

**GUSTAVO HENRIQUE DE MEDEIROS ALCOFORADO**

**PREVALÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA<sup>+</sup> (DELEÇÃO - $\alpha^{3,7}$ ) NA  
POPULAÇÃO ADULTA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da UFRN, como  
requisito para a obtenção de Grau de  
MESTRE em Ciências Farmacêuticas,  
Área de Concentração: Bioanálises

**Orientadora:**

Profa. Dra. Tereza Maria Dantas de Medeiros

**Natal**

**2011**



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

**PREVALÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA<sup>+</sup> (DELEÇÃO - $\alpha^{3,7}$ ) NA  
POPULAÇÃO ADULTA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE**

**GUSTAVO HENRIQUE DE MEDEIROS ALCOFORADO**

**NATAL**

**2011**

## CATALOGAÇÃO NA FONTE

A354p

Alcoforado, Gustavo Henrique de Medeiros.

Prevalência de talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção - $\alpha^{3.7}$ ) na população adulta do Estado do Rio Grande do Norte. / Gustavo Henrique de Medeiros Alcoforado. – Natal, 2011.

67p.:Il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tereza Maria Dantas de Medeiros.

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

1. Talassemia alfa<sup>+</sup> – Dissertação. 2. Deleção - $\alpha^{3.7}$  – Dissertação. 3. Doença da hemoglobina H – Dissertação. 4. População do RN – dissertação I. Medeiros, Tereza Maria Dantas de. II. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 616.155.16-053.8(043.3)

**GUSTAVO HENRIQUE DE MEDEIROS ALCOFORADO**

**PREVALÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA<sup>+</sup> (DELEÇÃO - $\alpha^{3,7}$ ) NA POPULAÇÃO  
ADULTA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação para a obtenção do Grau de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Tereza Maria Dantas de Medeiros  
Orientadora/Presidente

---

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati  
1º Examinador

---

Profa. Dra. Ivanise Marina Moretti Rebecchi  
2º Examinador

Natal, 28 de fevereiro de 2011

## I

“Pedi a Deus que me desse força, para tudo conseguir...  
Fui feito fraco para aprender a obedecer.  
Pedi a Deus por saúde, para realizar coisas grandiosas...  
Fui feito doente para realizar coisas difíceis.  
Pedi a Deus por riquezas, para comprar felicidade...  
Fui feito pobre, para vender sabedoria.  
Pedi a Deus que me concedesse poder, para que os homens necessitassem de mim...  
Fui feito insignificante, para sentir a necessidade de Deus ...  
Pedi a Deus por tudo isso, para poder gozar a vida...  
Foi me dada a vida para poder avaliar seu gozo.  
Não recebi nada do que pedi mas obtive tudo aquilo de que necessitava!”

Autor desconhecido

## II

“Nenhum homem pode ser totalmente feliz,  
enquanto não se unificar, sintonizando sua vida  
com o Deus do mundo de Deus”

Humberto Rohden

Dedico este trabalho à minha Família amada,  
em especial à minha Mãe, símbolo de amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que, pela Sua presença e força, me conduziu ao longo desta jornada, tornando possível a conclusão de mais uma etapa de vida.

À minha Família, pelo apoio tanto nos momentos felizes quanto nos tristes. Em especial, à minha Mãe, Regina, por ser minha grande amiga de todos os momentos. Por sempre me fazer acreditar que amanhã será um dia melhor e pelas constantes orações.

À minha Amada Waleska Cecília, pela total disponibilidade para ouvir minhas angústias e incertezas, pelo carinho, amor, ajuda e compreensão dispensados neste momento tão importante em minha vida.

À Profa. Dra. Tereza Maria Dantas de Medeiros, Orientadora desta Dissertação de Mestrado, por todo o empenho, sabedoria, dedicação e, acima de tudo, compreensão. Gostaria de ratificar a sua competência, sua participação com discussões, suas correções e suas sugestões, que fizeram com que concluíssemos esta etapa do trabalho.

À Profa. Dra. Telma Maria Araújo Moura Lemos, pela parceira firmada com nossa Equipe de Trabalho, que resultou na obtenção de grande parte das amostras analisadas.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati e à Equipe do Laboratório de Hemoglobinopatias da UNICAMP (Campinas/SP), pela colaboração e inestimável suporte técnico-científico dispensado à concretização do projeto, representando a pedra angular do nosso sonho realizado.

À Dra. Suerda Cunha, bioquímica do LACEN/RN (Laboratório Central “Dr. Almino Fernandes”), pela excelente recepção e colaboração técnica, e à Direção do LACEN/RN por nos ter permitido a utilização do HPLC para a análise de algumas amostras.

À Profa. Dra. Ivanise Maria Moretti Rebecchi, pela contribuição e sugestões dispensadas durante todo o andamento do trabalho e, sobretudo, pela amizade firmada.

Ao Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito, pela disponibilidade de seus equipamentos para o preparo de soluções.

Aos Professores Arnóbio Antônio da Silva Júnior e Luiz Alberto Lira Soares, por sempre me incentivarem na busca do crescimento, sendo exemplos de competência, garra, determinação e disciplina.

Aos Coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal além da confiança em mim depositada.

A Maria Lúcia, Funcionária do Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (UFRN) pela presteza e dedicação e às Alunas de Iniciação Científica Maria das Vitórias e Waleska por toda a ajuda nas coletas e análises.

À minha fiel Amiga Zama Messala Luna de Oliveira, por todos os conhecimentos compartilhados e atenção dispensada, não somente, no campo profissional, como também, na vida pessoal; à minha Amiga japonesa Cynthia Hatsue, que com bastante paciência, inerente à sua ascendência, e conhecimento auxiliou o desenvolvimento da pesquisa.

Especial e sincero agradecimento à Profa. Christiane Medeiros Bezerra, que, com seus conhecimentos, experiência, e amizade, contribuiu de maneira ímpar para a realização deste trabalho.

Ao Amigo e Prof. Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes, pela humildade e paciência dispensada no compartilhamento de sua sabedoria.

Ao Mestrando Alfredo de Araújo Silva, pela agilidade e disponibilidade para as dosagens de ferritina sérica.

Ao Estatístico, Ítalo Medeiros de Azevedo, pela competência, sugestões, discussões, busca de resultados, ensinamentos e empenho no intuito de chegar à excelência.

À minha Amiga Cristiane Maia pela atenção e assessoria prestada ao desenvolvimento do *abstract*.

Aos Alunos de Pós-Graduação e de Iniciação Científica dos Laboratórios Multidisciplinar (LabMult), de Biologia Molecular (BioMol) e de Bioquímica, pela atenção e auxílio no desenvolvimento das atividades. E, de modo especial, aos seus Professores, Profa. Adriana Augusto de Rezende e Maria das Graças Almeida.

Ao Secretário Estadual de Saúde, Dr. George Antunes de Oliveira, e diretores das Unidades Básicas de Saúde, pela autorização e permissão para coleta de amostras.

Aos Farmacêuticos-Bioquímicos, Técnicos e Funcionários das Unidades Básicas de Saúde, pela hospitalidade, agilidade e auxílio, que permitiram a realização deste estudo.

À Equipe da Clínica da Saúde, em especial, ao meu Amigo Dr. Edmar Araújo Dantas,



que representa a minha rocha no momento de luta, sempre presente e pronto para me ajudar nos momentos difíceis, seja disponibilizando seus equipamentos e conhecimentos técnicos, seja confortando-me através da palavra de Deus.

Aos indivíduos que participaram desta pesquisa, pois, sem eles, nenhuma dessas páginas estaria completa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Norte (FAPERN) pelo apoio financeiro.

A todos os meus Amigos e Amigas que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando, em especial minha grande Amiga Mariana Guimarães por me ajudar durante toda a Graduação e Pós-Graduação.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste projeto.

## RESUMO

A talassemia alfa, doença monogênica mais frequente no mundo, é caracterizada por deleções envolvendo um dos genes (talassemia  $\alpha^+$ ) ou ambos os genes (talassemia  $\alpha^0$ ) de globina alfa localizados no *cluster*  $\alpha$  no cromossomo 16 (16p13.3). A alteração presente na maioria dos casos de talassemia  $\alpha^+$  é a deleção de um fragmento de 3.7 kb de DNA (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) com frequências muito elevadas na região do Mediterrâneo e na África. No Brasil, estudos já realizados mostram que a deleção  $-\alpha^{3.7}$  é a mais frequente, e sendo, encontrada principalmente em indivíduos de origem africana. O presente estudo teve como objetivo principal determinar a prevalência da talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) na população adulta do estado do Rio Grande do Norte. Foram obtidas amostras de sangue de 713 indivíduos (408 do sexo feminino e 307 do sexo masculino), com idade compreendida entre 18 e 59 anos, não aparentados e naturais do estado do Rio Grande do Norte. Os dados hematológicos foram obtidos em contador automático de células (Micros 60, ABX Diagnostics). A confirmação do perfil hemoglobínico e a quantificação das hemoglobinas A<sub>2</sub> e Fetal foram realizadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). O DNA foi isolado de leucócitos do sangue periférico utilizando-se o kit “*Illustra blood genomicPrep Mini Spin*” (GE Healthcare), e a investigação da talassemia alfa (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) foi realizada por PCR. Dos 713 indivíduos investigados, 80 (11,2%) apresentaram talassemia alfa<sup>+</sup>, sendo 79 (11,1 %) heterozigotos ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ) e 1 (0,1%) homozigoto da deleção ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ). Considerando a etnia, verificou-se que os indivíduos negros apresentaram uma maior prevalência de talassemia alfa (12,5%), seguido pelos pardos (12,3%) e brancos (9,6%). A comparação dos índices hematológicos entre os indivíduos com genótipo normal e heterozigoto da talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) mostrou uma diferença estaticamente significativa no número de hemácias ( $p<0,001$ ), VCM ( $p<0,001$ ), HCM ( $p<0,001$ ) e A<sub>2</sub> ( $p=0,007$ ), além da dosagem de hemoglobina ( $p=0,003$ ) para o sexo feminino. O estudo constitui um dos primeiros a investigar a talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) na população geral do estado do Rio Grande do Norte e os resultados obtidos evidenciam a importância da investigação dessa condição a fim de elucidar a etiologia da microcitose e/ou hipocromia.

**Palavras-chaves:** Talassemia alfa<sup>+</sup>, deleção  $-\alpha^{3.7}$ , população brasileira

## ABSTRACT

Alpha thalassemia, the most common monogenic disorder in the world, is characterized by deletions of one ( $\alpha^+$ -thalassemia) or both alpha genes ( $\alpha^0$ -thalassemia) located on human chromosome 16 (16p13.3). The most common case of  $\alpha^+$ -thalassemia is a deletion of 3.7 kb of DNA ( $-\alpha^{3.7}$  deletion). It is most prevalent in African and Middle East regions. In the few studies carried out in Brazilian population  $-\alpha^{3.7}$  deletion was the most common deletion, mainly in African descendants. This study was conducted to determine the prevalence of  $\alpha^+$ -thalassemia (deletion 3.7kb) in adult population from Rio Grande do Norte. We obtained blood samples from 713 unrelated individuals of both genders, aged between 18 and 59 years old. All individuals were born in Rio Grande do Norte. The hematological indices were obtained in an automatic cell counter (Micros 60, ABX Diagnostics). The hemoglobin measurement ( $A_2$  and Fetal hemoglobin) and the profile confirmation were carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) methodology. Genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes using *Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin* kit and  $-\alpha^{3.7}$  deletion was investigated by PCR. Among the 713 individuals studied, 80 (11,2%) presented  $\alpha^+$ -thalassemia: 79 (11,1%) were heterozygous and 1 (0,1%) homozygous for the  $-\alpha^{3.7}$  deletion. Considering the ethnic group, negroes showed the greatest prevalence of  $\alpha^+$ -thalassemia (12,5%), followed by mulattoes (12,3%) and caucasian (9,6%). Statistical comparison of hematological parameters between normal individuals and heterozygous to  $\alpha^+$ -thalassemia showed significant differences in RBC ( $p<0,001$ ), MCV ( $p<0,001$ ), MCH ( $p<0,001$ ), Hb  $A_2$  ( $p=0,007$ ) as well as female hemoglobin concentration ( $p=0,003$ ). This is one of the first studies to research  $\alpha^+$ -thalassemia in general population of Rio Grande do Norte state and these results attest the importance of investigation of this condition to define the etiology of microcytosis and hypochromia.

**Key-words:** alpha thalassemia;  $-\alpha^{3.7}$  deletion; brazilian population

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da molécula de hemoglobina e do grupo prostético	14
Figura 2	Agrupamento dos genes da globina	15
Figura 3	Síntese das cadeias globínicas ao longo do desenvolvimento	16
Figura 4	Estrutura dos genes da alfa e da beta globina	17
Figura 5	Estrutura do agrupamento alfa	17
Figura 6	Estrutura do agrupamento beta	18
Figura 7	Representação das regiões homólogas e não-homólogas dos genes da alfa globina	18
Figura 8	Genótipos da talassemia alfa	22
Figura 9	Fisiopatologia da talassemia alfa	23
Figura 10	Mecanismo de recombinação desigual originária da deleção $-\alpha^{3.7}$	24
Figura 11	Mecanismo de recombinação desigual originária da deleção $-\alpha^{4.2}$	25
Figura 12	Distribuição mundial da talassemia alfa	27
Figura 13	Distribuição dos 713 indivíduos de acordo com as Mesorregiões do estado do Rio Grande do Norte	33
Figura 14	Representação do pareamento dos <i>primers</i> nas regiões homólogas dos genes globina alfa	37
Figura 15	Visualização dos produtos de PCR para a deleção $-\alpha^{3.7}$	40
Figura 16	Prevalência da talassemia alfa <sup>+</sup> de acordo com as Mesorregiões do estado do Rio Grande do Norte	42
Figura 17	<i>Box-plot</i> representando as diferenças de volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular médio (HCM) encontrada entre indivíduos normais (genótipo 1) e heterozigotos (genótipo 2) para a deleção $-\alpha^{3.7}$ .	45
Figura 18	<i>Box-plot</i> representando as diferenças de dosagem de Hb A <sub>2</sub> encontradas entre indivíduos normais (genótipo 1) e heterozigotos (genótipo 2) para a deleção $-\alpha^{3.7}$ .	46

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b>	Achados clínicos e laboratoriais dos diferentes fenótipos talassêmicos	26
<b>Tabela 1</b>	População de 18 a 59 anos distribuída nas Mesorregiões do Estado do Rio Grande do Norte	30
<b>Tabela 2</b>	Cálculo amostral da população de 18 a 59 anos representativa de cada Mesorregião	32
<b>Tabela 3</b>	Composição da reação na PCR	38
<b>Tabela 4</b>	Distribuição dos 713 indivíduos de acordo com genótipo encontrado	41
<b>Tabela 5</b>	Prevalência da talassemia alfa <sup>+</sup> (deleção - $\alpha^{3.7}$ ) entre os 713 indivíduos de acordo com o grupo étnico	42
<b>Tabela 6</b>	Comparação dos parâmetros hematológicos (média $\pm$ desvio padrão) entre indivíduos com genótipo normal e heterozigoto para a deleção - $\alpha^{3.7}$	44
<b>Tabela 7</b>	Classificação de 701* indivíduos de acordo com a presença de microcitose, hipocromia e/ou anemia	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

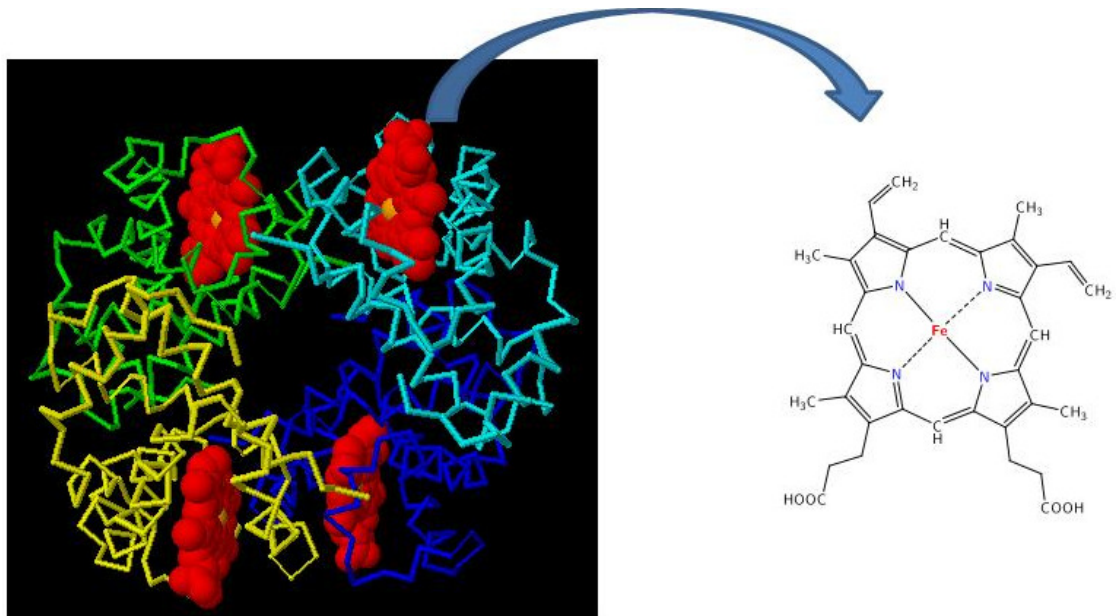
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleotídeos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
fL	Fentolitro
g	Força Gravitacional
HbF	Hemoglobina Fetal
Hb	Hemoglobina
Hcias	Hemácias
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HS-40	Sítio de Hipersensibilidade
Hto	Hematócrito
IBGE	Instituto Brasileiro e Geográfico de Estatística
IVS	Íntron
kb	Kilobase
LCR	Região de Controle de Locus
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
pg	Picograma
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>
TCLE	Termo de Compromisso Livre e Esclarecido
UTR	Região não-Traduzida
UV	Ultravioleta
V	Volts
VCM	Volume Corpuscular Médio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1. Genes das cadeias globínicas.....	16
1.2. Hemoglobinopatias.....	19
1.3. Talassemia alfa.....	20
1.3.1. Fisiopatologia da talassemia alfa.....	22
1.3.2. Talassemia alfa <sup>+</sup> .....	23
1.3.3. Achados laboratoriais da talassemia alfa.....	25
1.3.4. Distribuição da talassemia alfa.....	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	29
2.1. Objetivo principal.....	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	30
3.1. Determinação do tamanho amostral.....	30
3.2. Caracterização da casuística.....	33
3.3. Métodos.....	34
3.3.1. Obtenção das amostras.....	34
3.3.2. Eritrograma.....	34
3.3.3. Eletroforese de hemoglobina.....	35
3.3.4. Quantificação das hemoglobinas A <sub>2</sub> e fetal.....	35
3.3.5. Dosagem de ferritina sérica.....	35
3.3.6. Extração do DNA do sangue periférico.....	36
3.3.7. Avaliação da integridade e quantificação do DNA.....	36
3.3.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção da talassemia alfa (deleção - $\alpha^{3.7}$ ).....	37
3.3.9. Eletroforese dos produtos de PCR.....	38
3.3.10. Análise estatística.....	39
<b>4. RESULTADOS</b> .....	40
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	54
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	55
<b>APÊNDICES</b> .....	62
<b>ANEXOS</b> .....	66

## 1. INTRODUÇÃO

A hemoglobina humana, proteína eritrocitária especializada no transporte de oxigênio para os tecidos, corresponde a um tetrâmero de aproximadamente 68.000 dáltons, formado pela combinação de duas cadeias polipeptídicas do “tipo alfa” [alfa ( $\alpha$ ) e zeta ( $\zeta$ )] – cada uma com 141 aminoácidos, e duas cadeias do “tipo beta” [épsilon ( $\epsilon$ ), beta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ) e gama ( $\gamma$ )], com 146 aminoácidos. Cada cadeia se liga a um grupo prostético heme, formado pela combinação de um átomo de ferro com uma molécula de protoporfirina (CLARKE; HIGGINS, 2000).



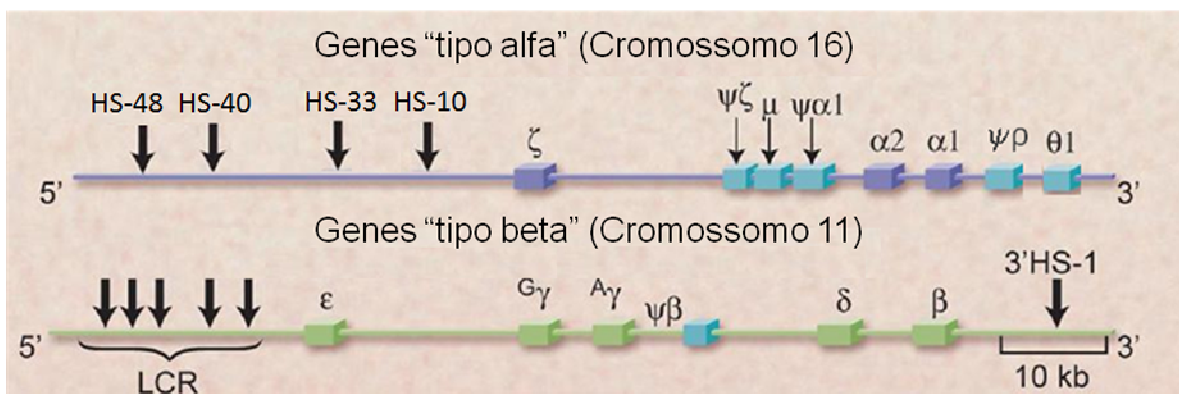
**Figura 1** - Representação esquemática da molécula de hemoglobina e do grupo prostético (disponível em: [www.umass.edu/molvis/tutorials/hemoglobin/heme.htm](http://www.umass.edu/molvis/tutorials/hemoglobin/heme.htm))

Os agrupamentos gênicos (*clusters*), responsáveis pela síntese das cadeias globínicas, “tipo alfa” e “tipo beta”, encontram-se dispostos em cromossomos diferentes. Os genes do agrupamento alfa estão dispostos em aproximadamente 26 kb de DNA localizados no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) e incluem três genes funcionais ( $\zeta$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ ), dois genes de função desconhecida ( $\theta_1$  e  $\alpha^D$ , também conhecido por “ $\mu$ ”) e três pseudogenes ( $\psi\zeta_1$ ,  $\psi\alpha_1$  e



$\psi\rho$ ), arranjados na seguinte ordem: 5'- $\zeta$ - $\psi\zeta$ - $\mu$ - $\psi\alpha_1$ - $\alpha_2$ - $\alpha_1$ - $\psi\rho$ - $\theta_1$ -3' (Figura 2) (GOH *et al.*, 2005; VOON; VADOLAS, 2008).

Os genes do “tipo beta” estão alocados em cerca de 70 kb de DNA, na porção terminal do braço curto do cromossomo 11 (11p15.5). Esse agrupamento é formado pelos genes funcionais épsilon ( $\epsilon$ ), beta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ) e gama ( $^G\gamma$ ) e ( $^A\gamma$ ), além do pseudogene beta, na seguinte ordem: 5'- $\epsilon$ - $^G\gamma$ - $^A\gamma$ - $\psi\beta$ - $\delta$ - $\beta$ -3' (Figura 2). Os genes da globina “tipo alfa” e “tipo beta” estão ordenados na direção 5' - 3', na mesma sequência em que são expressos durante as diferentes fases de desenvolvimento (BIRGENS; LJUNG, 2007; SCHECHTER, 2008).

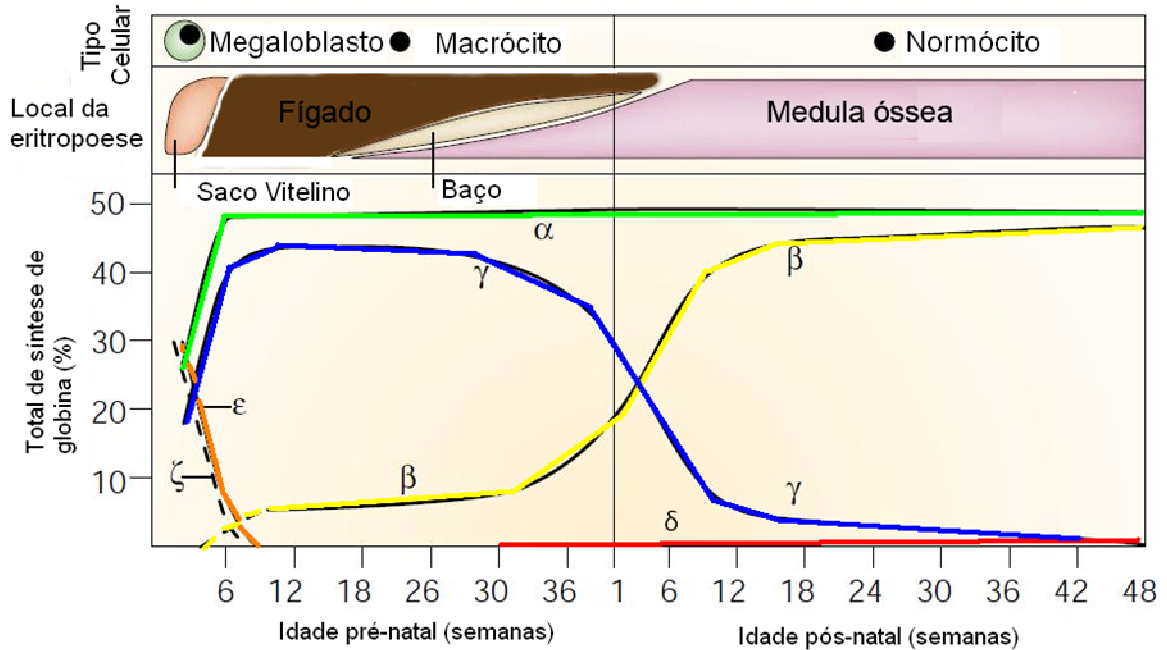


**Figura 2** – Agrupamento dos genes da globina (modificado de SCHECHTER, 2008)

No período embrionário, as cadeias zeta ( $\zeta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ), alfa ( $\alpha$ ) e gama ( $\gamma$ ) se arranjam aos pares para formar as hemoglobinas embrionárias: Gower-1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Gower-2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) e Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ). A produção dessas hemoglobinas pelos eritroblastos do saco vitelínico ocorre nas primeiras semanas e continua até a oitava semana de gestação.

Após esse período, o fígado passa a ser o principal responsável pela eritropoese, produzindo, especialmente, a mais importante hemoglobina da vida intra-uterina, a hemoglobina fetal ou Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ), a qual predomina até a 30ª semana de gestação, quando então o aumento na produção das cadeias globínicas  $\beta$  começa a determinar a substituição, por estas, das cadeias  $\gamma$ , elevando assim, gradualmente, a síntese da hemoglobina do adulto ou Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ) (Figura 3). Decorrido o nascimento, a produção de cadeias gama ( $\gamma$ ) decai pronunciadamente e a produção de cadeias  $\beta$  eleva-se acentuadamente, de modo que, aos 6 meses de vida pós-natal, o indivíduo apresenta uma constituição hemoglobínica semelhante à

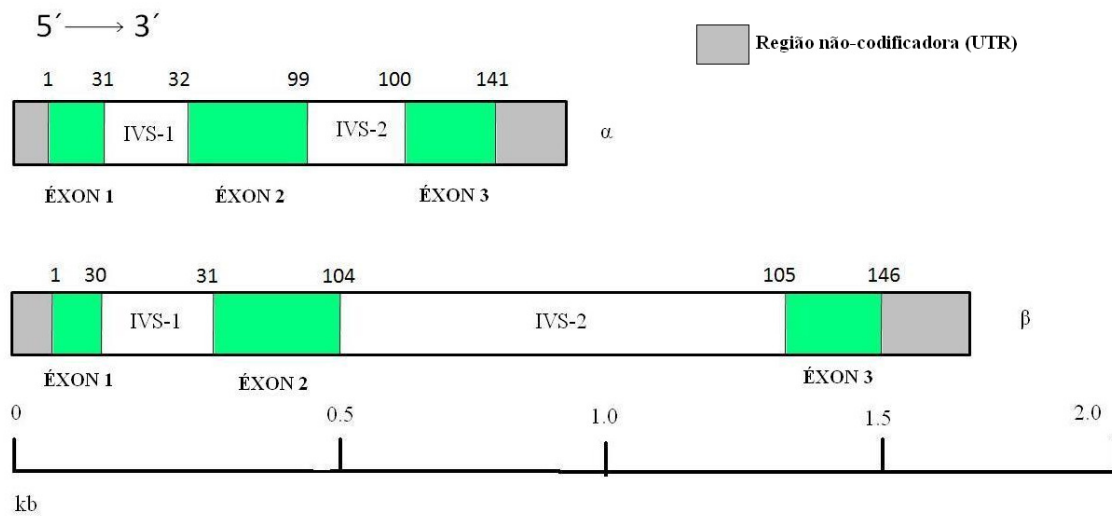
encontrada na vida adulta: cerca de 95% de HbA, 2-3% de HbA<sub>2</sub>, e aproximadamente 1% de Hb F (WAYE; CHUI, 2001; GIAMBONA *et al.*, 2009).



**Figura 3** - Síntese das cadeias globínicas ao longo do período do desenvolvimento (WEATHERALL, 2001b)

### 1.1. Genes das cadeias globínicas

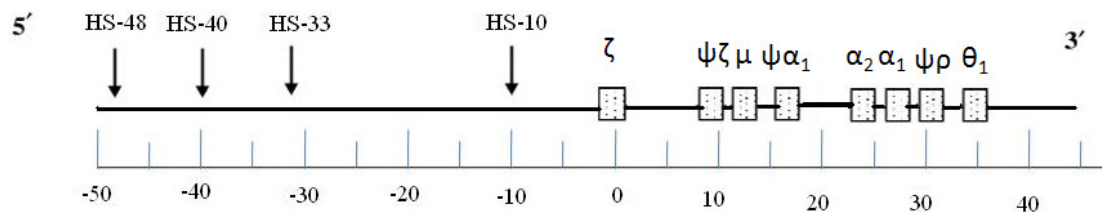
Todos os genes das globinas são formados por três sequências codificadoras de aminoácidos (éxons) separados por duas sequências de intervenção não-codificadoras (íntrons ou IVS) e flanqueados por regiões não codificadoras de aminoácidos (UTRs) em 5´ e 3´ (CLARK; THEIN, 2004). As sequências intrônicas do gene alfa possuem tamanhos similares, em torno de 100 a 300 pares de bases, os quais estão localizados entre os códons 31-32 e 99-100, enquanto as do gene beta localizam-se entre os códons 30 - 31 e 104 - 105 e possuem 122-130 e 850-900 pares de bases, respectivamente (FORGET; PEARSON, 1995; WEATHERALL, 2001a) (Figura 4).



**Figura 4** – Estrutura dos genes da alfa e da beta globina (FORGET; PEARSON, 1995)

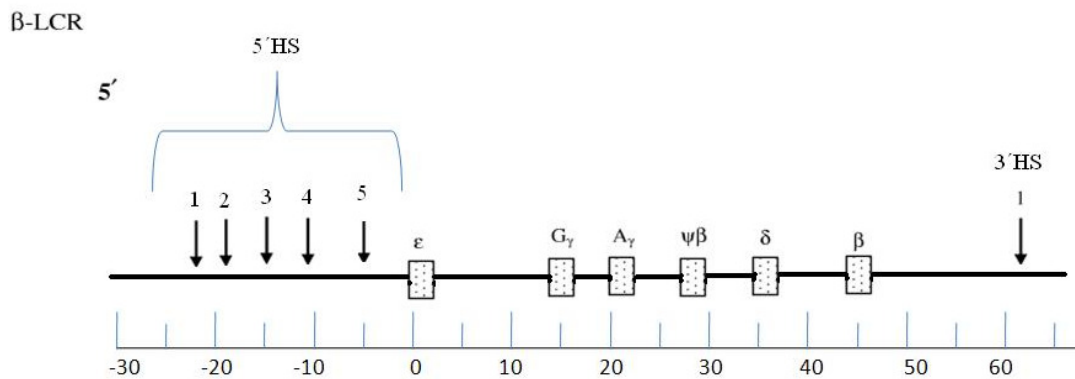
Os agrupamentos gênicos  $\alpha$  e  $\beta$  possuem regiões que regulam a expressão de seus respectivos genes ao longo da vida eritrocitária. Essas regiões são denominadas “regiões promotoras ou regulatórias” (*promoter box*).

A região promotora do “*cluster alfa*” possui quatro regiões de hipersensibilidade à DNase I. São elas: HS-10, HS-33, HS-40 e HS-48. Essas regiões são assim denominadas devido à localização que ocupam ao longo do cromossomo 16: a 10, 33, 40 e 48 kb do gene  $\zeta$  sentido 3' - 5' (Figura 5). Estudos revelaram que somente a região HS-40 apresenta efeito significativo na regulação dos genes alfa (VOON; VADOLAS, 2008; RIBEIRO; SONATI, 2008).



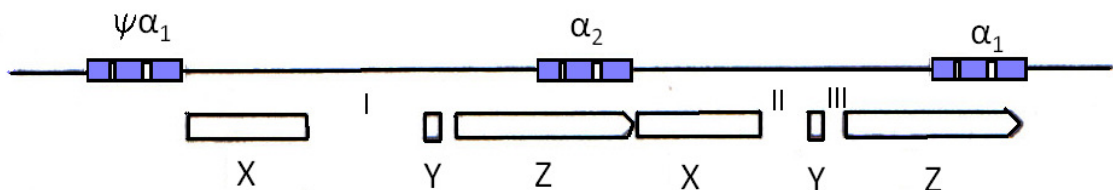
**Figura 5** – Estrutura do agrupamento alfa (VOON; VADOLAS, 2008)

De modo similar, o LCR (*Locus Control Region*), região regulatória do agrupamento beta, possui cinco regiões de hipersensibilidade à DNase I, as quais se encontram posicionadas entre 5 e 25 kb na extremidade 5', em relação ao gene  $\epsilon$  e a região de hipersensibilidade próximo à extremidade 3' cuja função não está esclarecida (Figura 6). A propriedade de controle gênico dessas regiões é de extrema importância, de modo que a supressão delas implica em inativação dos genes por eles regulados (HO; THEIN, 2000)



**Figura 6** – Estrutura do agrupamento beta (BANK, 2005)

Cada gene alfa encontra-se compreendido dentro de uma região de homologia de aproximadamente 4kb de comprimento, subdividida em três subsegmentos homólogos designados X, Y e Z e separados por três regiões não-homólogas, I, II e III (Figura 7) (HIGGS; WEATHERALL, 2009).



**Figura 7** – Representação das regiões homólogas e não-homólogas dos genes da alfa globina (WEATHERALL, 2001a)

Os genes  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  são altamente homólogos, codificam proteínas idênticas e diferem em apenas 17%, estando essa diferença limitada à inserção de sete nucleotídeos próximo à região final do íntron 2 (IVS-2) e à substituição de base, nas posições 509 e 573, do mesmo íntron,

além de diferenças nas regiões 3' não codificantes (3' UTR). Apesar da elevada homologia, a expressão do gene  $\alpha_2$  parece ser duas a três vezes superior à do gene  $\alpha_1$ , provavelmente devido a diferenças no ritmo da transcrição dos dois genes (BERNINI; HARTEVELD, 1998; VOON; VADOLAS, 2008).

## 1.2. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias referem-se a um grupo heterogêneo de alterações de síntese da hemoglobina. São classificadas em três grupos (WEATHERALL, 2001b):

- Variantes estruturais da hemoglobina ou hemoglobinas anormais -resultantes de modificações estruturais nas cadeias de globina, ocasionadas geralmente por substituição de um único aminoácido;
- Talassemias - caracterizadas por uma diminuição ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias globínicas, o que acarreta desequilíbrio nas quantidades relativas das cadeias polipeptídicas;
- Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF) – caracterizada pela produção persistente de cadeias gama durante a vida adulta.

Estima-se que aproximadamente 7% da população mundial seja portadora dos diferentes distúrbios hereditários da hemoglobina e que cerca de 300.000 a 500.000 nascidos por ano apresentem a forma homozigótica ou heterozigótica de tal condição (HIGGS; WEATHERALL, 2009).

Atualmente, foram descritas mais de 1000 variantes estruturais da hemoglobina (CLARK; THEIN, 2004), resultantes geralmente da substituição de um único aminoácido na cadeia polipeptídica, que pode interferir na estabilidade ou funcionamento da hemoglobina. As hemoglobinas anormais mais encontradas em todo o mundo são: Hb S, Hb C e Hb E. As hemoglobinas S e C ocorrem devido a uma mutação pontual no códon 6 do gene beta. A HbS, por sua vez, se caracteriza pela troca do ácido glutâmico pela valina (Glu6Val), enquanto a HbC pela troca do ácido glutâmico por lisina(Glu6Lis) (STEINBERG, 2006). A hemoglobina E também surge devido à substituição do ácido glutâmico pela lisina, só que no códon 26, do gene beta(Glu26Lis) (VICHINSKY, 2007).

As talassemias são classificadas de acordo com o tipo de cadeia globínica que possui sua taxa de síntese alterada: talassemia alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ), delta-beta ( $\delta\beta$ ), gama-delta-beta ( $\gamma\delta\beta$ ) e épsilon-gama-delta-beta ( $\epsilon\gamma\delta\beta$ ). As mais comuns são as talassemias alfa e beta (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

### 1.3. Talassemia alfa

A talassemia alfa caracteriza-se por uma diminuição ou ausência na produção de cadeias alfa, geralmente devido à deleção de um ou ambos os genes responsáveis pela sua produção ou, menos frequentemente, por uma forma não deletional (VICHINSKY, 2009).

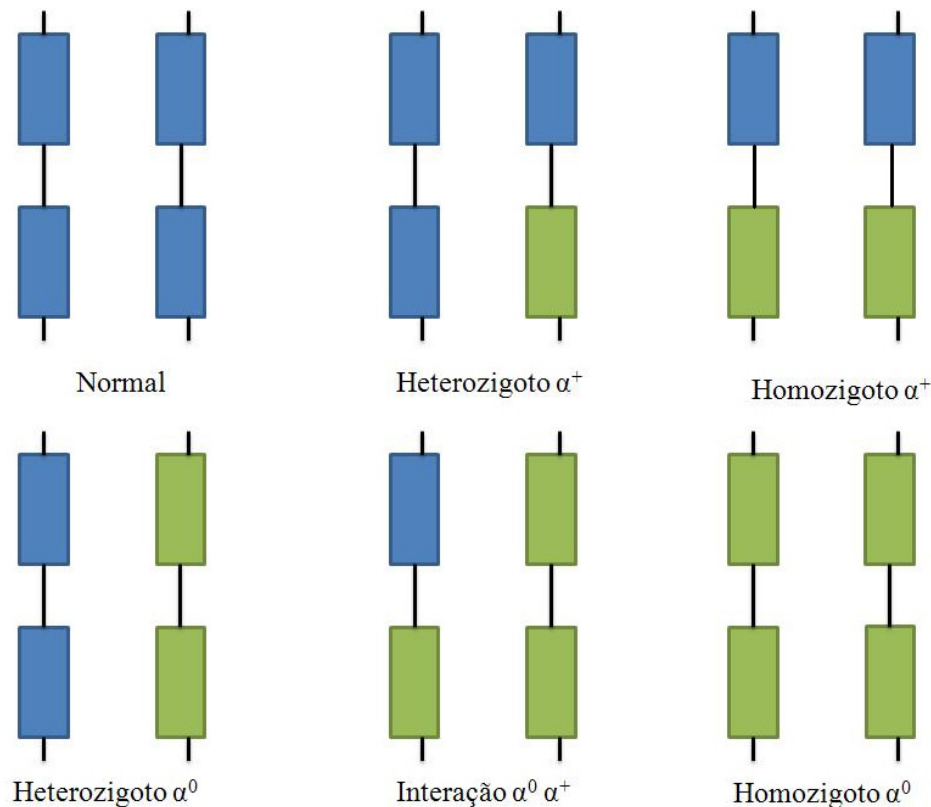
De acordo com o número de genes afetados em um mesmo cromossomo, a talassemia alfa pode ser classificada em talassemia  $\alpha^0$  (--), na qual ambos os genes alfa de um mesmo cromossomo são deletados ou inativados, não havendo produção de cadeias alfa, e talassemia  $\alpha^+$  (- $\alpha$ ), caracterizada pela diminuição na produção de cadeias de alfa, ocasionada pela deleção ou inativação de apenas um dos genes alfa ( $\alpha_1$  ou  $\alpha_2$ ) (BIRGENS; LJUNG, 2007).

A inexistência de produção de cadeias  $\alpha$  pelo cromossomo afetado, na talassemia  $\alpha^0$ , é consequência da deleção de ambos os genes alfa em posição *cis*, de todo o *cluster* alfa e/ou da região promotora (HS-40). A talassemia  $\alpha^0$  resulta de recombinação ilegítima (ou não-homóloga), usualmente envolvendo as famílias Alu. Deleções de regiões próximas aos elementos de regulação também são possíveis causas de talassemia  $\alpha^0$ . Neste caso, os dois genes alfa encontram-se estruturalmente intactos, embora completamente inativos. As deleções  $\alpha^0$  mais comuns são (--<sup>MED</sup>), -( $\alpha$ )<sup>20.5</sup>, (--<sup>SEA</sup>) e a (--<sup>FIL</sup>). As duas primeiras deleções são comuns na região do Mediterrâneo e as duas últimas no Sudeste Asiático. A deleção (--<sup>MED</sup>) se estende da região 5' do gene  $\psi\zeta$  até o gene  $\theta 1$  e a deleção -( $\alpha$ )<sup>20.5</sup> da região 5' do gene  $\psi\zeta$  ao códon 51 do gene  $\alpha_1$ , removendo um fragmento de 20.5 kb. Já a deleção (--<sup>SEA</sup>) remove aproximadamente 20 kb de DNA deletando os genes  $\mu$ -  $\psi\alpha 1$ -  $\alpha 2$ -  $\alpha 1$ - $\psi\rho$ - $\theta 1$ . (CHONG *et.al*, 2000; KATTAMIS *et al.*, 1996; HIGGS; WEATHERALL, 2009).

A recombinação recíproca de pares de cromossomos homólogos desalinhados resulta nas deleções mais comuns encontradas na talassemia  $\alpha^+$ , quais sejam: a deleção - $\alpha$ <sup>3.7</sup> e a deleção - $\alpha$ <sup>4.2</sup>, responsáveis pela deleção de 3.7 e 4.2 kb, respectivamente. A deleção mais frequente -  $\alpha$ <sup>3.7</sup> - envolve a região 3' do gene  $\alpha_2$  e 5' do gene  $\alpha_1$ , resultando na formação de um único híbrido funcionante: o  $\alpha_2$ - $\alpha_1$ . Já a deleção - $\alpha$ <sup>4.2</sup> remove totalmente o gene  $\alpha_2$ , permanecendo o gene  $\alpha_1$  intacto (HARTEVELD; HIGGS, 2010).

A talassemia  $\alpha^+$  não-deleccional provoca uma redução mais acentuada na síntese de cadeias alfa do que a do tipo deleccional. Muitas mutações já foram descritas como afetando o processamento ou transcrição do RNAm e a estabilidade da  $\alpha$  globina. As variantes mais comuns de talassemia  $\alpha^+$  não-deleccional correspondem à  $\alpha^{\text{IVSI}(-5\text{nt})}$  (comum no Mediterrâneo) e à poliadenilação de alguns sítios como  $\alpha_2^{\text{AATAAG}}$ ,  $\alpha_2^{\text{AATGAA}}$  e  $\alpha_2^{\text{AATA--}}$  (encontrada no Mediterrâneo e Oriente Médio) (HARTEVELD; HIGGS, 2010).

Os diferentes haplótipos talassêmicos  $\alpha^+$  e  $\alpha^0$  se combinam para formar os distintos genótipos encontrados na talassemia alfa: a talassemia  $\alpha^+$  heterozigótica ( $-\alpha/\alpha$ ), também denominada “portador silencioso”, caracteriza-se pela deleção de um único gene alfa; já a talassemia  $\alpha^+$  homozigótica ( $-\alpha/-\alpha$ ) caracteriza-se pela deleção de um gene alfa em cada cromossomo ou em posição *trans*, enquanto a talassemia  $\alpha^0$  heterozigótica ( $--/\alpha\alpha$ ) pela perda de dois genes alfa no mesmo cromossomo ou em posição *cis*; a interação  $\alpha^+/\alpha^0$  ( $--/-\alpha$ ), também denominada doença de hemoglobina H, ocorre devido a deleção de três genes alfa, e talassemia  $\alpha^0$  homozigótica ( $--/--$ ) é caracterizada pela ausência dos quatro genes alfa (Figura 8) (BERNINI; HARTEVELD, 1998).



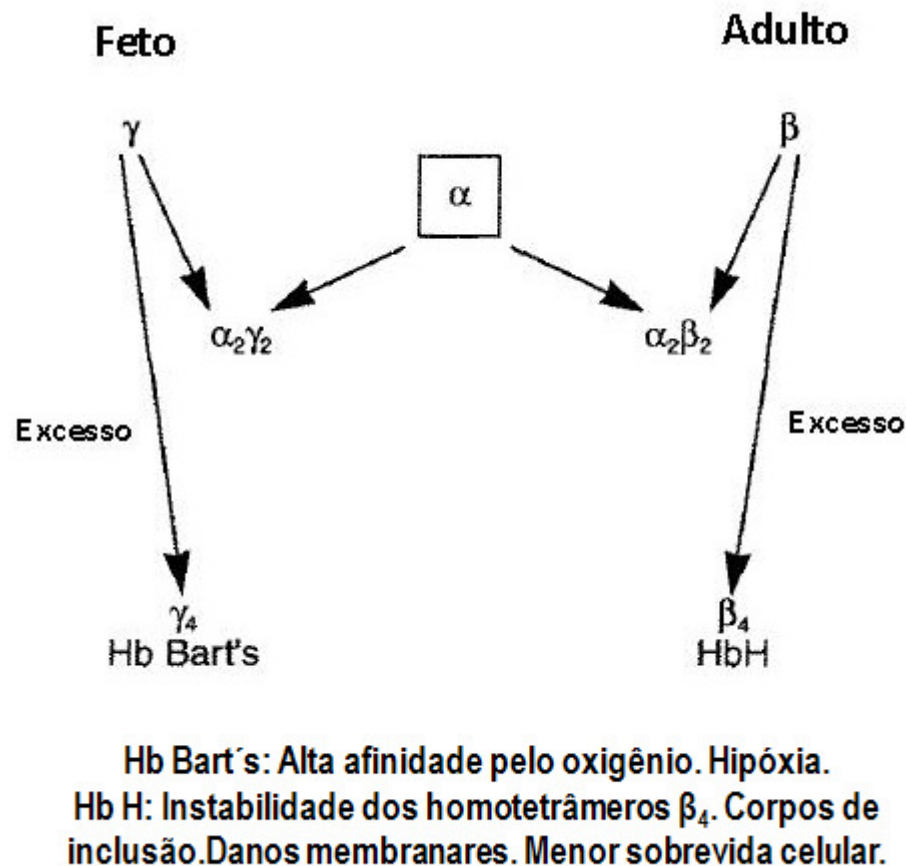
**Figura 8** - Genótipos da talassemia alfa. A parte em azul representa a presença do gene alfa e a verde sua ausência (adaptado de WEATHERALL; PROVAN, 2000)

### 1.3.1 Fisiopatologia da talassemia alfa

A fisiopatologia da talassemia alfa corresponde a uma consequência direta da deficiência de síntese das cadeias globínicas alfa (RUND; RACHMILEWITZ, 2001).

Durante o período fetal, a produção reduzida de cadeia alfa ( $\alpha$ ) leva a um desequilíbrio no arranjo entre as cadeias alfa ( $\alpha$ ) e gama ( $\gamma$ ). Conseqüentemente as cadeias gama ( $\gamma$ ) se agrupam e formam homotetrâmeros ( $\gamma_4$ ), denominados “hemoglobina Bart’s”. De modo análogo, a produção em menor quantidade de cadeias alfa na vida adulta leva a um desequilíbrio entre as cadeias alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ), durante a formação da Hb A, conduzindo à formação de homotetrâmeros  $\beta_4$ , denominados “hemoglobina H (Hb H)” (Figura 9). A hemoglobina Bart’s apresenta elevada afinidade pelo oxigênio ocasionando hipóxia tissular, já a Hb H é altamente instável, precipitando-se nos eritrócitos. O precipitado causa dano oxidativo e alterações da membrana favorecendo a eritrofagocitose (CHUI et al., 2003).





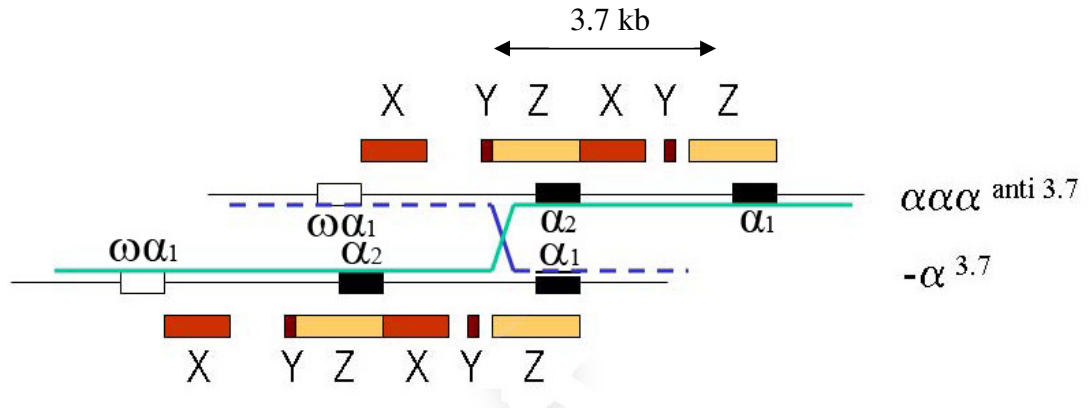
**Figura 9** – Fisiopatologia da talassemia alfa (WEATHERALL; PROVAN, 2000)

### 1.3.2. Talassemia alfa<sup>+</sup>

A recombinação entre fragmentos homólogos ocorre frequentemente no genoma humano e, de modo especial, entre os genes dos agrupamentos gênicos homólogos responsáveis pela síntese das cadeias polipeptídicas da globina humana. Em numerosas ocasiões, a recombinação gênica representa o principal meio de mutagenicidade desses agrupamentos, seja através de um “*crossing-over*” desigual, seja através de conversão gênica (BORG *et al.*, 2009).

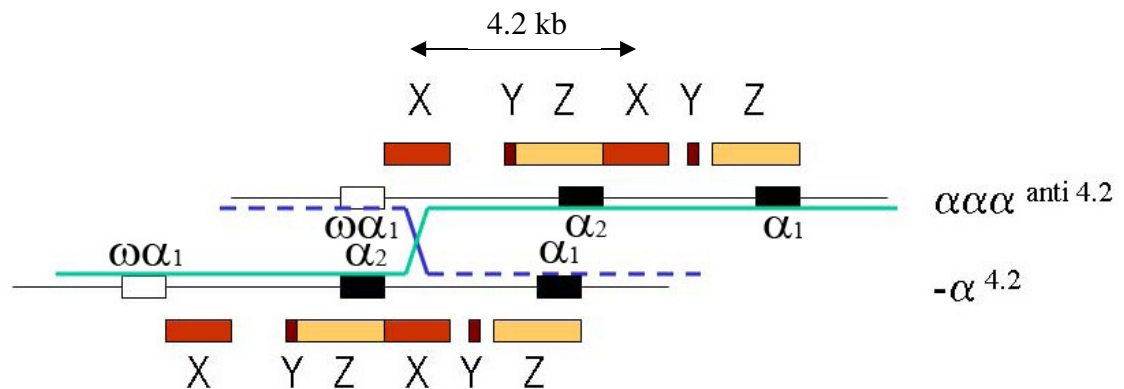
O mecanismo responsável pela deleção  $\alpha^+$  reflete a estrutura do complexo gênico da alfa globina. A existência de subsegmentos homólogos duplicados contribui para que, durante a meiose, ocorra um pareamento incorreto entre os pares de cromossomos homólogos, resultando em um “*crossing-over*” desigual, que gera os dois tipos mais frequentes de deleções causadas pela perda de um gene alfa, as deleções  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$  (BORG *et al.*, 2009).

A recombinação errônea entre os subsegmentos Z, separados por uma seqüência de DNA de 3.7 kb, origina um gene  $\alpha$  híbrido funcional ( $\alpha_2\alpha_1$ ), que corresponde à região 3' do gene  $\alpha_2$  e 5' do gene  $\alpha_1$ , e um gene triplicado  $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$  (Figura 10) (HIGGS; WEATHERALL, 2009; MARE *et al.*, 2010).



**Figura 10** – Mecanismo de recombinação desigual originária da deleção  $-\alpha^{3.7}$  (modificado de HARTEVELD; HIGGS, 2010)

Se o “*crossing-over*” desigual ocorrer entre os subsegmentos X, que distam 4.2 kb, ter-se-á como resultado a eliminação do gene  $\alpha_2$  inteiro, restando apenas o gene  $\alpha_1$  intacto (Figura 11) (HIGGS ; WEATHERALL, 2009).



**Figura 11** – Mecanismo de recombinação desigual originária da deleção  $-\alpha^{4.2}$  (modificado de HARTEVELD; HIGGS, 2010)

Além das deleções  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ , outras três deleções raras que também produzem talassemia  $\alpha^+$  têm sido descritas. Uma que elimina todo o gene  $\alpha_1$  ( $-\alpha^{3.5}$ ), foi encontrada em dois índios asiáticos; contudo o ponto específico desta deleção ainda não foi determinado. A segunda deleção, denominada  $\alpha(\alpha^{5.3})$ , remove a região 5' final do gene  $\alpha_2$ . E a terceira deleção remove 2.7 kb do gene  $\alpha_1$ , porém os pontos de quebra não são conhecidos (WEATHERALL, 2001a).

### 1.3.3. Achados laboratoriais da talassemia alfa

Os diversos achados clínicos e laboratoriais associados às talassemias alfa são resultantes da heterozigose, homozigose ou da interação das duas principais formas da talassemia alfa - a  $\alpha^0$  e a  $\alpha^+$  (Quadro 1) (BIRGENS; LJUNG, 2007).

O heterozigoto da talassemia  $\alpha^+$  ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ), também denominado clinicamente “portador silencioso”, caracteriza-se pela deleção de um único gene e apresenta parâmetros hematólogicos normais ou minimamente reduzidos (BIRGENS; LJUNG, 2007).

A deleção de dois genes alfa, em um mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes, conduz à talassemia  $\alpha^0$  heterozigótica ( $--/\alpha\alpha$ ) ou à talassemia  $\alpha^+$  homozigótica ( $-\alpha/-\alpha$ ), respectivamente. Estes fenótipos são caracterizados por anemia discreta com moderada microcitose e hipocromia (WAYE; CHUI, 2001).

A doença da hemoglobina H, ou interação  $\alpha^+/\alpha^0$  corresponde a uma síndrome clínica caracterizada pela acentuada redução da síntese das cadeias alfa (de modo geral, há uma produção de cadeias alfa inferior a 30%), resultando em uma intensa microcitose e hipocromia. O percentual de Hb H encontra-se entre 0,8 e 40%, devido ao pronunciado desequilíbrio entre as cadeias alfa e beta (HARTEVELD; HIGGS, 2010).

A homozigose da talassemia  $\alpha^0$  (---) caracteriza-se pela ausência total da síntese de cadeias alfa e, por conseguinte, pela não formação de Hb F, Hb A, e Hb A<sub>2</sub>. O resultado é a síndrome clínica conhecida como “Hidropisia Fetal por Hb Bart’s”, geralmente incompatível com a vida extra-uterina. A hemoglobina predominante nessa síndrome é a hemoglobina Bart’s ( $\gamma_4$ ), que é incapaz de liberar oxigênio para os tecidos devido à grande afinidade que possui com o oxigênio (WEATHERALL; PROVAN, 2000).

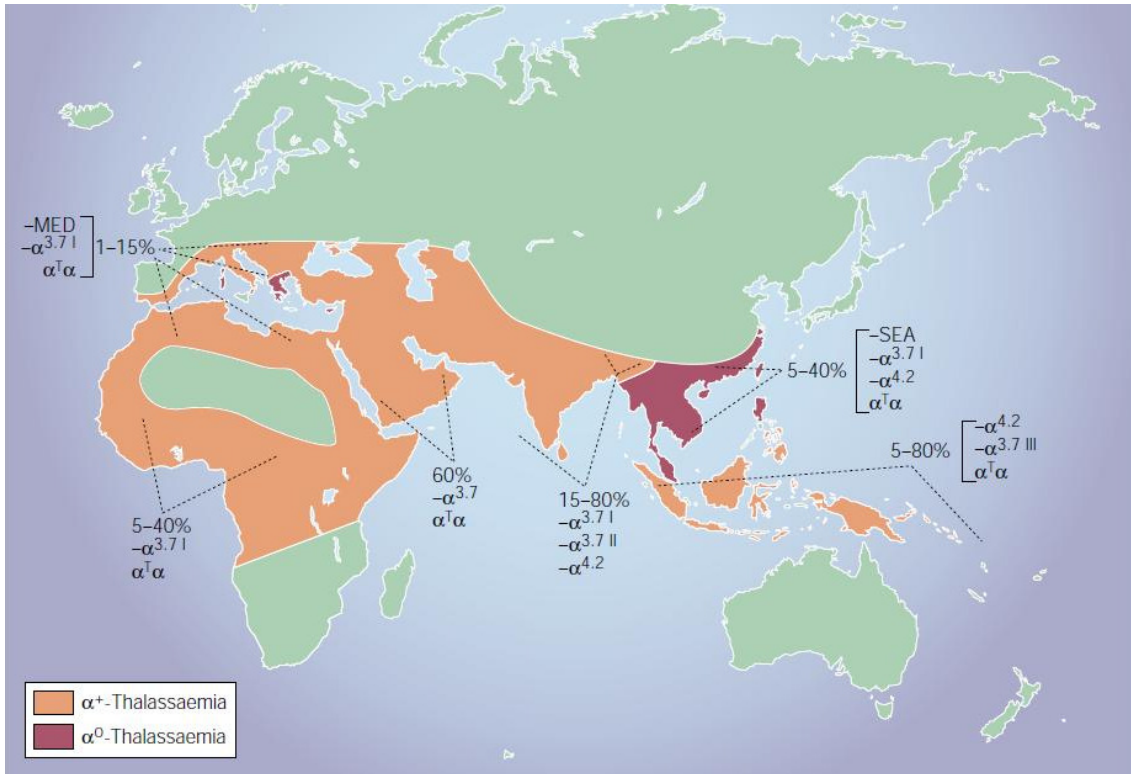
Fenótipo	Genes Funcionantes	Achados clínicos e laboratoriais	Genótipo
Normal	4	Parâmetros hematológicos normais	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Talassemia $\alpha^+$ heterozigótica	3	Hb normal. VCM normal ou próximo do limite inferior. Clinicamente normal	$-\alpha/\alpha\alpha$
Talassemia $\alpha^+$ homozigótica ou talassemia $\alpha^0$ heterozigótica	2	Hb normal ou próxima ao limite inferior e VCM baixo. Clinicamente normal	$-\alpha/-\alpha$ ou $--/\alpha\alpha$
Interação $\alpha^+/\alpha^0$	1	Anemia acentuada. VCM baixo (Doença da Hb H)	$--/-\alpha$
Talassemia $\alpha^0$ homozigótica	0	Anemia grave com hipóxia uterina. Morte intrauterina ou horas após o nascimento (Hidropisia Fetal por Hb Bart’s)e	$---/---$

**Quadro 1** – Achados clínicos e laboratoriais dos diferentes fenótipos talassêmicos (modificado de WAYE; CHUI, 2001)

### 1.3.4. Distribuição da talassemia alfa

A talassemia alfa é encontrada em uma larga faixa compreendendo a bacia do Mediterrâneo, parte da África, Oriente Médio, Índia, sudeste da Ásia, Melanésia e algumas ilhas do Pacífico. A frequência da talassemia  $\alpha^+$  varia de 10 a 20% em algumas regiões da África, 40% ou mais em alguns países do Oriente Médio e populações indígenas, e até mesmo 80% no norte de Papua Nova Guiné e grupos isolados do nordeste da Índia. A distribuição da

talassemia  $\alpha^0$  é mais restrita, apresentando uma alta prevalência no Sudeste Asiático e em parte da Bacia do Mediterrâneo (Figura 12) (WEATHERALL; CLEGG, 2001).



**Figura 12** - Distribuição mundial da talassemia alfa (WEATHERALL, 2001b)

Apesar da elevada frequência da talassemia alfa no Brasil, esta hemoglobinopatia ainda é pouco investigada, especialmente em nível molecular (SOUZA *et al.*, 2009).

Em Campinas, Região Sudeste do Brasil, SONATI *et al.* (1991), investigaram a frequência de talassemia alfa<sup>+</sup> em indivíduos negros, doadores de sangue, e verificaram que 21,3% eram heterozigotos e 2,1% eram homozigotos da deleção  $\alpha^{3.7}$ . Na mesma Região, BORGES *et al.* (2001) estudaram 339 indivíduos com microcitose e hipocromia sem anemia e encontraram prevalência de 49,9% de talassemia alfa, sendo 42,8% heterozigotos e 5,3% homozigotos da talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ). Entre os demais indivíduos com talassemia alfa, 1,5% eram heterozigotos da forma não-delecional.

No Sul do Brasil, Wagner *et al.* (2010) investigaram diferentes formas moleculares de talassemia alfa entre indivíduos afrodescendentes e eurodescendentes e verificaram que 23,1% e 4,5%, respectivamente, apresentaram a deleção  $-\alpha^{3.7}$ . As demais formas moleculares de talassemia alfa pesquisadas no estudo ( $-\alpha^{4.2}$ ;  $-\alpha^{20.5}$ ;  $--^{SEA}$ ;  $--^{MED}$ ) não foram encontradas.

Na Região Nordeste, COUTO *et al.* (2003) investigaram a frequência da deleção  $-\alpha^{3.7}$  em 106 grávidas da cidade de Salvador e encontraram 21,7% de heterozigose ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) e 0,9% de homozigose ( $-\alpha/-\alpha$ ). Na mesma capital, ADORNO *et al.* (2005) analisaram 514 amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos e observaram que 22,2% possuíam talassemia alfa  $^{3.7}$ , sendo 19,7% heterozigotos e 2,5% homozigotos.

No estado do Rio Grande do Norte, Bezerra (2009) investigou a presença da talassemia  $\alpha^+$  (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) em 319 indivíduos que apresentavam microcitose e/ou hipocromia e verificou a prevalência de 32,9%, sendo 29,1% heterozigotos e 3,8% homozigotos.

Diante da elevada prevalência da talassemia alfa observada em estudos já realizados, julgou-se relevante estabelecer a prevalência da talassemia<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) na população do estado do Rio Grande do Norte independentemente da presença de microcitose ou hipocromia.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Principal**

- Determinar a prevalência de talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3,7}$ ) na população adulta do estado do Rio Grande do Norte.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Verificar a prevalência de talassemia alfa entre os diferentes grupos étnicos;
- Identificar homozigotos e heterozigotos da deleção  $-\alpha^{3,7}$ ;
- Identificar a talassemia alfa<sup>+</sup> como causa de microcitose e hipocromia;
- Comparar os parâmetros hematológicos entre indivíduos com genótipo normal e os que apresentaram talassemia alfa<sup>+</sup>.

### 3. CAUSUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1. Determinação do Tamanho Amostral

O tamanho amostral foi calculado através da Amostra Aleatória Estratificada (AAE), em que se levou em consideração a população residente no estado do Rio Grande do Norte com idade entre 18 e 59 anos. Para obter a população-alvo, recorreu-se à Contagem Populacional realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) para o ano de 2007 (<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/default.shtm>).

Foi obtido um total de 1.706.851 habitantes entre 18 e 59 anos, distribuídos nas quatro Mesorregiões do estado do Rio Grande do Norte, conforme mostra a Tabela 1.

**Tabela 1** - População de 18 a 59 anos distribuída nas Mesorregiões do estado do Rio Grande do Norte

Mesorregião	População (*)
Leste	833.088
Agreste	212.095
Central	210.990
Oeste	450.678
<b>Total</b>	<b>1.706.851</b>

(\*) **Fonte:** IBGE (Contagem Populacional, 2007)

De cada Mesorregião referida, foram selecionados 17 municípios segundo os seguintes critérios: facilidade de acesso aos serviços de saúde para coleta do material para análise e representatividade populacional com relação à Mesorregião.

O cálculo para a obtenção da amostra total foi realizado através da AAE, levando-se em consideração a representatividade do município dentro de cada Mesorregião.



Adotou-se a seguinte fórmula para a obtenção da amostra:

$$n = \frac{\sum_{i=1}^L \frac{N_i^2 \hat{p}_i \hat{q}_i}{w_i}}{\frac{N^2 B^2}{Z_{\alpha/2}^2} + \sum_{i=1}^L N_i \hat{p}_i \hat{q}_i} \text{ onde,}$$

$n \rightarrow$  é o tamanho da amostra;

$N \rightarrow$  é a população-alvo;

$\hat{p} \rightarrow$  é a estimativa da proporção de pessoas portadoras da doença em estudo;

$\hat{q} \rightarrow$  é o complementar de  $p$ , ou seja,  $\hat{q} = 1 - \hat{p}$ ;

$w_i \rightarrow$  é a fração amostral que será alocada em cada estrato, que, neste caso, foi realizada através da alocação proporcional;

$B \rightarrow$  é a estimativa do erro, que, neste caso, foi de 5%;

$Z_{\alpha/2} \rightarrow$  é o valor tabelado da distribuição normal, levando-se em consideração o nível de confiança, que, neste caso, foi de 95%.

Para o cálculo da amostra, admitiu-se uma frequência de 25% de pessoas portadoras de talassemia alfa<sup>+</sup>, baseando-se em estudos já realizados em outras regiões do País (ADORNO *et al.*, 2005; COUTO *et al.*, 2003; SONATI *et al.*, 1991). Para tal, previu-se um limite sobre o erro de 5% e um intervalo de confiança de 95%. Obteve-se, portanto, uma amostra total de 620 sujeitos, distribuídos nos diversos municípios selecionados (Tabela 2).

Foi definido como tamanho amostral um total de 713 indivíduos considerando-se um aumento de 15% no tamanho da amostra calculada para corrigir pequenos problemas operacionais de perda de informações.

**Tabela 2** – Cálculo amostral da população de 18 a 59 anos representativa de cada Mesorregião

<b>Mesorregião</b>	<b>Município</b>	<b>População (*)</b>	<b>Amostra</b>
	Ceará-Mirim	34.721	21
	Macaíba	34.651	21
Leste	Natal	468.002	287
	Parnamirim	103.793	64
	Touros	15.079	9
Total		656.246	402
	João Câmara	15.618	10
	Santa Cruz	18.156	11
Agreste	Monte Alegre	10.716	7
	Nova Cruz	18.394	11
	Santo Antônio	11.124	7
Total		74.008	46
	Caicó	36.489	22
Central	Currais Novos	24.047	15
	Macau	15.781	10
Total		76.317	47
	Açú	29.764	18
	Apodi	20.300	12
Oeste	Mossoró	140.724	86
	Pau dos Ferros	15.351	9
Total		206.139	125
<b>Total Geral</b>		<b>1.012.710</b>	<b>620</b>

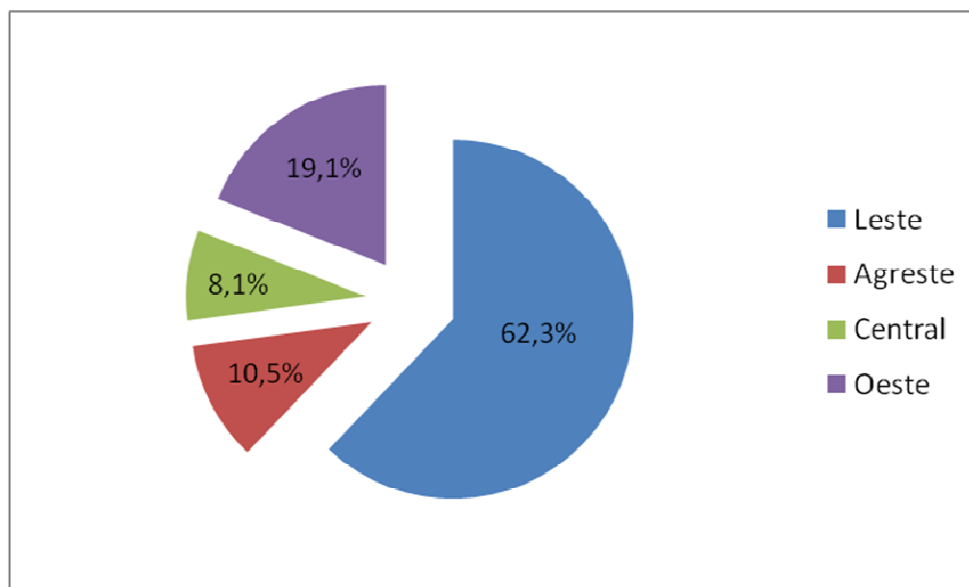
(\*) Fonte: IBGE (Contagem Populacional, 2007)

### 3.2. Caracterização da casuística

No período de maio de 2008 a outubro de 2010 foram coletadas amostras de sangue de 713 indivíduos do Estado do Rio Grande do Norte que se dirigiram às Unidades Básicas de Saúde, de cada município, para realização de exames de rotina.

No estudo, incluíram-se indivíduos de ambos os sexos, com idade compreendida entre 18 e 59 anos, não aparentados e naturais do estado do Rio Grande do Norte. Indivíduos que haviam realizado transfusão sanguínea nos três meses anteriores à coleta ficaram excluídos.

De acordo com as quatro Mesorregiões do estado do Rio Grande do Norte selecionadas para o estudo, foram coletadas amostras de 444 (62,3%) indivíduos residentes na Mesorregião Leste, 75 (10,5%) na Agreste, 58 (8,1 %) na Central e 136 (19,1%) na Oeste (Figura 14).



**Figura 13** – Distribuição dos 713 indivíduos de acordo com as Mesorregiões do estado do Rio Grande do Norte

O grupo étnico foi definido como branco, pardo e negro, pelo pesquisador, de acordo com a observação de características como cor da pele, traços faciais e textura do cabelo.

No momento da coleta, foi preenchida uma ficha de identificação contendo dados de identificação de cada participante, a qual foi utilizada posteriormente para anotações dos exames laboratoriais realizados (Apêndice 1).

O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário “Onofre Lopes”, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEP-HUOL), Protocolo nº 243/08 (Anexo 1).

Todos os participantes foram informados sobre os objetivos da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Apêndice 2).

### **3.3. Métodos**

#### **3.3.1. Obtenção das amostras**

As amostras de sangue periférico (aproximadamente 8 mL) foram obtidas através de punção venosa e distribuídas em dois tubos estéreis: um tubo com anticoagulante EDTA, na proporção de 1mg/mL de sangue, e outro tubo sem anticoagulante.

A amostra obtida com anticoagulante foi utilizada para a realização do eritrograma, eletroforese de hemoglobina, quantificação das hemoglobinas A<sub>2</sub> e Fetal e extração do DNA.

Para a obtenção do soro, centrifugou-se a amostra coletada sem anticoagulante a 1.500 g por 10 minutos (Centrífuga Quimis, Q222T, Brasil). O soro obtido foi transferido para um microtubo de 2 mL e estocado a -80°C até a determinação da ferritina sérica.

#### **3.3.2. Eritrograma**

O eritrograma foi realizado por contador automático de células modelo Micros 60 (ABX Diagnostics, Horiba, Tokyo).

#### **3.3.3. Eletroforese de hemoglobina**

Após preparo do hemolisado rápido em saponina a 1%, todas as amostras foram submetidas à eletroforese em pH alcalino (DACIE; LEWIS, 1995). Utilizaram-se fitas de acetato de celulose (Cellogel Electrophoresis Co. Milano, Itália) de 2,7 x 14 cm e tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,5<sup>1</sup>. A corrida eletroforética ocorreu sob uma diferença de potencial

---

<sup>1</sup> Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) pH 8,5: Tris-(hidroximetil)-aminometano 10,2g; Na<sub>2</sub>EDTA 0,6g; ácido bórico 3,2g; água destilada q.s.p. 1000mL

de 300 volts durante 30 minutos, utilizando-se cuba/fonte (TECNOW 7000, São Paulo, Brasil). A identificação das hemoglobinas foi realizada mediante comparação com padrões de hemoglobinas A, S e C.

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

#### **3.3.4. Quantificação das hemoglobinas A<sub>2</sub> e Fetal**

A quantificação das hemoglobinas A<sub>2</sub> e Fetal foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), utilizando-se o Sistema *Variant II* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). As análises foram realizadas no Laboratório de Hemoglobinopatias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas (Unicamp, São Paulo).

#### **3.3.5. Dosagem de ferritina sérica**

A determinação da ferritina sérica deu-se por quimioluminescência imunométrica em fase sólida com *kit* comercial (Ferritin, Euro Diagnostics Products Co., UK) em aparelho automatizado (Immulite, Diagnostics Products Co., USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

#### **3.3.6. Extração do DNA do sangue periférico**

A extração de DNA foi realizada através do *kit* “Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin” (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as recomendações do fabricante. Em um microtubo estéril de 1,5 mL foi adicionada uma alíquota de 200 µL de sangue total colhido com EDTA e a seguir a proteinase K e a solução de lise. A mistura foi homogeneizada em vórtex e incubada por 10 minutos em temperatura ambiente, com agitação intermitente, sendo depois transferida para uma microcoluna acoplada a um tubo coletor e centrifugada a 11.000 g por 1 minuto (Centrífuga Mikro-120, Hettich Zentrifugen). Após o

processo de lavagem da microcoluna, foi realizada a eluição, com a adição de um tampão de baixa força iônica previamente aquecido à 70°C. O DNA extraído foi armazenado em *freezer* -20°C.

### 3.3.7. Avaliação da integridade e quantificação do DNA

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese horizontal (cuba LCH-7x8, Locus Biotecnologia, Brasil), em gel de agarose 0,8%, sob diferença de potencial de 100V por 40 minutos (fonte APELEX OS-305, França). O tampão de corrida utilizado foi o TBE<sup>2</sup> 1X pH 8,0. Posteriormente à corrida, procedeu-se à coloração com solução de brometo de etídio 5µg/mL por 30 minutos e à visualização das bandas de DNA, por exposição à luz ultravioleta (SAMBROOK *et al.*, 1989) e fotodocumentação (Kodak Gel Logic 100 Image System, Alemanha).

A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria a 260 nm (espectrofotômetro FEMTO CIRRUS 80MB, Indústria e Comércio de Instrumentos, São Paulo, Brasil) e a sua pureza determinada pela relação  $A_{260/280}$  (SAMBROOK *et al.*, 1989).

### 3.3.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção da talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção - $\alpha$ <sup>3,7</sup>)

As amostras de DNA foram submetidas à reação de PCR, utilizando-se os iniciadores C<sub>2</sub><sup>3</sup> e C<sub>10</sub><sup>4</sup> (DODÉ *et al.*, 1992), que flanqueiam e amplificam fragmentos de 2,1 kb, quando o gene  $\alpha_1$  encontra-se íntegro, sem deleções, ou de 1,9 kb, quando o gene híbrido ( $\alpha_2\alpha_1$ ) está presente, configurando o portador de talassemia alfa<sup>+</sup>(deleção - $\alpha$ <sup>3,7</sup>). O iniciador C<sub>2</sub> liga-se exclusivamente ao gene  $\alpha_1$ , mais especificamente à região não-homóloga da fração não-

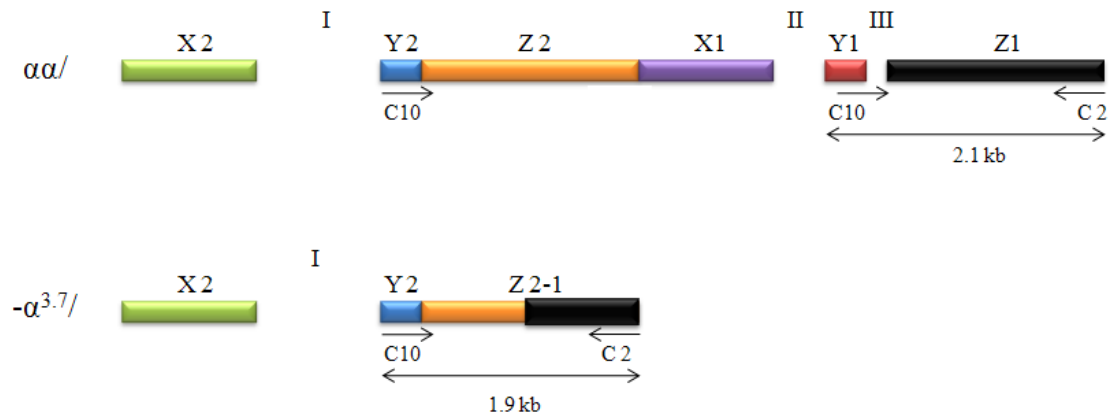
---

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

<sup>3</sup> C<sub>2</sub>: 5' CCATGCTGGCACGTTTCTGA 3'

<sup>4</sup> C<sub>10</sub>: 5' GATGCACCCACTGGACTCCT 3'

codificante 3', enquanto o iniciador C<sub>10</sub> anela-se à região homóloga Y de ambos os genes, conforme mostra a Figura 13.



**Figura 14** – Representação do pareamento dos *primers* nas regiões homólogas dos genes da globina alfa (adaptada de DODÉ *et al.*, 1992).

O protocolo da reação de PCR foi composto de *mix* de reagentes, ao qual foi adicionada uma alíquota de DNA (Tabela 3).

**Tabela 3** – Composição da reação na PCR

<b>Componentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
H <sub>2</sub> O (MiliQ Autoclavada)	12,75
Tampão alfa 1X <sup>5</sup>	2,5
DMSO 10%	2,5
dNTP (2 mM)	2,5
C <sub>2</sub> (10 mM)	1,0
C <sub>10</sub> (10 mM)	1,0
<i>Taq</i> DNA Polimerase (2U)	0,25
DNA	2,5
<b>Volume Final</b>	<b>25,0</b>

A reação de PCR foi processada em termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), onde foram realizados 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 56°C, por 1 minuto, e 72°C, por 1 minuto. Esses ciclos foram antecidos por um aquecimento a uma temperatura de 94°C, por 10 minutos, para desnaturação inicial, e seguidos de uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

### 3.3.9. Eletroforese dos produtos da PCR

Para visualização dos fragmentos amplificados, alíquotas de 5µL do produto da PCR foram misturadas a 5µL do tampão de amostra<sup>6</sup> e submetidas à eletroforese horizontal (cuba LCH 7x8, LOCCUS Biotecnologia, Brasil) em gel de agarose a 0,8%, utilizando-se tampão TBE 1X pH 8,0<sup>7</sup>, sob diferença de potencial de 100V, durante 1 hora e 30 minutos (fonte APELEX OS-305, França).

Em cada gel foram aplicados 5 µL (0,25 µg/µL) do padrão de tamanho molecular “λ DNA/Hind III Fragments” (Invitrogen), para determinação do tamanho do fragmento amplificado, um controle positivo (amostra de um heterozigoto da deleção -α<sup>3.7</sup>) e um branco

<sup>5</sup> Tampão Alfa: 67mM Tris-HCl, pH 8,8; 16,6 mM (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>; 2,5mM MgCl<sub>2</sub>; 67µM Na<sub>2</sub>EDTA; 16,0 µg/mL BSA; 10 mM β-mercaptoetanol

<sup>6</sup> Tampão de amostra: 40% de sacarose, 0,25% de azul de bromofenol em água.

<sup>7</sup> Tampão TBE 1X: tris base 0,089M, ácido bórico 0,089M, EDTA 0,2mM.



(*mix* dos reagentes de PCR sem a inclusão do DNA), para atestar ausência de contaminação. Após corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 5 $\mu$ L/mL por 30 minutos (SAMBROOK *et al.*, 1989), e, em seguida, exposto a luz ultravioleta em transiluminador *Sprectroline Ultraviolete Transilluminator*, para posterior fotodocumentação (*Kodak Gel Logic 100 Image System*, Alemanha).

### 3.3.10. Análise estatística

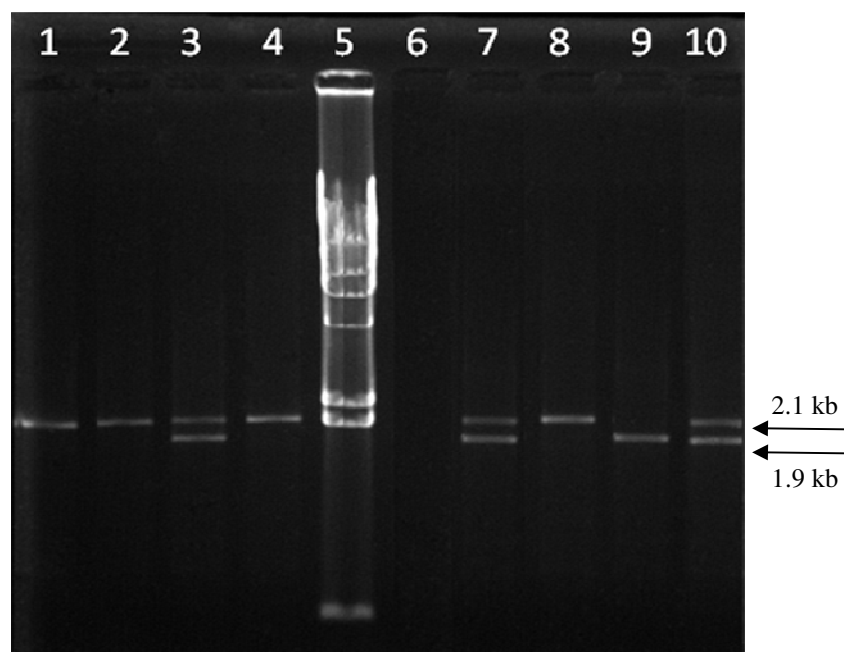
Para análise dos dados, foram utilizados os *softwares* “Statistica” versão 7.0 e “Microsoft Office Excel 2007”. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

As variáveis quantitativas estão descritas em tabelas, com seus valores médios e respectivos desvios-padrão. A distribuição da normalidade das variáveis quantitativas e a homogeneidade das variáveis foram testadas através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respectivamente. Atendidos esses pressupostos, utilizou-se o teste estatístico t de *Student* para verificar se havia diferença entre os parâmetros hematológicos dos indivíduos com genótipo normal e os heterozigotos para talassemia alfa<sup>+</sup>.

#### 4. RESULTADOS

Foram coletadas amostras de 713 indivíduos, não aparentados, dos quais 407 (57,1%) eram do sexo feminino e 306 (42,9%) do sexo masculino com faixa etária entre 18 e 59 anos (média de  $39,1 \pm 11,1$  anos e mediana de 40,0 anos), sendo que o grupo feminino apresentou média de idade  $38,3 \pm 11,1$  anos e o masculino  $40,1 \pm 11,1$  anos. Quanto à etnia, 333 (46,7%) indivíduos eram brancos, 308 (43,2%) pardos e 72 (10,1%) negros.

A talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) foi investigada em todos os participantes da pesquisa (713 indivíduos) através da técnica da reação da polimerase em cadeia. A identificação da presença da deleção  $-\alpha^{3.7}$  e a determinação do genótipo basearam-se na diferença de tamanho entre os fragmentos amplificados e, por conseguinte, na localização destes comparado a um padrão de tamanho molecular, quando submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%. O gene híbrido, presente em indivíduos que apresentam a deleção  $-\alpha^{3.7}$  possui 1.9 kb; enquanto o gene não deletado, 2.1 kb. O padrão de tamanho molecular utilizado foi o “ $\lambda$  DNA/Hind III Fragments”, cujas bandas de 2.3 e 2.0 kb permitem a identificação dos possíveis genótipos encontrados na talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) (Figura 15).



**Figura 15** - Visualização dos produtos de PCR para a deleção  $-\alpha^{3.7}$ . Eletroforese em gel de agarose 0,8% após coloração com brometo de etídeo e visualização em luz UV. As colunas 1, 2, 4 e 8 correspondem às amostras normais para deleção ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ); as colunas 3 e 7, às amostras heterozigotas ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ); a coluna 9, à amostra homozigota ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ); a 5 corresponde ao padrão de tamanho molecular ( $\lambda$  DNA/Hind III fragments); a 6, ao branco e a 10, ao controle positivo heterozigoto.

Dos 713 indivíduos investigados, 633 (88,8%) apresentaram genótipo normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), enquanto 80 apresentaram a deleção  $-\alpha^{3.7}$ , representando uma prevalência de 11,2% de talassemia alfa<sup>+</sup> na população do estado do Rio Grande do Norte, sendo 79 (11,1%) indivíduos heterozigotos e um (0,1%) homozigoto (Tabela 4). A distribuição dos genótipos entre os participantes do estudo manteve-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p=0,365$  com 1 grau de liberdade) e a frequência do alelo  $-\alpha^{3.7}$  foi de 0,06 (81 em 1430 cromossomos).

**Tabela 4** – Distribuição dos 713 indivíduos de acordo com genótipo encontrado

Genótipo	Prevalência	
	N	%
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	633	88,8
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	79	11,1
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	1	0,1
Total	713	100

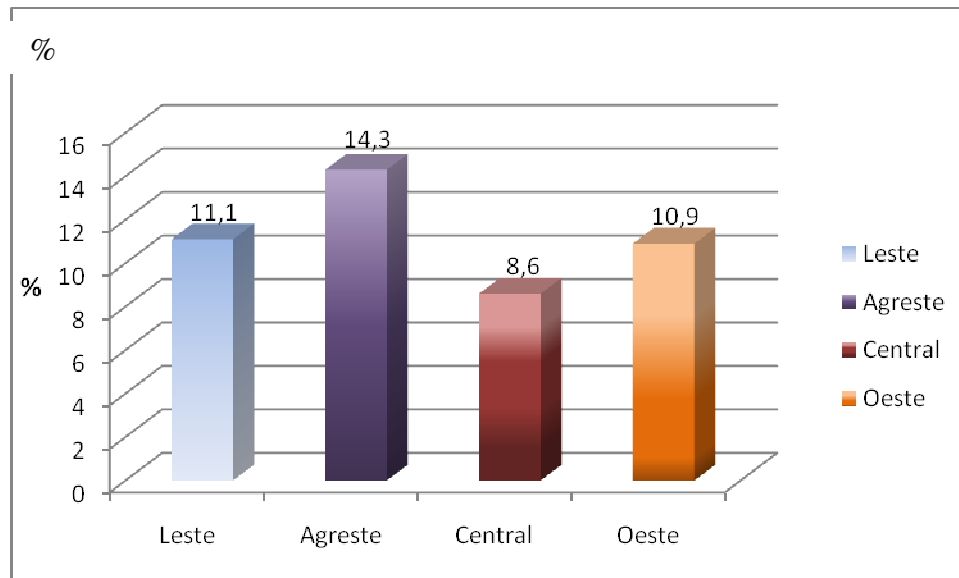
Dos 80 indivíduos que apresentaram a talassemia alfa<sup>+</sup>, 38 (47,5%) eram do sexo masculino e 42 (52,5%) do sexo feminino. Excetuando um indivíduo do sexo feminino que apresentou homozigose da talassemia alfa<sup>+</sup> ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ), todos os demais foram heterozigotos da deleção ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ).

A Tabela 5 apresenta a prevalência de talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) entre os diferentes grupos étnicos. Observou-se que os indivíduos afrodescendentes - pardos e negros - apresentaram um maior percentual de heterozigose da deleção (12,3% e 12,5%, respectivamente). Dos 333 indivíduos brancos, 32 (9,6%) eram heterozigotos da talassemia alfa<sup>+</sup>. Foi encontrado um homozigoto ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ) pertencente à etnia parda.

**Tabela 5** - Prevalência da talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) entre os 713 indivíduos 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	333	301	90,4	32	9,6	-	-
Pardo	308	269	87,4	38	12,3	1	0,3
Negro	72	63	87,5	9	12,5	-	-
<b>Total</b>	<b>713</b>	<b>633</b>	<b>88,8</b>	<b>79</b>	<b>11,1</b>	<b>1</b>	<b>0,1</b>

A presença da talassemia alfa<sup>+</sup> nas diferentes Mesorregiões encontra-se representada na Figura 16. Observou-se que a prevalência nas Mesorregiões Leste, Central e Oeste foi de 11,1% (49/441), 8,6% (5/58) e 10,9% (15/137), respectivamente, enquanto na Mesorregião Agreste, 14,3% (11/77) apresentaram a deleção  $-\alpha^{3.7}$ .



**Figura 16** – Prevalência da talassemia alfa<sup>+</sup> de acordo com as Mesorregiões do estado do Rio Grande do Norte

Dos 713 indivíduos analisados, 699 (98,0%) apresentaram perfil eletroforético normal (Hb AA) e 14 (2,0%) apresentaram algum tipo de variante da hemoglobina, sendo: 1,5% AS, 0,4% AC e 0,1% AD. Apenas um indivíduo apresentou associação de talassemia alfa<sup>+</sup> com a

variante AS. Todas as amostras analisadas apresentaram valores de hemoglobina A<sub>2</sub> inferiores a 4%.

A comparação dos parâmetros hematológicos entre os indivíduos normais e heterozigotos da talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção - $\alpha^{3.7}$ ) encontra-se na Tabela 6. Foi detectada uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nos seguintes parâmetros: número de hemácias, VCM, HCM e hemoglobina A<sub>2</sub> para ambos os gêneros, além da concentração de hemoglobina para o gênero feminino. Observou-se que os indivíduos portadores da deleção - $\alpha^{3.7}$  possuíram valores médios de VCM, HCM e A<sub>2</sub> mais baixos que os indivíduos normais, enquanto o número de hemácias apresentou-se mais elevado.

Os dados laboratoriais dos 80 indivíduos com talassemia alfa<sup>+</sup> encontram-se no Apêndice 3.

As diferenças encontradas entre os grupos analisados (genótipo normal e heterozigoto da talassemia alfa) para os parâmetros VCM, HCM e hemoglobina A<sub>2</sub> estão demonstradas através do gráfico *box-plot* nas Figuras 18 e 19. Observando estas figuras, percebe-se que os menores valores medianos para os três parâmetros foram encontrados no grupo de indivíduos heterozigotos da deleção - $\alpha^{3.7}$ .

**Tabela 6** – Comparação dos parâmetros hematológicos (média  $\pm$  desvio padrão) entre indivíduos com genótipo normal e heterozigoto da deleção  $-\alpha^{3.7}$

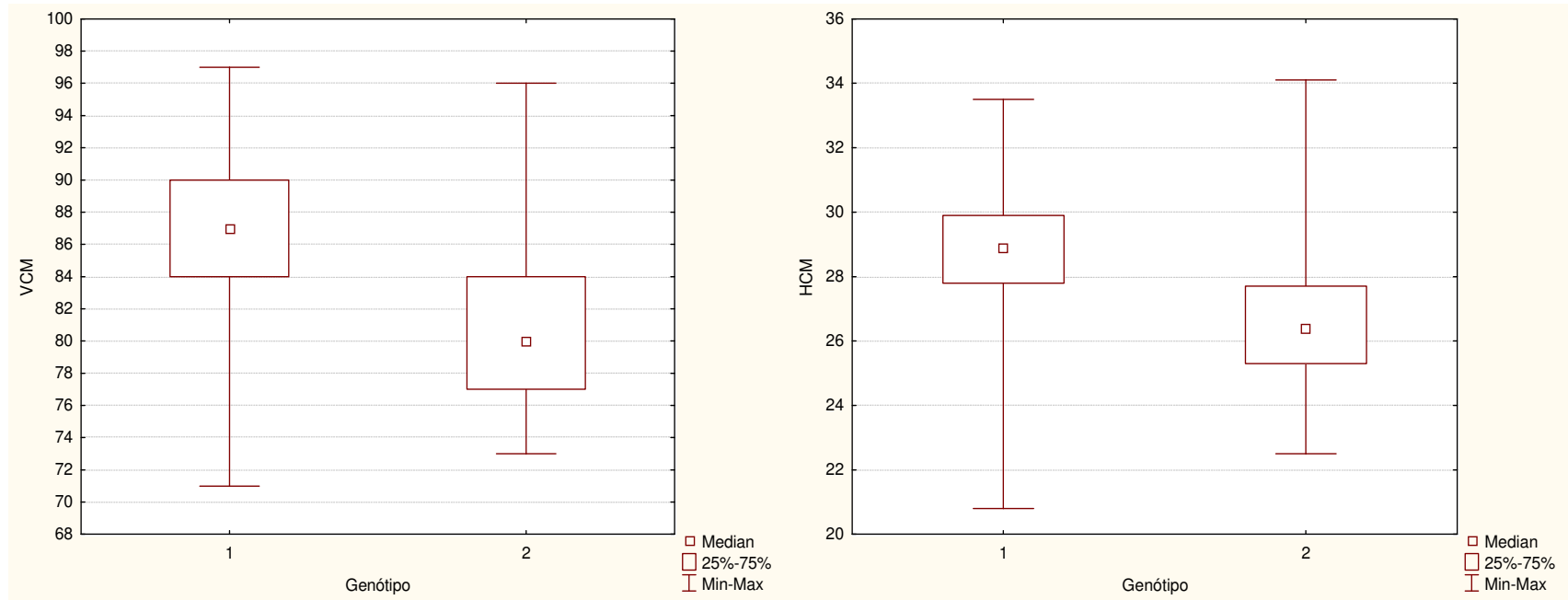
Genótipo	Sexo		Parâmetros hematológicos							
			Hemoglobina (g/dL)		Hemácias ( $\times 10^{12}/L$ )		VCM (fL)	HCM (pg)	Hb A <sub>2</sub>	Hb Fetal
	M	F	M	F	M	F				
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ (n = 623*)	265	358	14,6 $\pm$ 1,1	12,8 $\pm$ 1,0	5,05 $\pm$ 0,41	4,46 $\pm$ 0,36	86,4 $\pm$ 4,8	28,8 $\pm$ 1,9	2,8 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,3
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ (n = 77*)	38	39	14,4 $\pm$ 1,0	12,3 $\pm$ 0,8	5,46 $\pm$ 0,50	4,79 $\pm$ 0,33	80,5 $\pm$ 4,5	26,18 $\pm$ 1,7	2,6 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,3
p valor(**)			p = 0,211	p = 0,003	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,007	p = 0,750
Valores de referência <sup>†</sup>			15,0 $\pm$ 2,0	13,5 $\pm$ 1,5	5,00 $\pm$ 0,5	4,30 $\pm$ 0,5	92 $\pm$ 0,6	29,5 $\pm$ 2,5	2,4 $\pm$ 1,4 <sup>††</sup>	<1,0

M: masculino; F: feminino

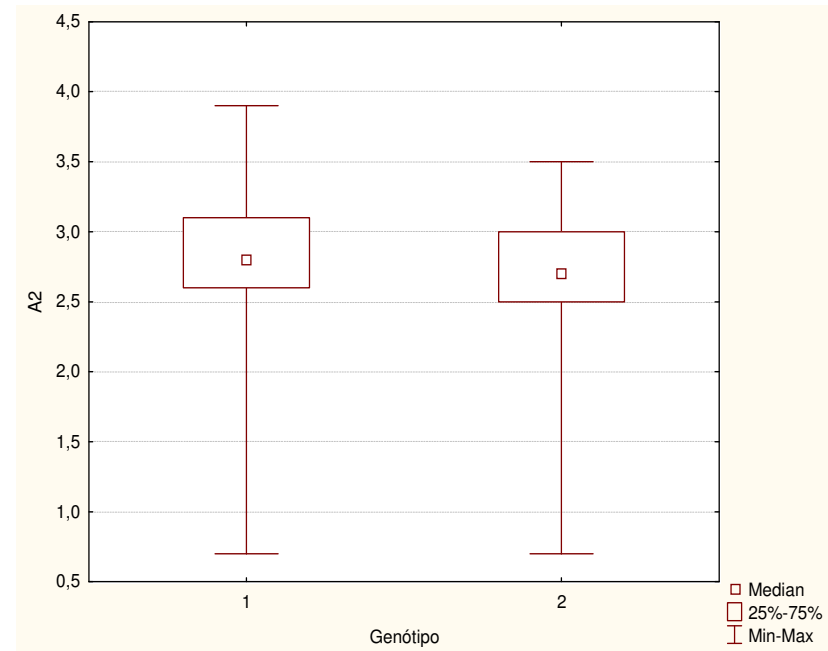
\*Foram excluídas da comparação 10 amostras com genótipo normal e 2 amostras com talassemia alfa<sup>+</sup> devido hemólise e/ou coagulação da amostra

\*\* p-valor do teste t de *Student* para amostras independentes.

<sup>†</sup> DACIE, J.V., LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. 8.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995; <sup>††</sup> BEZERRA, T.M.M. Quantificação de hemoglobina A<sub>2</sub> por eletroforese em acetato de celulose. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 20, n. 5, p. 143-145, 1984



**Figura 17:** *Box-plot* representando as diferenças de volume corpuscular média (VCM) e hemoglobina corpuscular médio (HCM) encontrada entre indivíduos normais (genótipo 1) e heterozigotos (genótipo 2) da deleção  $-\alpha^{3.7}$ . O quadro central da caixa representa a mediana do conjunto de dados, ou seja, o ponto em que os dados estão divididos em duas partes iguais, de modo que 50% deles estão acima e 50% abaixo deste ponto. O contorno inferior da caixa representa o 1º quartil, onde 25% dos dados localizam-se abaixo dele e o contorno superior da caixa, o 3º quartil, no qual 75% dos dados estão abaixo deste quartil. As hastes representam os limites inferiores e superiores da distribuição. Analisando a posição das medianas, ficam claras as diferenças entre os grupos.



**Figura 18:** *Box-plot* representando as diferenças de hemoglobina A<sub>2</sub> encontradas entre indivíduos normais (genótipo 1) e heterozigotos (genótipo 2) da deleção  $-\alpha^{3.7}$ . O quadro central da caixa representa a mediana do conjunto de dados, ou seja, o ponto em que os dados estão divididos em duas partes iguais, de modo que 50% dos dados estão acima e abaixo deste ponto. O contorno inferior da caixa representa o 1º quartil, onde 25% dos dados localizam-se abaixo dele e o contorno superior da caixa, o 3º quartil, no qual 75% dos dados estão abaixo deste quartil. As hastes representam os limites inferiores e superiores da distribuição. Analisando a posição das medianas, ficam claras as diferenças entre os grupos.



A fim de se verificar a contribuição da talassemia alfa como fator causal de microcitose e/ou hipocromia, procedeu-se à divisão dos 701 indivíduos, cujos parâmetros hematológicos foram determinados em quatro grupos, a saber: I) indivíduos com microcitose e/ou hipocromia com anemia; II) indivíduos com microcitose e/ou hipocromia sem anemia; III) indivíduos sem microcitose e/ou hipocromia com anemia e IV) indivíduos sem alteração hematológica (Tabela 7).

Foram considerados microcitose e hipocromia, valores de volume corpuscular médio (VCM) abaixo de 80 fL e hemoglobina corpuscular média inferior a 27 pg, respectivamente. A presença ou não de anemia foi determinada de acordo com o critério estabelecido pela Organização Mundial de Saúde no qual preconiza valores mínimos de hemoglobina de 13g/dL e 12g/dL para o sexo masculino e feminino, respectivamente. (OMS, 1968).

**Tabela 7** – Distribuição dos 701 indivíduos<sup>(\*)</sup> de acordo com a presença de microcitose, hipocromia e/ou anemia

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b><math>\alpha\alpha/\alpha\alpha</math></b>	<b><math>-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha</math></b>	<b><math>-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}</math></b>
(I) Com microcitose e/ou hipocromia com anemia	33	20 (60,6%)	12 (36,4%)	1 (3,0%)
(II) Com microcitose e/ou hipocromia sem anemia	101	56 (55,4%)	45 (44,6%)	
(III) Sem microcitose e/ou hipocromia com anemia	49	48 (98,0%)	1 (2,0%)	
(IV) Sem alteração hematológica	518	499 (96,3%)	19 (3,7%)	

\*Foram excluídas 10 amostras de indivíduos com genótipo normal e 2 amostras de indivíduos com talassemia alfa<sup>+</sup> devido hemólise e/ou coagulação da amostra

Dos 33 indivíduos que apresentaram microcitose e/ou hipocromia com anemia, 13 (39,4%) tinham a deleção  $-\alpha^{3.7}$ , sendo 12 (36,4%) em heterozigose e apenas um (3,0%) em homozigose. Entre os indivíduos que apresentaram microcitose e/ou hipocromia sem anemia, 45 (44,6%) eram portadores de talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ).

No grupo composto por indivíduos sem alterações nos índices hematológicos (grupo IV) observou-se a presença da deleção  $-\alpha^{3.7}$  em 19 (3,7%) indivíduos.

Observou-se que 69,2% (54/78) dos indivíduos com talassemia alfa<sup>+</sup> apresentaram dosagem de ferritina dentro dos valores de referência, 6,4% (5/78) abaixo e 24,4% (19/78) acima dos limites de normalidade.

Dentre os cinco indivíduos que apresentaram deficiência de ferro, um não apresentou alterações nos índices hematológicos, quatro apresentaram microcitose e/ou hipocromia, sendo dois com anemia e dois sem anemia.

Dos 19 indivíduos que apresentaram valores de ferritina acima dos limites de normalidade, 13 apresentaram microcitose e/ou hipocromia (quatro com anemia e nove sem anemia) e seis indivíduos não apresentaram alteração hematológica.

## 5. DISCUSSÃO

A talassemia alfa é a doença monogênica mais comum, geralmente resultante de deleções que envolvem um ou ambos os genes alfa do cromossomo 16p.13.3, acarretando diminuição ( $\alpha^+$ ) ou ausência ( $\alpha^0$ ) de síntese de cadeias alfa globina. No mundo, as deleções mais comuns são as que envolvem um único gene alfa,  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ . Além destas, no Sudeste Asiático são frequentes as deleções de dois genes alfa,  $--^{SEA}$  e  $--^{FIL}$ , e no Mediterrâneo,  $--^{MED}$  e  $-\alpha^{20.5}$  (CHONG *et al.*, 2000).

A deleção de 3.7 kb de DNA (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) é difundida em todo o mundo possuindo maior prevalência na África, Índia, Nepal e alguns países do Mediterrâneo. Já a deleção  $-\alpha^{4.2}$  é mais comum na Índia, Melanésia, Tailândia e Sudeste Asiático (NAVA *et al.*, 2006).

Na população mundial, diversos autores investigaram a prevalência de talassemia alfa, sobretudo em indivíduos com microcitose e/ou hipocromia, contudo somente alguns estudos é que determinaram a frequência do alelo  $-\alpha^{3.7}$  na população geral. Entre esses, pode-se citar Khan, *et al.*, 2003; Mesbah-Amroun *et al.*, 2008; Nadkarni *et al.*, 2008; Noguera; Bragos; Milani, 2002. A frequência da deleção  $-\alpha^{3.7}$  variou de 12,9%, em indivíduos da região da Índia (NADKARNI *et al.*, 2008), a 2,25%, na população da Argentina (NOGUERA; BRAGOS; MILANI, 2002).

A prevalência da talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) na população geral do estado do Rio Grande do Norte, observada no presente estudo, foi de 11,2% (80/713), sendo 11,1% (79/713) de heterozigotos ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ) e 0,1% (1/713) de homozigoto ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ).

Estudos já realizados na população brasileira (ADORNO *et al.*, 2005; BEZERRA, 2009; BORGES *et al.*, 2001; COUTO *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2009; SONATI *et al.* 1991; WAGNER *et al.*, 2010) mostraram uma elevada prevalência da deleção  $-\alpha^{3.7}$ .

Em Campinas, Região Sudeste do Brasil, Sonati *et al.* (1991) investigaram a frequência de talassemia alfa<sup>+</sup> em indivíduos negros, doadores de sangue, e verificaram que 21,3% eram heterozigotos e 2,1%, homozigotos, da deleção  $-\alpha^{3.7}$ . Na mesma região, Borges *et al.* (2001) estudaram 339 indivíduos com microcitose e hipocromia sem anemia e encontraram uma prevalência de 48,1% de talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ), sendo 42,8% de indivíduos heterozigotos e de 5,3% homozigotos.

Na Região Nordeste, Couto *et al.* (2003) investigaram a frequência da deleção  $-\alpha^{3.7}$  em 106 grávidas da cidade de Salvador e encontraram 21,7% de heterozigose ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) e 0,9% de homozigose ( $-\alpha/-\alpha$ ). Na mesma capital, Adorno *et al.* (2005), analisaram 514 amostras de

sangue de cordão umbilical de recém-nascidos e observaram que 22,2% possuíam talassemia alfa (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ), sendo 19,7% de heterozigotos e 2,5% de homozigotos.

Souza *et al.* (2009), na Região Norte, investigando a deleção  $-\alpha^{3.7}$  em pacientes atendidos no Hospital Municipal de Santarém, Pará, e verificaram uma prevalência de 12,7% de indivíduos heterozigotos e 0,5% de indivíduo homozigoto para talassemia alfa<sup>+</sup>.

No estado do Rio Grande do Norte, Bezerra (2009), investigando a presença da talassemia  $\alpha^+$  (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) em 319 indivíduos que apresentavam microcitose e/ou hipocromia, verificou a prevalência de 32,9%, sendo 29,1% de heterozigotos e 3,8% de homozigotos.

Em estudo recente realizado na Região Sul do Brasil, Wagner *et al.* (2010) investigaram diferentes formas moleculares de talassemia alfa em 493 indivíduos, porém somente o alelo  $-\alpha^{3.7}$  foi detectado. Entre os 201 eurodescendentes 4,5% eram heterozigotos da talassemia alfa ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ), enquanto, dos 191 afrodescendentes, 21,5% eram heterozigotos e 1,6%, homozigotos.

Fundamentando a relação entre a talassemia alfa<sup>+</sup> e a população afrodescendente, Danquah & Mockenhaupt (2008) afirmam que, em alguns países da África, a deleção  $-\alpha^{3.7}$  é superior a 60%. Beutler & West (2005) investigaram a deleção  $-\alpha^{3.7}$  em 598 indivíduos afro-americanos e observaram a prevalência de 30,8%, sendo 27,8% de heterozigotos ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ) e 3,0% de homozigotos ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ) para a deleção. Nava *et al.*, (2006), realizaram um estudo com a população afro-mestiça no México e observaram que 19% dos pacientes apresentaram heterozigose para a deleção.

No presente estudo, de acordo com a distribuição étnica dos participantes da pesquisa, observou-se uma maior prevalência de talassemia alfa<sup>+</sup> nos indivíduos afrodescendentes, sendo 12,3% pertencentes à etnia parda e 12,5% à etnia negra.

Durante a colonização, ameríndios, europeus e africanos representaram os principais povos responsáveis pela heterogeneidade da população brasileira. De acordo com Callegari-Jacques & Salzano (1999), dos imigrantes que chegaram ao Brasil entre 1500 e 1972, 58% eram descendentes de europeus, 40% africanos e 2% eram asiáticos. A ocupação desses três grandes componentes ancestrais ocorreu de forma distinta no Brasil. Os maiores percentuais de afrodescendentes (negros e pardos) estão localizados nas regiões Norte (68,97%) e Nordeste (65,8%), enquanto nas regiões Sul e Sudeste, os brancos correspondem a 83,6% e 62,4%, respectivamente (ABE-SANDES *et al.*, 2010).

A cidade do Natal, capital do estado do Rio Grande do Norte, foi fundada em 1599 pelos portugueses, embora outros europeus, incluindo holandeses e franceses, também tenham

colonizado a antiga capitania do Rio Grande. Somado a estes, outras raças contribuíram para a formação do povo do Rio Grande do Norte, como os africanos, provenientes principalmente de Congo, Angola e Guiné e os próprios nativos pertencentes às tribos dos Potiguares (Tupi) e Cariri (ETTINGER et al., 2009).

Contudo, a influência da raça africana na composição étnica da população do Rio Grande do Norte não foi tão elevada comparada à outros Estados do Nordeste, sobretudo Salvador, uma vez que não recebeu grandes quantidades de escravos no período da Colonização. A pouca influência da raça negra na formação étnica potiguar, foi devido à ausência de portos para receber e comercializar escravos negros e à pecuária, atividade econômica aqui instalada, que não dependia tanto da mão de obra escrava (CASCUDO, 1984; MONTEIRO, 2000).

O grau influência da raça africana na composição étnica da população do Rio Grande do Norte justifica a menor prevalência da talassemia alfa<sup>+</sup> nos afrodescendentes em relação aos demais estudos.

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.

No Brasil, Sonati *et al.* (1991) constataram a deleção  $-\alpha^{3.7}$  em 23,4% dos doadores afrodescendentes da cidade de Campinas, São Paulo. Um estudo realizado por Adorno *et al.* (2005) na cidade de Salvador também observaram prevalências elevadas desta deleção entre os grupos de negros e mulatos (31,8% e 50%, respectivamente).

A talassemia alfa<sup>+</sup> caracteriza-se por leve microcitose e hipocromia, níveis reduzidos de hemoglobina e número aumentado de hemácias, comparado aos parâmetros do indivíduo normal, sendo essas modificações mais acentuadas no indivíduo homozigoto que no heterozigoto da talassemia alfa<sup>+</sup> (DANQUAH; MOCKENHAUPT, 2008). Ao comparar os parâmetros hematológicos entre os indivíduos com genótipo normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) e os heterozigotos da deleção  $-\alpha^{3.7}$  ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ), constatou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no número de hemácias, VCM, HCM e HbA<sub>2</sub>, além da dosagem de hemoglobina para o sexo feminino.

Adorno *et al.*, (2005) realizaram a comparação dos índices hematológicos entre recém-nascidos portadores da deleção  $-\alpha^{3.7}$  e indivíduos normais e verificaram uma diferença estatisticamente significativa em todos os parâmetros hematológicos analisados (número de

hemácias, hemoglobina, VCM e HCM), exceto CHCM. Souza *et al.*, (2009) também compararam os parâmetros hematológicos de indivíduos normais e heterozigotos e observaram uma diferença estatisticamente significativa na dosagem de hemoglobina, VCM e HCM. Estes autores não realizaram a comparação do número de hemácias.

Diversos estudos têm investigado a deleção  $-\alpha^{3.7}$  em indivíduos com microcitose e/ou hipocromia (BEZERRA; 2009; BORGES *et al.*; 2001; RAHIM, 2009; SANKAR *et al.*, 2006; WAGNER, 2010).

Estudos desenvolvidos na Ásia investigaram esta deleção em indivíduos com microcitose, hipocromia e anemia e a prevalência da deleção variou de 12,7% (SANKAR *et al.*, 2006) a 20,3% (RAHIM, 2009).

No Brasil, mais especificamente na Região Norte, Souza *et al.*, (2009) observaram a deleção  $-\alpha^{3.7}$  em 20,4% dos indivíduos com anemia microcítica e hipocrômica e em 9,1% dos indivíduos com microcitose e hipocromia sem anemia.

O perfil dos participantes do estudo em pauta, quanto à presença de microcitose, hipocromia e/ou anemia, foi estabelecido após a divisão em grupos. Entre os indivíduos com microcitose, hipocromia sem anemia, 44,6% apresentaram talassemia alfa<sup>+</sup>. Resultados semelhantes foram observados por Borges *et al.* (2001), que verificaram uma prevalência de talassemia alfa<sup>+</sup> ( $-\alpha^{3.7}$ ) em 48,1% dos indivíduos com microcitose e hipocromia sem anemia. Os elevados percentuais de talassemia alfa<sup>+</sup> em indivíduos com microcitose e/ou hipocromia enfatizam a importância da deleção  $-\alpha^{3.7}$  como possível causa dessas alterações hematológicas.

Vale ressaltar que o presente estudo identificou a deleção  $-\alpha^{3.7}$  em 3,7% dos indivíduos sem alterações hematológicas. Resultados semelhantes foram também observados em estudo realizado por Souza *et al.*, (2009).

As alterações nos índices hematológicos apresentadas pelos heterozigotos  $\alpha^+$  são mínimas, com *borderline* nos limites inferiores e, algumas vezes, até mesmo normais, dificultando assim a detecção dos portadores da deleção  $-\alpha^{3.7}$ , frequentemente realizada durante triagens moleculares para tal fim (BIRGENS; LJUNG, 2007; HARTEVELD; HIGGS, 2010).

Dentre os participantes da pesquisa, 633 indivíduos não apresentaram talassemia alfa<sup>+</sup> ocasionada pela deleção de 3.7 kb. Entretanto, há possibilidade da existência de alguma outra forma de talassemia alfa, sobretudo naqueles indivíduos com microcitose e/ou hipocromia.

Além da deleção  $-\alpha^{3.7}$ , estudos realizados no Brasil também evidenciaram as formas deletoriais  $--^{MED}$  (WENNING, *et al.*, 2000; BORGES, *et al.*, 2001) e  $--^{20.5}$  (WENNING, *et*

*al.*,2000) e a não-delecional  $\alpha^{\text{HphI}}\alpha$  (WENNING, *et al.*, 2000; BORGES, *et al.*,2001) embora em pequenas proporções.

O presente trabalho investigou a forma molecular da talassemia alfa de maior prevalência em todo o mundo. O estudo corresponde a um dos primeiros trabalhos a investigar a talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) na população geral do estado do Rio Grande do Norte, cujos resultados obtidos revelam uma elevada prevalência dessa condição em nossa população.

Embora os indivíduos heterozigotos da talassemia alfa sejam clinicamente normais e não necessitem de tratamento, é importante reconhecer essa condição a fim de que seja elucidada a etiologia da microcitose e/ou hipocromia, muitas vezes confundida e tratada como anemia por deficiência de ferro.

## 6. CONCLUSÕES

- A prevalência da talassemia alfa<sup>+</sup> na população do Estado do Rio Grande do Norte foi 11,2%, sendo 11,1% na forma heterozigótica e 0,1% na homozigótica.
- Quanto à etnia os indivíduos brancos apresentaram uma prevalência de 9,6%, enquanto que os pardos e negros apresentaram um maior percentual de heterozigotos para a deleção  $-\alpha^{3.7}$  (12,3% e 12,5%, respectivamente).
- Entre os indivíduos que apresentaram microcitose e/ou hipocromia 42,5% eram heterozigotos da talassemia alfa<sup>+</sup>.
- Os resultados obtidos revelam a elevada prevalência da talassemia alfa<sup>+</sup> em nossa população evidenciando a importância da investigação desta condição a fim de elucidar a etiologia da microcitose e/ou hipocromia.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE-SANDES, K.; BONFIM, T. F.; MACHADO, T. M. B.; et al. Ancestralidade Genômica , Nível Socioeconômico e Vulnerabilidade ao HIV /Aids na Bahia , Brasil. **Saúde e Sociedade**, v. 19, n. 2, p. 75-84, 2010.

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.

BANK, A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. **Blood**, v. 15, n. 107, p. 435-443, 2005.

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

BEUTLER, E.; WEST, C. Hematologic differences between African-Americans and whites: the roles of iron deficiency and alpha-thalassemia on hemoglobin levels and mean corpuscular volume. **Blood**, v. 106, n. 2, p. 740-745, 2005.

BEZERRA, C. M. **Diagnóstico molecular da talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) em indivíduos com microcitose e/ou hipocromia atendidos no Hemocentro Dalton Barbosa Cunha em Natal, Rio Grande do Norte.** 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

BIRGENS, H.; LJUNG, R. The thalassaemia syndromes. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 67, n. 1, p. 11-26, 2007.

BORG, J.; GEORGITSI, M.; ALEPOROU-MARINO, V.; KOLLIA, P.; PATRINOS, G. P. Genetic recombination as a major cause of mutagenesis in the human globin gene clusters. **Clin. Biochem.**, v. 42, n. 18, p. 1839-50, 2009.

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. 759-62, 2001.

CALLEGARI-JACQUES, S. M.; SALZANO, F. M. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. **Ciência e Cultura**, v. 51, p.166-174, 1999.

CANÇADO, R. D. Talassemias alfa. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 2, p. 86-87, 2006.

CASCUDO, L. C. **História do Rio Grande do Norte**. 2 ed. Natal: Fundação José Augusto, 1984.

CHONG, S. S.; BOEHM, C. D.; HIGGS, D. R.; CUTTING, G. R. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. **Blood**, v. 95, n. 1, p. 360-362, 2000.

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

CLARK, B. E.; THEIN, S. L. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. **Clin. Lab. Haematol.**, v. 26, n. 3, p. 159-76, 2004.

CLARKE, G. M.; HIGGINS, T. N. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. **Clin. Chem.**, v. 46, n. 8, p. 1284-90, 2000.

COUTO, F. D.; ALBUQUERQUE, A. B. L.; ADORNO, E. V.; MOURA NETO, J. P.; FREITAS A. 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.

DANQUAH, I.; MOCKENHAUPT, F. P.  $\alpha^+$ -thalassaemia and malarial anaemia. **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 11, p. 479-481, 2008.

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

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, 1992.

ETTINGER, N. A.; DUGGAL, P.; BRAZ, R. F. S.; et al. Genetic admixture in brazilians exposed to infection with *Leishmania chagasi*. **Ann. Hum. Genet.**, v. 73, p. 1469-1809, 2009.

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.

GIAMBONA, A.; PASSARELLO, C.; RENDA, D.; MAGGIO, A. The significance of the hemoglobin A<sub>2</sub> value in screening for hemoglobinopathies. **Clin. Biochem.**, v. 42, n. 18, p. 1786-1796, 2009.

GOH, S. H.; LEE, Y. T.; BHANU, N. V. A newly discovered human alpha-globin gene. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1466-1472, 2005.

SOUZA, A. E. S.; TAKANASHI, S. Y. L.; CARDOSO, G.; GUERREIRO, J. F.  $\alpha$ -thalassemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian Amazon region: Santarém, Pará State. **Genet. Mol. Res.**, v. 8, n. 2, p. 477-481, 2009.

HARTEVELD, L. C.; HIGGS, D. R.  $\alpha$ -thalassaemia. **Orphanet J. Rare Dis.**, v. 5, n. 13, p. 1-21, 2010.

HIGGS, D R; WEATHERALL, D. J. The Alpha Thalassaemias. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 1154 - 1162, 2009.

HO, P. J.; THEIN, S. L. Gene regulation and deregulation: a  $\beta$  globin perspective. **Blood Rev.**, v. 14, p. 78-93, 2000.

KATTAMIS, A. C.; CAMASCHELLA, C.; SIVERA, P.; SURREY, S.; FORTINA, P. Human  $\alpha$ -Thalassemia Syndromes: Detection of Molecular Defects. **Am. J. Hematol.**, v. 91, p. 81-91, 1996.

KHAN, S. N.; HASAN, F.; SOLLAINO, C.; PERSEU, L.; RIAZUDDIN, S. Molecular characterization of alpha-thalassemia in Pakistan. **Hemoglobin**, v. 27, n. 3, p. 161-166, 2003.

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.

MARE, A. D.; GROENEGER, A. H.O.; SCHUURMAN, S.; VAN DEN BERGH, F. A. T. J. M.; SLOMP, J. A rapid single-tube multiplex polymerase chain reaction assay for the seven most prevalent  $\alpha$ -thalassemia deletions and  $\alpha\alpha\alpha$ (anti 3.7)  $\alpha$ -globin gene triplication. **Hemoglobin**, v. 34, n. 2, p. 184-90, 2010.

MESBAH-AMROUN, H.; ROUABHI, F.; DUCROCQ, R.; ELION, J. Molecular basis of alpha-thalassemia in Algeria. **Hemoglobin**, v. 32, n. 3, p. 273-278, 2008.

MONTEIRO, D. M. **Introdução à história do Rio Grande do Norte**. Natal: EDUFRN, 2000.

NADKARNI, A.; PHANASGAONKAR, S.; COLAH, R.; MOHANTY, D.; GHOSH, K. Prevalence and molecular characterization of alpha-thalassemia syndromes among Indians. **Genet. Testing**, v. 12, n. 2, p. 177-180, 2008.

NAVA, M. P.; IBARRA, B.; MAGAÑA, M. T.; LUZ L. C. M.; PEREA, F. J. Prevalence of  $-\alpha^{3.7}$  and  $\alpha\alpha\alpha$ anti $3.7$  alleles in sickle cell trait and  $\beta$ -thalassemia patients in Mexico. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 36, n. 2, p. 255-8, 2006.

NOGUERA, N. I.; BRAGOS, I. M.; MILANI, A. C. Prevalence of  $-\alpha^{3.7}$  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).

RAHIM, F. Microcytic hypochromic anemia patients with thalassemia: genotyping approach. **J. Med.**, v. 63, n. 3, p. 101-108, 2009.

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

RUND, D.; RACHMILEWITZ, E. Pathophysiology of alpha- and beta-thalassemia: therapeutic implications. **Semin. Hematol.**, v. 38, n. 4, p. 343-349, 2001.

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

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.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2. Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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

STEINBERG, M. H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 27, n. 4, p. 204-10, 2006.

VICHINSKY, E. Hemoglobin E syndromes. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, p. 79-83, 2007.

VICHINSKY, E. P. Alpha thalassemia major - new mutations, intrauterine management, and outcomes. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, p. 35-41, 2009

VOON, H. P. J.; VADOLAS, J. Controlling  $\alpha$ -globin : a review of  $\alpha$ -globin expression and its impact on  $\beta$ -thalassemia. **Haematologica**, v. 93, n. 12, p. 1868-1876, 2008.

WAGNER, S. C.; CASTRO, S. M.; GONZALEZ, T. P.; SANTIN, A. P.; FILIPPON, L.; ZALESKI, C. F.; AZEVEDO, L. A.; AMORIN, B.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; HUTZ, M. Prevalence of common  $\alpha$ -thalassemia determinants in south Brazil : Importance for the diagnosis of microcytic anemia. **Genet. Mol. Biol.**, v. 33, n. 4, p. 641-645, 2010.

WAYE, J. S.; CHUI, D. H. K. The alpha globin gene cluster: genetics and disorders. **Clin. Invest. Med.**, v. 24, n. 2, p. 103-109, 2001.

WEATHERALL, D. J. The thalassemys. In: STAMATOYANNOPOULOS, G.; MAJERUSM P. W.; PERLMUTTER, R. M.; VARMUS, H. **The molecular basis of blood diseases**. 3. ed. Philadelphia: Saunders Company, 2001a. cap. 6.

WEATHERALL, D. J. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: Lessons from thlassaemias. **Nat. Rev. Genet.**, v. 2, n. 4, p. 245-255, 2001b.

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.; PROVAN, A.B. Red Cell I: Inherited anaemias. **Lancet**, v. 355, p. 1169-1175, 2000.

<http://www.umass.edu/molvis/tutorials/hemoglobin/heme.htm> . Acesso em: 29/04/2010.

<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=2093&z=cd&o=7&i=P>. Acesso em: 29/04/2010.

## APÊNDICE 1

**PROJETO DE PESQUISA: Prevalência de talassemia alfa no Estado do Rio Grande do Norte**

### FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

Nº: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ N.º.Registro: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Tel. \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Grupo étnico: ( ) Branco ( ) Pardo ( ) Negro Ascendência: \_\_\_\_\_

Médico: \_\_\_\_\_

Medicamento(s) em uso? Caso sim, qual (quais)?:

\_\_\_\_\_

Tem ou teve anemia: ( ) Sim ( ) Não Fez tratamento para a anemia: ( ) Sim ( ) Não

Já fez transfusão sangüínea?: \_\_\_\_\_ Quando?: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

#### **Exames Laboratoriais:**

Hto: \_\_\_\_\_ % Hb: \_\_\_\_\_ g/dL Hcias  $\times 10^{12}/L$  VCM: \_\_\_\_\_ fL HCM: \_\_\_\_\_ pg

CHCM: \_\_\_\_\_ g/dL RDW: \_\_\_\_\_ %

Morfologia eritrocitária:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ferritina sérica: \_\_\_\_\_ ng/mL

Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino: \_\_\_\_\_

Hb A: \_\_\_\_\_ % Hb A<sub>2</sub>: \_\_\_\_\_ Hb S: \_\_\_\_\_ %

Hb Fetal: \_\_\_\_\_ %

Teste de solubilidade: ( ) Positivo Negativo ( )

Observação: \_\_\_\_\_

Análise Molecular:

\_\_\_\_\_



## APÊNDICE 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Esclarecimentos

Este é um convite para você participar da pesquisa **Prevalência da talassemia alfa na população do estado do Rio Grande do Norte** que é coordenada pela Profa. Tereza Maria Dantas de Medeiros.

Sua participação é voluntária, o que significa que poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Essa pesquisa procura estudar a talassemia alfa que é transmitida de pai para filho. A talassemia é uma anemia causada por um gene (pedaço de DNA) que resulta na produção de quantidades muito pequenas de hemoglobina. Por causa disto, os glóbulos vermelhos de pessoas com talassemia são menores e contêm menos hemoglobina que o normal. A hemoglobina dá ao sangue a cor vermelha e é importante para carregar oxigênio. Todos possuem genes para hemoglobina, um vindo do pai e outro vindo da mãe. Quando não há hemoglobina suficiente diz-se que a pessoa tem anemia. A talassemia alfa ocorre tanto em homens quanto em mulheres e como é uma anemia herdada o indivíduo com talassemia alfa pode passá-la para seus filhos. Não é contagiosa e não é causada por deficiência de ferro ou de vitaminas na dieta. É importante saber que tem talassemia alfa para que o médico possa orientar melhor o tratamento.

Caso decida aceitar o convite, você será submetido aos seguintes procedimentos: uma pequena porção de 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 descartáveis para que sejam feitos alguns exames tais como: eritrograma, dosagem de ferritina sérica, eletroforese de hemoglobina e dosagem de hemoglobina A<sub>2</sub> e Fetal. Na amostra de sangue também será realizada a extração de DNA (molécula onde está armazenada a informação genética) para analisar as alterações do gene da hemoglobina (causador da doença). Após a realização dos exames laboratoriais as amostras de sangue serão descartadas de acordo com as normas de biossegurança.

Os riscos envolvidos com sua participação são aqueles referentes ao procedimento da coleta de sangue: desmaios, pequenos sangramentos e hematoma (mancha roxa) no local da punção o qual desaparecerá em poucos dias, que serão minimizados através das seguintes providências: uso de curativo auto-adesivo no local da punção.

Você terá os seguintes benefícios ao participar da pesquisa: identificação mais detalhada da talassemia alfa, proporcionando maior conhecimento sobre esse tipo de anemia a fim de orientar melhor o tratamento.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários.

Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite.

Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para a Prof<sup>a</sup>. Tereza Maria Dantas de Medeiros, no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFRN – 2º andar ou pelo telefone 3215-4231.

Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa do HUOL/UFRN no endereço Avenida Nilo Peçanha, 620 – Petrópolis, Natal RN ou pelo telefone 3202-3719.

#### Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa **Prevalência da talassemia alfa na população do estado do Rio Grande do Norte**

Participante da pesquisa:

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão datiloscópica

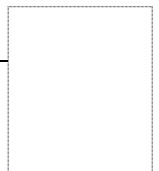
\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável:

\_\_\_\_\_  
Tereza Maria Dantas de Medeiros

Endereço: Laboratório de Hematologia – Faculdade de Farmácia da UFRN – 2º andar Fone: 3215-4231

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes – HUOL/UFRN

Endereço: Avenida Nilo Peçanha, 620 – Petrópolis, Natal



## APÊNDICE 3

Dados laboratoriais dos indivíduos com talassemia alfa<sup>+</sup>

N	Mesorregião	Idade	Sexo	Etnia	Hb (g/dL)	Hcias (x10 <sup>12</sup> /L)	VCM (fL)	HCM (pg)	Perfil Eletrof	HbA <sub>2</sub>	HbF	Ferritina (ng/mL)	Genótipo alfa
12	Leste	52	F	P	12	4,53	76	27,4	AA	2,8	0,9	77,9	-α/αα
14	Leste	58	M	P	13,1	5,11	79	25,7	AA	3,1	1,0	118	-α/αα
63	Agreste	37	M	P	14	5,71	76	24,5	AA	2,8	0,4	78,7	-α/αα
71	Agreste	38	M	P	16	6,29	78	25,4	AA	3,3	0,4	120	-α/αα
77	Agreste	53	F	B	12,5	4,51	81	27,7	AA	2,9	0,4	142	-α/αα
84	Agreste	19	F	N	13	5,07	78	25,7	AA	3,0	1,2	151	-α/αα
96	Agreste	47	M	B	14,9	5,58	81	26,7	AA	3,0	0,5	106	-α/αα
106	Leste	41	M	P	15,6	5,89	82	26,5	AA	3,5	1,4	133	-α/αα
127	Leste	22	M	B	16,5	6,76	75	24,4	AA	3,1	0,2	227	-α/αα
133	Leste	57	M	P	13,1	5,13	79	25,5	AA	3,0	0,2	573	-α/αα
149	Leste	25	M	P	13,4	5,64	76	23,7	AA	2,9	0,4	221	-α/αα
151	Leste	37	M	B	12,6	4,77	81	26,5	AA	2,8	0,3	344	-α/αα
153	Leste	43	M	P	13,5	5,68	74	23,7	AA	3,1	0,5	16,3	-α/αα
154	Leste	25	F	N	12,8	5,08	80	25,2	AA	3,1	0,4	118	-α/αα
166	Leste	21	M	P	16,1	6,23	80	25,9	AA	3,0	0,3	176	-α/αα
167	Leste	38	F	B	11,5	4,79	74	24,0	AA	3,1	0,5	150	-α/αα
168	Central	57	M	P	13,9	5,81	74	23,9	AA	2,7	0,4	36,9	-α/αα
171	Central	49	F	P	12,3	5,15	76	23,6	AA	3,1	0,5	132	-α/αα
172	Central	49	M	N	11,4	4,54	79	25,2	AA	3,1	0,3	141	-α/αα
173	Central	40	M	N	14,10	5,73	80	24,60	AA	2,7	0,4	58,2	-α/αα
177	Central	21	F	P	12,10	4,76	79	25,40	AA	3,0	0,2	77,5	-α/αα
178	Central	37	F	B	11,50	4,66	79	24,70	AA	2,9	0,3	243	-α/αα
181	Central	52	M	P	14,10	6,09	73	23,20	AA	3,1	0,4	40,6	-α/αα
182	Central	38	M	N	13,20	5,69	73	23,10	AA	3,0	0,3	68,6	-α/αα
184	Central	30	F	B	12,10	4,94	76	24,60	AA	2,7	0,4	74,9	-α/αα
190	Central	39	F	P	10,5	4,46	74	23,4	AA	2,6	0,3	7,1	-α/αα
194	Central	39	M	B	14,9	5,63	82	26,4	AA	2,8	0,3	304	-α/αα
246	Oeste	56	M	P	15	5,64	83	26,6	AA	2,7	0,4	177	-α/αα
255	Oeste	36	M	B	15	5,23	86	28,6	AA	2,8	0,4	17,3	-α/αα
258	Oeste	28	F	B	11	4,41	78	25	AA	2,6	0,7	4,5	-α/αα
282	Oeste	53	M	P	14,8	5,3	85	28	AA	2,9	0,4	267	-α/αα
300	Oeste	37	M	P	14,6	5,11	86	28,5	AA	3,0	0,4	103	-α/αα
309	Oeste	52	F	B	12,7	4,47	84	28,4	AA	3,0	0,3	39,8	-α/αα
314	Oeste	51	F	B	12,6	4,43	84	28,5	AA	2,7	0,2	82,7	-α/αα
321	Oeste	28	F	B	13,1	4,92	80	26,6	AA	3,0	0,3	72,5	-α/αα
329	Oeste	26	F	B	13	4,9	80	26,6	AA	2,5	0,0	220	-α/αα
343	Oeste	37	M	P	14,6	5,19	85	28,1	AA	2,7	0,0	150	-α/αα
358	Oeste	39	M	P	15	5,51	81	27,2	AA	3,1	0,0	90,7	-α/αα

## Continuação

N	Mesoregião	Idade	Sexo	Etnia	Hb (g/dL)	Hcias (x10 <sup>12</sup> /L)	VCM (fL)	HCM (pg)	Perfil Eletof	HbA <sub>2</sub>	HbF	Ferritina (ng/mL)	Genótipo alfa
368	Leste	19	F	P	11,7	4,7	83	25,0	AA	2,9	0,2	30,8	-α/αα
370	Leste	33	M	P	14,4	4,8	96	30,1	AA	2,5	0,2	189	-α/αα
371	Leste	25	F	B	12,1	4,7	80	25,6	AA	2,7	1,0	81,2	-α/αα
375	Leste	43	F	P	12,6	4,8	83	26,1	AA	2,3	0,6	161	-α/αα
376	Leste	42	M	P	16,0	6,4	80	25,2	AA	2,4	0,6	366	-α/αα
395	Leste	36	F	P	11,6	5,2	74	22,5	AA	1,9	1,2	189	-α/-α
400	Leste	30	F	P	11,8	4,6	84	25,6	AA	2,3	0,2	47,5	-α/αα
403	Leste	55	M	P	13,5	5,3	82	25,5	AA	2,8	1,0	253	-α/αα
421	Leste	23	F	P	12,0	5,0	80	24,1	AA	1,8	0,6	78	-α/αα
434	Leste	28	F	N	11,5	4,5	84	25,4	AA	2,3	0,3	260	-α/αα
435	Leste	46	F	P	11,2	4,6	84	24,2	AA	2,5	0,7	185	-α/αα
458	Leste	42	F	B	12,3	4,8	78	25,5	AA	2,3	0,6	138	-α/αα
469	Leste	31	M	N	16,0	6,4	77	24,8	AA	1,3	0,8	153	-α/αα
474	Leste	24	M	B	14,3	5,4	82	26,3	AA	2,3	0,2	42,1	-α/αα
476	Leste	40	F	B	12,6	4,7	81	26,9	AA	1,8	0,3	164	-α/αα
497	Leste	58	F	P	13,8	5,33	83	25,8	AA	1,4	0,3	385	-α/αα
498	Leste	48	F	B	12	4,9	79	29,4	AA	1,3	0,7	426	-α/αα
515	Leste	25	F	P	12,8	4,48	86	28,5	AA	0,7	0,2	217	-α/αα
517	Leste	27	M	B	14	5,04	83	27,7	AA	1,5	0,6	207	-α/αα
519	Leste	30	F	P	12,1	4,73	83	25,5	AA	2	0,6	131	-α/αα
532	Leste	33	F	P	11,8	4,59	79	25,8	AS		0,5	88,6	-α/αα
544	Leste	21	F	P	13,3	4,67	85	28,5	AA	2,9	0,9	132	-α/αα
549	Leste	31	M	B	13,6	4,89	85	27,8	AA	2,8	0,8	763	-α/αα
553	Leste	51	M	N	14,8	5,07	90	29,3	AA	0,7	0,3	335	-α/αα
554	Leste	54	M	B	14,8	5,09	90	29,1	AA	0,9	0,3	529	-α/αα
565	Leste	40	F	P	11,6	4,2	85	27,7	AA	2,7	0,6	112	-α/αα
570	Leste	40	M	B	14,6	5,2	86	28	AA	2,6	0,2	424	-α/αα
602	Leste	41	M	B	14,1	5,32	82	26,5	AA	2,6	0,2	86	-α/αα
606	Leste	36	M	B	13,7	4,9	88	28	AA	2,6	0,6	418	-α/αα
614	Leste	22	F	P	12,9	4,8	82	26,9	AA	3,0	0,2	188	-α/αα
615	Leste	38	F	P	12,6	4,52	85	28	AA	3,1	0,4	114	-α/αα
617	Leste	26	F	P	14,2	5,4	85	26,4	AA	2,7	0,4	56,4	-α/αα
637	Leste	37	M	B	14,3	5,22	76	27,3	AA	2,5	0,4	242	-α/αα
649	Leste	29	F	B	12,6	4,67	76	27	AA	2,6	0,3	233	-α/αα
658	Leste	41	M	B	14	5,31	76	26,3	AA	2,5	0,8	10,1	-α/αα
662	Leste	32	M	N	14,5	5	80	29	AA	3,1	0,2	437	-α/αα
673	Leste	36	F	B	13,2	4,92	76	26,8	AA	2,9	0,4	60,3	-α/αα
689	Leste	50	F	B	13,2	6,06	72	21,8	AA	2,7	0,5	191	-α/αα
700	Oeste	22	F	P	13,1	4,97	77	26,4	AA	2,4	0,7	50,3	-α/αα
705	Oeste	39	F	B	10,9	4,62	76	23,7	AA	2,4	0,3	14,5	-α/αα
711	Oeste	41	F	B	NR	NR	NR	NR	AA	2,5	0,3	42,4	-α/αα
713	Oeste	23	F	P	NR	NR	NR	NR	AA	2,6	0,3	42,8	-α/αα

## ANEXO 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
ONOFRE LOPES (CEP-HUOL)

## CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (CEP-HUOL), divisão – Comitê de Ética em Pesquisa, analisou o projeto:

**Título: Prevalência da talassemia alfa na população do estado do Rio Grande do Norte**

**Protocolo –243/08**

**Pesquisador Responsável: Tereza Maria Dantas de Medeiros**

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, em reunião extra-ordinária do CEP-HUOL realizada no dia 12 de dezembro de 2008. Toda e qualquer alteração no projeto/protocolo de pesquisa, assim como eventos adversos que venham a ocorrer deverão ser comunicados oficialmente e imediatamente ao CEP-HUOL. O relatório final do projeto ou a cópia de sua publicação deverá ser encaminhado ao CEP-HUOL após o término do estudo, conforme cronograma, com a respectiva cópia da folha de rosto.

Natal, 12 de dezembro 2008.

**Maria Sanali de Oliveira Paiva**  
Coordenadora do CEP-HUOL

*Dra. Aúrea Hojueira de Melo*  
Vice-Coordenadora do CEP-HUOL

## ANEXO 2

## VALORES DE REFERÊNCIA

	Masculino	Feminino
Hto(*) (%)	45,0 ± 5,0	41,0 ± 5,0
Hemácias(*) (x10 <sup>12</sup> /L)	5,0 ± 0,5	4,3 ± 0,5
Hb(*) g/Dl	15 ± 2,0	13,5 ± 1,5
VCM(*) (fL)		92 ± 9
HCM(*) (pg)		29,5 ± 2,5
RDW		12,8 ± 1,2
Hb A(**) (%)		>95%
HbF(**) (%)		<1,0
HbA <sub>2</sub> (**) (%)		1,75 - 3,25
Ferritina(***) (ng/mL)	28 - 397	10 - 159

- (\*) DACIE, J. V., LEWIS, S. M. Practical Haematology. 8.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995
- (\*\*) Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Instruction Manual - BioRad - Variant TM, beta-Thalassemia Short Program
- (\*\*\*) Valores de referências do kit (Immulite)