



**UNIVERSIDADE SANTO AMARO  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO  
MESTRADO PROFISSIONAL EM ANÁLISES CLÍNICAS**

**Altanir Lázaro Ferreira Marinho de Queiroz**

**INCIDÊNCIA DE HEMOGLOBINA H EM PACIENTES COM VOLUME  
CORPUSCULAR MÉDIO (VCM) MENOR OU IGUAL A 80  
FENTOLITROS (fL) NO POSTO DE SAÚDE DR. HÉLIO MACHADO,  
NA CIDADE DE SALVADOR – BA.**

**Salvador**

**2010**

U616.152  
Q42i  
Ex.1

**Altanir Lázaro Ferreira Marinho de Queiroz**

**INCIDÊNCIA DE HEMOGLOBINA H EM PACIENTES COM VOLUME  
CORPUSCULAR MÉDIO (VCM) MENOR OU IGUAL A 80  
FENTOLITROS (fL) NO POSTO DE SAÚDE DR. HÉLIO MACHADO,  
NA CIDADE DE SALVADOR – BA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Análises Clínicas do Programa de Pós-  
Graduação em Análises Clínicas da Universidade de  
Santo Amaro, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria  
Regina A. Azevedo.

Nome	Altanir Lázaro Ferreira Marinho de Queiroz
Data	10/05/2010
Assinatura	
Assinatura	
Assinatura	
Assinatura	
Assinatura	
Assinatura	
Assinatura	
Assinatura	
Assinatura	

**São Paulo**

**2010**

**Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca Milton Soldani Afonso – Campus I**

Q42i

Queiroz, Altanir Lázaro Ferreira Marinho de  
Incidência de hemoglobina H em pacientes com volume  
corpúscular médio (VCM) menor ou igual a 80 fentolitros  
(fL) no posto de saúde Dr. Hélio Machado, na cidade de  
Salvador - BA / Altanir Lázaro Ferreira Marinho de Queiroz.  
Orientação da Profa. Dra. Maria Regina de Andrade de  
Azevedo. -- São Paulo : 2010.

57 p.

Dissertação (Mestrado). Área de Concentração em Aná-  
lises Clínicas. Curso de Biomedicina. Universidade de  
Santo Amaro.

1. Hemoglobina H 2. Talassemia alfa 3. Anemia  
4. Hemoglobinopatias 5. Índices de eritrócitos I. Título  
II. Orientador

Autorizo a impressão parcial ou total do meu trabalho acadêmico para fins de divulga-  
ção científica.

São Paulo, 23 de agosto de 2010.

BC	20165051
Class	U616.152
Cutter	Q42i
Patri n°	
Tipo de Entrada	200.100
Nota Fiscal	
Data Rec.	___/___/___
Preço	
BB_( )	BC_( )
Origem	UW187

Altanir Lázaro Ferreira Marinho de Queiroz

**Altanir Lázaro Ferreira Marinho de Queiroz**

**INCIDÊNCIA DE HEMOGLOBINA H EM PACIENTES COM VOLUME  
CORPUSCULAR MÉDIO (VCM) MENOR OU IGUAL A 80 FENTOLITROS (fL) NO  
POSTO DE SAÚDE DR. HÉLIO MACHADO, NA CIDADE DE SALVADOR – BA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas do  
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Universidade de Santo  
Amaro, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Regina A. Azevedo.

Data de Aprovação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Regina A. Azevedo**

Mestre e Doutora em Análises Clínicas – USP  
Coordenadora do Mestrado Profissional em Análises Clínicas – UNISA  
Universidade de Santo Amaro

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Celidéia Aparecida Coppi Vaz**

Doutora em Imunologia pela Universidade de São Paulo  
Pós-doutorado - Central Public Health Laboratory, Londres

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yara Juliano**

Doutora em Ciências pela Escola Paulista de Medicina  
Universidade Federal de São Paulo -UNIFESP

CONCEITO FINAL: \_\_\_\_\_

Aos meus pais (*in memoriam*), eternas fontes de inspiração para querer melhorar sempre não apenas como profissional, mas como cidadão responsável e digno de tê-los como referências;

Aos meus irmãos que depositaram em mim a confiança para chegar a esta fase que muitos deles não puderam;

Aos meus filhos, que só por existirem, já me fortalecem nas mais difíceis adversidades.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Regina A. Azevedo, pela paciência, apoio e orientação para a realização deste trabalho;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Celidéia Aparecida Coppi Vaz pela colaboração e orientação metodológica;

À Prof.<sup>a</sup> Msc Lygia Paraguassu Batista que sempre me estimulou e apoio para que esta etapa acadêmica fosse concluída;

Ao Dr. Paulo César Naoum e equipe da AC&T e CDA pelo apoio técnico;

Às minhas monitoras, estagiárias, colegas e amigas, Isabel Florencio e Laila Menezes, sempre parceiras nas minhas atividades acadêmicas.

## RESUMO

Dentre as anemias, as morfológicamente classificadas como microcíticas são as mais prevalentes. Destas, a anemia ferropriva ocupa um destaque devido a sua alta incidência mundial. Por outro lado, também microcíticas, as talassemias são as anemias hereditárias mais comuns e estão entre as mais prevalentes doenças hereditárias diagnosticadas no mundo, destacando-se nestas as talassemias alfa. Em São Paulo encontram-se 10% de alfa talassêmicos, enquanto outras regiões do país revelam incidência de 20%. A frequência de heterozigotos da talassemia  $\alpha_2$  entre indivíduos afro-descendentes é da ordem de 20,0 a 25,0%. O objetivo deste estudo consistiu em verificar a incidência de Hemoglobina H, em pacientes com Volume Corpuscular Médio menor ou igual a 80 fL no posto de saúde Dr. Hélio Machado, na cidade de Salvador – Bahia. Foram realizados e analisados eritogramas em 200 amostras de sangue periférico de indivíduos de ambos os sexos, de qualquer idade, sem distinção de etnia. Destas, um total de 87 amostras apresentaram VCM inferior a 80 fL, (43,5% de microcitose) nas quais foram realizadas pesquisa de HbH através de eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose pH alcalino, sendo positiva em 26 pacientes, obtendo-se, portanto, uma incidência de 29,89% em relação aos pacientes microcíticos.

Os valores obtidos em relação a incidência de HbH (29,9%) nos pacientes microcíticos alertam para grande importância de patologia pouco conhecida e discutida na Bahia. Os achados em relação a incidência de microcitose na população estudada (43,5%) também estimulam preocupação diagnóstica, já que há muitas anemias associadas a esta característica morfológica, como outras hemoglobinopatias e anemia ferropriva, sendo fundamental o diagnóstico diferencial, principalmente entre as talassemias (em particular as talassemias alfa) e a anemia ferropriva, já que o tratamento para esta última pode ser iatrogênico para as primeiras, podendo gerar implicações negativas importantes para a qualidade de vida do paciente, como acúmulo excessivo de ferro no organismo e suas conseqüências deletérias.

Palavras-chave: Hemoglobina H. Talassemia alfa. Microcitose. VCM. Anemia. Hemoglobinopatias

## ABSTRACT

Among the anemia, there are the morphologically classified as microcytic which are the most prevalent one. Of these, iron deficiency anemia occupies a prominent position due to its high incidence worldwide. Furthermore, also microcytic, thalassemias are the most common inherited anemia and are among the most prevalent hereditary diseases diagnosed in the world, especially in this alpha thalassemia. In Sao Paulo there is 10% of alpha thalassemia, while other regions of the country reveal an incidence of 20%. The frequency of heterozygous thalassemia  $\alpha 2$  among African descents is between 20.0 to 25.0%. The main reason of this study is to determine the incidence of hemoglobin H in patients with Mean Corpuscular Volume less or equal to 80 fL at a health clinic of Dr. Helio Machado, in Salvador – Bahia, Brazil. Erythrograms were performed and analyzed in 200 peripheral blood samples in individuals of both sexes, all ages, regardless the ethnicity. Of these, a total of 87 samples had MCV below 80 fL, (43.5% of microcytosis) in which research HbH were performed by hemoglobin electrophoresis on cellulose acetate at alkaline pH and was positive in 26 patients, obtaining an incidence of 29.89% compared to patients microcytic.

The values obtained by the incidence of HbH (29.9%) in patients microcytic warn of major pathology little known and discussed in Bahia. The study's findings regarding the incidence of microcytosis in this population (43.5%) also stimulate diagnostic concern, since there are many anemia associated with this morphological characteristic, like other hemoglobinopathies and iron deficiency anemia and fundamental differential diagnosis, especially among the thalassemias (particularly alpha thalassemia) and iron deficiency anemia, since the treatment for the latter may be iatrogenic for the first, may generate significant negative implications for the patients life quality, as excessive accumulation of iron in the body and its deleterious consequences.

**Keywords:** Hemoglobin H. Thalassemia. Microcytosis. MVC. Anemia, Hemoglobinopathies.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Distribuição Mundial de Hemoglobinopatias, demonstrando a sobreposição das hemoglobinopatias sobre as áreas endêmicas da malária 19
- Figura 2 - Precipitados de HbH em sangue de portador do traço alfa talassêmico, incubado a 37°C com azul de cresil brilhante por 60 minutos 28
- Figura 3 - Modelo de rotina e alternativo para distensão sanguínea 28
- Figura 4 - Teste de Fragilidade Osmótica em salina 0,36%, realizada no Lab. de Análises Clínicas da UCSal 29
- Figura 5 - Diferenciação molecular de genótipos  $\alpha$ -tal por DHPLC 30
- Figura 6 - Exemplos de Eritrograma e Eletroforese de Hb de paciente com HbH positiva obtidas com as metodologias descritas durante a referida pesquisa 36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Hemoglobinas e Fases do Desenvolvimento Humano	23
Tabela 2 - Síndromes $\alpha$ -talassêmicas e Características Clínico-laboratoriais	25
Tabela 3 – Frequência de Microcitose no Posto de saúde Dr. Hélio Machado, Salvador – Bahia, entre ago/2009 a set/2009	37
Tabela 4 – Frequência de HbH em pacientes com Microcitose* no Posto de saúde Dr. Hélio Machado, Salvador – Bahia, entre ago/2009 a set/2009	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

CDA – Centro de Diagnóstico de Anemias  
CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média  
DHPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance por Desnaturação  
Dp – Desvio Padrão  
E – Eritrócitos  
fi – Frequência Absoluta  
fL – Fentolitros  
fr – Frequência Relativa  
Hb – Hemoglobina  
HbC – Hemoglobina C  
HbH – Hemoglobina H  
HbS – Hemoglobina S  
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média  
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance  
Ht – Hematócrito  
K<sub>3</sub> EDTA – Etilenodiaminotetracético Potássico  
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase  
PI – Pontos isoelétricos  
Tal - Talassemia  
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido  
TEB - Tris-EDTA-borato  
VCM – Volume corpuscular médio

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  – Alfa

$\beta$  – Beta

$\gamma$  – Gama

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA: TALASSEMIAS</b>	<b>16</b>
2.1 Histórico	16
2.2 Epidemiologia	18
2.3 Talassemias alfa	21
2.3.1 Etiopatogenia	22
2.3.2 Diagnóstico Clínico e Laboratorial das Talassemias $\alpha$	27
2.3.3 Diagnóstico Diferencial das Talassemias $\alpha$ nas microcitoses	31
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
4.1 Casuística	34
4.2 Amostras	34
4.3 Metodologia	34
4.3.1 Eritrograma	34
4.3.2 Eletroforese de Hemoglobina	35
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>42</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>43</b>
<b>9. APÊNDICES</b>	<b>48</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A anemia é a síndrome de maior prevalência na clínica médica, podendo ser definida como um estado de deficiência na quantidade e/ou qualidade da hemoglobina (Hb) no sangue circulante para o transporte de oxigênio requerido para a atividade normal de um indivíduo, o que leva a uma inadequada oxigenação tecidual com conseqüências clínicas que variam de um simples cansaço ou indisposição, até mesmo a incapacidade para execução de tarefas básicas fundamentais, como andar, subir escadas, alimentar-se, etc. Isso pode ser resultante de uma deficiência na captação, transporte, distribuição e/ou liberação de oxigênio. (SOUZA & BATISTA FILHO, 2003; HOFFBRAND, 2008; FAILACE, 2009)

Do ponto de vista fisiopatológico, as anemias podem ser classificadas por deficiência na produção de hemácias, com ou sem comprometimento do sistema hematopoiético, por aumento de destruição dos eritrócitos, ou ainda por perda sangüínea. Por outro lado, podemos também classificá-las morfológicamente tomando como base o parâmetro do volume corpuscular médio (VCM) e o conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos. Dessa forma, as anemias são divididas em três grandes grupos: microcíticas e hipocrômicas; normocíticas e normocrômicas; macrocíticas. Nestas classificações, a anemia por deficiência de ferro e as talassemias estão incluídas fisiopatologicamente entre aquelas por deficiência na produção de hemácias e morfológicamente nas microcíticas e hipocrômicas (LORENZI, 2006; MELO-REIS *et al*, 2006).

Entre os fatores etiológicos relacionados às anemias, a deficiência de ferro é a causa mais freqüente em todo o mundo, constituindo-se em grave problema de saúde pública em nosso meio (MELO *et al*, 2002). O tempo desde a sua descoberta e primeira descrição há mais de 1500 anos até os dias atuais, não fora suficiente para reduzir a importância estatística e clínica da patologia: a anemia ferropriva continua sendo uma das doenças mais prevalentes que acometem a humanidade (PAPA *et al*, 2003).

Por outro lado, as talassemias alfa estão entre as desordens das hemoglobinas mais prevalentes no mundo (IBARRA B *et al*, 2006), sendo também as anemias hereditárias mais comuns entre as doenças determinadas geneticamente (WEATHERALL & CLEGG, 2001; HARTEVELD & HIGGS, 2010).

Essas anemias são bastante freqüentes na população brasileira. Em São Paulo são encontrados 10% de alfa talassêmicos, enquanto em outras regiões do país este número pode chegar a 20% (OLIVEIRA *et al*, 2006). A razão provável para estes dados está relacionada ao processo de miscigenação ocorrido desde o início do povoamento e colonização do Brasil, seguida da dispersão dos genes anormais que determinam estas hemoglobinopatias. (MELO-REIS *et al*, 2006).

As talassemias constituem um grupo heterogêneo de anemias hereditárias caracterizadas pela deficiência total ou parcial da síntese de globina. Estas hemoglobinopatias são classificadas de acordo com a globina afetada. Indivíduos normais possuem quatro genes responsáveis pela produção de globinas alfa, os quais se encontram aos pares nos dois cromossomos 16. As formas de talassemia alfa ( $\alpha$ ) são resultantes da deficiência de um, dois, três ou quatro dos genes alfa e seus portadores são caracterizados segundo o número de genes afetados, recebendo a seguinte classificação clínica: portador silencioso (um gene alfa afetado); talassemia alfa heterozigota (dois genes alfa afetados); Doença de Hemoglobina H (HbH) - três genes alfa afetados; Síndrome de Hidropisia Fetal por Hemoglobina Bart's - quatro genes alfa afetados (TOMÉ-ALVES *et al*, 2000; MELO-REIS *et al*, 2006).

O diagnóstico laboratorial das talassemias alfa não se distancia da metodologia mais utilizada para as demais hemoglobinopatias: a eletroforese de hemoglobina. Para se realizar diagnóstico eficaz de alfa talassemia são necessários além do hemograma automatizado (VCM confiável), outros testes, como: teste de resistência osmótica em NaCl a aproximadamente 0,36%; eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose com os seguintes achados: hemoglobina  $A_2$  geralmente diminuída; hemoglobina fetal entre 0 a 1%; hemoglobina H (tetrâmero  $\beta_4$ ) com traços já detectáveis ou concentração variável da mesma, sendo esta proporcional à patogenia da doença. Na análise morfológica, além da microcitose esperada, deve-se buscar alguns corpos de precipitação de HbH na coloração de azul de cresil brilhante. (BAIN, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006; NAOUM, *et al*, 2007; MENDIBURU & BONINI-DOMINGOS, 2008).

O diagnóstico molecular diferencial das talassemias alfa pode ser realizado através de Southern Blot, PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) diferencial ou ainda através de Cromatografia Líquida de Alta Performance por Desnaturação

(DHPLC), recentemente otimizado para rastreamento de mutações de base única e pequenas deleções (HUNG *et al*, 2007).

No Brasil, como em outros países, as hemoglobinopatias são consideradas problemas de saúde pública, tendo o diagnóstico das mesmas sido incluído nos programas de triagem neonatal em junho de 2001, com a portaria do Ministério da Saúde - nº 822/GM. Com isso, possibilitou-se o diagnóstico precoce das talassemias e como consequência uma melhora na qualidade de vida dos portadores destas patologias (MELO *et al*, 2008).

Segundo Adorno *et al* (2005), No Brasil, a frequência de ocorrência de heterozigotos da talassemia  $\alpha_2$  (forma de talassemia onde há produção de globina  $\alpha$ , porém reduzida) entre indivíduos afro-descendentes é da ordem de 20,0 a 25,0%. Esses dados corroboram com os achados revelados em Salvador – BA, quando se obteve 22,2% de frequência de talassemia  $\alpha_2^{3.7Kb}$  em trabalho realizado com sangue do cordão de 590 recém-nascidos entre fevereiro e junho de 2000.

Quando a hemoglobina H está presente nas hemácias, os indivíduos portadores podem variar em relação à sintomatologia clínica, podendo não apresentar sintomas claros da doença, ou apresentarem alterações fisiológicas marcantes, como microcitose, hipocromia, hepatoesplenomegalia e agregados intracelulares. Devido à sua grande afinidade pelo oxigênio e dificuldade em dissociar-se do mesmo, a HbH diminui a taxa de hematose nos tecidos. Esta hemoglobina alterada pode ainda se oxidar, gerando agregados incorporados à membrana das hemácias visíveis à microscopia óptica, aumentando a fragilidade osmótica destas células, as quais são corrompidas mais facilmente, sendo absorvidas pelo tecido esplênico prematuramente, o que diminui sua sobrevivência média (NÉRI, 2005; WAGNER, 2005; OLIVEIRA, 2006).

Conforme já exposto, a presença da hemoglobina H, ainda que não resulte em sintomatologia importante em pacientes com um a dois genes afetados, deverá ser diagnosticada, seja para um acompanhamento terapêutico, seja para um aconselhamento genético, ou ainda para diferenciar-se do perfil ferropênico, já que o tratamento deste último pode gerar consequências graves em portadores de alfa talassemias (BONINI-DOMINGOS *et al*, 2004).

Como ainda há muito desconhecimento sobre as hemoglobinopatias, e em específico das talassemias, principalmente na Bahia, onde a população negra é maioria e a anemia genética mais estudada tem sido a anemia falciforme, assim

como a grande incidência de ferropenia tem induzido a uma precipitação diagnóstica em relação a pacientes microcíticos e hipocrômicos, torna-se útil avaliar pacientes microcíticos quanto à incidência de hemoglobina H, abrindo uma discussão sobre a necessidade do diagnóstico laboratorial não restringir-se ao hemograma nas anemias microcíticas, bem como reforçar os prejuízos causados aos pacientes talassêmicos tratados equivocadamente com suplemento à base de ferro.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA: TALASSEMIAS**

### **2.1 Histórico**

Em 1925, Thomas Cooley, um pediatra de Detroit, descreveu uma síndrome ocorrente entre crianças de descendência italiana, caracterizada por uma anemia profunda, esplenomegalia, e deformidades ósseas. A partir de então, evidenciou-se um grupo de anemias com expressões clínicas altamente variáveis, caracterizando as talassemias como entidades clínicas importantes (WINTROBE, 1998). Ainda neste ano, Cooley e Lee associaram esta forma de anemia severa a esplenomegalia e alterações ósseas freqüentes em pacientes que apresentavam sintomas da síndrome (WILLIAMS, 1995).

Em 1932, George H. Whipple e William L. Bradford compararam os achados patológicos da doença inicialmente descrita por Cooley a pacientes com sintomas similares, oriundos do Mediterrâneo. Com isso, as talassemias foram classificadas com base na severidade clínica. Dizia-se que o paciente com importantes manifestações clínicas e que apresentavam uma anemia severa sofriam de talassemia maior, enquanto os pacientes cujas anemias não se revelavam tão severas a ponto de necessitar de transfusões regulares, eram considerados como portadores de talassemia intermediária (WILLIAMS, 1995; WINTROBE, 1998).

Contudo, apenas a partir de 1940, que os verdadeiros caracteres genéticos associados à referida desordem hematológica foram apreciados. Quando a "doença de Cooley e Lee" fora relacionada etiológicamente a um gene autossômico dominante, o qual poderia ocorrer em heterozigose originando a chamada talassemia minor ou mínima, ou em homozigose, caracterizando uma doença severa chamada de talassemia major ou maior (WILLIAMS, 1995).

Em 1955, Rigas (Estados Unidos) e Gouffas (Grécia), ao analisarem pacientes com suspeita diagnóstica de talassemia beta, observaram que alguns apresentavam concentrações normais de Hb A<sub>2</sub> e Fetal, sendo verificada a presença de uma nova hemoglobina, com migração rápida, características instáveis e que formava inclusões nos eritrócitos quando visualizados após incubação com corantes supravitais, denominada de Hemoglobina H. Esses achados foram associados às alterações morfológicas dos eritrócitos destes pacientes, desde que afastadas as possibilidades de tratar-se de ferropenia. (WEATHERALL, 2004).

Em 1965, com o advento da técnica de avaliação da síntese de globina alfa e beta a partir de reticulócitos incubados com leucina, a medida da quantidade de síntese de globina era avaliada pela relação alfa/beta, cujo valor médio se situa em torno de 1,0. Ao serem analisados os pacientes classificados como talassêmicos alfa, foi observada que a relação alfa/beta era menor que 1,0, concluindo, portanto, que na talassemia alfa ocorria decréscimo na síntese de globina alfa (NAOUM *et al*, 2009).

Em 1974, Lehmann, um pesquisador da Universidade de Cambridge, ao analisar casos de hemoglobinas variantes com alterações por trocas de aminoácidos na globina alfa, verificou que todas as Hb variantes de globina alfa apresentavam concentrações inferiores a 25% quando associadas com a Hb A, concluindo que cada pessoa possui quatro genes alfa. Como estes estão presentes nos cromossomos 16, cada gene sintetiza cerca de 25% da globina alfa. Em 1978, a partir de metodologias moleculares, comprovou-se a hipótese de Lehmann. (NAOUM *et al*, 2009).

A partir de técnicas moleculares realizadas na década de 80, foi possível o estudo dos genes de globina alfa, quando foram revelados diversos defeitos genéticos que poderiam originar a talassemia alfa, e que dependendo da extensão da lesão do gene, a síntese de globina alfa apresentaria diferentes intensidades de decréscimos, incluindo a ausência total de síntese. Com isso, haveria um desequilíbrio entre as sínteses de globina alfa e beta, no qual esta última estaria em excesso, o que permitiria a associação entre monômeros de cadeias beta, resultando em tetrâmeros de globinas beta ( $\beta_4$ ), originando a HbH. Portanto, esta terá sua concentração diretamente proporcional à queda de globina alfa (CANÇADO, 2006).

Atualmente, já se sabe que além das formas hereditárias, as talassemias alfa podem ter causa adquirida. Evidentemente as formas hereditárias são as mais comuns, enquanto as formas adquiridas são secundárias a um processo patológico primário, por exemplo: doenças linfó e mieloproliferativas, anemias sideroblásticas, entre outras. Nos últimos anos, a aplicação de métodos de tecnologia de recombinação do DNA permitiu a caracterização da base molecular para a síntese de globinas deficientes, sendo verificado que as talassemias são resultantes da interação de um grande número de defeitos moleculares diferentes. (WINTROBE, 1998; FIGUEREDO *et al*, 2004; FAILACE 2009; NAOUM *et al*, 2009).

## 2.2 Epidemiologia

As talassemias estão entre as desordens das hemoglobinas mais prevalentes no mundo sendo também as anemias hereditárias mais comuns entre as doenças determinadas geneticamente. Estima-se uma prevalência mundial em torno de 7% da população, ao passo que, segundo a OMS, ocorrem 300.000 a 400.000 nascimentos ao ano de crianças portadoras de formas homocigóticas de talassemias (WEATHERALL & CLEGG, 2001; IBARRA B *et al*, 2006)

Segundo Zago (2001), a distribuição geográfica das talassemias está relacionada a dois fatores: a origem e a vantagem seletiva das mutações talassêmicas onde ocorre malária, e os movimentos populacionais migratórios.

As talassemias apresentam distribuição geográfica bastante abrangente, estando presentes em todos os continentes. As talassemias alfa ocorrem principalmente na África, países do Mediterrâneo, no Oriente Médio e sudeste da Ásia. A alfa<sup>0</sup>-talassemia (forma caracterizada pela deleção total de genes alfa) é encontrada mais geralmente em Mediterrâneos e em populações orientais e é extremamente raro na África e no leste médio. Entretanto, as formas de deleção da alfa<sup>+</sup>-talassemia (produção reduzida de alfa globinas) ocorrem com alta frequência na África Ocidental, Mediterrâneo, no oriente Médio e sudeste da Ásia (WILLIAMS, 1995; WEATHERALL & CLEGG, 2001; HARTEVELD & HIGGS, 2010).

Dentre os defeitos genéticos da hemoglobina, a talassemia alfa é a mais prevalente na maioria dos continentes, cuja variante  $\alpha^+$  apresenta índices alarmantes em países do Oriente Médio (Arábia Saudita, Irã e Turquia), onde pode

chegar à frequência de 60%, além de que no continente africano e alguns países da América (Canadá, Estados Unidos, México, Caribe, Jamaica, Venezuela, Argentina) este índice pode chegar a 40%. Já a prevalência da talassemia  $\alpha^0$  praticamente restringe-se às regiões do Mediterrâneo e Sudeste Asiático. (WEATHERALL DJ, 2004; LORENZI, 2006).

Atualmente já se sabe da elevada incidência mundial de talassemias alfa, com portadores encontrados nas frequências polimórficas (> 1%) em todas as populações tropicais e subtropicais que têm sido estudadas e, em algumas áreas, o estado de portador tem tendido à fixação. Isso ocorre principalmente em regiões onde a malária falciparum é ou tem sido endêmica, nas quais o processo de seleção natural manteria os indivíduos protegidos contra esta doença, o que também teria sustentado a manutenção e elevação da frequência dos genes de globinas alterados responsáveis pela talassemia alfa – fig. 1 (HARTEVELD & HIGGS, 2010).

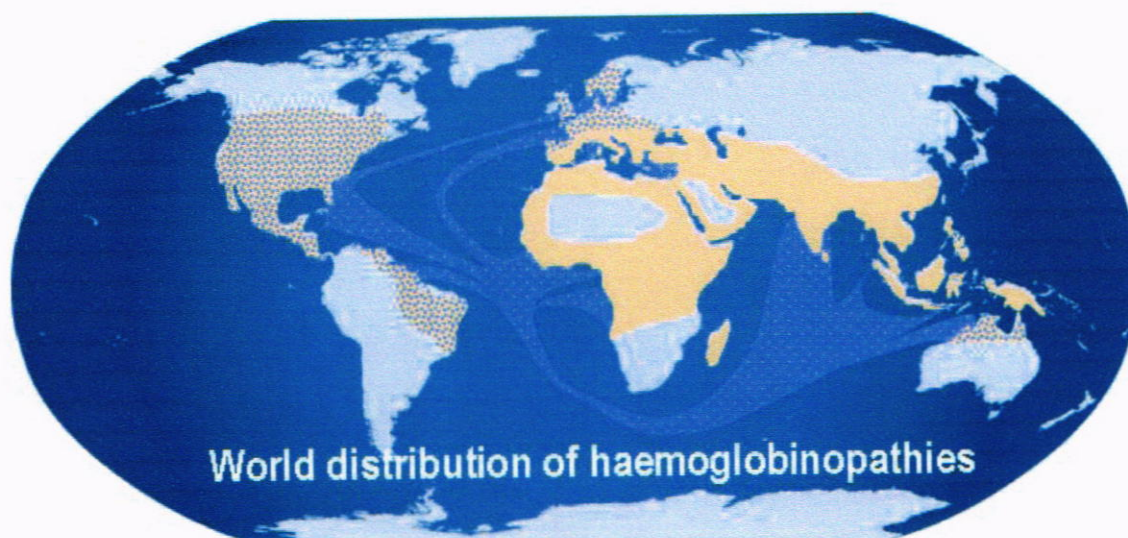


Fig. 1 – Distribuição Mundial de Hemoglobinopatias, demonstrando a sobreposição das hemoglobinopatias sobre as áreas endêmicas da malária (HARTEVELD & HIGGS, 2010).

Segundo Naoum (2009), as talassemias alfa atingem em torno de 20% da população brasileira dos quais cerca de 17% são assintomáticos e com valores hematimétricos (Hb, Ht - Hematócrito, VCM e HCM – Hemoglobina Corpuscular Média) normais; 3% têm discretos graus de anemia microcítica e hipocrômica, e 1:5.000 pessoas é portadora da doença de HbH.

Nota-se, portanto, que estas anemias apresentam elevada frequência na população brasileira, ainda que desconhecida por muitos. No estado de São Paulo estimam-se 10% de alfa talassêmicos, enquanto em outras regiões do país este número pode chegar a 20% (OLIVEIRA, 2006).

O processo de miscigenação, colonização e povoamento do Brasil, além da grande dispersão dos genes anormais que determinam estas hemoglobinopatias justificariam tais estatísticas. No estado de Goiás, trabalho realizado com 55 cidades, demonstrou que as talassemias alfa foram as hemoglobinopatias mais prevalentes, encontradas em 5,2% de uma população com 11,1% de hemoglobinas variantes. Este número pode aumentar, se somado às associações encontradas de  $\alpha$ -talassemias com outras hemoglobinas variantes como HbS - 0,5% e com HbC - 0,3% (MELO-REIS *et al*, 2006). Em Salvador, a prevalência de  $\alpha$ -talassemias em trabalho realizado com 590 recém-nascidos, chegou a 22,2% (ADORNO *et al*, 2005).

Em São Paulo, investigação e rastreamento de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de 3.048 neonatos entre os anos de 2001 e 2002, detectou 13,2% de hemoglobinas variantes incluindo as formas talassêmicas, sendo que o fenótipo de alfa talassemia foi o mais frequente, com 9,48% (MELO, *et al*, 2008).

Contudo, trabalho realizado em 585 pessoas residentes em Umuarama, no estado do Paraná, obteve um total de 6,83% de hemoglobinas variantes incluindo talassemias, sendo apenas 1,37% de fenótipos alfa talassêmicos heterozigotos. Além destes, havia presença de hemoglobina H (alfa talassemia) associada a outras hemoglobinopatias, como 0,17% com traço falciforme e 0,17% com beta talassemia. Estes valores são bastante inferiores aos de outras regiões inclusive podendo ser até mesmo discrepantes com demais cidades do estado, provavelmente devido às características de miscigenação da população estudada, caracterizada por grande quantidade de imigrantes de diversas partes do mundo, o que resultaria em um patrimônio genético também diversificado (SEIXAS *et al*, 2008).

Em suma, além do comportamento atual cosmopolita das hemoglobinopatias e particularmente das talassemias alfa, no Brasil, a incidência e prevalência destas últimas são bastante relevantes, ainda que variável entre as regiões, provavelmente devido à diversidade dos processos de miscigenação, migração, colonização e povoamentos locais (OLIVEIRA, 2006; MELO, *et al*, 2008; SEIXAS *et al*, 2008).

### 2.3 Talassemias alfa

As talassemias estão inseridas nas hemoglobinopatias, grupo de doenças autossômicas recessivas caracterizadas por distúrbios na síntese de hemoglobina e aparecimento de hemoglobinas instáveis variantes, o qual também inclui as síndromes falcêmicas. No caso específico das talassemias, há um distúrbio na síntese das globinas, que resulta em desequilíbrio na produção e concentração entre as cadeias de alfa e betaglobinas (NAOUM & BONINI-DOMINGOS, 2007).

As talassemias alfa pertencem ao grupo das hemoglobinopatias por deficiências quantitativas, nas quais há deficiência na síntese de uma ou mais cadeias de globina alfa (CANÇADO, 2006). Acredita-se que a grande maioria dos distúrbios dos genes de globina, incluindo talassemia  $\alpha$ , foram resultantes de mecanismos seletivos e adaptativos no sentido de proteger das grandes devastações causadas pela malária falciparum (HARTEVELD & HIGGS, 2010).

Após os trabalhos de Rigas (EUA) e Gouffas (Grécia), em 1955, quando a presença de uma nova hemoglobina, denominada de hemoglobina H (HbH) foi elucidada, aliada aos processos das técnicas moleculares, os estudos das talassemias alfa tornaram-se mais frequentes e com processos investigativos mais eficazes e diferenciais. Com isso, foi possível demonstrar que em um indivíduo normal, as células diplóides contêm dois pares de genes de globinas alfa, localizados um em cada cromossomo 16. Quando há deleção em um ou mais genes responsáveis pelas globinas alfa, tem-se a formação da Hemoglobina H, cuja concentração será diretamente proporcional à quantidade de genes afetados (SONATI, 2006; NAOUM & BONINI-DOMINGOS, 2007).

A doença da Hemoglobina H é mais frequente em pacientes heterozigotos com duas mutações diferentes e menos frequente em homozigotos, com conseqüentes quadros clínicos mais relevantes. Geralmente há decréscimo em torno de 30% da produção de globinas alfa, com conseqüente queda dos valores de hemoglobina e do volume corpuscular médio das hemácias e quantidades variáveis de HbH (0,5-40%) e Hemoglobina Bart's detectáveis no sangue (MELO-REIS *et al*, 2006; HARTEVELD & HIGGS, 2010).

### 2.3.1 Etiopatogenia

As hemoglobinas normais são moléculas globulares, sintetizadas durante a eritropoiese, constituídas por dois pares de cadeias globínicas, ligadas a uma molécula de heme, esta última formada pela condensação de quatro núcleos pirrólicos e um átomo de ferro central, na forma ferrosa (SANTIAGO *et al*, 2009).

A síntese do heme ocorre nas mitocôndrias, a partir de reações iniciadas com a condensação entre uma molécula de glicina e uma de succinato, a fim de originar o ácido delta levulínico, que prosseguirá em reações altamente coordenadas por um total de oito enzimas incluindo a delta ala sintetase, necessária para esta fase inicial. Após passar por uma fase extra-mitocondrial onde são formados produtos intermediários do heme conhecidos como porfirinas, há incorporação do átomo de ferro ferroso na molécula de protoporfirina formada no interior das mitocôndrias dos eritroblastos, através da ação enzimática da alfa-ferroquelatase, a qual facilita a ligação do átomo de ferro a quatro átomos de nitrogênio do anel pirrólico, concluindo assim a molécula de heme. (ZAGO, 2001; BAIN, 2006; LORENZI, 2006; HOFFBRAND, 2008).

Há diversos tipos de cadeias de globina que associadas originam diferentes moléculas de hemoglobina. O tipo de hemoglobina varia de acordo com a fase do desenvolvimento humano. Na fase embrionária, predominam as hemoglobinas Gower 1, Portland e Gower 2, na fase fetal, predomina a hemoglobina Fetal, ao nascimento e período neonatal até aproximadamente 6 meses, predominam a hemoglobina fetal e a hemoglobina A, e na fase adulta distinguimos as hemoglobinas A (95-97%), A2 (1-3%) e Fetal (traços – 2%) conforme evidenciado na Tabela 1(SANTIAGO *et al*, 2009).

Apesar da variedade de tipos de hemoglobinas, as cadeias de globinas sintetizadas no retículo endoplasmático dos precursores eritróides até a fase de reticulócitos, apresentam estruturas similares, compostas por uma sequência de 141 aminoácidos para cadeia alfa e 146 aminoácidos para cadeia beta. Enquanto o gene alfa é duplicado e localizado no braço curto do cromossomo 16, o gene beta é único e localizado no cromossomo 11. Portanto, os indivíduos normais apresentam quatro genes alfa e dois genes beta ativos, o que permite a uma grande variedade de alterações genéticas, as quais quando são quantitativas, originam as talassemias (SANTIAGO *et al*, 2009).

Tabela 1 – Hemoglobinas e Fases do Desenvolvimento Humano

Período de Desenvolvimento	Cadeias Globínicas	Tipos de Hemoglobina
Embrionário	$\zeta_2\varepsilon_2$	Gower 1
	$\zeta_2\gamma_2$	Portland
	$\alpha_2\varepsilon_2$	Gower 2
Fetal	$\alpha_2\gamma_2$	Fetal
Nascimento	$\alpha_2\gamma_2$	Fetal
	$\alpha_2\beta_2$	Hemoglobina A
Após 6 meses	$\alpha_2\beta_2$	Hemoglobina A (95-97%)
	$\alpha_2\delta_2$	Hemoglobina A2 (1-3%)
	$\alpha_2\gamma_2$	Hemoglobina Fetal (traços-2%)

Fonte: SANTIAGO *et al*, 2009 – Adaptada pelo autor

As moléculas de hemoglobinas normais apresentam quatro níveis estruturais de organização: primária, secundária, terciária e quaternária, nas quais, a estrutura terciária contribui para que seus aminoácidos polares e hidrófilos permaneçam na superfície da molécula, permitindo sua solubilidade citoplasmática na hemácia, além de proteger a molécula de heme pouco solúvel, recoberta por aminoácidos hidrofóbicos. A estrutura final quaternária da hemoglobina é obtida a partir da associação dos pares de cadeias de globinas em tetrâmeros, na qual cada cadeia de globina tetramérica se aglutina a uma molécula de heme (LORENZI, 2006; SANTIAGO *et al*, 2009).

Nas talassemias alfa, um ou mais genes alfa podem sofrer deleções totais ou parciais, bem como alterações nos elementos reguladores dos “clusters”, ou ainda podem ocorrer mutações no processamento e translação do RNA, resultando em diferentes formas da doença com patogenias distintas (LORENZI, 2006; FAILACE, 2009; SANTIAGO *et al*, 2009).

A grande possibilidade de alterações genéticas como fatores etiológicos das talassemias alfa permitem atualmente o estudo de dezenas de fatores responsáveis por algum tipo de alteração na síntese de globinas alfa, sendo as mais frequentes

oriundas de deleções gênicas, agrupadas de acordo com o gene afetado (WEATHERALL, 2004; FAILACE, 2009):

- Talassemias alfa 1 => atualmente designada pela expressão  $\alpha^0$  talassemia, ou ainda tal alfa ( $-/-$ ), ocorre quando há herança homocigótica e ausência total da produção de cadeias alfa, impedindo a formação da HbA. Isso leva à tetramerização de cadeias  $\gamma$  ainda no feto, originando a globina  $\gamma_4$ , denominada Hemoglobina de Barts (Hb Barts), predominante no sangue fetal e incompatível com a hematose e portanto com a vida. Nessa condição, há morte intra-uterina com hidropsia fetal. Neste caso, pode também estar presente no sangue fetal, ainda que em pequena quantidade, a hemoglobina H, formada pela tetramerização das cadeias  $\beta$  globinas. Um variante desta forma seria a  $\alpha^+$  Talassemia Homocigótica, a qual corresponde à herança simultânea de dois genes de  $\alpha^+$  talassemia, sendo um de cada cromossomo homólogo, genótipo ( $\alpha^-/\alpha^-$ ). Esta desordem origina um fenótipo com discreta anemia microcítica. Segundo FAILACE (2009), a diferença a menor estimada entre estes portadores e a população não acometida é da ordem de aproximadamente 1,0 g/dL de hemoglobina e 15 fL de VCM. Já a contagem eritrocitária está entre os valores referenciais e a discreta eritrocitose. Segundo SANTIAGO *et al* (2009), Os portadores podem apresentar além de baixa concentração de Hb Barts (5-10%), anemia hemolítica leve, hipocromia e microcitose. Podem ainda serem observadas pequenas inclusões de hemoglobina H, precipitadas nos eritrócitos, os quais passam a apresentar aspecto de bolas de golfe (FAILACE, 2009).

- Talassemias alfa 2 => atualmente denominada  $\alpha^+$  talassemia, ocorre nas formas heterocigóticas, nas quais as globinas alfa se formam, porém em quantidades reduzidas. Estas formas foram também denominadas formas silenciosas, devido ao quadro subclínico da anemia. Apesar de sintomatologia pouco visível, os achados laboratoriais como microcitose e hipocromia, confundem-se com os típicos da anemia ferropriva. A deleção restrita ao gene alfa 1, tal  $\alpha$  ( $\alpha\alpha/\alpha^-$ ), defeito genético pontual de maior prevalência no mundo, origina de 1 a 2% de prole homocigótica ( $\alpha^-/\alpha^-$ ). Com o advento da biologia molecular, atualmente se conhecem várias alterações nos genes alfa, como as mutações, com substituição de bases nitrogenadas, ou deleções, como a tal a ( $-\alpha^{3,7}$ ;  $-\alpha^{4,2}$ ). Outra variante da forma heterocigótica é a  $\alpha^0$  talassemia ( $\alpha\alpha^-$ ), onde há comprometimento simultâneo dos

genes  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , a qual tem alta prevalência na Ásia, mas é muito rara no Brasil. Nesta, o fenótipo apresenta uma anemia microcítica semelhante à  $\alpha^+$  talassemia homozigótica ( $\alpha^-/\alpha^-$ ) (WEATHERALL, 2004; FAILACE, 2009; SANTIAGO *et al*, 2009).

Tabela 2 – Síndromes  $\alpha$ -talassêmicas e Características Clínico-laboratoriais

Genótipo	HbA (%)	Hb Barts (%)	HbH (%)	Características Clínico-laboratoriais
$-\alpha/\alpha\alpha$ "Portador Silencioso"	95 - 98	0 - 2	0 - traços	Diminuição média de Hb e VCM em relação a pacientes saudáveis: Hb -0,5g/dL; VCM -5 fL; Ausência de sintomas detectáveis.
$--/\alpha\alpha$ $-\alpha/\alpha$ "α Tal menor" ou "Traço α-Talasêmico"	90 - 95	5 - 10	traços - 2	Diminuição média de Hb e VCM em relação a pacientes saudáveis: Hb -1,0g/dL; VCM -15 fL; Anemia microcítica e hipocrômica discreta; Há relatos de cansaço, dores nas pernas e palidez.
$--/-\alpha$ "Doença da HbH"	< 80	20 - 30	> 15	Anemia microcítica e hipocrômica moderada a grave, hepatoesplenomegalia. Alguns pacientes necessitam de transfusões sanguíneas. Há inclusões eritrocitárias visíveis à distensão comum, evidenciadas em colorações especiais.
$--/--$ "Hidropsia Fetal"	0	80 - 100	0 - 20	Anemia hemolítica grave, com eritroblastose fetal, edema e hepatoesplenomegalia, resultando em morte intra-uterina ou neonatal.

Fonte: SANTIAGO *et al*, 2009; NAOUM, 2009; FAILACE 2009 – Adaptada pelo autor

As formas moleculares relacionadas às talassemias alfa baseiam-se fundamentalmente nas deleções de um ou ambos os genes codificadores de globinas alfa, comumente as do tipo  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ , sendo a primeira a mais frequente em todo o mundo e responsável por mais de 95% dos casos em populações negras (WEATHERALL, 2001; HUNG *et al*, 2007; FAILACE, 2009).

Apesar das grandes variedades genéticas e moleculares citadas, a patogenia das talassemias está diretamente relacionada às concentrações das hemoglobinas variantes formadas, principalmente da hemoglobina H. Quanto maior a concentração desta, maiores as consequências clínico-laboratoriais (Tabela 2) (LORENZI, 2006; FAILACE, 2009; SANTIAGO *et al*, 2009).

Ainda que raras, há também formas adquiridas de Talassemias alfa, com sintomatologia e achados laboratoriais típicos das formas de Portador Silencioso e Traços alfa-talassêmicos, conforme reportado por FIGUEREDO *et al*, 2004. Contudo, para caracterizar a forma adquirida é necessário cautela na pesquisa e afastamento da possibilidade congênita, bem como histórico familiar positivo para esta patologia. Deve-se ainda diagnosticar a presença da hemoglobina H por uma metodologia confiável, como a eletroforese de hemoglobina, cromatografia, ou pesquisa intra-eritrocitária de HbH com coloração supravital, além da presença confirmada de algum tipo de neoplasia hematológica (STEENSMA *et al*, 2005)

Tantos os movimentos migratórios quanto o aumento de consaguinidade da população podem contribuir seja para a grande incidência das talassemias alfa, seja para aspectos adaptativos benéficos, como a relação positiva entre a endogamia e a mudança na velocidade da seleção de alelos e conseqüente adaptação para genes de talassemia alfa (DENIC *et al*, 2008).

Diferentemente da talassemia beta, na qual o acúmulo de cadeias alfa diminui a hidratação celular podendo precipitar resíduos globínicos desde as hemácias imaturas, nas alfas talassemias, as globinas beta e gama em excesso, apesar da capacidade aglutinante entre si, são inicialmente solúveis e aumentam a hidratação celular, logo, não precipitam durante a eritropoiese, e conseqüentemente não causam distúrbio na mesma. Contudo, com a maturação dos eritrócitos circulantes, o acúmulo de globina  $\beta$  tetramerizada nestes, então chamada Hemoglobina H, precipita no interior dos mesmos gerando inclusões deletérias para as hemácias, seqüestradas precocemente pelo sistema retículo-endotelial, principalmente o esplênico (STEINBERG *et al*, 2005; NAOUM *et al*, 2009).

Com isso, o quadro clínico fica relevante, podendo ser evidenciado, além dos sintomas típicos de anemia, conseqüências hemolíticas, como hepatoesplenomegalia, leve icterícia e reticulocitose, sendo muitas vezes necessárias transfusões sanguíneas como terapêutica paliativa. Outros exames laboratoriais evidenciam alterações, como contagem de reticulócitos elevada e diminuição da fragilidade osmótica (CHUI *et al*, 2003).

### 2.3.2 Diagnóstico Clínico e Laboratorial das Talassemias $\alpha$

Segundo NAOUM & BONINI-DOMINGOS (2007), A principal característica laboratorial das talassemias alfa é a visualização da HbH em amostras de sangue hemolisado com saponina a 1% e submetidas a eletroforese em acetato de celulose – o fundo branco deste tipo de eletroforese facilita a identificação da Hb H, a qual poderá apresentar concentrações visíveis a partir de 0,5%.

Geralmente, a grande maioria de pacientes Portadores Silenciosos e com Traços Talassêmicos, ou seja, com um a dois genes afetados, não revelam alterações numéricas importantes no hemograma, tão pouco sinais clínicos que favoreçam ao médico a suspeita diagnóstica. Uma pequena minoria desenvolve sintomas discretos, como os primeiros sinais cardeais de anemia: cansaço, e hipocromia de mucosas (WEATHERALL, 2004; NAOUM & BONINI-DOMINGOS, 2007; SANTIAGO *et al*, 2009).

Um teste laboratorial útil para investigação das talassemias alfa é a pesquisa intra-eritrocitária de HbH, a qual pode ser visualizada como inclusões azurófilas em distensões sanguíneas obtidas a partir de sangue incubado a 37°C com coloração supravital (azul de cresil brilhante). Nestas, os eritrócitos exibem inclusões de hemoglobina H na forma de precipitados que percorrem as células, conferindo-lhe um aspecto típico, comparados por alguns autores à aparência de “bolas de golfe” conforme figura 2 (BAIN, 2006; FERNANDES *et al*, 2006). Entre as principais técnicas utilizadas, esta possui a maior sensibilidade e podem ser bastante úteis na triagem das diversas formas de talassemias alfa, incluindo as adquiridas (STEENSMA *et al*, 2005).

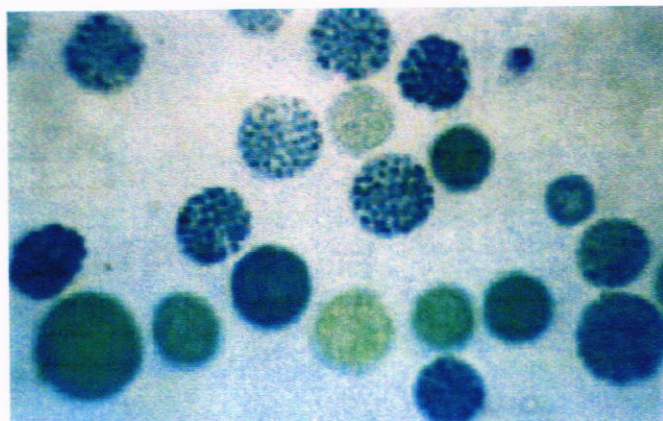


Fig. 2 – Precipitados de HbH em sangue de portador do traço alfa talassêmico, incubado a 37°C com azul de cresil brilhante por 60 minutos (NAOUM *et al*, 2009).

Recentemente, modelo alternativo de distensão sanguínea com incubações em 30 e 60 minutos (figura 3) promove maior definição dos precipitados de HbH na lâmina, bem como elimina grande parte de artefatos gerados na metodologia clássica, como manchas de corante que dificultam a diferenciação das inclusões. Nesta nova metodologia, diferentemente da habitual, cobre-se a gota de amostra na lâmina com lamínula e o espalhamento da amostra se dá por pressão dos dedos, entre duas folhas de papel absorvente. A observação microscópica é realizada em objetiva de imersão (100X) (MENDIBURU & BONINI-DOMINGOS, 2008).

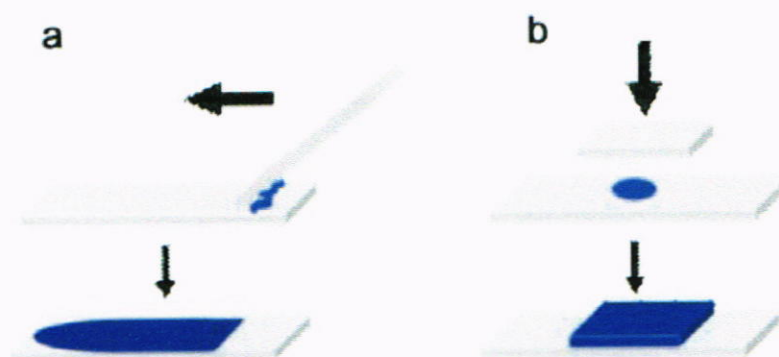


Fig. 3 – Modelo de rotina (a) e alternativo (b) para distensão sanguínea (MENDIBURU & BONINI-DOMINGOS, 2008).

Outro teste útil para triagem de hemoglobinopatias e com grande sensibilidade para talassemias incluindo a alfa-talassemia seria o Teste de Fragilidade Osmótica (figura 4), o qual poderá ser realizado e interpretado qualitativamente de forma bastante simples, a partir de mistura entre pequena quantidade de sangue a ser investigado e solução de NaCl a 0,36%, sempre comparando com sangue de paciente normal coletado nas mesmas condições e mesmo dia. Devido ao baixo custo, simplicidade técnica e alta sensibilidade para talassemias, poderia até mesmo ser incluído em exames pré-natais, evitando-se testes investigativos mais caros para a grande maioria da população, já que um resultado negativo em um dos genitores seria preditivo negativo para prole com talassemia grave (SIRICHOTIYAKUL *et al*, 2004; BAIN, 2006).

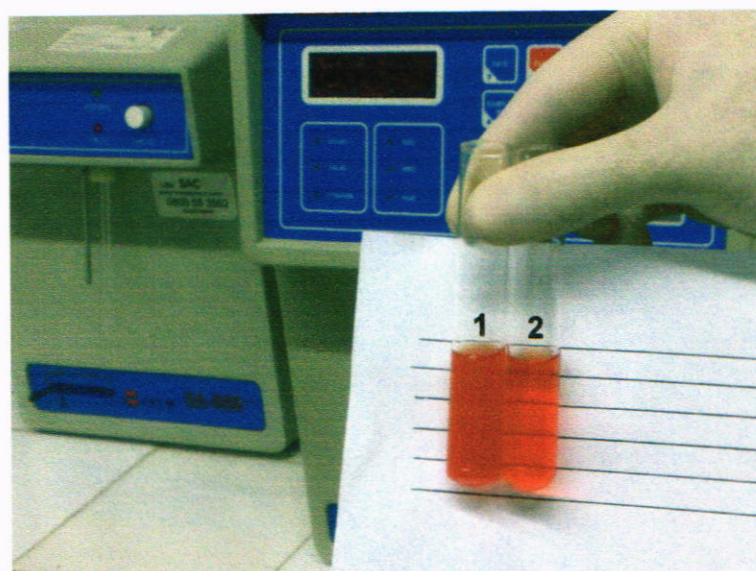


Fig. 4 – Teste de Fragilidade Osmótica em salina 0,36%, realizada pelo autor no Lab. de Análises Clínicas da UCSal: amostra 1 com turbidez devido a redução da fragilidade osmótica; amostra 2 de sangue normal. Ao fundo, analisador hematológico utilizado na referida pesquisa, citado no item 4.3.1.

Na doença da hemoglobina H (três genes afetados), o diagnóstico clínico e laboratorial já é mais simples, em virtude da sintomatologia evidente e típica de anemia, que pode vir acompanhada de sinais anatômicos, como aumento de fígado e baço, comumente diagnosticados ao exame clínico. Os resultados laboratoriais também são relevantes, pois expressam diminuições nítidas de Hb, VCM e HCM,

caracterizando a anemia microcítica e hipocrômica. Contudo, o diagnóstico patognomônico só será realizado a partir da determinação da HbH por Eletroforese de Hemoglobina em celulose, pH alcalino, quando geralmente é observado HbH superior igual ou superior a 15% do total de hemoglobinas presentes (WEATHERALL, 2004; FERNANDES *et al*, 2006; NAOUM & BONINI-DOMINGOS, 2007).

Na forma homocigótica grave, como deleção dos quatro genes de globina  $\alpha$  (Hidropsia Fetal por doença de Bart's), há morte intra-uterina ou natimorto, com presença de anemia hemolítica grave, edema generalizado e hepatoesplenomegalia, tendo como achados laboratoriais eritroblastose fetal perceptível ao exame microscópico da distensão sanguínea e eletroforese de hemoglobina com predomínio de Hb Bart's (tetrâmero  $\gamma_4$ ), a qual varia entre 80 a 100% (LORENZI, 2006; NAOUM *et al*, 2009; SANTIAGO *et al*, 2009).

O diagnóstico laboratorial molecular diferencial das talassemias alfa, pode ser realizado através de análises de DNA por Southern Blot, contudo esta metodologia é sofisticada e de alto custo, além de demorada e trabalhosa. Atualmente, os testes moleculares diferenciais a partir da PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) são mais indicados devido à maior sensibilidade e rapidez na execução. Há ainda metodologia relativamente nova a partir de Cromatografia Líquida de Alta Performance por Desnaturação (DHPLC- figura 4), recentemente otimizado para rastreamento de mutações de base única e pequenas deleções (HUNG *et al*, 2007).

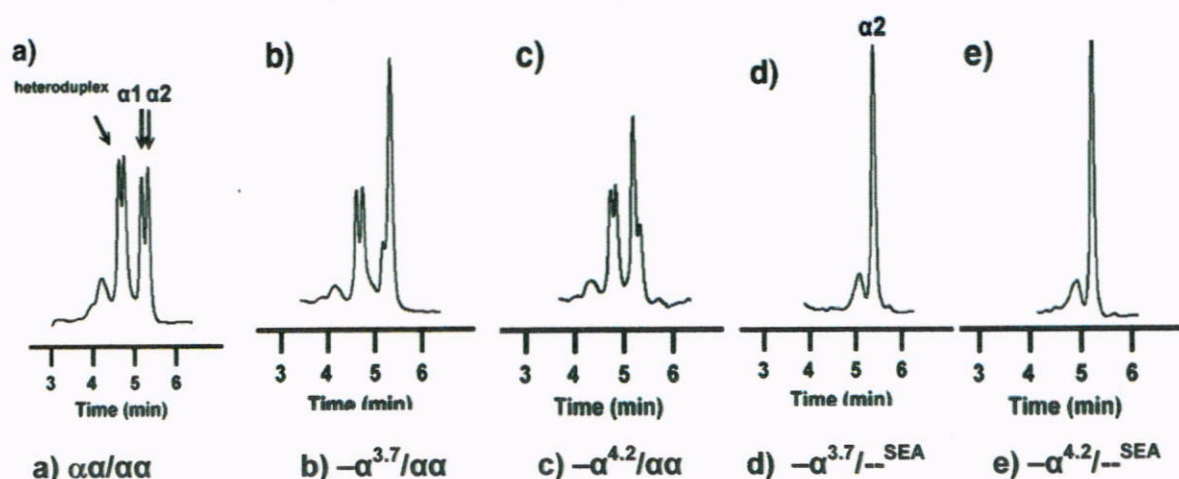


Fig. 5 – Diferenciação molecular de genótipos  $\alpha$ -tal por DHPLC (HUNG *et al*, 2007 – Adaptada pelo autor)

### 2.3.3. Diagnóstico Diferencial das Talassemias $\alpha$ nas Microcitoses

Conforme citado anteriormente, há diversas formas de talassemias alfa, sendo que muitas destas possuem, ainda que pouco notáveis, achados clínico-laboratoriais comuns em outras anemias microcíticas, como a ferropenia, e outras hemoglobinopatias como as beta talassemias e variantes. (MELO *et al*, 2008; SANTIAGO *et al*, 2009).

Em trabalho realizado com análise de 58 casos e 235 controles no Hospital das Clínicas de Porto Alegre, fora detectada a frequência de 63,8 % de hemoglobinopatias em pacientes não ferropênicos, sendo verificado 25,9% de talassemias alfa entre os casos e 11,5% entre os controles (WAGNER *et al*, 2005). Logo, devido à grande frequência de anemia ferropriva e de talassemias em não ferropênicos, é bastante comum na prática clínica, a necessidade de diferenciação entre anemia ferropriva e talassemias menores, a fim de se evitarem iatrogenias na abordagem terapêutica dos pacientes, como a frequente elevação de depósitos de ferro hepático, o que pode resultar até em quadros mais graves, como a hemossiderose (AGULO *et al*, 2008; SANTIAGO *et al*, 2009).

Diversos exames têm sido investigados em pacientes microcíticos e com hemoglobinopatias, sempre na tentativa de se obter dados de fácil e rápido acesso diferenciais entre estas patologias, ou que permitam boa avaliação terapêutica. Alguns marcadores de lesão tecidual com importância prognóstica em outras patologias como a micro e macroalbuminúria, quando pesquisada em indivíduos adultos com síndromes falcêmicas e talassemias alfa, apresentam resultados diferenciais entre os mesmos, com dados patológicos nos pacientes falciformes e valores normais em alfa-talassêmicos. Sugere-se que estes últimos apresentem um efeito protetor contra a glomerulopatias, conseqüências típicas de pacientes falciformes (D. NEBOR *et al*, 2010).

Marcadores importantes de ferropenia, a ferritina e os receptores de transferrina, podem também ajudar no diagnóstico diferencial das microcitoses, pois enquanto na anemia ferropriva a ferritina está escassa ou ausente, na maioria dos adultos com Doença da HbH está elevada, inclusive contribuindo para patogenia da doença. Nestes e também em outras formas mais brandas de talassemias alfa, há aumento dos receptores de transferrina, possivelmente devido à resposta medular

regenerativa à anemia hemolítica, com o aumento da eritropoiese (CHUY *et al* 2003).

A fim de estabelecer parâmetros diferenciais entre as anemias microcíticas, a eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, pesquisa intra-eritrocitária de HbH, a HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) e DHPLC, além da dosagem de ferritina, estabelecem resultados que possibilitam a identificação e diferenciação entre diversas formas de hemoglobinopatias e ferropenia. Contudo, a clínica médica deverá indicar a ordem e a necessidade de cada exame, a fim de se estabelecer eficácia diagnóstica, possibilitando o tratamento mais adequado (CANÇADO, 2006; HUNG *et al*, 2007; MELO *et al*, 2008; NAOUM *et al*, 2009).

Ainda assim, há dificuldades no diagnóstico das talassemias alfa mesmo quando da escolha correta dos exames, seja por imperícia técnica, instabilidade da hemoglobina H com dificuldade de sua detecção por eletroforese e na análise citológica com coloração supravital, além da presença de interação alfa/beta talassemias e no desequilíbrio mínimo entre as globinas alfa e beta (NAOUM & BONINI-DOMINGOS, 2007; SANTIAGO, 2009).

Como os pacientes alfa-talassêmicos possuem variados perfis hematológicos entre os diferentes padrões genotípicos e mesmo considerando o mesmo grupo genótipo, análises populacionais de eritrograma destes pacientes, a fim de se estabelecer futuramente padrões estatísticos que auxiliem no diagnóstico e acompanhamento de diversos grupos regionais e eticamente distintos são úteis para a eficácia diagnóstica e melhoria de qualidade de vida dos portadores dessa hemoglobinopatia (OLIVEIRA *et al*, 2006).

Já as metodologias moleculares mais exatas e sofisticadas para diagnóstico diferencial de talassemias alfa não são utilizadas em escala devido ao alto custo e complexidade técnica (HUNG *et al*, 2007).

Atualmente tem se desenvolvido técnicas moleculares bastante sofisticadas, como metodologia que associa eletroforese, cromatografia capilar com nanopartículas de ouro utilizadas como fase pseudo-estacionária, a fim de melhorar a resolução da separação de fragmentos de DNA em polímero de baixa viscosidade, obtendo-se resultados com excelente concordância com a metodologia clássica de separação eletroforese com gel (CHEN *et al*, 2009).

### 3. OBJETIVOS

#### GERAL

Identificar a incidência de Hemoglobina H em pacientes com Volume Corpuscular Médio (VCM) menor ou igual a 80 fentolitros (fL) no posto de saúde Dr. Hélio Machado, na cidade de Salvador – Bahia, no período de ago/2009 a set/2009.

#### ESPECÍFICOS:

- Relacionar os dados estatísticos da distribuição mundial de alfa talassemias com os registros no Brasil e os dados obtidos;
- Relacionar as principais técnicas laboratoriais para o diagnóstico de talassemias alfa;
- Observar a incidência de microcitose nos pacientes analisados;

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Casuística**

Foram analisadas 200 amostras de sangue total de pacientes atendidos no posto de saúde Dr. Hélio Machado, na cidade de Salvador – Bahia no período de ago/2009 a set/2009, de ambos os sexos, e sem distinção idade ou etnia para pesquisa de Hemoglobina H nos pacientes que apresentaram VCM menor ou igual a 80 fentolitros (fL).

O presente trabalho fora submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNISA e os pacientes ou aos seus responsáveis legais (no caso dos menores de idade) assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Neste documento fora explicito o objetivo da pesquisa, bem como teve declarado que a participação do indivíduo é voluntária e isenta de qualquer conotação financeira, política ou racial (Apêndice I).

### **4.2. Amostras**

Foram coletadas amostras de sangue de acordo com as normas da Resolução nº 196/98 do Conselho Nacional de Saúde. A coleta de 5 mL de sangue total será realizada por profissional habilitado através de punção periférica venosa, utilizando o sistema à vácuo, acondicionando o sangue diretamente em tubos com K<sub>3</sub> EDTA (etilenodiaminotetracético potássico).

### **4.3 Metodologia:**

#### **4.3.1 Eritrograma**

Fora realizado em equipamento semi-automatizado (modelo CELM CC550) no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Católica do Salvador – UCSal o eritrograma de todas as amostras incluindo como parâmetros: número de eritrócitos (E), Hematócrito (Ht), Hemoglobina (Hb), Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

Em seguida, foram selecionadas as amostras com VCM igual ou inferior a 80 fL, a fim realizar-se nas mesmas Pesquisa de Hemoglobina H, através de corrida

eletroforética em pH alcalino no Centro de Referência em Hemoglobinopatias Dr. Paulo César NAOUM, atual Centro de Diagnóstico de Anemias (CDA).

Conflitos entre resultados e correlações suspeitas entre os índices hematimétricos foram confrontados com resultados obtidos através de "Eritrograma Manual", realizado a partir de contagens microscópicas de eritrócitos em câmara de Neubauer dupla espelhada, com amostra diluída 1:200 em solução de Hayen Gower, dosagem de hemoglobina obtida por espectrofotômetro (modelo CELM E225) através do Método de Drabkin Modificado (kit Labtest Diagnóstica) e hematócrito a partir de microcentrifugação à 11.000 rpm, utilizando para tal Centrífuga para micro-hematócrito (modelo MH CELM). A partir destes dados, obtiveram-se os índices hematimétricos calculados.

#### **4.3.2 Eletroforese de Hemoglobina**

Nas amostras com VCM  $\leq 80$  fl foram realizadas pesquisa de Hb H através de eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose pH alcalino no Centro de Referência de Hemoglobinopatias Dr. Paulo César NAOUM, atual CDA – Centro de Diagnóstico de Anemias. Neta técnica, considerando-se que a hemoglobina é uma proteína carregada negativamente, em pH entre 8,0 e 9,0, esta migra em direção ao pólo positivo. Como se sabe que as diferentes mobilidades verificadas entre as diversas hemoglobinas com defeitos estruturais se devem às alterações de cargas elétricas, causadas por substituições de aminoácidos de diferentes pontos isoelétricos (pI), espera-se que as hemoglobinas que não envolvem alterações de cargas elétricas, geralmente apresentem mobilidade eletroforética semelhante à da Hb A; nesse grupo situa-se a maioria das hemoglobinas instáveis.

A partir do preparo do tampão TEB (Tris-EDTA-borato 0,025M) - pH 8,5 , colocou-se igual quantidade desta solução em cada compartimento eletrolítico da cuba de eletroforese. Em seguida, o acetato de celulose fora embebido na solução tampão, previamente colocada numa vasilha, por um tempo de 15 minutos. Após este tempo, enxugou-se o acetato de celulose entre duas folhas de papel absorvente para remover o excesso de solução tampão. As tiras de acetato de celulose foram então ajustadas na cuba de eletroforese, deixando-as sempre esticadas, utilizando-se papel de filtro para fazer a ponte de corrente elétrica na fita. A partir de então, as amostras foram aplicadas nas tiras de acetato de celulose

(hemolisado com saponina 1%) a 2 cm do compartimento do pólo negativo. A fonte fora ajustada para a corrente de 300 volts por 20 minutos. Após a corrida, o fracionamento fora analisado durante os 5 primeiros minutos, observando a presença ou não de HbH. Esta, quando presente, poderá ser visualizada, já que o hemolisado continha saponina a 1%. Durante a eletroforese é importante o uso de pelo menos uma amostra controle. Na ausência de padrões tipo Hb AS, Hb AC, ou outra forma de hemoglobina variante, usa-se uma amostra com hemoglobina normal. O padrão normal constitui-se num excelente meio de comparação entre hemoglobinas “normais” e “anormais”. A utilização de “mapas” de referência é muito útil na interpretação dos resultados, o que fora disponibilizado pelo CDA. É válido salientar que durante todo o procedimento, os cuidados técnicos e de biossegurança relativos aos ensaios de eletroforese foram rigorosamente seguidos, bem como foram evitadas as possíveis intercorrências em relação à metodologia, as quais vão desde o cuidado na preparação do tampão, estabilização da corrente elétrica, até a integridade dos reagentes utilizados e preparo do hemolisado.

Paciente 0074: Sexo: Masculino; Idade: 5 anos:

Nº 0074	14/8/2009	V. Ref. *	
RBC	3,99 x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	(4,0 – 5,2)	x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>
HCT	29,0 %	(35 – 45)	%
MCV	72,7 µ3	(77 – 95)	µ3 (fL)
MCH	23,1 µµg	(25 – 33)	µµg (pg)
MCHC	31,7 %	(31 – 37)	%
HGB	9,2 g/dL	(11,5 – 15,5)	g/dL

\* Valor Referencial conforme Wintrobe (1998) – Anexo I.

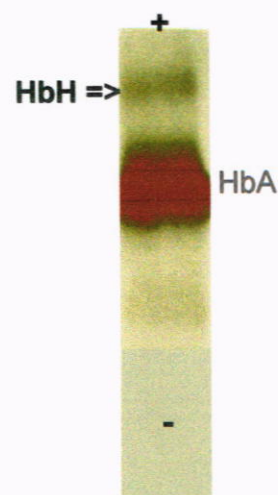


Fig. 6 – Eritrograma (transcrição de resultados do analisador semi-automático) e Eletroforese de Hb de paciente com HbH positiva (1,7%) obtidas com as metodologias descritas durante a referida pesquisa.

## 5. RESULTADOS

A partir da análise do hemograma dos 200 pacientes, foram observados que 87 destes estavam com VCM igual ou inferior a 80 fL, correspondendo a uma frequência de 43,5% (tabela 3). Nestes últimos, ao realizar-se a Pesquisa de Hemoglobina H, esta foi positiva em 26 pacientes, obtendo-se, portanto, uma incidência de 29,89% em relação aos pacientes microcíticos (tabela 4 e Apêndice II).

Tabela 3 – Frequência de Microcitose\* no Posto de saúde Dr. Hélio Machado, Salvador – Bahia, entre ago/2009 a set/2009

VCM (fL)	fi	fr	%
≤80*	87	0,435	43,5
80<VCM<100	110	0,550	55,0
≥100	3	0,015	1,5
<b>Total (Σ)</b>	<b>200</b>	<b>1,000</b>	<b>100,0</b>

Fonte: Primária

\* Valor Referencial conforme Wintrobe (1998).

fi = frequência absoluta; fr = frequência relativa.

Tabela 4 – Frequência de HbH em pacientes com Microcitose\* no Posto de saúde Dr. Hélio Machado, Salvador – Bahia, entre ago/2009 a set/2009

HbH - alfa Tal	VCM < 80 fL		
	fi	fr	%
Presença	26	0,2989	29,89
Ausência	61	0,7011	70,11
Total	87	1,0000	100,00

Fonte: Primária

Como não houve critérios de exclusão a partir de gênero, idade ou etnia dos 200 pacientes analisados, a faixa etária fora bastante variável, entre 3 e 89 anos, tendo como média indivíduos de 25 anos. Quanto ao gênero, 150 pacientes foram do sexo feminino (75%), enquanto que apenas 50 (25%) foram do sexo masculino (Apêndice II).

## 6. DISCUSSÃO

Analisando os resultados obtidos, pode-se verificar uma incidência de hemoglobina H equivalente a 29,89% em pacientes microcíticos na população estudada, o que reforça a justificativa deste projeto, bem como demonstra coerência com os dados obtidos em pesquisa anteriores, ainda que não sejam freqüentes os trabalhos relacionados restringirem a população amostral a pacientes microcíticos.

Um estudo realizado em Salvador-BA no ano de 2000 relatou a frequência de 22,2% de talassemia  $\alpha_2^{3.7Kb}$  em sangue do cordão de 590 recém-nascidos daquele ano (ADORNO *et al*, 2005). Ainda que este último não tenha sido realizado apenas em pacientes microcíticos, há correlação positiva entre esses números e o trabalho exposto, já que é de se esperar uma maior incidência de HbH em pacientes com microcitose, característica importante presente nas talassemias alfa.

Dados estatísticos relacionados publicados sobre talassemias alfa, como o trabalho de Adorno *et al*, (2005), na qual a frequência de heterozigotos da talassemia  $\alpha_2$  entre indivíduos afro-descendentes é da ordem de 20,0 a 25,0% , além dos dados publicados por NAOUM (1997), nos quais a estimativa é de que em torno de 20% da população brasileira apresentem algum tipo de talassemia alfa, também estabelecem correlação positiva com os achados deste trabalho, já que os valores encontrados neste foram inclusive superiores aos citados, provavelmente devido a sua restrição amostral para dosagem de HbH apenas em microcitose.

Segundo Wagner *et al* (2005), pesquisa realizada com análise de 58 casos e 235 controles no Hospital das Clínicas de Porto Alegre, detectou frequência de 63,8 % de hemoglobinopatias em pacientes não ferropênicos, sendo 25,9% de talassemias alfa entre os casos, números que também guardam coerência com os 29,89% de alfa-talassêmicos nos microcíticos obtidos neste trabalho. Vale sempre ressaltar que há diferenças entre a população amostral dos dois trabalhos, já que na

pesquisa em Porto Alegre, além de população apresentar etnia predominantemente diferente de Salvador, o primeiro não restringiu aos pacientes microcíticos, ao passo que neste trabalho também não se estabeleceu a frequência de ferropenia nos pacientes que apresentaram microcitose.

No México, Ruiz-Reyes *et al* (2006), pesquisou talassemia alfa em 106 pacientes com microcitose ou hipocromia e sem ferropenia, obtendo como resultado apenas 11 casos de  $\alpha$ -talassêmicos (10,4%). Apesar de haver correlação amostral em relação à microcitose, este excluiu possíveis pacientes com ferropenia e alfa talassemia concomitantes, o que pode ter minimizado o percentual encontrado.

Usar como critério de exclusão para pesquisa de talassemias a ferropenia, pode subestimar os dados obtidos, já que há grande possibilidade de haver intersecção entre as patologias, como fora demonstrado por Lafferty *et al* (2007), quando registraram que 75 pacientes dos 664 investigados (11,3%) apresentavam, além de talassemias (alfa ou beta), ferropenia (ferritina inferior a 18 ng/ml) associada. Nesse trabalho, realizado em Ontario (Canadá), há grande correlação com o exposto, já que sua população amostral total fora microcítica (VCM<80 fl), além de que o mesmo não excluiu os pacientes ferropênicos. Dos 664 pacientes, investigados, 224 (33,7%) apresentavam alguma forma de  $\alpha$ -talassemia.

Sankar *et al* (2006) ao avaliarem a frequência de talassemia alfa em 276 indivíduos com microcitose no Norte da Índia, verificou que destes, 33 pacientes apresentavam deleção  $-\alpha^{3.7}$  em heterozigose ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) e apenas 2 eram homozigóticos ( $-\alpha/-\alpha$ ), resultando em um total de 12,7% de pacientes com talassemia alfa. Apesar dos valores relativamente baixos de frequência de alfa-talassemia quando relacionados a outras pesquisas aqui apresentadas (incluindo a do autor), é válido salientar que os pacientes indianos também revelaram uma elevada frequência (30,8%) de deleção  $-\alpha^{3.7}$  e, conseqüentemente, de alfa talassemia em pacientes com S- $\beta$  tal. Nesse trabalho, os autores também investigaram paralelamente ferropenia, além de outras causas de microcitose, como esferocitose hereditária e deficiência de G6PD.

Em recente publicação, Bezerra (2009) ao investigar o diagnóstico molecular de talassemia alfa com genótipo  $-\alpha^{3.7}$  em indivíduos com microcitose e/ou hipocromia em um hospital de Natal – RN, além de ratificar como importante causa de

microcitose a talassemia alfa, registrou a prevalência de 32,9% de talassemia alfa nos 319 pacientes investigados, números bastante próximos dos apresentados.

Em paralelo, os últimos dados da OMS confirmam a grande prevalência de microcitoses nas anemias, lideradas amplamente pela anemia mais frequente em todo o mundo, que é ferropriva. Contudo, estabelecer um diagnóstico diferencial para o extenso grupo de anemias classificadas morfológicamente como microcíticas, ainda se apresenta como um grande desafio, pois estas entidades guardam entre si importantes e freqüentes semelhanças clínico-laboratoriais. Nestas, o hemograma apenas indicará a presença da anemia, necessitando de outros exames para o diagnóstico diferencial (AGULO *et al*, 2008; SANTIAGO *et al*, 2009).

As talassemias alfa também apresentam importantes semelhanças clínico-laboratoriais com as ferropenias, grupo de anemias mais prevalentes e grande problema de saúde pública mundial. Ambas morfológicamente se apresentam como anemias predominantemente microcíticas e hipocrômicas, portanto com VCM e HCM abaixo dos valores referenciais. A fim de se obter um diagnóstico diferencial entre as mesmas, as dosagens de ferritina e/ou saturação da transferrina podem incluir ou excluir as ferropenias, contudo, para o diagnóstico das talassemias alfa é imprescindível a eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose em pH alcalino ou metodologia molecular como PCR, além de outras, já citadas (STEENSMA *et al*, 2005; AGULO *et al*, 2008; SANTIAGO *et al*, 2009; HARTEVELD & HIGGS, 2010).

É válido salientar que a No Brasil, como em outros países, as hemoglobinopatias já são consideradas problemas de saúde pública, e a inclusão do diagnóstico das mesmas nos programas de triagem neonatal em junho de 2001, com a portaria do Ministério da Saúde - nº 822/GM tem contribuído para uma melhor investigação e conseqüente ampliação dos dados estatísticos, bem como promovendo melhoria significativa na qualidade de vida dos portadores dessas síndromes (MELO *et al*, 2008).

Contudo, especificamente as talassemias alfa ainda requerem exame adicional através da eletroforese de hemoglobina com acetato de celulose em pH alcalino, sendo também úteis exames complementares, como a pesquisa de inclusões intra-eritrocitária de HbH a partir de coloração supravital e teste de fragilidade osmótica, nem sempre habituais em laboratórios ambulatoriais de rotina (STEENSMA, 2005; BAIN, 2006; NAOUM 2009).

Outras metodologias mais complexas, como as moleculares são indispensáveis para análise genética da patologia, avançando na exatidão diagnóstica e permitindo análises estatísticas e populacionais de longo prazo, incluindo as movimentações migratórias e de cruzamentos consangüíneos, como as abordadas no trabalho de DENIC *et al* (2008).

Dentre as metodologias moleculares, destacam-se a PCR, Southern Blot e DHPLC, além de técnica híbrida entre eletroforese e cromatografia capilar com nanopartículas de ouro, recém descrita por CHEN *et al* (2009).

Durante a revisão bibliográfica realizada neste trabalho, não houve grande quantidade de pesquisas nos últimos cinco anos na busca de investigação de apenas talassemias alfa restrita em microcitoses, sem exclusão de ferropênicos, o que reforça a importância deste trabalho, além de que sua amostragem fora em uma cidade com grande etnia negróide, em serviço público, portanto em população pouco assistida e com serviços investigativos de anemias precários, em um estado onde a maioria dos estudos se direciona para hemoglobinopatias com maior apelo clínico, como a anemia falciforme.

Os dados obtidos mostraram coerência em relação aos publicados no Brasil e em outros países, citados e comentados anteriormente. Os valores obtidos em relação a incidência de HbH (29,9%) nos pacientes microcíticos alertam para grande importância de patologia pouco conhecida e discutida na Bahia. Apesar da grande maioria apresentar fenótipo subclínico, a tendência é que cada vez mais indivíduos heterozigóticos se encontrem, podendo gerar prole inviável, como é o caso da deleção total de globinas alfa na hidropisia fetal.

Os achados em relação a incidência de microcitose na população estudada (43,5%) também estimulam preocupação diagnóstica, já que há muitas anemias associadas a este quadro, sendo fundamental o diagnóstico diferencial, principalmente entre as talassemias (em particular as talassemias alfa) e a anemia ferropriva, já que o tratamento para esta última pode ser iatrogênico para as primeiras, podendo gerar implicações negativas importantes para a qualidade de vida do paciente, como acúmulo excessivo de ferro no organismo e suas conseqüências deletérias.

## 7. CONCLUSÕES

- A incidência de Hemoglobina H em pacientes com Volume Corpuscular Médio (VCM) menor ou igual a 80 fentolitros (fL) no posto de saúde Dr. Hélio Machado, na cidade de Salvador – Bahia, no período de ago/2009 a set/2009 foi de 29,9%; dado coerente com os relacionados publicados no Brasil e em outros países, principalmente quando os demais não utilizam como critério de exclusão a ferropenia, já que como fora comentado, há possibilidade de intersecção entre as patologias;

- Dentre as técnicas utilizadas para o diagnóstico das talassemias alfa, destacam-se em exatidão a eletroforese de hemoglobina em meio alcalino e os exames moleculares como a PCR e Southern Blot, os quais podem ser considerados patognomônicos para a presença de talassemia alfa. Atualmente, a DHPLC e técnica híbrida entre eletroforese e cromatografia capilar com nanopartículas de ouro têm sido estudadas com excelentes resultados e correlações com as técnicas moleculares, contudo o custo das mesmas ainda não permite a utilização no laboratório de rotina. Neste, porém, técnicas mais simples e de menor custo, mas com grande sensibilidade, como o teste de fragilidade osmótica a pesquisa de inclusões intra-eritrocitária de HbH podem ser utilizadas como bons exames de triagem;

- A incidência de microcitose na população estudada foi de 43,5%, portanto bastante relevante, já que há importantes e freqüentes patologias associadas a este achado, como a anemia ferropriva e outras hemoglobinopatias;

- De acordo com os dados apresentados, a elevada microcitose nos pacientes analisados, bem como a importante incidência de talassemia alfa nos mesmos, estimulam preocupação diagnóstica e valorizam a iniciativa, pois a população amostral se relaciona também com a anemia mais prevalente no mundo, que é a ferropriva, a qual precisa ser diagnosticada diferencialmente em relação às também freqüentes talassemias alfa, já que o tratamento para a primeira pode ser bastante iatrogênico para as estas últimas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADORNO, E.V. *et al* . Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 292-295, 2005.

AGULO, I.L., *et al* . Determination of iron-overload in thalassemia by hepatic MRI and ferritin. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 30, n. 6, p. 449-452, 2008.

BAIN, Barbara J.. **Haemoglobinopathy diagnosis**, 2nd Ed, Blackwell Publishing, Oxford, 2006.

BEZERRA, Christiane Medeiros. **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**. Natal, 2009, 92 p.

CHEN, Yen-Ling *et al*. Genotyping of  $\alpha$ -thalassemia deletions using multiplex polymerase chain reactions and gold nanoparticle-filled capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, nº 1216, p. 1206–1212, 2009.

CHUI, David H.K., *et al*. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. **BLOOD**, v. 101, n. 4, p. 791-800, 2003.

BONINI-DOMINGOS, A.C.; VIANA-BARACIOLI, L.M.S.; BONINI-DOMINGOS, C. R.. Identificação de variantes de hemoglobina em doadores de sangue. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 26, n. 1, p. 57-59, 2004

CANÇADO, R.D.. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** São José do Rio Preto. v. 28, n. 2, p. 81-87, 2006.

D. NEBOR, et al., Alpha-thalassemia is associated with a decreased occurrence and a delayed age-at-onset of albuminuria in sickle cell anemia patients. **Blood Cells Mol. Diseases** (2010), doi:[10.1016/j.bcnd.2010.06.003](https://doi.org/10.1016/j.bcnd.2010.06.003)

DENIC, Srdjan *et al.* **Evolution and Human Behavior** v.29, p. 364–369, 2008.

FAILACE, R.; FERNANDES, F.; FAILACE, R. . **Hemograma: manual de interpretação** – 5ª Ed., Porto Alegre, Artmed, 2009.

FERNANDES, A.R.C.; Mendiburu C.F.; BONINI-DOMINGOS C.R.. Utilization of different methodologies for characterization of Hb Hasharon heterozygotes. **Genetics and molecular research**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2006.

FIGUEREDO, M.S. *et al.* . Acquired hemoglobin H disease in a patient with aplastic anemia evolving into acute myeloid leukemia **São Paulo Medical Journal — Revista Paulista de Medicina** , São Paulo, v. 122, n. 6, p. 273-275, 2004.

HARTEVELD, Cornelis L.; HIGGS, Douglas R. Alpha Talhassaemia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 5, n. 13, p. 1-21, 2010.

HOFFBRAND, A.V. **Fundamentos em Hematologia** – 5ª Ed., Porto Alegre, Artmed, 2008.

HUNG, Chia-Cheng *et al.* Molecular assay of  $-\alpha 3.7$  and  $-\alpha 4.2$  deletions causing  $\alpha$ -thalassemia by denaturing high-performance liquid chromatography. **Clinical Biochemistry**, v. 40, p. 817–821, 2007.

IBARRA B, *et al.* Molecular characterization of the  $-\alpha^{SEA}$  alpha thalassemia allele in Mexican patients with HbH disease. **Revista de Investigacion Clinica**, Guadalajara, v. 58; n. 4, p. 313-317, 2006.

LAFERTY John D. *et al.* Prevalence of Thalassemia in Patients With Microcytosis Referred for Hemoglobinopathy Investigation in Ontario: A Prospective Cohort Study. **Am J Clin Pathol**, v.127, p.192-196, 2007.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia: propedêutica e clínica – 4ª Ed.**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006.

MELO, L.e M. *et al* . Rastreamento de hemoglobinas variantes e talassemias com associação de métodos de diagnóstico. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 30, n. 1, p. 12-17, 2008.

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

MELO-REIS, P. R. *et al* . A importância do diagnóstico precoce na prevenção das anemias hereditárias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v.28, n.2, p. 149-152, 2006.

MENDIBURU, C.F.; BONINI-DOMINGOS, C.R.. Alternative method of smearing samples on slides facilitate visualization of hemoglobin H inclusion bodies in alpha thalassemia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 30, n.1, p. 61-62, 2008.

NAOUM, P.C.. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. 1ª ed., São Paulo: Sarvier, 1997.

NAOUM, PC; BONINI-DOMINGOS, CR.. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 226-228, 2007.

NAOUM PC; NAOUM F.A.; NAOUM A.F.M.. **Talassemia Alfa 2009**, disponível em [www.talassemias.com.br/talassemias/tal-alfa.htm](http://www.talassemias.com.br/talassemias/tal-alfa.htm), acesso em 26/02/2010 – 23:00h.

NERI, Iramaia A. *et al*. Análise clínica e laboratorial para a identificação da Talassemia Alfa. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 27, n. 2, p. 142-143, 2005.

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

PAPA, A.C. *et al.* A anemia por deficiência de ferro na grávida adolescente: comparação entre métodos laboratoriais. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 10, p. 731-738, 2003.

RUIZ-REYES G. *et al.* Alpha Thalassemia in Mexico. **Rev. Invest. Clin** v.58, n.3, p. 234-236, 2006.

SANKAR, V.H. *et al.* Genotyping of alpha-thalassemia in microcytic hypochromic anemia patients from North India. **J Appl Genet**, v. 47, n 4, 2006, pp. 391–395, 2006

SANTIAGO, E.E., *et al.* **Medicina Laboratorial para o clínico**. 1ª ed., Belo Horizonte, Coopmed, 2009.

SEIXAS, F.A.V. *et al.* Incidence of hemoglobinopathies in Northwest Paraná, Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 30, n. 4, p. 287-291, 2008.

SIRICHOTIYAKUL, S. *et al.* **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 86 p. 347–350, 2004.

SONATI MF, Costa FF. Talassemias alfa. **Tratado de Clínica Médica**. Lopes AC. Ed Roca, p1.932-1.938, 2006.

SOUZA, A.I.; BATISTA FILHO, M.. Diagnóstico e tratamento das anemias carenciais na gestação: consensos e controvérsias. **Rev Bras. Saúde Materna e Infantil**, Recife, v. 3. n. 4, p. 473–479, 2003.

STEENSMA, David P *et al.* **BLOOD**, v. 105, n. 2, 2005.

STEINBERG, M. H. *et al.* Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. In : HOFFMAN, R. *et al.* **Hematology : Basic Principles and Practice**, 4th ed. Livingstone : Elsevier Churchill, 2005, p. 442-454.

TOME-ALVES, R. *et al.* Hemoglobins AS/alpha thalassemia: diagnostic importance. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 22, n. 3, p. 388-394, 2000.

WAGNER, SC. *et al.* Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes com anemia não ferropênica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 27, n. 1, p. 37-42, 2005.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B.. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization (WHO)** , Genebra, v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.

WEATHERALL, D.J.. Thalassemia: the long road from bedside to genome. **Nat Rev Genet**, v.5, n.8, p. 625-631, 2004.

WILLIAMS, William J. **Hematology** / editores, Ernest Bautler ... [et al]. 5ª ed: International Edition, 1995.

WINTROBE, Maxwell M. **Hematologia Clínica** / editores G. Richard Lee ... [et al]. 9ª ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1998.

ZAGO, Marco Antônio; Falcão, Roberto P.; PASQUINI, Ricardo. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2001.

## APÊNDICE I – TCLE E CARTA DE INFORMAÇÃO

**PROJETO: INCIDÊNCIA DE HEMOGLOBINA H EM PACIENTES COM VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO (VCM) MENOR OU IGUAL À 80 fl, NO POSTO DE SAÚDE DR. HÉLIO MACHADO, NA CIDADE DE SALVADOR – BAHIA**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96 - MS)

Eu, \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_,  
 Nascido(a) em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ e domiciliado(a) à  
 \_\_\_\_\_, município de Salvador-  
 BA, ou \_\_\_\_\_ (responsável legal  
 pelo voluntário) declaro que consinto em participar como voluntário (a) do projeto de  
 pesquisa **"INCIDÊNCIA DE HEMOGLOBINA H EM PACIENTES COM VOLUME  
 CORPUSCULAR MÉDIO (VCM) MENOR OU IGUAL À 80 fl, NO POSTO DE  
 SAÚDE DR. HÉLIO MACHADO, NA CIDADE DE SALVADOR – BAHIA"** sob  
 responsabilidade do Professor Pesquisador Altanir Lázaro Ferreira Marinho de  
 Queiroz, estando suficientemente esclarecido sobre as informações que li (ou leram  
 para mim) na Carta de Informação do Projeto.

A minha decisão ocorrera após esclarecimentos com o Prof. Altanir Lázaro Ferreira Marinho de Queiroz, o qual me tornou ciente dos objetivos, os procedimentos a serem realizados, da isenção de qualquer custo, benefício direto ou qualquer contribuição financeira, bem como os aspectos éticos do projeto. Com isso, declaro que fui satisfatoriamente esclarecido e que sendo assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

Salvador, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

\_\_\_\_\_  
 Voluntário/Resp. Legal

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 200\_\_;

\_\_\_\_\_  
 Testemunha

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 200\_\_.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário ou de seu representante legal para participação neste estudo.

Prof. Altanir Lázaro Ferreira Marinho de Queiroz  
Pesquisador Responsável

**PROJETO: INCIDÊNCIA DE HEMOGLOBINA H EM PACIENTES COM VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO (VCM) MENOR OU IGUAL À 80 fl, NO POSTO DE SAÚDE DR. HÉLIO MACHADO, NA CIDADE DE SALVADOR – BAHIA**

**Carta de Informação**

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96 - MS)

As informações que seguem estão sendo fornecidas para total esclarecimento dos voluntários que participarão do projeto de pesquisa **“INCIDÊNCIA DE HEMOGLOBINA H EM PACIENTES COM VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO (VCM) MENOR OU IGUAL À 80 fl, NO POSTO DE SAÚDE DR. HÉLIO MACHADO, NA CIDADE DE SALVADOR – BAHIA”** sob responsabilidade do Professor Pesquisador Altanir Lázaro Ferreira Marinho de Queiroz.:

- a) O objetivo do presente trabalho é Identificar a incidência de Hemoglobina H, em pacientes com Volume Corpuscular Médio menor ou igual a 80 fL (fentolitros), no posto de saúde Dr. Hélio Machado, na cidade de Salvador – Bahia;
- b) Essa pesquisa é importante, pois pode colaborar para o esclarecimento da patologia em estudo, seu diagnóstico mais preciso e precoce, além de contribuir para melhoria da saúde pública;
- c) A pesquisa prevê a doação de sangue, o qual será coletado com material descartável, utilizando sistema de coleta à vácuo e realizado por profissionais habilitados, seguindo as Recomendações da SBPC/ML, publicadas em 2005;
- d) Eventualmente, a coleta de sangue pode gerar vermelhidão local transitória, e raramente a formação de pequenos hematomas e inflamação local;
- e) O voluntário poderá consultar o pesquisador responsável para esclarecer dúvidas em qualquer época, pessoalmente no endereço Av. Pinto de Aguiar, nº 2589, Universidade Católica do Salvador - BA, Campus de Pituáçu, Instituto de Ciências

Biológicas, ou pelos telefones 71 32067809 / 71 99187656. Se ainda assim, persistir alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UNISA) – Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, nº 340, Jardim das Imbúias, São Paulo-SP, tels: 11 5929-5477 / fax: 11 520-9160

**f)** O voluntário estará livre para, a qualquer tempo, deixar de participar da pesquisa sem necessidade de apresentar justificativa para tal;

**g)** Todas as informações fornecidas pelos voluntários, bem como os resultados obtidos com a amostra coletada serão mantidos em sigilo, podendo ser utilizados apenas para divulgação em reuniões, revistas ou outras mídias científicas, desde que os dados relacionados sejam coletivos e não possuam qualquer elemento de identificação dos voluntários;

**h)** Não há qualquer benefício direto para o voluntário, pois se trata de trabalho experimental, no qual somente ao final do estudo pode-se concluir com algum benefício, bem como não há obrigação de emissão de laudo por amostra doada;

**i)** Não haverá qualquer despesa pessoal para o voluntário em qualquer fase do estudo, tão pouco compensação financeira relacionada à participação no referido experimento;

Em caso de haver dano pessoal diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o voluntário terá direito às reparações legalmente estabelecidas, incluindo tratamento médico-hospitalar caso necessário.

Prof. Altanir Lázaro Ferreira Marinho de Queiroz

CRBio 27313/5-D

CPF 454.338.795-34

Pesquisador Responsável

## APÊNDICE II – RESULTADOS OBTIDOS

Eritrograma e Eletroforese de Hemoglobina (Hb) indexados por Hb H <sup>+</sup> , VCM											
Nº	Cód.	Sexo (M/F)	Idade (anos)	Hb (g/dl)	Ht (%)	E (10 <sup>6</sup> /µl)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	Hb H (%)	Obs
1	0043	F	19	12,8	35,5	5,33	<b>66,6</b>	24,0	36,1	<b>1,8</b>	Tal alfa +
2	0048	F	41	12,5	37,0	5,49	<b>67,4</b>	22,8	33,8	<b>1,8</b>	Tal alfa +
3	0074	M	5	9,2	29,0	3,99	<b>72,7</b>	23,1	31,7	<b>1,7</b>	Tal alfa +
4	0179	F	10	12,5	34,5	4,94	<b>69,8</b>	25,3	36,2	<b>1,5</b>	Tal alfa +
5	0159	F	40	11,9	35,0	4,42	<b>79,2</b>	26,9	34,0	<b>1,5</b>	Tal alfa +
6	0181	M	12	13,8	40,0	5,35	<b>74,8</b>	25,8	34,5	<b>1,3</b>	Tal alfa +
7	0064	F	30	13,7	37,0	4,48	<b>82,6</b>	30,6	37,0	<b>1,3</b>	Tal alfa +
8	0120	F	58	12,2	37,0	4,79	<b>77,2</b>	25,5	33,0	<b>1,0</b>	Tal alfa +
9	0119	M	27	15,7	45,0	5,63	<b>79,9</b>	27,9	34,9	<b>1,0</b>	Tal alfa +
10	0125	F	22	14,2	39,5	5,35	<b>73,8</b>	26,5	35,9	<b>0,9</b>	Tal alfa +
11	0113	F	28	9,6	37,5	5,29	<b>70,9</b>	18,1	25,6	<b>0,8</b>	Tal alfa +
12	0051	F	86	14,0	42,5	5,57	<b>76,3</b>	25,1	32,9	<b>0,8</b>	Tal alfa +
13	0176	M	5	12,8	37,0	5,87	<b>63,0</b>	21,8	34,6	<b>0,7</b>	Tal alfa +
14	0027	F	51	12,3	35,0	5,04	<b>69,4</b>	24,4	35,1	<b>0,7</b>	Tal alfa +
15	0127	M	3	11,7	38,5	5,20	<b>74,0</b>	22,5	30,4	<b>0,7</b>	Tal alfa +
16	0177	M	7	10,5	31,5	3,93	<b>80,2</b>	26,7	33,3	<b>0,7</b>	Tal alfa +
17	0196	F	42	12,6	35,0	5,88	<b>59,5</b>	21,4	36,0	<b>0,6</b>	Tal alfa +
18	0098	F	54	12,9	40,0	5,60	<b>71,4</b>	23,0	32,3	<b>0,6</b>	Tal alfa +
19	0107	F	9	12,3	37,0	4,87	<b>76,0</b>	25,3	33,2	<b>0,6</b>	Tal alfa +
20	0142	M	57	12,5	35,0	4,42	<b>79,2</b>	28,3	35,7	<b>0,6</b>	Tal alfa +
21	0166	F	12	13,3	36,0	4,51	<b>79,8</b>	29,5	36,9	<b>0,6</b>	Tal alfa +
22	0116	F	54	13,3	40,5	6,00	<b>67,5</b>	22,2	32,8	<b>0,5</b>	Tal alfa +
23	0084	F	56	15,4	44,0	5,98	<b>73,6</b>	25,8	35,0	<b>0,5</b>	Tal alfa +
24	0163	F	39	15,7	44,0	5,89	<b>74,7</b>	26,7	35,7	<b>0,5</b>	Tal alfa +
25	0100	F	20	13,6	40,0	5,01	<b>79,8</b>	27,1	34,0	<b>0,5</b>	Tal alfa +
26	0103	F	39	8,7	29,5	3,67	<b>80,4</b>	23,7	29,5	<b>0,5</b>	Tal alfa +
27	0077	M	38	9,9	24,0	4,79	<b>50,1</b>	20,7	41,3	<b>0,0</b>	
28	0184	F	50	12,7	26,5	5,19	<b>51,1</b>	24,5	47,9	<b>0,0</b>	
29	0175	M	13	10,3	31,0	5,47	<b>56,7</b>	18,8	33,2	<b>0,0</b>	
30	0014	F	61	13,3	33,0	4,92	<b>67,1</b>	27,0	40,3	<b>0,0</b>	
31	0092	M	8	12,8	34,5	5,12	<b>67,4</b>	25,0	37,1	<b>0,0</b>	
32	0040	F	18	13,8	37,0	5,30	<b>69,8</b>	26,0	37,3	<b>0,0</b>	
33	0185	F	20	12,7	36,0	5,13	<b>70,2</b>	24,8	35,3	<b>0,0</b>	
34	0075	F	25	12,8	35,0	4,96	<b>70,6</b>	25,8	36,6	<b>0,0</b>	
35	0047	M	26	12,7	37,5	5,21	<b>72,0</b>	24,4	33,9	<b>0,0</b>	
36	0186	M	59	12,9	36,0	4,99	<b>72,1</b>	25,9	35,8	<b>0,0</b>	
37	0002	F	68	10,0	28,5	3,95	<b>72,2</b>	25,3	35,1	<b>0,0</b>	
38	0068	F	58	13,2	38,5	5,31	<b>72,5</b>	24,9	34,3	<b>0,0</b>	
39	0137	F	56	12,4	34,0	4,66	<b>73,0</b>	26,6	36,5	<b>0,0</b>	
40	0128	M	55	13,9	38,0	5,16	<b>73,6</b>	26,9	36,6	<b>0,0</b>	
41	0055	F	8	12,3	37,5	5,07	<b>74,0</b>	24,3	32,8	<b>0,0</b>	

<b>Eritrograma e Eletroforese de Hemoglobina (Hb) indexados por Hb H<sup>+</sup>, VCM</b>											
Nº	Cód.	Sexo (M/F)	Idade (anos)	Hb (g/dl)	Ht (%)	E (10 <sup>6</sup> /µl)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	Hb H (%)	Obs
42	0095	F	6	14,0	40,0	5,40	<b>74,1</b>	25,9	35,0	<b>0,0</b>	
43	0174	F	13	13,4	36,5	4,91	<b>74,3</b>	27,3	36,7	<b>0,0</b>	
44	0193	F	56	12,7	35,0	4,70	<b>74,5</b>	27,0	36,3	<b>0,0</b>	
45	0097	F	9	13,0	41,5	5,57	<b>74,5</b>	23,3	31,3	<b>0,0</b>	
46	0131	M	9	13,8	39,5	5,28	<b>74,8</b>	26,1	34,9	<b>0,0</b>	
47	0123	F	16	13,7	35,5	4,72	<b>75,2</b>	29,0	38,6	<b>0,0</b>	
48	0132	M	6	14,1	40,0	5,31	<b>75,3</b>	26,6	35,3	<b>0,0</b>	
49	0192	F	31	12,8	36,5	4,84	<b>75,4</b>	26,4	35,1	<b>0,0</b>	
50	0135	M	63	13,7	40,0	5,30	<b>75,5</b>	25,8	34,3	<b>0,0</b>	
51	0032	M	35	13,2	37,0	4,90	<b>75,5</b>	26,9	35,7	<b>0,0</b>	
52	0101	F	18	12,0	34,0	4,50	<b>75,6</b>	26,7	35,3	<b>0,0</b>	
53	0121	F	12	13,3	37,5	4,93	<b>76,1</b>	27,0	35,5	<b>0,0</b>	
54	0090	F	73	13,2	35,0	4,60	<b>76,1</b>	28,7	37,7	<b>0,0</b>	
55	0158	F	11	12,8	38,0	4,98	<b>76,3</b>	25,7	33,7	<b>0,0</b>	
56	0182	F	24	10,7	30,0	3,91	<b>76,7</b>	27,4	35,7	<b>0,0</b>	
57	0178	F	18	14,2	39,5	5,11	<b>77,3</b>	27,8	35,9	<b>0,0</b>	
58	0141	M	9	12,2	36,5	4,71	<b>77,5</b>	25,9	33,4	<b>0,0</b>	
59	0168	F	14	14,3	42,0	5,41	<b>77,6</b>	26,4	34,0	<b>0,0</b>	
60	0161	F	8	13,6	39,0	5,02	<b>77,7</b>	27,1	34,9	<b>0,0</b>	
61	0111	M	38	15,6	45,5	5,85	<b>77,8</b>	26,7	34,3	<b>0,0</b>	
62	0155	F	30	13,4	38,0	4,88	<b>77,9</b>	27,5	35,3	<b>0,0</b>	
63	0104	F	15	14,4	40,5	5,20	<b>77,9</b>	27,7	35,6	<b>0,0</b>	
64	0171	F	12	12,5	35,5	4,54	<b>78,2</b>	27,5	35,2	<b>0,0</b>	
65	0087	M	9	14,0	41,5	5,30	<b>78,3</b>	26,4	33,7	<b>0,0</b>	
66	0019	F	6	14,4	42,0	5,34	<b>78,7</b>	27,0	34,3	<b>0,0</b>	
67	0190	M	12	11,2	32,5	4,13	<b>78,8</b>	27,2	34,5	<b>0,0</b>	
68	0109	F	8	14,3	39,5	5,01	<b>78,8</b>	28,5	36,2	<b>0,0</b>	
69	0118	F	56	15,2	42,5	5,36	<b>79,3</b>	28,4	35,8	<b>0,0</b>	
70	0164	F	28	13,2	38,0	4,79	<b>79,3</b>	27,6	34,7	<b>0,0</b>	
71	0187	F	30	14,4	38,0	4,79	<b>79,3</b>	30,1	37,9	<b>0,0</b>	
72	0072	M	45	16,2	43,5	5,48	<b>79,4</b>	29,6	37,2	<b>0,0</b>	
73	0188	F	19	12,8	33,5	4,21	<b>79,6</b>	30,4	38,2	<b>0,0</b>	
74	0143	F	50	14,4	39,5	4,96	<b>79,6</b>	29,0	36,5	<b>0,0</b>	
75	0165	F	53	12,8	39,5	4,96	<b>79,6</b>	25,8	32,4	<b>0,0</b>	
76	0133	F	39	14,3	41,0	5,13	<b>79,9</b>	27,9	34,9	<b>0,0</b>	
77	0145	F	31	14,5	41,0	5,13	<b>79,9</b>	28,3	35,4	<b>0,0</b>	
78	0070	F	6	14,6	44,0	5,50	<b>80,0</b>	26,5	33,2	<b>0,0</b>	
79	0150	F	5	14,4	40,0	5,00	<b>80,0</b>	28,8	36,0	<b>0,0</b>	
80	0153	F	27	11,2	33,6	4,20	<b>80,0</b>	26,7	33,3	<b>0,0</b>	
81	0144	F	25	13,0	37,3	4,66	<b>80,0</b>	27,9	34,9	<b>0,0</b>	
82	0056	F	60	13,9	41,0	5,12	<b>80,1</b>	27,1	33,9	<b>0,0</b>	

<b>Eritrograma e Eletroforese de Hemoglobina (Hb) indexados por Hb H<sup>+</sup>, VCM</b>											
Nº	Cód.	Sexo (M/F)	Idade (anos)	Hb (g/dl)	Ht (%)	E (10 <sup>6</sup> /µl)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	Hb H (%)	Obs
83	0057	M	41	16,4	48,0	5,99	<b>80,1</b>	27,4	34,2	<b>0,0</b>	
84	0029	M	15	16,1	46,5	5,80	<b>80,2</b>	27,8	34,6	<b>0,0</b>	
85	0138	F	20	12,7	38,5	4,80	<b>80,2</b>	26,5	33,0	<b>0,0</b>	
86	0200	F	24	12,2	33,6	4,18	<b>80,4</b>	29,2	36,3	<b>0,0</b>	
87	0130	F	30	13,8	39,0	4,85	<b>80,4</b>	28,5	35,4	<b>0,0</b>	
88	0195	F	19	13,7	37,5	4,63	<b>81,0</b>	29,6	36,5	<b>0,0</b>	
89	0180	F	60	14,8	42,0	5,14	<b>81,7</b>	28,8	35,2	<b>0,0</b>	
90	0167	F	25	11,9	35,0	4,28	<b>81,8</b>	27,8	34,0	<b>0,0</b>	
91	0053	M	15	15,6	45,5	5,42	<b>83,9</b>	28,8	34,3	<b>0,0</b>	
92	0082	F	37	12,3	37,0	4,60	<b>80,6</b>	26,7	33,2	<b>0,0</b>	
93	0152	M	78	13,1	38,0	4,72	<b>80,5</b>	27,8	34,5		
94	0091	F	28	15,9	42,5	5,27	<b>80,6</b>	30,2	37,4		
95	0162	F	42	12,6	35,0	4,33	<b>80,8</b>	29,1	36,0		
96	0096	F	62	14,4	40,5	5,01	<b>80,8</b>	28,7	35,6		
97	0085	F	22	16,3	46,0	5,69	<b>80,8</b>	28,6	35,4		
98	0126	F	35	14,9	43,0	5,31	<b>81,0</b>	28,1	34,7		
99	0086	M	14	12,9	36,5	4,50	<b>81,1</b>	28,7	35,3		
100	0024	F	23	12,9	37,5	4,61	<b>81,3</b>	28,0	34,4		
101	0115	F	19	14,8	42,5	5,22	<b>81,4</b>	28,4	34,8		
102	0039	F	38	12,6	36,5	4,48	<b>81,5</b>	28,1	34,5		
103	0139	F	17	13,6	38,5	4,72	<b>81,6</b>	28,8	35,3		
104	0034	F	73	13,9	38,0	4,65	<b>81,7</b>	29,9	36,6		
105	0083	F	54	14,3	42,0	5,13	<b>81,9</b>	27,9	34,0		
106	0013	M	31	12,4	37,5	4,58	<b>81,9</b>	27,1	33,1		
107	0071	F	14	14,2	42,0	5,12	<b>82,0</b>	27,7	33,8		
108	0105	F	42	13,8	40,5	4,93	<b>82,2</b>	28,0	34,1		
109	0154	F	25	12,7	36,0	4,38	<b>82,2</b>	29,0	35,3		
110	0122	M	50	15,5	45,0	5,46	<b>82,4</b>	28,4	34,4		
111	0173	M	59	12,6	38,0	4,61	<b>82,4</b>	27,3	33,2		
112	0080	M	20	13,4	38,5	4,67	<b>82,4</b>	28,7	34,8		
113	0001	F	22	14,2	39,0	4,72	<b>82,6</b>	30,1	36,4		
114	0041	F	33	9,9	30,5	3,69	<b>82,7</b>	26,8	32,5		
115	0102	F	4	11,7	32,0	3,87	<b>82,7</b>	30,2	36,6		
116	0060	F	35	13,9	41,5	5,01	<b>82,8</b>	27,7	33,5		
117	0149	M	27	14,1	41,0	4,93	<b>83,2</b>	28,6	34,4		
118	0065	M	42	16,4	47,5	5,70	<b>83,3</b>	28,8	34,5		
119	0099	F	44	14,2	44,0	5,28	<b>83,3</b>	26,9	32,3		
120	0003	F	14	11,5	33,5	4,02	<b>83,3</b>	28,6	34,3		
121	0117	F	56	13,9	40,0	4,80	<b>83,3</b>	29,0	34,8		
122	0134	F	27	14,1	39,5	4,73	<b>83,5</b>	29,8	35,7		
123	0129	F	20	14,3	41,0	4,90	<b>83,7</b>	29,2	34,9		
124	0073	F	53	11,7	35,0	4,17	<b>83,9</b>	28,1	33,4		

Eritrograma e Eletroforese de Hemoglobina (Hb) indexados por Hb H <sup>+</sup> , VCM											
Nº	Cód.	Sexo (M/F)	Idade (anos)	Hb (g/dl)	Ht (%)	E (10 <sup>6</sup> /µl)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	Hb H (%)	Obs
125	0049	F	50	15,1	44,5	5,29	<b>84,1</b>	28,5	33,9		
126	0063	F	22	15,1	44,5	5,29	<b>84,1</b>	28,5	33,9		
127	0170	F	30	12,5	36,0	4,27	<b>84,3</b>	29,3	34,7		
128	0156	F	72	11,6	35,0	4,15	<b>84,3</b>	28,0	33,1		
129	0189	M	18	16,6	47,0	5,57	<b>84,4</b>	29,8	35,3		
130	0136	F	79	13,6	39,5	4,66	<b>84,8</b>	29,2	34,4		
131	0089	F	42	13,4	40,0	4,71	<b>84,9</b>	28,5	33,5		
132	0031	F	9	15,1	43,0	5,06	<b>85,0</b>	29,8	35,1		
133	0199	F	32	14,0	38,0	4,47	<b>85,0</b>	31,3	36,8		
134	0124	F	34	14,2	43,5	5,11	<b>85,1</b>	27,8	32,6		
135	0061	F	41	10,9	31,5	3,70	<b>85,1</b>	29,5	34,6		
136	0069	F	33	13,4	42,5	4,99	<b>85,2</b>	26,9	31,5		
137	0146	F	22	13,9	42,0	4,92	<b>85,4</b>	28,3	33,1		
138	0194	M	23	14,0	41,5	4,86	<b>85,4</b>	28,8	33,7		
139	0093	F	53	13,0	37,5	4,38	<b>85,6</b>	29,7	34,7		
140	0140	F	33	13,5	39,0	4,55	<b>85,7</b>	29,7	34,6		
141	0198	F	60	14,5	39,0	4,54	<b>85,9</b>	31,9	37,2		
142	0151	F	22	13,1	38,5	4,44	<b>86,7</b>	29,5	34,0		
143	0008	F	60	14,6	41,5	4,77	<b>87,0</b>	30,6	35,2		
144	0010	F	85	14,2	39,0	4,47	<b>87,2</b>	31,8	36,4		
145	0015	F	53	13,4	37,0	4,24	<b>87,3</b>	31,6	36,2		
146	0026	M	49	10,2	34,0	3,89	<b>87,4</b>	26,2	30,0		
147	0160	M	70	12,5	37,0	4,23	<b>87,5</b>	29,6	33,8		
148	0157	M	89	12,6	36,0	4,11	<b>87,6</b>	30,7	35,0		
149	0012	M	66	14,5	44,0	5,02	<b>87,6</b>	28,9	33,0		
150	0023	F	14	11,9	35,5	4,05	<b>87,7</b>	29,4	33,5		
151	0058	F	20	15,7	47,5	5,40	<b>88,0</b>	29,1	33,1		
152	0088	F	63	13,9	39,0	4,43	<b>88,0</b>	31,4	35,6		
153	0183	F	61	15,8	43,5	4,94	<b>88,1</b>	32,0	36,3		
154	0191	F	12	13,2	37,5	4,25	<b>88,2</b>	31,1	35,2		
155	0046	F	16	10,7	31,0	3,51	<b>88,3</b>	30,5	34,5		
156	0038	M	34	15,8	44,5	5,03	<b>88,5</b>	31,4	35,5		
157	0050	M	55	13,9	43,0	4,86	<b>88,5</b>	28,6	32,3		
158	0197	F	18	12,9	37,0	4,18	<b>88,5</b>	30,9	34,9		
159	0045	F	57	13,1	42,0	4,74	<b>88,6</b>	27,6	31,2		
160	0169	F	53	14,7	42,0	4,73	<b>88,8</b>	31,1	35,0		
161	0044	F	55	12,2	39,5	4,44	<b>89,0</b>	27,5	30,9		
162	0172	F	52	16,1	48,0	5,39	<b>89,1</b>	29,9	33,5		
163	0025	F	31	12,0	38,0	4,26	<b>89,2</b>	28,2	31,6		
164	0148	F	65	14,6	42,0	4,70	<b>89,4</b>	31,1	34,8		
165	0018	F	20	12,9	37,5	4,19	<b>89,5</b>	30,8	34,4		

<b>Eritrograma e Eletroforese de Hemoglobina (Hb) indexados por Hb H<sup>+</sup>, VCM</b>											
Nº	Cód.	Sexo (M/F)	Idade (anos)	Hb (g/dl)	Ht (%)	E (10 <sup>6</sup> /µl)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	Hb H (%)	Obs
166	0114	F	56	14,5	42,0	4,68	<b>89,7</b>	31,0	34,5		
167	0009	M	40	16,8	51,0	5,68	<b>89,8</b>	29,6	32,9		
168	0028	F	25	13,1	40,0	4,45	<b>89,9</b>	29,4	32,8		
169	0079	F	68	14,1	41,0	4,56	<b>89,9</b>	30,9	34,4		
170	0007	F	20	13,2	38,0	4,21	<b>90,3</b>	31,4	34,7		
171	0081	F	29	12,2	38,5	4,26	<b>90,4</b>	28,6	31,7		
172	0110	F	51	12,8	38,0	4,20	<b>90,5</b>	30,5	33,7		
173	0062	F	27	15,1	43,5	4,80	<b>90,6</b>	31,5	34,7		
174	0059	F	36	15,6	44,5	4,90	<b>90,8</b>	31,8	35,1		
175	0078	F	39	12,7	39,0	4,29	<b>90,9</b>	29,6	32,6		
176	0052	F	32	12,6	38,0	4,18	<b>90,9</b>	30,1	33,2		
177	0108	F	81	12,7	39,0	4,27	<b>91,3</b>	29,7	32,6		
178	0016	F	11	10,2	31,0	3,39	<b>91,4</b>	30,1	32,9		
179	0067	M	8	15,8	46,0	4,99	<b>92,2</b>	31,7	34,3		
180	0017	M	39	12,7	36,0	3,90	<b>92,3</b>	32,6	35,3		
181	0022	F	40	11,7	34,0	3,67	<b>92,6</b>	31,9	34,4		
182	0030	F	30	13,5	40,0	4,29	<b>93,2</b>	31,5	33,8		
183	0037	F	15	11,7	34,5	3,70	<b>93,2</b>	31,6	33,9		
184	0021	F	9	13,5	39,0	4,18	<b>93,3</b>	32,3	34,6		
185	0112	F	12	12,3	35,0	3,75	<b>93,3</b>	32,8	35,1		
186	0094	F	8	14,3	42,5	4,55	<b>93,4</b>	31,4	33,6		
187	0054	F	4	12,0	37,0	3,94	<b>93,9</b>	30,5	32,4		
188	0011	F	6	13,0	39,5	4,20	<b>94,0</b>	31,0	32,9		
189	0006	F	34	11,4	33,5	3,55	<b>94,4</b>	32,1	34,0		
190	0066	F	49	11,0	33,5	3,54	<b>94,6</b>	31,1	32,8		
191	0106	F	53	13,7	42,0	4,42	<b>95,0</b>	31,0	32,6		
192	0035	M	60	13,7	40,0	4,18	<b>95,7</b>	32,8	34,3		
193	0147	M	68	17,2	50,0	5,21	<b>96,0</b>	33,0	34,4		
194	0020	M	22	15,4	49,8	5,16	<b>96,5</b>	29,8	30,9		
195	0033	F	11	13,7	41,0	4,22	<b>97,2</b>	32,5	33,4		
196	0005	M	45	15,7	45,0	4,59	<b>98,0</b>	34,2	34,9		
197	0036	F	6	12,8	38,0	3,87	<b>98,2</b>	33,1	33,7		
198	0042	F	7	11,0	38,5	3,78	<b>101,9</b>	29,1	28,6		
199	0076	M	31	15,8	45,0	4,31	<b>104,4</b>	36,7	35,1		
200	0004	M	25	10,8	38,0	3,55	<b>107,0</b>	30,4	28,4		

VCM (fL)	fi	fr	%
≤80*	87	0,435	<b>43,5</b>
80<VCM<100	110	0,550	55,0
≥100	3	0,015	1,5
<b>Total (Σ)</b>	<b>200</b>	<b>1,000</b>	<b>100,0</b>

HbH - alfa Tal	VCM < 80 fL		
	fi	fr	%
Presença	26	0,2989	<b>29,89</b>
Ausência	61	0,7011	70,11
Total	87	1,0000	100,00

Gênero	Frequência		
	fi	fr	%
Feminino	150	0,7500	75,00
Masculino	50	0,2500	25,00
Total	200	1,0000	100,00

## ANEXO I – VALORES REFERENCIAIS DO ERITROGRAMA

## Valores Referenciais do Eritrograma

Idade	Hb (g/dl)	Ht (%)	E ( $10^{12}/l$ )	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
	( $\pm 2dp$ )	( $\pm 2dp$ )	( $\pm 2dp$ )	( $\pm 2dp$ )	( $\pm 2dp$ )	( $\pm 2dp$ )
Nascimento (cordão)	16,5 (13,5 – 19,5)	51 (42 – 60)	4,7 (3,9 – 5,5)	108 (98 – 118)	34 (31 – 37)	33 (30 – 36)
1 semana	17,5 (13,5 – 21,5)	54 (42 – 66)	5,1 (3,9 – 6,3)	107 (88 – 126)	34 (28 – 40)	33 (28 – 38)
1 mês	14 (10,0 – 18,0)	43 (31 – 55)	4,2 (3,0 – 5,4)	104 (85 – 123)	34 (28 – 40)	33 (29 – 37)
6 meses a 2 anos	12 (10,5 – 13,5)	36 (33 – 39)	4,5 (3,7 – 5,3)	78 (70 – 86)	27 (23 – 31)	33 (30 – 36)
6 a 12 anos	13,5 (11,5 – 15,5)	40 (35 – 45)	4,6 (4,0 – 5,2)	86 (77 – 95)	29 (25 – 33)	34 (31 – 37)
Mulher adulta	14 (12,0 – 16,0)	41 (36 – 46)	4,6 (4,0 – 5,2)	90 (80 – 100)	30 (26 – 34)	34 (31 – 37)
Homem adulto	15,5 (13,5 – 17,5)	47 (41 – 53)	5,2 (4,5 – 5,9)	90 (80 – 100)	30 (26 – 34)	34 (31 – 37)

Fonte: Wintrobe, 2008; Adaptado pelo autor.