



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA TALASSEMIA
ALFA⁺ (DELEÇÃO - $\alpha^{3.7}$) EM INDIVÍDUOS COM
MICROCITOSE E/OU HIPOCROMIA ATENDIDOS NO
HEMOCENTRO DALTON BARBOSA CUNHA EM
NATAL, RIO GRANDE DO NORTE**

CHRISTIANE MEDEIROS BEZERRA

**NATAL
2009**

CHRISTIANE MEDEIROS BEZERRA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA TALASSEMIA
ALFA⁺ (DELEÇÃO - $\alpha^{3.7}$) EM INDIVÍDUOS COM
MICROCITOSE E/OU HIPOCROMIA ATENDIDOS NO
HEMOCENTRO DALTON BARBOSA CUNHA EM
NATAL, RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito à obtenção do grau de MESTRE em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Bioanálises

Orientadora:
Profa. Dra. Rosely de Vasconcellos Meissner

**NATAL
2009**

CATALOGAÇÃO NA FONTE

B574d

Bezerra, Christiane Medeiros.

Diagnóstico molecular da talassemia alfa⁺ (deleção $-a^{3.7}$) em indivíduos com microcitose e/ou hipocromia atendidos no Hemocentro Dalton Barbosa Cunha em Natal, Rio Grande do Norte / Christiane Medeiros Bezerra. – Natal, 2009.

92p.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosely de Vasconcellos Meissner.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Hemoglobinopatias – Dissertação. 2. Talassemia alfa – Dissertação. 3. Microcitose – Dissertação. I. Meissner, Rosely de Vasconcellos. II. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 616.155.16 (043.3)

CHRISTIANE MEDEIROS BEZERRA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA TALASSEMIA ALFA⁺ (DELEÇÃO -
 $\alpha^{3.7}$) EM INDIVÍDUOS COM MICROCITOSE E/OU HIPOCROMIA
ATENDIDOS NO HEMOCENTRO DALTON BARBOSA CUNHA EM
NATAL, RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rosely de Vasconcellos Meissner
Orientadora/Presidente

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Sonati
1º Examinador

Prof. Dr. Marcos Dias Leão
2º Examinador

Natal, 27 de março de 2009

“A verdadeira viagem de descoberta não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

Marcel Proust

Dedico este trabalho a minha mãe **Tereza** que tudo fez pela minha formação pessoal e profissional, ensinando-me os mais preciosos valores e estando sempre ao meu lado, dando-me amor e carinho e incentivando todos os meus projetos de vida.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ser sempre uma constante em minha vida e ter permitido a realização deste trabalho, dando-me saúde, sabedoria, discernimento e determinação na superação dos desafios.

À minha orientadora, **Professora Dra. Rosely de Vasconcellos Meissner**, meus sinceros agradecimentos, não só pelo seu rigor científico, mas também pela sua orientação criteriosa e segura, pela disponibilidade, pelos ensinamentos e pela confiança em mim depositada na realização deste importante trabalho.

À **Professora Dra. Tereza Maria Dantas de Medeiros**, idealizadora deste projeto, a quem expresso os meus agradecimentos por ter me dado a oportunidade de executá-lo e pela inestimável colaboração na orientação deste trabalho.

À **Professora Dra. Maria de Fátima Sonati**, em nome de quem agradeço toda a sua equipe do Laboratório de Hemoglobinopatias da UNICAMP, pelo valioso auxílio e cooperação técnico-científica durante a realização deste trabalho.

Ao Diretor do Hemocentro Dalton Barbosa Cunha, **Dr. Wilson Cleto de Medeiros**, pela permissão e acesso para coleta de amostras nesta unidade de saúde.

Aos farmacêuticos bioquímicos do Hemonorte, **Dra. Maria de Fátima Gomes Gonzaga, Dr. Roberto Chaves de Vasconcelos, Dra. Rosana Lucena de Sá Leitão, Dra. Maria Salete Vieira Cesário, Dra. Valéria Gurgel Fernandes de Goés e Dra. Zeila Margareth Amad**, os meus sinceros agradecimentos pela atenção e auxílio indispensáveis na realização deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório de Hematologia do Hemonorte, **Irene, Robson, Rose e Zezé**, pelo interesse e indispensável contribuição na coleta das amostras de sangue.

Ao farmacêutico bioquímico **Dr. Marcos Adriano**, chefe do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Potiguar, por consentir a utilização do equipamento *Immulite* para determinação da ferritina sérica.

À farmacêutica bioquímica **Dra. Tenysa Freire** que sempre me atendeu com paciência e solicitude e que foi fundamental para a determinação da ferritina sérica.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Hematologia, **Isaac Dantas, Gláucia Lauriane e Yanara Cristina**, por terem contribuído de alguma forma para a realização deste trabalho e, em especial, à aluna **Maria das Vitórias Barbosa**, pela dedicação, interesse e responsabilidade na colaboração deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Doenças Infecciosas e do Câncer, especialmente à aluna **Ana Flávia Galvão** que pacientemente me orientou na execução das técnicas moleculares no período de padronização do trabalho.

Aos médicos hematologistas **Dr. Afonso Henrique Lamas de Oliveira, Dra. Édvis Santos Serafim, Dra. Elione Soares de Albuquerque, Dra. Eugênia Elbe Braga, Dra. Fabíola Melo Freitas, Dra. Irian Guedes Farkatt e Dr. Francisco do Nascimento Júnior** pela contribuição.

Ao meu noivo, **Thales**, por todo amor, carinho, apoio, compreensão e paciência a mim dispensados durante os anos de convivência e, ainda, pelo auxílio e sugestões na realização deste trabalho.

A minha avó **Zefinha**, exemplo de vida para todos que a cercam, pelo zelo, amor e carinho. Aos meus irmãos **Isabelle e Pedro Henrique** e ao meu sobrinho e afilhado **Pedro Lucas** que com a sua ingenuidade me transmite amor e carinho.

À querida **Professora Dra. Eveline Pípolo Milan**, pela orientação durante a iniciação científica e por ter me incentivado na vida acadêmica.

Aos amigos do Laboratório de Hematologia da UFRN, **Annabelle, Cynthia, Gustavo e Zama**, pelo companheirismo, amizade e apoio.

Às amigas, **Lauren, Marcela, Rosângela e Tatiana** pelo incentivo, apoio, amizade e momentos de descontração.

A **tia Maria Bezerra** pela valiosa revisão e correção do texto dessa dissertação, bem como pela atenção e carinho sempre dispensados.

A funcionária do Laboratório de Hematologia da UFRN, **Maria Lúcia de Oliveira**, pela boa vontade e disponibilidade com que colaborou para a viabilização dos experimentos.

Ao chefe do **Departamento de Microbiologia e Parasitologia**, prof. José Veríssimo Fernandes, pelo espaço e equipamentos cedidos para a realização dos experimentos.

Aos colegas da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela amizade e convívio durante estes dois anos.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica.

A **todos os pacientes** ou seus **representantes legais** por terem consentido a participação neste trabalho.

Ao **Sistema de Informações da Roche Diagnósticos** pelo envio dos artigos científicos solicitados.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho e para minha formação profissional e científica.

RESUMO

A talassemia alfa, uma das doenças monogênicas mais comuns no mundo, resulta de um desequilíbrio na síntese das cadeias alfa da hemoglobina devido, principalmente, à deleção de um ou ambos os genes da globina alfa, sendo a deleção $-\alpha^{3.7}$ a mais freqüente. A talassemia alfa, juntamente com a deficiência de ferro e a talassemia beta, representa uma importante causa de microcitose e hipocromia. Com o objetivo de diagnosticar e verificar a prevalência da talassemia alfa ($-\alpha^{3.7}$) em indivíduos com microcitose e/ou hipocromia (VCM ≤ 82 fL e HCM ≤ 27 pg, respectivamente) foram estudados 319 pacientes atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro Dalton Barbosa Cunha, Natal, RN. Todas as amostras de sangue periférico foram submetidas aos seguintes exames laboratoriais: eritograma, realizado em contador automático de células, eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, dosagem das hemoglobinas A₂ e Fetal e concentração de ferritina sérica determinada através de ensaio imunométrico quimioluminescente. O DNA foi extraído utilizando o kit *illustra Blood GenomicPrep Mini Spin* e a seguir submetido à PCR para investigação da deleção $-\alpha^{3.7}$. Dos 319 pacientes, 105 (32,9%) apresentaram talassemia alfa, sendo 93 (29,1%) heterozigotos ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) e 12 (3,8%) homozigotos ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$). Em relação ao grupo étnico, os negros foram os que apresentaram a maior prevalência da doença (45,7%), seguidos pelos pardos (32,3%) e brancos (29,1%). A associação da talassemia alfa com outras hemoglobinopatias foi observada em 12,3% dos indivíduos com a deleção $-\alpha^{3.7}$, sendo 7,6% associada ao traço falciforme, 1,9% à doença falciforme e 2,8% à talassemia beta, mostrando a coexistência dessas doenças da hemoglobina na população estudada. Dos 105 pacientes diagnosticados com talassemia alfa, 9 (8,6%) tinham deficiência de ferro associada. A comparação dos índices hematimétricos VCM e HCM entre os três grupos de pacientes classificados por genótipo alfa ($-\alpha^{3.7}$) (normal, heterozigoto e homozigoto) revelou diferença estatisticamente significativa entre os três grupos para ambos os parâmetros ($p < 0,05$, teste de Tukey). Porém, apesar das diferenças observadas, a sobreposição dos valores individuais não permite a distinção entre os diferentes genótipos alfa baseada nestes parâmetros. Nossos dados demonstram a presença da deleção $-\alpha^{3.7}$ em nossa população e corroboram a importância do diagnóstico molecular da talassemia alfa a fim de evitar investigações laboratoriais desnecessárias para elucidação da etiologia da microcitose e/ou hipocromia e garantir que o paciente não receberá tratamento inapropriado com ferro. Os resultados mostram também que o diagnóstico prévio de deficiência de ferro ou talassemia beta, não excluiu a presença da talassemia alfa.

Palavras-chave: Talassemia alfa, hemoglobinopatias, microcitose, hipocromia, deleção $-\alpha^{3.7}$

ABSTRACT

Alpha thalassemia, one of the most common monogenic disorders in the world, results from an imbalance in α -globin chain synthesis mainly due to deletion of one ($-\alpha$) or both ($--$) of the α genes, being the $-\alpha^{3.7}$ deletion the most important. Together with beta thalassemia and iron deficiency, alpha thalassemia represents an important cause of microcytosis and hypochromia. In order to diagnose and evaluate the prevalence of alpha-thalassemia ($-\alpha^{3.7}$) in individuals with microcytosis and/or hypochromia ($MCV \leq 82$ fL and $MCH \leq 27$ pg, respectively) were analyzed blood samples from 319 individuals referred to hematology outpatient clinic of Hemocentro Dalton Barbosa Cunha, Natal-RN. All peripheral blood samples were submitted to the following laboratorial analysis: erythrogram by automated cell counter, hemoglobin electrophoresis on cellulose acetate strips at alkaline pH, measurement of hemoglobins A₂ and Fetal and serum ferritin by chemiluminescent immunometric assay. DNA samples were extracted by illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit and the $-\alpha^{3.7}$ deletion was investigated by PCR. Among the 319 subjects studied, 105 (32,9%) presented α -thalassemia: 93 (29,1%) were heterozygous ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) and 12 (3,8%), homozygous ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$). Related to ethnic group, negroes showed the greatest prevalence of thalassemia (45,7%), followed by mulattoes (32,3%) and caucasian (29,1%). Alpha thalassemia was associated with other hemoglobinopathies in 13 (12,3%) patients with $-\alpha^{3.7}$ deletion, being 7,6% related to sickle cell trait, 1,9% to sickle cell disease and 2,8% related to beta thalassemia trait, showing the coexistence of these hemoglobin disorders in studied population. Of 105 patients diagnosed as alpha-thalassemia carrier, 9 (8,6%) had concomitant iron deficiency. Statistical analysis for hematological indices MCV and MCH revealed significant differences ($p < 0,05$, Tukey test) between the three groups separated by alpha ($-\alpha^{3.7}$) genotype (normal, heterozygous and homozygous) for both parameters. Despite statistically significant differences between groups, overlap in values does not allow any of these parameters to accurately predict the α -globin genotype. Our data show the presence of $-\alpha^{3.7}$ deletion in our population and attest the importance of molecular diagnosis of alpha thalassemia to prevent erroneous and expensive investigations to define the etiology of microcytosis and hypochromia and unnecessary prolonged iron supplementation. These results also show that the diagnosis of iron deficiency or beta thalassemia does not exclude the presence of alpha thalassemia.

Keywords: Alpha thalassemia, hemoglobinopathies, microcytosis, hypochromia, $-\alpha^{3.7}$ deletion

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da molécula de hemoglobina	18
Figura 2	Agrupamento (<i>clusters</i>) dos genes de globina nos cromossomos 11 e 16	20
Figura 3	Síntese das cadeias globínicas nos diferentes estágios do desenvolvimento	21
Figura 4	Representação esquemática da estrutura dos genes das globinas alfa e beta	21
Figura 5	Representação esquemática dos subsegmentos homólogos X, Y e Z dos genes da globina alfa	22
Figura 6	Genótipos da talassemia alfa	26
Figura 7	Fisiopatologia da talassemia alfa	28
Figura 8	Mecanismo de recombinação desigual originando a deleção $-\alpha^{3.7}$	29
Figura 9	Mecanismo de recombinação desigual originando a deleção $-\alpha^{4.2}$	30
Figura 10	Distribuição geográfica da talassemia alfa	35
Figura 11	Localização dos iniciadores C_2 e C_{10} nas regiões homólogas dos genes da globina α	44
Figura 12	Identificação dos produtos amplificados para a deleção $-\alpha^{3.7}$	46
Figura 13	Distribuição dos 319 pacientes analisados de acordo com a presença ou não da deleção $-\alpha^{3.7}$	47

Figura 14	Organograma de distribuição dos 691 pacientes coletados	49
Figura 15	<i>Box-plot</i> representando as diferenças de VCM encontradas entre os pacientes de genótipo normal sem deficiência de ferro, portadores heterozigotos e homozigotos da talassemia $-\alpha^{3.7}$ e os de genótipo normal com deficiência de ferro	59
Figura 16	<i>Box-plot</i> representando as diferenças de HCM encontradas entre os pacientes de genótipo normal sem deficiência de ferro, portadores heterozigotos e homozigotos da talassemia $-\alpha^{3.7}$ e os de genótipo normal com deficiência de ferro	60

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Principais tipos de talassemias	25
Quadro 2	Aspectos clínicos e laboratoriais dos diferentes genótipos talassêmicos	31
Quadro 3	Síntese de trabalhos realizados no Brasil para investigação molecular da talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3.7}$)	64
Tabela 1	Frequências genóticas observadas a partir da análise de DNA de 319 indivíduos não aparentados	47
Tabela 2	Distribuição dos genótipos entre os 319 pacientes com microcitose e/ou hipocromia de acordo com a cor da pele	48
Tabela 3	Perfil eletroforético e genótipo alfa dos pacientes investigados para talassemia alfa	50
Tabela 4	Dados hematológicos dos 282 pacientes agrupados por genótipo alfa	52
Tabela 5	Comparação dos dados hematológicos dos indivíduos AA e AS agrupados por genótipos alfa	53

Tabela 6	Comparação dos resultados das análises laboratoriais entre pacientes com genótipos normal, heterozigoto e homozigoto para a deleção $-\alpha^{3.7}$	55
Tabela 7	Comparação dos resultados das análises laboratoriais (média \pm DP) entre pacientes normais e heterozigotos para a deleção $-\alpha^{3.7}$, ambos com deficiência de ferro	56
Tabela 8	Comparação dos resultados das análises laboratoriais (média \pm DP) entre pacientes com genótipo α normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) com deficiência de ferro e pacientes heterozigotos da talassemia α^+ sem deficiência de ferro	57

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR	Região não traduzida do mRNA localizada após o códon de parada
A	Adenina
AA	Portador homocigoto da hemoglobina normal do adulto, A
AS	Portador da hemoglobina normal A e hemoglobina variante S
AC	Portador da hemoglobina normal A e hemoglobina variante C
BSA	Albumina sérica bovina
C	Citosina
CC	Portador homocigoto da hemoglobina variante C
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
fL	Fentolitro
g	Força gravitacional
G	Guanina
Hb	Hemoglobina
Hcias	Hemácias
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HS	Sítio hipersensível à DNase
IVS	Seqüência interveniente; íntron
kb	Mil pares de bases; kilobase
LCR	Região controladora do locus
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pg	Picograma
SC	Portador das hemoglobinas variantes S e C
SS	Portador homocigoto da hemoglobina variante S
V	Volts

UV	Ultravioleta
T	Timina
VCM	Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Estrutura e síntese da hemoglobina	18
1.2 Os genes das cadeias globínicas	21
1.3 Hemoglobinopatias	23
1.3.1 Talassemias	24
1.3.1.1 Talassemia alfa	25
1.3.1.1.1 Fisiopatologia	27
1.3.1.1.2 Talassemia alfa ⁺ (α^+).....	28
1.3.1.1.3 Achados clínicos e características laboratoriais	30
1.3.1.1.4 Diagnóstico e Importância Clínica	32
1.3.1.1.5 Associações da talassemia alfa com outras hemoglobinopatias	32
1.3.1.1.4. Distribuição da talassemia alfa	35
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo Geral	37
2.2 Objetivos Específicos	37
3. METODOLOGIA	38
3.1 Casuística	38
3.2 Métodos	39
3.2.1 Obtenção das amostras	39
3.2.2 Eritrograma	39
3.2.3 Eletroforese de hemoglobina	40
3.2.3.1 Preparo dos hemolisados	40
3.2.3.1.1 Hemolisado rápido	40

3.2.3.1.2 Hemolisado com clorofórmio (livre de estroma)	40
3.2.3.2 Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino	40
3.2.4 Dosagem de hemoglobina A ₂	41
3.2.5 Dosagem de hemoglobina Fetal	41
3.2.6 Dosagem de ferritina sérica	41
3.2.7 Extração do DNA do sangue periférico	42
3.2.8 Avaliação da integridade e quantificação do DNA	42
3.2.9 Reação da polimerase em cadeia (PCR) para detecção da talassemia alfa ($\alpha^{3.7}$).....	43
3.2.10 Eletroforese dos produtos da PCR.....	43
3.2.11 Análise estatística	45
4. RESULTADOS	46
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÊNDICES	82
ANEXOS	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura e síntese da hemoglobina

A hemoglobina, principal proteína intracelular dos eritrócitos, é uma molécula tetramérica composta por duas cadeias globínicas do “tipo α ” (α ou ζ) e duas cadeias do “tipo β ” (β , δ , γ ou ϵ). Cada cadeia se liga a um grupo prostético heme, que consiste de um anel tetrapirrólico de protoporfirina IX, contendo um átomo de ferro central, no estado reduzido (Fe^{2+}), que se liga de forma reversível à molécula de O_2 , transportando-a dos pulmões aos tecidos (BEUTLER, 2006) (Figura 1).

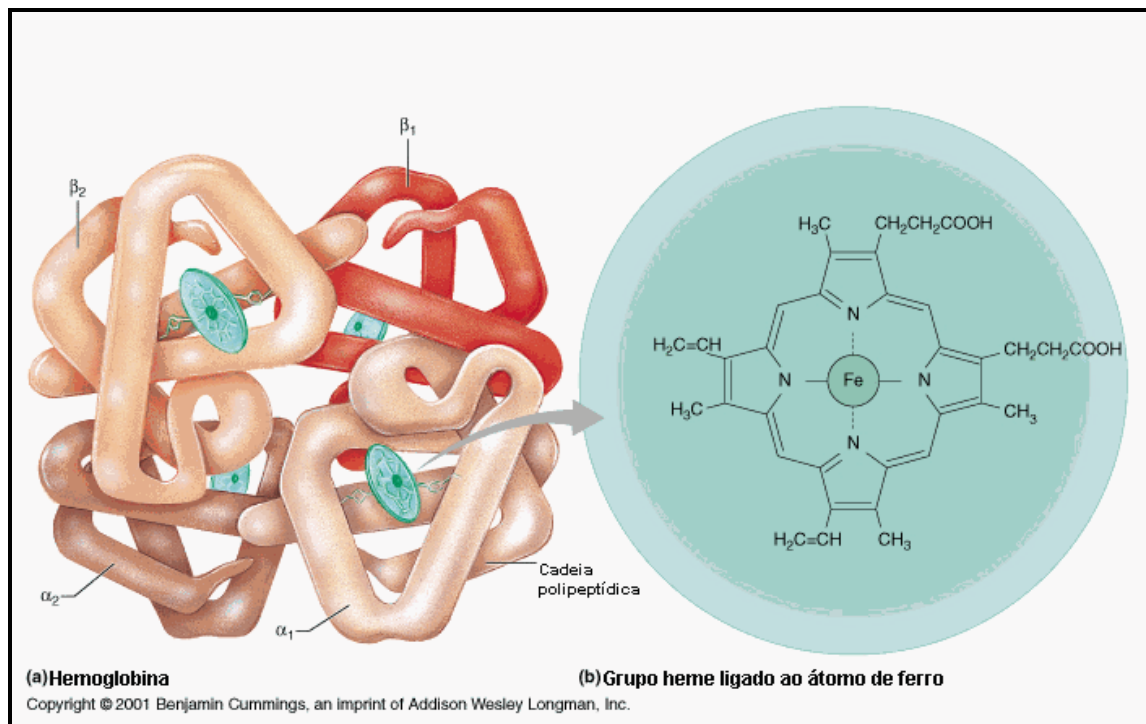


Figura 1 – Representação esquemática da molécula de hemoglobina (disponível em <http://www.octc.kctcs.edu>)

A hemoglobina é produzida durante a eritropoese, desde a fase de eritroblasto basófilo, acumulando-se em grande quantidade durante a fase de eritroblastos policromatófilos e ortocromáticos. A síntese continua ainda nos reticulócitos, que dispõem de mitocôndrias, retículo endoplasmático e restos de mRNA contribuindo com aproximadamente 10 a 20% do total da hemoglobina do eritrócito (McKENZIE, 1996).

As cadeias polipeptídicas do tipo α e as do tipo β são codificadas por genes distintos, localizados em dois agrupamentos gênicos (“clusters”) presentes em cromossomos diferentes: o agrupamento da globina alfa está situado próximo à extremidade do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) e inclui um gene zeta embrionário (ζ_2), um pseudogene $\psi\zeta_1$, um gene recentemente descoberto (α^D , também chamado μ) (GOH et al., 2005), cuja proteína apresenta pouca expressão em humanos, um pseudogene alfa ($\psi\alpha_1$), dois genes alfa duplicados (α_2 e α_1) e um gene teta (θ_1) de função indeterminada, arranjados, no sentido 5' → 3', na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento (Figura 2) (WEATHERALL, 2001b; HIGGS; WOOD, 2008); o agrupamento beta está situado numa região de 70 kb no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5) e é composto pelo gene embrionário épsilon (ϵ), pelos dois genes gama ($^G\gamma$ e $^A\gamma$), que diferem apenas em guanina ou alanina na posição 136, pelo pseudogene beta ($\psi\beta$) e pelos genes delta (δ) e beta (β), dispostos, ao longo do cromossomo, na mesma ordem em que são expressos (Figura 2) (GROSVELD; DILLON; HIGGS, 1993; SCHECHTER, 2008). Uma vez que estas cadeias se agrupam aos pares para formar as diversas hemoglobinas presentes ao longo da vida, é necessário um rígido e coordenado controle da expressão gênica destas, juntamente com o grupo heme, a fim de promover a adequada e equilibrada produção das hemoglobinas humanas nos diferentes estágios do desenvolvimento (Figura 2) (CLARK; THEIN, 2004; HIGGS, 1993).

Na fase inicial do período embrionário, a síntese das hemoglobinas é restrita aos eritroblastos do saco vitelino, onde as cadeias zeta e épsilon são sintetizadas nas primeiras quatro semanas do período pré-natal, originando a primeira hemoglobina embrionária, denominada Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$). Logo após esse período, as cadeias alfa e gama iniciam suas sínteses, formando as hemoglobinas Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$), que predominam após a 4ª semana e não mais são detectadas após a 13ª semana do período embrionário (STEINBERG *et al.*, 2005; WEATHERALL; CLEGG, 2001). Após a sexta semana de gestação, o fígado fetal passa a ser o principal responsável pela síntese das hemoglobinas, produzindo, especialmente, a mais importante Hb da vida intra-uterina, a Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$), que predomina até aproximadamente a 30ª semana da gestação, quando então, o aumento da síntese das cadeias globínicas β começa a substituir as cadeias γ e a Hb do adulto, a Hb A ($\alpha_2\beta_2$) tem um aumento gradativo de sua produção (MIGLIACCIO; PAPAYANNOPOULOU, 2001; STEINBERG *et al.*, 2005). Ainda antes do nascimento, a medula óssea inicia a síntese da cadeia delta, que juntamente com a alfa compõe a Hb A₂

($\alpha_2\delta_2$), segunda mais importante Hb do indivíduo adulto normal. Ao nascimento, as Hb F e Hb A representam, aproximadamente, 80 e 20% de toda a hemoglobina do eritrócito, respectivamente, e a partir dos seis meses de vida o indivíduo já possui as mesmas hemoglobinas da vida adulta, sendo a Hb A em torno de 95%, Hb A₂ até 3,5% e Hb F até 2% (CLARKE; HIGGINS, 2000; STEINBERG *et al.*, 2005) (Figura 3).

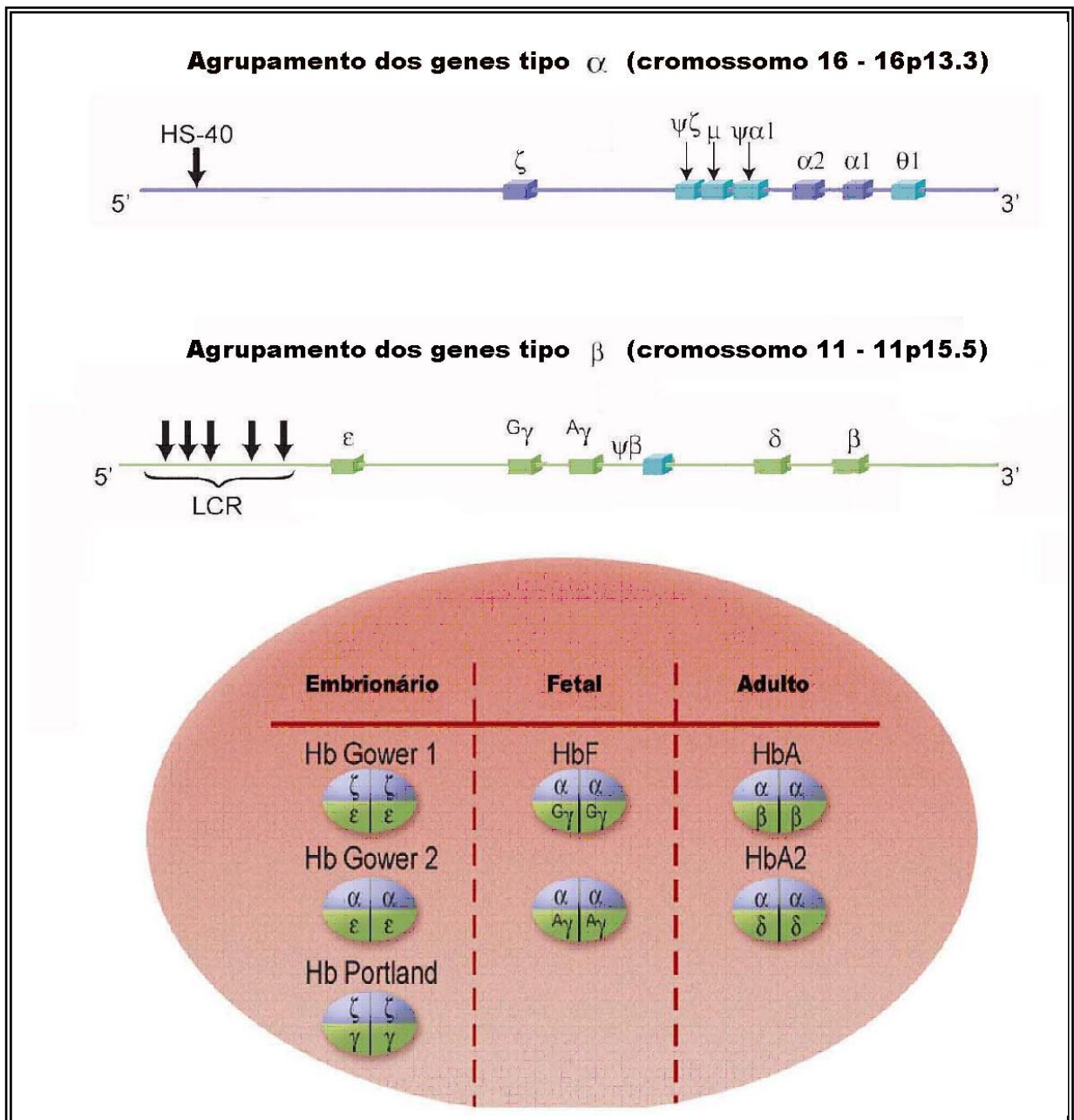


Figura 2 – Agrupamento (*clusters*) dos genes de globina nos cromossomos 11 e 16 (modificado de SCHECHTER, 2008)

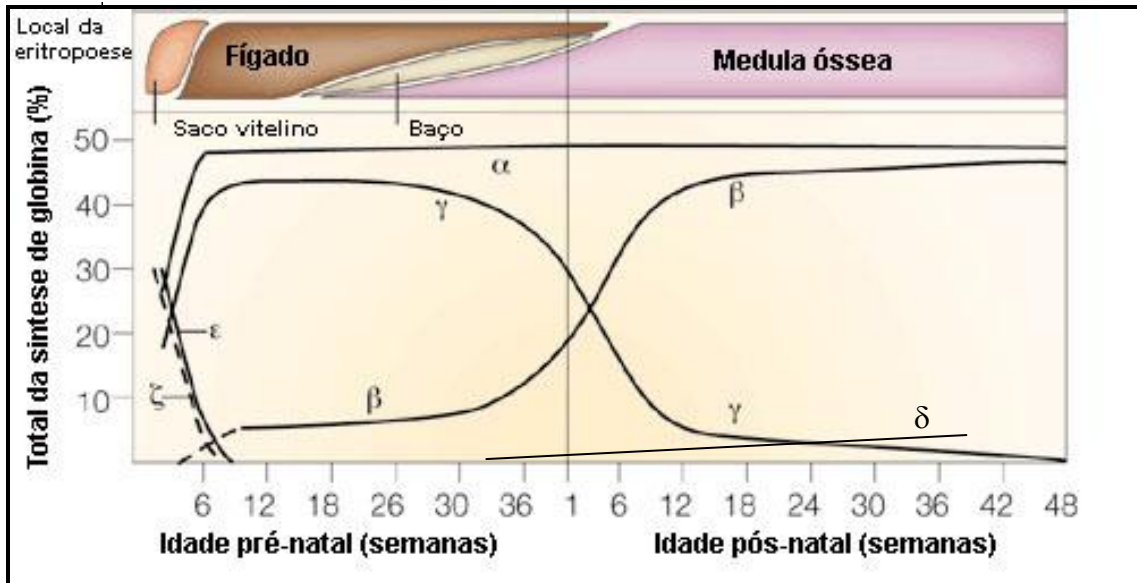


Figura 3 – Síntese das cadeias globínicas nos diferentes estágios do desenvolvimento (modificada de WEATHERALL, 2001a).

1.2 Os genes das cadeias globínicas

De um modo geral, os genes que codificam as cadeias globínicas são formados por três éxons e dois íntrons (IVS) (Figura 4) (CLARK; THEIN, 2004; HIGGS, *et al.*, 1989).

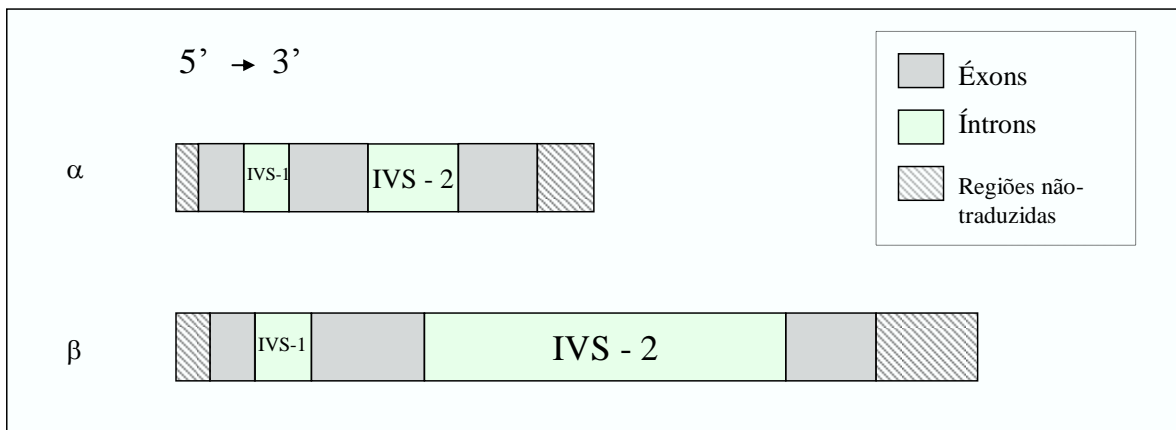


Figura 4 – Representação esquemática da estrutura dos genes das globinas alfa e beta (adaptada de FORGET, 2001)

Os genes alfa (α_1 e α_2) são compactos, compreendendo cerca de 1 a 2 kb de DNA e resultam da duplicação de um gene ancestral comum, ocorrida há milhões de anos (HIGGS, 1993; STEINBERG *et al.*, 2005). Cada um destes genes está localizado dentro de uma região homóloga de 4 kb de comprimento, onde cada região é dividida em três subsegmentos

homólogos, denominados X, Y e Z, separados por três segmentos não homólogos, denominados I, II e III (Figura 5) (BERNINI; HARTEVELD, 1998; HIGGS; WEATHERALL, 2008).

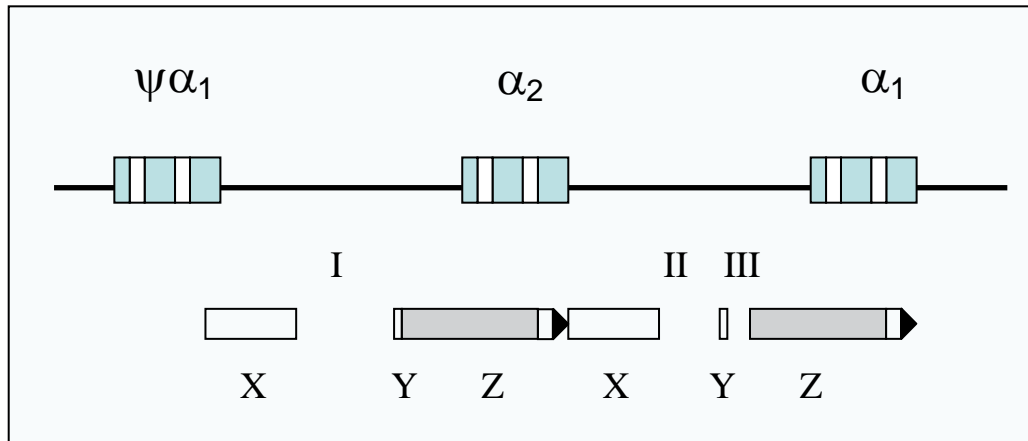


Figura 5 – Representação esquemática dos subsegmentos homólogos X, Y e Z dos genes da globina alfa (adaptada de WEATHERALL, 2001b)

O segmento de DNA de 26 kb no qual estes genes estão inseridos e o extenso segmento (150 kb) que flanqueia o agrupamento são parte de uma longa região rica em G + C que confere ao agrupamento alfa e ao DNA que o circunda características peculiares, tais como: replicação precoce no ciclo celular, localização dentro de uma banda Giemsa negativa, associação a ilhas CpG não-metiladas e presença de muitas seqüências repetitivas do tipo *Alu* (HIGGS, 1993; HIGGS *et al.*, 2005; WEATHERALL, 2001b).

Estes genes duplicados são altamente homólogos, codificam a mesma proteína (globina alfa) e divergem em apenas 17%, sendo esta limitada ao íntron 2 (IVS 2) e às suas regiões 3' não codificantes (3'UTR). Entretanto, embora o produto protéico formado pelos dois genes seja idêntico, métodos experimentais capazes de explorar a divergência entre as seqüências nas regiões 3' UTR verificaram que a expressão de mRNA do gene α_2 é cerca de três vezes maior do que a do gene α_1 , provavelmente resultante de diferenças na regulação da transcrição dos dois genes (HIGGS, 1993, WEATHERALL, 2001b).

Ambos os grupamentos gênicos são controlados por elementos regulatórios principais, localizados a 5' dos genes estruturais. A região controladora do locus beta (LCR) possui cinco sítios hipersensíveis à DNase I e se localiza de 6 a 20 kb a 5' do gene ϵ e o elemento regulatório do grupamento alfa (HS-40), possui um sítio hipersensível à DNase I específico de

eritrócitos e está situado 40 kb a 5' do gene ζ_2 (Figura 2) (CLARK; THEIN, 2004; HIGGS, *et al.*, 2005; STAMATOYANNOPOULOS; GROSVELD, 2001).

Os padrões de expressão tecido-específico dos genes das globinas, bem como de desenvolvimento-específico, se devem à regulação precisa dos grupamentos gênicos que envolvem uma complexa relação entre proteínas *trans*-atuantes, como os fatores de transcrição, e seqüências reguladoras *cis*-atuantes que atuam como promotores, reforçadores ou silenciadores da atividade gênica (STAMATOYANNOPOULOS; GROSVELD, 2001; GARRICK *et al.*, 2008).

Cada elemento regulatório é composto de “motivos de ligação” para múltiplos ativadores ou supressores transcricionais expressos de forma ubíqua ou restrita aos eritrócitos. Análises detalhadas da região HS-40 mostraram que este importante segmento de DNA contém múltiplos sítios de ligação para os fatores de transcrição específico dos eritrócitos, GATA-1 e NF-E2 (HIGGS, 1993; STAMATOYANNOPOULOS; GROSVELD, 2001).

1.3. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias constituem um grupo heterogêneo de doenças genéticas resultantes de alterações na síntese das globinas causadas por mutações que afetam os genes que codificam as cadeias polipeptídicas da hemoglobina (CLARK; THEIN, 2004; WEATHERALL *et al.*, 2001). Estima-se que aproximadamente 7% da população mundial seja portadora dos diferentes distúrbios hereditários da hemoglobina, tornando-se estas as doenças monogênicas humanas mais comuns (HIGGS; WEATHERALL, 2008). As hemoglobinopatias são divididas em três grupos (WEATHERALL *et al.*, 2001):

- Variantes estruturais da hemoglobina ou hemoglobinas anormais, resultantes de alterações estruturais em uma das cadeias de globina, sem afetar a sua taxa de síntese;
- Talassemias, decorrentes de uma redução ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias de globina, acarretando desequilíbrio nas quantidades relativas das cadeias polipeptídicas;
- Persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF), condição em que a síntese de cadeias gama continua além da infância, persistindo a produção de quantidades apreciáveis de Hb F durante a vida adulta.

Mais de 1.000 variantes estruturais da hemoglobina já foram descritas, das quais mais de 75% resultam da substituição de um único aminoácido por outro nas cadeias α ou β da hemoglobina (BAIN, 2006; WEATHERALL; CLEGG, 1999). Além de variantes resultantes das trocas de bases nos genes das cadeias γ ou δ , existem também formas raras que resultam da produção de cadeias globínicas híbridas, cadeias alongadas devido a inserções ou mutações de terminação, cadeias encurtadas devido a códon de terminação precoce ou cadeias com dupla substituição de aminoácidos. Dentre as variantes estruturais, as mais comuns são as hemoglobinas S, C e D (WEATHERALL, 2001a; WEATHERALL; CLEGG, 1999). Em 1996, Huisman *et al.*, publicaram uma compilação de parte destas variantes que hoje se encontram disponíveis, juntamente com as variantes descobertas e descritas mais recentemente, em um banco de dados que pode ser acessado eletronicamente através do endereço (<http://globin.cse.psu.edu/>).

1.3.1 Talassemias

As talassemias apresentam como principal característica o desequilíbrio na síntese de determinado tipo de cadeia de globina com conseqüente produção deficiente de hemoglobina, resultando em hemácias microcíticas e hipocrômicas, e dano aos eritrócitos e aos seus precursores, devido ao excesso das subunidades dos outros tipos de globina que são produzidos (FORGET; COHEN, 2005; WEATHERALL, 2006). São classificadas de acordo com o tipo de cadeia cuja produção está afetada em: talassemias α , β , δ , γ e $\delta\beta$, sendo as talassemias α e β as que apresentam maior frequência e importância clínica (Quadro 1) (WEATHERALL, 2001b).

São encontradas em praticamente todos os grupos étnicos e localizações geográficas, sendo bastante frequentes na região do Mediterrâneo, nas regiões equatoriais e subequatoriais da Ásia e África, países do Oriente Médio, além de Índia e Tailândia (FORGET; COHEN, 2005; WEATHERALL; PROVAN, 2000).

Talassemia alfa
α^0
α^+
Delecional ($-\alpha$)
Não delecional (α^T)
Talassemia beta
β^0
β^+
Talassemia delta-beta
$(\delta\beta)^0$
$(\delta\beta)^+$
Talassemia gama (γ)
Talassemia delta (δ)
Talassemia delta-beta-gama ($\delta\beta\gamma$)

Quadro 1 – Principais tipos de talassemias (adaptado de WEATHERALL, 2001b)

1.3.1.1 Talassemia alfa

Diferentemente da talassemia β , na qual a maioria das alterações se deve a mutações pontuais no gene beta, o principal mecanismo molecular das talassemias alfa consiste em deleções que removem um ou ambos os genes que codificam as cadeias α (FORGET; PEARSON, 1995; WEATHERALL; CLEGG, 1999). Como estas são compartilhadas tanto pelas hemoglobinas do adulto (Hb A e Hb A₂) quanto pela fetal (Hb F), a produção deficiente de cadeias alfa é refletida em ambas as fases do desenvolvimento: no feto, uma taxa reduzida destas cadeias leva a um excesso na produção de cadeias γ , que se tetramerizam (γ_4) formando a Hb Bart's e no adulto as cadeias beta em excesso se tetramerizam (β_4) originando a Hb H (FORGET; COHEN, 2005; WEATHERALL *et al.*, 2001).

Como existem dois genes alfa por genoma haplóide, sendo quatro numa célula diplóide normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), as talassemias alfa são classificadas em α^+ ($-\alpha$) e α^0 ($--$), conforme o número de genes comprometidos no cromossomo, levando, respectivamente, à redução parcial ou total da síntese de cadeias α (HIGGS, 1993; KATTAMIS *et al.*, 1996). A talassemia α^0 resulta de grandes deleções que removem todo ou parte do grupamento gênico alfa e/ou seu elemento regulatório (HS 40), deixando os genes α sem expressão. As deleções

mais frequentes são a $--^{MED}$, a $--^{SEA}$ e a $-(\alpha)^{20.5}$. Por outro lado, a talassemia α^+ ocorre mais frequentemente devido a deleções menores que removem apenas um desses genes embora também possa, mais raramente, ser causada por mutações de ponto ou deleções/inserções de poucos nucleotídeos resultando na expressão diminuída ou ausente dos genes α (talassemia α não delecional - α^T) (KATTAMIS *et al.*, 1996; WEATHERALL *et al.*, 2001).

Os diferentes haplótipos talassêmicos alfa podem se combinar formando diferentes genótipos, que variam conforme a quantidade de genes deletados: heterozigose da talassemia α^+ ($-\alpha/\alpha\alpha$), com deleção de um gene alfa; talassemia α^+ homozigoto ($-\alpha/-\alpha$), com perda de um gene alfa em cada cromossomo; talassemia α^0 heterozigoto ($--/\alpha\alpha$), com perda de dois genes alfa no mesmo cromossomo; interação α^0/α^+ ($--/-\alpha$), com deleção de três genes alfa; e a síndrome da hidropisia fetal por Hb Bart's, com ausência dos quatro genes α ($--/--$) (Figura 6) (WEATHERALL, 2001b; WEATHERALL; PROVAN, 2000).

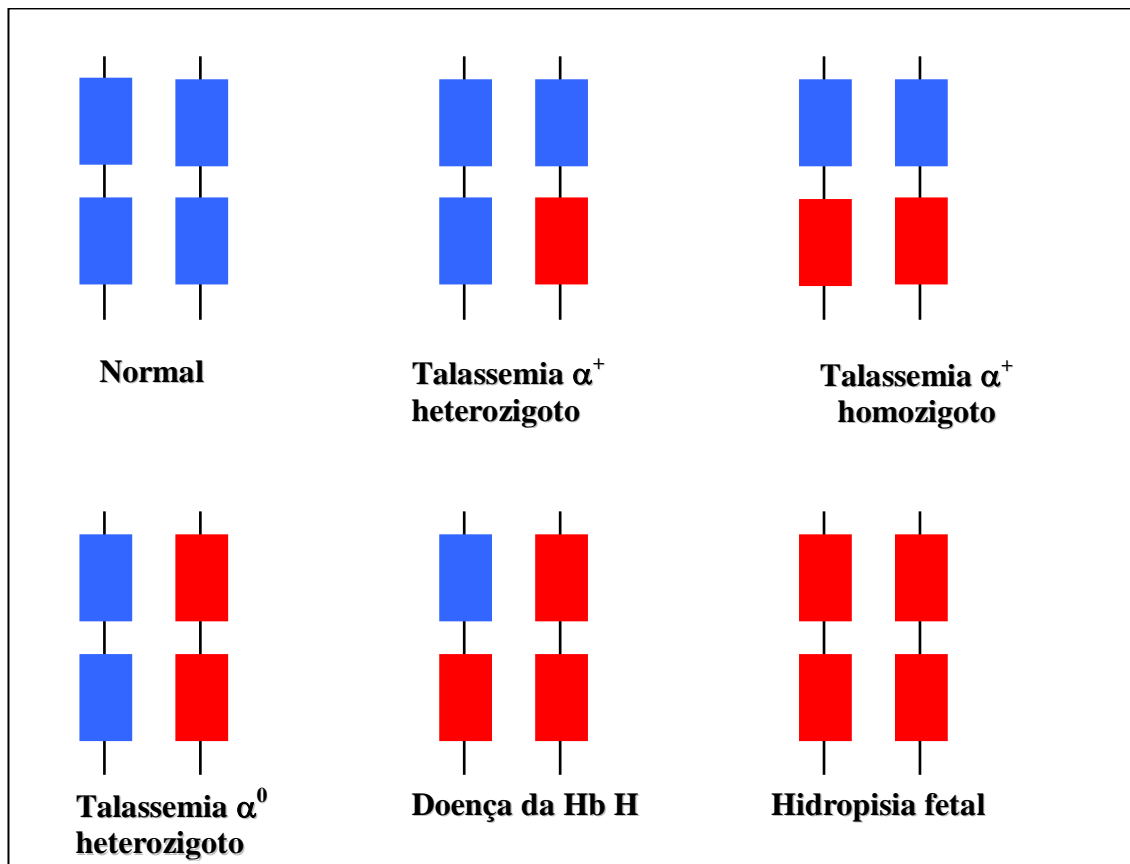


Figura 6 – Genótipos da talassemia α . Os retângulos de cor azul representam os genes normais e os vermelhos representam os genes deletados (adaptado de WEATHERALL; PROVAN, 2000).

1.3.1.1.1 Fisiopatologia

A fisiopatologia das talassemias, tanto em nível celular quanto clínico, representa uma conseqüência direta do desequilíbrio na síntese das cadeias de globina. O acúmulo destas afeta os componentes da membrana dos eritrócitos e, também, o estado de hidratação celular (RUND; RACHMILEWITZ, 2001; SCHRIER, 1994).

Na talassemia alfa, as membranas eritrocitárias são hiperestáveis e não apresentam alterações oxidativas na proteína 4.1. Além disso, o acúmulo de cadeias β leva a um aumento da hidratação celular, diferentemente do que ocorre com o excesso de cadeias α , na talassemia beta (RUND; RACHMILEWITZ, 2001; SCHRIER, 1994).

Como mencionado anteriormente, uma importante característica da talassemia alfa é a capacidade das cadeias que se encontram em excesso (γ e β) se agruparem para formar homotetrâmeros (Hb Bart's e Hb H, respectivamente) que são solúveis e não precipitam nos precursores das hemácias na medula óssea, não ocasionando, pois, eritropoese ineficiente. Entretanto, a Hb H precipita nos eritrócitos mais maduros formando corpos de inclusão e estas células são, então, removidas da circulação pelo baço e outros órgãos do sistema reticuloendotelial, provocando anemia hemolítica. Desta maneira, a anemia das formas mais severas da talassemia alfa no adulto é resultante da menor sobrevivência das hemácias na circulação e da reduzida quantidade de hemoglobina, originando microcitose e hipocromia. Além destas características, as Hb Bart's e H apresentam uma elevada afinidade ao O_2 , tornando-as sem utilidade fisiológica para transportá-lo, uma vez que não liberam o oxigênio eficientemente para os tecidos (Figura 7) (STEINBERG *et al.*, 2005; WEATHERALL, 2001b; WEATHERALL *et al.*, 2001).

como deleção à direita (*rightward deletion*) (Figura 8). O produto final desta deleção é um gene α híbrido ($\alpha_2\alpha_1$) que corresponde à região 3' do gene α_2 e 5' do gene α_1 (FOGLIETTA *et al.*, 1996; KATTAMIS *et al.*, 1996; WEATHERALL *et al.*, 2001).

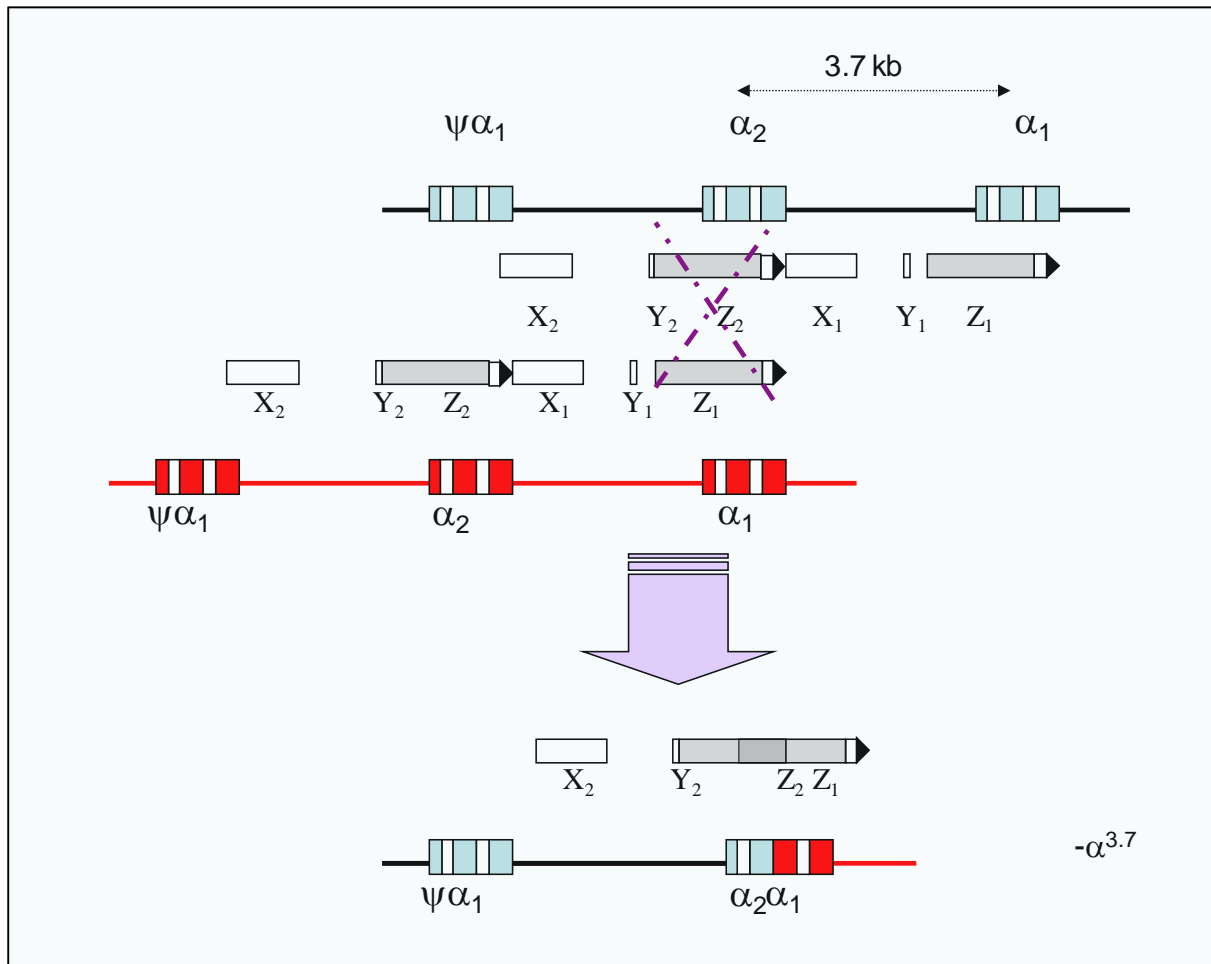


Figura 8 – Mecanismo de recombinação desigual originando a deleção $-\alpha^{3.7}$ (adaptada de WANG *et al.*, 2003)

De modo similar, o pareamento desigual entre os segmentos X remove 4,2 kb de DNA, originando a segunda forma mais frequente de talassemia α^+ , a $-\alpha^{4.2}$, conhecida como deleção à esquerda (*leftward deletion*) (Figura 9) (FOGLIETTA *et al.*, 1996; KATTAMIS *et al.*, 1996; WEATHERALL *et al.*, 2001). Neste caso, o gene α_2 é inteiramente removido, restando no final, apenas o gene α_1 intacto (FOGLIETTA *et al.*, 1996).

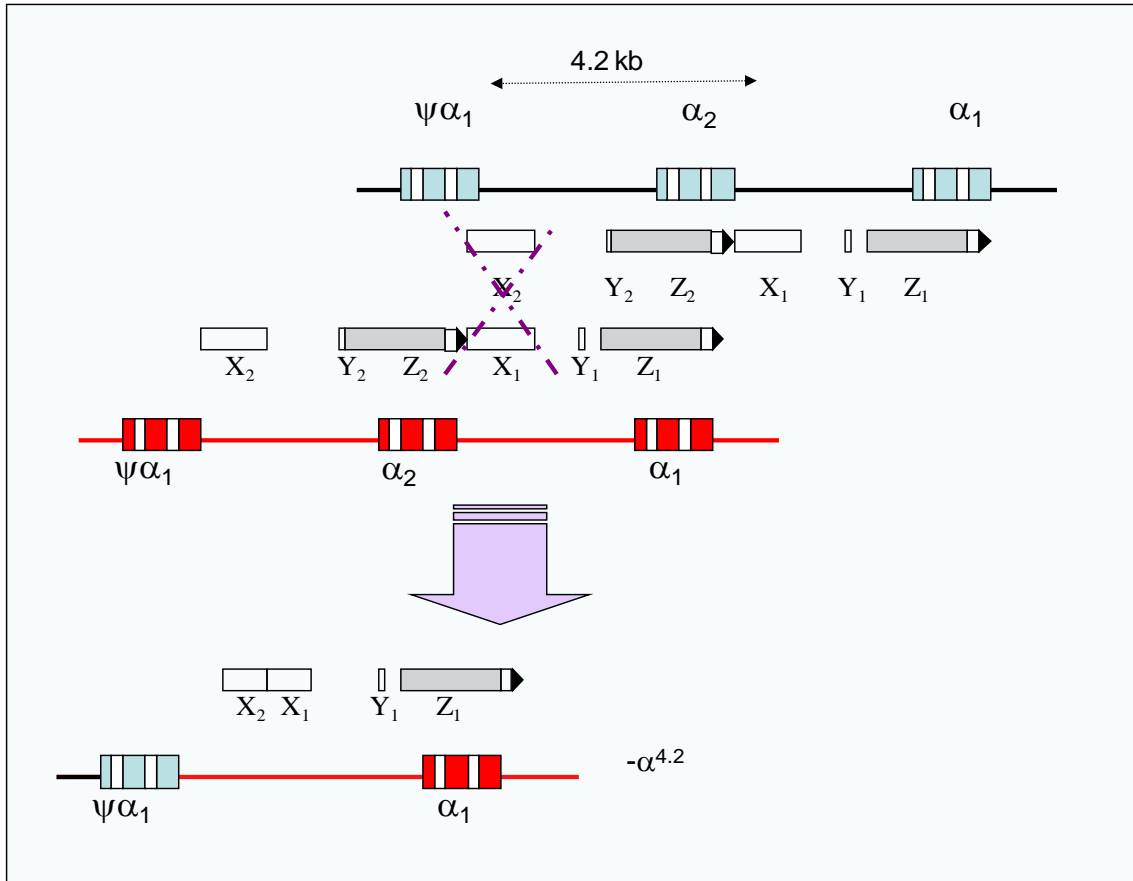


Figura 9 - Mecanismo de recombinação desigual originando a deleção $-\alpha^{4.2}$ (adaptada de WANG *et al.*, 2003)

Outras formas deletionais mais raras da talassemia α^+ já foram descritas, como a $-\alpha^{2.7}$, que remove o gene α_1 e a $-\alpha^{3.5}$, que também remove o gene α_1 e o DNA que o flanqueia (KATTAMIS *et al.*, 1996; WEATHERALL, 2001b).

1.3.1.1.3 Achados clínicos e características laboratoriais

Os diversos quadros clínicos e laboratoriais associados às talassemias alfa são resultantes da heterozigose, da homozigose ou da interação das duas principais formas da talassemia alfa, a α^0 e a α^+ (Quadro 2) (HIGGS, 1993; WEATHERALL, 2001b; WEATHERALL, 2006).

A heterozigose da talassemia α^+ , também denominada clinicamente de “portador silencioso” caracteriza-se pela deleção de um único gene α e apresenta discretas alterações hematológicas, por vezes até mesmo ausentes (CLARKE; HIGGINS, 2000; WEATHERALL, 2006).

As formas heterozigota da talassemia α^0 ($--/\alpha\alpha$) e homozigota da talassemia α^+ ($-\alpha/-\alpha$) são caracterizadas pela deleção de dois genes da globina alfa. São clinicamente normais, porém apresentam microcitose e hipocromia mais acentuadas que a forma descrita anteriormente (WEATHERALL, 2001b).

A interação das formas α^+ e α^0 resulta na doença da hemoglobina H que está associada à deleção de três genes α . Com apenas um único gene funcional, a síntese das cadeias alfa está fortemente diminuída e com isso são formados tetrâmeros de cadeias β em excesso, tornando-se mais evidentes (Hb H) (WEATHERALL, 2001b; WEATHERALL, 2006).

A homozigose da talassemia α^0 ($--/--$) corresponde à hidropisia fetal por Hb Bart's, que tem como consequência a morte intra-uterina ou algumas horas após o nascimento (CHUI; WAYE, 1998; WEATHERALL, 2001b).

Tipos	Genótipos	Aspectos clínicos e laboratoriais
Talassemia α^+ heterozigótica	$-\alpha/\alpha\alpha$ ou $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$	1 – 2% de Hb Bart's ao nascimento, com alterações hematológicas mínimas ou ausentes no adulto.
Talassemia α^+ homozigótica	$-\alpha/-\alpha$ ou $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$	5 - 10% de Hb Bart's ao nascimento, com discretas microcitose e hipocromia no adulto.
Talassemia α^0 heterozigótica	$--/\alpha\alpha$	5 - 15% de Hb Bart's ao nascimento, com discretas microcitose e hipocromia no adulto.
Interação talassemia α^+/α^0 ou Doença da hemoglobina H	$--/-\alpha$ ou $--/\alpha^T\alpha$	25 - 50% de Hb Bart's ao nascimento e 2 - 40% de Hb H na vida adulta. Apresenta hemácias microcíticas e hipocrômicas, anisopoiquilocitose e reticulocitose.
Talassemia α^0 homozigótica ou Hidropisia Fetal	$--/--$	Cerca de 80% de Hb Bart's, traços de Hb H e 10 a 20% de Hb Portland. Condição incompatível com a vida.

Quadro 2 – Aspectos clínicos e laboratoriais dos diferentes genótipos talassêmicos (adaptado de WEATHERALL, 2001b; WEATHERALL, 2006)

1.3.1.1.4 Diagnóstico e Importância Clínica

O diagnóstico da talassemia alfa apresenta dificuldades, pois somente duas formas possuem alterações clínicas significativas: a doença da Hb H e a hidropisia fetal. As demais formas não apresentam manifestações clínicas e as alterações laboratoriais são discretas no adulto (HIGGS; BOWDEN, 2001; WEATHERALL *et al.*, 2001).

Embora as triagens laboratoriais avaliem a contagem de hemácias, a eletroforese de hemoglobina, as determinações das hemoglobinas A₂ e Fetal e os índices hematológicos VCM e HCM, estes últimos que poderiam funcionar como indicadores de redução da síntese de cadeias alfa, apresentam nessas formas brandas da talassemia, considerável superposição com os valores encontrados em indivíduos normais, sendo de pouco valor na distinção entre os diferentes genótipos (HIGGS; BOWDEN, 2001; WEATHERALL *et al.*, 2001). Sendo assim, o diagnóstico preciso das talassemias alfa somente pode ser feito através da análise de DNA (CLARK; THEIN, 2004; HIGGS; BOWDEN, 2001; WEATHERALL, 2006).

Além da talassemia alfa, outras condições patológicas tais como anemia por deficiência de ferro, traço talassêmico beta e anemia de doenças crônicas, também causam microcitose e hipocromia, tornando-se necessário, portanto, o diagnóstico diferencial entre estas.

Embora os indivíduos com as formas mais brandas da talassemia alfa sejam clinicamente normais e não necessitem de tratamento, é extremamente importante reconhecer esta condição para evitar exames laboratoriais e consultas médicas desnecessárias a fim de se investigar as causas da microcitose e hipocromia e, ainda mais importante, para garantir que o paciente não receberá tratamento inapropriado com ferro, que pode vir a ser danoso para o organismo (HIGGS; BOWDEN, 2001; WEATHERALL, 2006).

1.3.1.1.5 Associações da talassemia alfa com outras hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são as doenças monogênicas mais comuns no mundo. Estima-se que cerca de 300 a 500 mil crianças nascidas vivas, por ano, apresentem alguma forma homocigota severa ou associações heterocigotas de mais de um tipo de hemoglobinopatia (HIGGS; WEATHERALL, 2008). A hemoglobina S, resultante de uma mutação de ponto (GAG > GTG) no gene da globina beta da hemoglobina que leva à substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia beta, é a variante estrutural mais frequente no Brasil, seguida pela hemoglobina C, também resultante de alteração na posição 6 da cadeia

beta, com substituição de ácido glutâmico por lisina (RAMALHO; GIRALDI; MAGNA, 2008).

As regiões do país que apresentam a maior prevalência da hemoglobina S são a Sudeste e a Nordeste, com cerca de 8% de heterozigotos, entre os indivíduos de descendência africana (SONATI; COSTA, 2008).

No estado do Rio Grande do Norte, diferentes estudos populacionais identificaram prevalência para o traço falciforme variando de 1,5 a 2,5% e para o traço Hb AC de 0,1 a 0,3% (ARAÚJO *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 1991; MEDEIROS *et al.*, 1992). A anemia falciforme (Hb SS) teve prevalência entre 0,05 e 0,2% (ARAÚJO *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 1991).

O traço falciforme, forma heterozigota para o gene da hemoglobina S (β^S), caracteriza o portador assintomático, laboratorialmente representado pela associação da hemoglobina normal, A, com a variante estrutural S (Hb AS) (STEINBERG, 2001). A concentração de hemoglobina S no traço falciforme é sempre menor que o da Hb A, variando entre 20 e 45%, com um valor médio de aproximadamente 40% (KENNEDY *et al.*, 1986; STEINBERG, 2001). Acredita-se ainda que a concentração de Hb S no traço falciforme seja distribuída de maneira trimodal, com picos de 30, 35 e 40%, sendo estes dependentes, principalmente, do número de genes da globina alfa presentes no indivíduo. Além da talassemia alfa, fatores como anemia ferropriva, anemia megaloblástica e talassemia beta⁺, também podem provocar a redução da concentração de Hb S, que nestas condições está normalmente situada abaixo de 30% (BAIN, 2006; STEINBERG, 2001).

Já a forma homozigota para o gene β^S (Hb SS), conhecida como anemia falciforme, é a doença hereditária monogênica mais comum no Brasil, e em virtude de sua prevalência e morbimortalidade, tem sido apontada como uma importante questão de saúde pública. Acomete cerca de 0,1 a 0,3% da população negróide, com tendência a atingir parcela cada vez mais significativa da população devido à grande miscigenação em nosso país (BANDEIRA *et al.*, 2007). Quando em associação com a talassemia alfa, principalmente nos indivíduos homozigotos para a talassemia alfa⁺, acredita-se que esta favoreça um curso clínico menos grave da doença, provavelmente por diminuir a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (BALLAS, 2001; EMBURY, 1985).

Os pacientes que apresentam anemia falciforme associada à talassemia alfa têm anemia moderada, baixa contagem de reticulócitos, valores mais reduzidos de VCM e HCM, aumento nas taxas de hemoglobina e hematócrito e menor concentração intraeritrocitária de Hb S do que pacientes sem deleção nos genes alfa. Além desses efeitos nos parâmetros

hematológicos, a coexistência destas referidas hemoglobinopatias leva a diferentes efeitos na reologia das hemácias, como por exemplo, maior deformabilidade celular, menor quantidade de células irreversivelmente falcizadas e menores graus de desidratação e fragilidade celular. Juntos, estes fatores contribuem para uma reduzida polimerização da desoxihemoglobina S, atenuado processo de falcização dos eritrócitos e menor grau de hemólise. Entretanto, esta associação não é sempre benéfica, uma vez que a aumentada viscosidade sanguínea decorrente das taxas mais elevadas de hemoglobina e hematócrito podem favorecer a interação célula-célula na microvasculatura, levando a episódios de vaso-oclusão (BALLAS, 2001; EMBURY, 1985; STEINBERG, 1998).

Além de seus estados heterozigoto e homozigoto, a Hb S também pode coexistir com outras variantes estruturais, como a hemoglobina C, por exemplo, resultando na doença da hemoglobina SC que é similar à anemia falciforme, porém geralmente menos severa (BAIN, 2006; NAGEL; STEINBERG, 2001). A associação desta hemoglobinopatia com a talassemia alfa⁺ leva a um aumento na contagem de hemácias e uma diminuição nos valores de VCM e HCM, comparados com outros pacientes com a mesma doença. Clinicamente, a sintomatologia dessa associação ainda não está bem clara, possivelmente devido ao pequeno número de indivíduos identificados com esse diagnóstico (BAIN, 2006; BALLAS, 2001).

A interação da talassemia alfa com a talassemia beta ocasiona alteração nos fenótipos clínicos da doença, a qual depende do número de genes alfa presentes e da gravidade dos alelos da talassemia beta associados (CAO; GALANELLO; ROSATELLI, 1994; THEIN, 2005). A coexistência dessas formas mais comuns de talassemia não é incomum, uma vez que ambas entidades clínicas são encontradas com certa frequência em determinadas regiões do mundo (THEIN, 2005; WEE *et al.*, 2008). Laboratorialmente, essa co-herança pode levar à normalização de índices hematológicos e a uma síntese de cadeias globínicas mais balanceadas (BAIN, 2006). Entretanto, essas alterações são mais proeminentes quando se têm dois ou três genes alfa deletados (BAIN, 2006; THEIN, 2005).

1.3.1.1.6 Distribuição da talassemia alfa

As talassemias alfa apresentam distribuição mundial, sendo frequentemente encontradas na África, Oriente Médio, Sudeste Asiático e região do Mediterrâneo. As diferentes formas da doença, entretanto, apresentam características peculiares quanto à sua distribuição (WEATHERALL, 2006). As talassemias α^0 são mais comumente encontradas nas populações do Mediterrâneo e Sudeste Asiático enquanto as talassemias α^+ são extremamente frequentes no Oeste da África, Oriente Médio, Sudeste da Ásia e região do Mediterrâneo, atingindo uma frequência de aproximadamente 80% em algumas partes de Papua Nova Guiné (Figura 10) (WEATHERALL, 2001b; WEATHERALL, 2006).

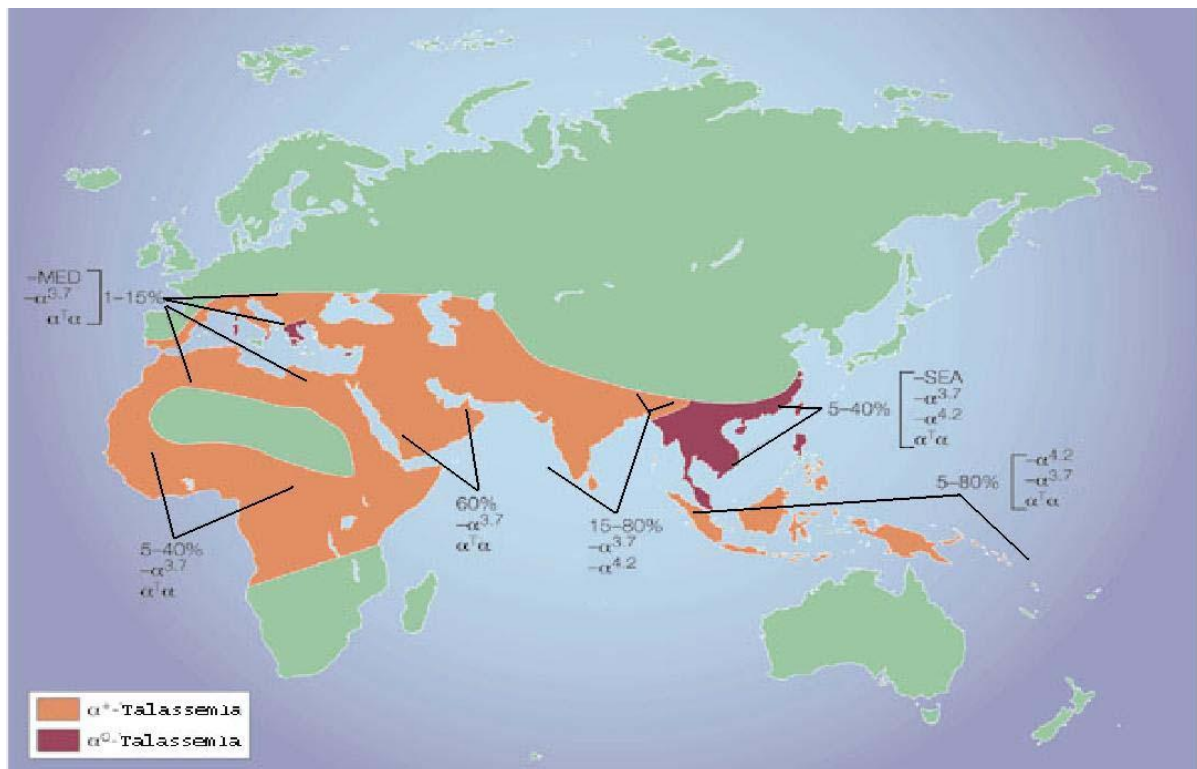


Figura 10 – Distribuição geográfica da talassemia alfa (adaptada de WEATHERALL, 2001a)

Nas Américas, a talassemia α^+ foi estudada em vários países, como Estados Unidos (JOHNSON; TEGOS; BEUTLER, 1982), Canadá (BERGERON *et al.*, 2005), México (REYES-NUNEZ *et al.*, 2006), Venezuela (ARENDS, *et al.*, 2000), Jamaica (HIGGS, *et al.*, 1981), Costa Rica (SAENZ *et al.*, 1988), Argentina (NOGUERA; BRAGÓS; MILANI, 2002), Uruguai (LUZ *et al.*, 2006) e Brasil (SONATI *et al.*, 1991).

No Brasil, estudo realizado em 47 doadores de sangue negros do Estado de São Paulo estimou uma prevalência de 21,3% (10/47) da deleção $-\alpha^{3.7}$ heterozigótica ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) e de

2,1% (1/47) da forma homozigótica ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) (SONATI *et al.*, 1991). Neste mesmo trabalho também foi relatada uma frequência de 4,2% (2/47) para a interação Hb AS – talassemia alfa.

Borges *et al.*, (2001) ao investigarem as diferentes formas da talassemia alfa em 339 indivíduos com microcitose e hipocromia sem anemia na cidade de Campinas, São Paulo, observaram uma frequência de 49,9%, sendo a frequência da deleção $-\alpha^{3.7}$ heterozigótica de 42,8% e da deleção $-\alpha^{3.7}$ homozigótica de 5,3%; a forma não deletional ($\alpha^{\text{HphI}}\alpha/\alpha\alpha$) representou 1,5% dos casos e a forma deletional da talassemia α^0 ($-\alpha^{\text{MED}}/\alpha\alpha$), 0,3% dos casos. As formas deletionais $-(\alpha)^{20.5}$ e $-\alpha^{4.2}$ e as não deletionais α^{NcoI} e α^{TSAUDI} não foram encontradas em nenhum dos indivíduos analisados.

Na Região Nordeste, estudo realizado por Couto *et al.*, (2003) em gestantes provenientes da mais importante maternidade pública de Salvador, encontrou frequência de 21,7 % para o genótipo ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) e 0,9% para o ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$). Em outro estudo (ADORNO *et al.*, 2005) conduzido na mesma unidade de saúde, foram investigadas as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ em 514 recém-nascidos. As frequências observadas foram de 19,7% para o genótipo ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) e 2,5% para o ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$). A deleção $-\alpha^{4.2}$ não foi observada em nenhum dos recém-nascidos investigados.

Silva-Filho *et al.*, (2005) analisaram 2.190 amostras de trabalhadores da Fiocruz/RJ e a frequência encontrada foi de 0,7% (16/2.190) para a deleção $-\alpha^{3.7}$. A deleção $-\alpha^{4.2}$ foi investigada, porém não foi observada em nenhuma das amostras. Neste trabalho também foi encontrada a interação Hb AS – talassemia alfa em 0,2% dos indivíduos.

Embora a ocorrência da talassemia alfa venha sendo estudada ao longo dos anos em diferentes regiões do país, as informações sobre dados moleculares e de prevalência ainda são poucos, devido às limitações das metodologias utilizadas em algumas pesquisas que não se baseiam no diagnóstico molecular (LISOT *et al.*, 2004; MELO-REIS *et al.*, 2006; ORLANDO *et al.*, 2000; SEIXAS *et al.*, 2008; WAGNER *et al.*, 2005). Além disso, como consequência da variação étnica observada no Brasil, onde a população é miscigenada por elementos de origens européia, africana, indígena e asiática em diferentes proporções dependendo da região e/ou estado, a frequência da talassemia alfa pode variar de região para região.

No Rio Grande do Norte ainda não existem dados sobre talassemia alfa, sendo este o primeiro trabalho realizado com tal propósito.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Diagnosticar e verificar a prevalência da talassemia alfa⁺ (deleção $-\alpha^{3,7}$) em pacientes com microcitose e/ou hipocromia mediante técnicas de biologia molecular.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Implantar a técnica de biologia molecular (reação da polimerase em cadeia, PCR) para o diagnóstico da deleção $-\alpha^{3,7}$;
- 2) Avaliar os parâmetros hematológicos dos pacientes com microcitose e/ou hipocromia que apresentarem a deleção $-\alpha^{3,7}$;
- 3) Comparar os dados hematológicos dos pacientes com a deleção $-\alpha^{3,7}$ com os que apresentarem deficiência de ferro.

3. METODOLOGIA

3.1 Casuística

No período de outubro de 2007 a agosto de 2008 foram coletadas amostras de sangue de 691 indivíduos de ambos os sexos atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro Dalton Barbosa Cunha (Hemonorte), Natal – RN. Este ambulatório atende pacientes encaminhados por médicos hematologistas ou que estejam relacionados à clínica hematológica, bem como indivíduos doadores de sangue e seus familiares.

Foram incluídas no estudo todas as amostras de indivíduos não aparentados que apresentaram microcitose e/ou hipocromia, caracterizadas por volume corpuscular médio (VCM) igual ou inferior a 82 fL e/ou hemoglobina corpuscular média (HCM) igual ou inferior a 27 pg.

Os critérios de exclusão foram crianças com idade inferior a 4 anos, pacientes com transfusões sanguíneas nos últimos três meses e aqueles que relataram ser portadores de anemia megaloblástica ou auto-imune, leucemia ou demais doenças oncológicas. Os pacientes que se encontravam hospitalizados também não foram incluídos no estudo.

No momento da coleta, foi preenchida uma ficha de acompanhamento de cada paciente contendo dados de identificação pessoais e clínicos, a qual foi utilizada para anotar os resultados dos exames laboratoriais realizados (Apêndice 1).

A origem étnica foi inferida pela cor de pele e os sujeitos foram classificados em branco, pardo e negro.

Todos os pacientes ou seus representantes legais foram previamente esclarecidos quanto aos procedimentos adotados e a finalidade do trabalho, sendo a amostra de sangue obtida somente após a concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Apêndice 2). Todos os pacientes analisados no presente estudo receberam os resultados dos exames laboratoriais realizados (Apêndices 3 e 4).

O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEP-UFRN), protocolo nº 129/06 (Anexo 1).

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção das amostras

As amostras de sangue periférico (aproximadamente 8 mL) foram obtidas através de punção venosa e distribuídas em dois tubos de ensaio: um tubo estéril contendo anticoagulante EDTA na proporção de 1mg/mL de sangue e outro, sem anticoagulante, para a obtenção do soro.

O sangue colhido com anticoagulante foi utilizado para a realização do eritrograma, eletroforese de hemoglobina, dosagem das hemoglobinas A₂ e Fetal e extração do DNA, quando necessário. Todos os exames foram executados no período de até 24 horas após a coleta.

A obtenção do soro se deu após centrifugação do sangue sem anticoagulante a 600 g por 15 minutos. O soro obtido foi estocado em microtubo estéril sob refrigeração a 4 °C, por no máximo 7 dias, até a determinação da ferritina sérica.

As análises hematológicas, envolvendo o estudo das hemoglobinas, foram realizadas no Laboratório do Anexo de Hematologia do Hemonorte e no Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e a determinação da ferritina sérica no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Potiguar. A extração e análise do DNA foram realizadas no Laboratório de Doenças Infecciosas e do Câncer do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFRN.

3.2.2 Eritrograma

A determinação do número de hemácias, da concentração de hemoglobina, do hematócrito e dos índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM foi realizada através de contador automático de células modelo Micros 60 (ABX Diagnostics), imediatamente após a coleta das amostras de sangue.

3.2.3 Eletroforese de hemoglobina

3.2.3.1 Preparo dos hemolisados

3.2.3.1.1 Hemolisado rápido

Em uma placa de plástico, foram colocados 20 µL de sangue total homogeneizado e 50 µL do reativo hemolisante⁸. Em seguida, procedeu-se à homogeneização da mistura por 30 segundos, até completa hemólise (NAOUM, 1997).

Este hemolisado foi utilizado na eletroforese de hemoglobina em pH alcalino.

3.2.3.1.2 Hemolisado com clorofórmio (livre de estroma)

Uma alíquota de cerca de 2 mL do sangue colhido com anticoagulante foi centrifugado por 5 minutos a 350 g (centrífuga ALC modelo PK 121R) para a remoção do plasma. Em seguida, as hemácias foram lavadas 3 vezes com solução salina 0,9 % e centrifugadas a 350 g por 5 minutos, em cada etapa. Os eritrócitos lavados foram lisados pela adição de 1 volume de água destilada, isto é, igual volume de água destilada em relação às hemácias lavadas e posterior agitação. Em seguida, foi adicionado 0,5 volume de clorofórmio para cada volume do lisado. Após vigorosa agitação, centrifugou-se a 1.500 g por 20 minutos. A camada superior que constitui o hemolisado livre de estroma foi retirada com o auxílio de pipeta Pasteur e transferida para um tubo de ensaio (DACIE; LEWIS, 1995).

Este hemolisado foi utilizado para as dosagens das hemoglobinas A₂ e Fetal.

3.2.3.2 Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino

Todas as amostras, após o preparo do hemolisado rápido, foram submetidas à eletroforese em pH alcalino, utilizando-se fitas de acetato de celulose (Cellogel, Chemetron) de 2,7 x 14 cm e tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,5⁹. A corrida eletroforética foi efetuada sob a diferença de potencial de 300 volts durante 30 minutos. O reconhecimento das hemoglobinas foi feito mediante o emprego de padrões eletroforéticos conhecidos (BARTLETT, 1963).

⁸ Reativo hemolisante: saponina 1%

⁹ Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) pH 8,5: Tris-(hidroximetil)-aminometano 0,08 M; Na₂EDTA 1,61 µM; ácido bórico 0,05 M.

A confirmação das hemoglobinas S e C foi feita pelo teste de solubilidade e eletroforese em gel de ágar pH 6,0, respectivamente (MAGALHÃES, ARASHIRO, 1977; DACIE; LEWIS, 1995).

3.2.4 Dosagem da hemoglobina A₂

A hemoglobina A₂ (Hb A₂) foi quantificada mediante eletroforese em acetato de celulose (Cellogel, Chemetron), em tampão Tris-EDTA-Borato, pH 8,5, sob a diferença de potencial de 300 volts por 30 minutos, seguida de eluição em solução de NaCl 0,9%. A leitura das absorbâncias das frações de hemoglobina foi feita em comprimento de onda de 415 nm, utilizando-se espectrofotômetro Coleman modelo 395-UV. A técnica foi realizada em duplicata e os valores de Hb A₂ foram expressos como a média das duas determinações (BEZERRA, 1984).

3.2.5 Dosagem da hemoglobina Fetal

Para quantificar a hemoglobina Fetal (Hb F) foi utilizado o método da desnaturação alcalina que consistiu na adição de uma solução NaOH 1,2 N ao hemolisado livre de estroma e após exatamente dois minutos, a desnaturação foi interrompida pela adição de solução saturada de sulfato de amônio¹⁰ que reduz o pH e precipita a hemoglobina desnaturada. Após filtração em papel de filtro Whatman nº 42, a quantidade de hemoglobina não desnaturada foi medida em comprimento de onda de 540 nm, utilizando-se espectrofotômetro Coleman modelo 395-UV. A proporção da hemoglobina álcali-resistente (Hb F) foi então calculada como uma percentagem da quantidade total de hemoglobina presente (BETKE; MARTI; SCHLICHT, 1959).

3.2.6 Dosagem de ferritina sérica

A determinação da ferritina sérica foi realizada através de ensaio imunométrico quimioluminescente em fase sólida, utilizando-se Kit comercial (Ferritin, Euro Diagnostics Products Co., UK) em aparelho automatizado (Immulite, Diagnostics Products Co., USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

¹⁰ Solução saturada de sulfato de amônio: Sulfato de amônio 500 g; água destilada q.s.p. 500 mL.

3.2.7 Extração do DNA do sangue periférico

Após as análises hematológicas, todas as amostras que apresentaram microcitose e/ou hipocromia tiveram seu DNA extraído e foram submetidas aos testes moleculares.

A extração do DNA de sangue periférico foi realizada através do kit *illustra Blood GenomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante. O sangue total colhido com EDTA foi previamente homogeneizado e uma alíquota de 200 µL foi transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril. O processo de extração iniciou-se com a adição de proteinase K, uma serino-protease que auxilia na hidrólise de ligações peptídicas e é capaz de inativar DNAses e possíveis inibidores, aprimorando, assim, o processo de extração. A lise das células ocorreu por meio de um agente caotrópico presente na solução de lise, que também é responsável pela desnaturação protéica e ligação seletiva do DNA genômico à membrana de sílica presente na coluna de extração. O processo seguiu com a lavagem da coluna, por meio de tampão específico contendo etanol, o qual tem por propriedade remover sais residuais e outros possíveis contaminantes e preparar a membrana de sílica para a etapa final de eluição. A eluição foi realizada com 200 µL de um tampão de baixa força iônica, previamente aquecido, para obtenção de maior rendimento na extração. A solução de DNA obtida foi armazenada sob refrigeração a cerca de -20 °C.

3.2.8 Avaliação da integridade e quantificação do DNA

Verificou-se a integridade do DNA purificado através de eletroforese horizontal em gel de agarose a 0,8 % em tampão TBE¹¹ 1X a 100V por 1h 30min. Ao final, o gel foi corado com solução de brometo de etídio 5 µg/mL em TBE 1X por 30 min sendo, posteriormente, exposto à luz ultravioleta para a visualização das bandas presentes (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1992).

A estimativa da concentração do DNA foi realizada através de espectrofotômetro (BioPhotometer, Eppendorf), medindo-se a absorbância a 260nm, onde a absorbância de 1 em 260nm corresponde a aproximadamente 50 µg/mL de DNA.

¹¹ Tampão TBE 1X: tris base 0,089 M; ácido bórico 0,089 M; EDTA 0,2 mM, pH 8,0.

3.2.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção da talassemia alfa (- $\alpha^{3.7}$)

As amostras de DNA foram submetidas à PCR utilizando-se os iniciadores C2¹² e C10¹³ (DODÉ *et al.* 1993) que flanqueiam e amplificam fragmentos de 2,1 kb quando o gene α_1 não apresenta deleções ou de 1,9 kb quando o gene híbrido ($\alpha_2\alpha_1$) está presente e o indivíduo é portador da deleção - $\alpha^{3.7}$ (Figura 11). Na maioria das reações, 2,5 μ L da suspensão de DNA genômico (aproximadamente 350 ng de DNA) foram adicionadas em um volume final de 25 μ L da reação de PCR, contendo: 67 mM Tris-HCl, pH 8,8, 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 mM MgCl_2 , 67 μ M Na_2EDTA , 16,0 μ g/mL BSA, 10 mM β -mercaptoetanol, 10% DMSO, 200 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M de cada iniciador e 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As amostras de DNA que apresentaram banda de baixa intensidade na eletroforese para verificação da integridade foram processadas da mesma maneira, entretanto, com um volume de 2,8 μ L da suspensão de DNA. A reação em cadeia da polimerase foi processada em termociclador (Mastercycler, Eppendorf), onde foram realizados 30 ciclos de 94°C/45 s, 56°C/1 min e 72°C/1 min, precedidas por um passo de desnaturação inicial a 94°C/10 min e seguidas de um passo de extensão final a 72°C/10 min (adaptado de DODÉ *et al.* 1993). Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose, conforme descrito no item 3.2.10.

3.2.10 Eletroforese dos produtos da PCR

Para visualização dos fragmentos amplificados, alíquotas de 5 μ L do produto da PCR foram misturadas a 5 μ L do tampão da amostra¹⁴, aplicadas em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X e submetidas a uma corrida eletroforética a 100V por aproximadamente 1h 30min. Em cada gel de eletroforese foi aplicado 5 μ L (0,25 μ g/ μ L) do padrão de tamanho molecular “ λ DNA/Hind III Fragments” (Invitrogen), para determinação do tamanho do fragmento amplificado. Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para um recipiente contendo solução de brometo de etídio em uma concentração de 5 μ g/mL de tampão TBE 1X, no qual permaneceu por 30 min, sendo, em seguida, exposto à luz ultravioleta para a

¹² C2: 5' CCATGCTGGCACGTTTCTGA 3'

¹³ C10: 5' GATGCACCCACTGGACTCCT 3'

¹⁴ Tampão de amostra: 40% sacarose; 0,25% azul de bromofenol, em água.

visualização das bandas presentes (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1992). Posteriormente, foi feita a foto documentação do gel.

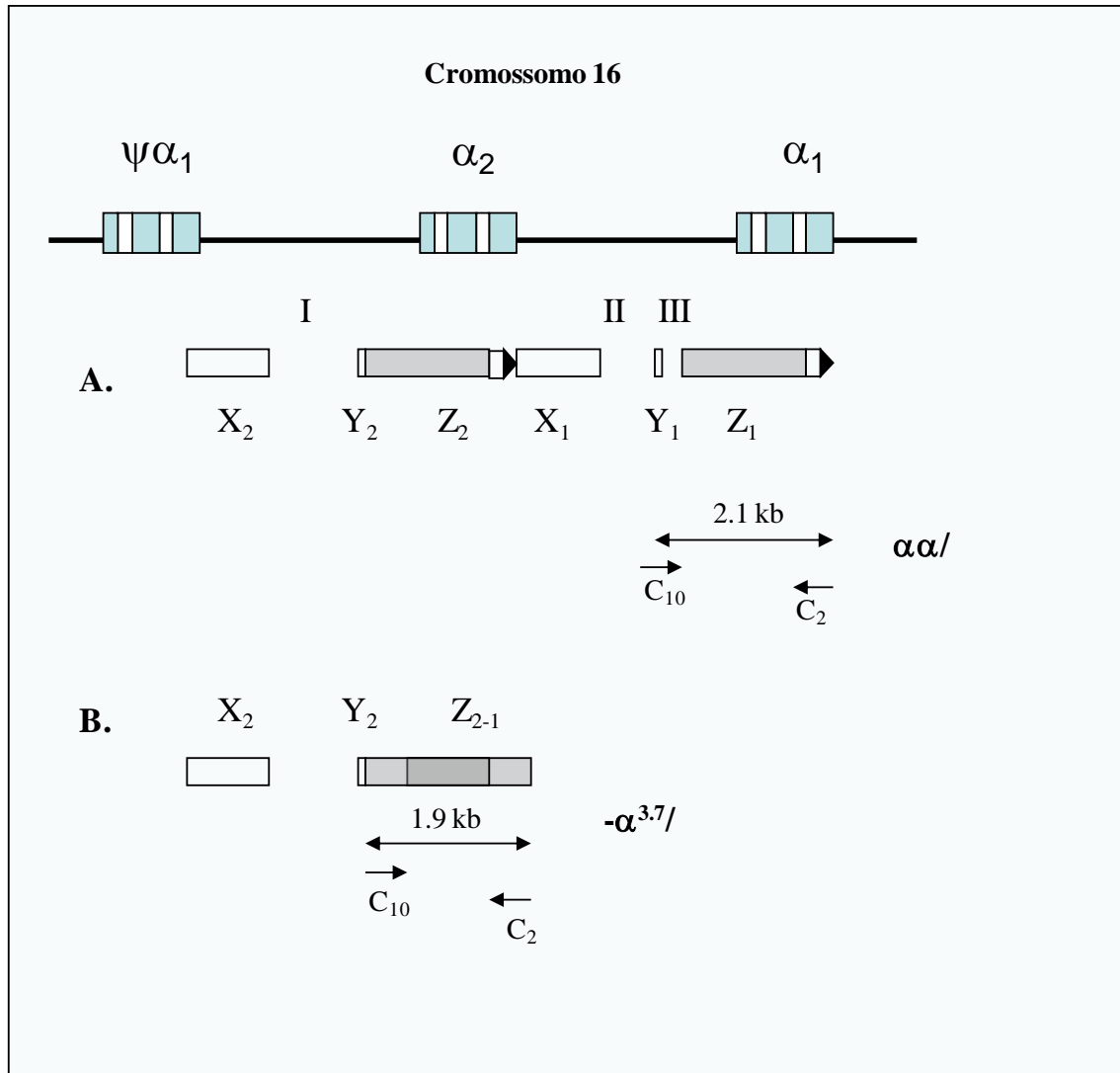


Figura 11 – Localização dos iniciadores C_2 e C_{10} nas regiões homólogas dos genes da globina α . A. Regiões homólogas normais e o fragmento de 2,1 kb resultante do *crossing-over* normal. B. Regiões homólogas com o fragmento de 1,9 kb, referente à deleção $-\alpha^{3.7}$

3.2.11 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software estatístico “*S.P.S.S. for Windows*” versão 10.0. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

Para todas as variáveis foi empregada análise descritiva (média e desvio padrão). A distribuição da normalidade das variáveis quantitativas foi testada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. A homogeneidade das variâncias foi analisada através do teste de Levene.

Para comparar as variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade das variâncias, entre dois grupos, foi utilizado o teste t de Student. Nas variáveis que não tinham homogeneidade das variâncias foi utilizado o teste t de Student para variâncias não homogêneas.

A análise de variância (*One Way ANOVA*), seguida do teste de Tukey, quando necessário, foi empregada nas comparações entre três grupos, obedecendo a distribuição da normalidade e a homogeneidade das variâncias.

Para comparação dos dados entre grupos amostrais pequenos ou que não atenderam aos pressupostos da normalidade e igualdade de variâncias, foram utilizados os testes não-paramétricos de Mann-Whitney, entre dois grupos e o de Kruskal-Wallis, entre três grupos.

4. RESULTADOS

Foram coletadas amostras de 691 indivíduos, não aparentados, dos quais 319 (46,2%) apresentaram microcitose e/ou hipocromia. Destes, 222 (69,6%) eram do sexo feminino e 97 (30,4%), do sexo masculino. A idade dos pacientes variou de 4 a 77 anos (mediana de 15 anos) para o sexo masculino e de 4 a 79 anos (mediana de 32 anos) no sexo feminino. De acordo com o grupo étnico, 86 (27%) eram brancos, 198 (62%) eram pardos e 35 (11%) eram de etnia negra.

As amostras dos 319 indivíduos com microcitose e/ou hipocromia foram submetidas à investigação da deleção $-\alpha^{3.7}$ através da técnica da reação da polimerase em cadeia. Exemplos dos resultados obtidos após eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR investigados para esta deleção podem ser observados na Figura 12. Nos pacientes homozigotos para a deleção obtém-se uma única banda de 1,9 kb; naqueles heterozigotos para a deleção são visualizadas duas bandas, sendo uma de 2,1 e outra, de 1,9 kb. Já nas amostras dos indivíduos normais, ou seja, homozigotos para a ausência da deleção $-\alpha^{3.7}$, observa-se apenas a banda de 2,1 kb. Estas bandas são identificadas utilizando-se um padrão de tamanho molecular, como o “ λ DNA/Hind III Fragments” utilizado neste trabalho, que apresenta bandas de 2,3 e 2,0 kb.

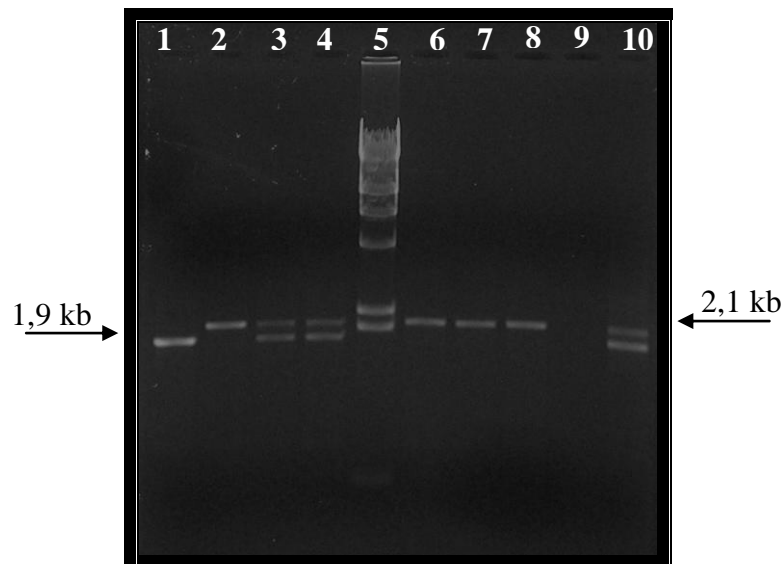


Figura 12 – Identificação dos produtos amplificados para a deleção $-\alpha^{3.7}$. Eletroforese em gel de agarose 0,8% após coloração com brometo de etídeo e visualização em luz UV. A coluna 1 corresponde a amostra homozigota para a deleção ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$); as colunas 3 e 4, amostras heterozigotas ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$); 2, 6, 7 e 8, amostras normais para a deleção ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$); 5 corresponde ao padrão de tamanho molecular (λ DNA/Hind III fragments); 9 corresponde ao branco e 10, ao controle positivo heterozigoto

A talassemia alfa⁺ (deleção $-\alpha^{3.7}$) foi detectada em 105 indivíduos, representando uma prevalência de 32,9%, sendo 93 (29,1%) heterozigotos e 12 (3,8%), homozigotos para a deleção (Tabela 1) (Figura 13). Destes 105 indivíduos, 89 (84,8%) apresentaram microcitose e hipocromia associadas, 3 (2,8%) apresentaram apenas hipocromia e 13 (12,4%), apenas microcitose. A frequência do alelo $-\alpha^{3.7}$ foi de 0,183 (117 em 638 cromossomos).

Tabela 1 – Frequências genótípicas observadas a partir da análise de DNA de 319 indivíduos não aparentados

GENÓTIPO	FREQUÊNCIA	
	N	%
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	214	67,1
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	93	29,1
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	12	3,8
TOTAL	319	100

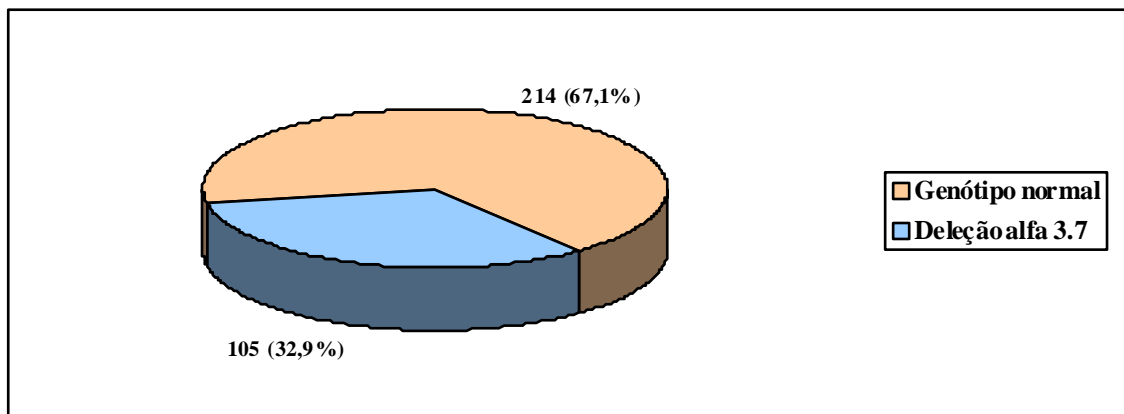


Figura 13 – Distribuição dos 319 pacientes analisados de acordo com a presença ou não da deleção $-\alpha^{3.7}$

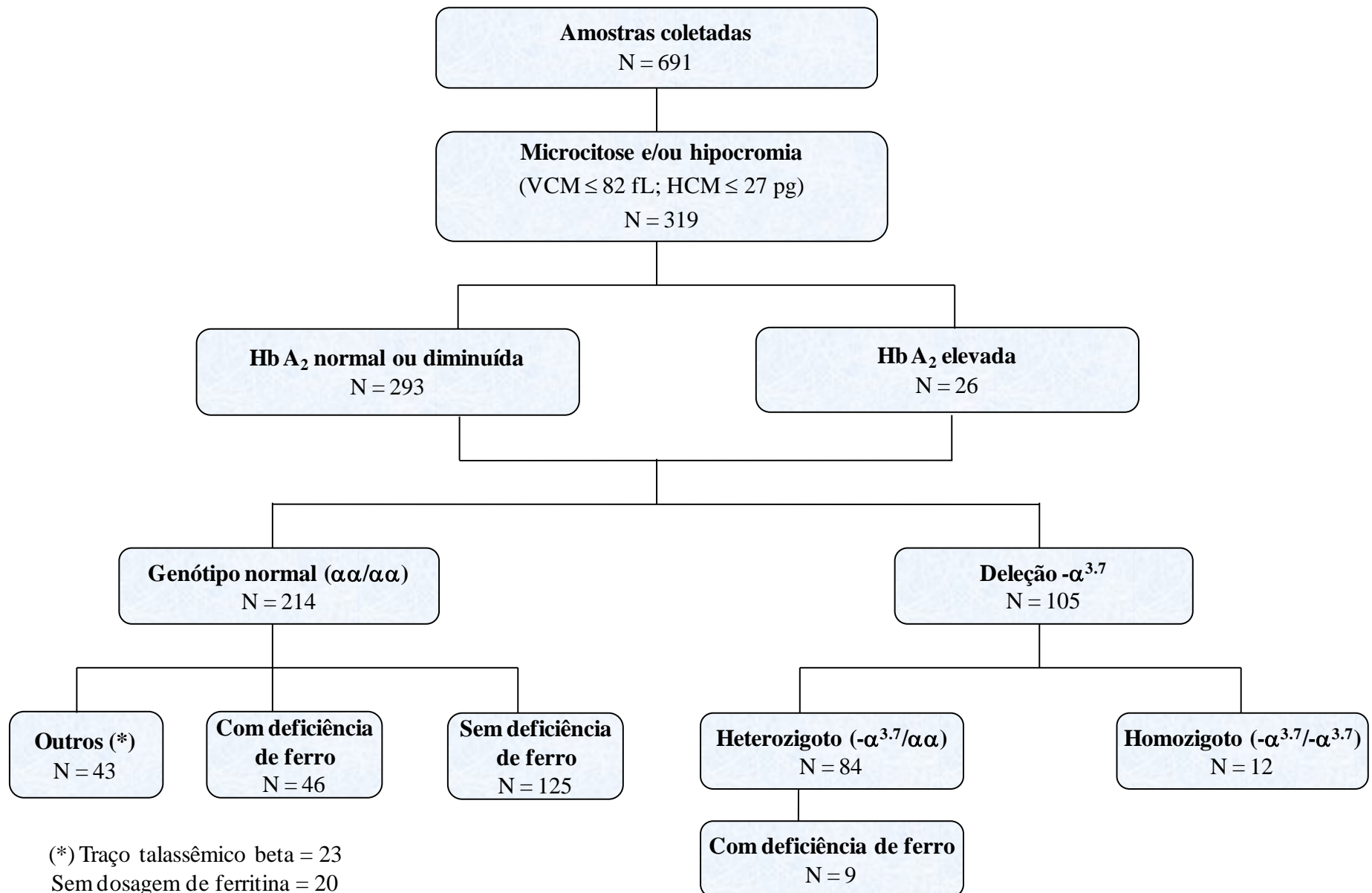


Figura 14 – Organograma da distribuição dos 691 pacientes coletados

Dos 105 pacientes com talassemia alfa, 22 (21,0%) eram do sexo masculino, 62 (59,0%), do sexo feminino e 21 (20,0%) eram crianças (idade inferior a 15 anos).

A distribuição dos genótipos de acordo com a etnia é mostrada na Tabela 2. Entre os 35 indivíduos negros, 15 (42,9%) apresentaram o genótipo $(-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha)$ e 1 (2,8%), o genótipo $(-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7})$. Entre os pardos, 57 (28,8%) eram heterozigotos e 7 (3,5%), homozigotos. Já entre os brancos, 21 (24,4%) tinham a forma heterozigota e 4 (4,7%), a forma homozigota da deleção $-\alpha^{3.7}$.

Tabela 2 - Distribuição dos genótipos entre os 319 pacientes com microcitose e/ou hipocromia de acordo com o grupo étnico

Grupo étnico	Número de amostras analisadas	Genótipos					
		$\alpha\alpha/\alpha\alpha$		$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$		$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	
		n	%	n	%	n	%
Branco	86	61	70,9	21	24,4	4	4,7
Pardo	198	134	67,7	57	28,8	7	3,5
Negro	35	19	54,3	15	42,9	1	2,8
Total	319	214	67,1	93	29,1	12	3,8

A Figura 14 é um organograma dos testes laboratoriais realizados desde a coleta das amostras, de acordo com os critérios utilizados e sumariza a distribuição dos pacientes.

Dos 319 indivíduos com microcitose e/ou hipocromia investigados para a deleção $-\alpha^{3.7}$, 259 (81,2%) apresentaram perfil eletroforético normal (Hb AA) e 60 (18,8%) apresentaram algum outro tipo de hemoglobinopatia, associada ou não à talassemia alfa, assim distribuídos: 28 eram portadores do traço falciforme (Hb AS), 2, portadores do traço AC (Hb AC), 2 eram homozigotos para a hemoglobina C (Hb CC), 2 apresentavam doença falciforme, sendo um paciente SS e outro SC e 26 tinham traço talassêmico beta (Tabela 3).

Tabela 3 – Perfil eletroforético e genótipo alfa dos pacientes investigados para talassemia alfa

Perfil eletroforético	Nº de casos	Genótipo α (%)		
		$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$
AA	259	167 (64,5)	83 (32,0)	9 (3,5)
AS	28	20 (71,4)	5 (17,9)	3 (10,7)
AC	2	2 (100)	-	-
CC	2	2 (100)	-	-
SS	1	-	1 (100)	-
SC	1	-	1 (100)	-
AA/talassemia beta	26	23 (88,5)	3 (11,5)	-
TOTAL	319	214 (67,1)	93 (29,1)	12 (3,8)

Entre os 105 pacientes com talassemia alfa, 10 (9,5%) apresentaram associação da deleção com hemoglobinas variantes, na qual a mais frequente foi a interação com o traço falciforme, encontrada em 8 (7,6%) pacientes, dos quais 3 eram homozigotos ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) e 5 eram heterozigotos ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) para a talassemia alfa. Os dois pacientes diagnosticados com doença falciforme neste trabalho tinham talassemia alfa heterozigota associada. Três pacientes (2,8%) com deleção $-\alpha^{3.7}$ apresentaram associação com o traço talassêmico beta. A talassemia alfa foi encontrada concomitantemente com a deficiência de ferro em 9 (8,6%) pacientes.

Os dados laboratoriais dos 105 pacientes com talassemia alfa encontram-se no Apêndice 5.

A Tabela 4 mostra as médias dos valores dos principais parâmetros hematológicos analisados. Os pacientes foram separados em grupos, levando-se em consideração o genótipo para talassemia alfa⁺ e a presença ou não de heterozigose para as hemoglobinas anormais S e C, de talassemia beta e de deficiência de ferro. Nesta tabela não foi feita separação entre crianças e gênero masculino e feminino.

Tabela 4 – Dados hematológicos dos 282 pacientes agrupados por genótipo alfa

Grupo de pacientes (n)		Dados hematológicos (média ± desvio padrão)				
		Hemoglobina (g/dL)	Hemácias (x10 ¹² /L)	VCM (fL)	HCM (pg)	Hb A ₂ (%)
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ (N=190)*	AA (n = 101)	12,4 ± 1,6	4,65 ± 0,56	79,4 ± 3,5	26,6 ± 1,7	2,5 ± 0,6
	AS (n = 18)	12,5 ± 1,2	4,69 ± 0,43	79,8 ± 2,3	26,7 ± 1,0	2,7 ± 0,4
	AC (n = 2)	12,6 ± 0,4	4,84 ± 0,07	80,0 ± 8,5	26,1 ± 0,3	NR
	Traço talassêmico beta (n = 23)	10,3 ± 1,8	5,19 ± 0,87	64,3 ± 6,0	19,92 ± 2,1	4,9 ± 0,7
	Deficiência de ferro (n = 46)	9,3 ± 2,1	4,26 ± 0,61	69,2 ± 9,1	21,71 ± 3,8	1,9 ± 0,6
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (N=80)**	AA (n = 64)	12,3 ± 1,4	4,89 ± 0,57	77,4 ± 4,4	25,3 ± 2,0	2,2 ± 0,6
	AS (n = 4)	12,3 ± 1,7	4,94 ± 0,71	76,5 ± 1,7	24,9 ± 1,4	2,2 ± 0,7
	Traço talassêmico beta (n = 3)	10,2 ± 0,6	4,91 ± 0,32	68,0 ± 2,6	20,7 ± 1,1	5,3 ± 0,8
	Deficiência de ferro (n = 9)	10,2 ± 2,2	4,60 ± 0,69	67,8 ± 7,6	21,9 ± 3,2	2,1 ± 0,9
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ (N=12)	AA (n = 9)	11,3 ± 1,1	5,28 ± 0,70	68,9 ± 6,9	21,6 ± 2,1	2,1 ± 0,4
	AS (n = 3)	11,1 ± 0,6	5,33 ± 0,26	67,0 ± 2,5	20,9 ± 2,0	2,5 ± 0,4

* Foram excluídos da comparação 20 pacientes sem dosagem de ferritina, 3 pacientes com anemia por doença crônica e 1 paciente CC

** Foram excluídos da comparação 11 pacientes sem dosagem de ferritina e 2 pacientes com doença falciforme (1 SS e 1 SC)

NR = não realizado; Valores de referência encontram-se no Anexo 2

A comparação dos dados hematológicos dos indivíduos Hb AA e Hb AS agrupados por genótipo alfa é mostrada na Tabela 5.

Como não houve diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros hematológicos desses pacientes nos três grupos analisados ($p > 0,05$), eles foram agrupados num mesmo segmento em todas as análises subsequentes.

Tabela 5 – Comparação dos dados hematológicos dos indivíduos AA e AS agrupados por genótipos alfa

Genótipo/ Padrão eletroforético		Dados hematológicos (média \pm DP)				
		Hb (g/dL)	Hemácias ($\times 10^{12}/L$)	VCM (fL)	HCM (pg)	Hb A ₂ (%)
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	AA (n= 101)	12,4 \pm 1,6	4,65 \pm 0,56	79,4 \pm 3,5	26,6 \pm 1,7	2,5 \pm 0,6
	AS (n= 18)	12,5 \pm 1,2	4,69 \pm 0,43	79,8 \pm 2,3	26,7 \pm 1,0	2,7 \pm 0,4
		p = 0,708	p = 0,755	p = 0,629	p = 0,920	p = 0,310
$-\alpha/\alpha\alpha$	AA (n= 64)	12,3 \pm 1,4	4,89 \pm 0,57	77,4 \pm 4,4	25,3 \pm 2,0	2,2 \pm 0,6
	AS (n= 4)	12,3 \pm 1,7	4,94 \pm 0,71	76,5 \pm 1,7	24,9 \pm 1,4	2,2 \pm 0,7
		p ₁ = 0,948	p ₁ = 0,938	p ₁ = 0,479	p ₁ = 0,540	p ₁ = 0,814
$-\alpha/-\alpha$	AA (n= 9)	11,3 \pm 1,1	5,28 \pm 0,70	68,9 \pm 6,9	21,6 \pm 2,1	2,1 \pm 0,4
	AS (n= 3)	11,1 \pm 0,6	5,33 \pm 0,26	67,0 \pm 2,5	20,9 \pm 2,0	2,5 \pm 0,4
		p ₁ = 0,758	p ₁ = 0,849	p ₁ = 0,606	p ₁ = 0,600	p ₁ = 0,170

DP: desvio padrão; p: calculado através do teste *t* de Student; p¹: calculado pelo teste de Mann-Whitney

A Tabela 6 mostra a comparação das análises laboratoriais entre os pacientes com genótipo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), heterozigotos e homozigotos para a deleção $-\alpha^{3.7}$. A fim de verificar a contribuição da talassemia alfa como causa de microcitose e/ou hipocromia, foram excluídos desta comparação aqueles que apresentaram talassemia beta ou deficiência de ferro. Apenas os pacientes AA e AS foram considerados na comparação entre os grupos.

Os valores médios de hemácias e concentração de hemoglobina dos pacientes foram separados de acordo com sexo e idade dos mesmos. Foram consideradas crianças, meninos e meninas com idade igual ou inferior a 14 anos (OMS, 1968).

A análise estatística mostrou haver diferença significativa entre as médias dos três grupos para os parâmetros VCM e HCM, tendo os homozigotos apresentado os menores valores médios dos referidos parâmetros. A microcitose e a hipocromia dos heterozigotos foi discreta em relação aos indivíduos de genótipo normal.

Tabela 6 – Comparação dos resultados das análises laboratoriais entre pacientes com genótipos normal, heterozigoto e homozigoto para a deleção $-\alpha^{3.7}$

Genótipo alfa (n)	Gênero			Dados hematológicos (média ± desvio padrão)								
				Hemoglobina (g/dL)			Hemácias ($\times 10^{12}/L$)			VCM (fL)	HCM (pg)	Hb A ₂ (%)
	M	F	Criança	M	F	Criança	M	F	Criança			
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ (N=119)	17	52	50	14,4 ± 1,6	11,6 ± 1,2	12,5 ± 1,2	5,40 ± 0,56	4,36 ± 0,45	4,71 ± 0,36	79,4 ± 3,3 ^{a*}	26,6 ± 1,6 ^a	2,6 ± 0,5 ^a
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (N=68)	15	39	14	13,7 ± 1,3	12,0 ± 1,3	11,6 ± 0,8	5,47 ± 0,69	4,72 ± 0,46	4,74 ± 0,26	77,4 ± 4,3 ^b	25,3 ± 2,0 ^b	2,2 ± 0,6 ^b
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ (N=12)	3	5	4	11,8 ± 1,4	11,2 ± 1,0	11,4 ± 1,1	5,00 ± 0,70	5,23 ± 0,51	5,69 ± 0,60	68,3 ± 6,0 ^c	21,4 ± 2,0 ^c	2,2 ± 0,4 ^{a,b}
Valores de referência [†]				15,0 ± 2,0	13,5 ± 1,5	13,5 ± 2,0	5,0 ± 0,5	4,3 ± 0,5	4,6 ± 0,6	92 ± 9,0	29,5 ± 2,5	2,4 ± 1,4 ^{††}

M: masculino; F: feminino

* Letras diferentes seguindo os valores de média ± desvio padrão dentro da mesma coluna, representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. $p < 0,05$ (ANOVA, seguida do teste de Tukey, quando necessário). Os valores p resultantes da comparação grupo a grupo encontram-se no Apêndice 6.

† DACIE, J.V., LEWIS, S.M. *Practical Haematology*. 8.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995; †† BEZERRA, T.M.M. Quantificação de hemoglobina A₂ por eletroforese em acetato de celulose. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, v.20, n. 5, p. 143-145, 1984

Na Tabela 7 estão os resultados da comparação dos índices hematimétricos (VCM e HCM) e da Hb A₂ dos pacientes com genótipo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) e heterozigoto para a talassemia alfa⁺ e que apresentaram deficiência de ferro. Observou-se que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) para nenhum dos dados hematológicos analisados.

Os parâmetros hemácias e hemoglobina não foram comparados em virtude de sofrerem influência do sexo e idade e, quando segregados nestes requisitos, apresentaram um número amostral muito pequeno, inviabilizando desta forma a análise estatística.

Tabela 7 - Comparação dos resultados das análises laboratoriais (média \pm DP) entre pacientes normais e heterozigotos para a deleção $-\alpha^{3,7}$, ambos com deficiência de ferro

Achados laboratoriais	Genótipo						Valor p ^(*)
	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ (n = 46)			$-\alpha/\alpha\alpha$ (n = 09)			
	M (n=3)	F (n=37)	Criança (n=6)	M (n=2)	F (n=5)	Criança (n=2)	
Hemácias ($\times 10^{12}/L$)							
Masculino	4,28 \pm 1,21			5,16 \pm 0,02			NR
Feminino	4,18 \pm 0,58			4,48 \pm 0,90			
Criança	4,71 \pm 0,25			4,81 \pm 0,04			
Hb (g/dL)							
Masculino	10,5 \pm 3,7			12,0 \pm 0,0			NR
Feminino	8,9 \pm 1,9			9,7 \pm 2,8			
Criança	11,0 \pm 2,0			10,2 \pm 1,3			
VCM (fL)	69,2 \pm 9,1			67,8 \pm 7,6			0,659
HCM (pg)	21,7 \pm 3,8			21,9 \pm 3,2			0,877
Hb A ₂ (%)	1,9 \pm 0,6			2,1 \pm 0,9			0,275

DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino; NR: não realizado

^(*) Teste *t* de Student

Por outro lado, comparando-se os mesmos índices (VCM e HCM) e a Hb A₂ dos pacientes $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ com deficiência de ferro e os $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ sem deficiência de ferro, verificou-se diferença estatisticamente significativa para esse três parâmetros laboratoriais, mostrando que as médias desses dados hematológicos dos pacientes com deficiência de ferro são significativamente menores que as dos indivíduos que apresentam a deleção $-\alpha^{3.7}$ em sua forma heterozigota (Tabela 8).

De maneira semelhante, não foram comparados os parâmetros hemácias e hemoglobina em razão de não demonstrarem número amostral representativo para a análise estatística.

Tabela 8 - Comparação dos resultados das análises laboratoriais (média \pm DP) entre pacientes normais ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) com deficiência de ferro e pacientes heterozigotos para a talassemia α^+ sem deficiência de ferro

Achados laboratoriais	Genótipo						Valor p ^(*)
	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ (n = 46)			$-\alpha/\alpha\alpha$ (n = 68)			
	M (n=3)	F (n=37)	Criança (n=6)	M (n=15)	F (n=39)	Criança (n=14)	
Hemácias ($\times 10^{12}/L$)							
Masculino	4,28 \pm 1,21			5,50 \pm 0,71			NR
Feminino	4,18 \pm 0,58			4,72 \pm 0,46			
Criança	4,71 \pm 0,25			4,74 \pm 0,26			
Hb (g/dL)							
Masculino	10,5 \pm 3,7			13,9 \pm 1,2			NR
Feminino	8,9 \pm 1,9			12,0 \pm 1,3			
Criança	11,0 \pm 2,0			11,6 \pm 0,8			
VCM (fL)	69,2 \pm 9,1			77,4 \pm 4,3			0,000
HCM (pg)	21,7 \pm 3,8			25,3 \pm 2,0			0,000
Hb A ₂ (%)	1,9 \pm 0,6			2,2 \pm 0,6			0,002

DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino; NR: não realizado

^(*) Teste de Mann-Whitney

As diferenças encontradas entre os grupos analisados (heterozigoto, homozigoto, genótipo normal sem deficiência de ferro e genótipo normal com deficiência de ferro) para os parâmetros mais representativos da talassemia alfa (VCM e HCM) são mostradas através do gráfico *Box-Plot*, nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

De maneira geral, pode-se dizer na análise de um *Box-plot*, que quanto mais larga a caixa e as suas caudas superior e inferior, mais dispersa é a distribuição dos dados. Observando as duas figuras percebe-se que os menores valores medianos, tanto para VCM quanto para HCM, foram encontrados no grupo de pacientes homozigotos para a deleção $-\alpha^{3.7}$ e os maiores valores medianos para esses índices hematimétricos foram observados no grupo de indivíduos normais para esta deleção e que não apresentaram deficiência de ferro.

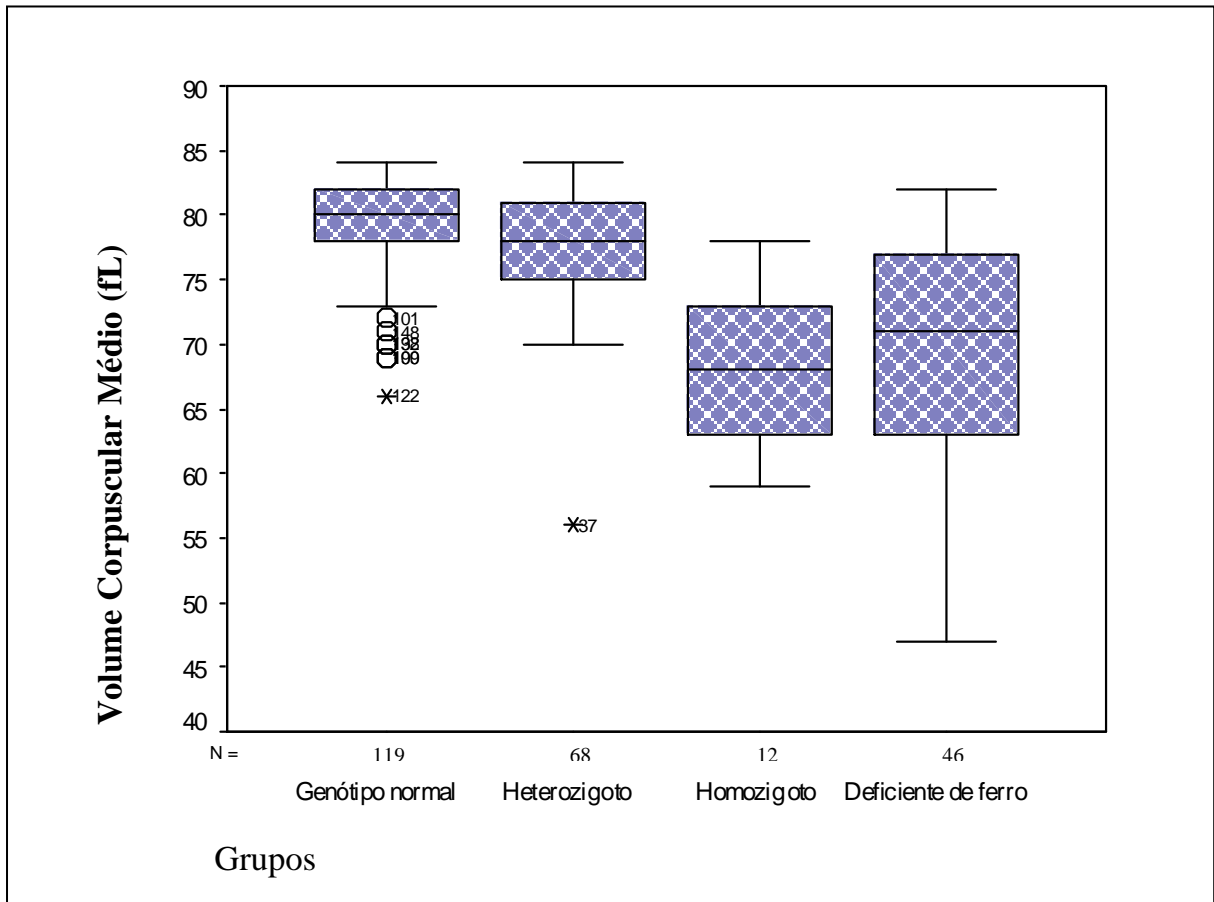


Figura 15 – Box-plot representando as diferenças de VCM encontradas entre os pacientes de genótipo normal sem deficiência de ferro, portadores heterozigotos e homozigotos da talassemia $\alpha^{3.7}$ e os de genótipo normal com deficiência de ferro. No interior de cada retângulo existem 50% dos dados, dos quais, 25% estão entre a linha da mediana e a linha do primeiro quartil e os outros 25% estão entre a linha da mediana e a linha do terceiro quartil. A linha preta no interior da caixa representa a mediana dos valores. Os pontos representados por asteriscos ou círculos correspondem aos valores discrepantes (*outliers*)

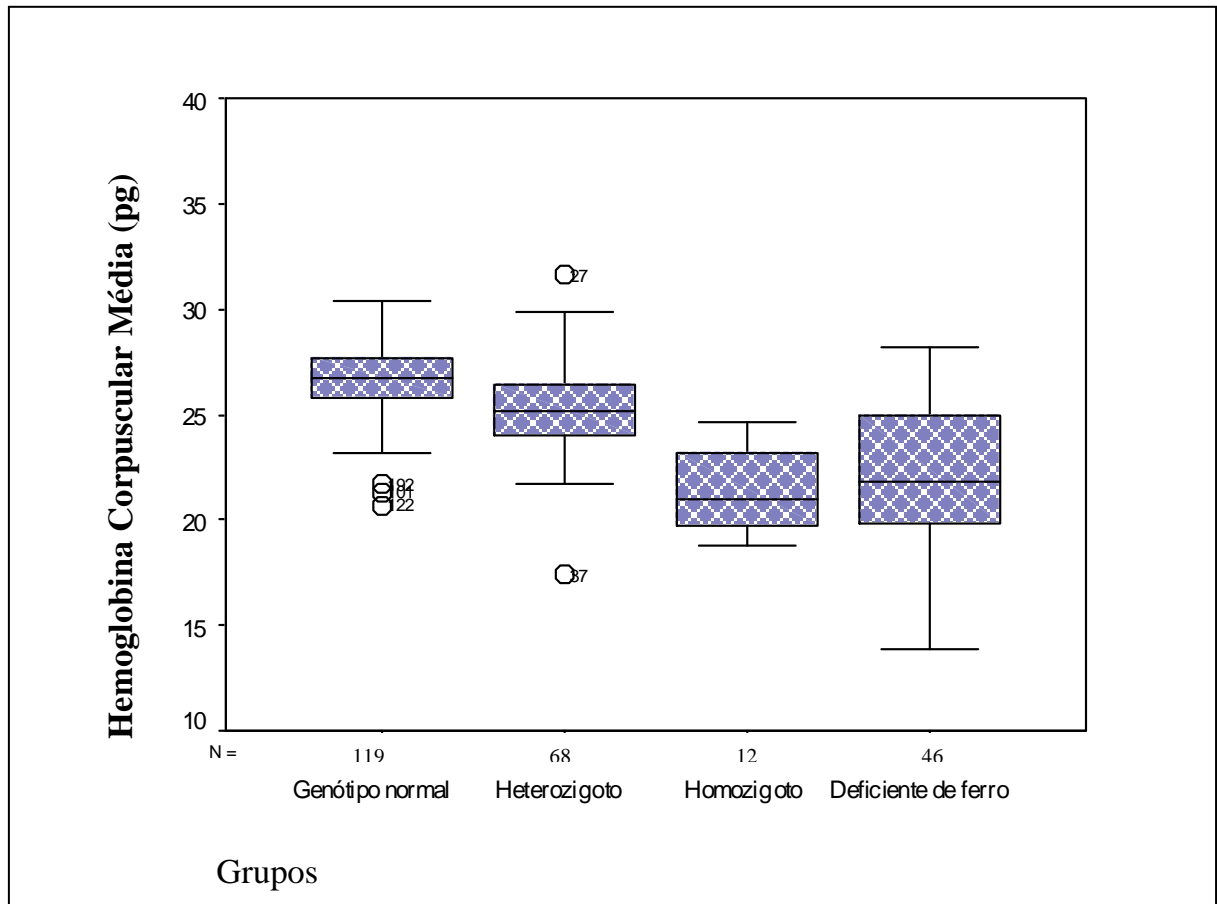


Figura 16 – Box-plot representando as diferenças de HCM encontradas entre os pacientes de genótipo normal sem deficiência de ferro, portadores heterozigotos e homozigotos da talassemia $\alpha^{3.7}$ e os de genótipo normal com deficiência de ferro. No interior de cada retângulo existem 50% dos dados, dos quais, 25% estão entre a linha da mediana e a linha do primeiro quartil e os outros 25% estão entre a linha da mediana e a linha do terceiro quartil. A linha preta no interior da caixa representa a mediana dos valores. Os pontos representados por asteriscos ou círculos correspondem aos valores discrepantes (*outliers*)

5. DISCUSSÃO

A talassemia alfa é uma das doenças monogênicas mais comuns no mundo e é resultante de um desequilíbrio na síntese das cadeias da globina alfa (BAYSAL; HUISMAN, 1994; WEATHERALL *et al.*, 2001). Juntamente com a deficiência de ferro e o traço talassêmico beta, representa uma importante causa de microcitose e hipocromia (DUMARS, *et al.*, 1996).

Apesar de ser frequentemente encontrada nas diferentes regiões e populações mundiais, por vezes, a talassemia alfa permanece sem diagnóstico em virtude de não haver testes bioquímicos e hematológicos simples capazes de identificá-la rotineiramente (SANKAR *et al.*, 2006; SIVERA, *et al.*, 1997). Com o advento das técnicas moleculares, por volta do início dos anos 80, foi possível iniciar a caracterização molecular desta hemoglobinopatia, fornecendo diagnóstico rápido e preciso das diferentes formas da doença (STEINBERG, 1988). Porém, mesmo identificando precisamente as principais causas moleculares da talassemia alfa, esse diagnóstico ainda não é rotina nos laboratórios de análises hematológicas devido ao seu elevado custo.

No Brasil, a ocorrência da talassemia alfa tem sido estudada ao longo dos anos. Entretanto, como as metodologias empregadas em algumas pesquisas não se baseiam na análise de DNA, os dados moleculares e de prevalência ainda são escassos. Os trabalhos utilizando biologia molecular para a investigação da talassemia alfa mostram que a deleção - $\alpha^{3.7}$ é a mais comum, responsável por prevalências que variam de 0,7% em um estudo populacional (SILVA-FILHO *et al.*, 2005) a 48,1% em estudo envolvendo pacientes com microcitose e hipocromia sem anemia (BORGES *et al.*, 2001). Em relação às outras formas moleculares, a deleção - $\alpha^{4.2}$, segunda causa mais comum de talassemia alfa⁺ no mundo, foi investigada em alguns dos trabalhos já realizados no país, porém não foi observada em nenhum deles (ADORNO *et al.*, 2005; BORGES *et al.*, 2001; SILVA-FILHO *et al.*, 2005). Formas não-delecionais da talassemia alfa, bem como as delecionais e aquelas que removem a região reguladora do gene α foram relatadas, com baixa frequência, apenas em estudos realizados na região de Campinas, São Paulo, (BORGES *et al.*, 2001; SONATI *et al.*, 1992; WENNING *et al.*, 2000; 2002).

No presente estudo, observamos a presença da deleção - $\alpha^{3.7}$ em 105 pacientes com microcitose e/ou hipocromia por PCR. A prevalência encontrada para esta deleção foi de

32,9%, sendo a forma heterozigota responsável por 29,1% (93/105) e a homozigota, por 3,8% (12/105) dos casos.

Trabalhos realizados no Brasil (BORGES, *et al.*, 2001), assim como em outros países (BERGERON, *et al.*, 2005; GALANELLO *et al.*, 1998; REYES-NÚÑEZ, *et al.*, 2006; SANKAR, *et al.*, 2006), também mostram a deleção $-\alpha^{3.7}$ como uma importante causa de microcitose e hipocromia.

Bergeron *et al.* (2005) investigando diversas formas moleculares da talassemia alfa em 196 pacientes com microcitose, sem deficiência de ferro, na cidade de Montreal, Canadá, observaram que a deleção $-\alpha^{3.7}$ estava presente em 20,9% dos pacientes. Trabalho realizado por Reyes-Núñez *et al.* (2006) na cidade de Puebla, México, em pacientes com microcitose e/ou hipocromia, sem deficiência de ferro associada, encontrou frequência de 14,5% para esta deleção e Sankar *et al.* (2006) ao investigarem 276 pacientes com microcitose e hipocromia na Índia, observaram frequência de 12,7%.

Em estudo semelhante conduzido em 521 indivíduos provenientes da região da Sardenha, Itália, a frequência da deleção $-\alpha^{3.7}$ foi de 74,0%, sendo o genótipo ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) responsável por 48,5% e o homozigoto ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$), por 25,5% dos casos. (GALANELLO *et al.*, 1998). De modo geral, a talassemia alfa é bastante comum na região banhada pelo mar Mediterrâneo (KATTAMIS *et al.*, 1996; FICHERA, *et al.*, 1997; DI BELLA, *et al.*, 2006). Dessa maneira, há de se considerar que a população estudada por Galanello *et al.*, (1998) está localizada em uma área onde a prevalência das diferentes formas da talassemia alfa, inclusive a deleção $-\alpha^{3.7}$, é bastante elevada, o que justificaria a frequência encontrada pelos autores.

No Brasil, Borges *et al.*, (2001) ao investigarem diferentes formas moleculares de talassemia alfa em pacientes com microcitose e hipocromia, sem anemia, na região Sudeste do Brasil, observaram que a deleção $-\alpha^{3.7}$ foi o principal determinante destas alterações hematológicas, representando uma prevalência de 48,1%. A forma heterozigótica ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) contribuiu com 42,8% e a deleção $-\alpha^{3.7}$ homozigótica, com 5,3%. Em se tratando de estudos realizados no mesmo país, essa prevalência mais elevada encontrada por esses autores pode estar relacionada ao fato de que o grupo amostral por eles estudado foi mais seletivo, isto é, foram incluídos pacientes com microcitose e hipocromia, sem anemia e com concentrações normais ou diminuídas de Hb A₂.

A deleção $-\alpha^{3.7}$ é encontrada com frequência significativa nas populações mundiais de diferentes regiões, especialmente naquelas de origem africana (FLINT *et al.*, 1998; KATTAMIS *et al.*, 1996).

A população do Rio Grande do Norte não teve em sua composição étnica forte influência africana, como ocorreu em outros estados brasileiros, uma vez que não recebeu grandes quantidades de escravos no período da colonização. A capitania do Rio Grande, como era chamada àquela época, não possuía indústria açucareira desenvolvida e suas atividades econômicas limitavam-se à criação de gado e pequenos roçados, fazendo com que a força do trabalho escravo não fosse tão necessária. A sociedade norte-rio-grandense, no entanto, constituiu-se de brancos, indígenas e negros, com os tipos intermediários de mamelucos, caboclos e mulatos. O elemento branco foi sempre o de menor quantidade e o mais prolífero, tendo como principais representantes os portugueses seguidos dos franceses e holandeses (CASCUDO, 1980; SUASSUNA; MARIZ, 1997).

Dados do censo demográfico realizado pelo IBGE (2000), no qual o critério de inclusão em determinado grupo étnico é a autodeclaração, mostram que a população do Rio Grande do Norte é constituída por 1.171.699 indivíduos brancos, 1.454.665 pardos, 126.441 negros, 2.374 amarelos, 3.168 indígenas e 19.161 indivíduos sem cor ou raça declaradas, totalizando 2.777.508 habitantes.

De acordo com a distribuição étnica da amostra estudada, observou-se no presente trabalho que a maior frequência da talassemia alfa⁺ ($-\alpha^{3.7}$) foi encontrada em indivíduos classificados como negros (45,7%), seguida pelos pardos (32,3%) e, brancos (29,1%).

No Brasil, Borges *et al.*, (2001) ao analisarem amostras de 339 indivíduos com microcitose e hipocromia provenientes da região Sudeste do Brasil, verificaram que 69,3% dos negros e 39,4% dos caucasóides investigados apresentavam a deleção $-\alpha^{3.7}$. Sonati *et al.*, (1991) ao estudarem 47 doadores de sangue negros oriundos da mesma região do país, encontraram prevalência de 23,4% para a deleção $-\alpha^{3.7}$. Na Bahia, Adorno *et al.*, (2005) também observaram prevalências elevadas desta deleção entre os grupos de negros, mulatos e brancos.

Além dos indivíduos classificados como negros, outros segmentos étnicos da população brasileira também apresentam alta prevalência da doença. Porém, devido à grande diversidade étnica existente no país, resultante da miscigenação ocorrida entre os indivíduos de origens européia, africana, indígena e asiática, em diferentes proporções dependendo da região e/ou estado, a frequência da talassemia alfa pode variar de região para região ou mesmo entre os estados.

A talassemia alfa também tem sido investigada em amostras populacionais brasileiras distintas, sem que necessariamente seja levada em consideração a presença de microcitose e

hipocromia (Quadro 3). Nesses casos, é esperado que as frequências encontradas sejam menores, uma vez que os critérios de inclusão não se baseiam nas principais alterações laboratoriais causadas pela deleção $-\alpha^{3.7}$. Analisando esses dados já descritos na literatura e os resultados do presente trabalho é possível observar que a talassemia alfa ($-\alpha^{3.7}$) tem elevada prevalência no Brasil.

Autor/Ano	Amostra analisada	N	Método de detecção	% da talassemia alfa ⁽¹⁾
Sonati <i>et al.</i> , (1991)	Doadores de sangue negros do Estado de São Paulo	47	<i>Southern Blot</i>	23,4
Figueiredo <i>et al.</i> , (1996)	Pacientes com anemia falciforme do Estado de São Paulo	85	<i>Southern Blot</i>	18,8
Couto <i>et al.</i> , (2003)	Gestantes com perfil Hb AC e Hb AA de Salvador, BA	106	PCR	22,6
Adorno <i>et al.</i> , (2005)	Sangue de cordão umbilical de recém-nascidos de Salvador, BA	514	PCR	22,2
Silva-Filho <i>et al.</i> , (2005)	Trabalhadores da Fiocruz-RJ	2.190	PCR	0,7
Bezerra <i>et al.</i> , (2007)	Crianças com doença falciforme do Estado de Pernambuco	74	PCR	25,7

Quadro 3 – Síntese de trabalhos realizados no Brasil para investigação molecular da talassemia alfa (deleção $-\alpha^{3.7}$). ⁽¹⁾ Homozigotos e heterozigotos para a deleção $-\alpha^{3.7}$

Comumente, a talassemia alfa ocorre em áreas geográficas onde variantes estruturais da globina beta (hemoglobinas S e C), além da talassemia beta, também são frequentes. Dessa maneira, não é raro que um indivíduo herde os genes para duas destas condições genéticas (BERNINI; HARTEVELD, 1998; WEATHERALL, 2001a).

A co-herança da talassemia alfa⁺ ($-\alpha^{3.7}$) com outras hemoglobinopatias tem sido amplamente investigada em diversas partes do mundo. Relacionada à interação com o traço falciforme, esta já foi evidenciada por Sonati *et al.*, (1991), Adorno *et al.*, (2005) e Silva-Filho *et al.*, (2005) em trabalhos conduzidos no Brasil, González *et al.*, (2005) na Espanha, Nava *et al.*, (2006) no México, Wambua *et al.*, (2006) no Quênia, entre outros. A interação da talassemia alfa⁺ com a anemia falciforme foi observada por Costa *et al.*, (1989), Figueiredo *et al.*, (1996) e Adorno *et al.*, (2005; 2008) no Brasil, Stevens *et al.*, (1986) na Jamaica, Arends *et al.*, (2000) na Venezuela, González *et al.*, (2005) na Espanha, dentre outros. A associação com a hemoglobinopatia SC foi mostrada por Powars *et al.*, (2002) nos Estados Unidos e Lee *et al.*, (1998), ao estudarem pacientes Hb SC provenientes de diversas regiões da África.

No presente trabalho foram observadas associações da talassemia alfa com variantes estruturais da hemoglobina em 9,5% (10/105) dos pacientes com a deleção, sendo a associação com o traço falciforme responsável por 7,6% destes casos, dos quais 5 (4,8%) na forma heterozigota ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) e 3 (2,8%), na homozigota ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$). A coexistência com a anemia falciforme e com a hemoglobinopatia SC contribuiu com 0,95% cada.

Os indivíduos heterozigotos para a hemoglobina S, Hb AS, são normalmente assintomáticos. Por não apresentarem características clínicas evidentes são identificados, em sua maioria, em triagens populacionais ou através de estudo familiar (STEINBERG, 2001). Geralmente, esses indivíduos possuem concentrações normais de hemoglobina, VCM e HCM, porém quando há associação com a talassemia alfa, esses valores se encontram diminuídos (BAIN, 2006). Outra evidência importante da coexistência com a talassemia alfa é a redução na concentração de Hb S (BAIN, 2006; KENNEDY *et al.*, 1986). Deve-se ressaltar que essas alterações hematológicas tornam-se mais evidentes em consequência do número de genes alfa deletados (BAIN, 2006).

Os portadores do traço falciforme que apresentaram associação com a deleção $-\alpha^{3.7}$, no presente estudo, mostraram dados laboratoriais concordantes com esses descritos na literatura. Os heterozigotos para a deleção $\alpha^{3.7}$ apresentaram valores médios de VCM e HCM significativamente menores ($p = 0,042$ e $0,033$, respectivamente) quando comparados aos Hb AS de genótipo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Os homozigotos ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) tiveram os menores valores de VCM e HCM em relação aos demais genótipos (Apêndice 7). Em relação à concentração média de Hb S, esta se distribuiu da seguinte maneira nos três grupos: genótipo normal ($34,1 \pm 4,0\%$), heterozigoto ($28,2 \pm 2,4\%$) e homozigoto ($21,1 \pm 0,8\%$) e houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos de genótipo alfa (Apêndice 7).

Embora nada se possa concluir em relação aos dois pacientes com doença falciforme que apresentaram a deleção $-\alpha^{3.7}$ ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$), alguns estudos mostram que há modificações no fenótipo clínico desses pacientes quando a talassemia alfa⁺ está presente. Porém, as alterações fenotípicas, assim como as laboratoriais, são mais evidentes quando se herda a forma homozigota da talassemia alfa⁺ (EMBURY, 1985; STEINBERG, 1998; BALLAS, 2001).

Além das associações com hemoglobinas anormais, encontrou-se neste trabalho interação da deleção $-\alpha^{3.7}$ com a talassemia beta em 2,8% (3/105) dos casos.

Essa mesma associação já foi descrita por Nava *et al.*, (2006) no México, Sankar *et al.*, (2006) e Panigrahi *et al.*, (2004) na Índia, Lafferty *et al.*, (2007) no Canadá, Wee *et al.*, (2008) na Malásia, dentre outros. No Brasil, de acordo com a literatura consultada, o único relato encontrado diz respeito à triplicação do gene α ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$), alelo $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$, em um paciente com talassemia beta heterozigota (KIMURA *et al.*, 2003).

A deleção de genes alfa é considerada um modulador genético favorável da evolução clínica da talassemia β . Por outro lado, o excesso de cadeias α (triplicação do gene ou quadruplicação) agrava o quadro clínico dos talassêmicos β (SONATI; COSTA, 2008). Em nosso trabalho, os pacientes com a associação dessas duas formas de talassemia, apresentaram microcitose e hipocromia mais brandas, quando comparados aos indivíduos com traço talassêmico β que não tinham interação com a deleção.

As alterações hematológicas causadas pela deleção $-\alpha^{3.7}$ podem variar de moderadas a, praticamente, inexistentes (HIGGS; BOWDEN, 2001; KATTAMIS *et al.*, 1996; WEATHERALL *et al.*, 2001).

Com o intuito de analisar a contribuição da talassemia α como causa de microcitose e/ou hipocromia, foram excluídos da comparação os dados laboratoriais dos pacientes que apresentaram quaisquer uma das outras prováveis causas de microcitose e/ou hipocromia investigadas no trabalho, a saber, deficiência de ferro, traço talassêmico beta e homozigose para hemoglobinas variantes.

Os resultados das comparações feitas entre os indivíduos que apresentaram a deleção $-\alpha^{3.7}$, separados por genótipo heterozigoto e homozigoto, e o grupo de indivíduos com genótipo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) que havia sido estratificado como sem deficiência de ferro revelaram haver diferença estatisticamente significativa entre as médias amostrais dos parâmetros VCM e HCM entre todos os grupos (Apêndice 6). Como esperado, os indivíduos homozigotos foram os que apresentaram os menores valores médios destes índices hematológicos. Para a Hb A₂, as menores médias foram vistas nos pacientes com a deleção -

$\alpha^{3.7}$ ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$), porém a significância estatística só foi observada entre o grupo normal e o heterozigoto (Apêndice 6).

Em estudo semelhante realizado em pacientes com microcitose (VCM < 80fL) na cidade de Montreal, Canadá, também foi observado que o grupo de homozigotos apresentava os menores valores médios de VCM e HCM. Apesar de estes valores terem apresentado diferença estatisticamente significativa em relação aos demais genótipos, não foi observada diferença estatística entre os grupos de genótipo normal e heterozigoto (BERGERON *et al.*, 2005).

Os resultados aqui obtidos demonstram que a talassemia alfa é uma importante causa de microcitose e/ou hipocromia também em nossa população. Porém, apesar de ter sido observada diferença entre as médias dos índices hematimétricos VCM e HCM nos três grupos de genótipo alfa, a sobreposição dos valores entre indivíduos de genótipo normal e heterozigoto, mostra uma vez mais que estes parâmetros são de pouco valor na distinção entre os genótipos, enfatizando a necessidade do diagnóstico molecular para elucidação segura dos casos de microcitose e/ou hipocromia com dosagem de Hb A₂ normal e sem deficiência de ferro. Pelo fato de a amostra total estudada ter sido composta por homens, mulheres e crianças, a melhor referência de valores hematológicos a ser considerada é a de homens adultos.

No presente trabalho foram encontrados 9 pacientes que apresentavam talassemia alfa e deficiência de ferro associada, o que representa um percentual de 8,6% do total de indivíduos com a deleção $-\alpha^{3.7}$. Entre esses pacientes e os que tinham deficiência de ferro com genótipo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) não houve diferença estatística para os parâmetros hematológicos analisados, VCM ($p=0,659$) e HCM ($p=0,877$), o que sugere que a talassemia alfa não contribui de forma significativa na microcitose e hipocromia desses pacientes.

A observância dessa associação é um dado interessante, uma vez que os trabalhos relatados na literatura geralmente utilizam a deficiência de ferro como critério de exclusão (BERGERON, *et al.*, 2005; BORGES *et al.*, 2001; GALANELLO *et al.*, 1998; REPAPINO *et al.*, 2007; REYES-NÚÑEZ, *et al.*, 2006; SIVERA *et al.*, 1997). No levantamento bibliográfico realizado, foram poucos os trabalhos encontrados que investigaram talassemia α em indivíduos com microcitose e/ou hipocromia e deficiência de ferro associada (LAFFERTY, *et al.*, 2007; MACH-PASCUAL *et al.*, 1996; SANKAR *et al.*, 2006). Sankar *et al.*, (2006) na Índia, observaram que apenas 1 dos 35 indivíduos analisados apresentou a deleção $-\alpha^{3.7}$ em associação com a deficiência de ferro, o que representa uma frequência de

2,8% em relação aos indivíduos portadores da deleção $-\alpha^{3.7}$. Por outro lado, Lafferty *et al.*, (2007) em Ontário, no Canadá e Mach-Pascual *et al.*, (1996) em Geneva, na Suíça, ao investigarem as causas de microcitose em pacientes com suspeita de hemoglobinopatias, encontraram que 20,7% (75/362) e 21,0% (49/233), respectivamente, dos pacientes com talassemia (alfa ou beta) apresentavam deficiência de ferro associada. Esses resultados, juntamente com o observado em nosso trabalho, mostram que não se deve descartar a possibilidade de talassemia alfa em indivíduos com deficiência de ferro, uma vez que estas podem estar associadas.

Ao compararmos o grupo de indivíduos com genótipo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) que apresentava deficiência de ferro, com os heterozigotos ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) sem deficiência de ferro, observamos diferença estatística significativa para VCM ($p=0,000$) e HCM ($p=0,000$), mostrando que a deficiência de ferro provoca alterações hematológicas mais pronunciadas. Porém, esse achado não é suficiente para diferenciar essas duas doenças, uma vez que estas condições clínicas podem coexistir.

De uma maneira geral, embora a metodologia utilizada no presente trabalho tenha identificado as causas da microcitose e/ou hipocromia de mais da metade dos pacientes, é importante enfatizar que aqueles que não foram portadores da deleção $-\alpha^{3.7}$ nem apresentaram deficiência de ferro ou talassemia beta, não podem ser relatados, com segurança, como não portadores de talassemia alfa, uma vez que somente foi pesquisada a forma molecular mais frequente, não sendo descartada, pois, a possível existência das outras formas deletoriais ou mesmo, das não-deletoriais da talassemia alfa.

Embora os indivíduos com as formas mais brandas da talassemia alfa sejam clinicamente normais e não necessitem de tratamento, é extremamente importante reconhecer a condição de portador para elucidar a etiologia da microcitose e/ou hipocromia e garantir que o paciente não receberá tratamento inapropriado com ferro que pode, a longo prazo, ser danoso ao organismo.

Mesmo que a análise molecular ainda seja uma técnica onerosa para a maioria dos laboratórios, ela deve ser realizada naqueles indivíduos com microcitose e/ou hipocromia a esclarecer, quando descartada a presença de talassemia beta ou deficiência de ferro. Contudo, deve-se lembrar que essas condições podem ocorrer concomitantemente.

Como se tratou de uma população previamente selecionada com base na microcitose e/ou hipocromia, que são sabidamente conhecidas como alterações causadas pela talassemia alfa, os dados de frequência não se aplicam à população geral.

Esse foi o primeiro estudo sobre caracterização molecular da talassemia alfa no Estado do Rio Grande do Norte e os dados encontrados atestam a importância da identificação dessa hemoglobinopatia em nosso meio, bem como de sua interação com as variantes estruturais da hemoglobina e com a talassemia beta.

6. CONCLUSÕES

- A prevalência da talassemia alfa ($-\alpha^{3.7}$) nos pacientes com microcitose e/ou hipocromia foi de 32,9%, sendo a forma heterozigota responsável por 29,1% e a homozigota, por 3,8%;
- A associação da talassemia alfa com outras hemoglobinopatias foi observada em 12,3% dos indivíduos com a deleção $-\alpha^{3.7}$, sendo 7,6% associada ao traço falciforme, 1,9%, à doença falciforme e 2,8%, à talassemia beta, mostrando a coexistência dessas doenças da hemoglobina em nossa população;
- Em relação aos genótipos alfa, os pacientes homozigotos foram os que apresentaram microcitose e hipocromia mais pronunciada;
- Embora os valores de VCM e HCM dos pacientes heterozigotos para a deleção $-\alpha^{3.7}$ e dos pacientes com genótipo normal que tinham deficiência de ferro tenham apresentado diferença estatisticamente significativa, isso não foi suficiente para diferenciar essas duas doenças, uma vez que estas condições clínicas podem coexistir;
- Apesar de ter sido observada diferença entre as médias dos índices hematimétricos VCM e HCM nos três grupos de genótipo alfa, a sobreposição dos valores entre indivíduos de genótipo normal e heterozigoto, corrobora que estes parâmetros são de pouco valor na distinção entre os genótipos, comprovando uma vez mais a necessidade do diagnóstico molecular;
- Em relação aos pacientes Hb AS, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os valores médios da concentração de Hb S nos três grupos de genótipo alfa, sendo a média de Hb S nos pacientes com genótipo α normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) de 34,1%, nos heterozigotos ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) de 28,2% e nos homozigotos ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$), de 21,1%.
- Os resultados obtidos mostram a importância da investigação molecular da talassemia alfa em nossa população, uma vez que esta representa uma importante causa de microcitose e/ou hipocromia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADORNO, E. V.; COUTO, F. D.; MOURA NETO, J. P.; MENEZES, J. F.; RÊGO, M.; REIS, M. G.; SOUZA GONÇALVES, M. Hemoglobinopatias em recém-nascidos de Salvador, Bahia, Nordeste do Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 21, n. 1, p. 292-298, 2005.

ADORNO, E. V., ZANETTE, A., LYRA, I., SEIXAS, M. O., REIS, M. G., GONÇALVES, M. S. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. *Genet. Mol. Biol.*, v. 31, n. 3, p.621-625, 2008.

ARAÚJO, M. C. P. E., SERAFIM, E. S. S., CASTRO Jr., W. A. P., MEDEIROS, T. M. D. Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 20, n. 1, p. 109-118, 2004.

ARENDS, A.; ALVAREZ, M.; VELÁZQUEZ, D.; BRAVO, M.; SALAZAR, R.; GUEVARA, J. M.; CASTILLO, O. Determination of beta-globin gene cluster haplotypes and prevalence of alpha-thalassemia in sickle cell anemia patients in Venezuela. *Am. J. Hematol.*, v. 64, n. 2, p. 87-90, 2000.

BAIN, B. J. Haemoglobinopathy diagnosis. 2. ed. Blackwell Publishing, Oxford, 2006.

BALLAS, S. K. Effect of α -globin genotype on the pathophysiology of sickle cell disease. *Pediatr. Pathol. Mol. Med.*, v. 20, p. 107-121, 2001.

BANDEIRA, F. M. G. C., BEZERRA, M. A. C., SANTOS, M. N. N., GOMES, Y. M., ARAÚJO, A. S., ABATH, F. G. C. Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina S. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2007.

BARTLETT, R. C. Rapid cellulose acetate electrophoresis. *Clin. Chem.*, v. 9, n. 3, p. 325-329, 1963.

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.

BERGERON, J., WENG, X., ROBIN, L., OLNEY, H. J., SOULIÈRES, D. Prevalence of alpha-globin gene deletions among patients with unexplained microcytosis in a North-American population. *Hemoglobin*, v. 29, n. 1, p. 51-60, 2005.

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

BETKE, K.; MARTI, H. R.; SCHLICHT, I. Estimation of small percentages of Foetal haemoglobin. *Nature*, v. 184, p. 1877-1878, 1959.

BEUTLER, E. Disorders of hemoglobin structure: sickle cell anemia and related abnormalities. In: LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, V.; KAVSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T (Ed.). *Williams Hematology*, 7.ed. McGraw-Hill Medical, New York, 2006. p. 667-700.

BEZERRA, M. A. C.; SANTOS, M. N. N.; ARAÚJO, A. S.; GOMES, Y. M.; ABATH, F. G. C.; BANDEIRA, F. M. G. C. Molecular variations linked to the grouping of beta and alpha globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. *Hemoglobin*, v. 31, p. 1-6, 2007.

BEZERRA, T. M. M. Quantificação de hemoglobina A₂ por eletroforese em acetato de celulose. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, v. 20, n. 5, p. 143-145, 1984.

BEZERRA, T. M. M., ALBUQUERQUE, L. M. M., LIMA, A. A. B., ANDRADE, S. R. Prevalência de hemoglobinas anormais em Natal, Rio Grande do Norte. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v. 23, n. 3, p. 73-76, 1991.

BORGES, E.; WENNING, M. R. S. C.; KIMURA, E. M.; GERVÁSIO, S. A.; COSTA, F. F.; SONATI, M. F. High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 34, n. 6, p. 759-762, 2001.

CAO, A., GALANELLO, R., ROSATELLI, M. C. Genotype-phenotype correlations in beta-thalassemias. *Blood Reviews*, v. 8, n. 1, p. 1-12, 1994.

CASCUDO, L. C. *História da cidade do Natal*. 2. ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1980.

CHUI, D. H. K; WAYE, J. S. Hydrops fetalis caused by alpha-thalassemia: an emerging care health problem. *Blood*. v. 91, n. 7, p. 2213-2222, 1998.

CLARK, B. E.; THEIN, S. L. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin. Lab. Haem.*, v. 26, p. 159-176, 2004.

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

COSTA, F. F., TAVELLA, M. H., ZAGO, M. A. Deletion type α -thalassemia among Brazilian patients with sickle cell anemia. *Rev. Bras. Genet.*, v. 12, n. 3, p. 605-611, 1989.

COUTO, F. D.; ALBUQUERQUE, A. B. L.; ADORNO, E. V.; MOURA NETO, J. P.; FREITAS ABBEHUSENLF, L.; OLIVEIRA, J. L. B.; REIS, M. G.; SOUZA GONÇALVES, M. Alpha-thalassemia 2, 3.7 Kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: a molecular and hematological analysis. *Clin. Lab. Haematol.*, v. 25, p. 29-34, 2003.

DACIE, J. V., LEWIS, S. M. *Practical Haematology*. 8.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.

DI BELLA, C., SALPIETRO, C., LA ROSA, M., CUPPARI, C., PIRAINO, B., CUTRI, M. R., RIGOLI, L. 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.

DODÉ, C.; KRISHNAMOORTHY, R.; LAMB, J.; ROCHETTE, J. Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. *Br. J. Haematol.*, v. 83, p.105-111, 1993.

DUMARS, K. W., BOEHM, C., ECKMAN, J. R., GIARDINA, P. J., LANE, P. A., SHAFER, F. E. Practical guide to the diagnosis of thalassemia. *Am. J. Med. Genet.*, v. 62, n. 1, p. 29-37, 1996.

EMBURY, S. H. The interaction of coexistent alpha-thalassemia and sickle cell anemia: A model for the clinical and cellular results of diminished polymerization? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 445, p. 37-44, 1985.

FICHERA, M., SPALLETTA, A., FIORENZA, F., LOMBARDO, T., SCHILIRÒ, G., TAMOUZA, R., LAPOUMÉROULIE, C., LABIE, D., RAGUSA, A. Molecular basis of alpha thalassemia in Sicily. *Hum. Genet.*, v. 99, n. 3, p. 381-386, 1997.

FIGUEIREDO, M. S., KERBAUY, J., GONÇALVES, M. S., ARRUDA, V. R., SAAD, S. T., SONATI, M. F., STOMING, T., COSTA, F. F. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *Am. J. Hematol.*, v. 53, n. 2, p. 72-76, 1996.

FLINT, J., HARDING, R. M., BOYCE, A. J., CLEGG, J. B. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillière's Clin. Haematol.*, v. 11, n. 1, p. 1-51, 1998.

FOGLIETTA, E; DEIDDA, G.; GRAZIANI, B; MODIANO, G.; BIANCO, I. Detection of alpha-globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica*, v. 81, n. 5, p. 387-396, 1996.

FORGET, B. G. Molecular Genetics of the Human Globin Genes. In: STEINBERG, M. H.; FORGET, B. G.; HIGGS, D. R.; NAGEL, R. L. (Ed.) *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management*. Cambridge University Press, 2001. p. 117-130.

FORGET, B. G.; COHEN, A. R. Thalassemia Syndromes. In: HOFFMAN, R.; Jr., E. J. B.; SHATTIL, S. J.; FURIE, B.; COHEN, H. J.; SILBERSTEIN, L. E.; McGLAVE, P. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 4th. ed. Livingstone: Elsevier Churchill, 2005.p. 557-589.

FORGET, B. G.; PEARSON, H. A. Hemoglobin Synthesis and the Thalassemias. In: HANDIN, R. I.; LUX, S. E.; STOSSEL, T. P. *Blood: principles and practice of hematology*. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1995. p. 1525-1578.

GALANELLO, R.; SOLLAINO, C.; PAGLIETTI, E.; BARELLA, S.; PERRA, C.; DONEDDU, I.; PIRRONI, M. G.; MACCIONI, L.; CAO, A. α -thalassemia carrier identification by DNA analysis in the screening for thalassemia. *Am. J. Hematol.*, v. 59, p. 273-278, 1998.

GARRICK, D.; DE GOBBI, M.; LYNCH, M.; HIGGS, D. R. Switching genes on and off in haemopoiesis. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 36, p. 613-618, 2008.

GOH, S. H.; LEE, Y. T.; BHANU, N. V.; CAM, M. C.; DESPER, R.; MARTIN, B. M.; MOHARRAM, R.; GHERMAN, R. B.; MILLER, J. L. A newly discovered human alpha-globin gene. *Blood*, v. 106, p. 1466-1472, 2005.

GONZÁLEZ, F. A., BLÁZQUEZ, C., ROPERÓ, P., BRICEÑO, O., ALAEZ, C., POLO, M., BENAVENTE, C., MATEO, M., PEÑA, A., VILLEGAS, A. Association of hemoglobinopathy and alpha thalassemia. Study of 45 patients. *Med. Clin.*, v. 124, n. 19, p. 726-729, 2005.

GROSVELD, F.; DILLON, N.; HIGGS, D. The regulation of human globin gene expression. *Baillière's Clin. Haematol.*, v. 6, n. 1. p. 31-55, 1993.

HIGGS, D. R. α -thalassemia. *Baillière's Clin. Haematol.* v. 6, n. 1, p. 117-150, 1993.

HIGGS, D. R.; BOWDEN, D. K. Clinical and Laboratory Features of α -Thalassemia Syndromes. In: STEINBERG, M. H.; FORGET, B. G.; HIGGS, D. R.; NAGEL, R. L. (Ed.) *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management*. Cambridge University Press, 2001. p. 431-469.

HIGGS, D. R., GARRICK, D., ANGUITA, E., DE GOBBI, M., HUGHES, J., MUERS, M., VERNIMMEN, D., LOWER, K., LAW, M., ARGENTARO, A., DEVILLE, M. A., GIBBONS, R. Understanding alpha-globin gene regulation: Aiming to improve the management of thalassemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1054, p. 92-102, 2005.

HIGGS, D. R.; PRESSLEY, L.; SERJEANT, G. R.; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J. The genetics and molecular basis of alpha thalassaemia in association with Hb S in Jamaican Negroes. *Br. J. Haematol.*, v. 47, n. 1, p. 43-56, 1981.

HIGGS, D. R., VICKERS, M. A., WILKIE, A. O. M., PRETORIUS, I. M., JARMAN, A. P., WEATHERALL, D. J. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood*, v. 73, n. 5, p. 1081-1104, 1989.

HIGGS, D. R.; WEATHERALL, D. J. The alpha thalassaemias. *Cell. Mol. Life Sci.*, p. 1-9, 2008 (in press).

HIGGS, D. R.; WOOD, W. G. Long-range regulation of alpha globin gene expression during erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.*, v. 15, p. 176-183, 2008.

HUISMAN, T. H. J., CARVER, M. F. H., EFREMOV, G. D. *A Syllabus of Human Hemoglobin Variants*. The Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, 1996.

JOHNSON, C. S.; TEGOS, C.; BEUTLER, E. Alpha-Thalassemia: prevalence and hematologic findings in American Blacks. *Arch. Intern. Med.*, v. 142, n. 7, p. 1280-1282, 1982.

KATTAMIS, A. C., CAMASCHELLA, C., SIVERA, P., SURREY, S., FORTINA, P. Human α -thalassemia syndromes: detection of molecular defects. *Am. J. Hematol.*, v. 53, p. 81-91, 1996.

KENNEDY, A. P., WALSH, D. A., NICHOLSON, R., ADAMS, J. G., STEINBERG, M. H. Influence of HbS levels upon the hematological and clinical characteristics of sickle cell trait. *Am. J. Hematol.*, v. 22, p. 51-54, 1986.

KIMURA, E. M., GRIGNOLI, C. R. E., PINHEIRO, V. R. P., COSTA, F. F., SONATI, M. F. Thalassemia intermedia as a result of heterozygosity for β^0 -thalassemia and $\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}/\alpha\alpha$ genotype in a Brazilian patient. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 36, n. 6, p. 699-701, 2003.

LEE, K., PRÉHU, C., MÉRAULT, G., KÉCLARD, L., ROUDOT-THORAVALL, F., BACHIR, D., WAJCMAN, H., DENIS, L., GALACTÉROS, F. Genetic and hematological studies in a group of 114 adult patients with SC sickle cell disease. *Am. J. Hematol.*, v. 59, n. 1, p. 15-21, 1998.

LAFFERTY, J. D.; BARTH, D. S.; SHERIDAN, B. L.; MCFARLANE, A. G.; HALCHUK, L. M.; CROWTHER, M. A.; Prevalence of Thalassemia in Patients With Microcytosis Referred for Hemoglobinopathy Investigation in Ontario: A Prospective Cohort Study. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 127, n. 2, p. 192-196, 2007.

LISOT, C. L. A., SILLA, L. M. R. Triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil: prevalência em área de colonização italiana. *Cad. Saúde Pública*, v. 20, n. 6, p. 1595-1601, 2004.

LUZ, J. A.; SANS, M.; KIMURA, E. M.; ALBUQUERQUE, D. M.; SONATI, M. F.; COSTA, F. F. Alpha-thalassemia, HbS, and beta-globin gene cluster haplotypes in two Afro-Uruguayan sub-populations from northern and southern Uruguay. *Genet. Mol. Bio.* v. 29, n. 4, p. 595-600, 2006.

MACH-PASCUAL, S.; DARBELLAY, R.; PILOTTO, P. A.; BERIS, P. Investigation of microcytosis: a comprehensive approach. *Eur. J. Haematol.* v. 57, n. 1, p. 54-61, 1996.

MAGALHÃES, E.; ARASHIRO, D. N. Um método simples para visualização da hemoglobina S em testes de solubilidade. *Rev. Bras. Patol. Clín.*, v. 13, n. 3, p. 133-134, 1977.

McKENZIE, S. B. *Textbook of Hematology*. 2nd. ed. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 31-53, 1996.

MEDEIROS, T. M. D., ABREU, A., ALBUQUERQUE, L. M. M., LINS, M. R. S. Hemoglobinas anormais e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em Natal, RN. *Rev. Bras. Pat. Clin.*, v. 28, n. 2, p. 43-47, 1992.

MELO-REIS, P. R.; NAOUM, P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; DIAS-PENNA, K. G. B.; MESQUITA, M. M.; BALESTRA, F. A.; TERNES, Y. M. F.; MASCARENHAS, C. C.; CHEN, L. C. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes no estado de Goiás, Brasil. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 42, n. 6, p. 425-430, 2006.

MIGLIACCIO, A. R.; PAPAYANNOPOULOU, T. Erythropoiesis. In: STEINBERG, M. H.; FORGET, B. G.; HIGGS, D. R.; NAGEL, R. L. (Ed.) *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management*. Cambridge University Press, 2001. p. 52-71.

NAGEL, R. L., STEINBERG, M. H. Hemoglobin SC disease and Hb C disorders. In: STEINBERG, M. H.; FORGET, B. G.; HIGGS, D. R.; NAGEL, R. L. (Ed.) *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management*. Cambridge University Press, 2001. p. 756-785.

NAOUM, P. C. *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: Sarvier, 1997.

NAVA, M. P., IBARRA, B., MAGAÑA, M. T., DE LA LUZ CHÁVEZ, M., PEREA, F. J. Prevalence of -alpha(3.7) and alpha alpha alpha(anti3.7) alleles in sickle cell trait and beta-thalassemia patients in Mexico. *Blood Cells Mol. Dis.*, v. 36, n. 2, p. 255-258, 2006.

NOGUERA, N. I.; BRAGÓS, I. M.; MILANI, A. C. Prevalence of -alpha3.7-thalassemia in Argentina. *Hemoglobin*. v. 26, n. 1, p. 103-106, 2002.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. *Anemias nutricionales*. Ginebra. 1968 (Série de informes técnicos, n° 405).

ORLANDO, G. M., NAOUM, P. C., SIQUEIRA, F. A. M., BONINI-DOMINGOS, C. R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 22, n. 2., p. 111-121, 2000.

PANIGRAHI, I., RAFEEG, P. H., CHOUDHRY, V. P., SAXENA, R. High frequency of deletional alpha-thalassemia in beta-thalassemia trait: implications for genetic counseling. *Am. J. Hematol.*, v. 76, n. 3, p. 297-299, 2004.

POWARS, D. R., HITI, A., RAMICONE, E., JOHNSON, C., CHAN, L. Outcome in hemoglobin SC disease: a four-decade observational study of clinical, hematologic, and genetic factors. *Am. J. Hematol.*, v. 70, n. 3, p. 206-215, 2002.

RAMALHO, A. S., GIRALDI, T., MAGNA, L. A. Estudo genético-epidemiológico da hemoglobina S em uma população do Sudeste do Brasil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 30, n. 2, p. 89-94, 2008.

REPAPINO, Z.; KARABABA, P. H.; BOUSSIOU, M.; KAFARAKIS, V.; PAPADAKI, H. A.; MAVROUDIS, D.; ELIOPOULOS, G. D.; LOUTRADI-ANAGNOSTOU, A. An improved method for the diagnostic approach of α^+ -thalassemia. *Int. J. Lab. Hematol.*, v. 29, p. 45-51, 2007.

REYES-NUNEZ, V., GARCES-EISELE, J.; JORGE, S.; KIMURA, E.; COSTA, F. F.; SONATI, M. F.; RUIZ-REYES, G. Molecular characterization of alpha-thalassemia in the Mexican population. *Rev. Invest. Clin.*, v. 58, n. 3, p. 234-236, 2006.

RUND, D.; RACHMILEWITZ, E. Pathophysiology of α - and β - Thalassemia: Therapeutic Implications. *Semin. Hematol.* v. 38, p. 343-349, 2001.

SÁENZ, G. F.; ALTAFULLA, M.; SANCHO, G.; SALGADO, M. Abnormal hemoglobins and thalassemias in Costa Rica, other countries of Central America, and Panama. *Bull. Pan. Am. Health Organ.* v. 22, n. 1, p. 42-59, 1988.

SAMBROOK J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.

SANKAR, V. H.; ARYA, V.; TEWARI, D.; GUPTA, U. R.; PRADHAN, M.; AGARWAL, S. Genotyping of alpha-thalassemia in microcytic hypochromic anemia patients from North India. *J. Appl. Genet.* v. 47, n. 4, p. 391-395, 2006.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, v. 112, n. 10, p. 3927-3938, 2008.

SCHRIER, S. L. Thalassemia: Pathophysiology of Red Cell Changes. *Annu. Rev. Med.*, v. 45, p. 211-218, 1994.

SEIXAS, F. A. V., SILVA, C. D., TOMINAGA, J., FERRO, O. C., NILSON, L. G. Incidence of hemoglobinopathies in Northwest Paraná, Brazil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 30, n. 4, p. 287-291, 2008.

SILVA-FILHO, I. L., GONÇALVES, M. S., ADORNO, E. V., CAMPOS, D. P., FLEURY, M. K. Triagem de hemoglobinopatias e avaliação da degeneração oxidativa da hemoglobina em trabalhadores portadores do traço falciforme (Hb AS), expostos a riscos ocupacionais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 27, n. 3., p. 183-187, 2005.

SIVERA, P.; ROETTO, A.; MAZZA, U.; CAMASCHELLA, C. Feasibility of molecular diagnosis of α -thalassemia in the evaluation of microcytosis. *Haematologica*, v. 82, p. 592-593, 1997.

SONATI, M. F., COSTA, F. F. Genética das doenças hematológicas: as hemoglobinopatias hereditárias. *J. Pediatr.*, v. 84, n. 4, p. S40-S51, 2008.

SONATI, M. F.; FARAH, S. B.; RAMALHO, A. S.; COSTA, F. F. High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin*, v. 15, p.309-311, 1991.

SONATI, M. F., KIMURA, E. M., GROTTTO, H. Z. W., TAVELLA, M. H., COSTA, F. F. HbH disease associated with the (--(MED)) deletion in a Brazilian black woman. *Acta Haematologica*, v. 87, n. 3, p. 145-147, 1992.

STAMATOYANNOPOULOS, G.; GROSVELD, F. Hemoglobin Switching. In: STAMATOYANNOPOULOS, G.; MAJERUS, P. W.; PERLMUTTER, R. M.; VARMUS, H. *The Molecular Basis of Blood Diseases*. 3rd. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001. p. 135-182.

STEINBERG, M. H. Review: Thalassemia: Molecular pathology and management. *Am. J. Med. Sci.*, v. 296, n. 5, p. 308-321, 1988.

STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. *Baillière's Clin. Haematol.* v. 11, n. 1, p. 163-184, 1998.

STEINBERG, M. H. Sickle cell trait. In: STEINBERG, M. H.; FORGET, B. G.; HIGGS, D. R.; NAGEL, R. L. (Ed.) *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management*. Cambridge University Press, 2001. p. 811-830.

STEINBERG, M. H.; BENZ, E. J.; Jr., H. A. A.; EBERT, A. Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. In: HOFFMAN, R.; Jr., E. J. B.; SHATTIL, S. J.; FURIE, B.; COHEN, H. J.; SILBERSTEIN, L. E.; McGLAVE, P. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 4th. ed. Livingstone: Elsevier Churchill, 2005. p. 442-454.

STEVENS, M. C. G., MAUDE, G. H., BECKFORD, M. et al., α -thalassemia and the hematology of homozygous sickle cell disease in childhood. *Blood*, v. 67, n. 2, p. 411-414, 1986.

SUASSUNA, L. E. B., MARIZ, M. S. *História do Rio Grande do Norte Colonial (1597-1822)*: Natal: Natal Editora, 1997.

THEIN, S. L., Genetic modifiers of beta-thalassemia. *Haematologica*, v. 90, n. 5, p. 649-660, 2005.

WAGNER, S. C.; SILVESTRI, M. C.; BITTAR, C. M.; FRIEDRISCH, J. R.; SILLA, L. M. R. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes com anemia não ferropênica. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 27, n. 1, p. 37-42, 2005.

WAMBUA, S., MWACHARO, J., UYOGA, S., MACHARIA, A. WILLIAMS, T. N. Co-inheritance of alpha⁺-thalassaemia and sickle trait results in specific effects on haematological parameters. *Br. J. Haematol.*, v. 133, n. 2, p. 206-209, 2006.

WANG, W.; MA, E. S.; CHAN, A. Y.; PRIOR, J.; ERBER, W. N.; CHAN, L. C.; CHUI, D. H.; CHONG, S. S. Single-tube multiplex-PCR screen for anti-3.7 and anti-4.2 alpha-globin gene triplications. *Clin. Chem.*, v. 49, n. 10, p. 1679-1682, 2003.

WEATHERALL, D.J. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat. Rev. Genet.*, v. 2, p. 245-255, 2001a.

WEATHERALL, D. J. The Thalassemias. In: STAMATOYANNOPOULOS, G.; MAJERUS, P. W.; PERLMUTTER, R. M.; VARMUS, H. *The Molecular Basis of Blood Diseases*. 3rd. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001b. p. 183-226.

WEATHERALL, D. J., Disorders of globin synthesis: The thalassemias. In: LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, V.; KAVSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T (Ed.). *Williams Hematology*, 7.ed. McGraw-Hill Medical, New York, 2006. p. 633-666.

WEATHERALL, D. J., CLEGG, J. B. Genetic disorders of hemoglobin. *Semin. Hematol.*, v. 36, n. 4, p. 24-37, 1999.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull. World Health Organ.*, v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.

WEATHERALL, D. J., CLEGG, J. B., HIGGS, D. R., WOOD, W. G. The Hemoglobinopathies. In: SCRIVER, C. R. et al. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8.ed. New York: McGraw-Hill, 2001.vol. 3. p. 4571-4636.

WEATHERALL, D. J; PROVAN, A. B. Red cell I: inherited anaemias. *Lancet*, v. 355, p. 1169-1175, 2000.

WEE, Y. C., TAN, K. L., KULDIP, K., TAI, K. S., GEORGE, E., TAN, P. C., CHIA, P., SUBRAMANIAM, R., YAP, S. F., TAN, J. A. M. A. Alpha-thalassaemia in association with beta-thalassaemia patients in Malaysia: A study on the co-inheritance of both disorders. *Community Genet.*, v. 11, p. 129-134, 2008.

WENNING, M. R. S. C.; HARTEVELD, C. L.; GIORDANO, P. C.; KIMURA, E. M.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F.; SONATI, M. F. Hemoglobin H disease resulting from the association of the – alpha 3.7 rightward deletion and the (alpha alpha)MM deletion in a Brazilian patient. *Eur. J. Haematol.*, v. 69, n. 3, p.179-181, 2002.

WENNING, M. R. S. C., KIMURA, E. M., COSTA, F. F., SAAD, S. T. O., GERVÁSIO, S., de JORGE, S. B. et al . alpha-Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 33, n. 9, p. 1041-1045, 2000.

<http://www.octc.kctcs.edu> Acesso em: 20/02/2008.

<http://globin.cse.psu.edu> Acesso em: 24/01/2009.

APÊNDICE 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROJETO DE PESQUISA:

Diagnóstico molecular da talassemia alfa em indivíduos portadores de microcitose e hipocromia

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

Nº: _____

Data: _____

NOME: _____ Nº registro _____

ENDEREÇO: _____ Tel.: _____

D. NASC: _____ SEXO: _____ NATURALIDADE: _____

GRUPO ÉTNICO: () BRANCO () PARDO () NEGRO

MÉDICO: _____

MEDICAMENTO(S) EM USO: _____

JÁ FEZ TRANSFUSÃO SANGÜÍNEA: () Sim () Não QUANDO? _____

TEM (ou teve) ANEMIA: () Sim () Não Fez tratamento: () Sim () Não

Faz uso de algum medicamento nos últimos 12 meses: () Sim () Não Medicamento: _____

Observações: _____
_____**EXAMES LABORATORIAIS**

Hto: _____ % VCM: _____ fL RDW: ____%

Hb: _____ g/dL HCM: _____ pg

Hcias: _____ x10¹²/L CHCM: _____ g/dL

Morfologia eritrocitária: _____

Ferritina sérica: _____

Eletroforese de hemoglobina: (pH alcalino):

Hb A: _____ % Hb A₂: _____ %

Hb Fetal: _____ %

Obs.: _____

Análise molecular: _____

APÊNDICE 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA TALASSEMIA ALFA EM INDIVÍDUOS COM MICROCITOSE E/OU HIPOCROMIA

Responsável pela Pesquisa: Tereza Maria Dantas de Medeiros

O (a) Sr(a) está sendo convidado(a) a participar, voluntariamente, de uma pesquisa que visa estudar uma doença chamada Talassemia alfa que é transmitida de pai para filho. Essa doença ocorre devido a um defeito no gene que forma a hemoglobina do nosso sangue e por isso causa anemia. A anemia da talassemia alfa é muito parecida com a anemia causada por deficiência de ferro, por isso é importante a sua identificação a fim de orientar o médico para um tratamento correto. Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, sem ônus ou pagamento pela participação, e você pode desistir a qualquer momento de participar solicitando ao responsável pela pesquisa que destrua a sua amostra e os dados obtidos da análise da mesma. Solicitamos ainda a permissão para estocar no laboratório o DNA (molécula onde está armazenada a informação genética) extraído de seu sangue para usá-lo em estudos de outros genes que causam anemia. Nenhum novo estudo será realizado sem antes ter a sua autorização e ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN.

Nesse estudo, uma pequena porção de seu sangue deverá ser coletada e analisada no Laboratório de Hematologia localizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFRN. Para este fim, será necessário a coleta de 10 mL de sangue por punção venosa (dobra do braço) utilizando seringa e agulha descartável para que sejam feitos alguns exames tais como: eritrograma, eletroforese de hemoglobina, dosagem de hemoglobina A₂ e Fetal, dosagem de ferritina sérica. Na amostra de sangue também será realizada a extração de DNA (molécula onde está armazenada a informação genética) para analisar as alterações do gene alfa (causador da doença). Após a realização dos exames laboratoriais as amostras de sangue serão descartadas de acordo com as normas de biossegurança.

A coleta de seu sangue será feita por um profissional habilitado através de uma punção venosa na dobra do braço após assepsia local, de modo semelhante a um exame de sangue convencional, não havendo risco para a sua integridade ou saúde por esse procedimento. No entanto, pode ocorrer raramente o surgimento de um pequeno hematoma no local da punção o qual desaparecerá em poucos dias. Esse estudo permitirá a identificação de portadores de talassemia alfa proporcionando esclarecimento sobre esse tipo de hemoglobinopatia principalmente no que diz respeito à presença de anemia a fim de orientar melhor o tratamento.

Os dados de registro de sua participação nesse estudo serão mantidos confidenciais. Eles serão guardados e somente os pesquisadores envolvidos na pesquisa terão acesso aos dados, sendo vetado a divulgação dos dados que permitam sua identificação. Cada pessoa participante do projeto terá acesso aos resultados de seus exames, se assim o desejar, em qualquer momento da realização da pesquisa ou mesmo após a conclusão da mesma. Cada participante do projeto receberá um número secreto de identificação para ser utilizado na pesquisa o que garantirá o anonimato do participante no projeto. Qualquer relatório ou publicação resultante deste trabalho a sua identificação não será revelada.

Você não receberá nenhum pagamento por participar dessa pesquisa, mas poderá ser ressarcido de gastos ou indenizado caso ocorram danos comprovados, oriundos da mesma.

Você pode fazer qualquer pergunta sobre o projeto antes de dar o seu consentimento e, se depois surgir alguma dúvida, você pode contatar a responsável pelo projeto Dra. Tereza Maria Dantas de Medeiros no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFRN (tel: 3215-4231) para esclarecimentos.

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO

DECLARO que o responsável pela pesquisa informou os riscos e benefícios da minha participação no estudo e que após ter lido e compreendido as informações deste documento, estou disposto a participar de livre e espontânea vontade do estudo, sabendo que posso desistir da participação a qualquer momento, sem que minha desistência implique em qualquer prejuízo à minha pessoa. Concedo também o uso das informações obtidas no estudo para utilização em ensino e divulgação nos jornais e/ ou revistas científicas, desde que seja mantido o sigilo sobre meu nome e identificação.

Natal, ____/____/____

NOME PACIENTE _____

(ou responsável legal)

ASSINATURA _____

TESTEMUNHA _____

(assinatura)

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Declaro que expliquei ao participante todos os procedimentos necessários para a realização do referido estudo. Comprometo-me a cumprir o que foi acordado com o mesmo sobre os riscos e benefícios da pesquisa, de acordo com as normas estabelecidas na Resolução 196/96-CNS, procurando manter a integridade e o bem estar dos indivíduos participantes da pesquisa.

Assinatura do pesquisador responsável

APÊNDICE 3

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DISCIPLINA HEMATOLOGIA CLÍNICA

PROJETO DE PESQUISA: Diagnóstico molecular da talassemia alfa em indivíduos com microcitose e hipocromia

RESULTADO DOS EXAMES LABORATORIAIS

NOME: _____ **Nº Reg.** _____

Tipo do exame	Resultado	Valores de referência
Eletroforese de hemoglobina (pH alcalino)	_____ Hb A = _____	Hb AA Hb A = 96 a 98 %
Dosagem Hb A ₂ (Eletroforese alcalina com eluição)	_____	1,0 a 3,8 %
Dosagem Hb Fetal (Método de Betke)	_____	0,0 a 1,0%

Natal, ____/____/____

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DISCIPLINA HEMATOLOGIA CLÍNICA

PROJETO DE PESQUISA: Diagnóstico molecular da talassemia alfa em indivíduos com microcitose e hipocromia

RESULTADO DOS EXAMES LABORATORIAIS

NOME: _____ **Nº Reg.** _____

Tipo do exame	Resultado	Valores de referência
Eletroforese de hemoglobina	_____	Hb AA

Obs: _____

Natal, ____/____/____

APÊNDICE 4

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DISCIPLINA HEMATOLOGIA CLÍNICA

PROJETO DE PESQUISA: Diagnóstico molecular da talassemia alfa em indivíduos com microcitose e hipocromia

RESULTADO DOS EXAMES LABORATORIAIS

NOME: _____ Reg. _____

Tipo do exame:

Eritrograma:

	Resultado	Valores de Referência
Hematócrito		Homem: 40 - 52% Mulher: 36 - 47%
Hemoglobina		Homem: 13,0 - 18 g/dL Mulher: 12 a 15 g/dL
Hemácias		Homem: 4,4 - 5,9 x10 ¹² /L Mulher: 4,0 - 5,4 x10 ¹² /L
VCM.....		80 - 94 fL
HCM.....		26 - 32 pg
CHCM		32 - 36g/dL
RDW		11,5 - 14,5 %

Tipo do exame

Resultado

Valores de referência

Ferritina sérica

(Método quimioluminescente)

Homem: 28 - 397 ng/mL

Mulher: 6 - 159 ng/mL

Eletroforese de hemoglobina

(pH alcalino)

Hb AA

Hb A = 96 a 98 %

Dosagem Hb A₂

(Eletroforese alcalina com eluição)

1,0 a 3,8 %

Dosagem Hb Fetal

(Método de Betke)

0,0 a 1,0%

Análise molecular para talassemia alfa: Investigada a deleção - $\alpha^{3.7}$ por PCR:

RESULTADO:

Natal, ___/___/___

APÊNDICE 5

Tabela 1 – Dados laboratoriais dos 105 pacientes que apresentaram talassemia alfa

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Hcias (x10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	Perfil eletroforético	Hb A ₂ (%)	Hb F (%)	Ferritina (ng/mL)	Genótipo
3	51	F	4,49	11,3	77	25,2	AA	2,5	0,1	152,0	-α/αα
4	11	F	4,29	10,6	75	24,8	AA	2,5	0,4	54,2	-α/αα
12	23	F	4,60	11,6	78	25,2	AA	3,1	0,4	240,0	-α/αα
16	77	M	4,67	12,8	82	27,5	AA	2,2	0,1	111,0	-α/αα
18	11	F	4,81	9,7	68	20,1	AA	2,4	0,3	130,0	-α/-α
19	51	F	4,10	9,9	78	24,0	AA	1,1	0,2	109,0	-α/αα
21	36	F	4,91	12,3	77	25,0	AA	2,6	0,4	29,1	-α/αα
25	55	F	4,58	12,3	82	26,9	AA	2,2	0	93,1	-α/αα
27	9	M	4,78	11,1	69	23,3	AA	3,2	0,3	6,5	-α/αα
33	5	F	4,89	11,8	74	24,0	AA	3,0	0,3	31,4	-α/αα
36	40	F	4,39	10,6	74	24,2	AA	2,1	0,6	837,0	-α/-α
38	10	M	4,83	9,3	62	19,0	AA	2,6	0,3	3,9	-α/αα
41	28	F	4,37	11,9	82	27,1	AA	2,4	0,6	17,8	-α/αα
42	37	F	4,72	12,1	80	25,6	AA	2,0	0,5	283,0	-α/αα
53	31	F	4,92	12,1	74	24,7	AA	2,1	0,6	36,6	-α/αα
57	33	F	4,51	12,0	76	26,6	AA	2,8	0,9	1,9	-α/αα
60	28	F	4,23	10,6	74	25,0	AA	2,8	0,4	< 1,5	-α/αα
64	7	F	4,35	10,9	73	25,2	AA	2,4	0,2	36,4	-α/αα
68	30	F	4,63	12,3	78	26,6	AA	2,2	0,4	303,0	-α/αα
74	60	M	5,67	13,3	72	23,4	AA	2,2	0,2	86,4	-α/-α
76	8	F	4,62	11,4	74	24,6	AA	2,3	0,2	28,7	-α/αα
80	35	M	5,41	14,1	78	26,0	AA	2,9	0,2	NR	-α/αα
81	20	F	4,27	11,5	80	26,9	AA	3,1	0,2	NR	-α/αα
82	34	M	3,51	9,6	82	27,5	SS	2,6	10,7	434,0	-α/αα
83	50	M	4,28	10,5	78	24,6	AA	1,2	0,2	419,0	-α/-α
84	15	F	4,21	13,3	82	31,6	AA	0,8	0,1	47,5	-α/αα
85	76	M	5,17	12,0	74	23,2	AS	2,0	0,2	8,8	-α/αα
87	44	F	4,52	12,7	81	28,0	AA	2,6	0,2	241,0	-α/αα
89	40	F	4,62	12,7	81	27,4	AA	2,5	0,0	20,1	-α/αα
90	18	F	4,24	11,1	77	26,3	AA	0,8	0,0	21,0	-α/αα
91	17	M	5,32	14,5	80	27,3	AA	1,6	0,0	NR	-α/αα
92	46	F	4,03	8,2	63	20,2	AA	0,4	0,0	4,1	-α/αα
96	25	F	5,29	12,8	76	24,1	AA	2,5	0,1	5,5	-α/αα
100	20	F	3,90	10,7	79	27,6	AA	2,4	0,1	51,3	-α/αα
107	4	M	6,11	11,8	59	19,2	AA	2,2	0,2	25,9	-α/-α
115	6	F	4,72	11,3	71	23,9	AA	2,7	0,1	80,7	-α/αα
122	39	F	5,35	9,6	57	17,9	AA	1,4	0,4	3,2	-α/αα
123	42	F	4,78	12,0	71	25,1	AA	2,2	0,5	48,3	-α/αα
124	52	F	4,56	11,8	74	25,8	AA	1,9	0,5	NR	-α/αα
126	28	F	3,34	9,1	77	27,3	AA	2,4	0,4	NR	-α/αα
128	34	F	4,92	12,4	74	25,3	AA	2,1	0,3	14,2	-α/αα
137	15	F	4,03	12,1	82	29,9	AA	2,8	0,0	81,5	-α/αα
144	10	M	4,63	11,8	78	25,6	AA	2,7	0,4	50,1	-α/αα
150	27	M	5,87	15,1	80	25,8	AA	1,4	0,2	122,0	-α/αα
152	42	F	4,99	11,8	75	23,6	AA	2,6	0,0	31,3	-α/αα
155	28	F	5,57	10,5	67	18,8	AS	2,7	0,5	134,0	-α/-α
156	23	F	4,73	11,4	77	24,1	AA	2,3	0,5	126,0	-α/αα
158	24	M	5,97	14,5	75	24,3	AS	2,2	0,2	459,0	-α/αα
159	6	M	5,15	12,6	73	24,4	AA	1,0	0,8	87,5	-α/αα
160	7	M	5,31	12,2	70	22,9	AA	2,2	0,4	NR	-α/αα
161	59	F	5,00	13,5	80	27,0	AA	1,8	0,5	165,0	-α/αα
169	61	F	4,57	9,6	67	21,0	AA	4,6	0,5	335,0	-α/αα

NR: Não realizado; Valores de Referência (Ver ANEXO 2)

Tabela 1 – continuação

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Hcias (x10 ¹² /L)	Hb (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	Perfil eletroforético	Hb A ₂ (%)	Hb F (%)	Ferritina (ng/mL)	Genótipo
171	8	M	4,80	11,0	72	22,9	AA	2,8	0,2	58,5	-α/αα
172	29	F	3,94	10,5	82	26,6	AA	2,6	0,1	184,0	-α/αα
174	25	M	6,06	14,6	78	24,1	AA	2,8	0,0	57,4	-α/αα
176	35	F	5,13	11,1	70	21,7	AA	2,6	0,2	11,4	-α/αα
179	30	M	6,52	15,2	75	23,3	AA	2,4	0,2	88,4	-α/αα
180	46	F	4,74	11,4	76	23,9	AS	3,1	0,1	194,0	-α/αα
181	76	F	4,89	12,9	81	26,5	AA	1,9	0,1	98,2	-α/αα
182	31	M	5,51	14,3	80	26,0	AA	2,4	0,3	175,0	-α/αα
185	72	M	5,68	14,2	82	24,9	AA	0,9	0,5	94,3	-α/αα
193	48	F	5,73	14,2	79	24,9	AA	2,0	0,8	105,0	-α/αα
196	15	M	5,06	11,6	69	22,9	AS	2,1	0,5	223,0	-α/-α
197	56	F	5,37	11,2	64	20,9	AS	2,8	0,5	243,0	-α/-α
198	40	M	4,09	11,1	81	27,1	AA	2,3	0,2	687,0	-α/αα
199	27	F	4,67	12,7	82	27,3	AA	2,2	0,5	35,7	-α/αα
204	32	F	5,29	13,5	82	25,5	AA	2,5	0,4	17,6	-α/αα
205	37	M	5,88	15,3	84	26,0	AA	2,2	0,4	202,0	-α/αα
207	50	M	5,61	15,1	82	26,9	AA	2,1	0,1	112,0	-α/αα
209	39	F	5,70	9,4	57	16,6	AA	1,7	0,2	NR	-α/αα
211	26	F	5,72	13,6	76	23,8	AA	2,5	0,3	35,2	-α/αα
217	26	F	5,54	14,3	75	25,8	AA	2,6	0,6	33,7	-α/αα
222	51	F	4,95	10,8	71	21,7	AA	5,2	0,4	278,0	-α/αα
232	40	F	5,56	11,0	62	19,8	AA	2,8	0,2	1.087,0	-α/-α
239	49	F	4,88	12,4	79	25,5	AA	2,1	0,5	218,0	-α/αα
247	57	M	5,21	13,7	83	26,3	AA	1,8	0,2	199,0	-α/αα
250	21	F	4,34	10,6	79	24,3	AS	2,1	0,6	42,7	-α/αα
251	49	F	4,80	11,2	76	23,4	AA	2,0	0,5	145,0	-α/αα
253	63	F	5,09	13,0	77	25,5	AA	2,0	0,1	NR	-α/αα
260	7	F	4,73	11,3	77	23,9	AA	2,4	0,9	16,0	-α/αα
263	20	F	4,58	12,2	86	26,7	SC		0,9	56,9	-α/αα
267	26	M	4,96	12,6	81	25,5	AA	2,2	0,6	199,0	-α/αα
270	25	F	4,79	10,9	73	22,7	AA	2,4	0,5	17,2	-α/αα
281	31	M	5,38	14,1	82	26,2	AA	2,2	0,4	122,0	-α/αα
282	7	M	4,55	10,8	74	23,7	AA	2,7	0,6	64,6	-α/αα
285	11	F	4,66	11,1	79	23,9	AA	2,0	0,2	25,2	-α/αα
293	28	F	4,01	9,6	76	23,9	AA	2,0	0,3	66,7	-α/αα
295	40	F	4,86	12,7	81	26,1	AA	1,6	0,5	40,2	-α/αα
304	40	F	4,70	12,7	76	27,0	AS	1,4	0,5	10,5	-α/αα
305	7	F	5,20	13,4	74	25,7	AA	0,4	0,0	53,4	-α/αα
308	76	F	4,39	11,9	77	27,2	AA	1,4	0,7	30,9	-α/αα
309	16	F	3,21	5,8	59	18,0	AA	1,5	1,3	1,5	-α/αα
311	8	F	4,73	11,9	79	25,2	AA	2,2	0,4	19,5	-α/αα
314	32	M	6,45	14,3	75	22,2	AA	2,5	0,5	475,0	-α/αα
317	6	M	5,00	12,5	75	24,9	AA	2,8	1,0	94,4	-α/αα
318	12	M	5,86	12,3	68	21,1	AA	1,9	0,5	36,8	-α/-α
324	44	F	4,84	10,9	77	22,6	AA	2,2	0,3	162,0	-α/-α
325	49	F	4,69	12,3	78	26,1	AA	2,4	0,6	647,0	-α/αα
326	38	F	4,81	8,4	56	17,4	AA	2,0	1,0	75,4	-α/αα
327	41	F	4,49	11,1	76	24,8	AA	2,4	0,8	NR	-α/αα
328	46	F	5,24	13,7	78	26,1	AA	2,4	0,6	NR	-α/αα
330	38	F	4,63	11,4	77	24,6	AA	2,7	0,4	NR	-α/αα
331	4	F	5,99	11,7	62	19,6	AA	2,1	0,7	26,5	-α/-α
334	16	F	5,21	10,2	66	19,5	AA	6,1	0,6	42,0	-α/αα
346	60	M	5,14	12,0	75	23,4	AA	1,3	0,2	21,9	-α/αα

NR: Não realizado; Valores de Referência (Ver ANEXO 2)

APÊNDICE 6

Comparação dos resultados das análises laboratoriais entre os pacientes de genótipo normal (Grupo I), genótipo heterozigoto (Grupo II) e genótipo homozigoto para a deleção $-\alpha^{3.7}$ (Grupo III)

Parâmetro analisado	Valor p ^(*)		
	Grupo I (n=119) x Grupo II (n=68)	Grupo I (n=119) x Grupo III (n=12)	Grupo II (n=68) x Grupo III (n=12)
VCM (fL)	0,002	0,000	0,000
HCM (pg)	0,000	0,000	0,000
Hb A ₂ (%)	0,000	0,107	0,937

(*) ANOVA seguida do teste de Tukey. Valor p estatisticamente significante < 0,05

APÊNDICE 7

Comparação dos resultados das análises laboratoriais entre os pacientes com perfil eletroforético AS de genótipo α normal (Grupo I), genótipo heterozigoto (Grupo II) e genótipo homozigoto para a deleção $-\alpha$ ^{3,7} (Grupo III)

Parâmetro analisado	Valor p ^(*)		
	Grupo I (n=18) x Grupo II (n=4)	Grupo I (n=18) x Grupo III (n=3)	Grupo II (n=4) x Grupo III (n=3)
VCM (fL)	0,042	0,000	0,000
HCM (pg)	0,033	0,000	0,001
Hb S (%)	0,009	0,000	0,038

(*) Kruskal-Wallis

ANEXO 1



MINISTÉRIO DE EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

Parecer consubstanciado
(Final)

Prot. nº	129/06 – CEP/UFRN
Projeto de Pesquisa	Título original: Diagnóstico Molecular da Talassemia Alfa na População de Natal – RN Título atual: Diagnóstico Molecular da Talassemia Alfa em indivíduos portadores de microcitoses e hipocromia.
Área de Conhecimento	Ciências da Saúde - Medicina
Pesquisador Responsável	Tereza Maria Dantas de Medeiros
Instituição Onde Será Realizado	UFRN – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Instituição Sediadora	Hemocentro Dalton Barbosa Cunha.
Período de realização	Início: janeiro 2007 Término: julho/2008
Revisão Ética em	12 de dezembro de 2006

Relato

Considerando que as pendências expostas por este Comitê, foram adequadamente cumpridas, o Protocolo de Pesquisa em pauta enquadra-se na categoria de APROVADO.

Vale acrescentar que o pesquisador aceitando sugestão deste Comitê alterou o título para: **Diagnóstico Molecular da Talassemia Alfa em indivíduos portadores de microcitoses e hipocromia.**

Orientações ao Pesquisador: em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa (Brasília, 2002) e Resol. 196/96 – CNS o pesquisador responsável deve:

1 – entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na íntegra, por ele assinada (Resol. 196/96 – CNS – item IV.2d);


2 – desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após a análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UFRN (Resol. 196/96 – CNS – item III.3z);

3 – apresentar ao CEP/UFRN eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.41);

4 – apresentar ao CEP/UFRN relatórios parciais e final (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa - CONEP – Brasília – 2002 – p.65);

Os formulários para os relatórios parciais e final encontram-se na página do CEP. (www.ética.ufrn.br)

Natal, 12 de dezembro de 2006.


Dulce Almeida
Vice-Coordenadora
CEP-UFRN

ANEXO 2

VALORES DE REFERÊNCIA

	Homem	Mulher
Ferritina (*) (ng/mL)	28 - 397	10 - 159
Hemácias (**) (x10 ¹² /L)	5,0 ± 0,5	4,3 ± 0,5
Hb (**) (g/dL)	15,0 ± 2,0	13,5 ± 1,5
VCM (**) (fL)		92 ± 9
HCM (**) (pg)		29,5 ± 2,5
Hb F (**) (%)		< 1,0
Hb A ₂ (***) (%)		2,4 ± 1,4

(*) Valores de referência do kit (Immulite)

(**) DACIE, J.V., LEWIS, S.M. *Practical Haematology*. 8.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995

(***) BEZERRA, T.M.M. Quantificação de hemoglobina A₂ por eletroforese em acetato de celulose. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, v.20, n. 5, p. 143-145, 1984.