw-Hill, 2001. p.547-578.
6. Weatherall DJ, Clegg JB. The α thalassaemias. In: Weatherall DJ, Clegg JB, editors. The thalassaemia syndromes. 3 ed. London. Blackwell Scientific Publications, 1981. p. 508-612.
7. Weatherall DJ, Old J, Longley J, Wood WG, Clegg JB, Pollock A, Lewis MJ. Acquired haemoglobin H disease in leukaemia: pathophysiology and molecular basis. Br J Haematol, 1978; 38:305-322.
8. Liebhaber S. α Thalassemia. Hemoglobin, 1989; 13 (7 & 8): 685-731.
9. Naoum PC. Talassemias alfa. In: Naoum PC (eds). Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Savier Ed. Livros Médicos, 1997, p.96-104.
10. Pedrollo E, Hutz MH, Salzano F. Alpha Thalassemia Frequency In Newborn Children From Porto Alegre, Brazil. Rev Brasil Gen, 1990; 13 (3): 573-581.
11. Chui DHK, Waye JS. Hydrops fetalis caused by α -thalassemia: an emerging health care problem. Blood, 91 (7): 2213-2222, 1998.

12. Lafferty JD, Crowther MA, Waye JS, Chui DHK. A reliable screening test to identify adult carriers of the (α^0 -SEA) α^0 -thalassemia deletion. *Am J Clin Pathol*, 2000; 114(6).
13. Kazazian HH. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol*, 1990; 27(3): 209-228.
14. Brittenham, G.M. Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload. In: Hoffman R.; Benz Jr. EJ; Shattil SJ. *et al.* (eds.). **Hematology – Basic Principles and Practice**. 3.ed. New York, Churchill Livingstone, 2000. p. 397-426.
15. Naoum PC, Bonini-Domingos CR. Técnicas laboratoriais para identificação das hemoglobinas normais e anormais. In: Naoum PC, editors. *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: Savier Ed. Livros Médicos, 1997, p.144-170.
16. Fucharoen S et al. Prenatal and postnatal diagnoses of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. *Clinical Chemistry* 44(4): 740-748, 1998.
17. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clinical Chemistry*, 2000; 46:8(B): 1284-1290.
18. Lanzkowsky P. **Manual of Pediatric Hematology and Oncology**. 2.ed. New York, Churchill Livingstone, 1995. p. 629-350.
19. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico, 1991. Available from: <http://www.sidra.ibge.gov.br>.
20. Orlando GM, Naoum PC, Siqueira FAM, Bonini-Domingos CR. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2000; 22 (2): 111-1121.
21. Daudt LE. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre. Porto Alegre – UFRGS, 2000. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Curso de Pós- Graduação em Medicina: Pediatria, 2000.

22. Bortolini MC, Silva WAJr, Guerra DS, Remonato G, Mirándola, R, Hutz MH, Weimer TA, Silva MCBO, Zago MA, Sazano FM. African-derived South American populations: A history of symmetrical and asymmetrical matings according to sex revealed by bi- and uni-parental genetic makers. *Am J Hum Biol*, 1999; 11:551-563.
23. Castilho EM, Naoum PC, Graciano RA, Silva RA. Prevalência de talassemia alfa em pacientes com anemia e em pessoas sem anemia. *Rev Pat Clín*, 1987; 23 (5): 131-134.
24. Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, Costa FF. High prevalence of α -Thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin*, 15 (40), 309-311, 1991.
25. Viana-Baracioli LMS, Bonini-Domingos CR, Pagliusi RA, Naoum PC. Prevenção de hemoglobinopatias, a partir do estudo em gestantes. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2001; 23 (1): 31-39.
26. Naoum PC, Isiqui WD, Pagotto RS, Bonini-Domingos CR. Prevalência de hemoglobinopatias em amostras de proveniência diferenciada. *Bol Soc Bras Hematol Hemoter*, 1989; 153 (XI): 69-72.
27. Ducatti RP, Teixeira AEA, Galão HE, Bonini-Domingos CR, Conte ACF. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. *Rev Bras Hematol hemoter*. 2001, 23 (1):23-29.
28. Velati C, Sampietro M, Biassoni M, et al. Alpha Thalassaemia in an Italian population. *Br J Haematol*, 1986; 63 (3): 497 – 501
29. Peres MJ, Carreiro MH, Machado MC, Seixas T, Picanco I, Batalha L, Lavinha J, Martins MC. Neonatal screening of hemoglobinopathies in a population residing in Portugal. *Acta Med Port*, 1996; 9 (4-6):135-9.
30. Chan LC, Ma SK, Chan AYY, Há SY, Waye JS, Lau YL, Chui DHK. Should we screen for globin gene mutations in blood samples with mean corpuscular volume (MCV) greater than 80 fl in areas with a high prevalence of thalassaemia? *J Clin Pathol*, 2001; 54:317-320.

ANEXOS

Anexo I
Carta ao paciente

Prezado Paciente,

Como já é de seu conhecimento, o senhor (a) está em acompanhamento no ambulatório do Serviço de Hematologia do HCPA por estar em investigação de um quadro de anemia.

Como estamos realizando uma pesquisa científica no Serviço de Hematologia, constatamos que as características do seu sangue podem ajudar aos médicos e, desta maneira, a muitos pacientes, a esclarecer uma série de dúvidas sobre anemias.

O grupo de médicos e pesquisadores gostaria de solicitar o seu comparecimento a uma consulta para realização de exames complementares.

Queremos deixar claro que não constatamos nenhuma doença em exames já realizados. Sua presença será somente para fins de darmos continuidade a esta importante pesquisa que, certamente, poderá ajudar na sua avaliação clínica.

Para sua maior comodidade, estamos colocando a sua disposição um telefone, com dias e horários para agendar a sua consulta:

Fone: 0(xx) 51- 316 8317

Dias e horários para ligar e agendar a sua consulta: de segundas a quintas-feiras das 12:00 às 13:30 horas.

Falar com Matheus Silvestri ou Sandrine Wagner

Por favor, assim que receber esta correspondência, entre em contato conosco.

* Observação: caso o Sr. ou a Sra. não consiga ligar nos horários determinados, por favor, entre em contato com a farmacêutica Sandrine Wagner, pelo fone 0(xx) 51-9984 5757.

Gratos por sua colaboração

Farmacêutica Sandrine Wagner
Aluna Responsável

Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla
Pesquisadora Responsável

Anexo II
Ficha de Identificação

Número: _____ Número proutuário: _____
 Nome: _____ Sexo: ()M ()F
 Endereço: _____

Telefone para contato: _____

Local de nascimento: _____

Origem da mãe: () 1-branca; 2-negra; 3-parda, 4-amarela; 5-índia

Origem do pai: () 1-branca; 2-negra; 3-parda; 4- amarela; 5-índia

Cor: () 1-branca; 2-negra; 3-parda; 4- amarela; 5-índia

Outras: _____

Ancestrais caucasóides? () sim () não

Quais? _____

Anos na escola: () 1-analfabeto; 2-1° grau inc; 3-1° grau comp; 4-2° grau inc; 5-2° grau compl.; 6-3° grau inc.; 7-3° grau comp.

Número de irmãos: () _____

Data de nascimento: / /

História anterior de anemia: () sim () não

História familiar de anemia: () sim () não

Tratamento com ferro: ()sim ()não

Hemograma: _____ Data: _____

Hgb: g/dl Hct: % Erit: $\times 10^6 / \mu\text{l}$

VCM: fl HCM: pg CHCM: pg/dl

Leuco: $/\mu\text{l}$ Plaquetas: $/\mu$

Reticulócitos: %

Ferro: $\mu\text{g/dl}$ LDH: _____

Ferritina: ng/ml Bilirrubinas: _____

VSG: mm

Eletroforese de Hemoglobina: _____ Data: _____

Obs.: _____

% de Hb: _____

Realizada por: _____

Pesquisa de Hb H: () positiva () negativa

Se positiva, quantas/campo: _____

Teste Hb A₂: () positivo () negativo

Data HPLC:

% Hb A: % Hb A₂: % Hb F: % Hb S:

% Hb C: % Hb outra:

Dados clínicos (preencher se for caso)

Tontura: () s () n

Vertigem: () s () n

Dispnéia: () s () n

Palpitações: () s () n

Cansaço: () s () n

Mucosas hipocoradas: () s () n

Hepatomegalia: () s () n cm:

Esplenomegalia: () s () n cm:

Icterícia: () s () n

Outros:

Anexo III

Termo de consentimento

Número: _____

Prezado Paciente

Existe um tipo de anemia que parece ser comum na nossa população. Tal anemia não traz, para a maioria dos afetados, problema algum, exceto o fato de que desconhecendo a causa, o paciente vai inúmeras vezes ao médico e recebe freqüentemente tratamento com ferro, o que é prejudicial para a sua saúde.

Até o momento, foi realizado apenas um estudo em Porto Alegre (Pedrollo e cols. 1990) mostrando que em cada 100 nascimentos, aproximadamente 4 pessoas nascem com esse tipo de anemia, chamada de talassemia alfa.

As talassemias alfa são um grupo de alterações hereditárias, ou seja, que passam de pais para filhos e que podem levar a quadros variáveis de anemia. Na maioria dos casos, essa anemia é tão leve que o paciente não sente nada, mas em outros pode apresentar sintomas como fraqueza, falta de ar, sonolência e desânimo e, com o passar do tempo, o paciente pode desenvolver pedra na vesícula (litíase biliar).

Este projeto de pesquisa, para o qual estamos pedindo a sua participação, tem como objetivo principal levantar dados mais precisos e atuais sobre o número de pessoas afetadas neste Hospital. Com as informações obtidas, poderemos planejar programas que oferecem uma melhor qualidade de atendimento, diagnóstico e orientação aos pacientes, principalmente sobre a possibilidade de casais portadores de talassemia alfa gerarem filhos também afetados. Cabe explicar que um casal de portadores de traço talassêmico alfa tem um risco de, aproximadamente, 37%, isto é, uma chance de 1 em cada 3, de gerar uma criança com esta mesma condição.

Para o desenvolvimento deste trabalho, precisamos de um grupo de pessoas portadoras de anemia a esclarecer e de um grupo de pessoas sem anemia diagnosticada (sem sinais de anemia).

É necessário apenas que os participantes do estudo com anemia em investigação que colem uma amostra a mais de sangue e os que não têm anemia cedam uma amostra (10 ml), que será coletada por profissional habilitado e com todas as técnicas adequadas.

Estas amostras de sangue serão analisadas para que sejam identificados possíveis portadores de talassemia alfa. Também será extraído DNA desta amostra de

sangue, que é o material genético que pode auxiliar no esclarecimento do diagnóstico. Caso concorde, este DNA será mantido congelado e identificado para utilização em um próximo projeto de pesquisa que dará continuidade a este, visando detalhar melhor o diagnóstico desta forma de anemia. Na ausência da execução deste próximo projeto, o DNA, extraído e armazenado anteriormente, será totalmente destruído.

Os riscos associados ao presente estudo são apenas os de uma coleta de sangue venoso. Pode haver um pequeno hematoma, isto é, um pequeno derramamento de sangue no local da coleta. Lembramos que todo material utilizado é descartável e estéril e o profissional que irá realizar a coleta está capacitado para esta função. Além disso, a quantidade de sangue coletada não fará falta alguma ao paciente.

Os benefícios envolvidos são os de possibilitar o diagnóstico de uma doença genética e oferecer alternativas de tratamento e de aconselhamento familiar com finalidade de reprodução.

Caso sejam detectadas alterações compatíveis com as da talassemia alfa, o resultado do exame será enviado para o seu prontuário.

Eu, _____, fui informado do objetivo deste trabalho de forma clara e detalhada, bem como sobre o procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, se assim o desejar, sem prejuízo para o meu tratamento.

O (a) profissional _____ certificou-me de que todas as informações por mim fornecidas serão utilizadas apenas para fins do presente projeto de pesquisa e serão divulgadas de forma anônima.

() Concordo com a coleta e a utilização do material obtido.

() Concordo com a extração, armazenamento e utilização do DNA obtido.

Paciente

Pesquisador

Data: _____

Telefone para esclarecimentos: 0 XX 51-316-8317