

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Aplicação das Técnicas de HPLC e FIE na Triagem Neonatal de  $\alpha$ -  
talassemia em amostras de Sangue Seco em Papel Filtro

Yasmini Dandara S. da Silva

Porto Alegre, dezembro de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Aplicação das Técnicas de HPLC e FIE na Triagem Neonatal de  $\alpha$ -  
talassemia em amostras de Sangue Seco em Papel Filtro

Trabalho apresentado na Disciplina  
de Trabalho de Conclusão do Curso  
de Farmácia da Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul

Yasmini Dandara S. da Silva

Prof<sup>a</sup>. Dra. Simone Martins de Castro

Orientadora

Juliana Longo Macedo

Co-orientadora

Porto Alegre, dezembro de 2017.

*“A ciência é muito mais do que um corpo de conhecimento. É uma maneira de pensar”*

- Carl Saga

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço ao Serviço de Triagem Neonatal do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas por ceder o espaço para que este estudo pudesse ser realizado.

A minha professora orientadora Dra. Simone Martins de Castro, pela oportunidade de trabalharmos juntas, por me oferecer este projeto, por toda a ajuda dada e dedicação, sempre dando suporte e retorno aos meus questionamentos, espero um dia ser tão profissional e dedicada quanto ela.

A minha co-orientadora Juliana Longo Macedo por me receber de braços abertos ajudando sempre na elaboração e organização dos dados aqui apresentados.

A banca examinadora deste trabalho Laura e Suzane obrigada pela disponibilidade de tempo e as observações que irão contribuir com o enriquecimento deste trabalho.

A todos os funcionários e estagiários do LACT, agradeço por esse tempo, pela ajuda e pelos ensinamentos que também me ajudaram a decidir o que quero para minha vida profissional e isto reflete diretamente neste trabalho.

Quero agradecer também a todos que me deram suporte na minha vida pessoal, como os grandes amigos que fiz durante a graduação, Letícia, Artur, Manuela, Caroline Souto, Alexi, Guilherme, Gabriel, Juliana, Francine, Elissa, Vanessa, Rudinei, Paola, e Nathan, obrigada por tornar nosso difícil curso um pouco mais leve e divertido pela companhia de vocês seja nos nossos estudos em grupo, nas nossas saídas ou nas nossas conversas banais, sempre terei histórias maravilhosas para contar graças a vocês. Quero agradecer em especial a maravilhosa amizade que a faculdade me trouxe, minha amiga Caroline Gentz, obrigada por entrar na minha vida, pelas nossas risadas, conversas diárias, ajuda e cumplicidade durante todo esse tempo. Agradeço aos meus amigos de mais de 10 anos de amizade Fernanda e Leandro por estarem comigo durante todos esses anos, pela amizade e pela sensação de sempre ter com quem contar.

E por último agradeço ao meu irmão Kauê por me inspirar a seguir seus passos, e aos meus pais Vera e Volnei, por todo amor incondicional, carinho e suporte, sem eles eu não poderia estar aqui terminando esta etapa da minha vida, obrigada por tudo pais amados.

Este artigo foi elaborado segundo as normas da revista *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* apresentadas em anexo, na qualidade de “Artigo Original”. Adequações serão elaboradas após as correções e sugestões da banca revisora.

## **Aplicação das Técnicas de HPLC e FIE na Triagem Neonatal de $\alpha$ -talassemia em amostras de Sangue Seco em Papel Filtro**

Yasmini Dandara Silva da Silva<sup>1</sup>, Juliana Longo Macedo<sup>2</sup>, Vera Regina Diedrich<sup>2</sup>, Simone Martins de Castro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup>Serviço de Referência de Triagem Neonatal, Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, Porto Alegre, RS, Brasil

Autor correspondente:

Prof<sup>a</sup> Dra. Simone Martins de Castro

Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Avenida Ipiranga, 2752, sala 304B, Porto Alegre, RS, Brasil. CEP 90.610-000

E-mail: simonecastro13@gmail.com

## Resumo

**Introdução:** A  $\alpha$ -talassemia engloba todas as condições nas quais há um déficit na produção das cadeias  $\alpha$  globínicas da hemoglobina. Para triagem neonatal, os métodos de escolha mais utilizados são a focalização isoelétrica (FIE) e o HPLC. Frente à dificuldade, baixa sensibilidade e especificidade das técnicas disponíveis para o diagnóstico de  $\alpha$ -talassemia na triagem neonatal é essencial o aperfeiçoamento e o conhecimento da capacidade de detecção de  $\alpha$ -talassemia das técnicas já existentes.

**Objetivos:** Avaliar o método de HPLC e FIE na triagem neonatal de  $\alpha$ -talassemia em amostras de sangue seco em papel filtro.

**Métodos:** Foram analisados os resultados dos exames de recém-nascidos (RN). As amostras de sangue seco capilar em papel filtro dos RNs para triagem neonatal foram analisadas através dos métodos de HPLC e FIE. Após triagem, os RNs foram atendidos no ambulatório e submetidos a análises confirmatórias em sangue total, através das seguintes metodologias: hemograma, HPLC e estudo molecular. O teste molecular foi utilizado como padrão ouro na detecção de  $\alpha$ -talassemia para todas as amostras analisadas. Foram estabelecidos dois grupos com e sem  $\alpha$ -talassemia. Os resultados obtidos foram expressos através de análises estatísticas.

**Resultados:** No hemograma os parâmetros que apresentaram diferença significativa entre os grupos foram os valores de eritrócitos, HCM, CHCM e VCM. Entre as três técnicas avaliadas, as três apresentaram diferença significativa entre os dois grupos. Os valores de área sobre a curva foram de: HPLC PF 0,862; FIE (0,855) e HPLC ST (0,811). Os valores de sensibilidade e especificidade foram de: HPLC PF 91,7% e 70,6%; FIE 100% e 76,5% e HPLC ST 95,8% e 64,7%, respectivamente. Na análise do índice kappa os valores obtidos foram: quando três testes positivos o índice kappa foi de 0,718, dois testes positivos 0,604 e quando somente um teste positivo foi de 0,595.

**Conclusões:** Os métodos analisados apresentaram ótimos valores de acurácia, sensibilidade e especificidade. O HPLC não pode ser utilizado como diagnóstico definitivo, porém, pode auxiliar na triagem neonatal. Para futuros estudos, um aumento no valor do n amostral deve ser levado em consideração.

**Palavras-Chave:** Anemia, Hemoglobinopatias,  $\alpha$ -talassemia, Triagem neonatal, FIE, HPLC.

## Abstract

**Introduction:** The  $\alpha$ -thalassemia encompasses all conditions in which there is a deficit in the production of  $\alpha$  globin chains of hemoglobin. For neonatal screening, the most frequent used methods are the isoelectric focusing (IEF) and the HPLC. In face of the difficulty, low sensitivity and specificity of the techniques available for the diagnosis of  $\alpha$ -thalassemia in neonatal screening is essential for improvement and the knowledge of the detection capability of  $\alpha$ -thalassemia of existing techniques.

**Objectives:** Evaluate the HPLC method and IEF in neonatal screening of  $\alpha$ -thalassemia in samples of dried blood on filter paper.

**Methods:** Were analyzed the results of examinations of newborns (NB). Capillary blood samples of the NB's for neonatal screening were analyzed through HPLC methods and FIE. After, the NB were treated in the outpatient clinic and submitted to confirm analyzes in whole blood, through following methodologies: hemogram and HPLC. Molecular test was used as the gold standard for all the samples tested. The results obtained were expressed through statistical analyzes.

**Results:** The hemogram parameters which presented significant difference were the values of erythrocytes, HCM, CHC and VCM. Among the three techniques evaluated the three showed significant difference between the two groups. The values of area under the curve were: 0.862; IEF HPLC PF (0.855); HPLC ST (0.811). The sensitivity and specificity values were: 91.7% PF HPLC and 70.6%; 100% FIE and 76.5% and 95.8% HPLC ST and 64.7%, respectively. In the analysis of the Kappa index values obtained were: when three positive tests the kappa index was of 0, 718, two positive tests 0, 604 and only when a positive test was 0, 595.

**Conclusions:** The methods analyzed showed great values of accuracy, sensitivity and specificity. The HPLC cannot be used as a definitive diagnosis, however, can assist in neonatal screening. For future studies, an increase in the value of the small sample size should be taken into consideration.

**Key words:** Anemia, Hemoglobinopathies,  $\alpha$ -thalassemia, Neonatal screening, IEF, HPLC.



## Introdução

As hemoglobinopatias são as anemias hemolíticas intrínsecas hereditárias mais comuns no mundo. Este grupo de doenças é causado por mutações nos genes da globina humana e são classificadas como, hemoglobinopatias estruturais ou talassemias <sup>(1)</sup>.

Nas hemoglobinopatias estruturais, ocorre alteração estrutural na cadeia globínica da hemoglobina, como substituições, inserções ou deleções, gerando assim, hemoglobinas variantes como, por exemplo, hemoglobina S e hemoglobina C, que apresentam maior prevalência com significado clínico <sup>(2)</sup>.

As talassemias são doenças em que ocorre uma diminuição parcial ou total da expressão de uma das duas cadeias de globina da molécula de hemoglobina, sendo denominadas quando a deficiência ocorrer na síntese de cadeia  $\alpha$  ( $\alpha$ -talassemia) ou de cadeia  $\beta$  ( $\beta$ -talassemia) <sup>(3,1)</sup>. O grupamento dos genes alfa inclui quatro genes funcionais e três pseudogenes <sup>(4)</sup>. Uma pessoa normal tem quatro genes alfa, sendo dois herdados do pai e os outros dois da mãe <sup>(5)</sup>. Por ser uma doença em que os genes das cadeias alfa ou beta podem ser afetados em diferentes níveis, a talassemia pode apresentar-se de forma leve, em que não ocorre anemia no portador, até formas mais graves em que se tem volume corpuscular médio (VCM) diminuído e anemia que pode ser de leve a grave. O desequilíbrio causado pela diminuição da expressão de uma das cadeias causa maturação anormal dos eritrócitos, resultando em microcitose que, juntamente com a anemia deve alertar para um possível diagnóstico de talassemia <sup>(3, 6)</sup>.

A  $\alpha$ -talassemia engloba todas as condições nas quais há um déficit na produção das cadeias  $\alpha$  globínicas da hemoglobina <sup>(7)</sup>. A subprodução das cadeias de  $\alpha$ -globina origina um excesso de cadeias globínicas do tipo  $\beta$  que formam os tetrâmeros de  $\gamma_4$ , denominados Hb Bart's (na vida fetal) e tetrâmeros de  $\beta_4$ , denominados Hb H (na vida adulta) <sup>(8)</sup>. A  $\alpha$ -talassemia é o transtorno genético mais comum da síntese de Hb no mundo. Ela resulta de um desequilíbrio na produção da cadeia  $\alpha$ -globínica (HBA1 e HBA2), que pode ser reduzida ( $\alpha^+$ -talassemia) ou completamente ausente ( $\alpha^0$ -talassemia) <sup>(3)</sup>. Mais comumente a  $\alpha$ -talassemia resulta da deleção de um ( $-\alpha$ ) ou de ambos ( $--$ ) os genes  $\alpha$  ( $\alpha\alpha$ ) <sup>(9)</sup>. Existem duas deleções que são as mais comumente encontradas na talassemia  $\alpha^+$ . A deleção  $\alpha^{3.7}$  kb de

DNA ( $-\alpha^{3,7}$ ), sendo esta mais comum na regiões africana e mediterrânea, e a deleção  $-\alpha^{4,2}$  encontrada nas populações asiática e mediterrânea <sup>(7,9)</sup>.

No Brasil, a prevalência de  $\alpha$ -talassemia está relacionada com as múltiplas diferenças étnicas que compõe o país, sendo cada uma específica de sua região. A  $-\alpha^{3,7}$  é o tipo padrão predominante no país <sup>(8,9)</sup>.

Os fenótipos clínicos relacionados à  $\alpha$ -talassemia são muito variáveis, desde portadores assintomáticos a portadores que apresentam uma forma letal da doença. Portadores de traço talassêmico apresentam anemia hipocrômica e microcítica leve à moderada, geralmente não apresentando sintomas comuns em anemias graves, ou podem ser assintomáticos <sup>(7)</sup>. A deleção de três genes alfa resulta na doença da hemoglobina H<sup>(11)</sup>. Os pacientes portadores dessa forma apresentam 25% a 50% de hemoglobina Bart's ao nascimento e 5% a 30% de hemoglobina H na vida adulta e necessitam de acompanhamento médico <sup>(11,7)</sup>. A deleção de quatro genes alfa leva a condição mais severa e letal de talassemia, conhecida como hidropsia fetal. Crianças afetadas por esta forma de talassemia apresentam anemia grave, sendo que os portadores de hidropsia fetal quase sempre morrem durante o período intrauterino (23-38 semanas) ou logo após o nascimento <sup>(8)</sup>.

Existem alguns métodos de triagem e diagnóstico utilizados para o diagnóstico da  $\alpha$ -talassemia, tais como: 1-Avaliação do hemograma: em geral, pacientes com  $\alpha$ -talassemia apresentam anemia hipocrômica e microcítica resultantes da deficiência da síntese de hemoglobina (Hb) <sup>(8)</sup>; 2-Eletroforese por focalização isoelétrica (FIE): teste auxiliar na pesquisa de Hb variantes raras. Esta técnica permite a separação de frações muito próximas através de um gradiente de pH, até a Hb alcançar seu ponto isoelétrico <sup>(3)</sup>; 3-Eletroforese capilar: esta técnica baseia-se no princípio da eletroforese capilar em solução livre. Utilizada para quantificação de Hb variantes, Hb F, Hb A e Hb A<sub>2</sub>. A quantificação de Hb H nesta técnica só é possível na presença de três deleções da alfa globina <sup>(12)</sup>; 4-A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC): técnica utilizada para quantificação de Hb variantes, Hb F e Hb A<sub>2</sub>. Apesar de não ser possível a quantificação de Hb H nesta técnica, existe um indicativo de que a Hb H apresenta uma banda facilmente detectável no cromatograma (denominada banda "Fast"), sugerindo destaforma a presença de  $\alpha$ -talassemia<sup>(10)</sup>; 5- A técnica de Multiplex-GAP-PCR foi desenvolvida para identificar as deleções de  $\alpha$ -talassemia mais comuns

em nosso meio. Um resultado positivo indica presença de  $\alpha$ -talassemia, ou seja, alteração genética que resulta na diminuição ou ausência da síntese de cadeia alfa globínica. Um resultado positivo significa uma  $-\alpha^{3,7}$  entre genes  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  (3,10).

Para triagem neonatal, os métodos de escolha mais utilizados são a focalização isoelétrica (12) e o HPLC(13). Mais recentemente a eletroforese capilar (CE) tem sido introduzida nas rotinas laboratoriais (14). Contudo, em todos estes casos, a suspeita na triagem deve ser confirmada através de uma identificação a nível protéico ou molecular (15).

O diagnóstico e o tratamento precoces dessas hemoglobinopatias têm proporcionado aos profissionais, que acompanham crianças portadoras, um melhor conhecimento e manejo sobre a doença, aumentando significativamente a sobrevivência e a qualidade de vida de seus portadores, diminuindo suas sequelas e atenuando suas complicações clínicas (16, 17).

Frente à dificuldade, baixa sensibilidade e especificidade das técnicas disponíveis para a triagem e o diagnóstico de  $\alpha$ -talassemia na triagem neonatal, é essencial o aperfeiçoamento e o conhecimento da capacidade de detecção de  $\alpha$ -talassemia das técnicas já existentes. Portanto, é um desafio definir com precisão um ponto de corte de seleção para o diagnóstico clínico de diferentes genótipos de talassemia. No período neonatal, as quantidades de hemoglobina de interesse podem estar significativamente reduzidas, devido à interação de outros locus de globina. Portanto, este trabalho tem por objetivo avaliar o método de HPLC e FIE na triagem neonatal de  $\alpha$ -talassemia em amostras de sangue seco em papel filtro.

## **Materiais e Métodos**

### Delineamento e recrutamento da amostra

Foram analisados os resultados dos exames de recém-nascidos (RN) atendidos pelo Sistema Único de (SUS), rastreados no Laboratório de Referência em Triagem Neonatal do Rio Grande do Sul, e em investigação no ambulatório do Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) para  $\alpha$ -talassemia, no período de maio a outubro de 2017. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas.

### Metodologias

As amostras de sangue capilar seco dos recém-nascidos obtidas em papel filtro (S&S) para triagem neonatal de hemoglobinopatias foram analisadas através dos métodos de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC; *Bio-Rad Variant Hemoglobin Testing System-Sickle Cell Short Program*) e Focalização Isoelétrica (FIE; *Perkin Elmer*). Após os procedimentos de triagem neonatal em papel filtro, os pacientes foram atendidos no ambulatório e submetidos a análises confirmatórias em sangue total, através das seguintes metodologias: Hemograma completo realizado em contador automatizado de células (ABX Pentra XL 80), com posterior visualização em distensão sangüínea para visualização de outras possíveis alterações citológicas de série vermelha. Eletroforese de hemoglobina para as análises das frações hemoglobínicas em sangue total com EDTA por um sistema automatizado de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) (*Bio-Rad VARIANT II™ - Beta Thal Short Program*).

Para este estudo (conforme orientação dos fabricantes), o ponto de corte da banda “Fast” foi definido em 10% para HPLC em papel filtro e no HPLC em sangue total. A hemoglobina Bart’s é instável e sua liberação, quando presente, aparece antes do primeiro minuto de eluição, e por esta razão não é considerada nos marcadores dos tempos de retenção.

Na FIE a presença de bandas com Ponto Isoelétrico (PI) de 6,13 a 6,51 foram definidas como positivas para Hb Bart’s, independente de sua concentração. Segundo o fabricante, bandas acima de 1% nesta região são sugestivas de presença para Hb Bart’s.

Os estudos moleculares foram realizados após a extração do DNA genômico por técnicas “*in house*” ou por kits comercialmente disponíveis, dependendo da quantidade e qualidade do material obtido. O teste molecular foi utilizado como padrão ouro para todas as amostras testadas, conforme PCR multiplex descrito por Tan et al., (2001) <sup>(18)</sup> e foram rastreados para  $\alpha^{3.7}$ . As amostras foram classificadas como: normais, heterozigotas ou homozigotas para a deleção estudada.

### Análise Estatística

Os resultados foram expressos através de medidas estatísticas descritivas, tais como tabelas, gráficos, média, mediana, desvio padrão e coeficiente de variação. Os dados obtidos foram plotados e organizados em planilha do Microsoft Office Excel®2007. A análise estatística foi realizada através do programa *Statistical Package for the Social Sciences* 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Valores de p bilateral menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. A sensibilidade e especificidade e ponto de corte de hemoglobinas variantes presentes nas três metodologias avaliadas foram analisadas através de curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Para análise estatística também foi realizado teste U de Mann-Whitney e análise de concordância através de índice kappa.

### Resultados

Foram analisados os resultados do perfil hemoglobínico de amostras de sangue seco em papel filtro, coletados na primeira semana de vida de 44 RNs. A idade mediana dos bebês no momento da triagem foi de 5 dias e dos estudos confirmatórios em sangue total foi de 35 dias, variando de 14 a 224 dias. As amostras foram divididas em dois grupos a partir do resultado da pesquisa molecular. Grupo positivo para RN que apresentaram  $\alpha^{3.7}$  na forma heterozigota ou homozigota e grupo negativo para RN que não apresentaram a  $\alpha^{3.7}$ .

A tabela 1 mostra a média e mediana dos parâmetros avaliados entre os dois grupos de RN com e sem suspeita de  $\alpha$ -talassemia e submetidos aos estudos confirmatórios em sangue total.

**Tabela 1.** Dados descritivos do hemograma e das porcentagens de banda “Fast” em HPLC em amostra de sangue seco em papel filtro e sangue total dos pacientes e porcentagens das bandas em IEF.

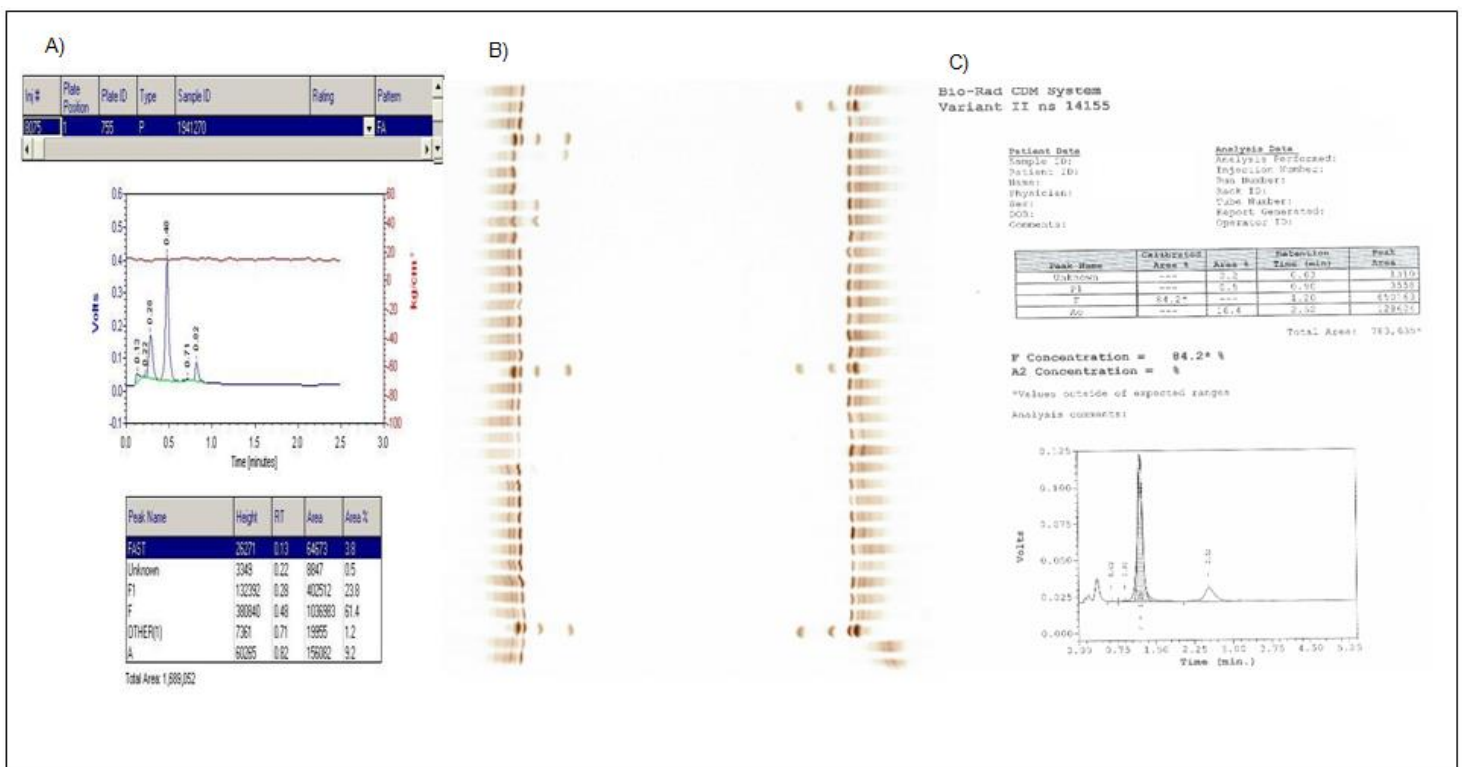
	<b>-<math>\alpha^{3.7}</math> positivo</b> <b>(homozigoto/heterozigoto)</b> <b>Média <math>\pm</math> SD</b>	<b>-<math>\alpha^{3.7}</math> negativo</b> <b>Média <math>\pm</math> SD</b>	<b>P valor</b>
Eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ )	4,14 ( $\pm 0,59$ )	3,62 ( $\pm 0,74$ )	0,014
Hematócrito (%)	32,24 ( $\pm 4,3$ )	33,45 ( $\pm 4,99$ )	0,395
Hemoglobina (g/dL)	10,24 ( $\pm 1,16$ )	11,01 ( $\pm 1,70$ )	0,114
HCM (pg)	24,76 ( $\pm 1,52$ )	30,92 ( $\pm 3,71$ )	0,000
VCM (fL)	77,96( $\pm 4,18$ )	93,46( $\pm 10,56$ )	0,000
	Mediana (P25-P75)	Mediana (P25-P75)	
CHCM	31,73 (31,40-32,25)	33,02 (31,40-32,25)	0,000
RDW (%)	14,30 (13,30-14,85)	14,05 (13,50-14,95)	0,488
HPLC FAST PF (%)	13,25 (12,40-14,42)	0,00 (0,000-12,40)	0,000
FIE (%)	9,50 (7,37-17,1)	0,00 (0,00-5,000)	0,000
HPLC FAST ST (%)	18,45 (15,68-19,13)	3,85 (0,00-16,77)	0,003

Legenda: HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; RDW: *red cell distribution width* PF: papel filtro; ST: sangue total.

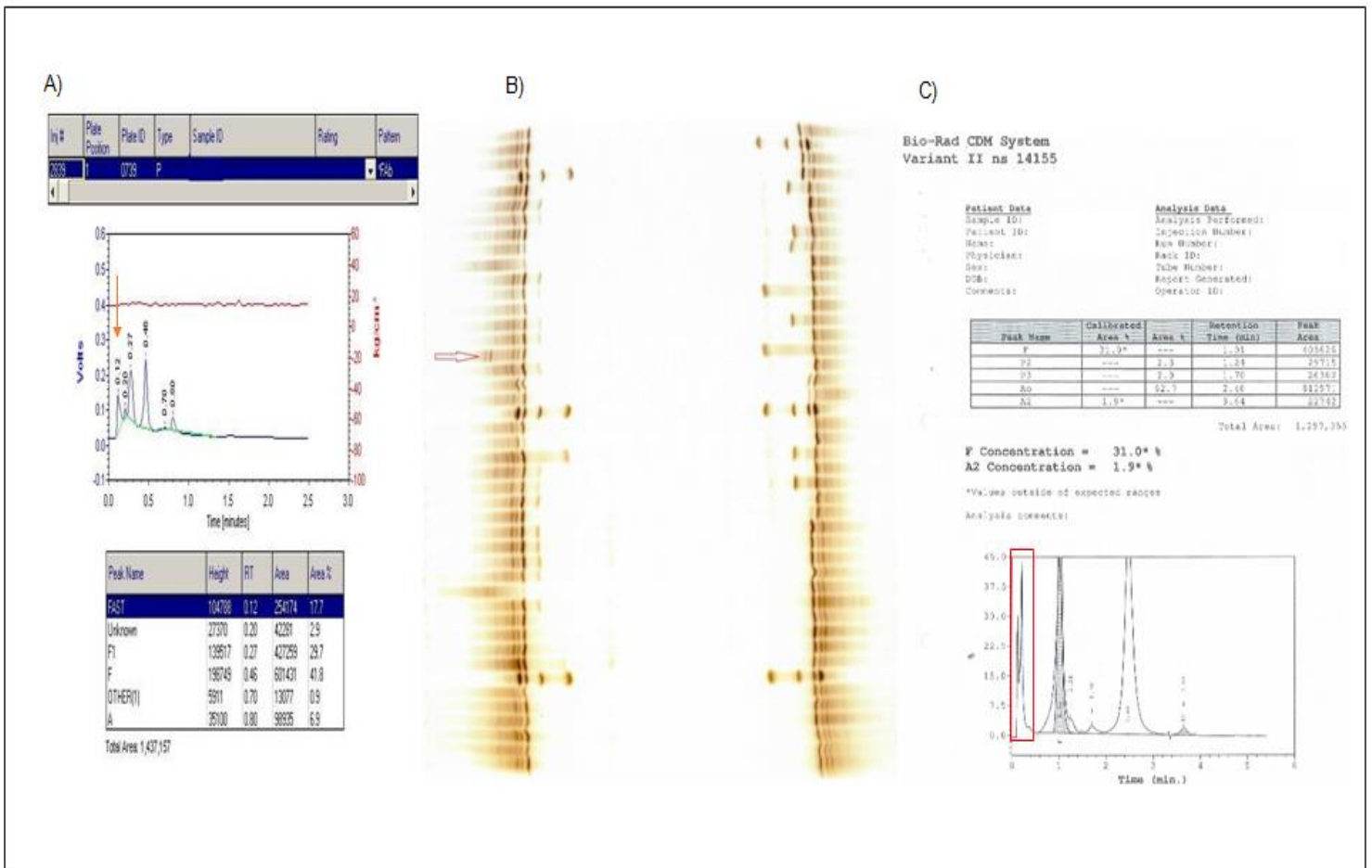
Entre os parâmetros analisados do hemograma, os que apresentaram diferença significativa entre os dois grupos foram os valores de eritrócitos, HCM,

CHCM e VCM (Tabela 1 e Figura3). Entre as três técnicas avaliadas para detecção de frações hemoglobínicas características de  $\alpha$ -talassemia, as três técnicas apresentaram diferença significativa entre grupo positivo e negativo (Tabela 1 e Figura 4).

A Figura 1 apresenta os gráficos de um paciente com estudo molecular negativo para  $\alpha$ -talassemia analisado no estudo, mostrando os resultados das análises do HPLC em papel filtro, sangue total, FIE. A figura 2 apresenta os mesmos gráficos para um paciente com estudo molecular positivo homozigoto para  $\alpha$ <sup>3.7</sup>.

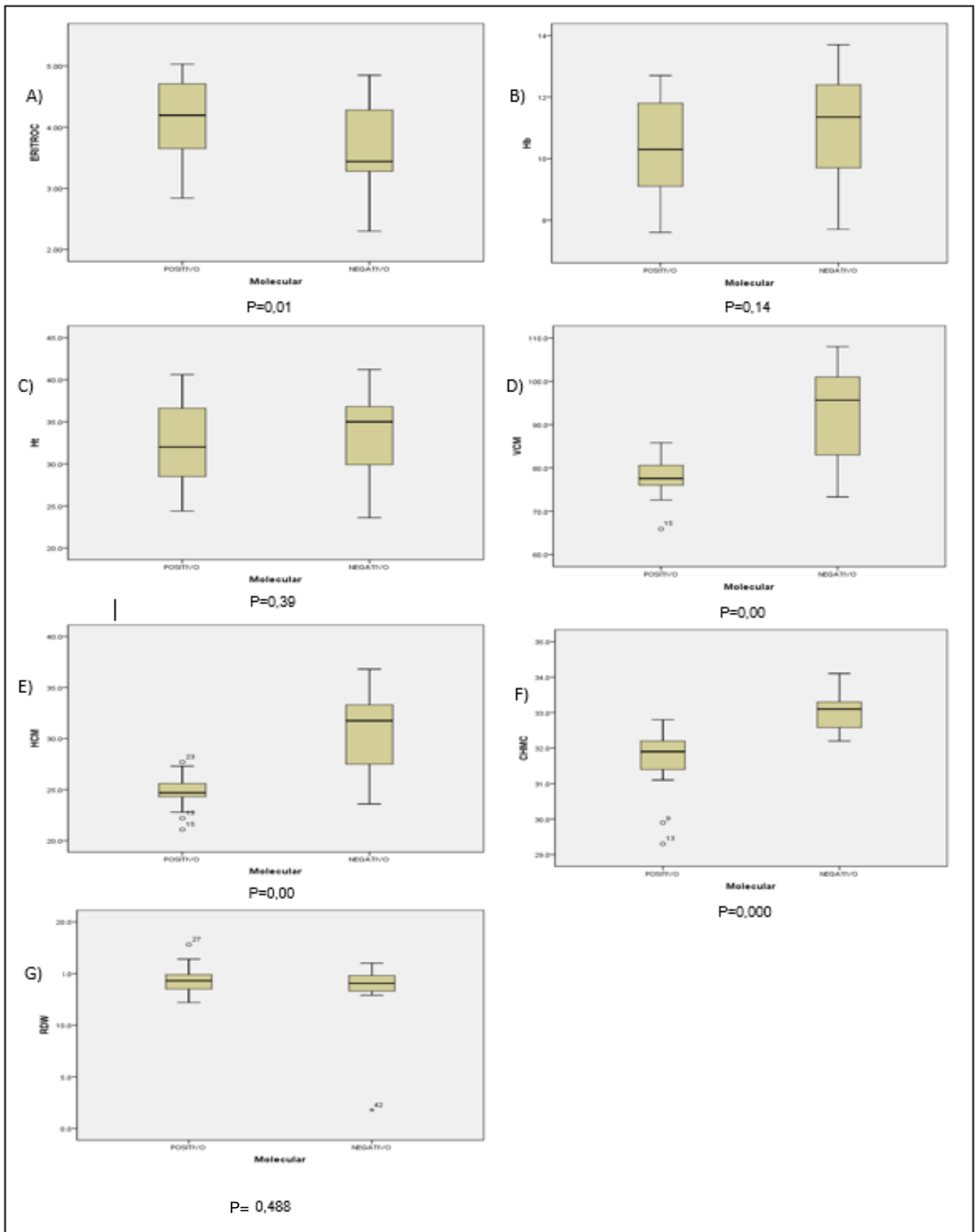


**Figura 1.** Gráfico dos resultados de HPLC e FIE de pacientes negativos para detecção da mutação do tipo  $\alpha$ <sup>3.7</sup> em dois alelos (forma homozigota) do gene HBA1. Imagem A apresentando resultado em HPLC PF, imagem B apresentando resultado para FIE e imagem C apresentando resultado para HPLC ST.

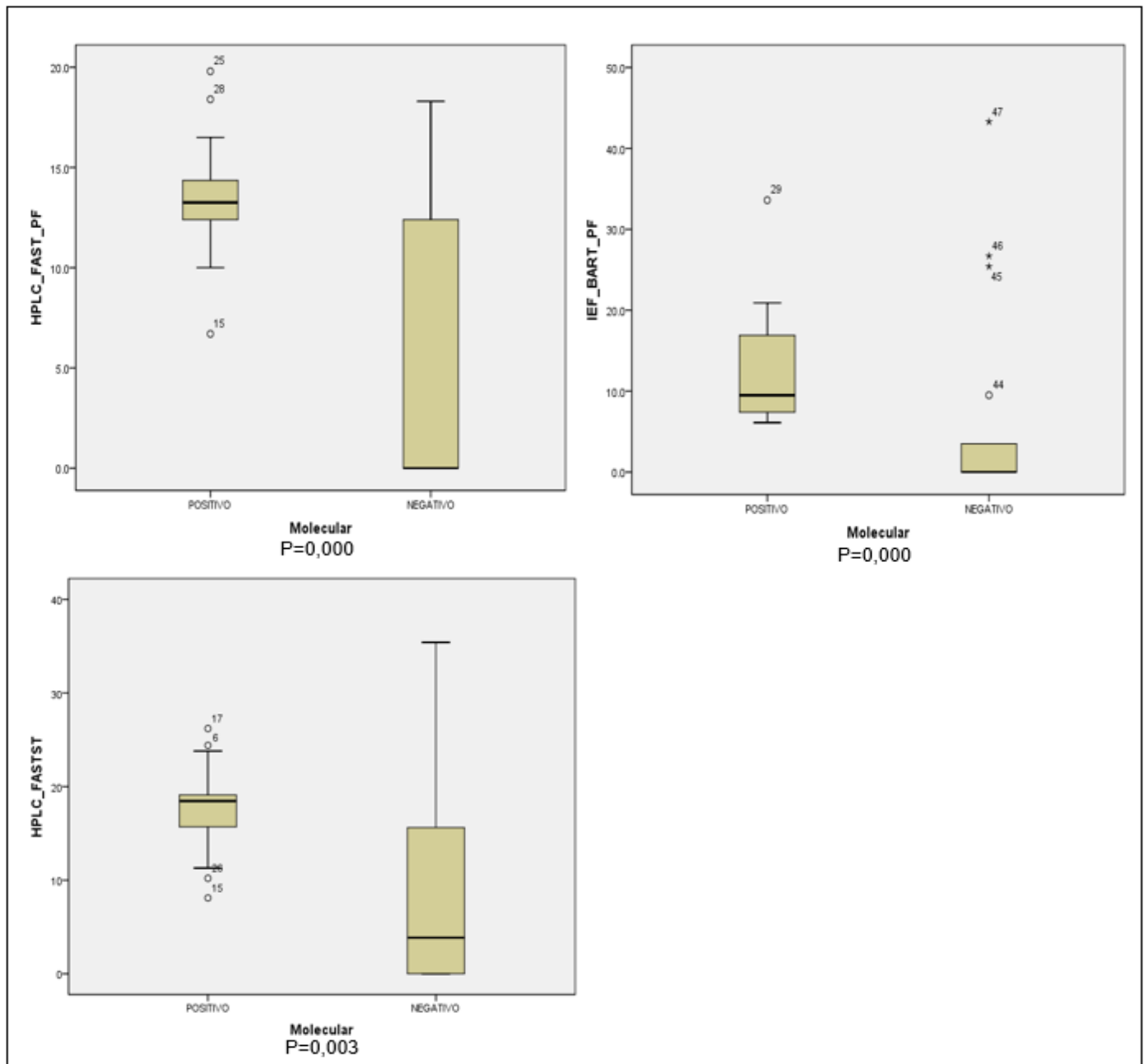


**Figura 2.** Gráfico dos resultados de HPLC e FIE de pacientes positivos para detecção da mutação do tipo- $\alpha^{3.7}$  em dois alelos (forma homozigota) do gene HBA1. Imagem A apresentando resultado em HPLC PF. (Seta laranja indicando a presença de pico “Fast” no cromatograma); imagem B apresenta resultado para FIE (seta vermelha indicando a presença de bandas indicativas de Hb Bart’s) e imagem C apresentando resultado para HPLC ST (marcado em vermelho a presença de pico “Fast”).



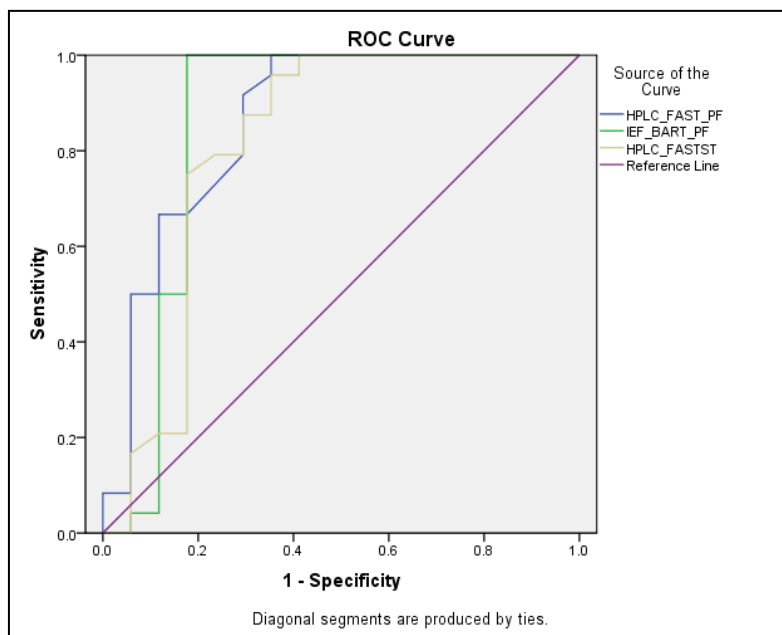


**Figura 3.** Boxplot comparativo entre grupo positivo e negativo para os parâmetros do hemograma. Valores significativos foram considerados quando valor de  $P < 0,05$ . Diferença significativa para (A), (D), (E) e (F).



**Figura 4.** Boxplot comparativo entre controle positivo e negativo para HPLC PF, HPLC ST e FIE. Valores significativos foram considerados quando valor de  $P < 0,05$ . Diferença significativa para (A), (B) e (C).

O gráfico da curva ROC está representado na Figura 5. Os valores de área sob a curva (AUC) e seus respectivos intervalos mínimos e máximos estão representados na Tabela 2. A Tabela 3 traz os valores de ponto de corte definidos no estudo para análise da sensibilidade e especificidade.



**Figura 5.** Curva ROC para análise de acurácia dos métodos HPLC PF, HPLC ST e FIE.

**Tabela 2.** Valores de área sob a curva (AUC) e seus respectivos intervalos mínimos e máximos.

	AUC	Intervalo de confiança (95%)
HPLC PF	0,862	0,735 –0,988
FIE PF	0,855	0,683 –1,000
HPLC ST	0,811	0,651 –0,971

**Tabela 3.** Sensibilidade e especificidade nos pontos de corte definidos pelo fabricante.

	Ponto de corte	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
HPLC PF	10,3%	91,7	70,6
FIE PF	1,7	100	76,5
HPLC ST	9,25	95,8	64,7

Quando analisamos o índice kappa no grupo positivo das três metodologias empregadas na triagem neonatal de  $\alpha$ -talassemia, definiu-se três grupos para análise de concordância entre as técnicas, foram estes: grupo 1 em que tínhamos pelo menos uma metodologia positiva para diagnóstico; grupo 2 com pelo menos duas técnicas positivas e grupo 3 em que todas as técnicas foram positivas. Os valores obtidos foram: quando três testes positivos para a presença de  $\alpha$ -talassemia o índice kappa foi de 0,718; quando somente dois resultados foram positivos o índice foi de 0,604 e quando somente um teste foi positivo o índice foi de 0,595. Valores maiores que 0,75 representam excelente concordância. Valores abaixo de 0,40 representam baixa concordância e valores situados entre 0,40 e 0,75 representam concordância mediana.

## Discussão

O diagnóstico de  $\alpha$ -talassemia na triagem neonatal apresenta desafios devido à baixa sensibilidade e especificidades das técnicas disponíveis. A hemoglobina Bart's é instável e amostras de sangue seco em papel filtro apresentam hemoglobinas oxidadas, dificultando sua detecção. Portanto, é essencial avaliar a acurácia das metodologias empregadas nas rotinas laboratoriais quanto à capacidade de detectar pacientes com  $\alpha$ -talassemia no período neonatal <sup>(19)</sup>.

Sabe-se que o hemograma de portadores de  $\alpha$ -talassemia pode apresentar determinadas características como hemoglobina diminuída, VCM diminuído e CHCM e/ou HCM diminuído <sup>(8)</sup>. Nossos resultados apresentaram diferenças significativas

( $p < 0,05$ ) para os parâmetros eritrócitos, VCM, CHCM e HCM (Figura 3) entre os grupos estudados. A hemoglobina e o hematócrito não apresentaram diferença significativa entre os dois grupos (Figura 3). O hemograma de RN apresenta dificuldades na interpretação até aproximadamente os três primeiros meses de vida<sup>(20)</sup>, o que dificulta a interpretação dos resultados. Sendo assim, não podemos afirmar que, as alterações observadas são associadas à presença de  $\alpha$ -talassemia, pois os índices de normalidade apresentados no hemograma apresentam grande variação no primeiro trimestre de vida.

A  $\alpha$ -talassemia é uma doença muito comum no nosso meio. Na população brasileira, acredita-se que a prevalência de portadores silenciosos seja de 10% a 20% e de portadores de traço talassêmico seja de 1 a 3%. Em indivíduos afro-descendentes há um aumento da prevalência da doença para 20% a 25%<sup>(11)</sup>. Apesar da alta frequência de  $\alpha$ -talassemia, essa é uma doença de difícil diagnóstico, pois as técnicas de triagem utilizadas apresentam limitações, como na FIE em que pequenas concentrações da hemoglobina Bart's são dificilmente detectadas no ensaio e a hemoglobina H na vida adulta é facilmente proteolisada, dificultando desta forma o diagnóstico<sup>(11)</sup>. Por estes motivos, é essencial que novas técnicas sejam desenvolvidas validadas para auxiliar no diagnóstico de  $\alpha$ -talassemia.

Entre os métodos HPLC PF, HPLC ST e FIE observou-se uma diferença significativa dos valores de mediana entre grupo positivo e negativo (Tabela 1). No entanto, ao observar os resultados (Figura 2) referentes a cada método, é possível notar que algumas amostras do controle negativo para  $-\alpha^{3,7}$  apresentaram picos "Fast" tanto no HPLC em papel filtro quanto no HPLC em sangue total e bandas na FIE, sugerindo resultados falsos positivos para estas metodologias. Sabe-se que a  $\alpha$ -talassemia resulta frequentemente da supressão de um ou ambos os alelos (HBA1 e HBA2)<sup>(10)</sup>. Mais raramente, as mutações pontuais em regiões críticas desses genes podem causar  $\alpha$ -talassemia não relacionada com deleção. Hoje mais de quarenta tipos de deleções já foram descritas, sendo as mais comuns  $-\text{SEA}$  (sudeste asiático) e  $-\text{MED}$  (mediterrâneo) na  $\alpha^0$  e para  $\alpha^+$  mais de dez diferentes tipos de deleções foram relatadas, sendo as mais comuns  $\alpha^{+3,7}$  e  $\alpha^{+4,2}$ .<sup>(21)</sup> Ou seja, estudo molecular negativo para  $-\alpha^{3,7}$  não exclui a possibilidade de presença de  $\alpha$ -talassemia, pois nem todas as deleções/mutações foram avaliadas neste estudo.

Outro fator que pode interferir na interpretação dos resultados, gerando resultado falso positivo é a viabilidade das amostras em papel filtro. O sangue seco em papel filtro apresenta produtos de degradação que dificultam a quantificação adequada das frações hemoglobínicas presentes na amostra. O papel filtro pode apresentar interferentes na sua composição ou problemas resultantes da fase pré-analítica, como ressecamento que podem levar as amostras a apresentar picos e bandas inespecíficas decorrentes de hemoglobina oxidada ou degradada <sup>(20,22)</sup>.

A curva ROC foi realizada para determinação da acurácia das três metodologias avaliadas individualmente (Figura 5). A acurácia avalia a proporção de predições corretas, sem levar em consideração o que é positivo e o que é negativo. Valores acima de 80% representam um teste de ótima acurácia. Os três métodos demonstraram uma ótima acurácia (86,25%, 85,5%, 81,1%) na capacidade de detecção da  $\alpha$ -talassemia em amostras de sangue seco e sangue total.

O ponto de corte definido em 10% para as técnicas em HPLC é baseado nas orientações dos fabricantes dos equipamentos. Diferentes estudos podem apresentar diferentes pontos de corte como para Bouva et. al (2011) <sup>(23)</sup> em que o ponto de corte do estudo foi definido em 20% em HPLC para triagem neonatal.

Segundo orientação do fabricante do equipamento FIE utilizado neste estudo, bandas acima de 1% com PI entre 6,13 e 6,51 são consideradas sugestivos para presença de hemoglobina Bart's e positivas para  $\alpha$ - talassemia. Os valores de PI podem ser variáveis, como para Jindatanmanusan et al. (2013)<sup>(19)</sup> onde foram detectadas hemoglobina Bart's com bandas de movimentos rápidos com PI entre 6,0 e 6,40 sugerindo desta forma  $\alpha$ - talassemia. Além da possibilidade de quantificação da hemoglobina Bart's e definição de PI na técnica, alguns estudos mostram que o nível das bandas observadas se correlaciona com as síndromes. Segundo o manual do fabricante, percentuais de banda entre 1% e 3% é sugestivo para portador silencioso, 3% a 10% para traço talassêmico, 20% a 30% para doença da Hb H e 100% em hidropsia fetal.

A modificação dos pontos de corte nas três técnicas causa alteração nos valores de sensibilidade e especificidade dos métodos. Um aumento do valor do ponto de corte gera uma diminuição da sensibilidade e aumento da especificidade, já a diminuição do ponto causa um aumento da sensibilidade e uma diminuição da

especificidade. Quando valores de sensibilidades são aumentados, temos como consequência maior chance de resultados falsos positivos, ou seja, os pacientes podem apresentar bandas nas técnicas estudadas, porém, podem não apresentar  $\alpha$ -talassemia. Na triagem neonatal um resultado falso positivo é mais aceito que um resultado falso negativo, pois, estes pacientes serão chamados para exames confirmatórios.

O ponto de corte de 10% do nosso estudo para HPLC está adequado para atender a demanda da triagem neonatal, pois, apresenta sensibilidade e especificidade satisfatórias. A escolha do ponto de corte fica a critério do laboratório dentro das necessidades específicas de sua população analisada.

O coeficiente kappa foi utilizado para testar e descrever o grau de concordância (confiabilidade e precisão) entre as três metodologias avaliadas<sup>(24)</sup>. Observou-se que dentro do grupo positivo para  $\alpha$ -talassemia, quando tínhamos resultados positivos nas três metodologias, os valores de índice kappa foram mais satisfatórios do que quando tínhamos apenas duas ou uma metodologia positiva. Desta forma, é possível afirmar que, aumenta a precisão e as chances de um diagnóstico positivo de  $\alpha$ -talassemia quando empregamos associação de três metodologias.

## **Conclusão**

A  $\alpha$ -talassemia é uma doença que apresenta desafios para o seu diagnóstico, porém, por ser muito prevalente no nosso meio é de extrema importância a sua detecção, para que pacientes não sejam tratados de maneira incorreta. Os métodos analisados apresentaram ótimos valores de acurácia, sensibilidade e especificidade. A escolha do ponto de corte para análise de sensibilidade e especificidade fica a critério do serviço dentro dos seus objetivos de estudo. Quando obtivemos três metodologias positivas, notamos que ocorre um aumento de concordância nos resultados dos testes. O HPLC não pode ser utilizado como critério definitivo de diagnóstico, porém, a presença de picos “Fast” no cromatograma pode auxiliar na triagem neonatal e nos estudos confirmatórios. Um fator que deve ser levado em consideração, para futuros estudos, é um aumento do n amostral para que desta forma, se tenha uma melhor análise dos dados.

## Referências Bibliográficas

1. shang X, Xu X. Update in the genetics of thalassemia: what clinicians need to know. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 39. 2017; 3-15.
2. Sonati MF, Costa FF. Genética das doenças hematológicas: as hemoglobinopatias hereditárias. *J. Pediatr. (Rio J.)* 2008; vol.84 no.4 suppl.0 Porto Alegre Aug.
3. SABATH DE. Molecular Diagnosis of Thalassemias and Hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol* 2017; 148:6-15
4. Shaji RV, Eunice SE, Baidya S, Serivastava A, Chandy M. Determination of breakpoint and molecular diagnosis of common  $\alpha$ -Thalassaemia-1 deletion in the Indian population. *British Journal of Haematology*, 2003;123:942-947.
5. NAOUM PC. Talassemias alfa. In: NAOUM PC (eds.). *Hemoglobinopatias e talassemias*. São Paulo. Savier Ed. Livros Médicos, 1997:96-104.
6. Barros E, Dora JM, Xavier RM. *Laboratório na Prática Clínica- Consulta rápida*. Artmed, 2005.
7. Belisário AR, Viana MR. Alpha thalassemia effects on clinical and hematological manifestations of sickle cell disease: A systematic review. *Rev Med Minas Gerais* 2011; 21(3): 319-330.
8. Higgs DR, Hartevelde CL.  $\alpha$ -thalassaemia. *Hartevelde and Higgs Orph J of Rare Dis* 2010; 5:13.



9. Borges E, Wenning MR, Kimura EM, Gervásio SA, Costa FF, Sonati MF. High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Braz J Med Biol Res.* 2001 Jun;34(6):759-62.
10. Galanello R, Cao A. Alpha-thalassemia. *Genetics IN Medicine* February 2011; 13, 83–88. Volume 13, Number 2,
11. CANÇADO RD. Talassemias alfa. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2006; v.28, p.86-7.
12. Manual Sebia Capillarys HEMOGLOBINE ( E ) 2010/10.
13. Eastman JW. et al. Automated HPLC screening of newborns for sickle cell anaemia and other haemoglobinopathies. *Clinical Chemistry.* 1996; v.42, p.704–10.
14. Jenkins M, Ratnaike S. Capillary electrophoresis of haemoglobin. *Clinical Chemistry Lab* 2003; v.41, p.747–54.
15. Giordano PC. Starting neonatal screening for hemoglobinopathies in The Netherlands. *Journal of Clinical Pathology* 2009; v.62, p.18–21.
16. Silva KR, Yamaguchi UM. Os benefícios da inclusão das hemoglobinopatias na triagem neonatal. *Arquivos de Ciência da Saúde Unipar* 2007; v.11, p. 67-73.
17. Ramalho AS et. al. portaria nº822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 2003; v.19, p. 1195-9.

18. Tan GB, Aw TC, dustan RA Lee SH. Evaluation of high performance liquid chromatography for routine estimation of haemoglobins A<sub>2</sub> and F. *Journal of Clinical Pathology* 1993; v.46, p. 852-6.
19. Jindatanmanusan P, Riolueang S, Glomglao W. Diagnostic applications of newborn screening for  $\alpha$ -thalassaemias, haemoglobins E and H disorders using isoelectric focusing on dry blood spots. *Ann Clin Biochem.* 2014 Mar; 51(Pt 2):237-47.
20. Gonçalves J, Souza NMA, Hermes EM, Jesus CSC, Jordão MM Perfil hematológico dos neonatos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2010;32(3):219-224
21. Shang X, Xu X. Update in the genetics of thalassemia: what clinicians need to know. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 39 2017; 3-15.
22. Campbell M, Henthorn JS, Davies SC. evaluation of Cation-Exchange HPLC Compared With Isoelectric Focusing for Neonatal Hemoglobinopathy Screening. *Clinical Chemistry* 45:7 1999; 969-975
23. Bouva MJ, Sollaino C, Perseu L, et al. Relationship between neonatal screening results by HPLC and number of  $\alpha$ -thalassemia gene mutations; consequences for the cut-off value. *J Med Screen.* 2011;18(4):182-6.
24. Galan PR, Gaidzinski RR. Avaliando a confiabilidade interavaliadores de um instrumento para classificação de pacientes - coeficiente Kappa. *Rev Esc Enferm USP* 2003; 37(1): 72-80

## **Anexo I**

### **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**

#### **Instruções aos autores**

O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial ( JBPML), continuação do Jornal Brasileiro de Patologia, de periodicidade bimestral (fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro), é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML), da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) e da Sociedade Brasileira de Citopatologia (SBC). É indexado no Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), no Periodica e no Chemical Abstracts e é integrante da base de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO). Destina-se à publicação de trabalhos científicos que contribuam para o desenvolvimento da área de Medicina Laboratorial e aceita as seguintes categorias: artigos originais, de revisão, de atualização, experimentais, relatos de caso, comunicações breves e cartas aos editores. Os trabalhos podem ser submetidos nos idiomas português, inglês ou espanhol, mas o texto completo será publicado apenas em inglês, com resumo em português ou espanhol.

#### **ANÁLISE DOS TRABALHOS**

O manuscrito recebido será enviado para, pelo menos, dois avaliadores independentes, pares científicos, de renome e com conhecimento específico na área contemplada pelo artigo. Após análise pelos avaliadores, o editor-chefe do JBPML entrará em contato com o autor principal comunicando os passos a serem seguidos na aceitação do trabalho para publicação ou sua eventual rejeição.

#### **ÉTICA**

Estudos realizados com seres humanos, incluindo órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Quando pertinente, o trabalho deverá ter aprovação do comitê de ética da instituição onde foi realizada a pesquisa, em consonância com a Declaração de Helsinki, atualizada em 2008. Nos trabalhos experimentais envolvendo animais, devem ser respeitados os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as normas estabelecidas no Guide for Care and Use of Laboratory Animals

(Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C., atualizada em 2011). As drogas e substâncias químicas eventualmente utilizadas na realização do trabalho devem ser identificadas com precisão. Não devem ser utilizados nomes ou iniciais do paciente nem informados nomes comerciais, de empresas e/ou registros de hospitais.

## **RESPONSABILIDADE DA AUTORIA E CONFLITO DE INTERESSES**

De acordo com as diretrizes elaboradas pelo International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), atualizada em 2013, a autoria deve ser validada para: a) concepção e projeto do trabalho ou aquisição, análise e interpretação dos dados; b) redação inicial do artigo ou revisão crítica do seu conteúdo; c) aprovação final da versão para publicação; d) responsabilidade para todos os aspectos do trabalho, garantindo que questões relacionadas à acurácia ou integridade de qualquer parte do trabalho sejam adequadamente investigadas e analisadas. Todos os autores listados no artigo devem preencher os quatro critérios de validação de autoria para serem designados como tal. Os participantes do trabalho que não preencherem os quatro critérios devem ser incluídos na seção de Agradecimentos (Acknowledgements). O autor principal deve especificar a contribuição de cada um nas diferentes etapas do estudo.

Do mesmo modo, o autor principal deve declarar ou negar a existência de possíveis conflitos de interesse. Caso exista algum conflito, ele deve ser especificado como nota no final do artigo.

## **RESUMOS E UNITERMOS**

Independentemente do idioma no qual o trabalho foi escrito, devem constar dois resumos: um em português (Resumo) e outro em inglês (Abstract). Os resumos devem identificar os objetivos, os procedimentos e as conclusões do trabalho (máximo de 250 palavras para artigos originais, artigos de revisão e artigos de atualização; e máximo de 100 palavras para relatos de caso e comunicações breves). Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver um resumo também nesse idioma.

Os unitermos, palavras que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de três a seis, utilizando o vocabulário controlado Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da BIREME, acrescidos de outros termos, quando necessário. Devem

ser apresentados em português e inglês. Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver descritores também nesse idioma.

### **AGRADECIMENTOS**

Devem ser breves, diretos e dirigidos apenas à pessoa ou à instituição que contribuiu substancialmente para a elaboração do trabalho. Devem ser incluídos após as conclusões e antes das referências bibliográficas.

### **ESTRUTURA DO TEXTO**

#### Artigos originais

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original que possam ser replicados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

O uso de subtítulos é recomendado, particularmente na Discussão. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente apontadas. Sugere-se o detalhamento do tópico Material e Método. Para esses artigos, exige-se a apresentação de resumos estruturados em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O Abstract (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências bibliográficas devem aparecer no final do texto, obedecendo às normas especificadas a seguir

#### Comunicações breves

São relatos curtos que devem apresentar: 1) dados de estudos preliminares com achados sugestivos que garantam uma investigação mais definitiva; 2) estudos de replicação; e 3) estudos negativos de tópicos importantes. Esses artigos devem ter até 1.500 palavras, incluir resumo não estruturado e, no máximo, uma tabela ou figura, além das referências bibliográficas.

#### Artigos de revisão

Serão aceitos apenas mediante convite.

Avaliações críticas sistematizadas da literatura sobre determinado assunto, devem incluir conclusões e ter até 5 mil palavras. A organização do texto, com exceção de Introdução, Discussão e Conclusão, fica a critério do autor. Para esses artigos, exige-

se um resumo estruturado no idioma do texto e outro em inglês. Uma lista extensa de referências bibliográficas deve aparecer no final do texto.

#### Relatos de caso

São trabalhos de observações clinicolaboratoriais originais, acompanhados de análise e discussão. Devem conter até 1.500 palavras. A estrutura deve apresentar, no mínimo, os seguintes tópicos: Introdução, Relato(s) dos(s) caso(s) e Discussão. Incluir um resumo não estruturado no idioma do texto e outro em inglês.

#### Cartas aos editores

Inclui cartas que visam a discutir artigos recentes publicados na revista ou a relatar pesquisas originais ou achados científicos significativos. Cartas breves, com no máximo 500 palavras (incluindo referências, sem tabelas ou figuras), serão consideradas se estiver explícita a frase “para publicação”.

### **REFERÊNCIAS**

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, e ser numeradas sucessivamente pela ordem em que são mencionadas pela primeira vez no texto. Devem seguir as normas do Estilo Vancouver. Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo.

#### Exemplos:

- Artigos de periódicos (um só autor)  
Fry PH. O significado da anemia falciforme no contexto da ‘política racial’ do governo brasileiro 1995-2004. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2005; 12: 347-70. PubMed PMID: 16353330.

- Artigos de periódicos (até seis autores)  
Barbosa AJA, Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Lima GF Jr, Oliveira CA. Immunocytochemical identification of *Campylobacter pylori* in gastritis and correlation with culture. *Arch Pathol Lab Med*. 1988 May; 112(5): 523-5. PubMed PMID: 3282485.
- Artigos de periódicos (mais de seis autores)  
Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EN, et al. Indirect immunofluorescence determination of the frequency of anti-*H. pylori* antibodies in Brazilian blood donors. *Braz J Med Biol Res*. 1992; 25(7): 683-9. PubMed PMID: 1342599.
- Artigo de periódico on-line  
Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after femoral artery catheterization: a case-control study. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2006 Jan; 27(1): 34-7. Disponível em: <http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069.web.pdf>.
- Livros no todo (dois autores)  
Eyre HJ, Lange DP. *Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery*. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; 2002.
- Capítulos ou parte de livro editado por outro autor  
Mendenhall WM. Treatment of head and neck cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principles and practice of oncology*. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 729-80.
- Parte de livro em meio eletrônico  
São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. *Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente*. In: São Paulo (Estado). *Entendendo o meio ambiente*. São Paulo; 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>.
- Evento em meio eletrônico  
Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editores. *Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming*; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

- Tese ou dissertação  
Silva MAL. Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com doença falciforme. 2008. [dissertação]. Programa de pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
- Citações no texto  
Devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice). Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de um autor devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão et al., como, por exemplo, Higashi et al.

### **Tabelas e figuras**

As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993).

As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos etc.) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras. Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.

O SGP aceita a importação de tabelas, imagens e gráficos em arquivo eletrônico nos seguintes formatos: jpg, gif, psd, tif e png, e com resolução de no mínimo 300 dpi.

O direito à privacidade do paciente não deve ser infringido. Imagens que eventualmente permitam a identificação pessoal somente poderão ser utilizadas com consentimento por escrito do paciente ou responsável, quando da submissão do manuscrito

### **Abreviações e nomes de medicamentos**

As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não disponíveis para prescrição.



As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no Sistema Internacional (SI) entre parênteses.