



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

KARLLA GREICK BATISTA DIAS PENNA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
TALASSEMIA ALFA**

**Goiânia
2009**

KARLLA GREICK BATISTA DIAS PENNA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
TALASSEMIA ALFA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia, Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Goiás – UFG – para obtenção do Grau de Doutora em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus

**Goiânia
2009**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a): Karlla Greick Batista Dias Penna

Orientador (a): Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus

Membros:

1. Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus

2. Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz

3. Profa. Dra. Ellen Synthia Fernandes de Oliveira

4. Prof. Dr. Wagner Gouveia dos Santos

5. Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Suplentes

1. Prof. Dr. André Kipnes

2. Profa. Dra. Rosália Santos Amorim Jesuíno

3. Prof. Dr. Élson Alves Costa

Data: 27/03/2009

Tenho andado ao teu lado, junto a ti permanecido.
Eu te tenho em meus braços. Sou o teu melhor amigo.
Ninguém te ama como eu. Olhe pra cruz, essa é a minha grande prova.
Jesus Cristo

*Dedico este trabalho ao meu esposo
Alessandro, ao meu tão desejado filho, Pedro,
pelo amor, pela compreensão e pela torcida.*

*Aos meus pais, Manoel e Abadia, irmãos,
Márcio e Julianna e ao querido Felipe, pelo
apoio, carinho e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, por esta oportunidade de trabalho, pelos ensinamentos que tive e pela certeza de que sempre ESTEVE comigo.

Ao Alessandro pela confiança e incentivo e principalmente por compartilhar com tanto entusiasmo as minhas vitórias, mesmo no seu eterno silêncio.

Ao Pedro pelo carinho e pela alegria que trouxe a minha vida, e pelos diversos “eu te amo” inesperados.

Aos meus pais pelos ensinamentos essenciais que me fizeram um ser humano. Obrigada pelo exemplo de amor e bondade.

Aos meus irmãos que são meus eternos amigos pelo carinho e pela certeza do apoio de vocês. Ao Márcio, pelas traduções, pelas dicas e pelas inúmeras vezes que me salvou de problemas referentes à parte computacional.

Ao Felipe pela sua presença em nossas vidas que nos encheu de felicidade.

A Dona Dulcína e ao Alex, pelo carinho e compreensão durante os momentos difíceis.

A Universidade Federal de Goiás por possibilitar a execução deste trabalho.

A Universidade Católica de Goiás que contribuiu com grande parte do trabalho.

Aos sujeitos da pesquisa, que gentil e voluntariamente aceitaram participar, cedendo amostras de sangue para as análises, meu especial agradecimento.

Ao Prof. Dr. Luiz Artur que sempre me tratou como profissional não somente me orientando, mas trocando experiências e buscando uma relação de aprendizagem em todos os momentos.

Ao querido Dr. Ivan que generosamente me auxiliou cientificamente e pelo empréstimo de materiais importantes (a velha pipeta p10).

Ao Prof. Dr. Cirano pelo apoio e colaboração, cedendo gentilmente equipamentos e reagentes do Laboratório de Enzimologia, indispensáveis para a realização do presente trabalho.

Aos meus amigos da UCG: Bertin, Dédora, Flávia Ikeda, Karlinha, Mauro, Sérgio Nascente e Wilson pelos sábios e indispensáveis conselhos. Ao Francisco pela edição das figuras.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Enzimologia e do Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética: Valzinha, Roberto, Ana Flávia, Lilian, Marcela, Renata e Maria Isabel pelos momentos de descontração que passamos juntos e por proporcionarem momentos agradáveis no dia a dia.

Ao Prof. Paulo Roberto de Melo Reis, que sempre acreditou no meu sucesso e que me inseriu nesta linha de pesquisa.

Aos meus queridos vizinhos Kênia, Herbert, Juju, Oneida, Valdson, Cecília e João Paulo pelo carinho, companheirismo e pela torcida.

A todos, MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO GERAL	18
1. Hemoglobinas	18
2. Hemoglobinopatias	21
2.1. Hemoglobinas variantes mais frequentes	22
2.2. Talassemias	26
3. Hemoglobinopatia no Brasil	26
OBJETIVOS	29
CAPÍTULO I – DIFICULDADE NA DETECÇÃO LABORATORIAL DA TALASSEMIA ALFA	30
I. Introdução	30
II. Objetivos	36
III. Material e Métodos	37
IV. Resultados	43
V. Discussão	53
VI. Conclusões	67

CAPÍTULO II – DETECÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA TALASSEMIA ALFA POR MÉTODOS MOLECULARES	68
I. Introdução.....	68
II. Objetivos.....	78
III. Material e Métodos.....	79
IV. Resultados	89
V. Discussão.....	97
VI. Conclusões.....	106
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ANEXOS	118

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Hemoglobinas observadas durante o desenvolvimento ontogenético humano	19
TABELA 2. Síndromes alfa talassêmicas. Sinopse geral da relação entre deleção dos genes alfa e consequências fisiopatológicas.....	31
TABELA 3. Idade e sexo dos 64 pacientes	43
TABELA 4. Resultado do eritrograma das 64 amostras	45
TABELA 5. Amostras resistentes ao teste de resistência osmótica à salina 0,36% e os valores de VCM.....	47
TABELA 6. Amostras não resistentes ao teste de resistência osmótica à salina 0,36% e os valores de VCM	48
TABELA 7. Resultado do perfil eletroforético em acetato de celulose em tampão TEB pH 8,5 das 64 amostras	50
TABELA 8. Resultado do percentual das hemoglobinas normais e variantes identificadas por HPLC no aparelho Variant I (Biorad) das 64 amostras.....	51
TABELA 9. Resultado da eletroforese alcalina, VCM, HCM e da PIEHH das 15 amostras sugestivas de talassemia alfa.....	52
TABELA 10. Valores de referência adotados.....	54
TABELA 11. Sequências nucleotídicas dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene da globina alfa para detecção da deleção $\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{4,2}$	83
TABELA 12. Sequências nucleotídicas dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene da globina alfa para detecção da deleção $\alpha^{3,7}$	83
TABELA 13. Condições de amplificação dos oligonucleotídeos 3.7F/KGB01	86

TABELA 14. Condições de amplificação dos oligonucleotídeos KGB04/KGB05	87
TABELA 15. Condições de amplificação dos oligonucleotídeos KGB01/KGB02	87
TABELA 16. Resultado das análises moleculares das 49 amostras utilizando o par de oligonucleotídeos 3.7F e KGB01	90
TABELA 17. Resultado das análises moleculares das 16 amostras utilizando o par de oligonucleotídeos KGB04 E KGB05	95
TABELA 18. Resultado da eletroforese alcalina, VCM, HCM, PIEHH e o genótipo das 15 amostras sugestivas de talassemia alfa	101
TABELA 19. Resultado do eritrograma e do genótipo dos pacientes que apresentaram associação entre dois tipos de talassemia alfa	104

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática dos <i>clusters</i> dos genes alfa e beta	20
FIGURA 2. Fotomicrografia mostrando os agregados de hemoglobina H em eritrócitos de esfregaços preparados com azul de cresil brilhante	33
FIGURA 3. Perfil eletroforético das hemoglobinas normais e principais variantes na eletroforese alcalina em acetato de celulose.....	34
FIGURA 4. Distribuição dos sujeitos da pesquisa quanto à faixa etária e sexo.	44
FIGURA 5. Perfil eletroforético em acetato de celulose pH 8,5	49
FIGURA 6. Resistência globular osmótica em cloreto de sódio a 0,36%.....	57
FIGURA 7. Mobilidade eletroforética de hemoglobinas em acetato de celulose e ágar citrato..	59
FIGURA 8. Perfil cromatográfico do paciente 18 portador de HB S realizado no equipamento Variant I com o programa “ β -thalassemia short” (Bio-Rad Laboratories)	61
FIGURA 9. Eletroforese alcalina em acetato de celulose pH 8,5.....	65
FIGURA 10. Agrupamento alfa e a região regulatória no braço curto do cromossomo 16	70
FIGURA 11. Genes do <i>cluster</i> α -símile e a representação do gene alfa dois	71
FIGURA 12. Regiões homólogas entre os espaços $\psi\alpha_1$ e α_2 , e entre os genes α_2 e α_1	72
FIGURA 13. “Crossing-over” desigual entre dois cromossomos 16.....	73
FIGURA 14. Representação das deleções mais comuns nos genes alfa	74
FIGURA 15. Sequência parcial do gene da globina alfa humana.....	84
FIGURA 16. Representação esquemática da localização dos oligonucleotídeos KGB01, KGB02, KGB03, KGB04, KGB05 e 3.7F no cromossomo 16	85

FIGURA 17. Produtos de amplificação com o par de oligonucleotídeos 3.7F/KGB01 dos pacientes 25, 27, 34, 52, 61, 62 e 63.....	91
FIGURA 18. Produtos de amplificação com o par de oligonucleotídeos 3.7F/KGB01 dos pacientes 05, 08, 14, 15 e 20	92
FIGURA 19. Produtos de amplificação com o par de oligonucleotídeos 3.7F/KGB01 dos pacientes 30, 31, 44 e controle para heterozigoto $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	93
FIGURA 20. Produtos de amplificação com o par de oligonucleotídeos 3.7F/KGB01 dos pacientes 38, 45, 50, 65 e 12	94
FIGURA 21. Produtos de amplificação com o par de oligonucleotídeos KGB04/KGB05 dos pacientes 22, 23, 29 e 33	96
FIGURA 22. Representação da região de anelamento do oligonucleotídeo KGB01 na seqüência final do gene alfa 1 e alfa 2.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -talassemia	- Alfa-talassemia
α^0	- Alfa zero
α^+	- Alfa mais
$\alpha^{3.7}$	- Deleção de 3,7 Kb
$\alpha^{4.2}$	- Deleção de 4,2 Kb
ARMS	- Sistema de mutação de amplificação refratária
β -talassemia	- Beta-talassemia
$^{\circ}\text{C}$	- Graus centígrados
CO_2	- Dióxido de carbono
CHCM	- Concentração de hemoglobina corpuscular média
<i>clusters</i>	- Agrupamento de genes
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DMSO	- Dimetil sulfoxide
DO	- Densidade óptica (Absorvância)
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
fL	- Fentolitros
<i>g</i>	- Aceleração da gravidade
g	- Grama
g/dL	- Gramas por decilitro
Hb	- Hemoglobina (s)
Hb A	- Hemoglobina A
Hb A ₂	- Hemoglobina A2
Hb F	- Hemoglobina Fetal
Hb S	- Hemoglobina S
Hb C	- Hemoglobina C
Hb H	- Hemoglobina H

Hb N	- Hemoglobina N
Hb J	- Hemoglobina J
Ht	- Hematócrito
HCM	- Hemoglobina corpuscular média
Intervening Sequence (IVS)- introns	
Kb	- Kilobases
L	- Litro
LCR	- Locus control region
M	- Molar
mg	- Miligrama
µg	- Micrograma
mL	- Mililitro
µL	- Microlitro
mM	- Milimolar
mA	- Miliâmpere
mm	- Milímetro
nm	- Nanômetros
ng	- Nanogramas
O ₂	- Oxigênio
ORF	- Moldura aberta de leitura
pmol	- Picomol
pb	- Pares de bases
pg	- Picogramas
PCR	- Reação de polimerização em cadeia
PHHF	- Persistência hereditária de hemoglobina fetal
PIEHH	- Pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H
RDW	- Red cell dispersion width ou índice de anisocitose
RFLP	- Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
T _m	- Temperatura de dissociação ("melting")
U	- Unidade de enzima

UTR	- região não traduzida
V	- Volts
VCM	- Volume corpuscular médio

RESUMO

A talassemia alfa é uma síndrome resultante de distúrbios na síntese da cadeia da globina alfa que formam o tetrâmero da molécula da hemoglobina. A talassemia alfa é classificada em quatro tipos de acordo com o número de genes alfa afetado: portador silencioso ($-\alpha/\alpha$); traço alfa talassêmico ($--/\alpha\alpha$ ou $-\alpha/-\alpha$); doença de hemoglobina H ($--/-\alpha$) e hidropsia fetal ($--/--$). A diminuição na síntese de globina alfa causa a produção inadequada de hemoglobina que resulta em anemia microcítica e hipocrômica. Causa também o acúmulo de cadeias do tipo beta, no interior do eritrócito, pela falta de balanceamento com a síntese da globina alfa afetada. O resultado deste desbalanceamento é a formação de tetrâmeros de cadeias beta denominados Hb H. Clinicamente o indivíduo portador de talassemia alfa pode ser assintomático ou apresentar anemia severa. As formas assintomáticas da talassemia alfa, o portador silencioso e o traço alfa talassêmico, são mais difíceis de diagnosticar, pois os corpúsculos de Hb H nem sempre estão presentes. Para estas situações faz-se necessária a investigação molecular visando a caracterização do genótipo e a confirmação da presença da talassemia alfa. Este fato se deve principalmente porque o diagnóstico através de métodos clássicos não moleculares, apesar de importantes, é limitado e impreciso. O presente trabalho avaliou alguns dos métodos laboratoriais clássicos na detecção de talassemia alfa e associou a caracterização molecular das formas deletoriais mais prevalentes $\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{4,2}$. Para a confirmação e caracterização da talassemia alfa, foram desenhados novos oligonucleotídeos. Através da técnica convencional da PCR, utilizando o par de oligonucleotídeos 3.7F/KGB01 foi possível detectar a deleção $\alpha^{3,7}$, diferenciando o genótipo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), do heterozigoto ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$) e do homozigoto ($-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$). Apesar de ter sido desenhado para detectar a deleção $\alpha^{3,7}$, este par também permitiu detectar a deleção $\alpha^{4,2}$ quando em homozigose ($-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$). Utilizando o par KGB04/KGB05 foi possível detectar a deleção $\alpha^{4,2}$, porém sem diferenciar entre o genótipo heterozigoto e homozigoto. A deleção mais prevalente encontrada foi a $\alpha^{4,2}$ (20,0%) sendo que destas podemos afirmar que 9,2% estão na forma homozigótica ($-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$). A deleção do tipo $\alpha^{3,7}$ na forma heterozigótica foi detectada em 12,3% dos pacientes. Os dados obtidos revelam que a importância da detecção molecular para talassemia alfa não se restringe apenas na definição do genótipo, mas também na detecção deste tipo de talassemia em pacientes que apresentam: quadros hematológicos alterados, quadros hematológicos normais, mas com valores próximos aos valores limítrofes e em neonatos.

Unitermos: Hemoglobinopatias, Talassemia alfa, Hemoglobina H, Detecção laboratorial, Análise Molecular

ABSTRACT

Alpha thalassemia is a syndrome resulting from disturbances in the synthesis of alpha globin chain that forms the tetramer of the hemoglobin molecule. Alpha thalassemia is classified into four types according to the number of alpha genes affected: silent carrier ($-\alpha/\alpha\alpha$), alpha thalassemia trait ($--/\alpha\alpha$ or $-\alpha/-\alpha$) Hemoglobin H disease ($--/-\alpha$), and fetalis hydrops ($--/--$). The decrease in synthesis of alpha globin causes inadequate production of hemoglobin resulting in hypochromic and microcytic anaemia. Also it causes accumulation of beta chains, inside the erythrocytes, resulting in formation of beta chain tetramer of hemoglobin called Hb H. Clinically the individual with thalassemia can be asymptomatic or present severe anemia. Asymptomatic forms of thalassemia, silent carrier and alpha thalassemia trait, are more difficult to diagnose because of the inclusions bodies of Hb H are not always present. In these situations it is necessary to research the molecular characterization of the genotype and confirming the presence of alpha thalassemia. This is mainly because the diagnosis by conventional methods, although important, is limited and imprecise. This study evaluated some of the traditional laboratory methods in the detection of alpha thalassemia and associated molecular characterization of the more prevalent deletion forms $\alpha^{3,7}$ and $\alpha^{4,2}$. For confirmation and characterization of alpha thalassemia, new oligonucleotides were designed. By conventional PCR technique, using 3.7F/KGB01 *primers* it was possible to detect the deletion $\alpha^{3,7}$, differentiating the normal genotype ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), the heterozygote ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$), and homozygous ($--\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$). Although it was designed to detect the deletion $\alpha^{3,7}$, this *primers* also identified the deletion $\alpha^{4,2}$ when in homozygote ($-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$). The *primers* KGB04/KGB05 detected the deletion $\alpha^{4,2}$, but without differentiating between the heterozygous and homozygous genotype. The most prevalent deletion founded was the $\alpha^{4,2}$ (20.0%) which represents 9.2% in the homozygous form ($-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$). The deletion $\alpha^{3,7}$ in the heterozygous form was detected in 12.3% of patients. The data demonstrate that the importance of molecular detection for alpha thalassemia is not limited only to the definition of the genotype, but also confirmation of the presence in patients with abnormal erythrogram values, with regular erythrogram values, with values closed to the boundary values and in neonates.

Key-words: Hemoglobinopathies, Alpha thalassemia, Hemoglobin H, Laboratorial detection, Molecular characterization

INTRODUÇÃO GERAL

1 – Hemoglobinas

A hemoglobina (Hb) humana é formada por quatro subunidades, composta de dois pares de cadeias globínicas conhecidas por cadeia alfa e beta. A cada uma destas cadeias está ligado um grupo heme que efetivamente tem a capacidade de se ligar, transportar e liberar moléculas de O_2 e CO_2 através do organismo. O grupo heme está parcialmente enterrado em uma fenda delimitada por radicais hidrofóbicos e unido à cadeia polipeptídica através de uma ligação de coordenação do átomo de ferro com um resíduo de histidina. A sexta ligação de coordenação do átomo de ferro de cada heme está livre para se ligar à molécula de O_2 . Essa estrutura mantém o ferro em estado ferroso (Fe^{++}) e lhe dá a cor vermelha (PRATT e CORNELLY, 2006).

Segundo PRATT e CORNELLY (2006) para que a hemoglobina possa desempenhar sua função, são necessários cerca de 300 milhões de moléculas por eritrócitos. A molécula da hemoglobina apresenta ligações do tipo pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre as cadeias que promovem a sua forma globular. As cadeias alfa globínicas apresentam 141 resíduos de aminoácidos e as cadeias beta globínicas 146 resíduos de aminoácidos (BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2004).

Nas regiões internas das cadeias globínicas, que constituem cerca de 75% da molécula, situam-se as dobraduras e o "pacote" do grupo heme, que o protege da entrada de água e conseqüente oxidação do ferro. Essas regiões são muito sensíveis às substituições de um aminoácido por outro que apresente características diferentes, fenômeno que provoca a instabilidade da molécula e sua desnaturação, podendo inclusive, alterar o processo de afinidade ao oxigênio. As regiões externas não apresentam dobraduras; os aminoácidos

localizados externamente estabelecem contatos com o meio circundante e, geralmente a substituição de um aminoácido por outro não afeta a viabilidade da molécula nem sua função de transportar oxigênio (NAOUM, 1997).

As cadeias globínicas que compõem as hemoglobinas são sintetizadas em diferentes estágios do desenvolvimento humano de acordo com uma ontogenia rigorosa que envolve mecanismos regulatórios de alta complexidade. No início do desenvolvimento intra-uterino existem três hemoglobinas embrionárias a Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$) Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$) que logo deixam de ser expressas. Em seguida inicia-se a síntese de hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$) e uma pequena quantidade de hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$) começa a ser produzida. A partir do sexto mês após o nascimento a molécula de hemoglobina predominante é designada por Hb A (97%), além de Hb A₂ (2,0 – 3,0%) e Hb Fetal (< 1,0%) em menor quantidade (WEATHERALL e CLEGG, 2001a), conforme tabela 1.

TABELA 1 – HEMOGLOBINAS OBSERVADAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO HUMANO

Período	Hemoglobina	Cadeias β -símile e α -símile
Embrionário	Hb Gower 1	$\zeta_2\epsilon_2$
	Hb Gower 2	$\alpha_2\epsilon_2$
	Hb Portland	$\zeta_2\gamma_2$
Fetal	Hb F	$\alpha_2\gamma_2$
Adulto	Hb A	$\alpha_2\beta_2$
	Hb A ₂	$\alpha_2\delta_2$

FONTE: ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004, p.276

Nos braços curtos dos cromossomos 11 e 16 estão presentes os complexos gênicos responsáveis pela síntese das cadeias globínicas α (alfa), β (beta), γ (gama), δ (delta), ϵ (épsilon) e ζ (zeta). Existem também os pseudogenes, produtos do processo evolutivo, que são seqüências equivalentes a um gene funcional, mas que não são ativas devido à presença de alterações nas regiões codificadoras e regulatórias. Em uma região de aproximadamente 30Kb do cromossomo 16 (16p13.3) está o *cluster* α -símile (agrupamento alfa) 5' – ζ – $\psi\zeta$ – $\psi\alpha_2$ – $\psi\alpha_1$ – α_2 – α_1 – θ_1 – 3' (zeta – pseudo zeta – pseudo alfa2 – pseudo alfa1 – alfa2 – alfa1 – teta1) e no cromossomo 11 (11p15.5) está o *cluster* β -símile (agrupamento beta) 5' – ϵ – $^G\gamma$ – $^A\gamma$ – $\psi\beta$ – δ – β – 3' (épsilon – gama glicina – gama alanina – pseudo beta – delta – beta) que compreende aproximadamente uma região de 60 Kb (fig. 1) (LORENZI, 2006; ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004; WEATHERALL e CLEGG, 2001a).

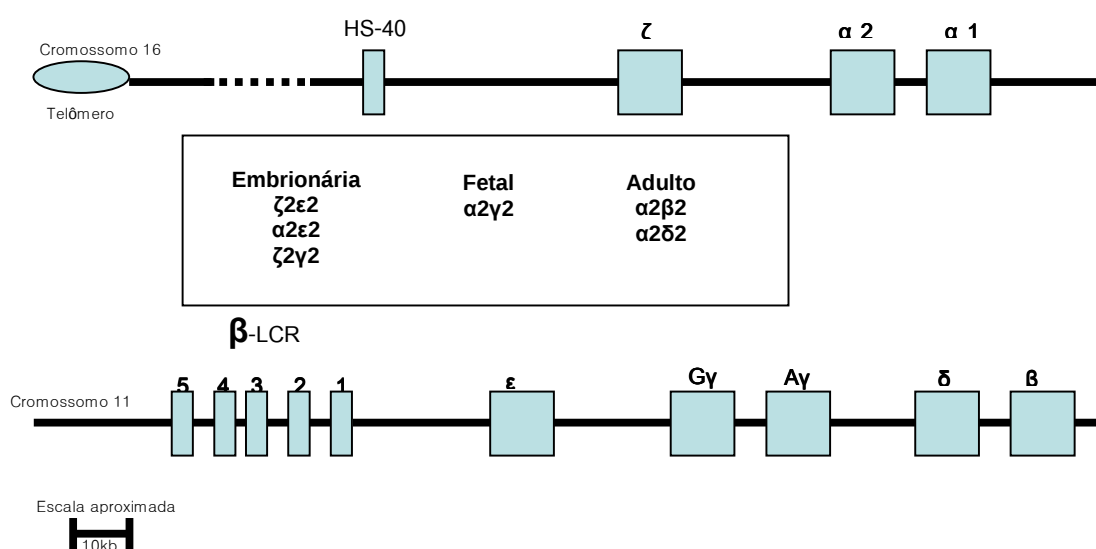


FIGURA 1 – Representação esquemática dos *clusters* dos genes alfa e beta. Os pseudogenes não estão representados (STEENSMA; GIBBONS e HIGGS, 2005)

2 – Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias aparecem em decorrência de alterações nos genes que codificam as cadeias globínicas alfa e/ou beta. Estas alterações podem ser: a) qualitativas, como a substituição de aminoácidos que resulta no aparecimento de hemoglobinas variantes; b) quantitativas, envolvendo os níveis de expressão dos genes, resultando nas talassemias (ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004; WEATHERALL e CLEGG, 2001a).

Em vários países as hemoglobinopatias são consideradas problemas de saúde pública. Tal fato levou as instituições governamentais do Brasil a regulamentar a pesquisa de hemoglobinopatias, como parte da triagem neonatal, entre outros distúrbios metabólicos, através da portaria nº 822/01, do Ministério da Saúde (RAMALHO; MAGNA e PAIVA e SILVA, 2003).

As hemoglobinopatias prevalentes no Brasil e no mundo ocorrem devido ao processo de miscigenação. A formação étnica da população brasileira está associada ao seu processo de colonização. Inicialmente, portugueses, índios, negros e africanos e posteriormente outros povos imigraram para o Brasil como: italianos, japoneses, tailandeses, gregos, chineses, filipinos, malasianos, árabes-jordanianos, indonésios, espanhóis, canadenses e outros povos africanos dando origem à população brasileira atual. Os colonizadores do Brasil apresentam genes para as hemoglobinas anormais com frequência variada (NAOUM *et al*, 1986; NAOUM *et al*, 1987; ZAGO e COSTA, 1985; SALZANO, 2002).

Estudos apontam que cerca de 7% da população mundial seja portadora de um dos tipos de hemoglobinopatia, justificando a importância da identificação destas alterações correlacionando estrutura, função, aspectos genéticos, antropológicos e consequências clínicas do indivíduo homozigoto ou heterozigoto (SCHNEIDER *et al*, 1976; WEATHERALL e CLEGG, 2001b; EASTMAN *et al*, 1999). Na página eletrônica do site Globin Gene Server (GGS) estão depositados os dados dos genes envolvidos na produção das hemoglobinas. No GGS são encontradas 1015 mutações que resultaram em

diferentes hemoglobinas variantes e 393 mutações que resultaram em diferentes formas de talassemias (GLOBIN GENE SERVER, Disponível em: <<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>> Acesso em: 23 de fevereiro de 2009).

2.1 – Hemoglobinas variantes mais freqüentes

As hemoglobinas variantes surgem de alterações qualitativas nos genes estruturais, geralmente em decorrência de mutações pontuais, ou seja, alterações de um único nucleotídeo. Conseqüentemente, a substituição de base modificará a seqüência do gene, que codificará para uma molécula de hemoglobina com características físico-químicas distintas. Sendo assim, as hemoglobinas variantes originam-se por substituição de um único aminoácido na porção externa da molécula. Dentre as hemoglobinas classificadas nesse grupo podemos citar as hemoglobinas S, C, D, G, E, J, não produzindo alterações funcionais significativas na molécula, exceto para a Hb S (WEATHERALL e CLEGG, 2001a).

Podem ocorrer também outros tipos de alterações como, por exemplo: a) substituição de aminoácidos na porção interna envolvendo resíduos polares e não polares, os quais se localizam em torno do grupo heme, causando instabilidade devido à oxidação do grupo heme, formando hemoglobinas instáveis, como por exemplo, Hb Zurich e Hb Köln; b) substituições de aminoácidos que participam do contato alfa1 beta1, das ligações químicas com o 2,3 bifosfoglicerato (2,3-BPG) e do resíduo histidina C-terminal da cadeia beta ocasionando a formação de hemoglobinas com alterações na afinidade pelo oxigênio (Hb Chesapeake, Hb Rainier, Hb Jamaica Plain); c) substituição dos resíduos de histidinas distal ou proximal, que estão ligados ao grupo heme; d) substituição de outros resíduos, que têm importância fundamental na constituição do arranjo tridimensional da proteína que protege o grupo heme contra oxidação, causando anormalidades na molécula provocando excessiva

formação de metemoglobina (Hb M-Boston, Hb M-Osaka) sendo que esta pode causar cianose; e) ou ainda por adição de aminoácidos ao C-terminal das cadeias alfa e beta como exemplo, Hb Constant Spring que apresenta 31 resíduos a mais na cadeia alfa, Hb Tak que apresenta 10 resíduos a mais na cadeia beta. Geralmente este tipo de alteração é causado pela deleção de um nucleotídeo, que promove a alteração de fase de leitura mudando a posição do códon de parada (NAOUM, 1999; PSCHTDT *et al*, 2003; HARTEVELD *et al*, 2001; WIWANITKIT, 2005; GEVA *et al*, 2004).

Hemoglobina S

A formação da Hb S é devido a uma mutação no sexto códon da cadeia beta (GAG → GTG), onde a base nitrogenada adenina (A) é substituída pela timina (T), ocasionando a substituição do aminoácido ácido glutâmico (Glu) pela valina (Val). A mudança Glu→Val altera a carga elétrica da hemoglobina, uma vez que ocorre a substituição de um aminoácido carregado negativamente por outro neutro, resultando na perda de duas cargas negativas por molécula de hemoglobina, isso faz com que a mobilidade eletroforética da Hb S seja mais lenta que a da Hb A. A Hb S quando está em situação de baixa tensão de oxigênio polimeriza no interior dos eritrócitos formando tactóides e, como consequência, promove a deformação da membrana celular mudando a morfologia dos eritrócitos de disco bicôncavo para drepanócito (NAOUM e NAOUM, 2004).

O indivíduo heterozigoto, genótipo AS, é classificado como portador do traço falciforme. Em geral, o heterozigoto apresenta-se assintomático, enquanto o homozigoto SS apresenta anemia falciforme, que resulta num quadro clínico-laboratorial grave, com crises frequentes de hemólise intravascular e obstruções vaso-oclusivas. Muitos pacientes portadores de Hb S apresentam associação com a Hb C, D, talassemia alfa e beta. A identificação da Hb S é realizada principalmente pela técnica de eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, que apesar de ser a mais sensível para sua detecção não é específica,

pois outras hemoglobinas anormais migram de forma semelhante: Hb D, Hb G, Hb Korle-Bu, Hb Lepore, Hb Hasharon e Hb Stanleyville (ZAMARO *et al*, 2002; NAOUM, 1999; SCHNEIDER, 1974). Existe, portanto, a necessidade da utilização de técnicas que confirmem e diferenciem estas variantes, que apesar da grande maioria não causarem alterações fisiopatológicas, sua identificação é importante do ponto de vista do aconselhamento genético.

Hemoglobina C

A Hb C é a segunda hemoglobina variante mais freqüente, sendo superada apenas pela Hb S. A mutação também ocorre no sexto códon da cadeia beta, onde há a substituição de uma guanina por uma adenina (GAG → AAG) resultando na troca do ácido glutâmico (Glu) pela lisina (Lis). Neste caso a troca é de um aminoácido de carga negativa por outro de carga positiva, alterando sensivelmente a migração eletroforética da hemoglobina em comparação com a Hb A. Porém, outras formas variantes de hemoglobina migram semelhantemente à Hb C, devendo ser realizada uma diferenciação através de outras metodologias. A mutação leva a uma cristalização anormal da Hb dentro do eritrócito e quando a Hb C está em associação com outras hemoglobinas variantes ou em homozigose o indivíduo apresenta sinais e sintomas de anemia, entretanto em heterozigose, os portadores são assintomáticos (ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004).

A prevalência de Hb C varia de 15% a 30% nos povos de origem africana, e sua freqüência é bastante variável na população brasileira, dependendo da região analisada (ZAGO e COSTA, 1985). Na região sudeste a Hb C está presente em cerca de 1% da população. BONINI-DOMINGOS *et al* (2003) relataram o caso de uma família de origem negróide apresentando interação de Hb C e beta talassemia. SILVA; PIVATTO e RONCHI-JUNIOR (1997) descreveram a interação de Hb C e Hb S (SC) em um paciente assintomático e com dados hematológicos aparentemente normais.

Hemoglobina D

É a terceira variante mais prevalente (NAOUM *et al*, 2002; FERNANDES *et al*, 2003). Foi descoberta em uma família proveniente da região de Los Angeles sendo classificada como Hb D-Los Angeles (VELLA e LEHMANN, 1974). É resultado da troca de uma guanina por uma citosina (GAA → CAA), causando a substituição de um ácido glutâmico (Glu) por uma glutamina (Gln) na posição 121 da cadeia beta. Essa variante apresentava mobilidade eletroforética idêntica a Hb S em pH alcalino e semelhante à Hb A em pH ácido; solubilidade normal quando em estado reduzido e ausência de falcização dos eritrócitos (VELLA e LEHMANN, 1974).

Esta hemoglobina recebeu outras denominações como: Hb D, D-Chicago, D-North Carolina, D-Punjab, D-Portugal e D-Oak Ridge, (GLOBIN GENE SERVER Disponível em: <<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>> Acesso em: 30 de junho de 2007), porém os nomes mais utilizados são Hb D-Los Angeles ou Hb D-Punjab. A heterozigose para Hb D-Los Angeles é caracterizada pela ausência de sintomatologia clínica, mas o homozigoto pode apresentar desde parâmetros clínicos e hematológicos normais até uma anemia hemolítica branda, com diminuição da fragilidade osmótica, presença de algumas células em alvo e níveis de hemoglobina normais.

A interação de Hb D com talassemia beta pode ser confundida com homozigose. Nesse caso é importante a confirmação através de análise molecular e estudo familiar, para evitar um diagnóstico equivocado. Esta é uma situação extremamente rara, mas já foram descritos em alguns países como: México (PEREA *et al*, 1999), Arábia Saudita (AHMED *et al*, 2001) e Brasil (NAOUM *et al*, 2002).

2.2 – Talassemias

Segundo LORENZI (1999) as talassemias constituem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias caracterizadas pela deficiência total ou parcial da síntese de globina. As talassemias são classificadas de acordo com a globina afetada. Problema na síntese de globina alfa, talassemia alfa, quando associada à cadeia beta, talassemia beta.

Os primeiros estudos ocorreram na década de 20 quando surgiram os primeiros relatos de pacientes, crianças, que apresentavam esplenomegalia e alterações medulares que foram associados à talassemia. Posteriormente, com estudos mais avançados sobre a hemoglobina observaram que a talassemia é uma desordem genética com muitas características similares às hemoglobinas variantes (WEATHERALL e CLEGG, 2001b; WEATHERALL, 1997; NAOUM,1997).

Está claro que todas as talassemias estão associadas com a produção desbalanceada de globinas. O excesso de cadeias alfa ou beta precipitam para formar inclusões nas células eritróides. Conseqüentemente, ocorre a uma destruição precoce das células da linhagem eritróide pelo sistema retículo endotelial, resultando em quadros de discreta anemia a anemia severa, dependendo do grau da destruição celular (WEATHERALL e CLEGG, 2001a).

3 – Hemoglobinopatias no Brasil

Estudos sobre cromossomo Y e DNA mitocondrial confirmam que a constituição genética do povo brasileiro é feita pelo homem europeu, português e pela mulher índia ou negra (PARRA *et al*, 2003). A grande heterogeneidade genética do povo brasileiro é derivada do grande número de grupos raciais formadores e do nível de cruzamento destes grupos em várias regiões do país, permitindo a dispersão de genes que eram próprios de povos negróides ou caucasianos. Este fato leva a acreditar que o processo de miscigenação contínuo tenha facilitado a propagação dos genes das hemoglobinas anormais,

justificando a distribuição heterogênea das hemoglobinopatias nos vários estados brasileiros dependendo da proveniência nacional dos seus colonizadores (NAOUM *et al*, 1986; SALZANO, 2000).

Assim, a detecção dos indivíduos portadores de hemoglobinopatias e sua correta caracterização são importantes do ponto de vista genético-antropológico e de suporte clínico. Os indivíduos portadores, além de representarem fonte de novos heterozigotos, podem, através de casamentos entre portadores, originar indivíduos homozigotos e duplos heterozigotos com forma grave da doença. Esses indivíduos, quando identificados previamente, são encaminhados para profissional especializado em aconselhamento genético, facilitando a orientação quanto ao risco para a descendência e tratamento (SILVA; PIVATTO e RONCHI-JUNIOR, 1997; ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004).

Os estudos moleculares no Brasil estão concentrados em algumas regiões como os estados do Sul e Sudeste. Sendo assim, acredita-se que tanto a talassemia alfa quanto a beta no Brasil não estão tão bem caracterizadas em todo o território nacional, principalmente quanto às bases moleculares de sua etiopatologia (BERTUZZO; SONATI e COSTA, 1997; BONINI-DOMINGOS, 2004; BERTHOLO e MOREIRA, 2006).

Não se sabe ao certo quais as mutações mais freqüentes nas diversas regiões do Brasil, pois se tem estudos regionalizados, não traduzindo necessariamente a realidade de todos estados brasileiros. As imigrações que aconteceram desde o descobrimento até os dias atuais nas diferentes regiões do Brasil modificaram a distribuição do padrão genético original, apesar da constituição étnica do povo brasileiro ser baseada no europeu português, no índio e no negro (MELO-REIS *et al*, 2006b; NAOUM, 1997).

Em Goiás, até o momento, existe um único centro de pesquisa dedicado ao estudo das hemoglobinopatias, desde 2001. Trata-se do Laboratório de Estudo e Pesquisa de Anemia Hereditária (LEPAH) integrado ao Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás. No ano de 2006 foram publicados os resultados de um estudo sobre a prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes no estado de Goiás (MELO-REIS *et al*, 2006b). Os

resultados mostraram uma prevalência de 10,1% de hemoglobinopatias na população estudada, sendo que 5,2% representavam portadores de talassemia alfa, 2,2% de heterozigotos para hemoglobina S, 1,0% de heterozigotos para hemoglobina C, 0,7% de talassemia beta, 0,5% de associação entre talassemia alfa e hemoglobina S, 0,3% de associação entre talassemia alfa e hemoglobina C e ainda 0,3% de heterozigotos para hemoglobina D. Naquele estudo, foram empregadas metodologias clássicas de diagnóstico laboratorial e não foram utilizados métodos moleculares de análise.

NETO (2007) realizou na cidade de Bom Jardim de Goiás um levantamento da prevalência de hemoglobinopatias em crianças que participam do programa de erradicação do trabalho infantil. Das 195 crianças, 184 (94,35%) apresentaram o perfil eletroforético normal (AA) e onze (5,65%) apresentaram hemoglobina variante. Dentre as amostras que apresentaram perfil alterado, dez (5,14%) eram portadoras de Hb S em heterozigose e apenas um (0,51%) apresentou heterozigose para Hb C.

Foi realizado o estudo de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico em tratamento no ambulatório do Departamento de Reumatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Goiás. Utilizando-se também apenas as metodologias clássicas de diagnóstico, foi observada uma frequência de 10,0% de alterações de hemoglobinas, destas a mais prevalente foi a talassemia alfa (5,0%), depois heterozigoto para Hb S (2,5%), heterozigoto para Hb C (1,25%) e beta talassemia (1,25%) (CASTRO *et al*, 2008).

OBJETIVOS



Geral

Estudar a talassemia alfa detectada nos pacientes atendidos no Laboratório Escola da Área da Saúde (LAS) do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás (UCG);



Específicos

- ✓ Caracterizar laboratorialmente a talassemia alfa através de métodos clássicos não moleculares, detectadas nos pacientes;
- ✓ Propor uma caracterização molecular das formas mais prevalentes de talassemia alfa.

Estes objetivos específicos estão abordados em dois capítulos independentes, conforme descrito abaixo, e ao final está a discussão geral referente ao estudo.

Capítulo I: Dificuldade na detecção laboratorial de talassemia alfa.

Capítulo II: Detecção e confirmação da talassemia alfa por métodos moleculares.

CAPÍTULO I

DIFICULDADE NA DETECÇÃO LABORATORIAL DE TALASSEMIA ALFA

I – INTRODUÇÃO

A talassemia alfa, um dos defeitos genéticos mais distribuídos no mundo (WEATHERALL, 2004), é caracterizada pela produção ausente (α^0) ou diminuída (α^+) das cadeias das globinas alfa, na maioria das vezes resultantes de deleções nos genes das globinas alfa. Menos frequentemente, as talassemias alfa resultam de mutações pontuais, sendo denominadas de α -talassemias não delecionais, envolvendo preferencialmente o gene α_2 ($\alpha^T\alpha$) e mais raramente o gene α_1 ($\alpha\alpha^T$) (EMBURY *et al*, 1980; HIGGS *et al*, 1989; CHUI; FUCHAROEN e CHAN, 2003).

A diminuição da síntese de cadeia alfa e o conseqüente excesso de cadeia beta leva a uma produção diminuída de hemoglobinas fisiológicas e o aparecimento de tetrâmeros de cadeia beta, chamado hemoglobina H (Hb H). O tetrâmero de beta é instável, podendo se tornar uma metemoglobina, que tem a capacidade de combinar com o oxigênio de maneira irreversível, não desempenhando sua função fisiológica (NAOUM, 1997; WEATHERALL, 2004).

Vários são os quadros clínico-laboratoriais da talassemia alfa variando de acordo com o número de genes alfa lesados, uma vez que o grau desta lesão também pode variar afetando o gene total ou parcialmente. O indivíduo normal para a produção de globinas alfa tem seu genótipo representado por dois haplótipos $\alpha\alpha$ ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Portanto, as talassemias alfa são classificadas de quatro formas: a) portador silencioso ou α -talassemia mínima (três genes ativos) que resulta da deleção de um dos quatro genes α ($-\alpha/\alpha\alpha$); b) traço α -talassêmico ou

α -talassemia menor resultante da deleção de dois genes α no mesmo cromossomo ($--/\alpha\alpha$) ou em cromossomos diferentes ($-\alpha/-\alpha$); c) doença da Hb H ou α -talassemia intermédia onde três genes foram deletados ($--/-\alpha$) resultando na formação de Hb H (β_4) ou Hb Bart's (γ_4); d) Hidropsia fetal que corresponde ao homozigoto de α^0 -talassemia devido a completa ausência de genes α ($--/--$) (tabela 2) (NAOUM e DOMINGOS, 1997; ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004).

TABELA 2 – SÍNDROMES ALFA TALASSÊMICAS. SINOPSE GERAL DA RELAÇÃO ENTRE DELEÇÃO DOS GENES ALFA E CONSEQUÊNCIAS FISIOPATOLÓGICAS

TIPOS DE TALASSEMIA ALFA	ALTERAÇÕES CLÍNICAS	ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS	ALTERAÇÕES LABORATORIAIS
Portador silencioso ($-\alpha/\alpha\alpha$)	Nenhuma. Talassemia alfa mínima.	Discreta microcitose ou normocitose. Hb: normal VCM: 75-80 fL HCM: 24-27 pg	Traços de HbH (<2%) na eletroforese PIE de Hb H = 1/1000 a 2000
Traço alfa talassêmico ($--/\alpha\alpha$ ou $-\alpha/-\alpha$)	Geralmente assintomático. Talassemia alfa menor.	Microcitose. Hipocromia. Anemia. Hb: 11-13 g/dL VCM: 65-75 fL HCM: 20-24 pg	Hb H = 2 a 8% PIE de Hb H = 1/250 a 500
Doença de HbH ($--/-\alpha$)	Talassemia alfa intermédia. Anemia moderada, icterícia, esplenomegalia.	Microcitose. Hipocromia. Anemia. Hb: 08-11 g/dL VCM: 55-65 fL HCM: 20-24 pg	HbH = 10 a 20% PIE de Hb H = presença de Hb H em todos os campos do microscópio (1:10 a 1:50)
Hidropsia Fetal Talassemia alfa homozigótica ($--/--$)	Morte neonatal com eritroblastose fetal	Anisocitose. Poiquilocitose. Eritroblastose. Anemia. Hb: < 07g/dL VCM: 100-110 fL HCM: diminuído	Hb Bart's = 80 a 100% HbH = 10 a 20% PIE de Hb H = idem ao da doença de Hb H

PIE = pesquisa intraeritrocitária, proporção de uma célula com Hb H para determinado número de eritrócitos. FONTE: NAOUM e NAOUM (2004) p. 61, com modificações

A Organização Mundial de Saúde, a Academia de Ciências do Terceiro Mundo e a Organização Pan-Americana de Saúde recomendam o levantamento populacional da prevalência das hemoglobinopatias – anemias hereditárias – nas populações, pois estas são causas de morbidade e de mortalidade elevadas na população (WHO WORKING GROUP, 1982; WEATHERALL e CLEGG, 2001b).

Na talassemia alfa a formação de hemoglobina dentro do eritrócito é reduzida, levando a uma conseqüente microcitose e hipocromia, características iniciais do diagnóstico. Tanto a microcitose quanto a hipocromia são detectadas pelo hemograma, determinados pelo VCM (volume corpuscular médio dos eritrócitos – valor de referência: 80-102 fL), HCM (hemoglobina corpuscular média dos eritrócitos – valor de referência: 27-32 pg) e CHCM (concentração da hemoglobina corpuscular média dos eritrócitos – valor de referência: 30-35 g/dL). A microcitose caracteriza um eritrócito de tamanho diminuído e a hipocromia um eritrócito com quantidade diminuída de moléculas de hemoglobina. É muito importante salientar que esta condição hematológica também acontece em anemias carenciais, como a ferropriva, e nas anemias por doença crônica (ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004; CLARKE e HIGGINS, 2000).

O excesso de globinas beta livres podem se agregar e precipitar, levando a lesões na membrana celular e distúrbios metabólicos variados, responsáveis pela destruição dos eritrócitos jovens – eritroblastos – ainda na medula óssea e conseqüente redução da sobrevivência dos eritrócitos maduros na circulação. Essa situação é detectada laboratorialmente também pelo hemograma, onde pode ser observadas alterações no número total de eritrócitos por microlitro de sangue e pela presença de eritroblastos circulantes resultantes da hemólise intravascular aumentada (WEATHERALL e CLEGG, 2001a). Tal perfil hematológico também é evidenciado em outras anemias hemolíticas como a anemia falciforme, anemia hemolítica imune, anemia hemolítica adquirida e anemias por defeitos de membrana (ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004).

No feto, a síntese reduzida de cadeias alfa resulta em acúmulo de cadeias do tipo gama que também possuem a capacidade de formar tetrâmeros dando origem a uma hemoglobina denominada Bart's (Hb Bart's). Tanto a Hb Bart's quanto a Hb H possuem afinidade aumentada pelo oxigênio dificultando o transporte deste pelos tecidos. Em 1955, ao mesmo tempo nos Estados Unidos e na Grécia, a Hb H foi descrita pela primeira vez por Rigas, Kohler e Osgood e por Gouttas e colaboradores, respectivamente. A Hb Bart's foi descrita em Londres por Ager e Lehmann em 1958, em uma criança portadora de alterações hematológicas compatíveis à talassemia (WEATHERALL e CLEGG, 2001a).

A pesquisa de Hb H é utilizada no diagnóstico da talassemia alfa. A Hb H é uma hemoglobina instável que forma corpos de inclusão – precipitados – no interior dos eritrócitos, podendo ser pesquisados citologicamente por meio da incubação com o corante azul de cresil brilhante à 1,0% (fig. 2). Outra forma de pesquisar a Hb H é através da eletroforese de hemoglobina em pH alcalino (fig. 3). A Hb H possui uma migração mais rápida que a Hb A. A quantidade de Hb H formada depende diretamente do número de genes alfa afetados (CLARKE e HIGGINS, 2000).

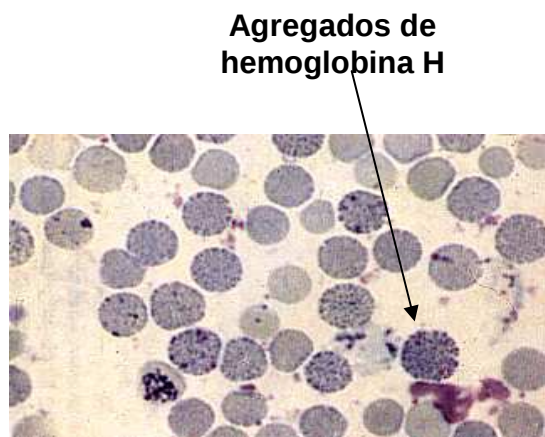


FIGURA 2 – Fotomicrografia mostrando os agregados de hemoglobina H em eritrócitos de esfregaços preparados com azul de cresil brilhante (aumento de 1000X)

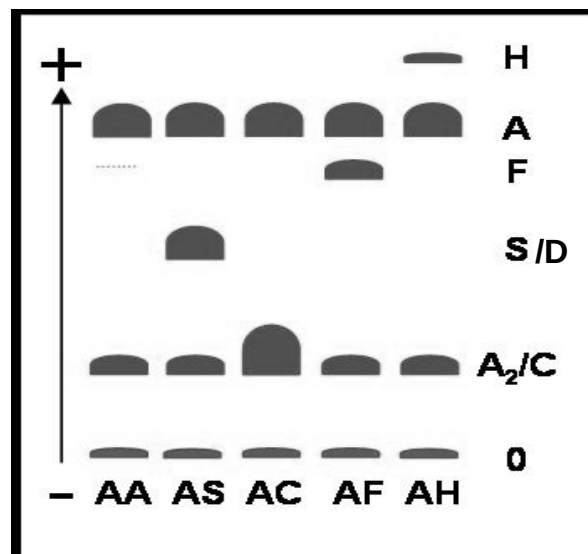


FIGURA 3 – Perfil eletroforético das hemoglobinas normais e principais variantes na eletroforese alcalina em acetato de celulose. AA = Perfil normal de HbA e Hb A₂; AS = Perfil de heterozigoto para HbS; AC = Perfil de heterozigoto para HbC; AF = Perfil de portador de HbF aumentada; AH = Perfil de portador de HbH. FONTE: <<http://www.hemoglobinopatias.com.br/>> acesso em: 18 de novembro de 2008

Existem centenas de mutações que acometem os genes responsáveis pela produção das cadeias de globinas alfa. Atualmente estão descritas cerca de 280 mutações envolvendo o gene alfa1 (α_1) e 327 relacionadas ao gene alfa2 (α_2) (GLOBIN GENE SERVER, Disponível em: <<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>> Acesso em: 23 de fevereiro de 2009.

As deleções mais prevalentes no mundo e no Brasil são $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$ e $--^{SEA}$, destas a deleção $-\alpha^{3.7}$ aparece com maior freqüência nos povos dos países europeus como Itália, Portugal e Espanha, justificando assim a sua alta freqüência também no Brasil. Nos povos negróides, quando misturados aos povos europeus também encontramos a talassemia alfa devido a deleção $-\alpha^{3.7}$.

Isso acontece na população negra do Brasil que é resultante da mistura de povos negróides com caucasóides (BONINI-DOMINGOS, 2004; WEATHERALL e CLEGG, 2001a; FOGLIETTA *et al*, 1996; SONATI *et al*, 1992; ZAGO e COSTA, 1985).

II – OBJETIVOS

II.1 – Objetivo geral:

Avaliar alguns dos métodos laboratoriais clássicos na detecção de talassemia alfa em amostras de pacientes atendidos no Laboratório Escola da Área da Saúde (LAS) do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás (UCG).

II.2 – Objetivos específicos:

1 – Detectar pacientes portadores de talassemia alfa utilizando técnicas laboratoriais clássicas como:

Hemograma – Eritrograma – e análise da morfologia eritrocitária;

Resistência Globular Osmótica em Cloreto de Sódio a 0,36%;

Eletroforese alcalina em acetato de celulose;

Pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H;

Cromatografia Líquida de alta performance (HPLC).

2 – Comparar os resultados encontrados para uma análise diagnóstica da talassemia alfa, mais precisa, visando encontrar dados que sejam indicativos de um quadro específico desta talassemia.

III – MATERIAL E MÉTODOS

III.1 – Material

Foram analisadas 64 amostras de sangue periférico, colhidas no período de fevereiro de 2006 a setembro de 2007, provenientes de indivíduos de ambos os sexos. Todas as amostras foram colhidas no Laboratório da Área da Saúde do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás e encaminhadas ao LEPAH – Laboratório de Estudo e Pesquisa em Anemia Hereditária da UCG.

O sangue foi coletado em frasco estéril com anticoagulante EDTA 5%, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, seguindo as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. As amostras biológicas foram obtidas a partir da aprovação da proposta pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, conforme protocolo número 065/2005.

III.2 – Metodologia

III.2.1 – Hemograma – Eritrograma – e análise da morfologia eritrocitária (LEWIS; BAIN e BATES, 2006)

A análise da série vermelha (eritrograma) foi realizada no contador automatizado de células PENTRA 60 (ABX[®]), que determinou o número total de eritrócitos, a dosagem de hemoglobina, o hematócrito e os índices hematimétricos, isto é, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina celular média (HCM), concentração da hemoglobina celular média (CHCM) e o índice de distribuição de anisocitose (RDW). Os resultados do eritrograma foram comparados aos resultados da morfologia eritrocitária realizada mediante análise das células sangüíneas em esfregaço coradas pelo Instant Prov[®] (Newprov).

III.2.2 – Resistência Globular Osmótica em Cloreto de Sódio a 0,36% (SILVESTRONI e BIANCO, 1975)

Em um tubo de hemólise, foram colocados 1,5 mL de solução de trabalho de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total colhido em EDTA. O tubo foi agitado suavemente por inversão e deixado em repouso por 10 minutos para leitura. A leitura do teste foi realizada colocando o tubo com o sangue hemolisado à 2,0 cm de distância de uma folha branca com linhas negras. O resultado foi considerado positivo ou resistente quando a resistência aumentada à hemólise dos eritrócitos tornou a amostra opaca, o que impediu a visualização das linhas negras na tabela de leitura. O resultado negativo ou não resistente, foi definido como resistência normal dos eritrócitos à solução de NaCl, que hemolisara e, conseqüentemente, possibilitava a visualização das linhas negras através da solução.

Reagentes:

1. Solução estoque de NaCl

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

2. Solução de trabalho

NaCl (solução estoque)	36 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

III.2.3 – Preparação de hemolisado para eletroforese (NAOUM, 1999, modificado)

As amostras para eletroforese alcalina de hemoglobinas foram hemolisadas aplicando-se a técnica do hemolisado rápido. Para tanto, foi utilizado como hemolizante o detergente biológico saponina, numa concentração de 1,0%. Foram pipetados 100 µL de sangue total colhido em EDTA em uma placa de Kline e 200 µL do reativo hemolisante e incubado por 05 minutos. Em seguida aplicou-se na fita de acetato de celulose conforme descrito no item III.2.4.

Reagente:

Saponina a 1,0%	
Saponina PA	1g
Água destilada q.s.p.	100 mL

III.2.4 – Eletroforese alcalina em acetato de celulose (MARENGO-ROWE, 1965, modificado)

Inicialmente foram colocados 50 mL de solução tampão de corrida, Tris-EDTA-Borato (TEB) pH 8,5, em cada compartimento da cuba de eletroforese. As fitas de acetato de celulose foram embebidas por 15 minutos neste tampão. As fitas foram secadas entre duas folhas de papel absorvente e colocadas no suporte da cuba de eletroforese, de forma que elas mantivessem contato com a solução tampão nos dois compartimentos. As amostras previamente hemolisadas conforme item III.2.3 foram aplicadas a 1,0 cm da extremidade da fita em contato com o pólo negativo. Foram aplicados 300 volts por 40 minutos para a separação das frações de hemoglobinas.

A análise das frações foi realizada sem coloração, por comparação com amostras controle como: o padrão normal Hb AA, o padrão Hb AS ou ainda o padrão Hb AC. A eletroforese alcalina em acetato de celulose permitiu a separação de hemoglobinas normais e grande parte das anormais.

Reagente:

1. Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB), pH 8,5

Tris hidroximetilaminometano	10,2 g
Ácido etilenodiaminotetracético	0,6 g
Ácido bórico	3,2 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

III.2.5 – Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Foram diluídos 05 µL da amostra de sangue total, colhido com EDTA, em 01 mL de reagente de hemólise fornecido pelo Kit “β-Thalassemia” da Bio-Rad

Laboratories. O hemolisado foi colocado na placa leitora do aparelho VARIANT I programado com para o programa “ β -Thalassemia Short” (Bio-Rad Laboratories). Foi utilizado o kit de análise específico para a detecção de talassemia beta heterozigota que separa e quantifica as porcentagens para as Hb A₂ e F além de identificar as variantes mais comuns como Hb S, D, C e E.

Este equipamento possui um sistema fechado de cromatografia líquida de alta pressão, totalmente automatizado. Após a limpeza da coluna cromatográfica e sua calibração, por calibradores com base em amostras de Hb A₂ e Hb F o equipamento processou as amostras previamente diluídas, utilizando um sistema de duas bombas de êmbolo duplo que injeta uma mistura de tampões de diluição com controles de gradientes pré-programados que passam através da coluna de troca iônica, retendo as amostras de hemoglobinas na coluna, por meio de sua especificidade de cargas. Cada hemoglobina foi eluída da coluna e, as absorbâncias foram quantificadas em 415 nm. Um segundo filtro de 690 nm corrigiu a linha de base que podia apresentar alterações provocadas pela mistura de tampões com diferentes forças iônicas. Foi gerado então um cromatograma de absorbância x tempo de retenção. O tempo de retenção foi o tempo transcorrido da injeção da amostra até o ápice do pico de hemoglobina, sendo característico para cada hemoglobina.

III.2.6 – Pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H – PIEHH (PAPAYANNOPOULOS e STAMATAYANNOPOULOUS, 1974)

Em tubo de ensaio pequeno foram colocados 50 μ L de sangue total colhido com EDTA e adicionado 100 μ L de solução de azul cresil brilhante. O tubo foi agitado suavemente e incubado a 37°C por 2 horas. Posteriormente, esfregaços finos foram confeccionados para a observação dos agregados de Hemoglobina H ao microscópio em objetiva de imersão. A presença de

hemoglobina H nos eritrócitos apareceu como granulação fina distribuída homogeneamente.

Reagentes:

1.Solução salina

Cloreto de sódio	0,85 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

2.Solução citrato

Citrato de sódio	2,2 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

3.Solução de azul cresil brilhante

Azul cresil brilhante	1,0 g
Solução salina	100 mL
Solução citrato	25 mL

IV – RESULTADOS

As 64 amostras analisadas no presente estudo, de pacientes atendidos no Laboratório da Área da Saúde do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás, eram provenientes de 35 pacientes do sexo feminino e 29 do sexo masculino com idade variando entre 02 a 79 anos (tabela 3). A distribuição dos sujeitos da pesquisa quanto à faixa etária e sexo está demonstrada na figura 4.

TABELA 3 – IDADE E SEXO DOS 64 PACIENTES

Paciente	Idade	Sexo	Paciente	Idade	Sexo
1	40	F	33	30	F
2	14	F	34	49	F
3	16	F	35	55	F
4	13	M	36	43	F
5	49	F	37	32	F
6	36	F	38	68	F
7	25	M	39	63	F
8	43	M	40	54	F
9	43	M	41	59	M
10	26	F	42	10	M
11	19	F	43	25	F
12	49	M	44	22	F
13	26	M	45	19	M
14	04	F	46	02	M
15	13	F	47	06	M
16	10	F	48	37	M
17	08	M	49	13	M
18	11	M	50	22	F
19	37	M	51	05	M
20	08	F	52	26	F
21	29	F	53	60	M
22	07	F	54	49	F
23	06	M	55	16	F
24	23	F	56	17	M
25	52	F	58	04	M
26	44	F	59	28	F
27	06	M	60	51	M
28	20	M	61	52	M
29	47	M	62	40	F
30	38	F	63	15	M
31	30	F	64	18	M
32	79	F	65	21	M

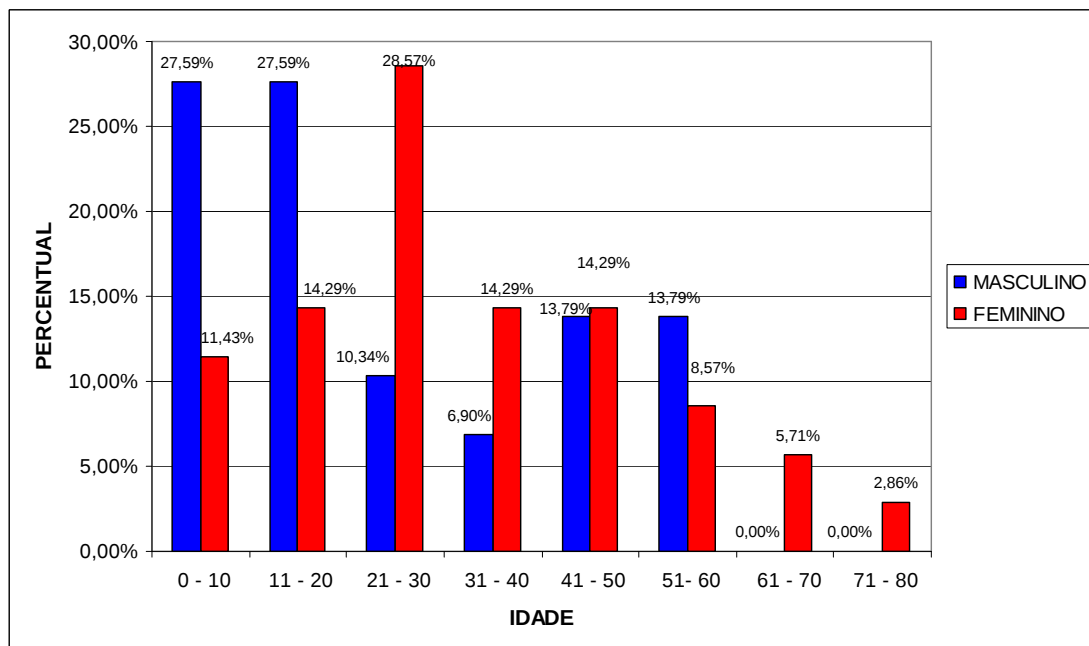


FIGURA 4 – Distribuição dos sujeitos da pesquisa quanto à faixa etária e sexo.

IV.1 – Eritrograma e análise da morfologia eritrocitária

Todas as 64 amostras foram inicialmente submetidas a uma análise laboratorial hematológica dos eritrócitos por meio do hemograma – eritrograma (tabela 4). O eritrograma é composto da contagem global de eritrócitos (hemácias – Hm), hematócrito (Ht), hemoglobina total (Hb) e dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM e RDW).

TABELA 4 – RESULTADO DO ERITROGRAMA DAS 64 AMOSTRAS **Continua**

	Hm	Ht	Hb	VCM	HCM	CHCM	RDW
1	5,37	42,1	13,3	78,4	24,8	31,6	13,8
2	4,57	39,1	12,5	85,6	27,4	32,0	12,6
3	5,03	43,5	14,3	86,5	28,4	32,9	13,2
4	5,89	45,0	14,3	76,4	24,3	31,8	13,2
5	4,58	40,9	13,1	89,3	28,6	32,0	13,6
6	4,87	41,9	13,5	86,0	27,7	32,2	13,1
7	5,65	45,8	15,0	81,1	27,0	32,8	13,8
8	5,46	43,7	14,2	80,0	26,0	32,5	13,8
9	4,16	37,3	12,3	89,7	29,6	33,0	11,2
10	5,40	32,1	9,3	59,0	17,2	28,9	18,0
11	5,31	39,8	13,3	75,0	25,0	33,4	13,7
12	5,66	34,7	11,0	61,0	19,5	31,8	15,4
13	5,80	40,1	11,5	69,1	19,8	28,7	16,7
14	3,96	27,4	9,4	69,2	23,7	34,3	25,4
15	5,28	39,9	13,5	75,6	25,6	33,8	15,6
16	5,16	41,7	13,3	80,8	25,8	31,9	13,9
17	4,96	36,0	12,2	72,6	24,6	33,9	15,0
18	2,42	24,5	8,0	101,2	33,1	32,7	15,1
19	5,15	44,1	15,1	85,6	29,3	34,2	13,6
20	4,49	33,4	10,7	75,0	23,9	32,1	13,8
21	4,53	37,9	12,6	83,7	27,8	33,2	13,3
22	4,73	37,3	13,0	78,9	27,5	34,9	13,4
23	4,88	36,9	12,0	76,0	24,5	32,4	13,1
24	4,76	46,5	14,6	99,0	31,1	31,5	9,9
25	4,52	39,5	13,8	87,4	30,5	34,9	12,1
26	5,26	37,6	12,0	71,4	22,8	31,9	14,1
27	5,52	33,9	10,6	61,4	19,2	31,2	17,5
28	2,44	19,5	7,2	79,9	29,5	36,9	19,1
29	4,99	44,6	14,8	89,4	29,7	33,2	12,4
30	5,82	40,0	12,4	69,0	21,4	31,1	14,1
31	3,96	27,4	9,4	69,2	23,7	34,3	24,0
32	3,73	31,4	10,2	84,0	27,3	32,5	16,5
33	4,30	38,9	12,8	90,5	29,8	32,9	10,0
34	4,76	28,6	9,1	60,0	19,1	31,9	14,0
35	4,55	41,5	13,8	91,0	30,2	33,2	10,4
36	4,48	40,6	13,3	91,0	29,7	32,7	10,5
37	4,68	40,4	13,1	86,0	27,8	32,3	10,7
38	4,21	40,2	13,3	95,0	31,5	33,0	10,5
39	4,15	37,0	12,4	89,0	29,9	33,6	11,3
40	4,74	44,0	14,5	92,8	30,6	33,0	11,2

Hm=contagem global de hemácia ($10^6/\mu\text{L}$); Ht=hematócrito (%); Hb=hemoglobina total (g/dL); VCM=volume corpuscular médio (fL); HCM=hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM=Concentração da Hemoglobina Celular Média (g/dL) e RDW=índice de anisocitose (%). Os valores destacados em vermelho estão abaixo dos valores de referência adotados.

TABELA 4 – RESULTADO DO ERITROGRAMA DAS 64 AMOSTRAS

	Hm	Ht	Hb	VCM	HCM	CHCM	RDW
41	5,26	46,6	15,3	89,0	29,1	32,8	12,6
42	4,27	39,2	13,8	92,0	30,0	32,7	11,9
43	2,73	26,8	9,0	98,0	32,8	33,4	16,8
44	2,72	27,4	8,7	101,0	32,1	31,9	14,1
45	4,76	45,6	14,6	96,0	30,8	32,1	11,7
46	4,50	27,2	9,2	61,0	20,5	33,9	15,2
47	4,18	32,5	10,7	78,0	25,6	33,0	14,0
48	3,61	32,1	10,3	89,0	28,5	32,1	13,8
49	6,65	40,3	11,9	61,0	17,9	29,5	16,4
50	5,52	34,9	10,6	63,0	19,0	30,4	15,5
51	5,81	34,7	11,3	59,7	19,4	32,5	18,8
52	3,91	34,5	11,2	88,0	28,5	32,4	12,0
53	5,25	34,5	10,8	66,0	20,6	31,2	14,7
54	6,06	45,4	14,8	75,0	24,4	32,5	12,9
55	3,90	33,4	10,9	86,0	27,9	32,6	12,1
56	2,99	22,8	7,5	76,2	32,9	33,0	24,3
58	4,25	33,5	10,9	78,8	25,7	32,5	15,4
59	3,54	32,1	12,0	90,7	31,0	34,2	12,6
60	4,26	40,7	14,4	84,0	28,0	34,0	12,4
61	5,56	39,1	12,3	70,3	22,1	31,5	16,2
62	5,20	42,0	13,4	80,8	25,8	31,9	15,0
63	5,33	32,8	9,4	61,5	17,6	28,7	23,2
64	6,49	40,7	12,8	62,7	19,7	31,4	16,8
65	6,40	50,8	16,1	79,0	25,2	31,7	15,4

Hm=contagem global de hemácia ($10^6/\mu\text{L}$); Ht=hematócrito (%); Hb=hemoglobina total (g/dL); VCM=volume corpuscular médio (fL); HCM=hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM=Concentração da Hemoglobina Celular Média (g/dL) e RDW=índice de anisocitose (%). Os valores destacados em vermelho estão abaixo dos valores de referência adotados.

IV.2 – Resistência Globular Osmótica em Cloreto de Sódio a 0,36%

As tabelas 5 e 6 mostram o resultado do teste de resistência globular osmótica em cloreto de sódio a 0,36% das 64 amostras. Para melhor visualização dos resultados, estas tabelas apresentam também o valor do VCM para efeito de comparação entre a resistência osmótica e o volume dos eritrócitos.

TABELA 5 – AMOSTRAS RESISTENTES AO TESTE DE RESISTÊNCIA GLOBULAR OSMÓTICA EM NaCl A 0,36% E OS VALORES DE VCM

Paciente	Resistência a Salina	VCM (fL)
10	R	59,0*
11	R	75,0*
12	R	61,0*
13	R	69,1*
14	R	69,2*
15	R	75,6*
17	R	72,6*
23	R	76,0
26	R	71,4*
27	R	61,4*
31	R	69,2*
34	R	60,0*
46	R	61,0*
49	R	61,0*
51	R	59,7*
53	R	66,0*
61	R	70,3*
63	R	61,5*

R = Resistente; VCM = Volume Corpuscular Médio expresso em fL

* Valores alterados em relação ao valor de referência

TABELA 6 – AMOSTRAS NÃO RESISTENTES AO TESTE DE RESISTÊNCIA GLOBULAR OSMÓTICA EM NaCl À 0,36% E OS VALORES DE VCM

Paciente	Resistência a Salina	VCM (fL)
1	NR	78,4*
2	NR	85,6
3	NR	86,5
4	NR	76,4*
5	NR	89,3
6	NR	86,0
7	NR	81,1
8	NR	80,0
9	NR	89,7
16	NR	80,8
18	NR	101,2
19	NR	85,6
20	NR	75,0*
21	NR	83,7
22	NR	78,9
24	NR	99,0
25	NR	87,4
28	NR	79,9*
29	NR	89,4
30	NR	69,0*
32	NR	84,0
33	NR	90,5
35	NR	91,0
36	NR	91,0
37	NR	86,0
38	NR	95,0
39	NR	89,0
40	NR	92,8
41	NR	89,0
42	NR	92,0
43	NR	98,0
44	NR	101,0
45	NR	96,0
47	NR	78,0
48	NR	89,0
50	NR	63,0*
52	NR	88,0
54	NR	75,0*
55	NR	86,0
56	NR	76,2*
58	NR	78,8
59	NR	90,7
60	NR	84,0
62	NR	80,8
64	NR	62,7*
65	NR	79,0*

NR = Não Resistente; VCM = Volume Corpuscular Médio expresso em fL

* Valores alterados em relação ao valor de referência

IV.3 – Eletroforese alcalina em acetato de celulose pH 8,5

As 64 amostras foram hemolisadas com o detergente biológico saponina à 1,0% para realização da eletroforese alcalina de hemoglobinas em acetato de celulose, os resultados do perfil eletroforético estão descritos na tabela 7. A figura 5 mostra a eletroforese alcalina em acetato de celulose de alguns pacientes. Na raia 01 o paciente 42 apresenta o perfil AA, na raia 02 o perfil SS do paciente 43, na raia 03 o perfil AS do paciente 02, na raia 04 o perfil AC do paciente 46. Na raia 05 o paciente 47, além de apresentar um perfil AA₂, apresentou também uma banda eletroforética com migração mais rápida que a Hb A, não identificada por esta metodologia, porém levando a suspeitar de Hb H, Hb J ou Hb N.

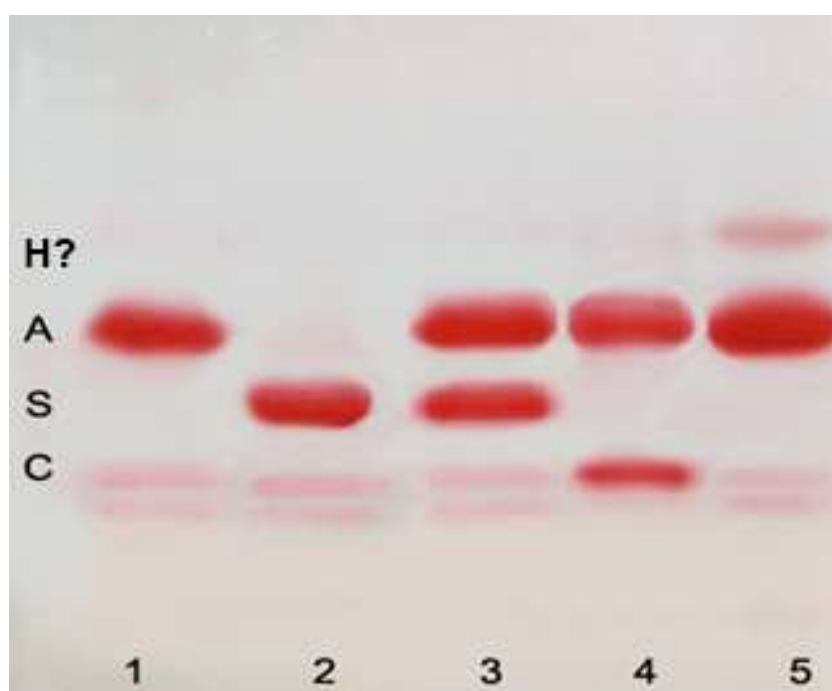


FIGURA 5 – Perfil eletroforético em acetato de celulose pH 8,5. 1) Paciente 42: perfil AA – hemoglobina normal; 2) Paciente 43: perfil SS – homozigoto para Hb S; 3) Paciente 02: perfil AS – heterozigoto para Hb S; 4) Paciente 46: perfil AC – heterozigoto para Hb C e 5) Paciente 47: perfil AH? – alfa talassemia

TABELA 7 – RESULTADO DO PERFIL ELETROFORÉTICO EM ACETATO DE CELULOSE EM TAMPÃO TEB pH 8,5 DAS 64 AMOSTRAS

Paciente	Eletroforese alcalina	Paciente	Eletroforese alcalina
1	ASH	33	AH
2	AS	34	A A ₂
3	AH	35	AA
4	AH	36	AA
5	AH	37	AA
6	AA	38	AA
7	AA	39	AA
8	AH	40	AA
9	AH	41	AA
10	AH	42	AA
11	AC	43	SS
12	A A ₂	44	SS
13	A A ₂	45	SC
14	CC	46	AC
15	AC	47	AA ₂ **
16	AA	48	AS
17	AC	49	A A ₂
18	SS	50	A A ₂
19	AS	51	A A ₂
20	AA	52	AF
21	AA	53	A A ₂
22	AA	54	AA
23	AA	55	AF
24	AS	56	AH
25	AF	58	AH
26	AC	59	AH
27	AC	60	AH
28	SS	61	A A ₂
29	AH	62	AF
30	AA ₂	63	FF
31	CC	64	A A ₂
32	SC	65	AF

**Presença de outra banda eletroforética não identificada (suspeita de Hb H, J ou N)

IV.4 – Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

As 64 amostras foram submetidas a uma análise quantitativa das hemoglobinas por meio da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) que determinou o percentual de cada hemoglobina, normal ou variante. Estes dados estão apresentados na tabela 8.

TABELA 8 – RESULTADO DO PERCENTUAL DAS HEMOGLOBINAS NORMAIS E VARIANTES IDENTIFICADAS POR HPLC NO APARELHO VARIANT I (BioRad) DAS 64 AMOSTRAS

Paciente	Hb A	Hb A ₂	Hb F	Hb Variante	Paciente	Hb A	Hb A ₂	Hb F	Hb Variante
1	59,0	4,5	0,2	S=36,3	33	98,0	2,0	0,0	
2	57,1	5,3	0,6	S=37,0	34	93,0	5,9	1,1	
3	97,4	2,6	0,0		35	97,7	2,1	0,2	
4	97,9	2,1	0,0		36	97,8	2,0	0,2	
5	98,1	1,9	0,0		37	97,0	2,1	0,9	
6	97,7	2,1	0,2		38	97,7	2,1	0,2	
7	97,9	1,8	0,3		39	97,9	2,0	0,1	
8	98,1	1,9	0,0		40	97,8	2,0	0,2	
9	97,5	2,0	0,5		41	97,7	2,1	0,2	
10	97,8	2,2	0,0		42	98,0	2,0	0,0	
11	57,6	3,5	0,3	C=38,6	43	19,0	3,3	3,0	S=74,7
12	93,5	5,7	0,8		44	5,7	3,2	13,3	S=77,8
13	92,7	5,7	1,6		45	0,0	3,6	1,5	S=51,3
									C=43,6
14	5,9	3,9	1,1	C=89,1	46	62,4	4,0	1,0	C=32,6
15	59,8	3,6	0,3	C=36,3	47	93,1	3,9	0,0	***3,0
16	96,9	2,4	0,7		48	57,6	4,4	0,6	S=37,4
17	57,7	3,4	0,0	C=39,6	49	93,0	6,4	0,6	
18	2,5	4,7	14,0	S=78,8	50	94,2	4,9	0,9	
19	52,5	3,4	0,0	S=44,1	51	94,0	5,2	0,8	
20	96,5	3,0	0,5		52	92,9	2,0	5,1	
21	96,9	3,1	0,0		53	92,6	4,5	2,9	
22	96,9	3,1	0,0		54	95,2	3,4	1,4	
23	96,9	3,1	0,0		55	93,2	2,4	4,4	
24	53,7	5,5	1,1	S=39,7	56	96,0	3,5	0,5	
25	91,1	2,2	6,7		58	96,0	3,2	0,8	
26	69,1	3,4	0,0	C=27,5	59	98,0	2,0	0,0	
27	66,2	2,9	0,0	C=30,9	60	97,1	2,0	0,9	
28	0,0	1,9	9,2	S=88,9	61	94,9	5,1	0,0	
29	97,7	1,6	0,7		62	68,4	2,1	29,5	
30	95,1	3,9	1,0		63	5,2	3,5	91,3	
31	0,0	2,8	2,3	C=94,9	64	94,0	5,3	0,7	
32	4,3	3,2	5,4	S=45,2	65	67,6	2,1	30,3	
				C=41,9					

***Presença de uma fração desconhecida numa concentração igual a 3,0%

IV.5 – Pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H – PIEHH

Um total de 15 amostras apresentou quadro sugestivo de talassemia alfa sendo então submetidas à pesquisa intra-eritrocitária de Hb H pela técnica de coloração com azul de crezil brilhante (tabela 9). Treze dessas amostras sugeriam talassemia alfa por apresentar na eletroforese alcalina de hemoglobina uma banda com migração eletroforética mais rápida que a Hb A, compatível com a Hb H. A amostra 02, apesar de não apresentar Hb H na eletroforese, nem microcitose e hipocromia no eritrograma, foi proveniente de uma paciente cuja mãe apresentou Hb H (paciente 1). A amostra 47, embora ter apresentado anemia normocítica e normocrômica, apresentou uma banda mais rápida que a Hb A na eletroforese alcalina, que permaneceu até o final da corrida eletroforética.

TABELA 9 – RESULTADO DA ELETROFORESE ALCALINA, VCM, HCM E DA PIEHH DAS 15 AMOSTRAS SUGESTIVAS DE TALASSEMIA ALFA

	Eletroforese alcalina	VCM	HCM	PIEHH
1	ASH	78,4*	24,8*	NEGATIVA
2	AS	85,6	27,4	NEGATIVA
3	AH	86,5	28,4	NEGATIVA
4	AH	76,4*	24,3*	NEGATIVA
5	AH	89,3	28,6	NEGATIVA
8	AH	80,0	26,0	NEGATIVA
9	AH	89,7	29,6	NEGATIVA
10	AH	59,0*	17,2*	POSITIVA
29	AH	89,4	29,7	NEGATIVA
33	AH	90,5	29,8	NEGATIVA
47	AA ₂ (H, J ou N)	78,0	25,6	NEGATIVA
56	AH	76,2*	32,9	NEGATIVA
58	AH	78,8	25,7	NEGATIVA
59	AH	90,7	31,0	NEGATIVA
60	AH	84,0	28,0	NEGATIVA

Hm=contagem global de hemácia ($10^6/\mu\text{L}$); Ht=hematócrito (%); Hb=hemoglobina total (g/dL); VCM=volume corpuscular médio (fL); HCM=hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM=Concentração da Hemoglobina Celular Média (g/dL) e RDW=índice de anisocitose (%). Os valores destacados em vermelho estão abaixo dos valores de referência adotados. PIEHH=pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H.

* Valores alterados em relação ao valor de referência

V – DISCUSSÃO

V.1 – Eritrograma e análise da morfologia eritrocitária

Para realização deste estudo as 64 amostras dos pacientes foram primeiramente submetidas a uma análise hematológica pelo hemograma. Este exame avalia quantitativamente e qualitativamente as três séries de células sangüíneas: leucócitos, eritrócitos e trombócitos (LORENZI, 2006). A avaliação dos eritrócitos é, portanto realizada no eritrograma, cujos resultados estão relacionados na tabela 4.

O eritrograma forneceu os dados para a classificação morfológica das anemias. Os princípios de funcionamento do equipamento utilizado, descrito no item III.2.1, são: a impedância, a citometria de fluxo, a citoquímica e a espectrofotometria. A contagem global das células, neste caso os eritrócitos, foi feita quando ocorreu a passagem de uma célula pela abertura de um contador de impedância que gerou um pulso elétrico cuja altura foi proporcional ao volume da célula. A análise da altura dos pulsos determinou o valor do hematócrito e do VCM sendo que computando a média de amplitude dos pulsos, obteve-se o VCM e multiplicando pelo número de eritrócitos obteve-se o hematócrito. De forma recíproca, quando a altura dos pulsos foi somada, tivemos o hematócrito e dividindo-o pela contagem de eritrócitos, tivemos o VCM (LEWIS; BAIN e BATES, 2006, cap.3).

A espectrofotometria é usada para a dosagem da hemoglobina que é o índice utilizado pela Organização Mundial de Saúde como critério para caracterizar a presença de anemia. Portanto é considerado anemia quando um adulto apresentar níveis de hemoglobina menor que 12,5 g/dL, crianças de 6 meses a 6 anos hemoglobina menor que 11,0 g/dL e crianças de 6 a 14 anos hemoglobina menor que 12,0 g/dL. A citometria de fluxo e a citoquímica são

utilizadas para a diferenciação morfológica dos glóbulos brancos (LEWIS; BAIN e BATES, 2006, cap.3).

Os índices hematimétricos, VCM, HCM, CHCM e o RDW classificam as anemias quanto à variação do tamanho dos eritrócitos (anisocitose) e do conteúdo hemoglobínico (anisocromia). Portanto, para os adultos, as anemias cujo VCM e HCM são respectivamente menores que 80 fL e 27 pg são microcíticas e hipocrômicas, quando o VCM e HCM estão entre 80 - 102 fL e 27 - 32 pg são então classificadas como normocíticas e normocrômicas e as que se encontram com os índices maiores que 102 fL e 32 pg são denominadas macrocíticas e hiperocrômicas (tabela 10) (ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004).

TABELA 10 – VALORES DE REFERÊNCIA ADOTADOS

ERITROGRAMA				
	MASCULINO ADULTO	FEMININO ADULTO	CRIANÇA 2 a 6 ANOS	CRIANÇA 6 a 12 ANOS
Hemácias (10 ⁶ / µL)	4,20 – 6,30	3,80 – 5,50	4,00 – 5,20	4,00 – 5,20
Hematócrito (%)	40,0 – 52,0	37,0 – 47,0	34,0 – 40,0	35,0 – 45,0
Hemoglobina (g/dL)	14,0 – 18,0	12,0 – 16,0	11,0 – 14,0	11,5 – 15,5
VCM (fL)	80,0 – 102,0		75,0 – 87,0	77,0 – 95,0
HCM (pg)	27,0 – 32,0		24,0 – 30,0	25,0 – 33,0
CHCM (g/dL)	30,0 – 35,0		31,0 – 37,0	31,0 – 37,0
PERCENTUAL DE HEMOGLOBINAS NORMAIS				
Hb A	96,0 – 98,0			
Hb A ₂	2,0 – 3,3			
Hb F	0 – 1,0			

FONTE: ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004, p.83 e 276 e LEWIS; BAIN e BATES, 2006, p.27 e 217

Existe uma considerável variação fisiológica nos valores para eritrócitos e hemoglobinas nos diversos períodos da vida. Ao nascimento tanto a contagem de eritrócitos quanto a dosagem de hemoglobina são elevadas em comparação com qualquer período subsequente (LEWIS; BAIN e BATES, 2006). Por este motivo foram adotados valores de referências correspondentes a idade do paciente, conforme apresentado na tabela 10.

Como pode ser observado na tabela 4, 30 pacientes apresentaram níveis diminuídos de hemoglobina total (Hb), o que permite classificar como um quadro de anemia. Das 64 amostras 27 apresentaram VCM abaixo dos valores de referência caracterizando-as como microcíticas. Com HCM abaixo dos valores de referência foram encontrados 27 amostras, caracterizando-as como hipocrômicas. Nem todas as 27 amostras coincidem com as 27 amostras microcíticas. BORGES *et al*, (2001) demonstraram que a talassemia alfa, em especial, a deletional $\alpha^{3,7}$ é uma importante causa de microcitose e hipocromia em indivíduos sem anemia.

Com relação ao índice de anisocitose (RDW) que indica a variação do tamanho dos eritrócitos analisados, 27 amostras apresentaram valores fora da normalidade (> 14%). Alguns trabalhos revelam que o RDW muito elevado (acima de 16%), indicando uma grande variação no tamanho dos eritrócitos, está associado às anemias ferroprivas (MELO *et al*, 2002; WAGNER *et al*, 2005).

Por meio do resultado do eritrograma sugere-se que as amostras com anemia microcítica, hipocrômica, sem anisocitose ou com discreta anisocitose, sejam de portadores de talassemias, do tipo alfa ou do tipo beta. Treze pacientes (10, 12, 13, 20, 26, 27, 30, 34, 46, 49, 50, 53 e 61) seguiram este critério. Cinco pacientes (14, 28, 31, 56 e 63) apresentaram anemia microcítica, hipocrômica com intensa anisocitose caracterizando uma anemia carencial (ferropriva).

Apesar destes dados sugerirem talassemia a próxima investigação deveria ser a quantificação das reservas de ferro (dosagem de ferro sérico e ferritina), para exclusão da suspeita de anemia ferropênica. Pois na anemia carencial os valores hematimétricos são semelhantes.

Neste trabalho não se deve considerar esta elevada frequência (20,3%), uma vez que a seleção do grupo amostral foi realizada dando preferência a pacientes que apresentaram hemogramas alterados. Algumas amostras com dados hematimétricos normais foram incluídas para permitir uma melhor comparação e discussão dos resultados.

Como pode ser visto na tabela 4 o eritrograma trouxe muitas informações para o clínico. Essas informações foram importantes para se detectar e classificar as anemias. Entretanto estas informações não são suficientes para dar diagnósticos conclusivos. Os resultados do eritrograma variaram de acordo com a idade, sexo, genótipo, estado nutricional dos pacientes, interferentes ambientais e regionais. Os dados apresentados na tabela 4 necessitam de uma análise muito criteriosa que permita diagnosticar com precisão os diferentes tipos de anemia. Assim, outras metodologias devem ser utilizadas para auxiliar na elaboração de um diagnóstico adequado, o qual resultará no direcionamento do tratamento clínico a ser empregado (CHINETATO-FERNADES e BONINI-DOMINGOS, 2006; LEWIS; BAIN e BATES, 2006; OLIVEIRA; MENDIBURU e BONINI-DOMINGOS, 2006).

V.2 – Resistência Globular Osmótica em Cloreto de Sódio a 0,36%

Independente do resultado do eritrograma, todas as 64 amostras foram submetidas ao teste de resistência osmótica em salina 0,36% (tabelas 5 e 6). Este teste foi desenvolvido na Itália para triagem de amostras que apresentavam eritrócitos microcíticos característicos das talassemias beta e alfa. Todavia outras anormalidades nos eritrócitos podem conferir a eles esta resistência, como a presença de hemoglobinas variantes S, C e D, e ainda a

microcitose em decorrência de outras anemias não hereditárias, como a anemia ferropriva e a anemia de doença crônica (SILVESTRONI e BIANCO, 1975).

O teste de resistência osmótica pode ser influenciado pelo tipo de hemoglobina variante, pela concentração de Hb total presente na célula, pelo genótipo e pelo estado nutricional do paciente.

As tabelas 5 e 6 associam os resultados da prova de resistência osmótica com os valores de VCM. Nem todas as dezoito amostras (10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 23, 26, 27, 31, 34, 46, 49, 51, 53, 61 e 63) que apresentaram resistência osmótica, ou seja, teste positivo, característico de um eritrócito microcítico apresentaram VCM diminuído. A amostra de número 23 apresentou VCM normal.

Das 46 amostras não resistentes, ou seja, que hemolizaram, caracterizando um teste negativo (fig. 6), 35 eram normocíticas (VCM normal), sendo este o resultado esperado para este grupo de células. Entretanto 10 amostras apresentaram VCM diminuído e uma amostra apresentou VCM elevado (tabela 6).

Como pode ser observado este ensaio não foi muito informativo, visto que muitos fatores podem interferir no resultado final. Apesar disso, a maior parte dos trabalhos envolvendo hemoglobinopatias, em especial as talassemias, utiliza esta metodologia como ferramenta de auxílio diagnóstico (CHINETATO-FERNADES e BONINI-DOMINGOS, 2006; WAGNER *et al*, 2005, CLARKE e HIGGINS, 2000).

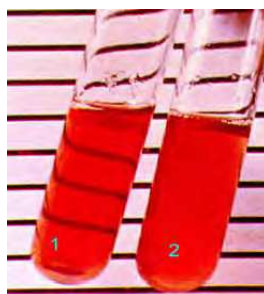


FIGURA 6 – Resistência globular osmótica em cloreto de sódio a 0,36%. O tubo 01 ilustra um teste não resistente (negativo) e o tubo 02 um teste resistente (positivo). FONTE: <<http://www.hemoglobinopatias.com.br/>> Acesso em: 18 de novembro de 2008

V.3 – Eletroforese alcalina em acetato de celulose pH 8,5

A eletroforese alcalina em acetato de celulose é uma metodologia muito importante na triagem das hemoglobinopatias, pois permite diferenciar entre anemias carenciais e hereditárias. As 64 amostras foram submetidas a eletroforese alcalina em acetato de celulose mesmo não apresentando alterações indicativas de anemias no eritrograma (tabela 7 e fig. 5).

Algumas mutações causam a substituição de aminoácidos com diferentes cargas elétricas diferenciando algumas hemoglobinas variantes. Porém, certas alterações na molécula da hemoglobina não alteram a carga elétrica e isso faz com que algumas possuam a mesma mobilidade eletroforética que a Hb A. Assim, a separação destas variantes deve ser feita usando-se outras metodologias, como por exemplo, a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). A eletroforese possui limitações ainda no diagnóstico das hemoglobinas de migração rápida, como a Hb H e Hb Bart's. (CLARKE e HIGGINS, 2000).

O perfil eletroforético das amostras analisadas foi definido por comparação com o mapa de mobilidade eletroforética das hemoglobinas (fig. 7) e a tabela 7 descreve os resultados encontrados.

Na tabela 7 estão resumidos os perfis encontrados. Dos 64 pacientes 11 (17,19%) apresentaram a Hb S, sendo quatro destes homozigotos (SS), cinco heterozigotos (AS) e dois apresentando também a Hb C (SC).

	Acetato de Celulose						Agar Citrato					
	+	0 A	-2.6 F	-5.2 S	-10 A ₂	-	-	-4.4 F	-0 A	+5.8 S	+10 C	+
S				■	-5.2					■	+5.8	
C					■	-10					■	+10
*E					■	-10			■	0		
Lepore				■	-5				■	0		
G Philadelphia				■	-5.2				■	0		
D Punjab				■	-5.2				■	0		
O-Arab					■	-9.7			■	+1.7		
*Hasharon				■	-5.5				■	+6.25	■	
H	■	+8.5							■	0		
Constant Spring					■	-11.9			■	0		
Malmo	+0.5	■							■	-1.1		
A ₂ '					■	-11.1			■	0		
Wood	0	■							■	-2.25		
Barts	■	+7.6						■	-4.0			
*Köln					■	-7.5		■	-2.5			
N Baltimore	■	+6.6							■	0		
ASG Philadelphia	0	■		■	-10	■			■	0	■	+5.8
J Oxford	■	+4.6							■	0		
J Baltimore	■	+4.3							■	0		
*Tacoma	+0.9	■							■	0		
*Lufkin	■	+3.2							■	0		
*Camperdown		■							■	0		
K	+0.8	■						■	-4.0			
Hope	+0.8	■						■	-4.0			
Camdem	■	+1.6						■	-2.8			
New York	■	+1.5							■	0		
*G San Jose			■	-3.6					■	+7.5	■	
C Harlem					■	-10.0			■	+5.8	■	

FIGURA 7 – Mobilidade eletroforética de hemoglobinas em acetato de celulose e ágar citrato. Manual de eletroforese de hemoglobinas da Helena Laboratories disponível em: <<http://www.helena.com/procedures/pro015%20rev6.pdf>> Acesso em: 12 de julho de 2007

A hemoglobina C foi detectada em dez amostras (15,62%) das quais 06 eram heterozigotas (AC), 02 homozigotas (CC) e duas apresentando Hb S (SC).

Treze pacientes (20,31%) apresentaram uma banda eletroforética com migração mais rápida que a da Hb A que não permanecia até o final da corrida eletroforética desaparecendo ao longo dos primeiros 15 minutos, levando a suspeitar de Hb H (AH), quadro sugestivo de talassemia alfa. Vale a pena destacar que o paciente número um apresentou a Hb H em associação com hemoglobina S (ASH).

Uma amostra, a de número 47, apresentou uma banda com migração também mais rápida que a da Hb A, porém permanecendo até o final dos 40 minutos da corrida eletroforética sugerindo Hb J ou N segundo a figura 7. No entanto, por esta metodologia não é possível afirmar o perfil desta amostra.

O aumento da banda eletroforética correspondente a Hb A₂ foi observado em 11 amostras sugerindo talassemia beta. O aumento da Hb F que também é outro indicativo da presença de talassemia beta foi determinado em seis pacientes. Dezesete pacientes (26,56%) tiveram Hb A₂ ou Hb F aumentadas caracterizando talassemia beta. No entanto, sem a confirmação destes aumentos, fazendo efetivamente a quantificação destas frações, não se pode afirmar que são portadores destas talassemias (LEONELI *et al*, 2000; WEATHERALL, 1997).

V.4 – Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

Dentre as metodologias utilizadas para diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias, a análise por HPLC é a mais precisa, entretanto é uma metodologia pouco acessível aos laboratórios de pequeno porte, uma vez seu custo é bastante oneroso. Para confirmar os resultados obtidos pela eletroforese alcalina, as amostras de todos os pacientes foram analisadas por

HPLC, utilizando o equipamento VARIANT I com o programa “ β -Thalassemia Short” (Bio-Rad Laboratories) (fig. 8).

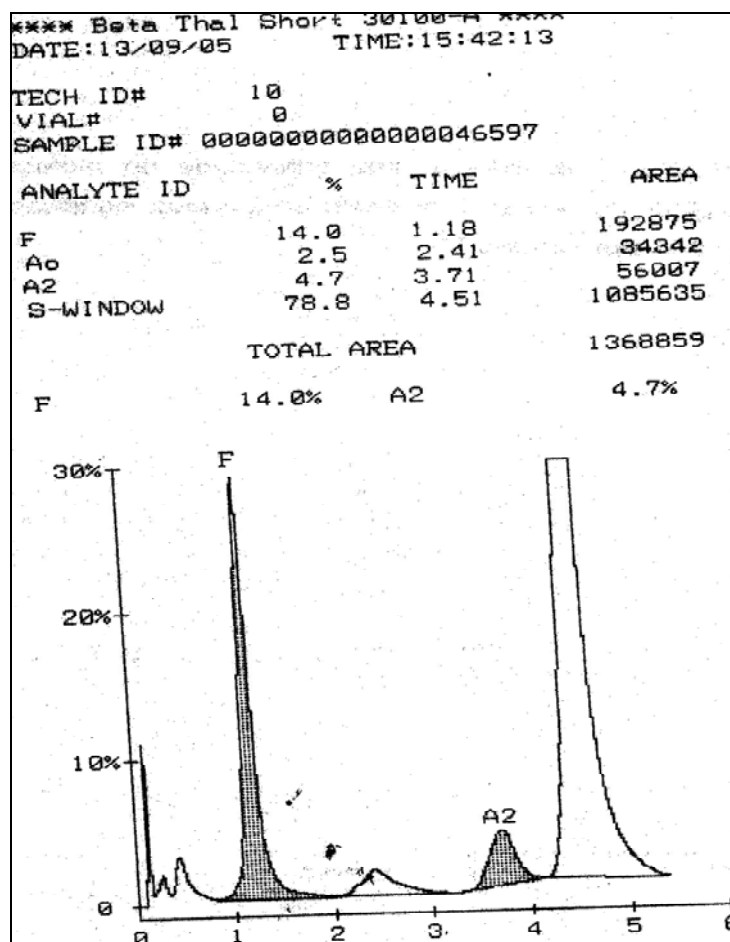


FIGURA 8 – Perfil cromatográfico do paciente 18 portador de Hb S realizado no equipamento Variant I com o programa “ β -thalassemia short” (Bio-Rad Laboratories)

JOUTOVSKY; HADZI-NESIC e NARDI (2004) afirmam em seu trabalho que a técnica de HPLC é excelente, segura, reprodutível e uma ótima ferramenta para a identificação direta de hemoglobinas variantes, com alto grau

de precisão na quantificação de suas frações sendo superior a eletroforese convencional para a identificação das hemoglobinas variantes e talassemias.

No entanto, outros autores afirmam que a HPLC também possui problemas de interpretação intrínseca como a co-eluição de algumas frações de hemoglobinas (CLARKE e HIGGINS, 2000; FUCHAROEN *et al*, 1998). CLARKE e HIGGINS (2000) utilizando o equipamento VARIANT I ("β-Thalassemia Short") da Bio-Rad Laboratories detectaram que a Hb E, Hb Osu Christianbourg e a Hb G Copenhagen co-eluem com a Hb A₂.

Os resultados das análises utilizando a HPLC, os tipos de hemoglobinas presentes e seus percentuais, são mostrados na tabela 8. Todos os perfis eletroforéticos (tabela 7) que apresentaram as hemoglobinas variantes S e C foram confirmados e quantificados. Através desta metodologia foi possível separar as hemoglobinas S da D e a C da A₂ que não podem ser separadas na eletroforese alcalina. O paciente 47, que na eletroforese alcalina apresentou uma banda eletroforética desconhecida, apresentou uma fração cromatográfica que não foi identificada. Esta fração apresentou uma concentração de 3,0%, com tempo de retenção de 1,58 minutos (tabela 8).

Os quatro pacientes com perfil SS (18, 28, 43 e 44) apresentaram níveis aumentados de Hb F que não foram observados na metodologia de eletroforese alcalina. Segundo (WEATHERALL e CLEGG, 2001a), em pacientes com anemia falciforme (SS) a presença de níveis aumentados de Hb F tem sido considerada um fator importante para determinar a gravidade da doença. A elevação da concentração da Hb F ajudaria na diminuição da anemia hemolítica, na inibição da polimerização intracelular de Hb S e na diminuição da intensidade de hemólise, sendo considerado um bom prognóstico para o paciente.

Na eletroforese alcalina foram detectados 11 pacientes com elevação dos níveis de hemoglobina A₂ e seis com elevação de Hb F (tabela 7). Estas elevações foram confirmadas e quantificadas pela análise de HPLC, conforme demonstra a tabela 8. No entanto, o aumento da concentração da Hb A₂ também foi detectado em outros três pacientes (54, 56 e 63). Este pequeno

incremento foi difícil de ser percebido visualmente na técnica de eletroforese alcalina evidenciando uma limitação desta técnica. Os dados de HPLC mostra que 14 amostras apresentaram concentração elevada de Hb A₂ sugerido talassemia beta (tabela 8).

A tabela 8 mostra que das 14 amostras com aumento de Hb A₂, onze apresentaram valores entre 3,4 e 6,4% levando a suspeitar de talassemia beta heterozigótica, que segundo alguns autores (ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004 e LEWIS; BAIN e BATES, 2006), valores maiores que 3,3% para Hb A₂ e entre zero e 5,0% de Hb F devem ser investigados para esta condição. O resultado do paciente 47 demonstrou uma associação entre talassemia beta e uma hemoglobina variante não identificada. Os resultados do paciente 56 mostram uma interação entre talassemia beta e talassemia alfa (tabela 7 e 8). O paciente 63 além de apresentar valores elevados para Hb A₂ possuía 91,3% de Hb F, típico de talassemia beta maior.

O aumento da concentração de Hb F foi determinado em dez pacientes, o paciente 63 e os pacientes 13, 25, 34, 52, 53, 54 e 55 que mostraram um quadro sugestivo de talassemia beta heterozigótica e dois pacientes (62 e 65) com suspeita de talassemia beta intermédia (tabela 8). Nestas amostras foram detectadas de Hb F variando entre 20 e 30% o que caracteriza o quadro de talassemia beta intermediária (NAOUM e NAOUM, 2004).

Na tabela 8 observamos ainda que alguns pacientes que apresentaram a Hb S ou C mostraram aumento na concentração de Hb A₂. Estes pacientes não entraram na tabela de suspeitos de portadores de talassemia beta porque vários trabalhos já demonstraram que a técnica de HPLC sofre interferências na quantificação de Hb A₂ em amostras que contém a presença de hemoglobinas variantes, em especial a S (SUB, KRAUSS & BURES, 1996; WILD e STEPHENS, 1997). SUB, KRAUSS & BURES, (1996) e WILD e STEPHENS (1997), afirmam que a concentração de Hb A₂ verificada por HPLC não pode ser considerada, porque parte das Hb S adulteradas eluem na janela da Hb A₂, superestimando a concentração de Hb A₂. Portanto, outra metodologia para a quantificação exata de Hb A₂ deveria ser aplicada.

O kit diagnóstico para beta talassemia que foi utilizado no equipamento VARIANT I (BIORAD) para a análise do perfil cromatográfico das amostras em estudo não possui um sistema de identificação para a Hb H.

V.5 – Pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H – PIEHH

Na avaliação morfológica das células sangüíneas utilizando corantes hematológicos panóticos, como o Giemsa e o Leishman, que são corantes alcoólicos, os corpúsculos de Hb H desaparecem por dissolução. Para a visualização destes corpúsculos é necessária a PIEHH. A PIEHH é uma análise citológica com coloração vital aquosa (azul de crezil brilhante) dos tetrâmeros de cadeia beta formados homogeneamente no interior dos eritrócitos como pequenos pontos azulados, dando a célula um aspecto de “bolas de golfe”.

A Hb H é formada apenas por cadeias de globina beta, demonstrando a carência na síntese da cadeia de globina alfa, sendo este o quadro que define a talassemia alfa. A quantidade de Hb H presente nas células está relacionada com o grau de lesão do gene alfa, bem como a severidade da doença (CANÇADO, 2006; PEDROLLO; HUTZ e SALZANO, 1990; NAOUM, 1997).

As amostras dos 13 pacientes que apresentaram a suposta Hb H na eletroforese alcalina (fig. 9) foram submetidas à pesquisa intra-eritrocitária de Hb H (PIEHH), conforme dados relacionados na tabela 9, no entanto, somente em uma amostra (10) foram visualizadas as inclusões nos eritrócitos (fig. 2).

As amostras dos pacientes 2 e 47 também foram submetidas a esta análise (tabela 9). A amostra 2 foi testada por se tratar de uma paciente filha de outra que apresentou Hb H na eletroforese (paciente 1), no entanto, a pesquisa foi negativa. O paciente 47 apresentou um perfil eletroforético semelhante a Hb H por isso foi submetido a esta análise para auxílio diagnóstico.

A concentração de Hb H está diretamente relacionada com número de genes alfa afetados. Quando apenas um gene é afetado, a concentração de Hb H tende a ser pequena, este fato diminui o número de corpúsculos de inclusão

(uma inclusão em cada 1000-10000 eritrócitos). Este dado poderia explicar a detecção de Hb H apenas na eletroforese alcalina. Quando três dos quatro genes alfa são afetados, ocorre uma grande formação de corpúsculos de inclusão, evidenciando a presença de Hb H por esta metodologia (típicas inclusões em 30 a 100% dos eritrócitos) (CLARKE e HIGGINS, 2000; RIBEIRO e ARAÚJO, 1992).

CLARKE e HIGGINS (2000) ainda afirmam que o padrão de coloração da Hb H no interior dos eritrócitos não se distingue do padrão de coloração de reticulócitos (ácido nucléico) ou de corpúsculos de Howell Jolly (proteína precipitada), ratificando a imprecisão desta técnica.

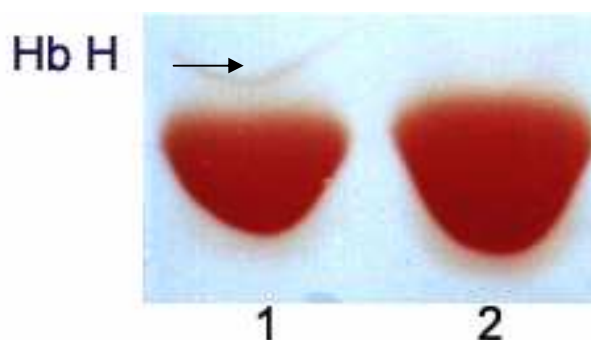


FIGURA 9 – Eletroforese alcalina em acetato de celulose pH 8,5. 1) Paciente 33: perfil AH; 2) Paciente 06: controle normal AA

V.6 – Dificuldades na detecção de talassemia alfa

DIAS-PENNA *et al*, (2009) estudaram dez crianças, bem como seus genitores, que apresentaram presença de Hb H na eletroforese alcalina. As amostras de sangue destes pacientes foram coletadas nos anos de 2001, 2004 e 2006. O estudo demonstrou que a presença de Hb H pode ser temporária. Das dez crianças avaliadas, oito apresentaram resultados conflitantes, ora a Hb

H era visualizada e ora não era observada. Esse mesmo padrão foi observado para alguns dos pais avaliados.

Os dados sugerem que a visualização de Hb H na eletroforese pode ser influenciada por outros fatores. A talassemia alfa além de estar associada a defeitos genéticos pode estar associada a um desbalanciamento temporário na expressão dos genes das globinas, diminuição de alfa ou aumento de beta, o que poderia explicar o aparecimento de tetrâmeros de cadeia beta (Hb H) sugerindo o diagnóstico de talassemia alfa mínima. A presença de Hb H deve ser confirmada por diferentes métodos, deve ser associada com microcitose e com exames realizados em diferentes períodos, devendo, sempre que possível ser, confirmada por métodos de diagnósticos moleculares.

O diagnóstico da talassemia alfa é baseado principalmente na presença de Hb H e no quadro de anemia microcítica, hipocrômica com discreta anisocitose. Em última análise os dados laboratoriais clássicos mostram o fenótipo daquele momento, as restrições de cada técnica dificultam a detecção e a caracterização da talassemia alfa. Desta forma é de fundamental importância fazer uma avaliação molecular para primeiro confirmar e então caracterizar o genótipo da talassemia alfa. Sendo assim, o clínico pode estabelecer um tratamento mais adequado ao paciente e se necessário encaminhá-lo ao aconselhamento genético. O que seria importante para evitar o nascimento de portadores de talassemia grave (MELO-REIS *et al*, 2006a).

VI – CONCLUSÕES

A caracterização de um indivíduo com quadro de anemia é relativamente simples. As técnicas laboratoriais permitem caracterizar com precisão este quadro.

A diferenciação entre uma anemia ferropriva e uma anemia hereditária não pode ser realizada através destas técnicas clássicas.

A identificação e caracterização das hemoglobinas variantes é alcançada utilizando as metodologias laboratoriais clássicas.

A identificação de talassemia beta não apresenta grandes dificuldades utilizando estas metodologias.

A caracterização da talassemia alfa é controversa, pois é baseada na presença da Hb H na eletroforese alcalina, que é instável e desaparece durante o procedimento ou na pesquisa intra-eritrocitária de Hb H, onde a detecção é fortemente influenciada pelas concentrações intracelulares de Hb H.

Na caracterização da talassemia alfa é necessário o emprego de técnicas moleculares.

CAPÍTULO II

DETECÇÃO E CONFIRMAÇÃO DE TALASSEMIA ALFA POR MÉTODOS MOLECULARES

I – INTRODUÇÃO

As hemoglobinas variantes e talassemias foram as primeiras doenças genéticas caracterizadas por metodologia molecular, representando um protótipo para o desenvolvimento de técnicas utilizadas no auxílio diagnóstico laboratorial através da biologia molecular. As talassemias são decorrentes de alterações estruturais ou reguladoras, alterando a síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da molécula de hemoglobina (WEATHERALL, 2004; NAOUM, 1997).

São inúmeras as metodologias aplicadas ao diagnóstico das hemoglobinopatias, a maioria delas apresenta vantagens e desvantagens demonstrando em certos casos, limitações que impedem o diagnóstico preciso e exato. Assim, é certo que existe a necessidade de associar metodologias clássicas, de triagem e métodos confirmatórios moleculares para um diagnóstico completo e esclarecedor das alterações nas hemoglobinas (NAOUM, 1999; CHINETATO-FERNADES e BONINI-DOMINGOS, 2006).

I.2 – Agrupamento dos genes tipo alfa

Dos genes contidos no agrupamento alfa – *cluster* α -símile – os dois genes alfa (α_2 – α_1) é que são funcionalmente importantes, eles codificam cadeias alfa exatamente iguais, porém o gene α_2 é duas vezes mais ativo do que o gene α_1 , eles estão separados por quatro Kb (fig. 1). O gene ζ , que está separado por cerca de 20 Kb do gene α_2 , só é expresso na fase embrionária e muito pouco se conhece sobre o gene θ_1 que é considerado um pseudogene, pois não se conhece o produto de sua síntese apesar do seu mRNA ser transcrito (fig. 10) (ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004; WEATHERALL e CLEGG, 2001a).

Existem regiões reguladoras para o controle da expressão dos genes dos *clusters* α e β que são expressos exclusivamente nos eritrócitos em perfeita harmonia e por períodos bem definidos do desenvolvimento, assegurando o balanço correto de cadeias globínicas do tipo alfa e do tipo beta para a formação dos diferentes tipos de hemoglobinas (LEWIS, BAIN e BATES, 2006).

A regulação dos genes alfa se faz por meio de uma região conhecida como HS-40, ou elemento regulatório maior do locus alfa (α -MRE) (fig. 10), correspondente à sítios hipersensíveis à DnaseI e de ligação de fatores de transcrição, localizada a 40 Kb *upstream* do gene ζ . Sua integridade é essencial para a expressão dos genes do *cluster*. As deleções que removem esta sequência silenciam a expressão dos genes do *cluster* alfa localizada em posição posterior ou *downstream* (JARMAN *et al*, 1991; HIGGS *et al*, 1989). RIBEIRO e SONATI (2008) relataram que a atividade do α -MRE é restrita a um fragmento de 350 pb, onde vários sítios de ligação de proteínas regulatórias foram encontrados. Deleções espontâneas envolvendo o elemento regulatório maior do locus alfa (α -MRE) constituem uma categoria particular de talassemia alfa onde os genes alfa estão intactos, porém funcionalmente inativos.

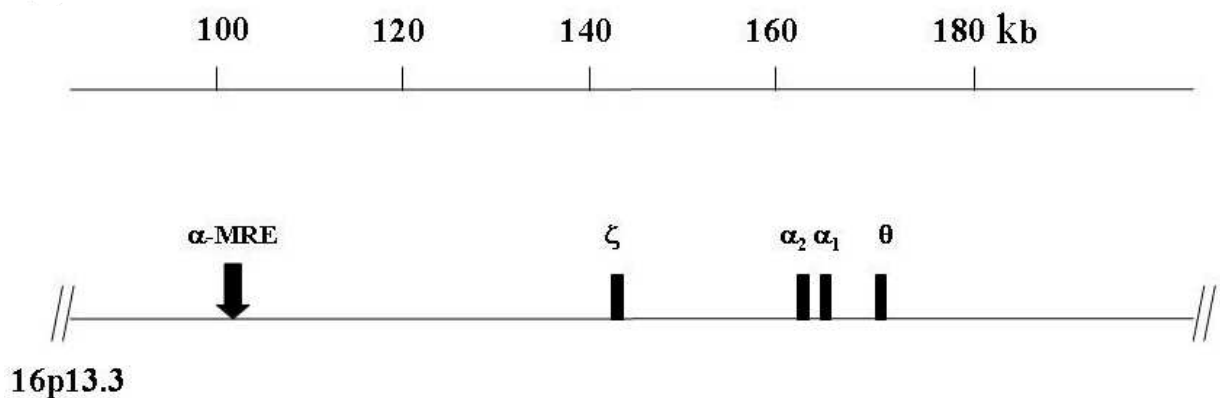


FIGURA 10 – Agrupamento alfa e a região regulatória no braço curto do cromossomo 16. Os boxes pretos representam os genes e a seta representa a sequência regulatória. α-mre = α-major regulatory element (elemento regulatório maior do locus alfa) (RIBEIRO e SONATI, 2008)

Os genes da globina humana são transcritos nos precursores eritróides, desde o pró-eritroblasto até o reticulócito. Os genes das globinas alfa e beta possuem uma estrutura muito similar sendo que os genes do agrupamento alfa (*cluster* α-símbolos) contêm 429 nucleotídeos e os do agrupamento beta (*cluster* β-símbolos) 444. Cada gene destes *clusters* possui três éxons intercalados por dois íntrons (IVS - Intervening Sequences) (fig. 11). O primeiro éxon codifica os aminoácidos de 01 a 31 no gene alfa, enquanto que o éxon 2 codifica os aminoácidos 32 a 99, que compreendem a porção dos polipeptídios envolvidos na ligação do radical heme e dos contatos α₁β₂ (α₂β₁). O terceiro éxon codifica o restante dos aminoácidos 100 a 141 (WEATHERALL e CLEGG, 2001a, p.65-120).

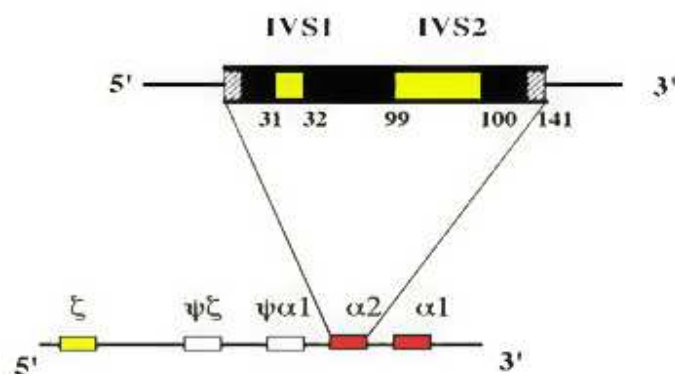


FIGURA 11 – Genes do *cluster* α-símile e a representação do gene alfa dois que contem três éxons (preto) e duas IVS (amarelo). Disponível em: <www.talassemiaticerca.unife.it/emoglobine.htm> acesso em: 22 de fevereiro de 2009, com modificações

A estabilidade do mRNA da globina, contribui muito para que os reticulócitos continuem a sintetizar hemoglobina por vários dias após a perda do núcleo. As cadeias de globina individuais são relativamente insolúveis, em contraste com o tetrâmero, que é uma molécula extremamente solúvel. A síntese balanceada das cadeias do tipo alfa e do tipo beta são essenciais para impedir sua precipitação. A fisiopatologia das talassemias envolve o desequilíbrio da síntese das cadeias globínicas, com precipitação das cadeias não pareadas (LORENZI, 2006; ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004).

As mutações do tipo *cis* que acometem os genes das globinas alfa afetam somente o gene na qual elas ocorreram, alterando diretamente sua estrutura, comprometendo sua função (NIENHUIS, ANAGNOU & LEY, 1984). As alterações genéticas capazes de levar à deficiência da produção das cadeias alfa podem ser determinadas por vários mecanismos como: mutações no códon de início dos genes alfa que impedem a tradução do mRNA; mutações no sítio de *splicing* que não permitem o correto processamento do mRNA; mutações que afetam o códon de terminação, levando à formação de cadeias alfa alongadas, instáveis e com menor ritmo de síntese; mutações de

ponto em regiões codificantes que resultam na produção de hemoglobinas instáveis; mutações no sítio poli-A produzindo mRNA instável e que afeta a expressão do gene $\alpha 1$ adjacente; e deleções envolvendo a seqüência controladora da expressão dos genes alfa (WEISS e LIEBHABER, 1994; ORKIN, GOFF & HETCHTMAN, 1981).

As deleções gênicas que acometem os genes alfa são favorecidas pela presença de um grande e variado número de seqüências repetidas (LIEBHABER & KAN, 1981) ricas em bases G e C, associados à eventos de recombinação por efeito de *crossing-over* desigual devido ao desalinhamento entre as duas fitas de DNA de dois cromossomos separados durante o processo de meiose, promovendo a deleção de um ou dois genes da globina alfa (BERNINI e HARTEVELD, 1998; CANÇADO, 2006).

A região do cromossomo 16 onde estão localizados os dois genes alfa, presentes em cada alelo é dividida em segmentos que apresentam grande homologia em bases nitrogenadas designados pelas letras X, Y e Z, e também por regiões não homólogas identificadas pelos números I, II e III (fig. 12).

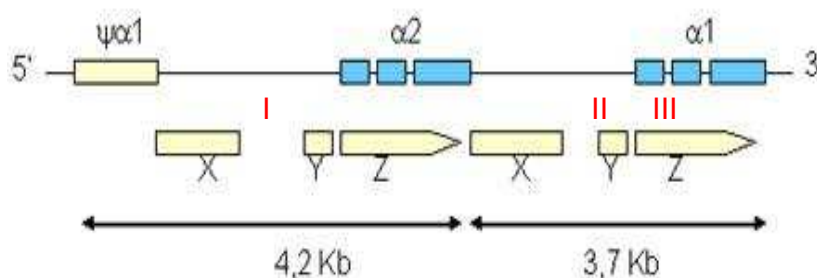


FIGURA 12 – Regiões homólogas entre os espaços $\psi\alpha 1$ e $\alpha 2$, e entre os genes $\alpha 2$ e $\alpha 1$. Essas regiões homólogas têm diferentes tamanhos em números de bases nitrogenadas: 3,7Kb e 4,2Kb, e são denominadas de X, Y e Z. Entre as regiões homólogas X e Y, e entre Y e Z, localizadas no espaço de 4,2Kb, há dois espaços que correspondem às regiões não-homólogas. O raciocínio é o mesmo em relação às regiões homólogas e não-homólogas localizadas no espaço 3,7Kb. O tamanho das regiões homólogas nos espaços 3,7 e 4,2 são iguais, enquanto os das regiões não-homólogas são diferentes (NAOUM, 1997)

As principais deleções envolvem os segmentos Z, deixando somente um gene alfa ativo. Provavelmente, são originadas pela recombinação não homóloga entre cromossomos alinhados desigualmente, originando um cromossomo que contém somente um gene alfa e um cromossomo complementar que contém três genes alfa. O sítio de recombinação localiza-se a direita (*rightward*) ou à esquerda (*leftward*) dentro do complexo gênico alfa. Na recombinação à esquerda, que leva a perda de um fragmento de 4,2 Kb temos uma talassemia α^+ ($-\alpha^{4,2}$). Neste caso ocorre a deleção completa do gene α_2 ficando íntegro o gene α_1 (fig. 13). Enquanto que na recombinação à direita denominada $-\alpha^{3,7}$ ocorre a perda de um fragmento de aproximadamente 3,7 Kb envolvendo a região 3' final do gene α_2 , a região entre os genes α_2 e α_1 e a porção inicial 5' do gene α_1 , resultando em um gene híbrido (α_2/α_1) formado pela porção inicial do gene α_2 e final do gene α_1 (fig. 13).

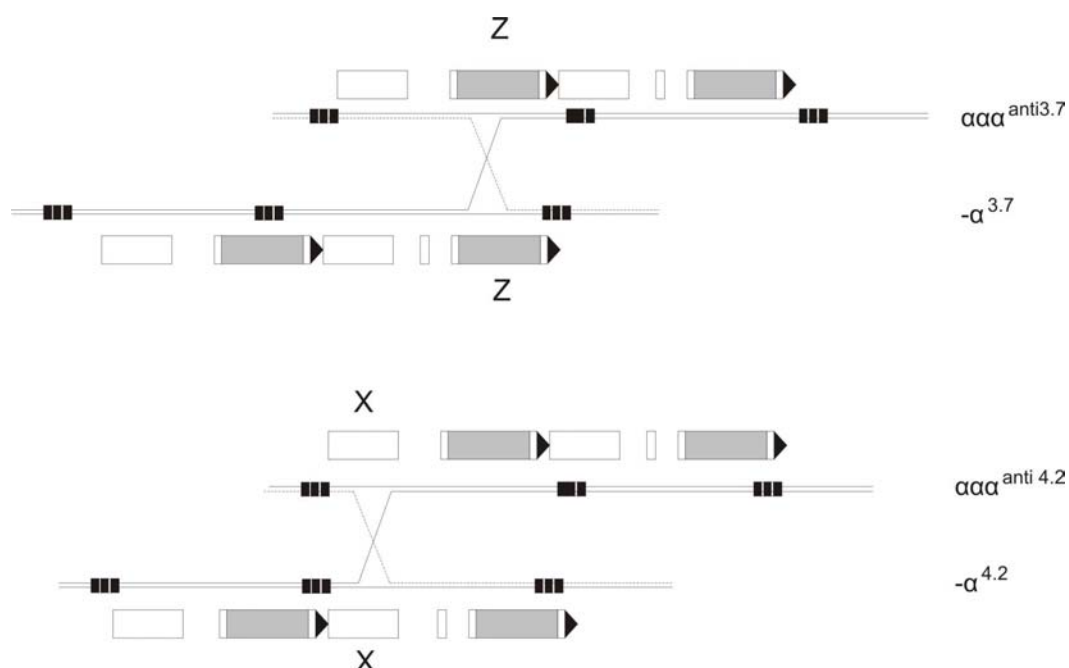


FIGURA 13 – “Crossing-over” desigual entre dois cromossomos 16. (1) Crossing-over para a direita: box Z desalinhado, dá lugar aos cromossomos $-\alpha^{3,7}$ e $\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$. (2) Crossing-over para a esquerda: box X desalinhado, dá lugar aos cromossomos $-\alpha^{4,2}$ e $\alpha\alpha^{\text{anti}4,2}$ (WEATHERALL e CLEGG, 2001a, p.137).

A deleção $-\alpha^{3,7}$ é a mais freqüente na população mundial e no Brasil seguida da deleção $-\alpha^{4,2}$, no entanto existem dezenas de outras deleções responsáveis pelo aparecimento de talassemia alfa (fig. 14) (EMBURY *et al*, 1980; MICHELSON e ORKIN, 1983; LACERRA *et al*, 2007; SONATI *et al*, 1992; ROMÃO *et al*, 1991; BAYSAL e HUISMAN, 1994).

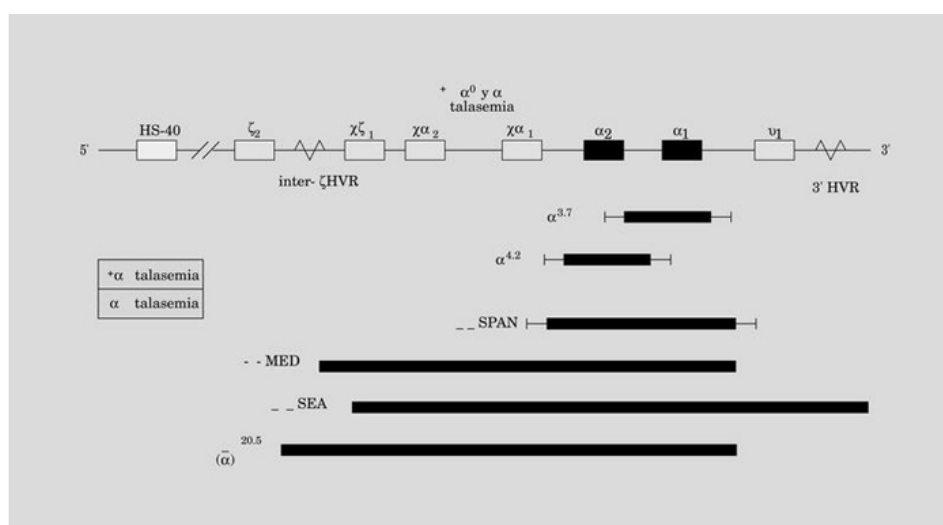


FIGURA 14 – Representação das deleções mais comuns nos genes alfa. Disponível em: <db.doyma.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/doyma/mrevista...> Acesso em: 03 de julho de 2007

I.3 – Metodologias moleculares aplicadas ao diagnóstico da talassemia alfa

Estudos moleculares revelam que a talassemia alfa é a mais prevalente em vários países como a China, Tailândia, Indonésia, Itália, Grécia, Arábia Saudita, Irã, Turquia, Canadá, Estados Unidos, Argentina, Venezuela, entre outros (WEATHERALL e CLEGG, 2001b). NAGEL (2003) descreve várias

metodologias que podem ser empregadas na análise e caracterização das hemoglobinas variantes e talassemias. São metodologias moleculares e não moleculares que podem ser empregadas na pesquisa de várias alterações da hemoglobina. São experimentos testados e padronizados para a detecção das principais alterações. Para a técnica de PCR-RFLP, por exemplo, são descritos os *oligonucleotídeos* e as enzimas respectivas para a identificação de várias alterações, tanto nos genes da globina alfa quanto da beta.

A identificação das sete mais comuns deleções e/ou mutações nos genes da globina alfa foram realizadas por FOGLIETTA *et al*, (1996) por meio da técnica convencional da PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para cada tipo de desordem. DI BELLA *et al*, (2006), analisando mutações que causam talassemia alfa, em 298 indivíduos da Sicília na Itália que apresentavam anemia microcítica e hipocrômica, com níveis normais de ferro, Hb A₂ e Hb F, relataram que 43,9% apresentavam sete genótipos diferentes para talassemia alfa: $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (36.6%), $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ (27.5%), $-(^{MED})/\alpha\alpha$ (10.0%), $-\alpha^{20.5}/\alpha\alpha$ (9.1%), $\alpha^{HphI}\alpha/\alpha\alpha$ (8.4%), $\alpha^{HphI}\alpha/\alpha^{HphI}\alpha$ (6.1%), and $-\alpha^{3.7}/\alpha^{HphI}\alpha$ (2.3%). Os autores afirmam que a caracterização molecular destas deleções e mutações são de extrema importância para a identificação de indivíduos assintomáticos que apresentam VCM e HCM ligeiramente diminuídos e níveis de ferro sérico normais.

Utilizando a técnica de PCR-ARMS, LACERRA *et al*, (2007) fez a genotipagem de nove amostras de países do mediterrâneo para a detecção da Hb J-Oxford gerada por mutação no gene alfa 1 e da deleção $-\alpha^{3.7}$ afirmando ser uma técnica simples, factível, rápida e reproduzível.

LIU *et al*, (2008) na China associou a PCR-MULTIPLEX com a PCR em tempo real e o seqüenciamento de DNA para o estudo da talassemia deletional em duas famílias. O genótipo identificado no feto, com hidropsia fetal, de uma das famílias foi $--^{SEA}/--^{SEA}$, uma deleção comum no sudeste da Ásia. O genótipo dos pais era $--^{SEA}/\alpha\alpha$. Na outra família foi identificado o genótipo $--^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$ (Hb Constant Spring (CS)) em um garoto com doença de Hb H e seu irmão com genótipo normal $\alpha\alpha/\alpha\alpha$.

No sudoeste do Iran, ZANDIAN *et al*, (2008) estudaram as mutações para alfa talassemia através da técnica de PCR-GAP e do seqüenciamento de DNA. 121 pacientes foram testados para as mutações $^{-3,7}$, $^{-4,2}$ e $^{-MED}$. A mutação mais freqüente encontrada foi a $^{-3,7}$ (62,6%) na forma hererozigótica.

No Brasil, alguns trabalhos mostram a necessidade de uma avaliação molecular como testes confirmatórios para o estudo das hemoglobinopatias (BONINI-DOMINGOS *et al*, 2003; ZAMARO; HIDALGO e BONINI-DOMINGOS, 2003; WAGNER *et al*, 2005; FERNANDES *et al*, 2003).

Através de estudos moleculares, a talassemia alfa no Brasil está sendo detectada em indivíduos descendentes de imigrantes, principalmente de países da Europa e da África. Estima-se que na população brasileira, a prevalência do portador silencioso seja de 10% a 20% e para o traço alfa talassêmico de 1,0% a 3,0%. Essa freqüência pode atingir números maiores, de 20% a 25%, se a população em estudo for de indivíduos afro-descendentes (SONATI *et al*, 1991).

No trabalho de PEDROLLO; HUTZ e SALZANO (1990) foi detectada a prevalência do haplótipo $^{-\alpha}$ em 6% e 2,5% entre negróides e caucasóides respectivamente, em um total de 599 amostras de recém-nascidos apresentando talassemia alfa. Outro estudo revelou mutações nos genes da globina alfa em indivíduos da região sudeste confirmando a influência Africana e Italiana naquela região do Brasil (WENNING *et al*, 2000). BORGES *et al*, (2001), utilizando métodos moleculares de diagnóstico, relataram que praticamente 50% dos 339 indivíduos analisados apresentavam talassemia alfa, sendo 42,8% $^{-\alpha^{3,7}}$; 5,3% $^{-\alpha^{3,7}}/^{-\alpha^{3,7}}$, 1,5% $\alpha^{HphI}/\alpha\alpha$ e 0,3% $^{-MED}/\alpha\alpha$.

JORGE *et al*, (2003) utilizaram a metodologia da SSCP para identificar mutações nos genes da globina alfa e afirma que esta estratégia pode ser utilizada pelos laboratórios que não possuem seqüenciador automático de DNA.

Na pesquisa de talassemia alfa, PEREIRA *et al*, (2006), descreveram uma nova deleção (-C) no códon 22 do gene da globina α_2 , que está associada a uma degradação acelerada do mRNA causando uma anemia microcítica e hipocrômica moderada.

Associando metodologias laboratoriais clássicas, HPLC e análise molecular por meio da PCR-RFLP, CHINETATO-FERNADES, MENDIBURU, e BONINI-DOMINGOS (2006) caracterizaram pacientes heterozigotos para Hb Hasharon. A Hb Hasharon resulta da substituição de uma asparagina (Asn) por histidina (His) no códon 47 (GAC→CAC) da globina alfa 01, que possui a mesma mobilidade eletroforética que a Hb S na eletroforese alcalina e mobilidade intermediária entre Hb S e Hb C na eletroforese ácida para hemoglobinas.

JORGE *et al*, (2007), trabalhando na triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP – SP, descreveu três novas variantes de globina alfa. A Hb Itapira [α 30(B11)Glu→Val], Hb Bom Jesus da Lapa [α 30(B11)Glu→Ala] and Hb Boa Esperança [α 16(A14)Lys→Thr]. As duas primeiras estão associadas com o alelo em triplicata de globina alfa ($\alpha\alpha\alpha^{(anti\ 3,7)}$) e possuem mobilidade eletroforética similar a da Hb S em eletroforese alcalina. Enquanto a Hb Boa Esperança possui mobilidade eletroforética mais rápida que a Hb A.

Em Goiás, estudos sobre a prevalência de talassemias tem sido feito no LEPAH da Universidade Católica de Goiás através de metodologias diagnósticas não moleculares. MELO-REIS *et al*, (2004) realizou o estudo de prevalência de hemoglobinopatias e talassemias em alunos da Universidade Católica de Goiás, encontrando 8,2% de talassemia alfa naquela população.

No ano seguinte MELO-REIS *et al*, (2005), num trabalho num trabalho com 197 crianças, com idade variando entre 06 meses e 07 anos de idade, observou que 19,8% delas apresentaram quadro sugestivo de talassemia alfa.

II – OBJETIVOS

II.1 – Objetivo geral:

Caracterização molecular dos pacientes suspeitos de apresentarem talassemia alfa, nos testes laboratoriais clássicos, atendidos no LAS – Laboratório da Área da Saúde do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás.

II.2 – Objetivos específicos:

- 1 – Detectar talassemia alfa através da utilização da técnica de PCR;
- 2 – Propor novos oligonucleotídeos que permitam a confirmação e caracterização de talassemia alfa;
- 3 – Detectar os tipos mais prevalentes de talassemia alfa.

III – MATERIAL E MÉTODOS

III.1 – Material

Foram analisadas 49 amostras de DNA, provenientes de 49 indivíduos dos 64 avaliados no capítulo 1. O sangue foi coletado em frasco estéril com anticoagulante EDTA 5%, após a assinatura do consentimento informado, seguindo as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. As amostras biológicas foram obtidas após a aprovação da proposta do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás - UFG, conforme protocolo número 065/2005.

O DNA total foi obtido dos glóbulos brancos mediante a extração fenólica e amplificado por PCR. Todas as amostras foram colhidas no Laboratório da Área da Saúde do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás e encaminhadas ao LEB – Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética da Universidade Federal de Goiás, onde as amostras foram processadas.

III.2 – Metodologia

III.2.1 – Extração de DNA de Glóbulos Brancos (PENA *et al*, 1991 – com modificações)

Em um tubo eppendorf foram pipetados de 300 µL a 01 mL de sangue periférico, colhido com EDTA. O volume foi completado para 1,5 mL com solução de lise 01. O material foi homogeneizado e centrifugado por 05 minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi desprezado deixando aproximadamente 300 µL de pellet. O volume foi completado para 1,0 mL com solução de lise 01, novamente. O material foi homogeneizado e incubado por 10 a 15 minutos. Esta etapa de lavagem com a solução de lise 01 foi repetida, com o objetivo de lavar o pellet retirando o maior número de glóbulos vermelhos. O tubo foi centrifugado por 05 minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi totalmente desprezado e ao pellet foi acrescentado 450 µL de solução de lise 02. O pellet foi ressuspenso e 25 µL de SDS a 10 % e 05 µL de proteinase K (20 mg/mL) foram adicionados. Após homogeneizar, o material foi incubado em banho-maria a 37°C overnight ou 42°C por três horas.

500 µL de fenol hidratado foram adicionados, o material foi homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 7000 rpm. Toda a face superior do material foi transferida para outro tubo eppendorf e 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi adicionado. Novamente foi homogeneizado e centrifugado por 05 minutos a 7000 rpm. Este procedimento foi repetido com clorofórmio: álcool isoamílico e em seguida o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 50 µL de KCl (gelado). Foram adicionados 500 µL de etanol 100% (gelado) e o tubo foi invertido várias vezes até a precipitação do DNA. Foi realizada uma centrifugação por aproximadamente 30 segundos a 13000-15000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o DNA que ficou aderido no tubo foi lavado com 200 µL de etanol 70% (gelado), centrifugado por aproximadamente 30 segundos a 13000-15000 rpm. O sobrenadante foi desprezado delicadamente e o tubo ficou invertido por 15 minutos para

secagem. O DNA foi re-hidratado com 20 a 100 µL de TE (Tris-EDTA) ou água MiliQ. Para total solubilização do DNA o material foi incubado à temperatura ambiente ou em banho-maria a 37°C por aproximadamente 12 horas. Para melhor conservação, as amostras foram armazenadas à -20°C.

A determinação da concentração de DNA foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (UltraSpec 2000 – Amersham Pharmacia Biotech) a 260 nm e 280 nm para garantir a qualidade do material extraído. A concentração de DNA foi ajustada entre 50 a 100 ng/µL para utilização em reação de amplificação pela técnica convencional da PCR.

Reagentes:

1. Solução de lise 01 para extração de DNA (lise de células vermelhas)

Sacarose	10,95 g
Tris HCl	1 mL
MgCl ₂	0,5 mL
Triton X-100	1 mL
Água mili-Q autoclavada q.s.p.	100 mL

Dissolver bem e armazenar em geladeira.

2. Solução de lise 02 para extração de DNA (lise de células brancas)

NaCl	2,19 g
EDTA (pH 8,0)	20 mL
Água mili-Q autoclavada q.s.p.	500 mL

Armazenar em geladeira.

3. Proteinase K (20 mg/mL)

Proteinase K (Invitrogen)	20 mg
Água mili-Q q.s.p.	1 mL

Conservar a - 20 °C.

4. Fenol hidratado

5. Clorofórmio/ álcool isoamílico 24:1 (preparado no momento do uso)

Clorofórmio	24 mL
Álcool isoamílico	1 mL

6. SDS 20%

SDS	20g
Água mili-Q autoclavada q.s.p.	100 mL

O SDS deve ser colocado aos poucos. Não autoclavar e estocar à temperatura ambiente.

7. Etanol 70%

8. KCl 2M

KCl	14,91 g
Água mili-Q autoclavada q.s.p.	100 mL

III.2.2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do gene da globina alfa (SAIKI *et al*, 1988)

Para pesquisar as deleções $\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{4,2}$ foram utilizados os oligonucleotídeos descritos na tabela 11: KGB01, KGB02, KGB03, KGB04 e KGB05. Estes oligonucleotídeos foram construídos baseados na sequência do agrupamento alfa depositado no GenBank em gi|1817575:30000-40000 (fig. 15). Os oligonucleotídeos foram obtidos da IDT® - Integrated DNA Technologies. Foi utilizado também o oligonucleotídeo 3.7F, segundo LIU *et al*, (2000) obtido da Bio-Synthesis (tabela 12). A figura 16 mostra a região de anelamento dos oligonucleotídeos no cromossomo 16.

TABELA 11 – SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA GLOBINA ALFA PARA DETECÇÃO DA DELEÇÃO $\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{4,2}$

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	SENTIDO
KGB01	(5'ATGGCCACCGAGGCTCCAGC3')	Antisense
KGB02	(5'CCGACCCGGGCTCCTCGCC3')	Sense
KGB03	(5'GGAAGCCCTCAGACTAACCC3')	Sense
KGB04	(5'TGAATGAAGTCCGAGTAGGC3')	Sense
KGB05	(5'TAAGGATATGTATTAGGTGGAGG3')	Antisense

TABELA 12 – SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA GLOBINA ALFA PARA DETECÇÃO DA DELEÇÃO $\alpha^{3,7}$

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	COORDENADAS GENBANK Z84721
3.7F	(5'AAGTCCACCCCTTCCTTCCTCACC3')	32755–32778 (alfa2) 36309–36332 (alfa1)

FONTE: LIU *et al*, (2000)

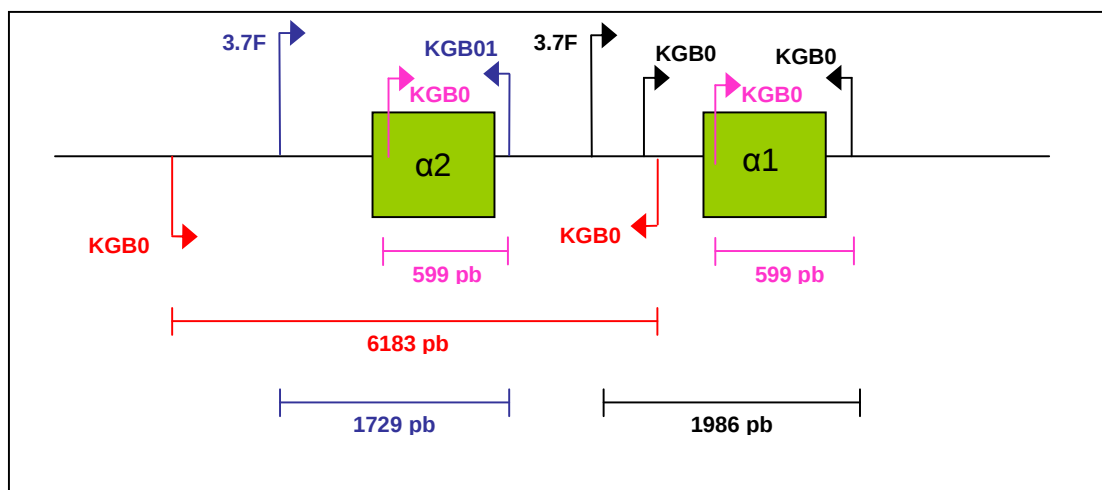


FIGURA 16 – Representação esquemática da localização dos oligonucleotídeos KGB01, KGB02, KGB03, KGB04, KGB05 E 3.7F no cromossomo 16

Para a amplificação dos fragmentos contidos no agrupamento dos genes que codificam as globinas alfa foi utilizado primeiro o par de oligonucleotídeos 3.7F/KGB01. O oligonucleotídeo 3.7F sense posicionava-se na região +32755/+32778 5'UTR (untranslated region – região não traduzida) do gene α_2 e na região +36309/+36332 5'UTR do gene α_1 . O oligonucleotídeo antisense KGB01 localizava-se na região +38275/+38295 3'UTR do gene α_1 e na região +34464/+34484 3'UTR do gene α_2 . Assim, o produto de amplificação do par de oligonucleotídeos 3.7F/KGB01 resultava num fragmento de 1986 pb (gene α_1) e em outro de 1729 pb (gene α_2) (fig. 16).

Depois, o par de oligonucleotídeos KGB04/KGB05 foi utilizado para a pesquisa da deleção $\alpha^{4,2}$. O oligonucleotídeo sense KGB04 localizava-se na região +30293/+30313 5'UTR do gene α_2 . O antisense KGB05 localizava-se na região +36453/+36476 3'UTR do gene α_2 . Contudo, a amplificação com o par KGB04/KGB05 indicava a presença do gene α_2 , resultando num fragmento de 6183 pb, já a deleção para este gene era representada pelo fragmento de 1983 pb (fig. 16).

Como controle de amplificação o par KGB01/KGB02 foi utilizado. A localização do KGB01 já foi descrita anteriormente. KGB02 localizava-se na região +33891/+33910 do início do gene α_2 e na região +37695/+37714 do início do gene α_1 e, resultando na amplificação de um fragmento de 599 pb. O fragmento foi resultado tanto da amplificação de parte do gene alfa 2 quanto do gene alfa 1. (fig. 16).

Para padronização das reações de amplificação com os oligonucleotídeos 3.7F/KGB01, KGB04/KGB05 e KGB01/KGB02 foram testadas as concentrações de 1,0 a 3,0 mM de cloreto de magnésio e ainda foi avaliada a necessidade de adição do desnaturante DMSO (Dimetil sulfoxide) nas concentrações de 5,0 a 10%.

As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 20 μ L, contendo 20 mmol/L de tampão; 1,5 mmol/L de $MgCl_2$; 1,25 U de TaqPlatinum DNA polimerase (Invitrogen); 0,2 mmol/L de cada dNTP (Invitrogen); 50,0 a 100,0 ng de DNA genômico; 10% de DMSO e 0,2 μ mol/L de cada oligonucleotídeo. O protocolo de termociclagem inclui um total de 35 ciclos. Para a PCR foi usado o termociclador MJ96+/MJ96G Biocycler, sob as condições descritas nas tabelas 13, 14 e 15.

TABELA 13 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS 3.7F/KGB01

AMPLIFICAÇÃO	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (min)
Desnaturação inicial	94	2
Desnaturação	94	0,5
Anelamento	65	0,5
Extensão	72	2
Extensão final	72	10

TABELA 14 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS KGB04/KGB05

AMPLIFICAÇÃO	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (min)
Desnaturação inicial	95	3
Desnaturação	95	1
Anelamento	53	1
Extensão	72	2
Extensão final	72	10

TABELA 15 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS KGB01/KGB02

AMPLIFICAÇÃO	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (min)
Desnaturação inicial	95	3
Desnaturação	95	1
Anelamento	62	1
Extensão	72	2
Extensão final	72	10

III.2.3 – Análise dos produtos amplificados (SAMBROOK; FRISTCH e MANIATIS, 1989)

Os produtos de PCR obtidos através da amplificação, assim como as amostras de DNA total, foram preparados com tampão de amostra e separadas por eletroforese em gel de agarose de 1,0%. O gel foi submetido a uma amperagem de 30 mA até a sua completa entrada nos poços e posteriormente esta amperagem foi aumentada para 60 mA na fonte PWSys (PW 300). A

eletroforese foi realizada em tampão de eletroforese TEB (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM) a uma concentração final de 0,5X. Para a visualização das amostras de DNA, foi utilizada luz ultravioleta de baixa intensidade utilizando o transiluminador ECX-26M VilberLourmat que fluoresce o brometo de etídio (0,5 µg/mL) presente no gel de agarose, corando o DNA.

Reagentes:

1. Tampão de eletroforese (TEB 5X)

Tris-HCl	53,85 g/L
Ácido Bórico	27,5 g/L
EDTA	1,8 g/L
Ajustar o ph para 8,0	

2. Tampão de amostra (5X)

TEB	10 X
Glicerol (v/v)	50 %
Azul de bromofenol (USB) (p/v)	0,001 g

3. Gel de agarose 0,8%

Agarose (Amershan Pharmacia)	0,8 g
Brometo de etídio (USB)	5 µL
TEB 0,5X	100 mL

4. Gel de agarose 1,5%

Agarose (Amershan Pharmacia)	1,5 g
Brometo de etídio (USB)	5 µL
TEB 0,5X	100 mL

IV – RESULTADOS

Foram extraídas amostras de DNA dos 64 pacientes avaliados no capítulo 1. Entretanto, nem todos os procedimentos de extração resultaram em amostras viáveis, com qualidade ou concentração passíveis de serem utilizadas em ensaios moleculares. Portanto, as análises moleculares através da metodologia da PCR convencional foram realizadas em 49 amostras.

IV.1 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do gene da globina alfa com o par de oligonucleotídeos 3.7F e KGB01

Na tabela 16 estão resumidos os resultados da amplificação por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos 3.7F e KGB01 (fig. 16). Das 49 amostras, 37 resultaram na amplificação de dois fragmentos (bandas) de DNA. O maior apresentando 1986 pb correspondente ao gene α_1 e o menor com 1729 pb correspondente ao gene α_2 . Dessas, 29 apresentaram a banda de 1986 pb com maior intensidade do que a banda menor de 1729 pb. Este padrão é o esperado para o genótipo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Na figura 17, raias 1, 2, 3, 5 e 6 podem ser observado os perfis de genótipo normal.

TABELA 16 – RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DE 49 AMOSTRAS UTILIZANDO O PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS 3.7F e KGB01

Paciente	Resultado	Paciente	Resultado
1	Normal	29	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$
2	Normal	30	Normal
3	Normal	31	Normal
4	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	33	Não foi testado
5	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	34	Normal
8	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	35	$-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$
9	Normal	38	Normal
10	Normal	40	$-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$
11	Normal	41	Normal
12	$-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$	42	Normal
13	Normal	44	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$
14	Normal	45	Não amplifica
15	Normal	46	$-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$
16	Normal	47	Normal
17	Normal	48	Amplificou 03 fragmentos
18	$-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$	50	Não amplifica
19	Normal	51	Normal
20	Amplificou 03 fragmentos	52	Normal
21	$-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$	53	Normal
22	Normal	61	Normal
23	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	62	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$
24	Normal	63	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$
25	Normal	64	Normal
27	Normal	65	Não amplifica
28	Normal		

Oito amostras resultaram na amplificação das duas bandas, de 1986 e de 1729 pb, com intensidade semelhantes. Este resultado é esperado para uma deleção $\alpha^{3,7}$ heterozigótica ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$). Na figura 17, raias 4 e 7, são observados padrões onde a intensidade das bandas é semelhante.

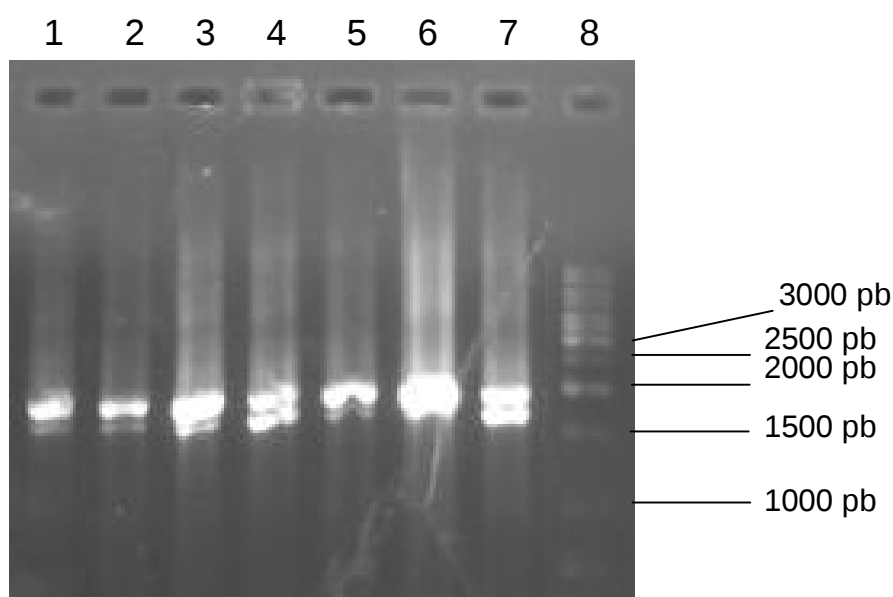


FIGURA 17 – Produtos de amplificação com o par de oligonucleotídeos 3.7F/KGB01. Eletroforese em gel de agarose 1,0%. Raias 1, 2, 3, 5 e 6: pacientes 25, 27, 34, 52 e 61 (genótipo normal). Raias 4 e 7: pacientes 62 e 63 (heterozigotos $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$). Raia 8: 1Kb DNALadder (Fermentas)

A figura 18 mostra o perfil de amplificação de 05 pacientes. Nas raias 1 e 2 estão o perfil esperado para a deleção $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$. Nas raias 3 e 4 o perfil do genótipo normal. Na raia 5 pode ser observado um perfil diferente de amplificação, nessa amostra foram amplificadas 3 bandas. Duas correspondendo aos fragmentos esperados. Um terceira banda foi observada com tamanho intermediário de aproximadamente 1800 pb. As amostras dos pacientes 20 e 48 apresentaram este perfil com três bandas.

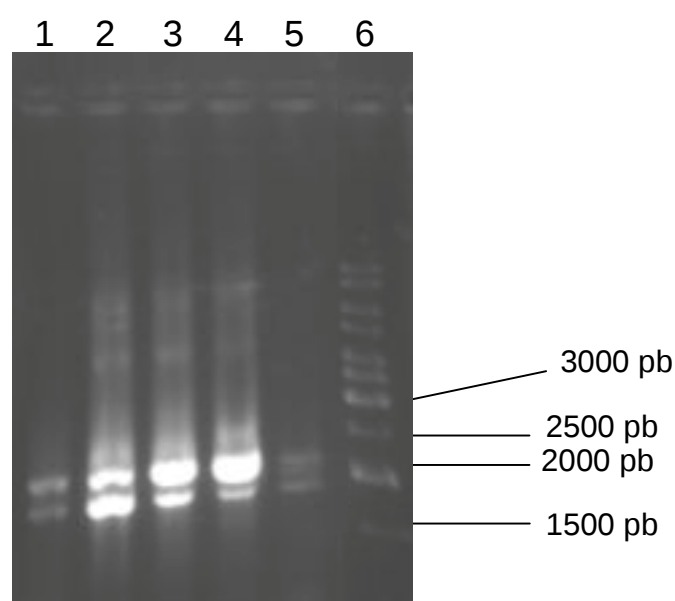


FIGURA 18 – Produtos de amplificação com o par de oligonucleotídeos 3.7F/KGB01. Eletroforese em gel de agarose 1,0%. Raias 1 e 2: pacientes 5 e 8 (heterozigotos $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$). Raias 3 e 4: pacientes 14 e 15 (genótipo normal). Raia 5: paciente 20 (três bandas, sendo a intermediária de aproximadamente 1800 pb). Raia 6: 1Kb DNALadder (Fermentas)

Na figura 19 é mostrado o perfil de amplificação de três pacientes. As raia 2 e 3 mostra o perfil do genótipo normal e a raia 4 mostra o perfil semelhante ao do controle positivo para a deleção $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ que está na raia 5. O controle positivo foi previamente caracterizado e gentilmente cedido pela Dra. Maria de Fátima Sonati da UNICAMP. O perfil de amplificação da amostra controle com os oligonucleotídeos 3,7F/KGB01 resultaram em duas bandas de 1986 e 1729 pb com mesma intensidade.

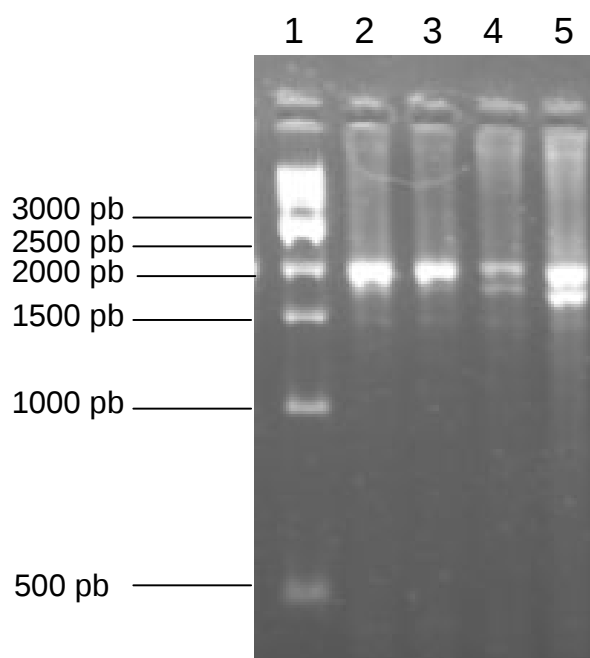


FIGURA 19 – Produtos de amplificação com o par de oligonucleotídeos 3.7F/KGB01. Eletroforese em gel de agarose 1,0%. Raia 1: KiloBaseTM DNA Marker (Amersham Pharmacia Biotech). Raias 2 e 3: pacientes 30 e 31 (genótipo normal). Raia 4: paciente 44 (heterozigoto $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$). Raia 5: controle para heterozigoto $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$

Seis amostras (12, 18, 21, 35, 40 e 46) amplificaram apenas o fragmento de 1986 pb (fig. 20) . Quadro sugestivo de uma deleção $\alpha^{4,2}$ homozigótica ($-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$). A amostra 33 não foi testada, pois o material genético era insuficiente e as amostras 45, 50 e 65 não amplificaram após várias tentativas em triplicata e em diferentes condições de amplificação.

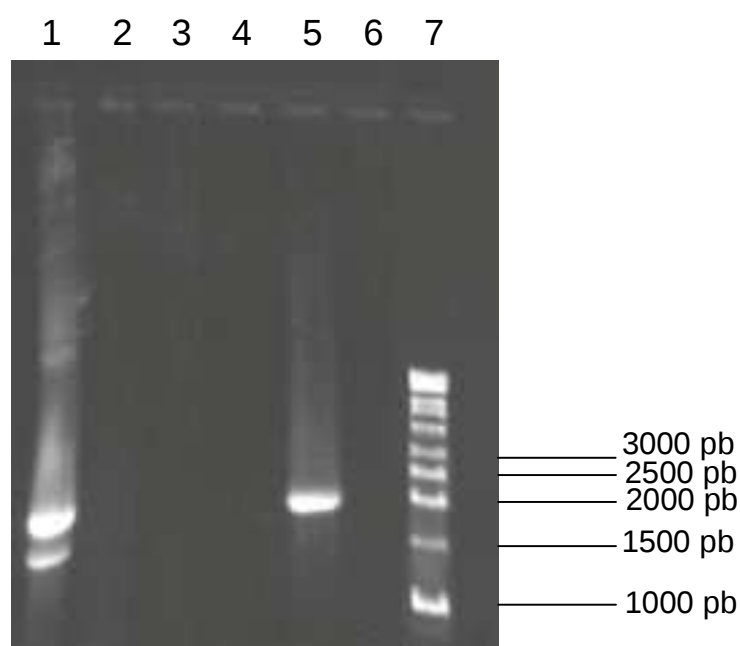


FIGURA 20 – Produtos de amplificação com o par de oligonucleotídeos 3.7F/KGB01. Eletroforese em gel de agarose 1,0%. Raia 1: paciente 38 (genótipo normal). Raias 2, 3, 4 e 6: pacientes 45, 50, 65 e 65 (não amplificaram). Raia 5: paciente 12 (homozigoto $-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$). Raia 7: KiloBaseTM DNA Marker (Amersham Pharmacia Biotech)

IV.2 – Detecção da deleção $\alpha^{4,2}$

Para a caracterização da deleção $\alpha^{4,2}$ foi realizado uma PCR utilizando os oligonucleotídeos KGB04 e KGB05. Nesta análise foram utilizadas 16 amostras que no eritrograma apresentarem Hb H ou microcitose e hipocromia e também foram selecionadas algumas amostras normais como controle. Os dados da amplificação estão relatados na tabela 17. Sete amostras (5, 8, 9, 16, 20, 33 e 47) resultaram na amplificação de uma banda de 1983 pb. Este resultado é esperado quando ocorre a deleção de aproximadamente 4.200 pb no agrupamento dos genes alfa, compreendendo o gene alfa 2.

TABELA 17 – RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES DE 16 AMOSTRAS UTILIZANDO O PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS KGB04 e KGB05

Paciente	Resultado
1	Negativa
2	Negativa
3	Negativa
4	Negativa
5	$-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$
8	$-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$
9	$-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$
10	Negativa
16	$-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$
20	$-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$
22	Negativa
23	Negativa
29	Negativa
30	Negativa
33	Deleção $\alpha^{4,2}$
47	$-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$

Na figura 21 é possível observar a amplificação do fragmento de 1983 pb do paciente 33. Das 16 amostras testadas sete resultaram na amplificação do fragmento esperado.

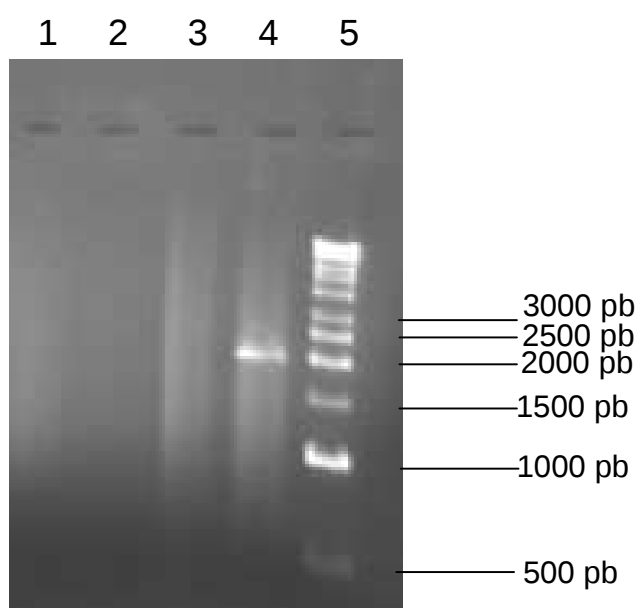


FIGURA 21 – Produtos de amplificação com o par de oligonucleotídeos KGB04/KGB05. Eletroforese em gel de agarose 1,0%. Raias 1, 2 e 3: pacientes 22, 23 e 29 (genótipo normal). Raia 4: paciente 33 (deleção $\alpha^{4,2}$). Raia 5: KiloBaseTM DNA Marker (Amersham Pharmacia Biotech)

V – DISCUSSÃO

Os métodos laboratoriais clássicos para o diagnóstico da talassemia alfa não permitem caracterizar com precisão o portador silencioso para talassemia alfa nem o traço alfa talassêmico, que geralmente são assintomáticos. Na eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose é possível observar a presença de uma banda instável que migra mais rapidamente que a hemoglobina A. Porém, alguns autores afirmam que a detecção destas hemoglobinas de migração rápida como a Hb H e a Hb Bart's, é imprecisa e inexata por meio da eletroforese (WEATHERALL e CLEGG, 2001a; CLARKE e HIGGINS, 2000; LEONELI *et al*, 2000).

Nosso trabalho (DIAS-PENNA, 2009) demonstrou que o fenótipo associado a Hb H pode ser modificado em função de diversas situações. No estudo conduzido com dez pacientes foi observado que ora o fenótipo era expresso e em outros momentos ele não era observado. Reforçando assim que a visualização ou não da Hb H, por eletroforese alcalina ou pela PIEHH, não permite caracterizar o paciente quanto a sua condição de portador de talassemia alfa.

Para a caracterização da talassemia alfa foi necessário realizar estudos moleculares que permitiram definir o genótipo dos pacientes. Vários trabalhos foram publicados na literatura que reafirmaram a importância da caracterização molecular para a confirmação diagnóstica das talassemias (REPAPINO *et al*, 2007; TRENT, 2006; JORGE *et al*, 2003; CHONG *et al*, 2000; LIU *et al*, 2000; WENNING *et al*, 2000).

A talassemia alfa está normalmente relacionada com mutações do tipo delecionais. Diferentes mutações estão descritas no GLOBIN GENE SERVER. As principais deleções descritas na literatura são a $\alpha^{3,7}$ e a $\alpha^{4,2}$ (fig. 14). (CANÇADO, 2006; BONINI-DOMINGOS, 2004; WEATHERALL e CLEGG, 2001a; BERNINI e HARTEVELD, 1998; BAYSAL e HUISMAN, 1994).

Para estudar o genótipo de pacientes suspeitos de serem portadores de talassemia alfa, foram desenvolvidos neste estudo, novos oligonucleotídeos visando a caracterização dessas duas principais deleções, $\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{4,2}$.

Na figura 16 estão representados os locais de anelamento dos oligonucleotídeos propostos. É descrito na literatura que a região do cromossomo 16, onde estão localizados os genes alfa, possui trechos internos que apresentam homologia (fig. 12). Estas regiões homólogas estão associadas com as mutações deletionais mais prevalentes.

V.1 – Detecção da deleção $\alpha^{3,7}$

Para detectar a deleção $\alpha^{3,7}$ foram desenhados novos oligonucleotídeos baseados na sequência descritos na figura 15. O oligonucleotídeo KGB01 anela no final do gene alfa 1. Entretanto ele também anela no final do gene alfa 2, porém nesta região do gene alfa 2 existem dois nucleotídeos que não são complementares (fig. 22). Essa diferença faz com que este oligonucleotídeo anele preferencialmente no gene alfa 1 em detrimento ao gene alfa 2.

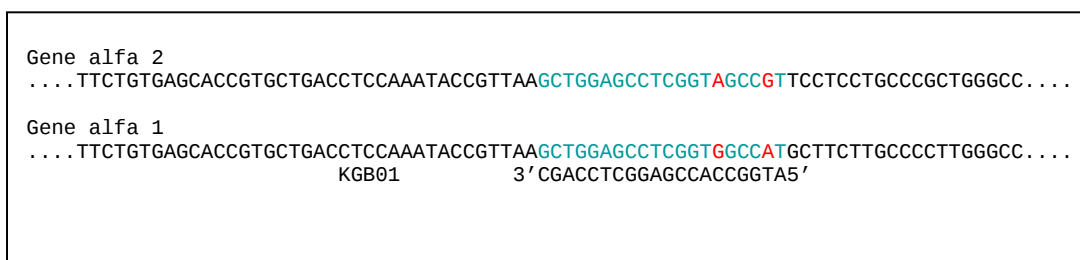


FIGURA 22 – Representação da região de anelamento do oligonucleotídeo KGB01 na sequência final do gene alfa 1 e alfa 2

O oligonucleotídeo KGB03 foi desenhado para amplificar o gene alfa 1 de tal forma a permitir a caracterização da deleção $\alpha^{3,7}$ (fig. 16). Os resultados de amplificação utilizando o par KGB03/KGB01 não foram satisfatórios, visto que

em torno de 50% das amostras testadas não houve amplificação (dados não mostrados).

Para contornar o problema da ineficiência de anelamento do par KGB03/KGB01 passou-se a utilizar o oligonucleotídeo 3.7F descrito por LIU *et al*, (2000), o qual anela na região 5'UTR dos genes alfa 2 e alfa 1 (fig. 16).

No trabalho original de LIU *et al*, (2000), o oligonucleotídeo 3.7F era utilizado formando o par com os oligonucleotídeos 3.7R1 e 3.7R2. O par 3.7F/3.7R1 amplificava o gene alfa 2 contendo 2217 pb e o par 3.7F/3.7R2 o gene alfa 1 contendo 2213 pb.

Quando se usou o par 3.7F/KGB01, houve amplificação dos dois genes alfa, sendo que o gene alfa 1 correspondeu a uma banda de 1986 pb e o gene alfa 2 a uma banda de 1729 pb (fig. 16 e 17). Como o oligonucleotídeo KGB01 é 100% complementar ao final do gene alfa 1, o fragmento de 1986 pb é preferencialmente amplificado em relação ao fragmento menor de 1729 pb. Esta amplificação preferencial do fragmento maior pode ser facilmente observada na figura 17.

Observa-se ainda que, amostras normais contendo os dois genes alfa, genótipo normal, resultou numa amplificação de duas bandas, sendo que a banda maior possuía uma intensidade maior por ser preferencialmente amplificada.

Quando ocorreu a deleção $\alpha^{3,7}$ formou-se um gene híbrido com a seqüência proximal do gene alfa 2 e a seqüência distal do alfa 1. A seqüência híbrida formada em consequência do rearranjo gênico também pode ser amplificada pelo par 3.7F/KGB01, sendo que o produto de amplificação continha 1737 pb. No indivíduo heterozigoto para a deleção $\alpha^{3,7}$ ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$) foi observado a amplificação de duas bandas com intensidades semelhantes, pois neste caso não ocorreu a amplificação preferencial de um gene sobre o outro. Assim, o gene normal alfa 1 é amplificado com a mesma preferência que o gene híbrido (alfa2/alfa1), uma vez que as regiões finais dos dois genes, são 100% complementares ao KGB01.

A detecção da deleção $\alpha^{3,7}$ ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$) provomeu mudança do padrão de amplificação. No padrão normal tem-se preferencialmente a amplificação da banda correspondente ao gene alfa1. Enquanto que no heterozigoto para a deleção $\alpha^{3,7}$ ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$) as bandas são amplificadas com a mesma intensidade.

Em indivíduos homozigotos para a deleção $\alpha^{3,7}$ ($-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$), o padrão esperado era a ausência do fragmento maior (1986 pb). Este par de oligonucleotídeos, 3.7F/KGB01, apesar de ter sido desenhado para a detecção da deleção $\alpha^{3,7}$, também detectou a deleção do tipo $\alpha^{4,2}$ homozigótica ($-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$), cujo padrão esperado era a ausência do fragmento menor (1729 pb).

Das 49 amostras analisadas com o par 3.7F/KGB01, em três não foram observados produtos de amplificação (45, 50 e 65). Essas amostras, no entanto, amplificaram com o par KGB02/KGB01. Este último par amplificou uma banda de 599 pb correspondente tanto ao gene alfa 2 quanto ao gene alfa 1 (fig. 16). Este par foi utilizado como controle de amplificação, sendo que todas as amostras dos 49 pacientes foram amplificadas. O fato do DNA dos pacientes 45, 50 e 65 terem amplificado a banda esperada quando avaliados com o par KGB02/KGB01, sugeriu que o DNA destes pacientes apresentava alguma alteração na região de anelamento do oligonucleotídeo 3.7F. O DNA do paciente 33 não foi testado com o par 3.7F/KGB01, pois a amostra era insuficiente para as análises.

Nos indivíduos 20 e 48 foi observada a amplificação de três bandas, sendo que a banda maior não apresentou intensidade superior as outras. Tal fato sugeriu que ocorreu uma deleção em uma das cópias do gene alfa 1 sendo que esta deleção não apresenta o perfil esperado para a deleção $\alpha^{3,7}$ ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$). Os produtos da amplificação destas amostras foram subclonados no plasmídeo pGEM-T Easy e serão submetidas ao seqüenciamento para caracterização destas mutações.

Vinte e nove pacientes apresentaram perfil correspondente ao genótipo normal, oito com perfil de deleção $\alpha^{3,7}$ heterozigótica ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$), seis com perfil de deleção $\alpha^{4,2}$ homozigótica ($-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$) e três não amplificaram nenhuma banda com o par 3.7F/KGB01.

Na tabela 18 foram descritos os genótipos dos 15 pacientes inicialmente suspeitos de serem portadores de talassemia alfa por meio das técnicas clássicas, não moleculares. Os pacientes 33, 56, 58, 59 e 60 não foram testados com o par 3.7F/KGB01 por insuficiência de material. Dos 10 pacientes suspeitos, os pacientes 4, 5, 8 e 29 apresentaram perfil de amplificação sugestivo da deleção $\alpha^{3,7}$ heterozigótica ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$). Os demais pacientes (1, 2, 3, 9, 10 e 47) apresentaram perfil normal. Dessa forma 40% dos suspeitos foram confirmados para a deleção ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$).

TABELA 18 – RESULTADO DA ELETROFORESE ALCALINA, VCM, HCM, PIEHH E O GENÓTIPO DAS 15 AMOSTRAS SUGESTIVAS DE TALASSEMIA ALFA

	Eletroforese alcalina	VCM	HCM	PIEHH	GENÓTIPO
1	ASH	78,4	24,8	NEGATIVA	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
2	AS	85,6	27,4	NEGATIVA	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
3	AH	86,5	28,4	NEGATIVA	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
4	AH	76,4	24,3	NEGATIVA	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$
5	AH	89,3	28,6	NEGATIVA	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$
8	AH	80,0	26,0	NEGATIVA	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$
9	AH	89,7	29,6	NEGATIVA	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
10	AH	59,0	17,2	POSITIVA	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
29	AH	89,4	29,7	NEGATIVA	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$
33	AH	90,5	29,8	NEGATIVA	Não foi testado
47	AA ₂ (H, J ou N)	78,0	25,6	NEGATIVA	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
56	AH	76,2	32,9	NEGATIVA	Não foi testado
58	AH	78,8	25,7	NEGATIVA	Não foi testado
59	AH	90,7	31,0	NEGATIVA	Não foi testado
60	AH	84,0	28,0	NEGATIVA	Não foi testado

VCM=volume corpuscular médio expresso em fL; HCM=hemoglobina corpuscular média expressa em pg; CHCM=Concentração da Hemoglobina Celular Média expressa em g/dL; RDW=índice de anisocitose expresso em % e PIEHH=pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H

Dos 34 pacientes que inicialmente não foram classificados como suspeitos de serem portadores de talassemia alfa, doze apresentaram perfil de amplificação diferente do genótipo normal. Quatro pacientes apresentaram perfil de amplificação típico da deleção $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ (23, 44, 62 e 63) e seis (12, 18, 21, 35, 40 e 46) apresentaram apenas a amplificação da banda de 1986 pb sugerindo tratar-se da deleção $(-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2})$ (tabela 16). Os indivíduos 20 e 48 apresentaram um perfil de amplificação diferente (três bandas), não podendo ser classificados como portadores das deleções $\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{4,2}$.

Os resultados descritos acima corroboram os dados descritos na literatura, onde a prevalência de talassemia alfa é subestimada em decorrência das limitações das técnicas de diagnóstico clássicas (REPAPINO *et al*, 2007; TRENT, 2006; WEATHERALL, 2004; SONATI *et al*, 1991; ADORNO *et al*, 1998; PEDROLLO, HUTZ e SALZANO, 1990)

V.2 – Detecção da deleção $\alpha^{4,2}$

No genótipo normal os oligonucleotídeos KGB04 e KGB05 estão distanciados de 6183 pb (fig. 16). Nas condições de amplificação utilizadas neste estudo um fragmento com este tamanho não seria efetivamente amplificado. A presença da deleção $\alpha^{4,2}$ resulta no encurtamento da distância de anelamento entre esses oligonucleotídeos, isso faz com que a distância passe a ser de 1983 pb, passível de ser amplificada nas condições utilizadas no trabalho.

Na tabela 17 estão os resultados de amplificação com o par de oligonucleotídeos KGB04/KGB05. Sete pacientes amplificaram a banda de 1983 pb característica da deleção $\alpha^{4,2}$. Na figura 21 foi possível observar a amplificação da banda de 1983 pb do paciente 33 indicativo da deleção $\alpha^{4,2}$.

Dos 15 pacientes inicialmente suspeitos de apresentarem talassemia alfa (tabela 8), onze foram testados para a caracterização da deleção $\alpha^{4,2}$ (1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 29, 33 e 47). Os pacientes 56, 58, 59 e 60 não foram testados, pois

amostras de DNA foram insuficientes. Desses onze pacientes testados, os pacientes 5, 8, 9, 33 e 47 apresentaram a banda de 1983 pb, caracterizando a presença da deleção $\alpha^{4,2}$, conforme mostra a tabela 17.

O paciente 10 foi o único a apresentar PIEHH positiva bem como a presença de Hb H na eletroforese. Apresentou ainda anemia severa, microcitose e hipocromia. No entanto ele apresentou genótipo normal quando avaliado para as deleções $\alpha^{3,7}$ e $\alpha^{4,2}$. Esses dados sugeriram que o paciente tenha uma talassemia alfa associada à região regulatória do agrupamento alfa ou ainda mutações pontuais. Para caracterizar este tipo de talassemia é necessário outros tipos de investigações.

Os pacientes 20 e 30 foram incluídos nesta análise por apresentarem um quadro de microcitose e hipocromia, sendo que na amostra do paciente 20 foi detectado o perfil característico da deleção $\alpha^{4,2}$.

Os pacientes 16, 22 e 23 foram incluídos como controles normais para talassemia alfa uma vez que apresentaram quadro hematológico normal (tabela 4 e 7). Na amostra do paciente 16 foi detectado o perfil característico da deleção $\alpha^{4,2}$.

O paciente 47 apresentou uma banda com migração eletroforética mais rápida que a Hb A persistindo até o final da eletroforese. Esse quadro foi sugestivo da ocorrência de um caso de hemoglobina variante. Utilizando-se o padrão apresentado na figura 7, esta hemoglobina poderia ser Hb H, Hb Bart's, Hb N Baltimore, Hb J Oxford, Hb J Baltimore, Hb Lufkin, Hb Camperdown, Hb Camdem e Hb New York. Como este paciente apresentou a deleção $\alpha^{4,2}$ pôde-se inferir que a banda representava a Hb H. Mas isso só seria possível se a concentração de Hb H fosse bastante elevada para perdurar até o final da eletroforese. Na tabela 9 pode-se notar que a PIEHH foi negativa para este paciente, sugerindo que os níveis de Hb H não estavam tão elevados, reforçando assim a hipótese de se tratar de outra hemoglobina variante. Segundo NAOUM (1999) as hemoglobinas mais associadas a este perfil são Hb J e Hb N.

V.3 – Pacientes que apresentaram associação entre dois tipos de talassemia alfa

Os pacientes 5 e 8 apresentaram perfil para deleção $\alpha^{4,2}$ e para deleção $\alpha^{3,7}$ ($-\alpha^{4,2}/-\alpha^{3,7}$). O paciente 20 apresentou deleção $\alpha^{4,2}$ e um perfil diferente do perfil normal quando amplificado com os oligonucleotídeos 3.7F/KGB01. Nestes três pacientes foi detectada a associação de dois tipos de talassemia alfa (tabela 19).

TABELA 19 – RESULTADO DO ERITROGRAMA E DO GENÓTIPO DOS PACIENTES QUE APRESENTARAM ASSOCIAÇÃO ENTRE DOIS TIPOS DE TALASSEMIA ALFA

	Hb	VCM	HCM	GENÓTIPO
5	13,1	89,3	28,6	$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{4,2}$
8	14,2	80,0	26,0	$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{4,2}$
20	10,7	75,0	23,9	$?/\alpha^{4,2}$

Hb=hemoglobina total expressa em g/dL; VCM=volume corpuscular médio expresso em fL; HCM=hemoglobina corpuscular média expressa em pg. Os valores destacados em vermelho estão abaixo dos valores de referência adotados.

Esses dados corroboram os achados de RAHIM *et al*, (2008); HUNG *et al*, (2007); LIU *et al*, (2000); CHONG *et al*, (2000); BOWIE *et al*, 1994; BOWDEN *et al*, 1987 que descreveram pacientes com diferentes associações de talassemia alfa. Apesar de apresentar esta associação, não houve grandes alterações no quadro hematológico destes pacientes. Como pode ser visto na tabela 19, apenas o paciente 20 apresentou valores sugestivos de alfa talassemia. O eritrograma do paciente 05 estava normal e do paciente 08 mostrou apenas uma discreta hipocromia. Essa discreta hipocromia normalmente não seria relevante para o clínico.

LIU *et al*, (2000) sugeriram que valores de HCM entre 25-27 pg com VCM normal ou diminuído estão associados a presença de deleções do tipo $\alpha^{3,7}$ ou $\alpha^{4,2}$ heterozigóticas e que valores de HCM inferiores a 25 pg e VCM diminuído estão associados a deleções homozigóticas. No entanto, de acordo com OLIVEIRA, MENDIBURU e BONINI-DOMINGOS (2006) estes índices eritrocitários podem variar de acordo com a população estudada. Fatores como a composição étnica da região estudada e fatores nutricionais devem ser levados em consideração na interpretação dos resultados.

Com relação ao paciente 20, seria importante aprofundar as investigações pertinentes ao padrão de amplificação obtido com os oligonucleotídeos 3.7F/KGB01, visto que o padrão hematológico apresentou-se bastante alterado.

VI – CONCLUSÕES

A utilização do par de oligonucleotídeos 3.7F/KGB01 foi informativa para a detecção da deleção $\alpha^{3,7}$, uma vez que permitiu diferenciar o genótipo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), do heterozigoto ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$) e do homozigoto ($-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$).

Apesar de ter sido desenhado para detectar a deleção $\alpha^{3,7}$, o par de oligonucleotídeos 3.7F/KGB01 também permitiu detectar a deleção $\alpha^{4,2}$, quando em homozigose ($-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$).

O par de oligonucleotídeos KGB04/KGB05 detectou a deleção $\alpha^{4,2}$, porém não foi possível diferenciar entre o genótipo heterozigoto e homozigoto.

Amostras com anemia, mesmo sem apresentar microcitose e hipocromia, devem ser submetidas a avaliação molecular para caracterização de talassemia alfa.

As amostras sem anemia, mas com microcitose e hipocromia também devem ser avaliadas.

A deleção mais prevalente encontrada nos pacientes atendidos no LAS – CBB – UCG foi a $\alpha^{4,2}$ (20,0%), sendo que 9,2% dos casos eram homozigotos ($-\alpha^{4,2}/-\alpha^{4,2}$).

A deleção do tipo $\alpha^{3,7}$ na forma heterozigótica foi detectada em 12,3% dos pacientes.

Em função da diversidade genética da formação da população brasileira seria de fundamental importância a criação de normas para a detecção molecular de talassemia alfa em neonatos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A talassemia alfa resulta principalmente de mutações deletionais de um (- α) ou dos dois (--) genes alfa localizados no cromossomo 16p13.3. Ela tem sido amplamente estudada no mundo e no Brasil por ser uma das formas mais prevalentes de anemias hereditárias e por estar relacionada com a diversidade genética que compõe a população brasileira (BONINI-DOMINGOS, 2004; WEATHERALL e CLEGG, 2001b).

É importante ressaltar a observação de ACEDO *et al*, (2002) que afirmam que à medida que as doenças infecciosas e a desnutrição vão sendo controladas, as hemoglobinopatias emergem como um dos mais importantes problemas de saúde pública dos países em desenvolvimento.

Quanto mais precoce o diagnóstico for realizado, melhor e mais adequado será o acompanhamento clínico a cada caso, evitando condutas terapêuticas desnecessárias com ferro, folatos e vitaminas, pois as talassemias são refratárias a esses tratamentos medicamentoso. Assim, um paciente submetido a esta terapia, poderá gerar distúrbios orgânicos graves pelo acúmulo de ferro (LORENZI, 1999; NAOUM, 1997; ZAGO; FALCÃO e PASQUINI, 2004).

A inclusão da pesquisa das hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), do Ministério da Saúde do Brasil, possibilitou o diagnóstico precoce dos portadores, favorecendo o aconselhamento genético aos pais, informando-os sobre a chance de virem a ter outros filhos afetados, orientação aos pais sobre os sinais e sintomas precoces das complicações e identificação de outros portadores na família. A inclusão do diagnóstico para hemoglobinopatias no PNTN constitui em um passo importante no reconhecimento da relevância deste complexo grupo de patologias no contexto da saúde pública no Brasil. Desde o ano de 2001, quando a portaria ministerial,

entrou em vigor, uma ampla divulgação entre os profissionais ligados à saúde pública, sobretudo entre aqueles que atuam na triagem neonatal está sendo realizada (RAMALHO, MAGNA e PAIVA e SILVA, 2003; DUCATTI *et al*, 2001; LEONELI *et al*, 2000).

O presente trabalho teve como proposta o estudo das metodologias empregadas no diagnóstico da talassemia alfa. Utilizando os métodos mais aplicados dentro, dos inúmeros existentes, confirmamos o que é descrito na literatura, que a maioria dessas metodologias apresenta vantagens e desvantagens demonstrando em certos casos, limitações que impedem o diagnóstico preciso e exato. Assim, é certo que, cada vez mais, existe a necessidade de associar metodologias clássicas, de triagem e métodos confirmatórios moleculares para um diagnóstico completo e esclarecedor das alterações nas hemoglobinas. Os exames laboratoriais disponíveis se tornam a cada dia mais rápido e preciso no auxílio diagnóstico para o clínico que faz a correlação com os processos fisiopatológicos de alguns portadores de hemoglobinopatias (NAOUM, 1999; CHINETATO-FERNADES e BONINI-DOMINGOS, 2006).

Para a detecção de talassemia do tipo beta observamos que as metodologias clássicas são capazes de caracterizar os portadores sem obviamente, definir o genótipo para o caráter em questão. Neste caso o tratamento seria direcionado sem nenhum transtorno ao paciente, independentemente ao genótipo.

Mas para o diagnóstico de talassemia alfa ficou claro que as metodologias não moleculares têm a sua importância, mas, no entanto, são limitadas ao tipo de deleção apresentada. A importância da detecção molecular para talassemia alfa não se restringe apenas na definição do genótipo, mas também na detecção deste tipo de talassemia em pacientes: a) com quadros hematológicos alterados; b) com quadros hematológicos normais, mas com valores próximos aos valores limítrofes e c) neonatos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEDO, M. J. *et al.* Programa comunitário de hemoglobinopatias: abordagem populacional a partir de doadores de sangue de Bragança Paulista, São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública** v.18, n.6, p.1799-1802, 2002.

ADORNO, E. V. *et al.* Caracterização molecular da talassemia alfa 2 em uma população de Salvador-Bahia. **Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemot.** v. 20, p. 97, 1998.

AHMED, M. *et al.* The β -globin genotype E121Q/W15X (cd121GAA $\rightarrow$ CAA/cd15TGG $\rightarrow$ TGA) underlines Hb D / β -(0) thalassemia marked by domination of haemoglobin D. **Ann. Hematol.** v.80, p.629-633, 2001.

BAYSAL, E.; HUISMAN, T. H. J. Detection of common deletional α -thalassemia-2 determinants by PCR. **Am. J. Hematol.** v.46, p.208-213, 1994.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5ª ed. Guanabara Koogan, 2004.

BERNINI, L.F.; HARTEVELD, C.L. Alpha-thalassaemia. **Baillieres Clin. Haematol.**, v.11, n.1, p.53-90, 1998.

BERTHOLO, I. C.; MOREIRA, H. W. Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre elas e talassemias beta. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.42, n.4, p.245-251, 2006.

BERTUZZO, C.S.; SONATI, M.F.; COSTA, F.F. Hematological phenotype and the type of β -thalassemia mutation in Brazil. **Braz. J. Genet.**, v.20, n.2, p.319-321, 1997.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Thalassemia screening in Brazil – Results for 20 years. **Rev. Bras. Hematol. e Hemot.**, v.26, n.4, p.288-289, 2004.

BONINI-DOMINGOS, C. R. *et al.* Interação entre HbC [β 6(A3) Glu>Lys] e IVS II-654 (C>T) beta-talassemia no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.25, n.2, p.115-121, 2003.

BORGES, E. *et al.* High prevalence of α -thalassemia among individuals with microcytosis and hipocromia without anemia. **Bras. J. Med. Biol. Res.** v.34, n.6, p.759-762, 2001.

BOWDEN, D. K. *et al.* Different hematologic phenotypes are associated with the leftward ($-\alpha^{4,2}$) and rightward ($-\alpha^{3,7}$) α^+ – thalassemia deletions. **J. Clin. Invest.** v.79, p.39-43, 1987.

BOWIE, L. J. *et al.* Detection of α -thalassemias by multiplex polymerase chain reaction. **Clin. Chem.**, v.40, n.12, p.2260-2266, 1994.

CANÇADO, R. D. Talassemias alfa. **Rev. Bras. Hematol. Hemot.**, v.28, n.2, p.81-87, 2006.

CASTRO, F. S. *et al.* Prevalências de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico. **Rev. Bras. Hematol. e Hemot.**, v.30, n.1, p.24-28, 2008.

CHINETATO-FERNADES, A. R.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinas variantes. **Rev. Bras. Hematol. e Hemot.**, v.28, n.1, p.65-70, 2006.

CHINETATO-FERNADES, A. R.; MENDIBURU, C. F.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Utilization of different methodologies for the characterization of Hb Hasharon heterozygotes. **Genet. Mol. Res.**, v.5, n.1, p.1-6, 2006.

CHONG, S. S. *et al.* Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassemia. **Blood**. v.95, n.1, p.360-362, 2000.

CHUI, D. H. K.; FUCHAROEN, S.; CHAN, V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. **Blood**. v.101, n.3, p.791-800, 2003.

CLARKE, G. M.; HIGGINS, T. N. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. **Clin. Chem.**, v.46, n.8, p.1284-1290, 2000.

DI BELLA, C. *et al.* Identification of alpha-thalassemia mutations in subjects from Eastern Sicily (Italy) with abnormal hematological indices and normal Hb A₂. **Ann Hematol.** v.85, n.12, p.829-831, 2006.

DIAS-PENNA, K. G. B. *et al.* Dificuldades na identificação laboratorial da talassemia alfa. **J. Bras. Patol. Med. Laboratol.**, 2009. **(Submetido)**

DUCATTI, R. P. *et al.* 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.

EASTMAN, J. W. *et al.* Distribution of hemoglobin F, A, S, C, E and D quantities in 4 million newborn screening specimens. **Clin. Chem.** v.45, n.5, p.683-685, 1999.

EMBURY, S. H. *et al.* Two different molecular organizations account for the single α -globin gene of the α -thalassemia-2 genotype. **J. Clin. Invest.**, v.66, p. 1319-1325, 1980.

FERNANDES, A. R. C. *et al.* Avaliação eletroforética, cromatográfica e molecular da Hb D Los Angeles no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. e Hemot.**, v.25, n.3, p.161-168, 2003.

FOGLIETTA, E. *et al.* Detection of α -globin gene disorders by a simple PCR methodology. **Haematol.** v.81, p.387-396, 1996.

FUCHAROEN, S. *et al.* Prenatal and post natal diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. **Clin. Chem.** v.44, p.740-748, 1998.

GEVA, A. *et al.* Hemoglobin Jamaica Plain – A sickling hemoglobin with reduced oxygen affinity. **N. Engl. J. Med.** v.351, p.1532-1538, 2004.

GLOBIN GENE SERVER. Disponível em: <<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>> Acesso em: 27 de fevereiro de 2009.

HARTEVELD. *et al.* Different geographic origins of Hb Constant Spring [α 2 codon 142 TAA→CAA]. **Haematologica.** v.86, n.1, p.36-38, 2001.

HIGGS, D. R. *et al.* A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. **Blood**, v.73, n.5, p.1081-1104, 1989.

HUNG, C. C. *et al.* Molecular assay of $-\alpha^{3.7}$ and $-\alpha^{4.2}$ deletions causing α -thalassemia by denaturing high-performance liquid chromatography. **Clin. Biochem.**, v.40, p.817-821, 2007.

JARMAN, A. P. *et al.* Characterization of the major regulatory element upstream the human alpha-globin gene cluster. **Mol. Cell. Biol.**, v.11, n.9, p.4679-4689, 1991.

JORGE, S. B. *et al.* Screening for mutations in human alpha-globin genes by nonradioactive single-strand conformation polymorphism. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.36, n.11, p.1471-1474, 2003.

JORGE, S. E. *et al.* Three new alpha-globin variants: Hb Itapira [α 30(B11)Glu→Val (α 1)], Hb Bom Jesus Da Lapa [α 30(B11)Glu→Ala (α 1)] and Hb Boa Esperança [α 16(A14)Lys→Thr (α 2)]. **Hemogl.** v.31, n.2, p.151-157, 2007.

JOUTOVSKY, A.; HADZI-NESIC, J.; NARDI, M. A. HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of

60000 samples in a clinical diagnostic laboratory. **Clin. Chem.**, v.50, n.10, p.1736-1747, 2004.

LACERRA, G. *et al.* Genotyping for known Mediterranean alpha-thalassemia point mutations using a multiplex amplification refractory mutation system. **Haematologica**. v.92, n.2, p.254-255, 2007.

LEONELI, G. G. *et al.* Hemoglobinas anormais e dificuldades diagnóstica. **Rev. bras. Hematol. Hemoter.** v.22, n.2, p.396-403, 2000.

LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Hematologia Prática de Dacie e Lewis**. 9ª ed. Artmed, 2006.

LIEBHABER, S. A.; KAN, Y. W. Differentiation of the mRNA transcripts originating from the alfa1 and alfa2-globin *loci* in normals and alfa-thalassemics. **J. Clin. Invest.** n.68, p.439-446, 1981.

LIU, J. Z. *et al.* Molecular prenatal diagnosis of alpha-thalassemia using real-time and multiplex polymerase chain reaction methods. **Hemoglob.**, v.32, n. 6, p.553-560, 2008.

LIU, Y. T. *et al.* Rapid detection of alfa-thalassemia deletions and alfa-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. **Brit. J. Haematol.**, v.108, p.295-299, 2000.

LORENZI, T. F. **Atlas de Hematologia: Clínica hematológica ilustrada**. 1ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.86-95, 2006.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia. Propedêutica e Clínica**. 2ª ed., Medsi, São Paulo, p.641, 1999.

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

MELO, M. R. *et al.* Uso de índices hematimétricos no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas: uma abordagem a ser adotada. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.48, n.3, p.222-224, 2002.

MELO-REIS, P. R. *et al.* A importância do diagnóstico precoce na prevenção das anemias hereditárias. **Rev. bras. hematol. hemot.** v.28, n.2, p.149-152, 2006a.

MELO-REIS, P. R. *et al.* Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em Goiás, Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Laboratol.** v.42, n.6, p.425-430, 2006b.

MELO-REIS, P. R. *et al.* Prevalência de hemoglobinopatias e talassemias em crianças de 6 meses a 7 anos de idade no laboratório escola do Departamento de Biomedicina (CBB)-UCG. **Rev. Bras. Anal. Clin.** v.37, n.1, p.3-5, 2005.

MELO-REIS, P. R. *et al.* Prevalência de hemoglobinopatias e talassemias em alunos da Universidade Católica de Goiás. **Estudos**, v.31, p.125-133, 2004.

MICHELSON, A. M.; ORKIN, S. H. Boundaries of gene conversion within the duplicated human α -Globin genes. **J. Biolog.Chem.** v.258, n.24, p.15245-15245, 1983.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em:
<<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2001/GM/GM822.htm>>
Acesso em 30 de junho de 2007.

NAGEL, R. L. **Hemoglobin disorders: molecular methods and protocols.** Humana Press, New Jersey, 2003.

NAOUM, P. C. **Eletroforese. Técnicas e Diagnósticos.** 2^a ed. Santos Livraria Editora, São Paulo, p.154, 1999.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias.** 1^a ed. Sarvier, São Paulo, 1997.

NAOUM, P. C. *et al.* Hb D/ Talassemia beta associada à anemia crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.24(1), p.51-52, 2002.

NAOUM, P. C. *et al.* Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, v.23, p.68-79, 1987.

NAOUM, P. C. *et al.* Hemoglobinopatias no Brasil. **Boletim**, v.8, n. 141, p.180-188, 1986.

NAOUM, P. C.; DOMINGOS, C. R. B. Talassemias Alfa. **Laes & Haes**, v.18, n.107, p.70-98, 1997.

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. **Doença das células falciformes.** 1^a ed. Sarvier, São Paulo, 2004.

NETO, M. A. S. **Estudo de prevalência de hemoglobinopatias na cidade de Bom Jardim de Goiás.** Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Goiás, Goiânia. 2007.

NIENHUIS, A. W.; ANAGNOU, N. P.; LEY, T. J. Advances in thalassemia research. **Blood**. v.63, n.4, p.738-758, 1984.

OLIVEIRA, G. L. V.; MENDIBURU, C. F.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Avaliação do perfil hematológico de portadores de talassemia alfa provenientes das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.28(2), p.105-109, 2006.

ORKIN, S. H.; GOFF, S. C.; HETCHMAN, R. L. Mutation in an intervening sequence splice junction in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.78, p.5041-5045, 1981.

PAPAYANNOPOULOS, R.; STAMATONYANNOPOULOS, G. Stains form inclusions bodies. In **"Standardization of laboratory reagents and methods for detection of haemoglobinopathies."** Atlanta: Hew publications, 1974.

PARRA, F. C. *et al.* Color and genomic ancestry in Brazilians. **PNAS**. v.100, n.1, p.177-182, 2003.

PEDROLLO, E; HUTZ, M. H.; SALZANO, F. M. Alfa thalassemia frequency in newborn children from Porto Alegre, Brasil. **Rev. Bras. Genet.** v.13, n.3, p.573-581, 1990.

PENA, S. D. J. *et al.* DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. **Electrophoresis**, v.12, p.146-152, 1991.

PEREA, F. J. *et al.* Hb D-Los Angeles associated with Hb S or β -thalassemia in four Mexican mestizo families. **Hemoglobin**, v.23, p.231-237, 1999.

PEREIRA, F. J. *et al.* Human alpha2-globin nonsense-mediated mRNA decay induced by a novel alpha-thalassaemia frameshift mutation at codon 22. **Br J Haematol.** v.133, n.1, p.98-102, 2006.

PRATT, C. W.; CORNELLY, K. **Bioquímica Essencial**. 1^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.117-123, 2006.

PSCHEITDT *et al.* Koln's unstable hemoglobin: case report and literature review. **J. Bras. Patol. Med. Laboratol.** v.39, n.1, p.37-40, 2003.

RAHIM, F. *et al.* Co-inheritance of alpha-and beta-thalassemia in Khuzestan Province, Iran. **Hematolog.** v. 13, n. 1, p.59-64, 2008.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; PAIVA e SILVA, R. B. A Portaria no 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Cad. Saúde Pública**. v.19, n.4, p.1195-1199, 2003.

REPAPINOU, Z. *et al.* An improved method for the diagnostic approach of α^+ -thalassaemia. **Int. Jnl. Lab. Hem.** v.29, p.45-51, 2007.

RIBEIRO, D. M.; SONATI, M. F. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia. **Genet. Mol. Res.**, v.7, n.4, p.1045-1053, 2008.

RIBEIRO, V. S.; ARAÚJO, J. T. Hemoglobina H. Identificação Laboratorial. **Res. Hosp. Clin. Fac. Med.**, v.47, n.4, p.176-179, 1992.

ROMÃO, L. *et al.* Alpha thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the alpha globin structural genes. **Blood**, v.78, p.1589-1595, 1991.

SAIKI, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-491, 1988.

SALZANO, F. M. Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. **An. Acad. Bras. Cienc.** v.74, n.2, p.223-263, 2002.

SALZANO, F. M. Permanence or change? The meaning of genetic variation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. v.97, n.10, p.5317-5321, 2000.

SAMBROOK, J.; FRISTCH, E.; MANIATIS, T. **Commonly used techniques in molecular cloning**. In molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SCHNEIDER, R. G. Differentiation of electrophoretically hemoglobins – such as S, D or G and P, or A₂, C, E, and O – by electrophoresis of globin chains. **Clin. Chem.**, v.20, p.1111-1115, 1974.

SCHNEIDER, R. G. *et al.* Abnormal hemoglobins in a quarter million people. **Blood**, v.48, n.5, p.629-637, 1976.

SILVA, P. H.; PIVATTO, I.; RONCHI-JUNIOR, I. Hemoglobinopatia SC: diagnóstico laboratorial e aconselhamento genético – A propósito de um caso. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v.29, n.1, p.2-4, 1997.

SILVESTRONI, E.; BIANCO, I. Screening for Microcytemia in Italy: analysis of collected in the past 30 years. **Am. J. Hum. Genet.** v.27, p.198-212, 1975.

SONATI, M. F. *et al.* Hb H disease associated with the (–^{MED}) deletion in a brazilian black woman. **Acta Haematol.** v.87, n.3, p.145-147, 1992.

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

STEENSMA, D. P.; GIBBONS, R. J.; HIGGS, D. R. Acquired α-thalassemia in association with myelodysplastic syndrome and other hematologic malignancies. **Blood** v.105, n.2, p.443-452, 2005.

SUB, D. D.; KRAUSS, J. S.; BURES, K. Influence of hemoglobin S adducts on hemoglobin A₂ quantification by HPLC. **Clin. Chem.**, v.42, n.7, p.1113-1114, 1996.

TRENT, R. J. A. Diagnosis of the haemoglobinopathies. **Clin. Biochem. Rev.** v.27, p.27-38, 2006.

VELLA, F.; LEHMANN, H. Haemoglobin D Punjab (D Los Angeles). **J. Med. Genet.**, v.11, p.341-348, 1974.

WAGNER, S. C. *et al.* Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes com anemia não ferropênica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.27, n.1, p.37-42, 2005.

WEATHERALL, D. J. The thalassaemias. **Brit. Med. J.**, v.314, p.1675-1678, 1997.

WEATHERALL, D. J. The thalassemias: the role of molecular genetics in an evolving global health problem. **Am. J. Hum. Genet.** v.74, p.385-392, 2004.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. **The Thalassaemia Syndromes**. 4^a ed. Blackwell Science Publications, 2001(a).

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **WHO.** v.79, n.8, p.704-712, 2001(b).

WEISS, I. M.; LIEBHABER, S. A. Erythroid cell-specific determinants of α -globin mRNA stability. **Mol. Cell. Biol.** v.14, n.12, p.8123-8132, 1994.

WENNING, M. R. S. C. *et al.* α -globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, p.1041-1045, 2000.

WHO WORKING GROUP. Hereditary anemia: genetics basic, clinical features, diagnosis and treatment. **WHO.**, v.60, p.643-660, 1982.

WILD, B. J.; STEPHENS, A. D. The use of automated HPLC to detect and quantitate haemoglobins. **Clin. Chem.**, v.43, p.1850-1856, 1997.

WIWANITKIT, V. Structural analysis of the elongated part of abnormal haemoglobin "Haemoglobin Tak". **Haema.** v.8, n.4, p.626-628, 2005.

ZAGO, M. A.; COSTA, F. F. Hereditary hemoglobin disorders in Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.79, n.3, p.385-388, 1985.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia. Fundamentos e Prática**. 1ª ed. Atheneu, 2004.

ZAMARO, P. J. A. *et al.* Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à HbS. **J. Bras. Patol. Med. Molec.**, v.38, n.4, p.261-266, 2002.

ZAMARO, P. J. A.; HIDALGO, C. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em indivíduos da população brasileira. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.25, n.4, p.223-229, 2003.

ZANDIAN, K. Alpha-thalassemia mutations in Khuzestan Province, Southwest Iran. **Hemoglobin.**, v.32, n.6, p.546-552, 2008.

ANEXOS

Anexo A. Parecer do Comitê de Ética

Anexo B. TCLE

Anexo C. Artigo submetido ao Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial – JBPML (ISSN 16762444), conforme normas de publicação (www.sbpc.org.br/comunicacao/instrucoes.jbpml.php)

Anexo A



PROTOCOLO
065/2005

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO

I. IDENTIFICAÇÃO:

Título do projeto: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEMOGLOBINAS VARIANTES E TALASSEMIAS EM PACIENTES DO LAS-CBB-UCG.

Pesquisador Responsável: KARLA GREICK BATISTA DIAS PENA, Professora Assistente da Universidade Católica de Goiás.

Pesquisadores Participantes: LUIZ ARTHUR MENDES BATAUS : ,Orientador, Professor Doutor do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.
PAULO ROBERTO DE MELO REIS, Professor Assistente da Universidade Católica de Goiás.

No período agosto 2004 a julho de 2007

Data de apresentação ao COEP: 15/08/2005

O presente projeto de pesquisa faz parte do programa do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás para a obtenção do título de Doutor, e tem como objetivo principal estudar e caracterizar as hemoglobinas variantes e talassemias.

II – OBJETIVOS:

Objetivo Geral:

- A realização do presente estudo visa a estudar e caracterizar através de técnicas de Biologia Molecular as hemoglobinas variantes e talassemias detectadas em pacientes do LAS-UCG.

Específicos:

- Analisar a prevalência de hemoglobinopatias e talassemias nos laboratórios do LAS-UCG.
- Possibilitar o levantamento dessas alterações hereditárias prevalentes nesta população.
- Executar métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico, das hemoglobinopatias e talassemias.
- Confirmação das variantes de hemoglobinas de difícil diagnóstica, através de técnicas de Biologia Molecular.
- Identificar possíveis mutações pontuais nos genes das hemoglobinas.
- Investigar nos genes das hemoglobinas regiões que sofreram inserções e/ ou deleções.

III – Sumário do projeto:• **Descrição e caracterização da amostra:**

A amostra será constituída de 50 pacientes atendidos o laboratório escola do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás, onde será realizada a primeira etapa dos procedimentos que compreenderão os testes de triagem e os de testes de eletroforese de hemoglobina em pH ácido e Cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os testes moleculares, PCR (Reação em cadeia polimerase) e RFLP (Restriction fragment length polymorphism), serão realizados no Laboratório de Engenharia Genética do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Goiás.

• **Crêterios de inclusão e exclusão:**

A participação dos pacientes será voluntária e só será realizado mediante consentimento por escrito e quando se tratar de menor idade será necessária a autorização do responsável.

• **Adequação da metodologia:**

Trata-se da realização de um trabalho de pesquisa em que serão utilizadas técnicas apropriadas para a coleta, conservação e utilização posterior para análises propostas nas respectivos laboratórios anteriormente enumerados.

Adequação das condições:

Uma vez que o referido estudo será realizado empregando-se técnicas adequadas e apropriadas para a coleta, manutenção e manuseio nos respectivos laboratórios, sendo, pois, técnicas usuais, pode-se observar que não trará riscos ou perigo para a vida ou mesmo ao seu organismo física e psiquicamente.

Não foi apresentado qual o tratamento estatístico que será aplicado, embora conste no cronograma a realização de análise estatística e, informando ainda que os gastos para a realização do presente, serão de recursos dos próprios realizadores deste estudo.

Também, os participantes se adequam satisfatoriamente dentro dos perfis de pesquisadores para a linha de pesquisa em pauta.

IV – Comentários do relator frente à Resolução CNS 196/96 e complementares em particular sobre:• **Estrutura do protocolo:**

O presente protocolo de trabalho de pesquisa preenche aos requisitos e normas fixadas pela Resolução 196/96 do CNS e cada participante será informado sobre o estudo a ser realizado bem como o termo de consentimento, cujas informações serão fornecidas pelo pesquisador, como o objetivo de esclarecer e firmar acordo por escrito, mediante o qual o sujeito da pesquisa autorizará a sua participação, sem qualquer forma de coação ou ameaça física deste estudo.

• Análise de riscos e benefícios:

Em virtude de ser um trabalho realizado, em se utilizando técnicas apropriadas não haverá riscos nem utilização de fármacos que poderiam por em riscos os partícipes.

• Estrutura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Conforme consta nos laudos do presente processo, em anexo, este satisfaz as normas vigentes.

• Forma de obtenção do Termo de Consentimento:

Informa-se que no ato da realização da coleta do material o participante terá as informações quanto a sua participação voluntária neste estudo e que a qualquer momento poderá ter as informações que desejar, podendo retirar seu consentimento e mesmo não participar deste estudo sem que haja qualquer tipo de pressão ou mesmo prejuízo.

• Privacidade e confidencialidade:

Informa que serão utilizados os meios para a manutenção da privacidade e confidencialidade, e que os resultados só serão divulgados em meio científico e serão tomados todos os meios para a manutenção da privacidade e sigilo de identificação dos participantes.

Parecer do COEP:

Portanto, diante do exposto e à luz dessas considerações, somos, S.M.J. favoráveis aprovação do presente.

VI – Data da reunião:

Goiânia, 07 de dezembro de 2005

Assinatura do relator:

Assinatura do Coordenador/COEP:

Anexo B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E ENGENHARIA GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você poder procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Linha de Pesquisa: **ANEMIAS HEREDITÁRIAS**

Projeto: **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEMOGLOBINAS
VARIANTES E TALASSEMIAS.**

Pesquisadora Responsável: **Karlla Greick Batista Dias Penna**

Telefone para contato: (62)32049012

Pesquisador participante: **Luiz Artur Mendes Bataus**

Telefones para contato: (62)35211493

Será colhida a sua amostra de sangue mediante o seu consentimento, esta amostra será utilizada para fazer exames específicos para o diagnóstico das ANEMIAS HEREDITÁRIAS tais como: hemograma, eletroforese de hemoglobina, prova de resistência à salina 0,36%, pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H, cromatografia líquida de alta performance, teste de falcização e extração de DNA para análise por técnica de PCR.

O objetivo da pesquisa é saber a prevalência desta doença na nossa população. Não existe nenhum risco, nem desconforto ou lesões que possam ser provocados pela pesquisa e você receberá o resultado no final da pesquisa, prevista para dezembro de 2008.

Todos os dados são sigilosos e você tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Data: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E ENGENHARIA GENÉTICA

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG nº _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo em ANEMIAS HEREDITÁRIAS, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu atendimento .

Local e data _____

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Observações complementares:

Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: ()

Endereço: _____

_____ Bairro _____

Telefone: _____

Naturalidade do paciente: _____ Estado: _____

Naturalidade do pai: _____ Estado: _____

Naturalidade da mãe: _____ Estado: _____

Na família (até os avós) possui alguém de ascendência: Negróide () Asiática () Européia () Indígena () Outra: _____

Você já teve anemia? Não () Sim () Já fez tratamento para anemia? Não () Sim ()

Qual medicamento você usou? _____

Houve melhora com o uso do medicamento? Não () Sim ()

Atualmente você está em uso de algum Medicamento: _____

Anexo C

Dificuldades na identificação laboratorial da talassemia alfa.

Difficulties in laboratory identification of alpha thalassemia.

Karlla Greick Batista Dias-Penna¹, Paulo Roberto de Melo-Reis², Mauro Meira de Mesquita², Jairo Batista da Silva², Luiz Artur Mendes Bataus³.

¹Professora mestre pela UFG. Professora assistente do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás. Doutoranda em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás.

²Professores mestres pela UCG. Professores assistentes do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás.

³Professor doutor pela UNB. Professor da UFG, Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFG, Goiânia GO.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Estudo e Pesquisa em Anemias Hereditárias – LEPAH – do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás (UCG), Goiânia, GO.

Resumo

INTRODUÇÃO: Talassemia alfa é uma síndrome associada à redução da síntese de cadeias de globina do tipo alfa. A severidade das manifestações clínicas estão relacionadas com a quantidade de globinas produzidas e a estabilidade das cadeias beta em excesso presentes. A talassemia alfa mínima resulta da deleção de apenas um dos quatro genes α ($-\alpha/\alpha\alpha$). Clinicamente apresenta anemia leve com microcitose ou ausência de anemia, sendo o diagnóstico realizado através da visualização da Hb H pela eletroforese alcalina em acetato de celulose ou pela identificação das inclusões celulares de Hb H coradas pelo azul de crezil brilhante. **OBJETIVO:** Avaliar portadores de talassemia alfa e seus respectivos progenitores, correlacionando o perfil hematológico e a presença de Hb H, utilizando procedimentos laboratoriais clássicos, em três diferentes amostragens. **DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:** Os dados obtidos mostram que a presença de Hb H, indicativo de talassemia alfa, pode ser temporária. A talassemia alfa está associada a defeitos genéticos envolvendo os genes codificadores da cadeia alfa, mas também pode estar associada a um desbalanciamento temporário na expressão dos genes globina, diminuição de alfa ou aumento de beta, o que poderia explicar o aparecimento de tetrâmeros de cadeia beta (Hb H) sugerindo o diagnóstico de talassemia alfa mínima.

Unitermos: Hemoglobinopatias, Talassemia alfa, Hemoglobina H

Abstract

BACKGROUND: Alpha thalassemia is a syndrome associated the reduced synthesis of alpha globin chains. The severity of clinical manifestations is related to the amount of globin produced and the stability of the beta chains presented in excess. The thalassemia alpha minimum is caused by the deletion of one of the four genes α ($-\alpha/\alpha\alpha$). Clinically it presents mild anemia with microcytosis or absence of anemia, and the diagnoses is done by the visualization of Hb H by the alkaline electrophoresis on cellulose acetate or can be detected by the visualization of the inclusion bodies of Hb H in cells stained with supravital oxidizing dyes as the brilliant cresyl blue. **OBJECTIVE:** Evaluate thalassemia alpha carriers and their respective progenitors, correlating the hematology profile and the presence of the Hb H, by classics laboratories proceeding, in tree different samplings. **DISCUSSION AND CONCLUSIONS:** The results show that the presence of the Hb H, indicative of talassemia alpha may be temporary. The thalassemia alpha is associated to genetics defects involving the coding genes of the alpha chain, but may be either associated with a temporary imbalance on the expression of globin gene, reduction of alpha chain or beta increase, what could explain the surging of the tetramers of beta chain (Hb H) suggesting the diagnoses of alpha thalassemia minimum.

Key words: Hemoglobinopathies, Thalassemia alpha, Hemoglobin H

Introdução

A talassemia (hemoglobinopatia) é uma síndrome que envolve os genes produtores de globina, alfa e não alfa (beta, delta e gama), encontrada em vários países representando um sério problema de saúde global principalmente na Europa, África e Ásia²³. No Brasil, devido a grande migração de povos originados destes continentes, é descrito uma significativa frequência de hemoglobinopatias que reflete uma enorme diversidade étnica dependendo da região estudada. Relatos das décadas de 70 e 80 mostraram a existência de pacientes portadores de talassemia alfa no Brasil^{15,24}.

A talassemia alfa está associada com a síntese reduzida de cadeias de globina alfa e conseqüente aumento da concentração de cadeias beta. Este desbalanceamento induz a formação de tetrâmeros de cadeias beta denominados de hemoglobina (Hb) "H"²². Esses tetrâmeros apresentam instabilidade, a qual resulta na precipitação dessa hemoglobina sobre a membrana do eritrócito, diminuindo conseqüentemente a sobrevivência das hemácias³². Atualmente cerca de 4.516 publicações sobre talassemia alfa estão disponíveis no banco de dados da NCBI (National Library of Medicine PubMed)¹³.

Nos cromossomos onze e dezesseis estão presentes os complexos gênicos responsáveis pela síntese das cadeias globínicas α (alfa), β (beta), γ (gama), δ (delta), ϵ (épsilon) e ζ (zeta). Em uma região de aproximadamente 30Kb do cromossomo 16 (16p13.3) está o cluster α 5'– ζ – $\psi\zeta$ – $\psi\alpha 2$ – $\psi\alpha 1$ – $\alpha 2$ – $\alpha 1$ – $\theta 1$ – 3' e no cromossomo 11 (11p15.5) está o cluster β 5'– ϵ – $G\gamma$ – $A\gamma$ –

$\psi\beta - \delta - \beta - 3'$ que compreende aproximadamente uma região de 60 Kb^{22,25}. A partir do sexto mês após o nascimento a molécula de Hb predominante é designada por Hb A ($\alpha_2\beta_2$) representando cerca de 95 a 98% do total de hemoglobina. Em menor quantidade, cerca de 2,0 a 4,0%, existe a Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e a Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$) com menos de 1,0%^{23,25}.

As manifestações clínicas da talassemia alfa são bastante diversificadas dependendo do número de genes alfa afetados. Existem quatro genes alfa ativos representado por dois haplótipos $\alpha\alpha$ ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Sendo assim, as talassemias alfa são classificadas de quatro formas: portador silencioso ou α -talassemia mínima que resulta da deleção de um dos quatro genes α ($-\alpha/\alpha\alpha$); traço α -talassêmico ou α -talassemia menor que resulta da deleção de dois genes α no mesmo cromossomo ($--/\alpha\alpha$) ou em cromossomos diferentes ($-\alpha/-\alpha$); doença da Hb H ou α -talassemia intermédia onde três genes foram deletados ($---/\alpha$) e por fim a Hidropsia fetal que resulta da deleção dos quatro genes α ($----$)²⁵.

A regulação dos genes alfa se faz por meio de uma região conhecida como HS-40 localizada a 40 Kb “upstream” do gene ζ sendo que sua integridade é essencial para a expressão dos genes do cluster. As deleções que removem esta sequência silenciam a expressão dos genes do cluster alfa localizado em posição “downstream”⁰⁶.

O diagnóstico da talassemia alfa pode ser feito pela detecção de Hb H no sangue hemolisado, por meio da eletroforese alcalina em acetato de celulose ou pela visualização dos corpos de inclusão de Hb H corados com azul de crezil brilhante nos eritrócitos do sangue periférico²³. Segundo Skogerboe (1992)¹⁵ e

Thompson (1989)⁷ existe uma correlação entre a formação dos corpos de inclusão de Hb H e os vários genótipos alfa, no entanto a sua ausência não exclui o diagnóstico principalmente no caso de portador silencioso ou α -talassemia mínima.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar portadores de talassemia alfa, correlacionando o perfil hematológico e a presença de Hb H, utilizando procedimentos laboratoriais clássicos, em três diferentes amostragens. Foram analisadas também as amostras dos progenitores destes portadores.

Casuística e Métodos

Foi realizado o acompanhamento dos resultados de indivíduos que apresentaram a migração eletroforética compatível com Hb H na eletroforese alcalina de hemoglobina em acetato de celulose, em três amostragens diferentes. O estudo foi realizado no Laboratório de Estudo e Pesquisa de Anemias Hereditárias – LEPAH, do Departamento de Biomedicina da UCG, de acordo com as normas da Resolução nº 196/98 do Conselho Nacional de Saúde. As amostras foram coletadas no ano de 2001, 2004 e 2006 compreendendo um período de seis anos. Foram analisadas 30 amostras de sangue total coletadas com EDTA provenientes de 10 crianças de ambos os sexos e de seus respectivos pais. O trabalho faz parte de um projeto submetido e aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Goiás, sob protocolo número 065/2005.

Para a determinação da talassemia alfa foi realizada a pesquisa de Hb H por meio da eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino (tampão TEB, pH 8,5), com hemolisado rápido utilizando saponina à 1%¹⁰ e também a detecção dos corpos de inclusão de Hb H (PIEHH) com azul de crezil brilhante^{10,14}.

Foram realizados também a resistência globular osmótica em cloreto de sódio a 0,36%¹⁶ e a avaliação do volume corpuscular médio (VCM) dos eritrócitos fornecido pelo equipamento PENTRA 60 (ABX®) adotando o valor de referência de 80 a 86 fentolitros, para ambos os sexos²⁵.

As amostras que apresentaram Hb S foram submetidas, para confirmação²⁵, aos testes de: eletroforese ácida de hemoglobinas, teste de falcização com solução de metabissulfito de sódio à 2% e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) no aparelho VARIANT I da Biorad®.

Resultados

O perfil dos tipos de hemoglobinas presentes no sangue de dez crianças e seus respectivos pais foram avaliados por eletroforese alcalina em acetato de celulose. As amostras de sangue foram coletadas em diferentes épocas (2001, 2004 e 2006) e são mostradas na tabela 1.

Oito, dentre as dez crianças identificadas como portadoras de Hb H na primeira avaliação, apresentaram variação quanto à presença dessa hemoglobina quando reavaliadas. Três crianças não apresentaram mais o perfil de Hb H. Apenas as crianças cinco e oito mantiveram o mesmo perfil da primeira amostragem. Dos 20 pais avaliados, onze não apresentaram Hb H em nenhuma das avaliações. Nove pais apresentaram Hb H, sendo que cinco apresentaram alternância de resultado. Ao todo foram avaliados 30 indivíduos, 13 desses apresentaram resultados contraditórios quanto à presença de Hb H, perfazendo um total de 43,33%.

Tabela 1 – Resultados do perfil eletroforético em acetato de celulose, da pesquisa dos corpos de inclusão de Hb H (PIEHH) e da prova de resistência osmótica à salina 0,36% dos 30 indivíduos nas amostras coletadas no ano de 2001, 2004 e 2006.

Indivíduo	Idade em 2001	PERFIL ELETROFORÉTICO			PESQUISA INTRA-ERITROCITÁRIA HbH			PROVA DE RESISTÊNCIA OSMÓTICA A SALINA 0,36%		
		2001	2004	2006	2001	2004	2006	2001	2004	2006
1	02 anos	ASH	AS	ASH	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
1P	36 anos	AH	AH	AA	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
1M	32 anos	AS	AS	AS	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	03 anos	ASH	AS	AS	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
2P	42 anos	AH	AH	AH	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2M	37 anos	AS	AS	AS	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	03 anos	AH	AA	AA	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
3P	28 anos	AA	AA	AA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3M	25 anos	AH	AA	AH	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
4	04 anos	AH	AA	AH	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
4P	35 anos	AA	AA	AA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4M	34 anos	AH	AH	AA	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
5	03 anos	ASH	ASH	ASH	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5P	43 anos	AA	AA	AA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5 M	38 anos	ASH	ASH	ASH	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
6	05 anos	ASH	ASH	AS	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
6P	44 anos	AA	AA	AA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6M	41 anos	ASH	ASH	ASH	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
7	09 anos	AH	AA	AA	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
7P	39 anos	AH	AA	AA	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
7M	37 anos	AA	AA	AA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	06 anos	AH	AH	AH	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
8P	44 anos	AA	AA	AA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8M	43 anos	AA	AA	AA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	07 anos	AH	AA	AH	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
9P	45 anos	AA	AA	AA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9M	38 anos	AA	AH	AH	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	05 anos	AH	AA	AH	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
10P	37 anos	AA	AA	AA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10M	34 anos	AH	AH	AH	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

P = pai, M = mãe, em negrito perfil diferente da amostra inicial de 2001.

Na tabela 1 pode-se observar também que na amostragem inicial do ano de 2001, todas as crianças avaliadas apresentaram corpos de inclusão de Hb H. Nos anos de 2004 e 2006, oito das dez crianças analisadas tiveram resultados contraditórios relativo à PIEHH. Dessas oito crianças, três não apresentaram mais o resultado positivo. Portanto, cinco crianças apresentaram alternância de resultados e apenas duas crianças mantiveram o resultado positivo. Dos 20 pais, doze apresentaram resultado negativo para a PIEHH, considerado normal. Quatro pais apresentaram resultado positivo em todas as avaliações, três em duas ocasiões e um apenas uma vez. Ao todo doze indivíduos apresentaram resultados contraditórios, perfazendo um total de 40,00%.

Observamos ainda, na tabela 1, os resultados da prova de resistência osmótica à salina 0,36%, onde sete das dez crianças analisadas tiveram resultados contraditórios. Das sete crianças, três não apresentaram mais o resultado positivo. Quatro crianças apresentaram alternância de resultados e apenas três mantiveram o resultado, sendo que as crianças cinco e oito continuaram com o resultado positivo e a criança dez com o resultado negativo. Em relação aos pais, doze apresentaram resultado negativo para a prova de resistência osmótica a salina 0,36%, considerado normal. Três pais apresentaram resistência em todas as avaliações, três em duas avaliações e dois somente uma vez. Ao todo doze indivíduos apresentaram resultados contraditórios, perfazendo um total de 40,00%.

Os indivíduos que apresentaram Hb S mantiveram o mesmo resultado em todos os testes confirmatórios: análise eletroforética em pH ácido, análise

cromatográfica utilizando HPLC e falcização positiva com metabissulfito de sódio.

A morfologia e o volume corpuscular médio dos eritrócitos (VCM) apresentaram uma grande variação entre as três amostragens (tabela 2). Adotando o valor de 80fL como valor limite entre a normocitose e a microcitose, pode-se observar que oito dos vinte pais apresentaram microcitose em alguma das amostragens. Desses oito pais, quatro apresentaram microcitose em pelo menos duas avaliações, sendo todos do sexo feminino. Das crianças avaliadas, todas apresentaram o VCM com valores inferiores a 80fL na primeira avaliação. Seis crianças apresentaram novamente resultados inferiores a 80fL e duas crianças apresentaram o VCM diminuído nas três amostragens.

Tabela 2 – Resultados do Volume Corpuscular Médio (VCM), em fentolitros (fL), dos 30 indivíduos. (P = pai, M = mãe)

Indivíduo	2001	2004	2006
1	72,3	87,6	79,7
1P	80,5	78,5	84,3
1M	88,5	90,5	90,1
2	75,7	88,3	86,7
2P	81,5	80,2	78,9
2M	88,5	90,8	91,4
3	79,4	85,7	85,7
3P	92,1	91,1	89,6
3M	79,4	89,7	78,3
4	75,5	88,3	77,2
4P	92,1	88,5	90,7
4M	79,4	77,6	89,9
5	75,7	73,9	74,3
5P	90,5	89,8	90,5
5 M	80,6	78,7	80,1
6	79,4	80,1	85,7
6P	91,2	92,1	89,9
6M	81,2	78,3	77,4
7	76,5	84,3	87,6
7P	78,7	89,4	89,3
7M	90,6	91,4	86,4
8	72,7	77,5	75,6
8P	88,6	90,3	88,6
8M	92,2	89,8	92,2
9	78	88,1	77,3
9P	89,7	91,5	89,7
9M	90,5	80,4	90,5
10	77,4	88,2	78,4
10P	91,2	90,6	91,2
10M	80,3	78,2	76,9

Discussão

A talassemia alfa é caracterizada pela redução na produção das cadeias polipeptídicas do tipo alfa que resulta em eritócitos microcíticos e hipocrômicos. A severidade dessa doença está associada com o grau de comprometimento da expressão da cadeia alfa e pode ser classificada clinicamente em: portador silencioso ou talassemia alfa mínima, traço alfa-talassêmico ou talassemia alfa menor, doença da Hb H ou talassemia alfa intermédia e Hidropsia fetal²³.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram uma grande variação com relação à presença de Hb H e o volume corpuscular médio (VCM) dos eritrócitos, quando se compara as três amostragens realizadas nos anos de 2001, 2004 e 2006. Essa variação alcançou 43,33% em relação à presença de Hb H, como pode ser observado nas tabelas 1 e 2.

Na primeira avaliação do perfil eletroforético no ano de 2001, todas as crianças apresentaram Hb H e pelo menos um dos pais também apresentou, com exceção da criança oito, cujos pais não apresentaram esta hemoglobina em nenhuma avaliação (tabela 1). É importante ressaltar que a forma mais comum de talassemia alfa é a hereditária, entretanto existem as formas adquiridas secundárias a uma patologia primária²².

Todas as amostras que apresentaram Hb H na eletroforese alcalina, apresentaram corpos de inclusão de Hb H na coloração com azul de crezil brilhante e uma microcitose característica da talassemia alfa. Embora a ausência dos corpos de inclusão de Hb H na PIEHH não exclui o diagnóstico^{7,11,12}, uma vez que esta técnica exige muita habilidade e mesmo em indivíduos com deleção de dois genes alfa é comum encontrar uma ou duas

destas inclusões após vários minutos duradouros de busca²⁰. Das crianças estudadas, oito apresentaram variação com relação à presença de Hb H nas amostras coletadas em diferentes épocas.

Na análise da resistência globular à salina 0,36%, somente a criança dez apresentou teste negativo, porém a Hb H foi detectada pela visualização dos corpos de inclusão e pela eletroforese, tanto nas avaliações do ano de 2001 e 2006. Isto pode ser explicado porque o teste desenvolvido por Silvestrone e Bianco (1975)¹⁶ é um teste de triagem pouco específico que visa apenas a detecção de células microcíticas dependendo diretamente da quantidade destas células e do seu volume médio. Em relação aos pais, somente a mãe 9M apresentou o teste negativo nos anos de 2004 e 2006 e presença de Hb H na eletroforese.

Todas as amostras que apresentaram a Hb H, apresentaram eritrócitos microcíticos, VCM baixo, menor que 80 fL, demonstrando uma estreita correlação entre microcitose e presença de Hb H. Esses dados corroboram o trabalho de Chan (2001)², que estudaram a importância de se avaliar em áreas de alta incidência de talassemia, pessoas com VCM normal, principalmente quando os valores de VCM forem próximos ao limite inferior (80 fL). No estudo conduzido em Hong Kong eles estudaram 95 indivíduos que apresentavam VCM entre 80 e 85 fL, desses 32,63% apresentaram alfa talassemia.

Os dados obtidos nesse trabalho (tabela 1) sugerem que o desbalanciamento entre as concentrações de cadeias alfa e beta pode ser temporário, visto que comparando as análises de épocas diferentes encontramos resultados contraditórios para a detecção de Hb H. É importante

destacar que as talassemias do tipo alfa podem ter duas origens: hereditária e adquirida. As formas hereditárias atingem 4% da população brasileira, enquanto as formas adquiridas são normalmente secundárias a um processo patológico primário^{19,23}. Alguns autores descrevem interação de hemoglobinas variantes com talassemia alfa. Na anemia falciforme é descrito interação benéfica com talassemia alfa, ocorrendo diminuição da anemia hemolítica, inibição da polimerização intracelular da hemoglobina S e diminuição da intensidade de hemólise^{18,19}.

Um trabalho realizado em nosso laboratório numa população estudantil de Goiás, encontramos uma prevalência de 8,2% de talassemia alfa e 2,1% de talassemia alfa associada a Hb S, entretanto não foram investigadas as origens⁸. Analisando amostras de indivíduos oriundos de 55 cidades do estado de Goiás detectamos a prevalência de 10,1% de hemoglobinopatias, 5,2% de talassemia alfa heterozigótica, 2,0% de heterozigose para hemoglobina S (Hb AS), 1,0% de heterozigose para hemoglobina C (Hb AC), 0,7% de talassemia beta menor, 0,5% de associação entre talassemia alfa e heterozigose para Hb S, 0,3% de associação entre talassemia alfa e heterozigose para Hb C e 0,3% de heterozigose para hemoglobina D (Hb AD)⁹.

Doenças hematológicas do tipo eritro-leucemias, doenças linfó e mieloproliferativas crônicas e agudas e anemia sideroblástica estão normalmente associadas ao aparecimento de talassemia alfa^{5,17}. Outros tipos de doenças crônicas, tais como a doença de Chagas e Diabetes mellitus também podem levar a um quadro de talassemia alfa e a detecção de Hb H^{3,25}.

Em nosso laboratório também detectamos a talassemia alfa em 5,0% dos indivíduos portadores de lúpus eritematoso sistêmico¹.

Já foram descritas algumas drogas capazes de afetar a expressão dos genes das globinas. Fibach (2003)⁴ estudaram a indução da produção de Hb F utilizando a mithramycin que é uma droga capaz de se ligar ao DNA provocando alterações estruturais que resultam no aumento dessa expressão. A cadeia gama foi a que apresentou maior indução com o tratamento, as cadeias alfa e beta também foram induzidas, mas apresentaram uma menor indução quando comparada com a cadeia gama.

Viola (2008)²¹ demonstraram, utilizando a técnica de transcrição reversa quantitativa (Q-RT-PCR), a variação na concentração dos mRNA de globinas em células tratadas com psoralenos ou irradiadas com luz UV. A concentração de mRNA de globina alfa foi maior em células tratadas com 5-methoxypsoralen quando comparada com células tratadas com 4,5',4'trimethyangelicin ou irradiadas com luz UV. O mRNA de globina gama apresentou o mesmo padrão, mas houve uma menor indução, portanto estes dados, bem como os de Fibach (2003)⁴ mostram claramente uma indução dos genes globina em resposta ao tratamento com diferentes substâncias.

Conclusão

Os dados obtidos nesse trabalho mostram que a presença de Hb H na detecção de talassemia alfa, pode ser temporária. A talassemia alfa está associada a defeitos genéticos envolvendo os genes codificadores da cadeia alfa, mas também pode estar associada a um desbalanciamento temporário na expressão dos genes das globinas, diminuição de alfa ou aumento de beta, o que poderia explicar o aparecimento de tetrâmeros de cadeia beta (Hb H) sugerindo o diagnóstico de talassemia alfa mínima.

É provável que, além de defeitos genéticos associados aos genes alfa, outros fatores possam induzir o aparecimento da talassemia alfa. Assim o diagnóstico dessa doença deve ser tratado com muito cuidado, principalmente em suas formas mais brandas. A presença de Hb H deve ser confirmada por diferentes métodos, deve ser associada com microcitose e com exames realizados em diferentes períodos, devendo, sempre que possível ser, confirmada por métodos de diagnósticos moleculares.

Referências

1. CASTRO, F.S. *et al.* Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 30, n. 01, p. 24-28, 2008.
2. CHAN, L. C. *et al.* 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, n. 04, p. 317-20, 2001.
3. DOMINGOS, C.R.B. *et al.* Hemoglobinopatias e hepatoglobinas em portadores de doença de Chagas. *Rev Bras Patol Clin*, v.27, n. 03, p. 80-7, 1991.
4. FIBACH, E. *et al.* Mithramycin induces fetal hemoglobin production in normal and thalassemic human erythroid precursor cells. *Blood*, v. 102, p. 1276-1281, 2003.
5. GOMES, C.T.; NAOUM, P.C.; ÂNGULO, I.L. Talassemia alfa adquirida nas doenças linfo e mieloproliferativas. *Rev Bras Patol Clin*, v.24, n. 03, p. 98-101, 1988.
6. JARMAN, A. P. *et al.* Characterization of the major regulatory element upstream the human alpha-globin gene cluster. *Mol Cell Biol*, v. 11, n. 09, p. 4679-4689, 1991.
7. THOMPSON, C. C. *et al.* Positional effect of cis/trans alpha globin gene deletions on the formation of "H" bodies. *Am J Hematol*. v. 31, n. 04, p. 242-247, 1989.

8. MELO-REIS, P.R. *et al.* Prevalência de hemoglobinopatias e talassemias em alunos de Biomedicina da UCG. Estudos, Goiânia, v. 31, p. 125-133, 2004.
9. MELO-REIS, P.R. *et al.* Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes no estado de Goiás, Brasil. J Bras Patol Med Lab, v. 42, n. 06, p. 425-430, 2006.
10. NAOUM, P.C. *Eletroforese, Técnicas e Diagnósticos*. 2.ed. São Paulo: Editora Santos, 1999.
11. SKOGERBOE, K.J. *et al.* Screening for alpha-thalassemia. Correlation of hemoglobin H inclusion bodies with DNA-determined genotype. Arch Pathol Lab Med. v. 116, n. 10, p. 1012-1018, 1992.
12. NAOUM, P.C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. Rev bras hematol hemoter, v. 29, n. 03, p. 226-228, 2007.
13. NCBI - National Library of Medicine PubMed. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed&cmd=search&term=thalassemia%20alpha>. Acesso em: 16 set. 2008.
14. PAPAYANNOPOULOS, R.; STAMATONYANNOPOULOS, G. Stains form inclusions bodies. In **“Standardization of laboratory reagents and methods for detection of haemoglobinopathies.”** Atlanta: Hew publications, 1974.
15. PEREIRA, J.M. *et al.* Investigação em uma família com alfa talassemia. Rev Brasil Pesqu Med Biol, v. 6, p. 349, 1973.
16. SILVESTRONI, E.; BIANCO, I. Screening for Microcytemia in Italy: analysis of collected in the past 30 years. Am J Hum Genet, v. 27, p. 198-212, 1975.

17. STEENSMA, D.P.; GIBBONS, R.J.; HIGGS, D.R. Acquired alpha-thalassemia in association with myelodysplastic syndrome and other hematologic malignancies. *Blood*, v. 105, p. 443-452, 2005.
18. STEINBERG, M.H. *et al.* Effects of thalassemia and microcytosis on the hematologic and vasoocclusive severity of sickle cell anemia. *Blood*, v. 63, p. 1353-1360, 1984.
19. TOME-ALVES, R. *et al.* Hemoglobinas AS/alfa talassemia: importância diagnóstica. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 22, n. 03, p. 388-394, 2000.
20. TRENT, R.J.A. Diagnosis of the haemoglobinopathies. *Clin Biochem Rev*, v. 27, p. 27-38, 2006.
21. VIOLA, G. *et al.* Induction of γ -globin mRNA, erythroid differentiation and apoptosis in UVA-irradiated human erythroid cells in the presence of furocumarin derivatives. *Bioch Pharmacol*, v. 75, p. 810-825, 2008.
22. WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *WHO*, v. 79, n. 08, p. 704-712, 2001.
23. WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. *The Thalassaemia Syndromes*. 4.ed. Blackwell Science Publications, 2001.
24. ZAGO, M.A.; COSTA, F.F. Hereditary hemoglobin disorders in Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, v. 79, n. 03, p. 385-388, 1985.
25. ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. *Hematologia. Fundamentos e Prática*. 1.ed. Atheneu, 2004.

Correspondência: Karlla Greick Batista Dias-Penna

Universidade Católica de Goiás – Departamento de Biomedicina – Área V

Avenida Universitária 1069 – Setor Universitário

74605-010 – Goiânia-GO – Brasil

Tel.: (62) 39461194

E-mail: karllagreick@yahoo.com.br