

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Triagem de Hemoglobinopatias em Doadores de Sangue em Área de Colonização
Italiana do Rio Grande do Sul, Brasil.**

Cristina Lucia Alberti Lisot

Orientadora: Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla

Dissertação de Mestrado

2003

Lisot, Cristina Lucia Alberti

Triagem de Hemoglobinopatias em Doadores de Sangue em Área de Colonização Italiana do Rio Grande do Sul, Brasil./ Cristina Lucia Alberti Lisot – Porto Alegre, 2003. cxlii, 142f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Título em Inglês: Hemoglobinopathy Screening in Blood Donors from a Region Colonized by Italians in Rio Grande do Sul, Brazil

1.Hemoglobinopatias. 2.Triagem 3.Doadores de sangue
4.Eletroforese

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é o resultado de um processo, de ensaio e investigação. Movimentos dolorosos. O que lhes cai às mãos é minha dança nestes últimos dois anos.

Aprendi sobre hemoglobinopatias, mas devo confessar que mais aprendi sobre mim. Percebo hoje que estarei sempre aprendendo.

Quero então agradecer aos que me ajudaram.

A todos os meus amigos, em especial aos que me ensinaram a aceitar e reconhecer os ciclos da vida, mesmo sem o saber.

A minha amada irmã Carolina que foi atenta, sem ser protetora, no momento em que “desconstruí” coisas, para reconstruí-las melhor. Arquitetura também é restauro, reconstrução!

Ao Cako, irmão do coração, pelas inúmeras consultas ao longo da vida. Médicas ou não. À Tati, pelo exemplo de força.

A Dra. Lúcia, pela orientação e pelas palavras que no entremeio ao caminho, me ajudaram a esclarecer o rumo.

À Dra. Sandra Fuchs, por me apoiar no momento mais difícil.

Aos meus amadíssimos pais, e sempre a eles. Quero registrar a ajuda do meu pai para o caminho da liberdade e a da minha mãe para o caminho da sensibilidade.

À minha tia Mônica.

À Mariângela Moschen, por me alertar, me incentivar e me dar espaço.

A todos os funcionários do HEMOCS pelo acolhimento às minhas "invenções de moda". Em especial à Odete e a Sionara pelo sempre dedicado trabalho técnico e também pelo bem querer.

À Viga, ao Guima e à Letícia.

A Prefeitura Municipal de Caxias do Sul e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre/FIPE pelo suporte financeiro.

A Neusa(Idina) pela inestimável ajuda de naturezas diversas...

Aos colegas de pós-graduação pelas palavras, em especial à Cida e à Elvira.

Obrigada também a Sandrine e ao Rafael pelas valiosas sugestões, correções e incentivo.

À Gi, pelo recomeço.

Ao Jederson, pelo conforto.

À força que me rege, por me ensinar a aprender.

À Stela.

Adolescente

A vida é tão bela que chega a dar medo.
Não o medo que paralisa e gela, estátua súbita,
Mas esse medo fascinante e fremente de curiosidade
Que faz o jovem felino seguir para frente
Farejando o vento ao sair, a primeira vez da gruta.

Medo que ofusca: luz!

Cumplicemente, as folhas contam-te um segredo velho como o mundo:

Adolescente: olha!

A vida é nova...

A vida é nova e anda nua – vestida apenas com o teu desejo!

Mário Quintana

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Hemoglobina.....	18
2.1.1 Estrutura.....	20
2.1.2 Função.....	24
2.1.3 Degradação.....	26
2.2 Biossíntese da Hemoglobina.....	26
2.3 Genética Molecular da Hemoglobina.....	28
2.4 Anemias.....	31
2.4.1 Definição de Hemoglobinopatias Quantitativas e Qualitativas.....	32
2.5 Hemoglobinopatias Qualitativas Devido às Variantes mais Comuns.....	33
2.5.1 Hemoglobina S.....	34
2.5.1.1 Estrutura e Determinantes Fisiológicos do Polímero da Hb S.....	34
2.5.2 Hemoglobina C.....	36
2.5.3 Hemoglobina D.....	37
2.5.4 Hemoglobina E.....	38
2.5.5 Hemoglobina O.....	39
2.5.6 Hemoglobina I.....	39
2.5.7 Hemoglobina H.....	40

2.6	Talassemias e Distúrbios Afins.....	40
2.6.1	Classificação das Síndromes Talassêmicas	43
2.6.1.1	Alfa-talassemias.....	43
2.6.1.1.1	Portador silencioso, ou Alfa-talassemia 2, ou α^+ -talassemia.....	44
2.6.1.1.2	Traço Alfa-talassêmico, ou Alfa-talassemia 1, ou α^0 -talassemia	46
2.6.1.1.3	Doença da Hemoglobina H.....	47
2.6.1.1.4	Hidropsia Fetal.....	48
2.6.1.2	Beta-talassemia	48
2.6.1.2.1	Beta-talassemia Maior (Anemia de Cooley).....	50
2.6.1.2.2	Beta-talassemia Intermediária.....	51
2.6.1.2.3	Beta-talassemia Menor/ Beta-talassemia Heterozigota	52
2.6.1.3	Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal(PHHF).....	53
2.7	Técnicas Laboratoriais para Diagnóstico das Hemoglobinopatias.....	54
2.8	Polimorfismo Balanceado.....	57
2.9	Prevalência das Hemoglobinopatias	59
2.10	Prevenção e Ética.....	66
2.11	Política de Abordagem.....	67
2.12	Formação Étnica do Sul do Brasil	69
2.12.1	População do Estado do Rio Grande do Sul.....	73
2.12.2	Caxias do Sul – Histórico	75
3	JUSTIFICATIVA	80
4	OBJETIVO DA PESQUISA	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

ARTIGO EM INGLÊS

Hemoglobinopathy Screening in Blood Donors from a Region Colonized by Italians in Rio Grande do Sul, Brazil.....98

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Triagem de Hemoglobinopatias em Doadores de Sangue em Área de Colonização Italiana do Rio Grande do Sul, Brasil.....117

ANEXOS..... 136

LISTA DE ABREVIATURAS

Letras gregas

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ε	Épsilon
ζ	Zeta
θ	Teta
ψ	Psi

Bases nitrogenadas

A	Adenina
T	Timina
C	Citosina
G	Guanina

Índices Hematimétricos

VCM	Volume corpuscular médio
HCM	Hemoglobina corpuscular média
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
RDW	<i>Red cell distribution width</i>

Referências geográficas

AFR	África Sub-Saara
AMR	Américas
EMR	Região Mediterrânea Leste
EUR	Europa
SEAR	Região do Sudeste Asiático
WPR	Região do Pacífico Oeste

NE Mesoregião Nordeste

SE Mesoregião Sudeste

Aminoácidos

Lys	Lisina
Val	Valina
Glu	Ácido glutâmico

Unidades de medida

g/dL	Gramas por decilitro
fl	Fentolitro
pg	Picograma

Biologia molecular da célula

DNA	Ácido desoxiribonucleico
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementar

RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro

Fórmulas moleculares

O₂	Oxigênio
CO₂	Dióxido de carbono

2,3-DPG	2,3-Difosfoglicerato
----------------	----------------------

Antígenos eritrocitários

Fy^a	Antígeno Duffy a
Fy^b	Antígeno Duffy b

Hemoglobinopatias

PHHF	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
-------------	---

Hemoglobinas

Hb	Hemoglobina
Hb A	Hemoglobina A
Hb A₂	Hemoglobina A ₂
Hb AC	Heterozigoto para hemoglobina C
Hb AD	Heterozigoto para hemoglobina D
Hb AS	Heterozigoto para hemoglobina S
Hb Bart's	Hemoglobina Bart's

Hb C	Hemoglobina C
Hb CC	Homozigoto para hemoglobina C
Hb D	Hemoglobina D
Hb D-Punjand	Hemoglobina D-Punjand
Hb E	Hemoglobina E
Hb EE	Homozigoto para hemoglobina E
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb Gower-1	Hemoglobina Gower-1
Hb Gower-2	Hemoglobina Gower-2
Hb H	Hemoglobina H
Hb O	Hemoglobina O
Hb O-Arab	Hemoglobina O-Arab
Hb O₂	Óxi-hemoglobina
Hb Portland	Hemoglobina Portland
Hb S	Hemoglobina S
Hb SC	Heterozigoto para hemoglobina S e hemoglobina C
Hb SF	Heterozigoto para hemoglobina S e hemoglobina Fetal
Hb S/β	Heterozigoto para hemoglobina S e beta-talassemia
Hb SS	Homozigoto para hemoglobina S

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curvas de dissociação do oxigênio em diferentes concentrações de 2,3-difosfoglicerato(DPG).

Figura 2 - Proporções das várias cadeias polipeptídicas de hemoglobina humana durante o início da vida.

Figura 3 - Organização dos agrupamentos de genes da globina humana nos cromossomos 16 e 11.

Figura 4 - Esquema do padrão de migração de diferentes hemoglobinas quando testadas em pH 8,4 e pH 6,0-6,2.

Figura 5 - Regiões segundo a Organização Mundial da Saúde e carreadores de desordens da hemoglobina.

Figura 6 - Distribuição de talassemia e outras hemoglobinopatias na Itália.

Figura 7 - Regiões mais representadas na emigração para a região de colonização italiana no nordeste do Rio Grande do Sul, em escala descendente.

Figura 8 - Mapa do estado do Rio Grande do Sul com indicações das regiões NW (Noroeste), NE (Nordeste), CW (Centro-oeste), CE (Centro-leste), SE (Sudeste), SW

(Sudoeste), MPOA (região metropolitana de Porto Alegre) e SC (estado de Santa Catarina).

Figura 9 - Mapa dos municípios da região de colonização italiana no nordeste do Rio Grande do Sul.

Figura 10 - Fotografia panorâmica da Cidade de Caxias do Sul.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Hemoglobinas humanas normais.

Tabela 2 – Características de mobilidade eletroforética, em pH alcalino, das principais hemoglobinas.

Tabela 3 – Principais imigrações para o Brasil em diferentes períodos.

1 INTRODUÇÃO

Uma diminuição na sobrevivência do glóbulo vermelho define hemólise (Nelson e Davey, 1995a; Mollison et al. 1997). Esta hemólise pode ser devida a defeitos na membrana do eritrócito, na hemoglobina ou metabólitos, ou ainda a fatores adquiridos (Bain, 1997). É importante para o sucesso em todo o ínterim de uma transfusão de glóbulos, que visa oferecer hemoglobina aos que tem carência deste componente, que as hemácias estejam em sua forma mais saudável. Contribui para esta causa, de maneira magna, a investigação das possíveis alterações qualitativas e quantitativas que são chamadas de hemoglobinopatias.

Dentre as hemoglobinopatias, as talassemias constituem um grupo heterogêneo de doenças geneticamente determinadas que, além de se caracterizarem por um defeito na síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina, se manifestam sob várias formas clínicas, dependendo da cadeia globínica afetada e da intensidade de tal comprometimento (Miller e Gonçalves, 1995; Naoum, 1997a). Quando este comprometimento se manifesta em genótipo heterozigoto, o portador normalmente tem ausência de sintomatologia clínica e pode apresentar valores de hematócrito e hemoglobina compatível com doação; o mesmo acontece em portadores de traço falcêmico, heterozigose para hemoglobina (Hb) C e outras inúmeras doenças da hemoglobina (Marques Júnior, 1994).

Os métodos utilizados para diagnóstico de hemoglobinopatias são muitos, porém, a triagem é freqüentemente realizada através do eritrograma e da eletroforese de hemoglobina. Técnicas mais sofisticadas incluem a focalização isoelétrica, cromatografia líquida de alta pressão e estudos moleculares. Diversos trabalhos têm sido realizados

visando encontrar testes de rastreamento suficientemente eficazes para o correto diagnóstico das inúmeras alterações hematológicas decorrentes das hemoglobinopatias (Marengo-Rowe, 1965; Lepp e Bluestein, 1978; Zago et al. 1984, Zago e Paçó-Larson, 1989; Skogesboe et al., 1991; Lubin et al., 1991; Ribeiro e Araújo, 1992; Flint et al., 1993; Baysal e Huisman, 1994; Molteni et al., 1994; Foglietta et al., 1996; Mohammad et. al, 1997; Guerra-Schinohara et al., 1999; Leoneli et al., 2000).

Doadores devem ser diagnosticados, instruídos quanto à morbidade e mortalidade das doenças e suas implicações. Desta maneira, o receptor de sangue é beneficiado com sangue de boa qualidade e o doador com o diagnóstico de uma alteração que pode ser prevenida em homozigose em seus descendentes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hemoglobina

O transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos é efetuado por uma molécula altamente especializada, a hemoglobina, que está contida nos milhares de eritrócitos circulantes (Thalassemia International Federation, 2000).

Em 1533, o teólogo e religioso espanhol, Michael Servetus descreveu como o sangue mudava de cor ao passar através dos pulmões. Servetus foi o primeiro a desafiar o antigo dogma de Galeno, que dizia que o sangue passava diretamente do ventrículo direito para o esquerdo através de poros invisíveis presentes no septo. Apesar da descoberta, relatada em “De Motu Cordis” (1628), William Harvey permaneceu intrigado com o porquê o sangue era obrigado a passar pelos pulmões (Bunn e Forget, 1986a).

A relação entre ar e sangue esperou os avanços da ciência através dos séculos. Em 1799, Sir Humphrey Davy demonstrou que o sangue continha mais oxigênio e dióxido de carbono do que poderia ser explicado por uma solução aquosa simples. Trinta e sete anos depois, Gustav Magnus comprovou que o sangue arterial continha mais oxigênio e menos dióxido de carbono do que o sangue venoso (Bunn e Forget, 1986a).

A natureza da relação entre oxigênio e sangue tornou-se tópico de considerável interesse durante o século XIX. O papel principal de ligação de oxigênio do “pigmento vermelho” do sangue foi estabelecido através de medidas espectrofotométricas. Em 1862, Felix Hoppe usou o termo *hemoglobina* para descrever este pigmento (Bunn e Forget, 1986a).

Um grande número de químicos, independentemente, mostrou que os cristais provenientes do tratamento da hemoglobina com ácido acético (chamado hemina),

continham ferro. Com a emergência da química orgânica na virada do século, o grupo prostético da hemoglobina, possuidor de ferro, atraiu considerável interesse. A estrutura do heme foi estabelecida por Kuster em 1912 e logo ficou explícito que esta singular porfirina era o grupo prostético não só da hemoglobina, como de uma grande variedade de proteínas respiratórias como as mioglobinas e algumas enzimas do citocromo. A partir do conhecimento da natureza do grupo prostético, o entendimento da inter-relação deste com as cadeias globínicas tornou-se possível (Weatheral e Clegg, 1981a; Bunn e Forget, 1986a).

Numerosos estudos seguiram, com o intuito de conhecer o peso molecular e a composição proteica desta molécula, quando, em 1956, Ingram separou os peptídeos produzidos após a digestão da globina por tripsina, o que levou a uma forte sugestão de que a hemoglobina consistia de duas metades idênticas. Uma reavaliação cautelosa feita pelos pesquisadores Rhinesmith, Schroeder e Pauling e por Braunitzer trouxe evidências de que a hemoglobina era um tetrâmero composto por dois pares de cadeias diferentes, designadas α e β . Assumiu-se, então, que cada cadeia de globina estava ligada ao grupo heme. O advento de poderosos métodos de determinação da estrutura proteica no começo dos anos 60 possibilitou a elucidação da estrutura da hemoglobina. A solução da estrutura tridimensional da molécula rendeu a Max Perutz o Prêmio Nobel em Química, em 1962 (Bunn e Forget, 1986a).

No começo dos anos 70, a descoberta da enzima transcriptase reversa tornou possível a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA mensageiro (Temin e Mizutani, 1970; Baltimore, 1970). Foram então obtidos cDNAs da alfa e beta globina, marcados radioativamente, o que possibilitou a análise de mRNA através de hibridização molecular (Kacian et al., 1973; Housman et al., 1973).

A tecnologia do DNA recombinante revolucionou o estudo da célula, possibilitando aos pesquisadores selecionarem qualquer gene entre milhares de genes a fim de determinar a estrutura exata deste. Técnicas estão disponíveis para investigar a seqüência de nucleotídeos de qualquer fragmento isolado de DNA (Alberts et al., 1999).

Desde a determinação da seqüência completa de nucleotídeos do genoma humano, possuímos as instruções necessárias e através das quais podemos detectar as mutações de DNA que são responsáveis pelas doenças herdáveis, além de inúmeras outras aplicações já consagradas. Mais do que isso, o domínio deste conjunto de conhecimentos amplia de maneira gigantesca os horizontes da pesquisa científica.

2.1.1 Estrutura

Para funcionar como o meio primário de troca de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2), a hemoglobina precisa satisfazer quatro requisitos básicos, delineados pela primeira vez por Barcroft em 1928. Ela deve ser capaz de transportar uma grande quantidade de oxigênio, deve ser altamente solúvel, deve captar e soltar o oxigênio em “pressões apropriadas” e deve ser um bom tampão. A hemoglobina humana normal preenche bem estes requisitos, embora muitas variantes anormais não sejam capazes de satisfazer uma ou mais dessas condições (Telen, 1998).

Aproximadamente 90% da hemoglobina humana adulta normal é hemoglobina A (Hb A) (Telen,1998) e é genericamente designada $\alpha_2\beta_2$ para indicar que contém duas cadeias alfa (α) e duas cadeias beta (β). Cadeias alfa também formam tetrâmeros com outras cadeias diferentes das beta (Bunn e Forget, 1986b) e assim, as hemácias também possuem outras hemoglobinas normais (Telen, 1998). A hemoglobina Fetal (Hb F), por exemplo, é um tetrâmero $\alpha_2\gamma_2$.

As hemoglobinas A, A₂, Gower I, Gower II e Portland são encontradas em diferentes proporções, dependendo da idade do indivíduo, sendo as três últimas proteínas embrionárias. A Hb F é a hemoglobina predominante na vida fetal e no início da primeira infância. Durante o primeiro ano de vida a Hb F é gradualmente substituída pela Hb A e apenas traços de Hb F podem ser encontrados no adulto. A Hb A₂ é encontrada em quantidades relativamente pequenas no feto; sua proporção cresce após o nascimento, mas atinge apenas cerca de 2 a 3% no adulto (Telen, 1998).

Tabela 1 – Hemoglobinas humanas normais. Adaptado de Telen, 1998 e Naoum, 1997c.

Nome	Designação	Estrutura molecular	Proporção no período		
			Pós-nascimento	Fetal	Embrionário
Hemoglobina adulta	A	$\alpha_2\beta_2$	96-98%	5-10%	0
Hemoglobina A ₂	A ₂	$\alpha_2\delta_2$	2,0-3,5%	Traços	0
Hemoglobina Fetal	F	$\alpha_2\gamma_2$	0-1%	90-100%	0
Portland		$\zeta_2\gamma_2$	0	0	5-20%
Gower I		$\zeta_2\varepsilon_2$	0	0	20-40%
Gower II		$\alpha_2\varepsilon_2$	0	0	10-20%

Estrutura primária

Uma vez que a estrutura das cadeias α , β , γ e δ normais da hemoglobina foram estabelecidas, a análise das variantes hemoglobínicas tornou-se muito menos difícil, pois geralmente representam uma única troca de aminoácido (Bunn e Forget, 1986b).

Estrutura primária das subunidades da globina humana

Cadeia alfa (α)

A cadeia α humana consiste de 141 aminoácidos ordenados em seqüência linear. O grupo heme é ligado covalentemente por ligação através do ferro e do resíduo imidazólico

da histidina da posição 87, a assim chamada histidina proximal (Bunn e Forget, 1986b).

Cadeia beta (β)

A cadeia β é levemente mais longa do que a alfa (146 resíduos). O heme liga-se a cadeia beta no resíduo histidina 92 (Bunn e Forget, 1986b).

Cadeias delta (δ), gama (γ), épsilon (ϵ) e zeta (ζ)

Existe considerável homologia estrutural entre as cadeias δ , γ , ϵ e β . De fato, esses são produtos de genes análogos em *tanden*, localizados no cromossomo 11. Da mesma maneira, as cadeias ζ são homólogas às cadeias α e são produtos de genes seqüenciais no cromossomo 16 (Bunn e Forget, 1986b).

Estrutura secundária

A estrutura secundária se refere à relação espacial entre os resíduos contíguos na seqüência linear estrutural. Segmentos da cadeia polipeptídica podem estabilizar-se através de dobramento em α -hélice ou β -folheto pregueado. As subunidades de hemoglobina seguem o padrão de dobramento em α -hélice. Em seu estado nativo, ao redor de 75% da molécula de hemoglobina é helicoidal. Em determinados locais das subunidades, a α -hélice é interrompida e nestes sítios a cadeia polipeptídica faz dobras responsáveis pela intrincada estrutura tridimensional da molécula (Bunn e Forget, 1986b).

Estruturas terciária e quaternária

A estrutura terciária se refere às relações estéricas dos domínios de seqüência separados entre si, quando analisados como parte de uma seqüência linear da proteína.

A estrutura quaternária é o modo através do qual as várias cadeias polipeptídicas se juntam para formar uma única molécula. Estas estruturas foram estudadas por técnicas de

difração de raios-x, especialmente por Perutz e seus colegas (Telen, 1998), onde, em suma, estabeleceu-se que cada globina tem duas regiões bem específicas denominadas de superfície interna e externa. A superfície externa é composta por maioria de aminoácidos polares e hidrofílicos que entram em contato com o meio aquoso circundante e, estruturalmente, representa a posição da molécula desprovida de dobraduras. A superfície interna é constituída por aminoácidos não-polares e hidrofóbicos e, estruturalmente, representa as regiões dobradas da molécula, bem como estabelece a proteção do grupo heme por meio da formação de uma bolsa totalmente impermeável formada por aminoácidos (Naoum, 1997b).

O ferro do heme forma ligação covalente com a histidina proximal e quando o oxigênio é ligado, este forma ligações covalentes com a histidina distal e com o heme, fazendo com que o heme fique suspenso numa fenda não-polar. Quando quatro cadeias polipeptídicas se combinam para formar a molécula completa de hemoglobina, cada cadeia fica posicionada aproximadamente nos vértices de um tetraedro regular (Telen, 1998). Contatos entre cadeias similares, isto é α_1 e α_2 ou β_1 e β_2 , são limitados e de pequena importância. Os dois principais contatos entre cadeias distintas foram denominados $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ e (Telen, 1998), embora similares, possuem diferenças de vários nanômetros em suas interfaces.

Os contatos estabelecidos entre as globinas $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ são bem extensos, com o envolvimento de 34 aminoácidos e, por isso, têm importância na estabilidade da molécula. Os contatos $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ são realizados somente por 19 aminoácidos, permitindo movimentos de deslizamentos das globinas alfa e beta, fato que facilita a oxigenação da molécula e a interação entre os quatro grupos heme. Os contatos α_1 e α_2 ocorrem somente

na forma desoxigenada da hemoglobina, e têm influência na interação entre os grupos heme, no efeito Bohr e no transporte de CO_2 . Os contatos β_1 e β_2 ocorrem nas formas oxigenadas e desoxigenadas, entretanto, é somente na forma desoxigenada que há fixação das moléculas de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) (Naoum, 1997b). Como resultado, existem duas estruturas quaternárias para a hemoglobina: uma para a forma desoxigenada e outra para a forma oxigenada. A principal diferença entre as duas é a natureza do contato (Telen, 1998).

2.1.2 Função

A função mais importante das hemácias e, por consequência, da hemoglobina é o transporte de gases respiratórios, oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) (Jandl, 1987), este transporte de oxigênio está baseado na capacidade dos átomos de ferro da hemoglobina se combinarem reversivelmente com o oxigênio molecular (Naoum, 1997b).

As átomos de ferro na forma ferrosa têm seis ligações de coordenação - quatro para os nitrogênios pirrólicos do heme, um para o nitrogênio imidazólico da histidina da cadeia de globina e uma que é ligação reversível para o oxigênio. À medida que a pressão parcial de oxigênio aumenta, os quatro grupos heme ligam-se seqüencialmente a uma molécula de oxigênio. No processo, ocorre uma mudança na configuração da molécula de hemoglobina, e esta configuração alterada favorece a ligação adicional de oxigênio (Nelson e Davey, 1995b). O processo foi demonstrado por Bohr e colaboradores em 1904, ao descobrirem que a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio estava significativamente reduzida na presença de concentrações elevadas de dióxido de carbono e conseqüente diminuição de pH (Telen, 1998). Outro fator importante a afetar a afinidade do oxigênio da hemoglobina é a concentração de compostos fosforilados, especialmente o 2,3-DPG (Telen,

1998).

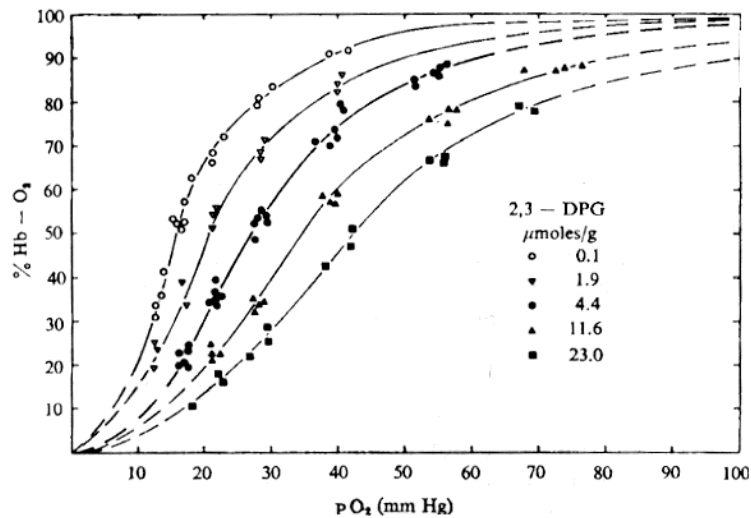


Figura 1 - Curvas de dissociação do oxigênio em diferentes concentrações de 2,3-difosfoglicerato (DPG). A curva é sigmóide e desvia-se para a direita com o aumento das concentrações de 2,3-DPG; isto resulta na diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e aumento da entrega de oxigênio para os tecidos. Adaptado de Nelson e Davey, 1995b.

A curva de dissociação do oxigênio da hemoglobina (Figura 1) em forma de sigmóide reflete a afinidade aumentada pelo oxigênio, com o aumento da pressão parcial de oxigênio nos pulmões. Nos tecidos, a conversão de $\text{HbO}_2 \rightarrow \text{Hb}$, a diminuição de pH, a temperatura aumentada produzida por processos metabólicos e a ligação de mais 2,3-DPG à hemoglobina, resultam em um desvio à direita da curva de dissociação Hb-O₂, favorecendo a liberação de oxigênio da hemoglobina (Nelson e Davey, 1995b).

Interpretando a curva de dissociação, é fácil entender que o 2,3-DPG, encontrado em grande quantidade nos eritrócitos e em pequenas quantidades nos tecidos, desvia a curva para a direita diminuindo a afinidade da hemoglobina para com o O₂.

Isoladamente, a hemoglobina variante S tem a mesma afinidade pelo oxigênio que a Hb A normal. Ocorre, porém, que eritrócitos falciformes contêm mais 2,3-DPG do que os

normais diminuindo a afinidade (Naoum, 1997b).

O transporte de dióxido de carbono pelas hemácias, diferentemente do oxigênio, não ocorre por ligação direta com o heme (Telen, 1998). Uma pequena parte do CO₂ das células vermelhas está dissolvida e outra pequena parte está ligada a grupos amino da hemoglobina, como carbamino-CO₂, mas a maioria está na forma de bicarbonato (Nelson e Davey, 1995b), além de ser também transportado pelo plasma (Telen, 1998; Nelson e Davey, 1995b).

2.1.3 Degradação

Após a remoção da célula vermelha da circulação, quando algumas enzimas glicolíticas diminuem sua atividade à medida que a célula envelhece, a hemoglobina é degradada dentro dos macrófagos do sistema retículoendotelial em seus três constituintes: ferro, protoporfirina e globina. O ferro é armazenado e reutilizado. A globina é degradada e retornada ao "pool" de aminoácidos do corpo e o anel de protoporfirina é aberto, convertido em bilirrubina e excretado do organismo sob forma de metabólitos (Nelson e Davey, 1995b).

2.2 Biossíntese da Hemoglobina

Estudos realizados em vários animais vertebrados têm demonstrado que, paralelamente ao desenvolvimento morfofisiológico que ocorre nas diferentes fases da gestação, são verificadas mudanças nos diferentes tipos de hemoglobinas características de cada espécie. Essas transformações têm sido consideradas como atividades adaptativas relacionadas à disponibilidade de oxigênio, durante o desenvolvimento do organismo (Naoum, 1997c).

Em 1961, Huehns e colaboradores descobriram dois componentes no sangue do embrião humano que diferiam da Hb A e da Hb F. Estes componentes migravam mais lentamente que a Hb A₂ na eletroforese em gel pH 8.6, e foram chamados de Hb Gower-1 e Gower-2 em homenagem a rua em Londres onde o Hospital da University College está situado (Bunn e Forget, 1986c). A primeira hemoglobina produzida pelo organismo (Gower-1) possui seqüências polipeptídicas características que são denominadas cadeias ϵ e ζ -globina (Rothstein, 1998).

As sínteses das hemoglobinas embrionárias estão restritas, em grande parte, às linhagens de células primitivas, enquanto que as Hb F, A e A₂ são produzidas pelas linhagens de células definitivas (Naoum, 1997c).

No período embrionário são produzidas a Hb Gower-1 ($\zeta_2 \epsilon_2$), Hb Portland ($\zeta_2 \gamma_2$) e a Hb Gower-2 ($\gamma_2 \epsilon_2$). Ao término deste período não ocorre mais síntese das hemoglobinas embrionárias, predominando nesta fase a Hb F, cuja produção tem início na quarta semana de gestação durante todo o desenvolvimento fetal. A Hb A ($\alpha_2 \beta_2$) é sintetizada a partir da décima semana e se mantém em concentrações próximas a 10% até o nascimento. A Hb A₂, por sua vez, formada por cadeias α e δ , começa a ser sintetizada na vigésima quinta semana, em concentrações reduzidas que permanecem até o nascimento, aumentando lentamente até se estabilizarem no sexto mês de vida (Naoum, 1997c) (Figura 2).

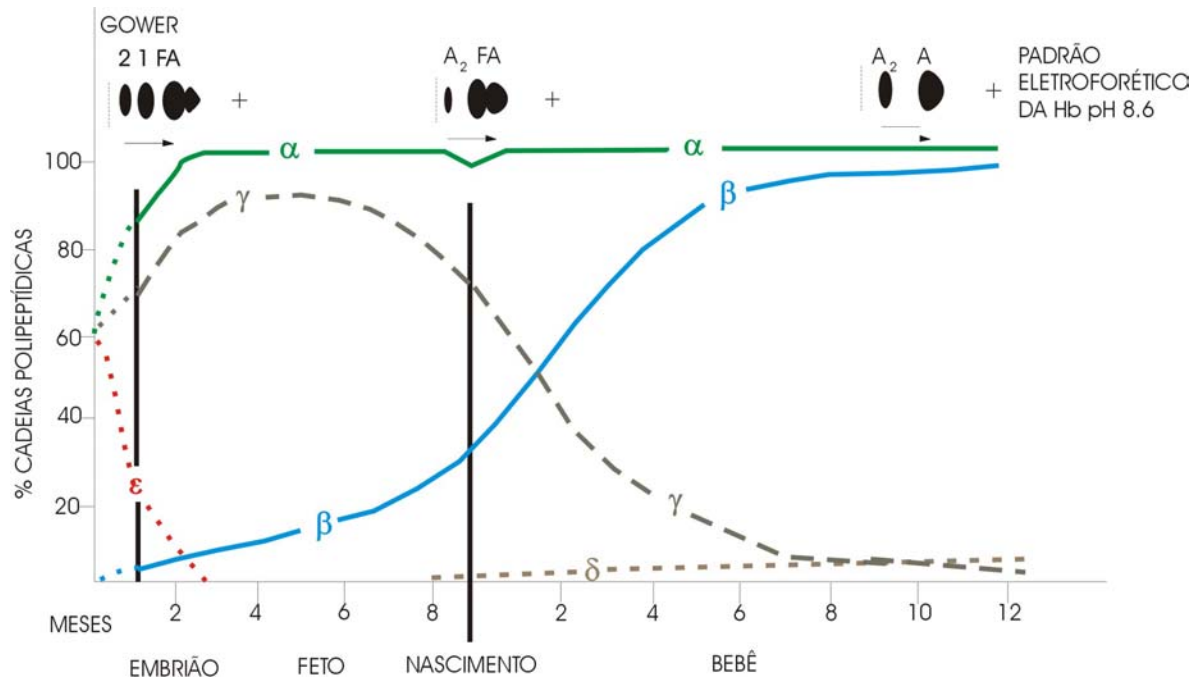


Figura 2 - Proporções das várias cadeias polipeptídicas de hemoglobina humana durante o início da vida. Mostra-se também o padrão eletroforético das hemoglobinas (Gower-1, Gower-2, Hb F, Hb A, Hb A₂) típico para cada período. Adaptado de Rothstein, 1998.

2.3 Genética Molecular da Hemoglobina

No braço curto do cromossomo 16, entre as banda p13.2 e o telômero, está o agrupamento de genes α (Weatherall e Clegg, 1981b; Olivieri, 1999; Wagner, 2002). Outros genes pertencentes a este complexo gênico são os genes zeta (ζ_2), três pseudogenes ($\psi\zeta_2$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$) e um gene com função ainda não bem definida, o gene teta (θ_1) (Bonini-Domingos e Naoum, 1997a; Naoum, 1997d). O locus do gene α é duplicado e existem quatro alelos (dois pares de genes) α idênticos em indivíduos normais (Dessypris, 1998; Chui et al., 2002). Em contraste, existe apenas um único par de genes codificando as cadeias β e δ (Dessypris, 1998). Na porção terminal do braço curto do cromossomo 11 estão os genes do tipo β , conhecidos também por "cluster" ou agrupamento dos genes β e que são compostos pelos genes ϵ (de atividade somente na fase embrionária), γ (de

atividade na fase fetal), δ e β , que , respectivamente, a produção das globinas ϵ , γ , δ e β (Naoum, 1997d, Wagner, 2002, Weatherall e Clegg, 1981b).

Pelo fato de a espécie humana ser diplóide podemos representar a presença normal dos diferentes genes para um indivíduo da seguinte forma: β/β , γ/γ , δ/δ e $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ (Naoum, 1997d).

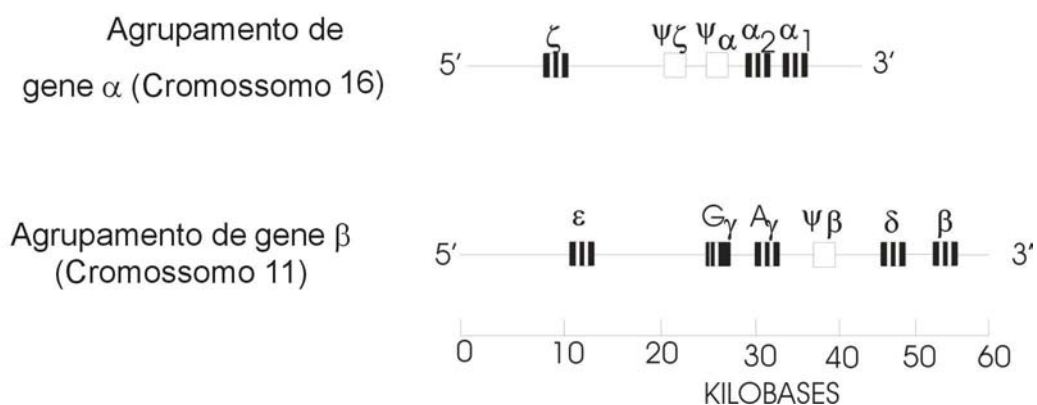


Figura 3 – Organização dos agrupamentos de genes da globina humana nos cromossomos 16 e 11. Áreas sólidas dentro dos genes, seqüências de codificação; áreas abertas, seqüências intrônicas. Cada agrupamento inclui pseudogenes ($\psi\zeta$, $\psi\alpha$ e $\psi\beta$), que têm homologia de seqüência a genes funcionais, mas incluem mutações que evitam sua expressão. Adaptado de Lukens, 1998a.

Todos os genes da globina funcional compartilham uma estrutura geral comum, consistindo de 3 éxons e 2 íntrons (Naoum, 1997d; Lukens, 1998a). A região promotora consiste de aproximadamente 100 pares de bases precedendo imediatamente o ponto no qual a transcrição começa. Três seqüências curtas dentro desta região ligam-se a uma enzima (RNA polimerase) que catalisa a síntese do RNA mensageiro (mRNA). Duas seqüências (TATA-box e CAT-box) são particularmente importantes para a iniciação da transcrição do gene. As mutações que envolvem essas seqüências reduzem a ligação da enzima, limitando a transcrição do gene. A região a jusante do terceiro éxon contém uma

seqüência (AATAAA) que informa a terminação da transcrição do gene. Considera-se que esta região desencadeia um processo enzimático que corta o mRNA no ponto apropriado e o libera para processamento posterior (Weatherall e Clegg, 1981b; Lukens e Lee, 1998).

Síntese das Globinas Tipo Alfa

A síntese das globinas tipo α é realizada por um grupo de genes que consiste em dois genes α estruturais α_1 e α_2 , genes estes que permanecem em atividade durante toda a vida do indivíduo. Seu ritmo normal de síntese é muito elevado, uma vez que a globina alfa participa da composição de quase todas as hemoglobinas. É importante ressaltar, neste contexto, que os dois genes α possuem diferença de síntese de globina; o gene α_2 tem capacidade de síntese duas vezes maior do que o gene α_1 (Naoum, 1997d). Apesar disto, os dois genes α apresentam idêntica estrutura molecular e alto padrão de homologia, fato que permite trocas genéticas entre eles (Naoum, 1997d).

O locus do gene ζ tem sua tradução progressivamente diminuída a partir da sexta semana de vida intra-uterina, reduzindo a produção de globina ζ . Ao mesmo tempo, são ativados os genes α_1 e α_2 , que passam a atuar durante o período fetal e por toda a vida após o nascimento (Naoum, 1997d).

Síntese das Globinas Tipo Beta

A síntese das globinas tipo beta é mais heterogênea e abrangente do que a do tipo alfa, pois envolve a produção das globinas beta, delta, gama e épsilon. O gene ϵ é expresso na fase embrionária, enquanto que os genes γ são característicos do período fetal. Os genes δ e β são atuantes a partir de uma fase do período fetal e se expressam por toda a vida após

o nascimento (Naoum, 1997d).

2.4 Anemias

Anemia é a diminuição da taxa de hemoglobina abaixo dos níveis mínimos, arbitrados pela Organização Mundial de Saúde em 13 g/dL para homens adultos, 12 g/dL para mulheres adultas e crianças de 6 a 12 anos, e 11 g/dL para gestantes e crianças de 6 meses a 6 anos. Como pode decorrer de uma multitude de causas, é uma síndrome. Sua prevalência é tão elevada que se constitui em problema mundial de saúde pública (Failace, 1995).

Os sinais e sintomas clínicos resultam da diminuição da entrega de oxigênio aos tecidos. Estão relacionados com a concentração de hemoglobina diminuída e com a volemia. Os fatores modificantes são ajustes compensatórios no rendimento cardíaco, a taxa respiratória e a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (Nelson e Davey, 1995a).

A detecção e diagnóstico da anemia são, freqüentemente, o foco de atenção no tratamento de pacientes (Wintrobe et al., 1998). É importante lembrar que o valor normal médio e limites inferiores de referência de medições e índices hematimétricos dependem da idade, sexo, altitude e biologia pessoal (Lee, 1998; Failace, 1995; Nelson e Davey, 1995a). A seleção de uma população de referência está repleta de problemas. Valores prevalentes localmente não devem ser considerados normais, pois levariam à conclusão errônea de que um padrão diferente aplica-se a uma subpopulação ou região geográfica específica (Wintrobe et al., 1998).

Geralmente, o paciente anêmico se queixa de fadiga fácil, dispnéia por exercício, e muitas vezes de desmaio, palpitações e dores de cabeça. Os achados físicos mais comuns são palidez, pulso rápido e latejante, alguns edemas dependentes e sopros sistólicos. Além

destes sinais e sintomas gerais, alguns achados clínicos são característicos de tipos específicos de anemias (Nelson e Davey, 1995a).

As causas de anemia pertencem a três grandes categorias fisiopatológicas: produção deficiente das células vermelhas, perda de sangue e destruição maior do que a capacidade compensatória da medula. "Anemia" não é um diagnóstico em si, mas apenas um sinal objetivo da presença de doença (Nelson e Davey, 1995a).

As anemias podem ter origem genética, ponto sobre o qual focaremos esta revisão da bibliografia; ou podem ser adquiridas em consequência de uma variedade de fatores como doenças carenciais, crônicas, etc...

2.4.1 Definição das Hemoglobinopatias Quantitativas e Qualitativas

As anormalidades herdadas da síntese de hemoglobina podem ser divididas em dois grupos: as caracterizadas por variantes de hemoglobinas estruturalmente anormais e aquelas nas quais uma ou mais cadeias de polipeptídeos da hemoglobina são sintetizadas a uma taxa reduzida (Lee, 1998).

Estas doenças podem ser divididas em grupos de acordo com o desempenho da função da hemoglobina (Lee, 1998). Muitas hemoglobinopatias são clinicamente assintomáticas pois a molécula de hemoglobina não tem sua função afetada. Algumas formam polímeros (Hb S) ou cristais (Hb C), outras são instáveis e ainda existem as em que uma única mutação pode diminuir a biossíntese da cadeia (hemoglobinopatias talassêmicas).

Durante a última metade do século XX, muito se aprendeu sobre as desordens herdadas da hemoglobina. Pesquisas sobre a fisiopatologia levaram a consideráveis crescimentos no controle e tratamento e, sobretudo, numa melhor compreensão da função e

do controle genético da síntese da hemoglobina (Weatherall e Clegg, 1999).

2.5 Hemoglobinopatias Qualitativas Devido às Hemoglobinas Variantes mais Comuns

Até 1998, 750 variantes estruturais da hemoglobina foram identificadas (Weatherall e Clegg, 1999). A maioria das variantes da hemoglobina normal foram detectadas devido ao seu comportamento eletroforético anormal (Bunn e Forget, 1986c).

Devido à sua prevalência e distribuição mundial, os distúrbios resultantes das hemoglobinas S, C e E têm enorme importância a nível de saúde pública (Lukens, 1998a).

As hemoglobinas variantes foram denominadas com letras do alfabeto, depois nomes geográficos, ou ambos, usualmente para distinguir hemoglobinas diferentes com características similares (Nelson e Davey, 1995a). Algumas destas hemoglobinas serão descritas ao longo do texto.

Cada hemoglobinopatia variante ocorre na forma homocigota e heterocigota. No estado heterocigoto, as hemácias contêm tanto a hemoglobina adulta normal (Hb A) como a hemoglobina variante. Como raramente a expressão fenotípica tem significado clínico, diz-se que os heterocigotos têm o "traço" para aquela anormalidade. No estado homocigoto, a Hb A está ausente e as manifestações clínicas são de gravidade variável. Além disso, a doença pode resultar da combinação de duas hemoglobinas variantes ou de uma hemoglobina variante e um gene de talassemia em interação. Estes estados duplamente heterocigotos são designados por ambos os produtos de gene aberrante, como por exemplo a doença da Hb SC, Hb S/ β tal (Lukens, 1998a).

2.5.1 Hemoglobina S

A hemoglobina falciforme (Hb S), assim denominada devido ao formato de foice que confere às hemácias desoxigenadas, é responsável por amplo espectro de distúrbios que variam em relação ao grau de anemia, frequência de crises, extensão da lesão ao órgão e duração da sobrevivência (Lukens, 1998a; Bandeira et al., 1999).

É uma doença conhecida há séculos por povos de diferentes regiões da África. Exames radiológicos de ossos de pessoas que viveram na África há mais de 7000 anos mostraram lesões características desta condição mórbida. Os doentes eram identificados por tatuagem incisional para facilitar o diagnóstico e proibir o casamento com membros sadios do grupo (Bonini-Domingos e Naoum, 1997b).

2.5.1.1 Estrutura e Determinantes Fisiológicas do Polímero da Hb S

A Hb S é causada por uma mutação no gene β da globina, onde há a substituição de uma base nitrogenada do códon GAG para GTG, resultando na substituição do ácido glutâmico (Glu) pela valina (Val) na posição 6 da globina (Bonini-Domingos e Naoum, 1997b).

A estrutura do polímero desoxigenado da Hb S foi deduzida de estudos envolvendo o uso de microscópio eletrônico e difração de raio-X. Análises estruturais indicam que a fibra de hemoglobina polimerizada é uma estrutura helicoidal com 14 ou 16 tetrâmeros de hemoglobina em cada camada. O equilíbrio da Hb S entre as suas fases líquida e sólida é determinado por quatro variáveis: tensão de oxigênio, concentração de Hb S, temperatura e outras hemoglobinas que não a Hb S (Hb A e Hb F têm efeito inibitório sobre a gelificação) (Lukens, 1998a).

As hemácias falciformes demonstram uma aderência anormal ao endotélio vascular

(Lukens, 1998a). A polimerização da Hb S deforma o eritrócito, fazendo com que a célula perca sua forma discóide, tornando-se alongada, com filamentos na sua extremidade. A alteração celular causada pelo processo de falcização influencia intensamente o fluxo sanguíneo, aumentando sua viscosidade (Bonini-Domingos e Naoum, 1997b). Assim, as características clínicas da anemia falciforme estão relacionadas à rigidez da membrana e polimerização da hemoglobina (Lukens, 1998a), são elas, principalmente, a hemólise e a vaso-oclusão.

Embora a doença atribuída a Hb S possa ser observada no início da lactância, os indivíduos afetados caracteristicamente não têm sintomas até a segunda metade do primeiro ano de vida. A falta de expressão clínica do genótipo da Hb SS durante a vida fetal e início da pós-fetal é explicada pela produção de quantidade suficiente de Hb F para limitar a falcização clinicamente importante (Lukens, 1998b). Este princípio é utilizado para o manejo da doença com hidróxiuréia (Lima et al., 1997).

O traço falciforme (Hb AS) caracteriza o portador assintomático. O portador da Hb AS não padece da doença e possui índices hematimétricos normais (Bonini-Domingos e Naoum, 1997b). Nessa condição a concentração de Hb A é sempre mais elevada do que a Hb S (Bonini-Domingos e Naoum, 1997b).

Ocasionalmente, o traço falciforme pode estar associado a condições clínicas graves que incluem: hipotermia, hematúria, aumento do risco às infecções do trato urinário durante a gravidez e retardo constitucional da pubescência. Os portadores de Hb AS, quando iniciam quadro de hipóxia, raramente desenvolvem sintomas relacionados a vaso-oclusão. No entanto, existem relatos de morte súbita e complicações clínicas em portadores de traço falciforme expostos a condições de baixa tensão de oxigênio durante e após processos cirúrgicos, em esforços físicos extenuantes associados à desidratação (Bonini-

Domingos e Naoum, 1997b).

As expectativas do prognóstico para pessoas homozigotas para anemia falciforme têm sofrido uma dramática alteração como resultado de diagnóstico precoce, educação do paciente e intervenção terapêutica (Lukens, 1998a; Howrey et al., 2000).

2.5.2 Hemoglobina C

A hemoglobina C (Hb C) foi descrita, em 1950, por Itano e Neel (Naoum, 1997e). Nesta hemoglobina, a lisina substitui o ácido glutâmico na sexta posição da cadeia beta. A carga positiva resultante desta substituição confere à variante uma mobilidade eletroforética lenta, tanto em pH ácido como em pH alcalino (Lukens, 1998a).

Esta variante, reconhecida pela primeira vez em Detroit, parece ter se originado na costa oeste da África (Lukens, 1998a), onde a prevalência de heterozigose para Hb AC alcança 30% da população (Naoum, 1997e). Embora menos convincente que para a Hb S, a distribuição da Hb C na África sugere que ela pode também ter conferido uma vantagem de sobrevivência em áreas endêmicas para malária (Lukens, 1998a).

Os portadores heterozigotos são assintomáticos, não têm anemia e não apresentam evidência do aumento da destruição precoce dos eritrócitos. A concentração da Hb C nas heterozigoses situa-se entre 30 e 40% (Naoum, 1997e).

O estado de homozigose para Hb C é caracterizado por anemia hemolítica de intensidade variável às vezes com icterícia e/ou esplenomegalia. O valor médio do hematócrito é de 33%; os valores individuais freqüentemente caem dentro da variação normal. O diagnóstico baseia-se na análise eletroforética da hemoglobina e a terapia não é necessária (Lukens, 1998a).

2.5.3 Hemoglobina D

No ano de 1951, Itano descobriu uma nova hemoglobina, que tinha características migratórias sob corrente elétrica idênticas a da Hb S, porém não apresentava a característica de afoçamento sob baixas tensões de oxigênio (Bunn e Forget, 1986d; Lukens, 1998a). Assim, a hemoglobina D (Hb D), é caracterizada por motilidade eletroforética igual a da Hb S em pH 8,6 (Lukens, 1998a; Leoneli et al, 2001), separável desta por eletroforese em ágar pH 6,2 e pela ausência da falcização dos eritrócitos (Naoum, 1997f).

Desde então, outras variantes foram encontradas e migram na mesma posição que a Hb S em eletroforese de pH alcalino. Elas têm sido nomeadas com o prefixo D e o nome do lugar onde foram descobertas (Bunn e Forget, 1986d).

Pelo menos 11 variantes de cadeia beta e 6 variantes de cadeia alfa têm as características eletroforéticas e de solubilidade da Hb D. A Hb D-Punjab (ou Los-Angeles) é de longe a mais comum das variantes (Lukens, 1998a). A estrutura desta hemoglobina é β 121 Glu→Gln (Bunn e Forget, 1986d).

O estado heterozigoto (Hb AD) não está associado a anormalidades clínica, hematológica ou fisiológica. A doença da Hb D homozigota é caracterizada por anemia hemolítica leve e esplenomegalia leve a moderada. Com apenas uma exceção, os estados duplamente heterozigotos para Hb S e Hb D são clinicamente assintomáticos. A hemoglobina D-Punjab interage com a Hb S para produzir anemia hemolítica leve e sintomas que simulam o da anemia falciforme leve (Lukens, 1998a).

2.5.4 Hemoglobina E

A hemoglobina E (Hb E) (β 26 Glu→Lys) é a segunda hemoglobina variante mais prevalente em todo o mundo. Aproximadamente 1 milhão de pessoas no mundo são homozigotas Hb EE (Bunn e Forget, 1986d). Das estimadas 30 milhões de pessoas heterozigotas para Hb E, mais de 80% vivem no sudeste asiático (Lukens, 1998a). A frequência gênica da cadeia β^E é de 0,05 na Tailândia e 0,10 em Burma. Na China, a frequência gênica cai para 0,001. A ocorrência de tão alta frequência em uma área específica pode ser o reflexo de algum tipo de polimorfismo balanceado onde os heterozigotos AE têm vantagens em nível de seleção natural (Bunn e Forget, 1986d).

A mobilidade eletroforética da Hb E é similar, embora um pouco mais rápida do que a Hb C em pH 8,6. Ela pode ser diferenciada da Hb C realizando-se uma eletroforese em gel de ágar em pH ácido (Lukens, 1998a).

Os heterozigotos para Hb E são assintomáticos. Níveis de hemoglobina estão normais, apesar das hemácias serem microcíticas, com um VCM médio em torno de 73 fl, existindo, então, um correspondente decréscimo no HCM e mantendo um CHCM normal (Bunn e Forget, 1986d).

Indivíduos homozigotos para Hb E também são assintomáticos. Os eritrócitos estão ainda mais microcíticos do que aqueles dos heterozigotos (Bunn e Forget, 1986d), e não existe anemia (Lukens, 1998a). Pode existir esplenomegalia, porém os sinais de hemólise são mínimos, podendo em certas circunstâncias, como por exemplo depois de estado gripal, tornarem-se mais evidentes (Naoum, 1997f).

Os portadores de Hb E associada com alfa ou beta-talasseмииs, e com outras variantes, especialmente a Hb S, podem apresentar sintomas clínicos mais importantes (Naoum, 1997f).

2.5.5 Hemoglobina O

A Hb O-Arab ($\beta 121 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$), foi identificada pela primeira vez em um garoto árabe em associação com Hb S. Tem sido encontrada em negros americanos, na Jamaica, no Sudão, Arábia Saudita, Iugoslávia, Bulgária, Egito e Grécia. Esta variante provavelmente se originou na África e espalhou-se no Oriente Médio (Lukens, 1998a).

Esta hemoglobina tem mobilidade eletroforética similar a da Hb C em pH alcalino, mas migra com a Hb S em pH ácido. O estado heterozigoto é clinicamente assintomático, porém o estado homozigoto para Hb O-Arab é caracterizado por anemia hemolítica leve e esplenomegalia (Lukens, 1998a).

2.5.6 Hemoglobina I

A Hb I ($\alpha 2 \text{ Lys} \rightarrow \text{Glu } \beta 2$) é uma das variantes de cadeia alfa mais comum (Bunn e Forget, 1986d).

Os portadores heterozigotos não apresentam anormalidades clínicas nem hematológicas. Apresentam, usualmente, ao redor de 25% de Hb I e 75% de Hb A. Esta proporção é similar em outras variantes de cadeia alfa e está consistente com a sabida presença de quatro cópias do gene α da globina (Bunn e Forget, 1986d). Mesmo nos portadores de interação entre Hb I e alfa ou beta-talassemias, os sintomas tendem a ser discretíssimos (Naoum, 1997f).

A Hb I tem propriedades funcionais normais, porém pode ter solubilidade diminuída quando comparada à Hb A. Quando submetida ao clássico teste de metabissulfito em lâmina, a Hb I assume a forma alongada, similar ao das células falciformes (Bunn e Forget, 1986d).

Todas as formas desta hemoglobina variante, que apresentam mobilidade bastante rápida em comparação com a Hb A, têm a mesma substituição de aminoácidos: lisina por ácido glutâmico. Essas variantes migram na mesma posição da Hb H em eletroforese de pH alcalino. Entretanto, em pH ácido de 6,5 a Hb I move-se em direção ao polo negativo, enquanto a Hb H permanece na origem da aplicação (Naoum, 1997f).

2.5.7 Hemoglobina H

A Hb H é um tetrâmero composto de quatro cadeias beta normais. Esta hemoglobina anormal é vista em indivíduos com alfa-talassemia (Bunn e Forget, 1986d).

A doença da Hb H é caracterizada pela anemia hemolítica crônica de intensidade variável (Bunn e Forget, 1986d). Corresponde aos indivíduos que apresentam apenas um gene α ativo. Resulta da associação gênica alfa-talassemia-1/alfa-talassemia-2 ($--/\alpha$) (Cançado, 1997).

A Hb H pode ser também um defeito adquirido, usualmente durante o curso de doenças mieloproliferativas (Bunn e Forget, 1986d; Chui et al., 2002). Ela é separada por eletroforese alcalina de sangue hemolisado com saponina a 1% e apresenta-se visível nos primeiros 20 minutos de migração (Naoum, 1997g). Por ser uma hemoglobina instável, forma inclusões de Heinz, que podem ser observadas ao microscópio ótico quando corado com azul de cresil brilhante por 60 minutos (Naoum, 1997g; Nelson e Davey, 1995b).

2.6 Talassemias e Distúrbios Afins

A talassemia não havia sido identificada como entidade clínica até que em 1925 Thomas Cooley, um pediatra de Detroit, descreveu uma síndrome ocorrente em crianças de descendência italiana, caracterizada por anemia profunda, esplenomegalia e deformidades

óssea (Lukens, 1998b).

O termo talassemia, derivado do grego $\theta\alpha\lambda\alpha\sigma\sigma\alpha$ (o mar), foi cunhado pela primeira vez por Whipple e Bradford, em 1932, para indicar a associação da doença com o mar Mediterrâneo (Bunn e Forget, 1986e).

Estas doenças constituem um grupo heterogêneo de mutações herdadas caracterizadas pelo funcionamento anormal do gene da globina, resultando em ausência total ou redução das sínteses das cadeias alfa ou beta da globina nas células eritróides humanas (Bunn e Forget, 1986f; Salzano e Bortolini, 2002). Este aspecto básico é de natureza quantitativa, e contrasta com as alterações qualitativas da estrutura da hemoglobina (Lukens, 1998b).

As talassemias podem ser classificadas de acordo com a cadeia cuja síntese está comprometida (Naoum, 1997g). A alfa-talassemia envolve ausência ou produção deficitária das cadeias alfa da globina, enquanto que na beta-talassemia, há o decréscimo ou ausência de produção das cadeias beta da globina. Em ambos os casos, não existem evidências de substituição de aminoácidos (Bunn e Forget, 1986f; Salzano e Bortolini, 2002).

Fisiopatologia

Existem muitas causas primárias e secundárias para a anemia observada na talassemia. A deficiência seletiva de uma ou mais cadeias polipeptídicas acarreta duas conseqüências imediatas: a redução da síntese de hemoglobina e o desequilíbrio entre as produções de cadeias alfa e não-alfa (Lukens, 1998b). É fácil de entender como a síntese reduzida de uma ou outra cadeia de globina da Hb A resulta num déficit desta e causa anemia hipocrômica e microcítica, com uma concentração de hemoglobina média baixa

(Bunn e Forget, 1986e), o que resulta numa eritrocitose de pouco significado clínico em heterozigotos (Lukens, 1998b).

Muito mais devastadora é a ruptura biossintética do equilíbrio entre as globinas. Na ausência de cadeias de globina complementares com as quais efetuar ligações, as cadeias cuja síntese está normal formam agregados, precipitam no citoplasma, lesionam as membranas celulares e conduzem a uma destruição prematura da célula. A primazia do desequilíbrio entre as cadeias de globina na fisiopatologia das talassemias é ilustrada pela natureza relativamente benigna dos estado de dupla heterozigose para a alfa e beta-talassemia, em que a síntese de ambas as cadeias está prejudicada, porém, dentro de uma situação de equilíbrio (Lukens, 1998b).

Os eritrócitos que contêm corpos de inclusão são retirados pelo baço, onde muitas destas células sofrerão lesões mecânicas e metabólicas irreparáveis (Lukens, 1998b).

O resultado desta atuação fisiopatológica que se verifica nos doentes talassêmicos é uma anemia hemolítica, com aumento da concentração da bilirrubina indireta e esplenomegalia (Moreira et al., 1997).

Em adição ao processo fisiopatológico operativo nas talassemias, um número de anormalidades secundárias ocorre e pode piorar os efeitos da anemia em pacientes afetados. Na talassemia intermédia ou em pacientes com programas de transfusão, a anemia pode ser agravada pela deficiência de ácido fólico, que pode ser facilmente desencadeada devido ao alto grau de requerimento resultante da hiperplasia eritróide massiva. Estes mesmos pacientes podem experimentar uma piora no grau de anemia durante crises aplásicas induzidas por parvovírus e outras condições como a gravidez, por exemplo (Bunn e Forget, 1986e).

2.6.1 Classificação das Síndromes Talassêmicas.

Existem diferentes tipos de talassemias dependendo da cadeia globínica cuja síntese está afetada. As duas categorias principais são a alfa e a beta-talassemia que podem ser subdivididas em diferentes subtipos que vai do estado heterozigoto ao homozigoto, gerando uma gama de síndromes hematológicas e clínicas (Bunn e Forget, 1986e; Salzano e Bortolini, 2002).

É importante destacar que as alfa-talassemias podem ter duas causas de origem: hereditária e adquirida. As formas hereditárias são as mais comuns e atingem, pelo menos, 4% da população brasileira. As formas adquiridas são secundárias a processos patológicos primários (Naoum, 1997g; Wenning et al., 2000).

2.6.1.1 Alfa-talassemias

A alfa-talassemia está associada a quatro síndromes clínicas. Este grupo de doenças é diferenciado e classificado de acordo com o número de genes α lesados, com a importante observação que o grau de lesão pode ser variável, afetando o gene parcial ou totalmente. (Bunn e Forget, 1986e)

São reconhecidos dois fenótipos no heterozigoto para alfa-talassemia: um caracterizado pela ocorrência de talassemia menor, e o outro pela ausência de anormalidades clínicas ou hematológicas. O primeiro desses fenótipos é conhecido como alfa-talassemia 1 e o segundo, alfa-talassemia 2 (Lukens, 1998b).

Atualmente, sabe-se que os determinantes da alfa-talassemia 1 estão associados à ausência completa da síntese de alfa-globina, e os fenótipos da alfa-talassemia 2 estão ligados apenas a uma redução desta proteína. Concomitantemente, hoje em dia, estas duas

variantes principais da alfa-talassemia são denominadas α^0 -talassemia e α^+ -talassemia (Lukens, 1998b).

A mutação que ocorre no gene α é uma deleção originada de um crossing-over desigual (Lukens, 1998b) ou, menos freqüentemente, outras mutações. Assim, as alfa-talasseмии se devem a deleção de um gene α ($-\alpha/\alpha\alpha$), deleção de dois genes α ($-\alpha/-\alpha$) ou ($--/\alpha\alpha$), de três ($--/-\alpha$) ou de quatro ($--/--$), deleções estas que podem diminuir (α^+) ou bloquear totalmente a síntese (α^0). Portanto, ao se representar a lesão do gene α pelo sinal (-), é compreensível que através de análises moleculares possa-se obter a indicação do grau de lesão genética, porém, para fins práticos, a classificação das talassemias é abordada com a representação genérica (-) (Naoum, 1997g).

A maioria das alfa-talasseмии é causada por deleções gênicas. Como, no genoma humano, existem cópias duplicadas do gene que codifica as cadeias alfa, o pareamento na meiose não é sempre perfeito e eventualmente alguns crossing-overs podem originar regiões com uma cópia do gene, bem como com três (Salzano e Bortolini, 2002).

As mutações deletoriais mais freqüentes, responsáveis pela alfa-talassemia, são: $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--MED$, $-(\alpha)^{20.5}$, $--SEA$, e as cinco mutações mais comuns não deletoriais são α^{Hph} , α^{NcoI} , $\alpha\alpha^{NcoI}$, α^{Ic} e α^{TSaudi} (Wenning et al., 2000; Borges et al., 2001).

2.6.1.1.1 Portador silencioso, ou Alfa-talassemia 2, ou α^+ -talassemia

É o tipo mais comum entre as talassemias (Naoum, 1997g). A deleção de um único gene não fica evidenciada por qualquer anormalidade (clínica ou hematológica). O estado de portador silencioso é inferido a partir de achados de estudos familiares cuja premissa é uma síndrome alfa-talassêmica sintomática (Lukens, 1998b).

Reticulócitos provenientes de indivíduos presumivelmente em estado de

portador silencioso (com base em estudos familiares) sintetizam menos alfa-globina (comparativamente à beta-globina). Contudo, em qualquer indivíduo, a relação entre a síntese de alfa-globina/beta-globina pode estar situada dentro da faixa de normalidade. A determinação da relação entre mRNAs para alfa-globina/beta-globina promove uma diferenciação mais clara entre indivíduos com um, dois, três ou quatro genes funcionais. Esta mensuração e o mapeamento genético representam o único meio confiável para uma identificação precisa (Lukens, 1998b).

O portador deste tipo de talassemia é assintomático e embora o volume corpuscular médio (VCM) se apresente como discretamente microcítico ($VCM < 80$), a morfologia eritrocitária é geralmente normal. A análise eletroforética da hemoglobina hemolisada com saponina pode revelar traços de Hb H que representam concentrações inferiores a 1% (Naoum, 1997g).

O diagnóstico laboratorial do portador silencioso de alfa-talassemia requer uma série de informações: discreta microcitose com valores de hemoglobina próximos ao limite inferior de normalidade, ausência de resposta ao tratamento com ferro, história familiar, e identificação de Hb H (Naoum, 1997g). Este diagnóstico pode ser realizado em levantamentos populacionais, através de mapeamento genético mostrando a deleção de um gene α da globina (Bunn e Forget, 1986e). Deleções que envolvem um único gene α da globina, tais como as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$, são resultado de um desalinhamento no crossover durante a meiose. Estas deleções e outras mutações de ponto envolvendo um único gene α da globina são conhecidas como mutações α^+ (Chui et al., 2002).

2.6.1.1.2 Traço Alfa-talassêmico, ou Alfa-talassemia 1, ou α^0 -talassemia

Esta condição clinicamente benigna é detectada principalmente em indivíduos com ancestrais asiáticos, mediterrâneos e africanos (Lukens, 1998b). Sua prevalência na população brasileira é de 4% entre os brancos e 10% entre os negros, com ampla variação regional (Naoum, 1997g).

Os achados hematológicos são indistinguíveis para os dois genótipos ($-\alpha/-\alpha$) ou ($--/\alpha\alpha$) (Bunn e Forget, 1986e). Os portadores, apesar de serem normais sob o ponto de vista clínico, podem referir fraqueza, cansaço, dores nas pernas e palidez (Naoum, 1997g).

Indivíduos afetados são detectados freqüentemente durante exames hematológicos de rotina ou durante estudos familiares de pacientes com desordens alfa-talassêmicas sintomáticas (Bunn e Forget, 1986e).

A concentração de hemoglobina encontra-se dentro da faixa de normalidade ou apenas ligeiramente diminuída como resultado da elevação do número de eritrócitos (Lukens et al., 1998b; Bunn e Forget, 1986e). Do ponto de vista morfológico, ocorre microcitose, hipocromia e ligeira anisocitose (Lukens, 1998b). A pesquisa da Hb H, em hemolisado com saponina a 1% revela concentrações próximas a 2% (Naoum, 1997g).

A detecção do traço talassêmico é mais sensível quando realizada em sangue de cordão umbilical ou em recém-nascidos com um mês de idade, pois a Hb Bart's (γ_4) apresenta-se com concentrações variáveis entre 5 e 10% (Naoum, 1997g). No entanto, apesar de ser possível confirmar a suspeita de diagnóstico eletroforético através de estudos da síntese das cadeias de globinas nos reticulócitos, assim como para o portador silencioso, o meio definitivo é o mapeamento de genes (Lukens, 1998b; Bunn e Forget, 1986e).

Existem mais de vinte deleções que removem ambos os genes α no mesmo

cromossomo 16 (in cis), ou todo o cluster $\zeta\alpha$, são elas chamadas mutações α^0 . Algumas deleções podem medir 100 – 300 Kb ou mais (Chui et al., 2002).

2.6.1.1.3 Doença da Hemoglobina H

Esta condição é caracterizada pela anemia hemolítica crônica de severidade variada, (Bunn e Forget, 1986e) e é decorrente da deleção de três genes alfa ($--/\alpha$) (Naoum, 1997g), freqüentemente causada pela deleção que remove ambos os genes α de um cromossomo 16 e uma deleção que remove um único gene α do outro cromossomo 16 (Chui et al., 2002).

A doença da Hb H afeta indivíduos em todo o sudeste da Ásia, ilhas do Mediterrâneo e partes do Oriente Médio. Ocorre raramente em populações de descendência africana (Lukens, 1998b). A doença da Hb H é rara no Brasil, apesar de vários relatos científicos provenientes de diferentes regiões do país (Naoum, 1997g).

A maioria dos pacientes têm nível de hemoglobina entre 8 e 10 g/dL com reticulocitose moderada (5 a 10%). Entretanto, como a variação é muito grande, é possível encontrar anemia de leve a severa. Esplenomegalia está normalmente presente e a hepatomegalia pode ocorrer (Bunn e Forget, 1986e).

O diagnóstico pode ser feito por eletroforese de hemoglobina. No recém-nascido é encontrado aproximadamente 20 a 40% de Hb Bart's (γ_4); gradualmente a Hb H(β_4) substitui a Hb Bart's na vida adulta e o nível desta varia entre 5 a 30% (Bunn e Forget, 1986e), sendo bem visível por eletroforese alcalina de sangue hemolisado com saponina (Ribeiro e Araújo, 1992; Naoum, 1997g).

A forma adquirida da doença da Hb H tem sido observada em associação com distúrbios mieloproliferativos, como a leucemia mielóide aguda, eritroleucemia,

anemia sideroblástica refratária e leucemia linfocítica aguda (Lukens, 1998b).

2.6.1.1.4 Hidropsia Fetal

O estado homozigoto para alfa-talassemia 1, ou a ausência de todos os quatro genes α , resulta na síndrome da Hidropsia Fetal com Hb Bart's (Lukens, 1998b; Bunn e Forget, 1986e).

Esse distúrbio, descrito em detalhes pela primeira vez em 1985 (Chui et al., 2002), e o mais devastador de todas as talassemias, é uma situação comum no extremo asiático sendo, entretanto, esporádico no Brasil (Naoum, 1997g; Lukens, 1998b). O quadro clínico é o de um bebê prematuro, pálido e edemaciado que, caso não tenha nascido morto, apresenta-se com uma angústia cardio-respiratória significativa por ocasião do nascimento, morrendo logo após. O óbito resulta de uma hipóxia severa, conseqüência da grande afinidade da Hb H e de Bart's pelo oxigênio (Lukens, 1998b). Eletroforeticamente, a concentração de HB Bart's está entre 80 a 100%, e a Hb H entre 10 a 20% (Naoum, 1997g).

2.6.1.2 Beta-talassemia

As beta-talassemias decorrem de mutações resultantes de uma diminuição da produção do mRNA, e redução da síntese da globina estruturalmente normal. Ao contrário das alfa-talassemias, quase todas as síndromes beta-talassêmicas são causadas por mutações que afetam a regulação ou expressão (e não a deleção) dos genes (Lukens, 1998b; Chui et al., 2002; Salzano e Bortolini, 2002).

O estudo da síntese das cadeias de globina no estado homozigoto revela dois tipos principais de beta-talassemia: uma com algumas cadeias beta residuais (tipo β^+), e outra sem (tipo β^0) (Lukens, 1998b; Andrade et al., 2002). Conseqüentemente, as cadeias de

alfa-globina que são sintetizadas normalmente, acumulam-se nos eritrócitos durante a eritropoiese, causando agregação e precipitação. Os precipitados, formados em quantidades variáveis, danificam a membrana e destroem prematuramente essas células provocando anemia (Moreira et al., 1997). A hemoglobina A₂, formada por duas cadeias alfa e duas cadeias delta, ocasionalmente passa o seu limite normal de até 3,5% (Cançado, 1997).

As quatro mutações mais comuns observadas no Brasil, México, Cuba, Guadeloupe e Argentina são CD39C→T, IVS1.110G→A, -29A→G e IVS2.1G→A (Bertuzzo et al., 1997; Salzano e Bortolini, 2002).

O modo de herança das talassemias, assim como o de outras alterações genéticas da hemoglobina é autossômico e o termo dominante ou recessivo é difícil de ser aplicado. No entanto, a beta-talassemia é considerada de herança autossômica recessiva, porque são necessários dois genes anormais da beta-globina para produzir o fenótipo clinicamente detectável (Moreira et al. 1997).

Com a utilização de técnicas de biologia molecular foi possível a identificação de aproximadamente 140 tipos diferentes de beta-talassemias, cujas diversidades estão relacionadas com os tipos de mutação no gene β , podendo inclusive atingir os genes δ , pseudogene β -1, os genes γ -alanina e γ -glicina e até o gene embrionário ϵ (Moreira et al., 1997) (Figura 3). O processo fisiopatológico da beta-talassemia está também relacionado com o desequilíbrio que se verifica entre a síntese de globina α e β (Moreira et al., 1997).

Visto que, na prática clínica, freqüentemente é difícil uma definição acurada do genótipo, para a discussão subsequente será utilizada uma terminologia descritiva do fenótipo.

A forma mais severa da doença, a Talassemia Maior, caracteriza-se por uma anemia severa e por complicações da sobrecarga de ferro que limitam a vida do indivíduo. A

denominação Talassemia Intermediária é utilizada para designar uma anemia hemolítica menos severa. Talassemia Menor é um distúrbio assintomático em que ocorre pouca ou nenhuma anemia e, finalmente, a Talassemia Mínima refere-se a uma condição de difícil detecção, devendo contar com o auxílio de estudos familiares e/ou moleculares (Lukens, 1998b).

2.6.1.2.1 Beta-talassemia Maior (Anemia de Cooley)

A Beta-talassemia Maior é o resultado do estado homozigoto tanto do tipo β^0 quanto do tipo β^+ , ou, em casos mais raros, de duplo componente heterozigoto β^0/β^+ (Moreira et al., 1997). A β^0 -talassemia homozigota está associada a uma predominância de Hb F, e não de Hb A, e a de quantidades variáveis de Hb A₂. Em indivíduos com β^+ -talassemia homozigota da variedade Mediterrânea e nos portadores de β^0/β^+ -talassemia duplamente heterozigota, a concentração de Hb A é variável, a Hb F está aumentada e distribuída de forma heterogênea entre os eritrócitos e a Hb A₂ está normal, diminuída ou elevada (Lukens, 1998b). Resumindo, o padrão de hemoglobinas nos pacientes com beta-talassemia homozigota é variável, caracterizando-se pelo aumento da Hb F, com concentrações que podem variar entre 20 e 90%, o nível de Hb A₂ pode estar normal ou elevada e a Hb A aparece somente nos casos de deficiência parcial da síntese de cadeias beta (Bertuzzo et al. 1997; Moreira et al., 1997).

Comumente, ao ser documentada pela primeira vez a anemia é pronunciada com níveis de hemoglobina e hematócrito de 2,5 a 6,5 g/dL e 11 a 24%, respectivamente. A anemia é microcítica (VCM 48 a 72 fl) e hipocrômica (CHCM 23 a 32 g/dL) (Lukens, 1998b). Como ocorre nos casos de anormalidades estruturais da cadeia beta, a beta-

talassemia não fica evidente clinicamente durante os primeiros meses de vida. Subseqüentemente, a criança desenvolve palidez progressiva, aumento da circunferência abdominal e apresenta retardo no crescimento. O curso natural da Beta-talassemia Maior é o de infecções recorrentes, caquexia progressiva e morte por volta dos cinco anos de idade (Lukens, 1998b).

2.6.1.2.2 Beta-talassemia Intermediária

Esta síndrome, intermediária em termos de severidade entre a Talassemia Maior e a Talassemia Menor, pode ser produzida por uma grande variedade de genótipos; ela foi definida por uma classificação muito mais clínica do que genética ou laboratorial (Lukens, 1998b; Moreira et al., 1997).

Estima-se que 5 a 10% dos pacientes homozigotos para uma das mutações que afetam a síntese das cadeias beta apresentam quadro clínico e hematológico de gravidade intermediária entre as beta-talasseмии Menor e Maior. Eles apresentam microcitose, hipocromia, hemácias em alvo, pontilhado basófilo, policromasia, reticulocitose, bem como sinais de diseritropoiese, sem diferenças morfológicas em relação à Beta-talassemia Maior (Cançado, 1997). A hiperplasia da medula óssea é significativa (Lukens, 1998b). Os índices hematimétricos VCM e HCM tendem a ser mais baixos do que na forma maior e a eletroforese de hemoglobina mostra elevação dos valores de Hb A₂ (até 7%) e da Hb F (20 a 100%), e redução dos níveis de Hb A (0 a 80%), de acordo com o genótipo do paciente (Bertuzzo et al., 1997; Cançado, 1997). A concentração de hemoglobina se mantém na faixa de 6 a 9 g/dL, sem transfusões (Lukens, 1998b).

O crescimento e o desenvolvimento durante a infância, de uma maneira geral, não são comprometidos, a pubescência ocorre normalmente e a fertilidade é preservada. Apesar

disso, regularmente pode-se observar palidez, icterícia intermitente, esplenomegalia e alterações dos ossos da face, analogamente ao que se observa em casos de Talassemia Maior (Lukens, 1998b).

2.6.1.2.3 Beta-talassemia Menor/ Beta-talassemia Heterozigota

Os estados heterozigotos para o gene β^0 ou para o gene β^+ constituem os genótipos mais comuns para a Beta-talassemia Menor. Em cada um destes distúrbios, a eletroforese das hemoglobinas demonstra uma predominância de Hb A, níveis elevados de Hb A₂ (3,5 a 8%) e níveis normais ou minimamente elevados de Hb F (Lukens, 1998b).

As formas β^0 e β^+ são indistinguíveis por exames laboratoriais de rotina, necessitando de técnicas de síntese de cadeias ou biologia molecular com sondas de DNA para diferenciar os heterozigotos (Moreira et al., 1997).

Esta síndrome é quase sempre desvendada acidentalmente durante algum exame devido a sintomas não relacionados. Nenhum sintoma pode ser legitimamente atribuído ao distúrbio, e os achados físicos são a exceção (Lukens, 1998b). Quando presentes, as manifestações clínicas variam (Moreira et al., 1997). As mulheres afetadas ficam mais anêmicas durante a gravidez do que as mulheres não talassêmicas, mas raramente há necessidade de transfusão de sangue (Lukens, 1998b).

A hematimetria está elevada e os valores para VCM e HCM estão, na grande maioria dos casos, reduzidos (Bertuzzo et al. 1997; Lukens, 1998b). De um modo geral, a maioria de portadores de Beta-talassemia heterozigota apresentam padrão hematológico que são coincidentes em 90% dos casos descritos na literatura: VCM: 61 a 73 fl; HCM: 20 a 24 pg e Hb A₂: 4 a 8%. Formas atípicas de Beta-talassemia heterozigota podem ocorrer, das quais os principais tipos são a Beta-talassemia Heterozigota com Hb A₂

aumentada, VCM e HCM normais; Beta-talassemia heterozigota com Hb A₂ normal, Hb F discretamente elevada, VCM e HCM diminuídos e Beta-talassemia heterozigota com Hb A₂ aumentada e HCM normal (Moreira et al., 1997).

2.6.1.3 Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF)

Essa denominação é utilizada para os distúrbios genéticos que se caracterizam por persistência da síntese de Hb F até a vida adulta. Como outras síndromes talassêmicas, a PHHF está associada à incapacidade de síntese das globinas e ao desequilíbrio na relação entre as sínteses das cadeias alfa/não-alfa (Costa et al., 2002; Lukens, 1998b).

Este distúrbio é incluído na chave das beta-talasseмии devido ao fato de o gene β estar parcial ou totalmente bloqueado para a síntese de beta-globina, entretanto, na PHHF essa ação deletéria é compensada pela contínua síntese de Hb F (Moreira et al., 1997).

O estado de heterozigose não se faz acompanhar por qualquer anormalidade clínica. Embora a concentração de hemoglobina esteja normal, os valores para VCM e para HCM estão ligeiramente diminuídos. O nível de Hb A₂ está baixo (1,6 a 2,2%) e a Hb F está aumentada, para 10 a 36% (média 26%), estando distribuída de modo equitativo entre os eritrócitos (Costa et al., 2002; Lukens, 1998b).

O estado homozigoto também é clinicamente silencioso. Esplenomegalia e ligeira reticulocitose já foram descritas, porém a eritrocitose é uma observação consistente. A concentração de hemoglobina está um tanto aumentada (14,8 a 18,2 g/dL) em consequência da maior afinidade da Hb F pelo oxigênio. A Hb F constitui 100% da concentração de hemoglobina; Hb A e Hb A₂ estão ausentes (Lukens, 1998b).

O estudo molecular da PHHF tem tido grande interesse científico por propiciar um entendimento dos mecanismos regulatórios dos genes da globina. Além disso, a PHHF

atua como um modulador de gravidade em várias hemoglobinopatias (Costa et al., 2002).

2.7 Técnicas Laboratoriais para Diagnóstico das Hemoglobinopatias

Quando se busca testes para triagem populacional é importante considerar o custo – benefício e a acurácia dos métodos disponíveis (Wheatherall e Clegg, 1981d). Inúmeras são as técnicas diagnósticas disponíveis para as várias síndromes hemoglobínicas. O diagnóstico correto das hemoglobinopatias depende, portanto, da disponibilidade técnica e da escolha acertada dos métodos.

É indiscutível a importância dos índices hematimétricos. Técnicas citológicas podem ser adicionadas a estes dados, como a análise morfológica dos eritrócitos, pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H, de corpos de Heinz e teste de falcização (Nelson e Davey, 1995a) enquanto que dosagens bioquímicas, eletroforéticas e técnicas especiais como focalização isoeletrica, microcromatografia ou a cromatografia líquida de alta pressão também são de grande valia (Craver et al., 1997; Bain et al., 1998; Daudt et al., 2002; Wagner, 2002).

As eletroforeses de hemoglobina são as principais formas de identificação das hemoglobinas variantes além de desempenhar um papel importante no diagnóstico das talassemias (Wheatherall e Clegg, 1981d). O emprego do acetato de celulose como suporte destina-se às análises qualitativas das hemoglobinas em pH alcalino e neutro e à quantificação da Hb A₂, da Hb S em heterozigose e outras frações (Wheatherall e Clegg, 1981d; Bonini-Domingos e Naoum, 1997c). Em pH alcalino pode-se classificar as hemoglobinas anormais em cinco grupos principais de acordo com sua mobilidade, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2 – Características de mobilidade eletroforética, em pH alcalino, das principais hemoglobinas. Adaptado de Lukens e Lee, 1998.

Grupo	Mobilidade	Principais hemoglobinas
C	Mais lenta que S, HbC é um marcador	C, E, A ₂ , O Arab
S	Lenta, HbS é um marcador	S, D, G, Lepore
A	HbA é um marcador	A, M, certas Hbs instáveis, Hbs com afinidade aumentada por O ₂
J	Mais rápida que A, HbJ é um marcador	J, K, N Baltimore
H	Mais rápida que J	H, I, Bart

A eletroforese em ágar-citrato pH ácido permite uma posterior diferenciação entre hemoglobinas com mesmo padrão de migração eletroforético em pH alcalino e é recomendada como teste confirmatório (Garrick et al, 1973; Wheatherall e Clegg, 1981d; Nelson e Davey, 1995a), porém, é sempre importante lembrar que a identificação das hemoglobinas é muitas vezes presumível, já que está baseada na mobilidade eletroforética e é comparada a um padrão conhecido (Bain et al., 1998).

Um parêntese deve ser aberto para comentar sobre o diagnóstico das talassemias. Como já mencionado anteriormente, um aumento na Hb A₂ é a característica mais típica da beta-talassemia (Gasperini et al., 1993). Dentre as técnicas existentes para esta dosagem, as mais recomendadas são a eluição da fração após eletroforese em acetato de celulose e microcromatografia líquida (Bain et al., 1998). Alguns autores apontam a microcromatografia como método de escolha, justificando a sugestão através da afirmativa de que a técnica leva a um número menor de erros (Milone et al., 1981), enquanto outros grupos concordam que ambas as técnicas oferecem resultados comparáveis com a vantagem de que a eluição tem custo muito inferior (Bain et al., 1998; Desai et al., 1998).

Fontes potenciais de erro podem advir do corte incorreto da fita de acetato de celulose ou da eluição incompleta (Marengo-Rowe, 1965), porém, Bain et al. (1998) chamam atenção para que porcentagens aumentadas ou diminuídas podem ser visualmente

conferidas na fita de eletroforese, vantagem que a microcromatografia não oferece e que pode ser útil para a checagem dos resultados.

Para as alfa-talassemias, a triagem inicial deve ser feita pelos índices hematimétricos (Higgs, 1993), todavia a presença de Hb H na eletroforese feita com sangue hemolisado com saponina pode ser um indício da doença (Bonini-Domingos e Naoum, 1997c).

Em alguns casos a identificação e portanto o diagnóstico das hemoglobinopatias requer o uso de técnicas de biologia molecular (Bain et al., 1998).

A figura que segue compara várias amostras de hemoglobina após migração eletroforética em pH alcalino (suporte acetato de celulose, pH 8,4) e pH ácido (suporte ágar-citrato, pH6,0-6,2), mostrando as mobilidades relativas. Vale ressaltar que como é uma figura esquemática, as quantidades relativas de hemoglobina não são necessariamente proporcionais ao tamanho da faixa, portanto cada amostra real testada deve ser investigada e as quantidades encontradas também fazem parte do conjunto diagnóstico.

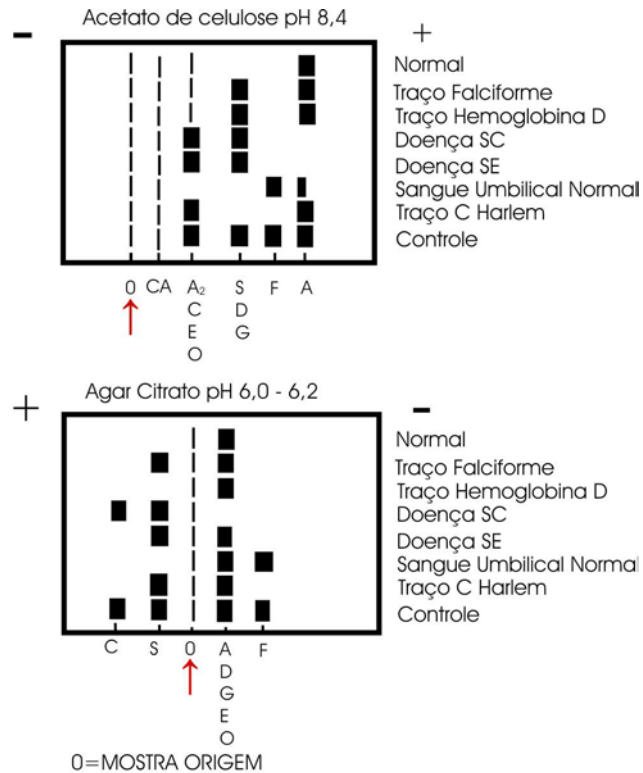


Figura 4 – Esquema do padrão de migração de diferentes hemoglobinas quando testadas em pH 8,4 e pH 6,0-6,2. Adaptado de Nelson e Davey, 1995a.

Finalmente, as técnicas de biologia molecular vêm sendo utilizadas na resolução de casos de difícil definição, onde as outras técnicas deixam lacunas (Gallanelo et al., 1994; Baysal e Huisman, 1994; Chui et al., 2002).

2.8 Polimorfismo Balanceado

Na natureza, a chance de uma frequência gênica permanecer balanceada no limiar de um equilíbrio instável é negligenciável, por isso a ocorrência de polimorfismos naturais em que os heterozigotos sejam menos aptos que os homozigotos não deve ser esperada. Pelo contrário, a observação de polimorfismos duradouros na natureza deve ser tida como

evidência marcante de um heterozigoto superior (Suzuki et al., 1989).

A resistência inata à infecção parasitária e as vezes a morte por malária é decorrente de vários fatores que se manifestam como características eritrocitárias, a saber: hemoglobinopatias, enzimopatias e desordens de membrana, além da presença dos antígenos Fy^a e Fy^b que conferem resistência á invasão pelo *Plasmodium vivax* (Kedar et al., 2002; Chotivanich et al. 2002).

Dados epidemiológicos abundantes sugerem que certas desordens hematológicas tenham sido selecionadas, pois conferem proteção à malária, entretanto, estudos laboratoriais têm tido dificuldade para provar como estes mecanismos acontecem (Kedar et al., 2002; Salzano e Bortolini, 2002). O melhor exemplo de adaptabilidade continua sendo o da Anemia Falciforme, na qual o homozigoto está em desvantagem em relação ao heterozigoto (Suzuki et al., 1989; Salzano e Bortolini, 2002).

Sem vantagem seletiva do traço da Hb S teria ocorrido a eliminação deste gene. A teoria mais amplamente aceita como responsável pela notável estabilidade do gene falciforme na África é a do polimorfismo balanceado. O reconhecimento de que o traço da célula falciforme tem sua maior prevalência em áreas hiperendêmicas para malária sugeriu que a Hb S proporciona proteção seletiva contra as suas formas letais. A renovação de células falciformes da circulação provavelmente reduz o grau de parasitemia e limita substancialmente o processo infeccioso (Lukens, 1998a).

A distribuição das Talassemias no Velho Mundo e na Melanésia é similar à distribuição da malária, sugerindo que um estado de polimorfismo balanceado permitiu a persistência de um gene potencialmente mortal. A referida preponderância imputada ao eritrócito talassêmico foi atribuída a sua baixa concentração de hemoglobina, um nutriente essencial para o parasito da malária. Além disso, tanto Hb F como Hb H parecem inibir o

crescimento do parasito (Lukens, 1998b ; Borges et al.,2001; Salzano e Bortolini, 2002).

A causa de certas frequências gênicas em locais específicos (como veremos no capítulo 2.9) permanece, ainda, pouco entendida. É difícil justificar a vantagem seletiva contra a malária quando, por exemplo, a célula eritróide de um heterozigoto para alfa-talassemia é de difícil diferenciação hematológica de hemácias normais (Bunn e Forget, 1986e).

2.9 Prevalência das Hemoglobinopatias

Dados epidemiologicamente acurados não estão disponíveis no que concerne a todas as partes do mundo e uma minoria de países têm todo seu território mapeado para hemoglobinopatias. As melhores estimativas que podem ser obtidas têm, então, sido divididas por áreas. A Organização Mundial da Saúde descreve a situação global, através das regiões AFR (África Sub-Saara), AMR (Américas), EMR (Região Mediterrânea Leste), EUR (Europa), SEAR (Região Sudeste Asiático) e WPR (Região do Pacífico Oeste) segundo a Figura 5 (Angastiniotis e Modell, 1998).

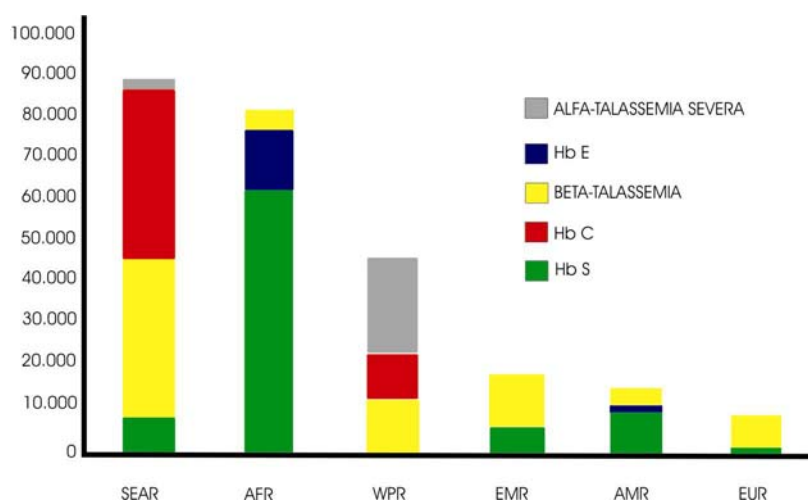


Figura 5 – Regiões segundo a Organização Mundial da Saúde e portadores de desordens da hemoglobina. (Total = 269 milhões). Adaptado de Angastiniotis e Modell, 1998.

Em todo o mundo, os portadores de hemoglobinopatias estão estimados em 269 milhões de pessoas. A maioria destas pessoas vive no Sudeste Asiático onde as talassemias (beta-talassemia, alfa-talassemia e Hb C) predominam. África vem logo depois com genes para doença falciforme e Hb E (Angastiniotis e Modell, 1998).

A maior prevalência de Hb S é na África tropical e entre negros em países que participaram de tráfico de escravos. O gene da hemoglobina S é encontrado também em populações não africanas. Uma prevalência de até 25% foi registrada na Turquia meridional (Lukens e Lee, 1998) enquanto que é baixa na bacia mediterrânea, Arábia Saudita e partes da Índia (Lukens, 1998a, Angastiniotis e Modell, 1998).

Na Itália, a distribuição das talassemias e outras hemoglobinopatias também é heterogênea, concentrando-se principalmente no norte do país, na Sardenha e no sul (Weatherall e Clegg, 1981c; Morelli et al., 2001).

No sul da Itália, Sicília e em populações gregas (Figura 6), aproximadamente 10 por cento dos indivíduos são heterozigotos para beta-talassemia enquanto que, em algumas ilhas gregas e cidades da Sardenha, a incidência atinge 20 a 30 por cento da população (Bunn e Forget, 1986e; Morelli et al., 2001).

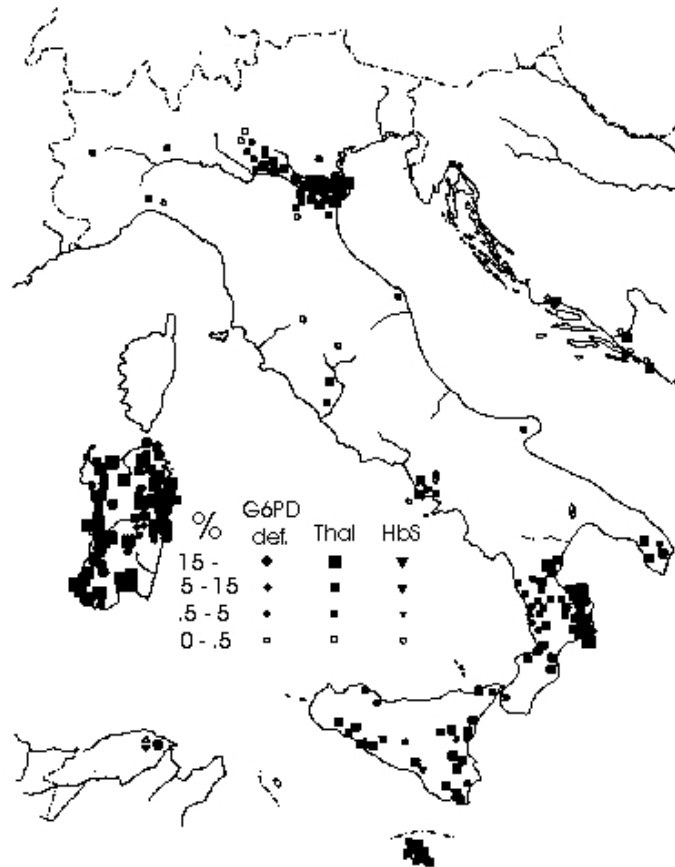


Figura 6 - Distribuição de talassemia e outras hemoglobinopatias na Itália. Adaptado de Weatherall e Clegg, 1981c.

A prevalência de hemoglobinas anormais nas Américas do Sul, Norte e Central, bem como a das talassemias, está relacionada com a herança étnica de seus povos que são derivados dos indígenas, europeus, africanos e asiáticos (Zago, 1986; Compri et al., 1996; Naoum, 1997h; Angastiniotis e Modell, 1998; Salzano e Bortolini, 2002). Devido a esta origem muito heterogênea, a frequência e os tipos de hemoglobinopatias mostram amplas variações regionais e nos subgrupos populacionais (Naoum, 1997h).

Especialmente em relação a Cuba, cuja população é constituída por 37% de brancos de descendência espanhola e 63% de negros do oeste da África e que apresenta atualmente uma população altamente miscigenada, as frequências de Hb AS e Hb AC variam entre

3 a 7% e a expectativa de nascimento anual de crianças com doença falciforme é de 100 casos novos. Este reduzido número de nascimentos de crianças com doença falciforme se deve aos programas de prevenção em gestantes, com aproximadamente 160 mil análises eletroforéticas de hemoglobina por ano (Naoum, 1997h; Salzano e Bortolini, 2002).

A Venezuela e a Colômbia apresentam populações com significativas frequências de negros e mulatos e, conseqüentemente, as prevalências de Hb S nos dois países também são altas (Bernal et al., 1995; Salzano e Bortolini, 2002). Estudos realizados em indígenas venezuelanos e colombianos não revelaram a presença de hemoglobinopatias em suas populações nativas (Arends, 1966; Naoum, 1997h; Mato, 1998).

A Argentina, composta predominantemente por populações nativas e de origens européias, estas provenientes da Itália e principalmente da Espanha, tem na beta-talassemia o tipo mais comum de hemoglobinopatias. Em Buenos Aires, em 1990, havia registrados cerca de 100 casos de Talassemia Maior (Naoum, 1997h; Torres et al., 2002).

Entre os países da América Central (Guatemala, Honduras, El salvador, Nicarágua, Costa Rica e Panamá), com uma população total próxima de 30 milhões de habitantes, as prevalências de Hb S e Hb C apresentam grande variabilidade. Por exemplo, na Costa Rica, por ter um Centro de Hemoglobinopatias detectou-se 2,0% de alfa-talassemia e 0,2% de beta-talassemia heterozigotas, além de 11% de Hb AS, em estudos populacionais (Sáenz et al., 1990; Naoum, 1997h).

O acompanhamento sistemático de hemoglobinopatias em 8961 doadores de sangue saudáveis, em Guadeloupe, demonstrou 7,75% de doadores com traço siclêmico, 2,36% heterozigotos para Hb C e 0,2% dos doadores com elevação significativa na Hb F, além de 3 doadores com fenótipo Hb AD, 5 Hb SC, 1 Hb CC, 2 Hb SF, 1 Hb CF e um caso isolado de Hb A₂ aumentada (Fabritius et al., 1978a). Em outro estudo, os mesmos autores

encontraram 8,08% de traço falcêmico e 2,52% para traço de Hb C (Fabritius et al., 1978b).

No México, país detentor da segunda maior população entre os países latino-americanos, a composição étnica é predominantemente indígena e de mestiços provenientes do cruzamento com espanhóis. Entre as hemoglobinopatias mais prevalentes destaca-se a Beta-talassemia heterozigota (0,1%), enquanto os casos de Hb S são esporádicos (Naoum, 1997h).

No Brasil, a distribuição das hemoglobinopatias está intimamente ligada com as etnias que compõem a população. As análises realizadas em indígenas "puros" mostraram ausência de hemoglobinas anormais entre as diversas tribos de diferentes regiões (Naoum, 1997h; Zago et al., 1999). As primeiras comunicações científicas sobre prevalência de hemoglobinopatias no Brasil datam do início da década de 40. Desta época até o final da década de 60, as análises dispunham de modesta tecnologia e, talvez por esse motivo, foram descritas apenas as Hb AS e Hb AC nas populações examinadas. Nos trabalhos publicados durante esse período quase nada se refere as talassemias (Naoum, 1997h).

O maior estudo de prevalência e distribuição de hemoglobinopatias realizado no Brasil, analisou amostras de 55217 indivíduos, em quarenta cidades, com idades entre um mês e noventa anos, provenientes de centros de saúde, escolas e bancos de sangue. Neste estudo, 3,08% dos indivíduos tinham hemoglobinas anormais desdobradas em variantes moleculares (2,49%), talassemias (0,53%) e alterações induzidas pela formação de meta-hemoglobinemias (0,06%). A condição Hb AS foi a mais prevalente, com 1038 casos (60,95%) do total de 1703 portadores; as alfa e beta-talassemias somaram 265 casos (15,56%); a condição Hb AC foi detectada em 243 (14,27%) e as formas mais raras em 156 casos (9,27%). A frequência de Hb SS na população total foi de 0,04%. Entre os vinte

portadores de Hb SS identificados e comprovados clinicamente, 18 pertenciam ao grupo negroíde e dois ao grupo caucasóide (Naoum et al., 1987). Estes resultados confirmam que o problema das hemoglobinopatias no Brasil tem importância médica.

Em uma revisão de dados sobre hemoglobinopatias no Brasil, Zago (1986) mostraram que os distúrbios mais freqüentes são representados por Hb S, Hb C e beta-talassemia. Os dois primeiros são de origem africana enquanto que o último foi introduzido predominantemente por imigrantes italianos. Num estudo anterior (Zago e al., 1983) o mesmo grupo encontrou uma incidência de 5,3% para desordens hereditárias da hemoglobina entre 400 estudantes em idade escolar; 4,5% entre 602 mães e 2,8% entre 606 neonatos do nordeste do estado de São Paulo. Os achados mais comuns foram Hb AS (1,9%), AC (0,8%) e beta-talassemia heterozigotas (0,8%), o que perfaz 3,5% da amostra. Numa segunda população de 1023 pacientes da Clínica Hematológica do Hospital Universitário e seus parentes, 417 casos de hemoglobinopatias foram detectados. As anormalidades mais freqüentes foram beta-talassemia heterozigota (35,2%) e Hb S (32,5%), seguidas por anemia falciforme (13,0%), beta-talassemia homozigota (4,0%) e anemia falciforme/beta-talassemia (4,0%)..

Na população brasileira, para PHHF são conhecidos somente os dados obtidos entre pacientes do hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), onde se encontrou a prevalência de 0,1% (Kimura et al, 2000) e os dados do Hemonúcleo da Universidade São Francisco (USF) na cidade de Bragança Paulista, São Paulo, que mostraram a mesma freqüência de 0,1% (Costa et al., 2002).

Entre doadores de sangue pode-se citar inúmeros trabalhos como o realizado em Minas Gerais que encontrou 4,7% de freqüência para doadores aptos e 6,7% hemoglobinas anormais para doadores inaptos (Carvalho et al., 1994). Alguns trabalhos se concentram na

identificação de hemoglobinas com alterações estruturais (Tavares Neto e Bernardes, 1980; Bezerra e Andrade, 1991). Um estudo realizado no estado de São Paulo encontrou 0,76% de Hb S, 1,14% de Hb C, 1,90% de alfa-talassemia, 0,38% de beta-talassemia e 0,76% de outras hemoglobinopatias em seus doadores de sangue. Quando a presença de hemoglobinas anormais foi correlacionada com a origem racial os autores encontraram, no grupo caucasóide 0,76% Hb AS, 1,14% Hb AC, 1,90% alfa-talassemia e 0,38% beta-talassemia; entre os não caucasóides foi encontrado 1 indivíduo com Hb AC e 2 com outras hemoglobinopatias (Orlando et al., 2000).

Quando, somente a Hb S foi focada pelo estudo, Ramalho (1976) encontrou em doadores de sangue do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, SP, uma prevalência de 9,3% de traço siclêmico no grupo racial negróide e 0,48% entre os caucasóides.

Alguns estudos procuraram estimar a prevalência de hemoglobinopatias no Sul do Brasil. Pedrollo et al. (1990) estudaram 559 amostras de sangue do cordão umbilical e determinaram uma freqüência de 3,7% de Hb Bart's (alfa-talassemia) na população geral (5,4% em negros e 2,5% em brancos). Salzano et al. (1968), através de exames realizados na rotina de um laboratório público de Porto Alegre encontraram uma freqüência de Hb AS de 6,8%, Hb AC de 1,0%, Hb SC de 0,1% e Hb SS de 0,1% em uma população negróide formada em sua maioria por adultos. Entretanto, considerando apenas as crianças menores de nove anos, o traço falciforme foi encontrada em 3,5% dos indivíduos (Tondo e Salzano, 1962; Salzano et al., 1968). A freqüência de heterozigotos para beta-talassemia foi estimada em 1,1%, conforme o estudo realizado em 704 caucasianos adultos, 65% destes eram descendentes de italianos e os outros 38% tinham origem espanhola, síria e libanesa (Freitas e Rocha, 1983).

Ainda em Porto Alegre, Daudt e colaboradores (2002) analisaram 1615 neonatos do Hospital de Clínicas, residentes na capital ou região metropolitana e encontraram uma frequência de 1,2% para o gene da anemia falciforme e 0,4% para o gene da Hb C, assim, para cada 62 neonatos triados 1 era portador do gene para hemoglobinopatia S ou C, independente da raça ou ascendência.

No interior do estado brasileiro do Rio Grande do Sul, poucas são as compilações de dados que tenham sido publicadas com referência à prevalência de hemoglobinopatias em doadores de sangue. Num estudo realizado para verificar a prevalência de hemoglobinopatias em doadores do banco de sangue do Hospital Universitário de Santa Maria, os autores encontraram 6 portadores de hemoglobinas anormais (1,2%) em uma amostra de 500 doadores assintomáticos (Marcks et al., 1995).

2.10 Prevenção e Ética

Um importante passo na prevenção da ocorrência de crianças severamente afetadas por hemoglobinopatias homozigotas é a detecção de estados heterozigotos em adultos em idade reprodutiva. Médicos devem estar atentos à possibilidade de ocorrer um traço talassêmico, por exemplo, em indivíduos com anemia hipocrômica que são refratárias ao tratamento com ferro (Bunn e Forget, 1986e).

Em áreas onde há alta incidência de hemoglobinopatias, triagens populacionais devem ser instauradas. Uma vez identificados, os indivíduos afetados devem ser educados e aconselhados a respeito do processo da doença e suas implicações genéticas. Indivíduos heterozigotos que venham a se casar, e que planejem ter filhos, devem ser alertados que existe uma em quatro chances de ter uma criança homozigota severamente afetada. Apesar desta informação raramente afetar o comportamento reprodutivo dos casais em risco, o

aconselhamento e a educação deve incluir informações concernentes à disponibilidade de diagnóstico pré-natal (Bunn e Forget, 1986e; Modell et al., 1998). Estes diagnósticos requerem sangue de cordão ou devem ser feitos através de tecnologias específicas de DNA.

O aconselhamento genético só irá reduzir significativamente a incidência de indivíduos homozigotos para as doenças da hemoglobina se lutarmos por educação, tecnologia e políticas de saúde.

2.11 Política de Abordagem

Quando se aborda a questão de serviços oferecidos para tratamento e prevenção os países podem ser colocados em três categorias distintas (Angastiniotis e Modell, 1998):

1. Países com situação endêmica, a maioria, mas não somente, do Mediterrâneo. Programas de controle atingiram 80 – 100% de prevenção de nascidos afetados, além do provimento de tratamento especializado.
2. Países em desenvolvimento, onde a provisão de serviços é travada por dificuldades econômicas e nos quais ainda existem outras prioridades de saúde pública. Neste grupo, os serviços variam de não existentes a muito bons, tanto em países isolados quanto dentro de um mesmo país.
3. Áreas de países desenvolvidos e industrializados, onde a prevalência está aumentando principalmente devido à imigração vinda de áreas endêmicas. Estes países possuem meios de proporcionar o controle adequado, mas encontram dificuldades em atingir os grupos de imigrantes que não convivem com a população hospedeira, além de possuírem diferenças culturais significativas.

Como um exemplo característico da primeira categoria estão as ilhas do Chipre que

divide o sucesso de seu programa com a Grécia e Itália (Angastiniotis e Modell, 1998). O Brasil pertence à segunda categoria.

As hemoglobinopatias se apresentam como doenças de importância na saúde pública de vários países latino-americanos. Particularmente nas ilhas do Caribe, onde a população é predominantemente de negros e a frequência de doenças falciformes é significativamente alta. Alguns desses países desenvolveram programas de controle de hemoglobinopatias com sucesso, como são os casos de Martinica, Guadeloupe, Jamaica e Cuba. Por outro lado, dois países com alta prevalência de doenças falciformes: República Dominicana e Haiti, caracterizados como os países mais pobres das Américas, carecem de qualquer tipo de programa preventivo e de controle (Naoum, 1997h).

A triagem populacional é extremamente válida para iniciar estágios preventivos de saúde, além de preparar as famílias para o manejo de bebês com hemoglobinopatias sérias (Fleury e Lima, 1989; Ramalho et al., 1999). Um estudo realizado para verificar a resposta de uma comunidade brasileira a programas de triagem de hemoglobinopatias, encontrou alta receptividade a programas de saúde pública oferecidos com bases de voluntariedade e não coerção. Os programas mostraram satisfatórios indicadores de eficiência, expressos pela porção significativa de testes realizados. Entretanto, eixos focados às mulheres grávidas foram mais efetivos quando comparados à triagem em doadores de sangue e estudantes, avaliando-se pela porcentagem de testes realizados em parentes dos propósitos (Ramalho et al., 1999).

Em junho de 2001 a portaria MS 822/GM tornou obrigatória a inclusão da pesquisa para hemoglobinopatias no teste do pezinho para todo o território nacional.

2.12 Formação Étnica do Sul do Brasil

Capistano de Abreu, um historiador renomado que viveu entre 1853 e 1927 se refere à carta de Pero Vaz de Caminha (que aportou neste continente junto com Cabral e que enviou notícias ao rei de Portugal Manuel I) como o certificado de nascimento do Brasil (Callegari-Jacques e Salzano, 1999).

Apesar de novidade para a Europa, o que se conhece como Brasil foi colonizado milhares de anos antes de 1500 por pessoas que Cristóvão Colombo chamou índios, pois ele estava convencido de ter chegado à Índia e não num continente desconhecido aos seus contemporâneos europeus (Callegari-Jacques e Salzano, 1999).

As trocas populacionais começaram a ocorrer, com vários graus de velocidade, nos séculos seguintes. Enquanto os indígenas experimentaram um processo de marcado declínio demográfico devido a conflitos com não-indígenas e a doenças às quais eles não estavam adaptados, isto foi compensado por um fluxo equilibrado de pessoas de outros grupos étnicos (Callegari-Jacques e Salzano, 1999).

Entre 1748 e 1752 a política real Portuguesa de mandar colonizar o sul do país envia açorianos (ao redor de 6 mil pessoas), a fim de criar grupos de povoamento. Aproximadamente 2300 açorianos vieram para o Rio Grande do Sul, provenientes de seu primeiro desembarque em Laguna, Santa Catarina. As necessidades de ocupação do território e de conter o espírito belicoso dos estancieiros levou o governo imperial a trazer alemães para o sul, e mais tarde, poloneses e italianos (Lembert, 1984a).

Com melhores preparativos, em 1824 ocorreu uma imigração de colonos alemães à província de São Pedro do Rio Grande do Sul, que se radicaram em São Leopoldo. O interesse do governo era mais recrutar soldados do que angariar colonos. Os soldados permaneciam no Rio de Janeiro e os colonos prosseguiram viagem rumo ao sul, via Rio

Grande e Porto Alegre. Entraram no RS, entre 1824 e 1830, cerca de 5350 alemães, provenientes de Holstein, Hamburgo, Mecklemburgo e Hannover. Vieram também pomeranos, westfalianos, württembergenses e boêmios (Lembert, 1984a).

Em 1840, a economia brasileira passava por modificações. O café substituíra o açúcar como principal produto e São Paulo tornava-se o centro econômico do país. A lavoura cafeeira crescia e a mão de obra rareava. Neste momento, a crise sócio-econômica da Itália veio de encontro aos planos dos fazendeiros de café paulistas (Frosi e Mioranza, 1975a; Lembert, 1984a; Gardelin e Costa, 1992).

A situação do Norte da Itália, nas últimas décadas do século XIX, sob o ponto de vista político, ressentia-se das divisões histórico-políticas anteriores à unificação e libertação do domínio austro-húngaro (Frosi e Mioranza, 1975a; Gardelin e Costa, 1992).

A economia era dependente de poucos industriais e de muitos latifundiários ainda afetos a esquemas econômicos medievais de feudalismo e de exploração da força operária e agrícola. A unificação política não destituía o fenômeno escravagista de uma economia tradicional e ultrapassada. A formação da nova Itália, como Reino, não abria perspectivas propícias à revogação dos esquemas antiquados de grandes proprietários feudais com títulos hereditários de posse de terras e do elemento humano que as trabalhavam. Se uma reconstrução geopolítica tivesse acarretado uma reforma econômica de base, com uma reformulação de estatutos de terras e posses, com uma agricultura baseada na pequena propriedade, os movimentos migratórios que se verificaram no norte da Itália, nos fins do século XIX, talvez não se tivessem registrado nas proporções que ocorreram (Frosi e Mioranza, 1975b; De Boni e Costa, 1984).

Sob o ponto de vista sócio-econômico, a Itália apresentava regiões do norte subdesenvolvidas e em condições de feudalismo decadente, embora politicamente

fortificado com a unidade nacional. Não havia, a breve prazo, perspectivas de melhoramentos (Frosi e Mioranza, 1975a; De Boni e Costa, 1984; Gardelin e Costa, 1992).

No período da grande imigração no Brasil (1884 a 1930), os imigrantes mais numerosos foram os italianos (34% do total). Estes imigrantes formaram duas correntes: para São Paulo a maior e Rio Grande do Sul a menor (Lembert, 1984b).

Eram lavradores independentes, que se fixaram na vizinhança das colônias alemãs, com as quais não se confundiram (Lembert, 1984a). Os camponeses italianos eram provenientes do Vêneto, Lombardia, Trentino-Alto Ágide, Friuli-Venécia Júlia, Piemonte, Emilia-Romanha, Toscana, Ligúria (Figura 7) (Frosi e Mioranza, 1975b).

Nos estados do extremo sul do país, os contingentes africanos foram pequenos. No Rio Grande do Sul, em que a atividade dominante da pecuária exigia pouca mão-de-obra, nunca houve muitos escravos (Lembert, 1984b).

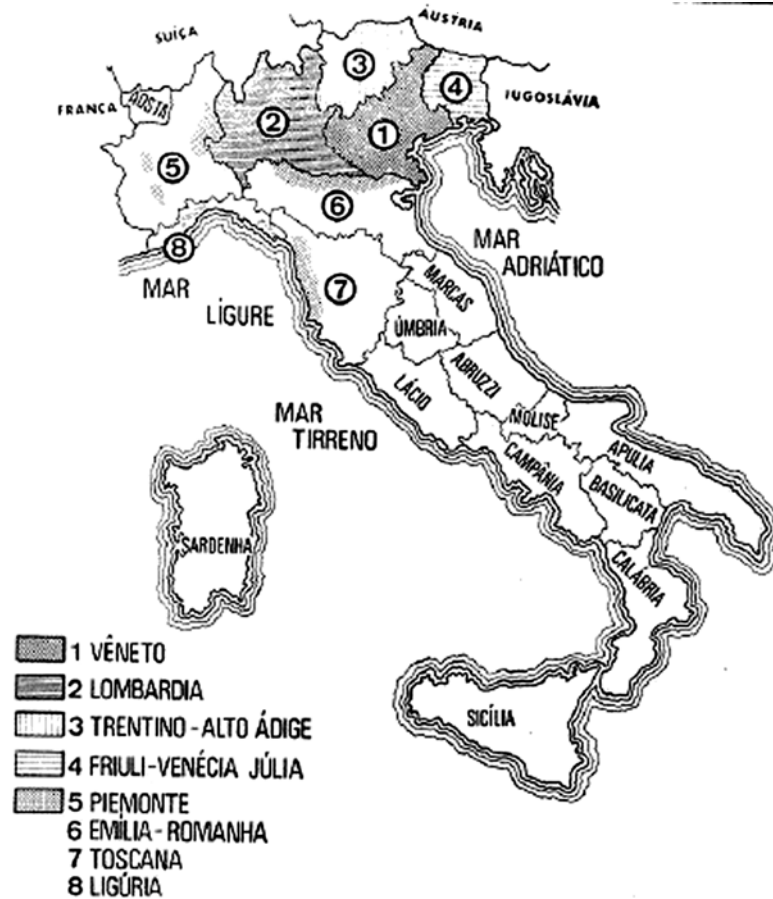


Figura 7 – Regiões mais representadas na emigração para a região de colonização italiana no nordeste do Rio Grande do Sul, em escala decrescente. Adaptado de Frosi e Mioranza, 1975b.

A Tabela 3 lista dados estatísticos e tendências migratórias no Brasil. O pico migratório africano teve seu lugar antes de 1820, enquanto o volume de chegada européia ocorreu durante o período entre 1877 e 1930. Importantes afluxos japoneses e chineses aconteceram mais recentemente (Callegari-Jacques e Salzano, 1999).

Tabela 3 – Principais imigrações para o Brasil em diferentes períodos. Adaptado de Callegari-Jacques e Salzano, 1999.

Períodos	Europeus			Neo-Asiáticos		Africanos
	Portugueses	Italianos	Outros	Japoneses	Chineses	
Antes de 1820	465.000	-	-	-	-	2.859.200
1820-1876	160.119	16.562	173.436	-	-	1.150.200
1877-1903	389.580	1.127.773	410.553	-	86	-
1904-1930	792.227	346.029	903.339	100.653	533	-
1931-1963	425.408	134.358	400.866	141.518	4.254	-
1964-1972	22.980	4.527	35.087	5.836	5.652	-
Total	2.255.314	1.629.249	1.923.281	248.007	10.525	4.009.400
%	22,38	16,17	19,09	2,46	0,11	39,79

Os brasileiros geralmente resistiram às mudanças que as transformações freqüentes de atividades econômicas teriam exigido; essa grande resistência era motivada pelo fato de que tais movimentos se processavam em um território imenso (Lembert, 1984b).

Quando cessou a imigração estrangeira que se dirigia preferencialmente para o sudeste e sul do país, começaram as migrações.

A questão que ocorre naturalmente é o quanto os colonizadores e os indígenas contribuíram para o pool de genes dos brasileiros da atualidade. Este problema foi considerado por várias escolas e análises recentes indicam que a contribuição migratória pode ser estimada em 18% para a formação da presente população brasileira. Isto indica que a diferença entre natalidade e mortalidade é a variável chave para representar os brasileiros dos dias atuais. Também muito importante, e clara, é a intermiscigenação (Lembert, 1984b; Callegari-Jacques e Salzano, 1999).

A população do país, em 1996 (157 milhões) foi estimada como sendo composta de 55,2% derivada de europeus, 6,0% predominantemente derivados de africanos, 38,2% miscigenada, 0,4% neo-asiáticos e 0,2% de indígenas. Porém, a situação é mais complexa, desde que uma grande proporção de alelos presentes em pessoas miscigenadas (especialmente no norte e centro-oeste) é de origem ameríndia (Callegari-Jacques e Salzano, 1999). Isto é, provavelmente, um reflexo do movimento geral de colonização

leste-oeste dos neobrasileiros. É difícil avaliar o grau de homogeneidade biológica e cultural que será alcançado pelas populações brasileiras no futuro (Callegari-Jacques e Salzano, 1999).

2.12.1 População do Estado do Rio Grande do Sul

A população não indígena dos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina foi estudada nas últimas três décadas. Contudo, até então estas investigações não tinham mostrado um padrão detalhado de polimorfismo, nem uma comparação com atributos do tipo nacionalidade dos avós ou sobrenomes individuais, os quais podem dar uma pista sobre a história destes grupos. Dornelles e colaboradores (1999) estudaram 2708 indivíduos de população derivada de europeus do Rio Grande do Sul, dividido o estado em seis mesoregiões e 226 indivíduos de origem similar do estado de Santa Catarina.

Resultados deste estudo mostraram que a menor mistura étnica com africanos (3%) foi encontrada na mesoregião nordeste (Figura 8) área onde a contribuição italiana é mais marcante; em contrapartida a maior taxa de mistura com africanos (12%) foi encontrada na mesoregião sudeste (SE), a região onde houve maior concentração de escravos no período colonial (Dornelles et al., 1999).

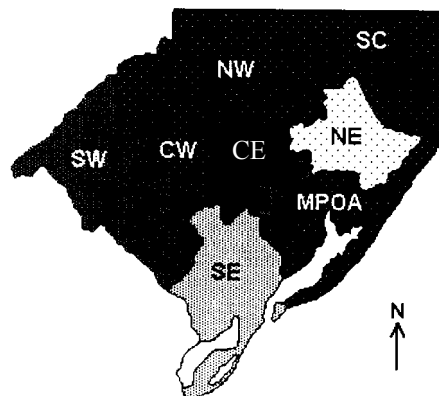


Figura 8 – Mapa do estado do Rio Grande do Sul com indicações das mesoregiões NW (Noroeste), NE (Nordeste), CW (Centro-oeste), CE (Centro-leste), SE (Sudeste), SW (Sudoeste), MPOA (região metropolitana de Porto Alegre) e SC (estado de Santa Catarina). Adaptado de Dornelles et al. , 1999.

Além disso, quanto a distribuição em porcentagem, dos sobrenomes dos indivíduos que habitavam estas sete mesoregiões, 50,5% dos habitantes da região nordeste do estado têm origem italiana em seus sobrenomes, seguidos de 37,3% de sobrenomes portugueses, 5,8% de sobrenomes alemães e 6,4% divididos entre espanhóis, poloneses, franceses e ingleses (Dornelles et al., 1999). O grau de miscigenação já referido torna extremamente difícil classificar a população brasileira (Lembert, 1984b).

Dados concretos apontam para uma população essencialmente de origem européia nesta região do estado, porém a vivacidade e fluidez das inter-relações humanas, que levam à miscigenação, imigração e migração é tão ou mais complexa do que podemos quantificar.

2.12.2 Caxias do Sul - Histórico

Embora o povoamento efetivo da região da serra do Rio Grande do Sul fosse iniciado em 1876, já dois séculos antes os jesuítas tinham tentado cristianizar esta zona. Por vários motivos as reduções fracassaram e os índios continuaram sua vida seminômade, daí o primeiro nome de Campo dos Bugres para a cidade de Caxias do Sul (Gardelin e Costa, 1993; NUTEP, 2003). Assim, a história de Caxias do Sul começa antes dos

italianos, quando a região era percorrida por tropeiros e indígenas (Gardelin e Costa, 1993; Prefeitura, 2003a).

Para a fixação dos imigrantes italianos no Rio Grande do Sul, o Governo Imperial do Brasil destinou duas zonas de povoamento de terras: as terras devolutas ou despovoadas do Nordeste do Estado e as terras localizadas nas proximidades de Santa Maria, hoje áreas de diversos municípios da Depressão Central e Sul da Região do Planalto Médio (Frosi e Mioranza, 1975c).

O Governo Imperial era responsável pelo transporte oceânico, divisão e distribuição dos lotes para cada família, abertura de estradas para as novas colônias e pelo provimento de ferramentas e sementes. Estes lotes eram pagos no prazo de cinco a quinze anos (NUTEP, 2003).

O primeiro grupo de imigrantes fixou-se nos Fundos da Colônia da Nova Palmeira, onde hoje está Nova Milano. No mesmo ano de 1875, criaram-se três núcleos de colonização italiana: colônia Caxias, colônia Dona Isabel e colônia Conde D'Eu (Frosi e Mioranza, 1975c; Gardelin e Costa, 1993). As primeiras levas de imigrantes chegaram quase que simultaneamente nas três colônias. As terras aquém do Rio das Antas foram loteadas e, num espaço de dez anos, totalmente ocupadas (Frosi e Mioranza, 1975d).

O sucesso das colônias criadas foi desigual. Não eram incomuns os casos de abandono de lote por moradores que, após mais de dez anos, quase nada possuíam. Entretanto houve caso de colônias bem sucedidas, como as que originaram as cidades de Bento Gonçalves, Garibaldi e Caxias do Sul (NUTEP, 2003; Prefeitura, 2003b).

Pode-se estabelecer dois momentos distintos na imigração italiana: num primeiro momento, a ocupação de terras é feita por imigrantes italianos que de Porto Alegre são destinados para:

- a) Colônias Caxias, Dona Isabel e Conde D' Eu (1875-1884)
- b) Colônias Antônio Prado e Alfredo Chaves (1884 – 1892)
- c) Colônia Guaporé (1892 – 1900)

Num segundo momento, toma vulto a migração interna que ocupa espontaneamente terras(Frosi e Mioranza, 1975c; Lember, 1984a):

- a) Encantado (1882 em diante)
- b) Colônia Guaporé (1892 em diante).

A Região de colonização italiana no nordeste do Rio Grande do Sul inclui atualmente os seguintes municípios (Figura 9):

1. Anta Gorda
2. Antônio Prado
3. Arvorezinha
4. Bento Gonçalves
5. Carlos Barbosa
6. Casca
7. Caxias do Sul
8. Ciriaco
9. Davi Canabarro
10. Encantado
11. Farroupilha
12. Flores da Cunha
13. Garibaldi
14. Guaporé
15. Ilópolis

16. Marau
17. Muçum
18. Nova Araçá
19. Nova Bassano
20. Nova Bréscia
21. Nova Prata
22. Paráí
23. Putinga
24. São Marcos
25. Serafina Correa
26. Veranópolis



Figura 9 – Mapa dos municípios da região de colonização italiana no nordeste do Rio Grande do Sul. Adaptado de Frosi e Mioranza, 1975c.

Em 1877, a sede da colônia Campo dos Bugres recebeu a denominação de Colônia de Caxias (Gardelin e Costa, 1993). Vários marcadores econômicos embasaram a evolução do Município ao longo do século. O primeiro deles está ligado ao traço maior de sua identidade: o cultivo da videira e a produção de vinho. Inicialmente para consumo próprio e mais adiante para comercialização. O Ato nº 257, de 20 de junho de 1890, criou o novo município e a 24 de agosto do mesmo ano foi efetivada a sua instalação (NUTEP, 2003; Prefeitura, 2003c).

A origem da indústria caxiense deu-se em 1895 com a atuação do jovem italiano Abramo Éberle, que iniciou uma pequena funilaria (NUTEP, 2003; Prefeitura, 2003a).

Devido ao grande desenvolvimento, no dia 1º de junho de 1910, Caxias recebeu ligação por via férrea e a sede foi elevada à categoria de cidade (NUTEP, 2003; Prefeitura, 2003c). Em 1940, 31,24% da população da região vivia na cidade. No final da década de 70 esta porcentagem subiu para 67,57% (Lembert, 1984b; Antunes, 2001).

Caxias (Figura 10) é hoje, pólo centralizador da região, constitui o segundo maior município do Rio Grande do Sul. É a principal cidade da chamada "região italiana" ou "região da serra", cujo conjunto de mais de 50 municípios perfazem mais de 1 milhão de habitantes e que possuem, em média, os melhores índices de qualidade de vida do país. Os principais municípios da região são: Caxias do Sul, Bento Gonçalves, Farroupilha, Garibaldi, Flores da Cunha, São Marcos, Carlos Barbosa, Veranópolis, Antônio Prado, Nova Prata e outros (NUTEP, 2003; Prefeitura, 2003c). A região é importante pólo de fabricação de vinho (mais de 85% do total do Brasil), móveis, autopeças, carrocerias, malhas e outros produtos e serviços, sendo sede de importantes empresas do setor metal mecânico (NUTEP, 2003; Prefeitura, 2003c). O desenvolvimento e a urbanização decorrente abriu as portas da cidade para migrantes que vieram em busca de trabalho.

Dados do censo de 2000 mostram que a cidade possui 360419 habitantes, sendo 176959 do sexo masculino e 183460 do sexo feminino; destes 333391 têm situação de domicílio em área urbana e 27028 fazem parte da população rural (IBGE, 2003; NUTEP, 2003).

Junto com os imigrantes, outras etnias compartilharam desse caminho. Aconteceram a miscigenação e a aculturação da linguagem; hábitos e tradições se aproximaram. Ao lado do lastro cultural itálico, convivem nesta cidade a tradição gaúcha e brasileira (NUTEP, 2003; Prefeitura, 2003b).



Figura 10 – Fotografia panorâmica da Cidade de Caxias do Sul. Fonte: NUTEP, 2003.

3 JUSTIFICATIVA

As hemoglobinopatias são um problema de grande interesse sob o ponto de vista de saúde pública. É preciso que se conheça o perfil das doenças relacionadas à hemoglobina no nosso país para que se possa instituir programas de prevenção e diagnóstico precoce, diminuindo despesas e reduzindo complicações de ordem clínica.

Por tratar-se Caxias do Sul e cidades circunvizinhas de sítios de imigração italiana do início do século, existe uma forte sugestão de que uma parte dos doadores de sangue e hemocomponentes possuam algum gene talassêmico. Por outro lado o desenvolvimento da região atraiu nas últimas décadas um grande número de migrantes.

No Brasil se estima que para uma população aproximada de 140 milhões de pessoas, cerca de 10 milhões são portadores de hemoglobinas anormais (Naoum,1997h) o que aponta que além das talassemias, outras hemoglobinopatias devem estar presentes na população da cidade.

A possibilidade de que um percentual significativo de doadores de sangue seja portador assintomático de hemoglobinopatias pode comprometer a qualidade dos eritrócitos. Quando o sangue é armazenado em meio líquido, as hemácias sofrem alterações bioquímicas e estruturais (a saber: um gradual decréscimo na concentração de adenosina-5'-trifosfato, decréscimo do pH, consumo de glicose e atividade enzimática durante estoque) que têm influências importantes na sua viabilidade e função após a transfusão (Leonart et al. 1997; Mollison et al., 1997; Schroeder e Rayner, 1998). A frequência da presença de hemácias contendo hemoglobina S em doadores de sangue brasileiros é representativa, chegando a 2,4% em algumas regiões, o que caracteriza a necessidade potencial de sua detecção laboratorial ao nível da triagem. A transfusão

destas hemácias pode resultar em efeitos indesejáveis, tanto pela possibilidade de falcização no receptor, como pelas alterações do produto hemoterápico durante o processamento e estocagem (Silva e Ramalho, 1997; Marques Júnior, 1994).

A implantação de programas brasileiros de genética comunitária vem sendo recomendada pela Organização Mundial da Saúde e por outras organizações internacionais, sobretudo para as hemoglobinopatias (Serra et al., 1995; Ramalho et al., 1996; Compri et al., 1996; Ramalho e Silva, 2000).

O trabalho de triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Caxias do Sul, que é responsável por aproximadamente 55% do sangue processado na cidade, tem por objetivo traçar um perfil das diferentes hemoglobinopatias encontradas em doadores de sangue desta área no Rio Grande do Sul, contribuindo assim, para a melhoria da saúde pública e para o mapeamento da prevalência destas doenças.

4. OBJETIVO DA PESQUISA

Estimar a prevalência de hemoglobinopatias em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Caxias do Sul e sua associação com a etnia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; DENNIS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Tecnologia de DNA. In: ALBERTS, B.; DENNIS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. Porto Alegre: Artmed, 1999, p. 319-353.
- ANDRADE, T.G.; FATTORI, A.; SAAD, S.T.O.; SONATI, M.F.; COSTA, F.F. Molecular identification of Sicilian ($\delta\beta$)^o-thalassemia associated with β -thalassemia and hemoglobin S in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.8, p.873-876, 2002.
- ANGASTINIOTIS, M.; MODELL, B. Global Epidemiology of Hemoglobin Disorders. Cooley's Anemia Seventh Symposium. **Annals of the New York Academy of Sciences**; Published by the New York Academy of Sciences Any AA9 850. Editor Alan R. Cohen. n.850, p.51-69, 1998.
- ANTUNES, B. Este povo não para. **Revista TV Escola Especial**. Ministério da Educação. Secretaria de Educação à Distância do MEC, Abril, p.38-42, 2001.
- ARENDS, T. Haemoglobinopathies, thalassemia and glucose-6-phosphate deficiency in Latin America and the West Indies. **N. Z. Med. J.**, v.65, p.831-844, 1966. [Lilacs]
- BAIN, B.J. Desordens dos eritrócitos e plaquetas. In: BAIN, B.J. (ed.). **Células Sangüíneas – Um guia prático**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997, p.204-274.
- BAIN, B.J.; AMOS, R.J.; BAREFORD, D. et al. (BCSH). Guideline – The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. **British Journal of Haematology**, v.101, n.4, p.783-792, 1998.
- BALTIMORE, D. RNA-dependent polymerase in virions of RNA tumor viruses. **Nature**, v.226, n.252, p.1209-1211, 1970.
- BANDEIRA, F.M.G.C.; LEAL, M.C.; SOUZA, R.R.; FURTADO, V.C.; GOMES, Y.M.; MARQUES, N.M. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina S detectado através de triagem em sangue de cordão umbilical. **Jornal de Pediatria**.

v.75, n.3, p.167-71, 1999.

BAYSAL, E.; HUISMAN, T.H.; Detection of common alpha-thalassemia-2 determinants by PCR. **Am. J. Hematol.**, v.46, n.3, p.208-213, 1994.

BERNAL, M.P.; GIRALDO, A.; BERMUDEZ, A.J.; MORENO, E. Estudio de la frecuencia de hemoglobinopatias en las islas de San André y Providencia, Colombia. **Biomedica** (Bogotá), v.15, n.1, p.5-9, 1995. [Lilacs]

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

BEZERRA, T. M.; ANDRADE, S.R. Investigação sobre a prevalência de hemoglobinas anormais entre doadores de sangue. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.23, n.4, p.117-118, 1991.

BONINI-DOMINGOS, C.R.; NAOUM, P.C. Genética molecular das hemoglobinas. In: NAOUM, P.C. (eds.). **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997a, p. 25-30.

BONINI-DOMINGOS, C.R.; NAOUM, P.C. Hemoglobina S (HbS) e as síndromes falcêmicas. In: NAOUM, P.C. (eds.). **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997b, p. 36-47.

BONINI-DOMINGOS, C.R.; NAOUM, P.C. Técnicas laboratoriais para identificação das hemoglobinas normais e anormais. In: NAOUM, P.C. (eds.). **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997c, p. 144-171.

BORGES, E.; WENNING, M.R.S.C.; KIMURA, E.M.; GERVÁSIO, S.A.; COSTA, F.F.; SONATI, M.F. High prevalence of α -thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, n.6, p.759-762, 2001.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. Historical Background. In: BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia: W. B.

Saunders, 1986a, p. 1-12.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. Hemoglobin structure. In: BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986b, p. 13-36.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. Hemoglobins A₂, F, and A_{1C} and other human hemoglobin components. In: BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986c, p. 61-90.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. Human hemoglobin variants. In: BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986d, p. 381-451.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. The thalassemias – Clinical manifestation. In: BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986e, p. 322-379.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. The thalassemias – Molecular pathogenesis. In: BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986f, p. 223-321.

CALLEGARI-JACQUES, S.M.C.; SALZANO, F.M. Brazilian Indian/non Indian interactions and their effects. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**. v.51, n.3/4, p.166-174, 1999.

CANÇADO, R.D. Talassemias – Manifestações Clínicas e Tratamento. In: NAOUM, P.C. (eds.). **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997, p. 120-136.

CARVALHO, M. G.; SOUZA, M. O.; SILVA, M. B. S.; OLIVEIRA, J. M. C.; CARDOSO, I. C. R. A.; CARVALHO, I. P.; SANTOS, C. M. F. R.; OLIVEIRA, H. M.; LOPES, M. S. S. N.; LIRA, L. R. Hemoglobinas anormais: perfil estatístico em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.26, n.2, p.39-40, 1994.

CHOTIVANICH, K.; UDOMSANGPETCH, R.; PATTANAPANYASAT, K.;

- CHIERAKUL, W.; SIMPSON, J.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *P falciparum* malaria. **Blood**, v.100, n.4, p.1172-1176, 2002.
- CHUI, D.H.K.; FUCHAEROEN, S.; CHAN, V. Hemoglobin H disease: Not necessarily a benign disorder. **Blood First Edition Paper, prepublished online September 12, 2002**; DOI 10.1182/ blood - 2002 - 07 - 1975 [Abstract] [PDF] <<http://www.bloodjournal.org/cgi/reprint/2002-07-1975v1.pdf>> Acesso em: 20 dez 2002.
- COMPRI, M.B.; POLIMENO, N.C.; STELLA, M.B.; RAMALHO, A.S. Programa comunitário de hemoglobinopatias hereditárias em população estudantil brasileira. **Revista de. Saúde Pública**. v.30, n. 2, p. 187-195, 1996.
- COSTA, V.A.; ACEDO, M.J.; POLIMENO, N.C.; BERTUZZO, C.S. Contribuição para a estimativa da frequência populacional da Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, n.5, p. 1469-1471, 2002.
- CRAVER, R.D.; ABERMANIS, J.G.; WARRIER, R.P.; ODE, D.L.; HEMPE, J.M. Hemoglobin A₂ levels in healthy persons, sickle cell disease, sickle cell trait and beta-thalassemia by capillary isoelectric focusing. **American Journal of Clinical Pathology**, v.107, n.1, p.88-91, 1997.
- DAUDT, L.E.; ZECHMAISTER, D.; PORTAL, L.; CAMARGO NETO, E.; SILLA, L.M.R.; GIUGLIANI, R. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, n.3, p.833-841, 2002.
- DE BONI, L. A.; COSTA, R. A Itália de 1870. In: DE BONI, L. A.; COSTA, R. **Os Italianos do Rio Grande do Sul**. 3ed. Caxias do Sul: Correio Riograndense, 1984, p.49-62.
- DESAI, S.N.; COLAH, R.B.; MOHANTY, D. Comparison of FPLC with cellulose acetate electrophoresis for the diagnosis of beta-thalassemia trait. **Indian Journal of Medical Research**, v.108, p.145-148, 1998.
- DESSYPRIS, E. N. Eritropoese. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.;

- ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, v.1, 1998, p. 139-165.
- DORNELLES, C.L.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; ROBINSON, W.M.; WEIMER, T.A.; FRANCO, M.H.L.P.; HICKMANN, A.C.; GEIGER, C.J.; SALZANO, F.M. Genetics, surnames, grandparent's nationalities and ethnic admixture in Southern Brazil: Do the patterns of variation coincide? **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.2, p.151-161, 1999.
- FABRITIUS, H.; MILLAN, J.; LE CORROLLER, Y. Systematic screening of hemoglobinopathies in blood donors in Guadeloupe (french West Indies). **Rev. Fr. Transf. Immunohematol.**, v.21, n.4, p.937-950, 1978a.
- FABRITIUS, H.; MILLAN, J.; LE CORROLLER, Y. Results of 3 years of screening of abnormal hemoglobins in the blood donors of Guadeloupe (French Antilles). **Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales**, v.71, n.2, p.216-220, 1978b.
- FAILACE, R.R. Anemia. In: FAILACE, R.R. **Hemograma. Manual de Interpretação**. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995, p. 40-85.
- FLEURY, M.K.; LIMA, J.C.S. Resultados de um programa preventivo para hemoglobinopatias na cidade do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**. v.25, n.2, p.42-46,1989.
- FLINT, J.; HARDING, R.M.; BOYCE, AJ.; CLEGG, J.B. The population genetics of haemoglobinopathies. **Baill. Clin. Haem.**, v.6, n.1, p.215-262, 1993.
- FOGLIETTA, E.; DEIDDA, G.; GRAZIANI, B.; MODIANO,G.; BIANCO, I. Detection of α -globin gene disorders by a simple PCR methodology. **Haematologica**, v.81, p.387-396, 1996.
- FREITAS, E. M.; ROCHA, F. J. Detection of beta-thalassemia heterozygotes among caucasians from Porto Alegre, RS, Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, v.6, n.1, p.185-188, 1983.
- FROSI, V.M.; MIORANZA, C. Situação Politico- econômica do nordeste da Itália

no século XIX. In: FROSI, V.M.; MIORANZA, C. **Imigração Italiana no Nordeste do Rio Grande do Sul**. Co-edições Universidade de Caxias do Sul/Instituto Superior Brasileiro Italiano de Estudos e Pesquisas. Porto Alegre: Movimento. 1975a, p.11-14.

FROSI, V.M.; MIORANZA, C. Divisão geo-político-administrativa do norte da Itália e correntes emigratórias. In: FROSI, V.M.; MIORANZA, C. **Imigração Italiana no Nordeste do Rio Grande do Sul**. Co-edições Universidade de Caxias do Sul/Instituto Superior Brasileiro Italiano de Estudos e Pesquisas. Porto Alegre: Movimento. 1975b, p.15-37.

FROSI, V.M.; MIORANZA, C. Inícios da imigração – Processos de estabelecimento. In: FROSI, V.M.; MIORANZA, C. **Imigração Italiana no Nordeste do Rio Grande do Sul**. Co-edições Universidade de Caxias do Sul/Instituto Superior Brasileiro Italiano de Estudos e Pesquisas. Porto Alegre: Movimento. 1975c, p.38-42.

FROSI, V.M.; MIORANZA, C. Distribuição dos imigrantes na região. In: FROSI, V.M.; MIORANZA, C. **Imigração Italiana no Nordeste do Rio Grande do Sul**. Co-edições Universidade de Caxias do Sul/Instituto Superior Brasileiro Italiano de Estudos e Pesquisas. Porto Alegre: Movimento. 1975d, p.43-45.

GALLANELO, R.; BARELLA, S.; IDEO, A.; GASPERINI, D.; ROSATELLI, C.; PADERI, L.; PAGLIETTI, E.; SOLLAINO, C.; PERSEU, L.; LOI, D. Genotype of subjects with borderline hemoglobin A₂ levels: implication for beta-thalassemia carrier screening. **Am. J. Hematol.**, v.46, n.2, p.79-81, 1994.

GARDELIN, M.; COSTA, R. A Itália e a Áustria dos imigrantes. GARDELIN, M.; COSTA, R. **Os povoadores da colônia Caxias**. 1ed. Porto Alegre: Suliani, 1992, p.21-30.

GARDELIN, M.; COSTA, R. A. A origem do campo dos bugres. GARDELIN, M.; COSTA, R. **Colônia Caxias – Origens**. Porto Alegre: Suliani, 1993, p.64-67.

GARRICK, M.D.; DEMBURA, P.; GUTHRIE, R. Sickle cell anemia and other hemoglobinopathies. Procedure and strategy for screening employing spots of blood on filter paper specimens. **The New England Journal of Medicine**, v.288, n.24, p.1265-

1268, 1973.

GASPERINI, D.; CAO, A.; PADERI, L.; BARELLA, S.; PAGLIETTI, E.; PERSEU, L.; LOI, D.; GALANELLO, R. Normal individuals with high Hb A₂ levels. **British Journal of Haematology**, v.84, n.1, p. 166-168, 1993.

GUERRA-SCHINOHARA, E.M.; ANDREGUETTO, A. A.; PAGLIUSI, R.A.; D'ÁVILA, V.L.B. Importância dos parâmetros: amplitude de variação do tamanho dos eritrócitos (RDW) e dos histogramas de distribuição de volumes celulares no diagnóstico das anemias. **NewsLab**, n.35, p.118-125, 1999.

HIGGS, D.R. α -thalassemia. **Bailliere's Clinical Haematology**, v.6, p. 117-150, 1993.

HOUSMAN, D.; FORGET, B.G.; SKOITCHI, A.; BENZ, E.J. Quantitative deficiency of chain specific messenger ribonucleic acids in the thalassemia syndromes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.70, p.1809, 1973.

HOWREY, R.P.; EL-ALFONDI, M.; PHILLIPS, K.L.; WILSON, L.; ROONEY, B.; LAN, N.; SULLENGER, B.; SMITH, C. An in vitro system for efficiently evaluating gene therapy approaches to hemoglobinopathies. **Nature**, v.7, n.3, p.215-223, 2000.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2000. População. Censo Demográfico 2000. Municípios. Rio Grande do Sul. C. Caxias do Sul. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/população/censo2000/universo.php?tipo=31&uf=letra=C> Acesso em: 17 mar. 2003.

JANDL, J.H. Physiology of red cells. In: JANDL, J.H. **Blood: Textbook of Hematology**. Boston: Little, Brown and Co., 1987. p. 49-93.

KACIAN, D.L.; GAMBINO, R.; DOW, L.W.; GROSSBARD, E.; NATTA, C.; RAMIREZ, F.; SPIEGELMAN, S.; MARKS, P.A.; BANK, A. Decreased globin messenger RNA in thalassemia detected by molecular hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n.70, p.1886, 1973.

KEDAR, P.S.; GHOSH, K.; COLAH, R.B.; MOHANTY, D. Chronic persistent hemolysis in an infant: can we afford to forget malaria as a cause? **The Hematology**

Journal, v.3, n.2, p.114-115, 2002.

KIMURA, E.M.; DUARTE, D.F.; SANTANA, S.C.; BORGES, E.; SILVA, N.M.; GERVÁSIO, A.S.; COSTA, F.F.; SONATI, M.F. Hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) and structural alterations of γ globin in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.573-577, 2000.

LEE, R.G. Microcitose e as anemias associadas com síntese prejudicada da hemoglobina. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, v.1, 1998, p.865-883.

LEMBERT, J. Imigração estrangeira e migrações internas. In: LEMBERT, J. **Os dois Brasis**. 12ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1984a, p.57-84.

LEMBERT, J. Estrutura étnica e contatos de raças. In: LEMBERT, J. **Os dois Brasis**. 12ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1984b, p.85-100.

LEONART, M.S.S.; NASCIMENTO, A.J.; NONOYAMA, K.; PELISSARI, C.B.; STINGHEN, A.E.; BARRETO, O.C. Correlation of discocyte frequency and ATP concentration in preserved blood. A morphological indicator of red blood cell viability. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, n.6, p.745-747, 1997.

LEONELI, G.G.; IMPERIAL, R.E.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; NAOUM, P.C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.22, n.3, p.396-403, 2000.

LEONELI, G.G.; MELO, S.M.A.; ZAGO, M.A.; SILVA JÚNIOR, W.A.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Hb D Los Angeles in a Brazilian family. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.23, n.3, p.142-145, 2001.

LEPP, A.C.; BLUESTEIN, B.I. Hemoglobin electrophoresis at alkaline pH on agarose gels. **Clinical Chemistry**, v.24, n.6, p.936-937, 1978.

LIMA, C.S.; ARRUDA, V.R.; COSTA, F.F.; SAAD, S.T. Minimal doses of hydroxyurea for sickle cell disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, n.8, p.933-940, 1997.

- LUBIN, B.H.; WITKOWSKA, H.E.; KLEMAN, K. Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. **Clinical Biochemistry**, v.24, n.4, p.363-373, 1991.
- LUKENS, J.N.; LEE G.R. As hemoglobinas anormais: princípios gerais. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, v.1, 1998, p. 1120-1152.
- LUKENS, J.N. Hemoglobinopatias S, C, D, E & O e doenças associadas. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, v.1, 1998a, p. 1161-1205.
- LUKENS, J.N. Talassemias e distúrbios afins: Distúrbios quantitativos da síntese da hemoglobina. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, v.1, 1998b, p. 1206-1255.
- MARCKS, L.; ZIMMERMANN, A.P.; FARIAS, I.; BUZATTI, E. Estudo da prevalência de hemoglobinopatias em doadores do banco de sangue do Hospital Universitário de Santa Maria. **Revista Científica AMECS**. v.4, p.31-34, 1995.
- MARQUES JÚNIOR, J.F.C. Transfusão de hemácias contendo hemoglobina S. **Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.16, n.166, p.229-232, maio-ago. 1994. [Lilacs]
- MARENGO-ROWE, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. **J. Clin. Path.**, v.18, n.6, p. 790-792, 1965.
- MATO, S.P. Anemia and malaria in a yanomami amerindian population from the southern Venezuelan Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.59, n.6, p.998-1001, 1998.
- MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. Hemograma – Série Vermelha In: MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. **Laboratório para o clínico**. 8 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p.66-72, 1995.
- MILONE, G.; CALACIURA, A.; GRANATA, P.; SORTINO, G. HbA2 evaluation: comparison between microchromatography on DEAE cellulose column and

conventional cellulose acetate electrophoresis. **Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.**, v.7, n.17, p. 1777-1782, 1981.

MODELL, M.; WONKE, B.; ANIONWU, E.; KHAN, M.; TAI, S.S.; LLOYD, M.;
MODELL, B. A multidisciplinary approach for improving services in primary care:
randomized controlled trial of screening for haemoglobin disorders. **British Medical
Journal**, v.317,n.7161, p.788-791, 1998.

MOHAMMAD, A.A.; OKORODUDU, A.O.; BISSEL, M.G.; DOW, P.; REGER, G.;
MEIER, A.; GUODAGNO, P.; PETERSEN, J.R. Clinical application of capillary
isoelectric focusing on fused silica capillary for determination of hemoglobin variants.
Clinical Chemistry, v.43, n.9, p.1798-1799, 1997.

MOLLISON, P.L.; ENGELFRIRT, C.P.; CONTRERAS, M The transfusion of red cells.
In: MOLLISON, P.L.; ENGELFRIRT, C.P.; CONTRERAS, M. **Blood Transfusion in
Clinical Medicine**. 10 ed. London: Blackwell Science, 1997. p. 278-314.

MOLTENI, S.; FRISCHNECHT, H.; THORMANN, W. Application of dynamic capillary
isoelectric focusing to the analysis of human hemoglobin variants. **Electrophoresis**,
v.15, n.1, p.22-30, 1994.

MOREIRA, H. W.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; NAOUM, P.C. Thalassemias beta. In:
NAOUM, P.C. (eds.). **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997, p.
105-119.

MORELLI, M.; ZULLO, F.; NOIA, R.; COREA, D.; ARDUINO, B.; PICCIONE, F.;
MASTRANTONIO, P. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia. A study based in
Calabria. **Minerva Ginecol.**, v.53, n.4, p.251-255, 2001.

NAOUM, P.C. As alterações das hemoglobinas. In: NAOUM, P.C. (eds.).
Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Sarvier, 1997a, p. 31-35.

NAOUM, P.C. Molécula da hemoglobina. In: NAOUM, P.C. (eds.). **Hemoglobinopatias
e Talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997b, p. 16-21.

NAOUM, P.C. Ontogenia das hemoglobinas. In: NAOUM, P.C. (eds.).

Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Sarvier, 1997c, p. 22-24.

NAOUM, P.C. As alterações das hemoglobinas. In: NAOUM, P.C. (eds.).

Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Sarvier, 1997d, p. 31-35.

NAOUM, P.C. Hb C e interações com outras hemoglobinas e talassemias. In: NAOUM, P.C. (eds.). **Hemoglobinopatias e Talassemias.** São Paulo: Sarvier, 1997e, p. 61-63.

NAOUM, P.C. Hemoglobinas variantes sem alterações fisiológicas. In: NAOUM, P.C. (eds.). **Hemoglobinopatias e Talassemias.** São Paulo: Sarvier, 1997f, p. 64-72.

NAOUM, P.C. Talassemias alfa. In: NAOUM, P.C. (eds.). **Hemoglobinopatias e Talassemias.** São Paulo: Sarvier, 1997g, p. 96-104.

NAOUM, P.C. Distribuição geográfica das hemoglobinopatias. In: NAOUM, P.C. (eds.). **Hemoglobinopatias e Talassemias.** São Paulo: Sarvier, 1997h, p. 137-143.

NAOUM, P.C.; ALVAREZ, F.; DOMINGOS, C.R.B.; FERRARI, F.; MOREIRA, H.W.; SAMPAIO, Z.A.; MAZIERO, P.A.; CASTILHO, E.M. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.23, p.68-79, 1987.

NELSON, D.A.; DAVEY, F.R. Doenças dos eritrócitos. In: HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais.** 18 ed. São Paulo: Manole; 1995a. p. 729-786.

NELSON, D.A.; DAVEY, F.R. Hematopoiese. In: HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais.** 18 ed. São Paulo: Manole; 1995b. p. 701-728.

NUTEPI – Núcleo de Estudos e Tecnologias em Gestão Pública. Municípios do RS. Caxias do Sul. Outras informações sobre o município (histórico, imagens, indicadores econômicos, links). **Histórico do Município.** Disponível em: <http://www.nutep.adm.ufrgs.br/projetos/menuprojetos.htm> - link histórico da cidade <http://www.raizesdosul.com.br/mun087.htm>. Acesso em: 20 fev. 2003.

OLIVIERI, N. F. The β -Thalassemias. **The New England Journal of Medicine**,

v. 341, n.2, p.99-109, 1999.

ORLANDO, G. M.; NAOUM, P. C.; SIQUEIRA, F. A. M.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.22, n.2, p.111-121, 2000.

PEDROLLO, E.; HUTZ, M.H.; SALZANO, F.M. Alpha-thalassemia frequency in newborn children from Porto Alegre, Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, v.13, n.3, p.573-581, 1990.

PREFEITURA Municipal de Caxias do Sul. A cidade. **Histórico**. Disponível em: http://www.caxias.rs.gov.br/cidade/cid_his.php4 Acesso em: 17 mar 2003a.

PREFEITURA Municipal de Caxias do Sul. A cidade. **Colonização**. Disponível em: http://www.caxias.rs.gov.br/cidade/cid_his1.php4 Acesso em: 17 mar 2003b.

PREFEITURA Municipal de Caxias do Sul. A cidade. **A terra**. Disponível em: http://www.caxias.rs.gov.br/cidade/cid_his2.php4 Acesso em: 17 mar 2003c.

RAMALHO, A. S. Hemoglobina S em doadores de sangue brasileiros. **AMB Revista da Associação Médica Brasileira**. v.22, n.12, p.467-468, 1976.

RAMALHO, A.S.; TEIXEIRA, R.C.; TEIXEIRA, P.A.; COMPRI, M.B.; STELLA, M.B.; POLIMENTO, N.C. Genética e saúde pública no Brasil: os programas comunitários de hemoglobinopatias hereditárias. **An. Acad. Nac. Med.**, v.156, n.1, p.13-18, 1996.

RAMALHO, A.S.; PAIVA E SILVA, R.B.; TEIXEIRA, R.C.; COMPRI, M.B. Hemoglobin screening: response of a Brazilian community to optional programs. **Caderno de Saúde Pública**. v.15, n.3, p. 591-595,1999.

RAMALHO, A.S.; SILVA, R.B.P. Community genetics: a new discipline and its application in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.16, n.1, p.261-263, 2000.

RIBEIRO, V.S.; ARAÚJO, J.T. Hemoglobin H: laboratory identification. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v.47, n.4, p.176-179, 1992.

ROTHSTEIN, G. Origem e desenvolvimento do sangue e dos tecidos que formam o

- sangue. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, v.1, 1998, p. 45-78.
- SÁENZ, G.F.; CHAVES, M.; RODRIGUEZ, W.; SÁNCHEZ, G.; BARRANTES, A.; BARRENECHEA, M.; MONTERO, A.; QUINTANA, E. Frequency of beta thalassemia and other hemoglobinopathies in the black Costa Rican population. **Rev. Costarric. Cienc. Med.**, v.11, n.1, p.3-11, 1990. [Lilacs]
- SALZANO, F.M.; ROCHA, F.J.; TONDO, C.V. Hemoglobin types and gene flow in Porto Alegre, Brazil. **Acta Genetica et Statistica Medica**, v.18, n.5, p.449-457, 1968.
- SALZANO, F.M.; BORTOLINI, M.C. Hemoglobin types and hemoglobinopathies. In: SALZANO, F.M.; BORTOLINI, M.C. **The evolution and genetics of Latin America population**. Cambridge: Cambridge University Press, p.215-254, 2002.
- SCHROEDER, M.L.; RAYNER, H.L. Transfusão de sangue e dos compostos sangüíneos. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, v.1, 1998, p. 708-765.
- SERRA, H.G.; MARTINS, C.S.B.; SILVA, R.B.P.; RAMALHO, A.S. Evaluation of genetic counseling offered to Brazilian carriers of the beta-thalassemia trait and to their relatives. **Brazilian Journal of Genetics**, v.18, n.3, p.479-484, 1995.
- SILVA, R.B.P.; RAMALHO A.S. Riscos e benefícios da triagem genética: o traço falciforme como modelo de estudo em uma população brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, v.13, n.2, p. 285-294, 1997.
- SKOGESBOE, K.; WEST, S.; MURILLO, M.D.; GLASS, M.W.; SHANAK, S.; TAIT, J.F. Genetic screening of newborns for sickle cell disease: Correlation of DNA analysis with hemoglobin electrophoresis. **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 3, p.454-458, 1991.
- SUZUKI, D.T.; GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. Genética de populações. In: SUZUKI, D.T.; GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. **Introdução à genética**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989, p. 548-577.
- TAVARES NETO, J.; BERNARDES, R. Hemoglobinas anormais em doadores de sangue

de Sobradinho (Distrito Federal, Brasil). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.12, n.1/4, p.55-60, 1980.

TELEN, M.J. O eritrócito maduro. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, v.1, 1998, p. 103-138.

TEMIN, H.M.; MIZUTANI, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. **Nature**, v.226, p.1211, 1970.

THALASSEMIA INTERNATIONAL FEDERATION. Genetic basis and pathophysiology. In: THALASSEMIA INTERNATIONAL FEDERATION. Guidelines for the clinical management of thalassemia. Nicosia: TIF, p. 3-8, 2000.

TONDO, C.V.; SALZANO, F.M. Abnormal hemoglobins in a Brazilian Negro population. **American Journal of Human Genetics**, v.14, p.401-409, 1962.

TORRES, F.A.; BONDUEL, M.; SCIUCCATI, G.; DEL POZO, A.; ROLDÁN, A.; CIACCIO, M.; ORAZI, V.; FANO, V.; OZUNA, B.; LEJARRAGA, H.; MURIEL, S.F. Beta talassemia mayor en la Argentina. **Medicina** (Buenos Aires), v.62, n.2, p.124-134, 2002. [Lilacs]

WAGNER, S.C. **Identificação de talassemia alfa e outras hemoglobinopatias no Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica, Porto Alegre: UFRGS, 2002.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Historical Perspectives. In: WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B (eds). **The thalassaemia syndromes**. 3 ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1981a, p. 1-18.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Structure, function, genetics and biosynthesis of haemoglobin. In: WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B (eds). **The thalassaemia syndromes**. 3 ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1981b. p. 19-48.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. The β thalassemsias. In:

- WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B (eds). **The thalassaemia syndromes**. 3 ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1981c. p. 148-319.
- WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Laboratory diagnosis of thalassemia syndromes. In: WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B (eds). **The thalassaemia syndromes**. 3 ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1981d. p. 744-769.
- WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Genetic Disorders of Hemoglobin. **Seminars in Hematology**. V. 36, n.4 (Supl 7 october), p. 24-37, 1999.
- WENNING, M.R.S.C.; KIMURA, E.M.; COSTA, F.F.; SAAD, S.T.O.; GERVÁSIO, S.; de JORGE, S.B.; BORGES, E.; SILVA, N.M.; SONATI, M.F. α -Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.9, p.1041-1045, 2000.
- WINTROBE, M.M.; LUKENS, J.N.; LEE, G.R. A abordagem do paciente com anemia. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (eds.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, v.1, 1998, p. 781-813.
- ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; TONE, L.G. BOTTURA, C. Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. **Hum. Hered.**, v.33, n.2, p.125-129, 1983. [PubMed]
- ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; BOTTURA, C. Hemoglobin H disease in three Brazilian families. **Revista Brasileira de Genética**, v.7, n. 1, p.137-147, 1984.
- ZAGO, M.A. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. **Revista Paulista de Medicina**. v. 104, n. 6, p.300-304, 1986.
- ZAGO, M.A.; PAÇÓ-LARSON, M.L. Hemoglobin H disease caused by two gene deletions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.22, n.6, p.675-681, 1989.
- ZAGO, M. A.; SILVA JÚNIOR, W. A.; FRANCO, R.F. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the brazilian population. **Ciênc. e Cult.** (São Paulo), v.51, n.3/4, p.226-234, 1999.

Hemoglobinopathy Screening in Blood Donors from a Region Colonized by Italians in Rio Grande do Sul, Brazil.

Lisot^{*1,2}, C.L.A.; Passos^{*3}, M.V.S.; Silva Júnior^{*3}, W.A.; Paixão^{*3}, B.M.C.; Silla^{*1,2}, L M. R.

^{*1} Division of Hematology and Bone Marrow Transplant, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos 2350, sala 2235, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003, Brasil

^{*2} Graduate Course in Medicine: Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos 2400, 2º andar, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003, Brasil

^{*3} School of Medicine, Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, Department of Clinical Medicine, Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Center for Cell Therapy. Rua Tenente Catão Roxo, 2501, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, CEP 14051-140, Brasil

Correspondence to: Dr. Cristina Lucia Alberti Lisot
Eça de Queiróz, 639/203. Porto Alegre - CEP 90035-007
Tel.: +55 51 3328 4221 crisliz@hotmail.com

Financial support by: FIPE/Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Hemocentro Regional de Caxias do Sul

Running title: Hemoglobinopathies in blood donors from Caxias do Sul, Brazil.

Abstract

In the 19th century, a great horde of Italian immigrants settled in Rio Grande do Sul, more specifically in the mountain region of the state. The high prevalence of beta thalassemia among Italians and their participation in the ethnic formation of Caxias do Sul and neighboring towns prompted us to investigate 608 blood donors at the Hemocentro Regional de Caxias do Sul (Regional Blood Center of Caxias do Sul).

Despite ethnic influence, abnormal hemoglobin levels were found in 1.81% of the cases (0.16% Hb AC, 0.99% Hb AS and 0.66% Hb AH), which are similar to the levels observed in a study on qualitative disorders conducted in the countryside region of Rio Grande do Sul.

In our setting, the most commonly used screening tests for thalassemia, combined with DNA sequencing, were not able to detect quantitative disorders of hemoglobin synthesis. This may be attributable to yet unknown genetic disorders, technical restrictions, or still, to a miscegenation that is greater than we initially suspected.

Key words: Hemoglobinopathies, blood donors, electrophoresis, gene sequencing.

Introduction

Hemoglobinopathies belong to a group of inherited diseases characterized by qualitative or quantitative disorders in the synthesis of hemoglobin polypeptide chains (1). It is common knowledge that hemoglobin diseases are associated with ethnicity (2, 3).

A great wave of Italian immigrants arrived in southern Brazil in the late 19th century and settled in the city of Caxias do Sul and in the neighboring region. Most of those immigrants came from Piedmont, in northern Italy(4), where the prevalence of individuals with beta thalassemia ranges between 0.4% and 20% (5). In the city of Porto Alegre, the prevalence of heterozygotes for beta thalassemia among Caucasians was of 1.1% in a sample of 704 individuals. The participants in this study were applicants for a job at the Institute for Biological Research of the State Department of Health of Rio Grande do Sul, or blood donors at Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 62% were of Italian descent (6).

Due to the mixed ethnicity of the Brazilian population, hemoglobin S is no longer restricted to black people, and beta thalassemia is not found among Caucasian individuals of Mediterranean origin only (1).

Hemoglobinopathies have been investigated in Brazil as to their prevalence and distribution in regions and ethnic groups. These studies include a wide variety of populations and screening techniques. Quite frequently, newborns and blood donors are the most widely studied populations (3,7-23). In newborns, for instance, the prevalence of hemoglobin S ranges from 1.2% in Porto Alegre (8) to 2.8% in northeastern Brazil (7).

Given its Italian ancestry, the region of Caxias do Sul affords an unparalleled opportunity to assess the prevalence of hemoglobinopathies in the state of Rio Grande do

Sul. The existence of only one study on the prevalence of hemoglobinopathies in blood donors in the countryside region of the state (19), the fact that the supportive actions regarding the care provided to the patients are the major arguments in favor of population screening for hemoglobinopathies (2, 14, 23-27), in addition to the fact that red blood cell transfusion containing hemoglobin S may produce undesirable effects due to the possibility of sickle cell anemia in the receptor, and changes in stored blood (28), prompted us to investigate the prevalence of hemoglobinopathies in blood donors, as well as their association with ethnicity.

Material and Methods

We used a cross-sectional study to assess the prevalence of hemoglobinopathies in blood donors from the Hemocentro Regional de Caxias do Sul between April and December 2001. This blood center is the main center for blood donation in the mountain region of the state of Rio Grande do Sul. This center receives approximately 12,000 blood donations a year from individuals living in Caxias do Sul, Antonio Prado, Flores da Cunha, Vacaria, Carlos Barbosa, Bento Gonçalves, Bom Jesus, Gramado, Canela, Nova Petrópolis, São Marcos, Cotiporã and Feliz.

The following inclusion criteria were used in our study: weight over 50 kg, age between 18 and 60 years, hemoglobin level between 13 and 17 g/dL for men and 12 and 16 g/dL for women, and clinical eligibility.

Participants were randomly selected once a week, and so were the day of the week and the shift for the donation. All eligible donors who turned up on the randomly selected day and shift were invited to participate in the study. All participants signed an informed

consent form.

For the sake of the study, an extra sample of peripheral blood was collected in EDTA tubes from each donor, totaling 608 samples.

The Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) codes skin color or race of the Brazilian population as follows: white, black, brown, yellow and indigenous (11), which were respectively categorized as ethnic groups in our study as: Caucasian, black, Brazilian Caucasian, Asian and indigenous. The classification into ethnic groups was made by three properly trained collaborators, who took into consideration skin color, eye color, lip shape, and hair type (8, 29).

The following red blood cell indices hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW) and hemoglobin level were obtained through an electronic cell counter (Coulter®ACT-DIFF).

The initial screening consisted of tris-borate (pH 8.6) electrophoresis buffer prepared with total blood and 1% saponin on cellulose acetate film. After that, quantitative electrophoresis was carried out using 20 µl of hemolysate obtained through distilled water and extracted with chloroform on a cellulose acetate film, at pH 8.6 with tris-borate buffer. The quantification of hemoglobin A₂ was obtained by aqueous elution and absorbance reading on an Analyser® spectrophotometer at 410 nm. Electrophoreses with variant hemoglobins and Hb A₂ levels higher than the reference value (3.5%) were performed twice and confirmed. Acid electrophoresis (pH 6.2) on a citrate agar gel was performed to confirm hemoglobin fractions different from A, A₂, F and H.

Samples with HbA₂ levels greater than 3.5% were submitted to the following procedures: DNA extraction and amplification by PCR and subsequent sequencing

reaction of the region located between positions -20 and + 270 of the beta hemoglobin gene on a MegaBACE® DNA sequence analyzer with primers 5'GGCAGAGCCATCTATTGCTT3' and 5'GTTATGGGCAACCCTAAGGT3'.

Statistical analysis

Our results were analyzed by means of descriptive statistics, which included frequency distribution and Fisher's exact test. The Statistical Package for Social Science (SPSS, version 10.0, Chicago, Illinois) and EPI-INFO (version 6.04 B, CDC, Atlanta) were used.

Results

Nearly 9,000 people donated blood between April and December 2001. Among these, 864 were randomly selected and 70.4% agreed to participate in the study.

Table 1 shows that most donors were men (62%), with incomplete elementary education (31.9%), born in Caxias do Sul (41.3%) and predominantly Caucasian (71.9%).

The red blood cell indices for the study population were normal (Table 2). The mean hematocrit level and hemoglobin concentration were 44.0% and 15.0 g/dL for males and 38.5% and 13.0 g/dL for females. No statistically significant difference was observed in red blood cell indices between the two groups. Hemoglobin A₂ concentration was analyzed in 607 samples as there was heterozygosity for hemoglobin C.

In the study population, we found 71 (11.68%) affected individuals, of whom 1

(0.16%) had HbAC, 4 (0.66%) showed possible alpha thalassemia due to the Hb AH electrophoretic pattern observed, 6 (0.99%) had Hb AS and 60 (9.87%) were believed to have beta thalassemia for their Hb A₂ levels were higher than the reference values for the technique used. Table 3 shows the distribution of different electrophoretic patterns according to the ethnic group.

The MCV, MCHC and RDW of the 60 individuals with high Hb A₂ levels were 91.3 fl (± 4.68), 33.5 g/dL (± 1.35) and 12.8% (± 0.82). One hundred percent of them were in the Caucasian or Brazilian Caucasian groups (Table 4). However, in these 60 individuals, no abnormality was noted in the beta globin gene sequencing at positions -20 through +270.

Discussion

The data obtained through hemoglobin electrophoresis and Hb A₂ quantification suggest that around 12% of blood donors at the Hemocentro Regional de Caxias do Sul are asymptomatic carriers of hemoglobinopathies. Among these, 60 (9.87%) are believed to carry a beta thalassemic trait and were classified as Caucasians and Brazilian Caucasians; 6 (0.99%) showed Hb AS, of whom approximately 67% belonged to the Caucasian ethnic group; 4 (0.66%) were Caucasians and Brazilian Caucasians with possible alpha thalassemia, and 1 (0.16%) was Brazilian Caucasian and heterozygous for Hb C (Hb AC).

Nevertheless, the absence of beta globin gene disorders decreases to 1.81% or 11 donors with asymptomatic hemoglobinopathies, among whom 4 (0.66%) had possible alpha thalassemia and 7 (1.15%) carried genes for qualitative hemoglobinopathies. These results describe a population of blood donors in Caxias do Sul, whose data are compatible with those found by Marcks et al. (1995) in Santa Maria, state of Rio Grande do Sul, namely 1.2% (19).

In a study conducted by Melo et. al. (2000) with 23,981 blood donors from Uberlândia, state of Minas Gerais, and from neighboring towns, 820 (3.42%) were carriers of hemoglobinopathies, which included the following types: Hb AS (2.48%), Hb AC (0.73%), beta thalassemia minor (0.13%), Hb AD (0.05%) among other types (0.03%) (17). In the state of Rio Grande do Norte, 630 blood donors from the Department of Hematology and Hemotherapy of Universidade Federal do Rio Grande do Norte were studied, and 15 (2.38%) individuals with abnormal hemoglobins were found; the prevalence of the sickle cell trait was 2.22% in the sample as a whole and 2.72% among blacks, whereas genotype AC was detected only in one individual, with a prevalence

around 0.16% in the analyzed sample (1). The study carried out in the Laboratory of Hemoglobins/UNESP in São José do Rio Preto, São Paulo, by Orlando et al. in the year 2000 (16) revealed that among 262 samples tested in blood donors 13 (4.96%) showed abnormal hemoglobins, of whom 2 (0.76%) had HbAS, 3 (1.14%) had Hb AC, 5 (1.90%) were believed to have alpha thalassemia, 1 (0.38%) possibly had beta thalassemia, and 2 (0.76%) had other types of hemoglobins; when the authors correlated the presence of abnormal hemoglobins according to ethnic origin, they found 2 (0.76%) individuals with Hb AS, 2 (1.14%) with Hb AC, 5 (1.90%) with alpha thalassemia and 1 (0.38%) with beta thalassemia among those classified as Caucasians; among non-Caucasians, they found 1 (0.38%) individual with Hb AC and 2 (0.76%) with other types of hemoglobin. The ethnic heterogeneity of the Brazilian population, in addition to technical variations, does not allow us to compare the results of our study with those obtained from other similar studies. However, Hb S is present and was the most frequently identified hemoglobinopathy in the current study as well as in other studies (13, 14, 16, 22). There is a natural association with the amount of Africans who populated various Brazilian regions. From the Brazilian southeastern to northern coasts, we note an increase in the prevalence of Hb S. On the other hand, in São José do Rio Preto, the prevalence of gene S seems to be the same as that observed in Caxias do Sul (0.76 and 0.99%, respectively) (16). São Paulo is another Brazilian state that was colonized by Italians (2, 4). Among 262 blood donors, the alpha and beta thalassemic traits were present in 1.9 and 0.38% respectively (16), although this study was not complemented by molecular investigation.

Knowingly, heterozygous carriers (beta thalassemic trait) are clinically asymptomatic. Any hemoglobin A₂ value between 3.5% and 8% is regarded as an indicative sign of beta thalassemia (30).

A large number of studies have shown that high levels of Hb A₂ may be used as screening for beta thalassemia and that threshold values for red blood cell indices and normal Hb A₂ levels do not rule out the diagnosis of the disease (31-35). On the other hand, the increase in hemoglobin A₂ levels classically considered an indicative sign of beta thalassemia may be seen in several acquired and congenital conditions (35). Transiently high levels of hemoglobin A₂ have already been described in cases of hyperthyroidism, megaloblastic anemia or malaria (35, 36).

The fact that we did not find any changes in the beta globin segment studied makes us speculate about technical restrictions regarding HbA₂ quantification (37, 38). Milone et al. (1981) compared Hb A₂ quantification techniques and observed that six out of 46 normal samples were false positive for the elution method. Based on these data we should expect to have 79 false positive samples in our study population, which was not statistically different from the 60 samples analyzed (39). If we accept this hypothesis, we admit that miscegenation was larger than we initially suspected.

However, we could not rule out the possibility of mutations in the unsequenced portion of the gene, in addition to some DNA change regarding the delta globin gene that might up-regulate the synthesis of these chains (35, 40). The results found by Gasperini et al. (1993) show a genetic trait that occurs due to an isolated increase in Hb A₂ and absence of beta globin mutations of the gene sequenced at positions -620 through +1630. The authors did not clearly explain their findings, but they posit that there may be a defect in another segment of the genome (35).

Further studies are necessary in order to clarify this issue. For the time being, we wonder whether high levels of Hb A₂ are significant for the diagnosis of beta thalassemia.

One of the limiting factors in the present study for the detection of a typical beta thalassaemic trait (normal hematocrit, low MCV and high Hb A₂ levels) is apparently the sample size, in addition to the fact that the selection of eligible blood donors naturally eliminates anemic individuals.

Curiously enough, albeit not surprising nowadays, the sickle cell trait was also observed in individuals classified as Caucasians. Several factors are implicated in the gene flow from Caucasian to black and vice versa (41, 42). Among these factors, Salzano et al. (1968) cite (a) incidence of ethnic groups in contact regions, (b) cross-mating, (c) fertility and mortality of hybrid/non-hybrid individuals (41). Unarguably, the Brazilian population has been “whitening” as a result of miscegenation and several biases regarding the classification of skin color. Although “whites” were the minority in the early 19th century (only 25%), they constitute the majority of the Brazilian population today (43).

Our conclusion is that the population of blood donors in Caxias do Sul is similar in qualitative disorders of hemoglobin synthesis to other populations in the countryside regions of Rio Grande do Sul, regardless of ethnicity. As far as quantitative disorders are concerned, the screening tests used could not detect the presence or absence of traits of hemoglobinopathies.

Acknowledgments

We thank the staff of Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Center for Cell Therapy, represented by Dr. Marco Antonio Zago, for the sequencing of our samples.

References

1. Bezerra TM, Andrade SR. Investigação sobre a prevalência de hemoglobinas anormais entre doadores de sangue. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 1991, 23(4): 117-118.
2. Zago MA. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. **Revista Paulista de Medicina**, 1986, 104(6): 300-304.
3. Tondo CV, Salzano FM. Abnormal hemoglobins in a Brazilian Negro population. **American Journal of Human Genetics**, 1962, 14: 401-409.
4. Frosi VM, Mioranza C. Inícios da imigração – Processos de estabelecimento. In: Frosi VM, Mioranza C. **Imigração Italiana no Nordeste do Rio Grande do Sul**. Co-edições Universidade de Caxias do Sul/Instituto Superior Brasileiro Italiano de Estudos e Pesquisas. Porto Alegre: Movimento. 1975, p.38-42.
5. Tentori L, Marinucci M, Massa A, Giuliani A, Mavilio F. Le emoglobinopatie in Italia: Distribuzione Geografica e Criteri per lo Screening. **Recenti Prog Med**, 1981, 71(2): 148-169.
6. Freitas EM, Rocha FJ. Detection of beta-thalassemia heterozygotes among caucasians from Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev Bras Genet**, 1983, 6(1): 185-188.
7. Ginabreda MGP, Sá E, Fonseca AA. Anemia falciforme e triagem neonatal. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2000, 22(Suplemento):22.
8. Daudt LE, Zechmaister D, Portal L, Camargo Neto E, Silla LMR, Giugliani R. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 2002, 18(3): 833-841.
9. Leonelli GG, Canalli AA, Bonini-Domingos CR. Caracterização de Hemoglobina G em família residente no interior do estado de São Paulo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2000, 22(Suplemento):22.
10. Pedrollo E, Hutz MH, Salzano FM. Alpha-thalassemia frequency in newborn children from Porto Alegre, Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, 1990, 13(3): 573-581.
11. Wagner SC. **Identificação de talassemia alfa e outras hemoglobinopatias no Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica, Porto Alegre: UFRGS, 2002.
12. Bandeira FMGC, Leal MC, Souza RR, Furtado VC, Gomes YM, Marques NM. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina S detectado através de triagem em sangue de cordão umbilical. **Jornal de Pediatria**, 1999, 75(3): 167-71.
13. Ducatti RP, Teixeira AEA, Galão HÁ, Bonini-Domingos CR, Fett-Conte AC.

- Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2001, 23(1): 23-29.
- 14.Viana-Baracioli LMS, Bonini-Domingos CR, Pagliusi RA, Naoum PC. Prevenção de hemoglobinopatias a partir de estudo em gestantes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2001, 23(1): 31-39.
- 15.Prudêncio BCAB, Covas DT, Bonini-Domingos CR. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de hemoglobina S (Hb S) em doadores de sangue. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2000, 22(2): 99-109.
- 16.Orlando GM, Naoum PC, Siqueira FAM, Bonini-Domingos CR. Diagnóstico diferencial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2000, 22(2): 111-121.
- 17.Melo SMA, Arantes SCF, Botelho Filho A, Rocha AFS. Prevalência de Hemoglobinopatias em Doadores de Sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia – MG. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2000, 22(Suplemento):51.
- 18.Tavares Neto J, Bernardes R. Hemoglobinas anormais em doadores de sangue de Sobradinho (Distrito Federal, Brasil). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 1980, 12(1/4): 55-60.
- 19.Mareks L, Zimmermann AP, Farias I, Buzatti E. Estudo da prevalência de hemoglobinopatias em doadores do banco de sangue do Hospital Universitário de Santa Maria. **Revista Científica AMECS**, 1995, 4: 31-34.
- 20.Fabritius H, Millan J, Le Corroller Y. Systematic screening of hemoglobinopathies in blood donors in Guadeloupe (french West Indies). **Rev. Fr. Transf. Immunohematol.**, 1978, 21(4): 937-950.
- 21.Fabritius H, Millan J, Le Corroller Y. Results of 3 years of screening of abnormal hemoglobins in the blood donors of Guadeloupe (French Antilles). **Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales**, 1978, 71(2): 216-220.
- 22.Carvalho MG, Souza MO, Silva MBS, Oliveira JMC, Cardoso ICRA, Carvalho IP, Santos CMFR, Oliveira HM, Lopes MSSN, Lira LR. Hemoglobinas anormais: perfil estatístico em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 1994, 26(2): 39-40.
- 23.Ramalho AS. Hemoglobina S em doadores de sangue brasileiros. **AMB Revista da Associação Médica Brasileira**, 1976, 22(12): 467-468.
- 24.Ramalho AS, Paiva e Silva RB, Teixeira RC, Compri MB. Hemoglobin screening: response of a Brazilian community to optional programs. **Caderno de Saúde Pública**. 1999, 15(3): 591-595.
- 25.Fleury MK, Lima JCS. Resultados de um programa preventivo para

- hemoglobinopatias na cidade do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, 1989, 25(2): 42-46.
26. Compri MB, Polimeno NC, Stella MB, Ramalho AS. Programa comunitário de hemoglobinopatias hereditárias em população estudantil brasileira. **Revista de Saúde Pública**. 1996, 30(2): 187-195.
27. Angastiniotis M, Modell B. Global Epidemiology of Hemoglobin Disorders. Cooley's Anemia Seventh Symposium. **Annals of the New York Academy of Sciences**; Published by the New York Academy of Sciences Any AA9 850. Editor Alan R. Cohen, 1998, (850): 51-69.
28. Marques Júnior JFC. Transfusão de hemácias contendo hemoglobina S. **Bolet. Soc. Brás. Hematol. Hemot.**, 1994, 16(166):229-232.
29. Krieger H, Morton NE, Mi MP, Azevedo E, Freire-Mais A, Yasuda N. Racial admixture in north-eastern Brazil. **Ann Human Genet.** 1965; 29(2):113-125.
30. Rocha HHG. Estudo comparativo de duas metodologias para determinação da hemoglobina A₂. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 1999, 21(2): 89-90.
31. Metaxotou-Mavromati A, Kattamis C, Matathia L, Tzetis M, Kanavakis E. Clinical haematological, and genetic studies of type 2 normal Hb A₂ beta thalassaemia. **J. Med. Genet.**, 1988, 25(3): 195-199.
32. Madan N, Sikka M, Sharma S, Rusia U. Haematological parameters and Hb A₂ levels in beta-thalassaemia trait with coincident iron deficiency. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, 1998, 41(3): 309-313.
33. Fortova H, Slavikova V, Musil F, Suttner J, Brabec V. Diagnosis of beta-thalassaemia on the basis of Hb A₂ determination. **Vnitř. Lek.**, 1995, 41(5): 302-306.
34. Rosatelli MC, Pischedda A, Meloni A, Saba L, Pomo A, Travi M, Fattore S, Cao A. Homozygous beta-thalassaemia resulting in the beta-thalassaemia carrier state phenotype. **Br. J. Haematol.**, 1994, 88(3): 562-565.
35. Gasperini D, Cao A, Paderi L, Barella S, Paglietti E, Perseu L, Loi D, Galanello R. Normal individuals with high Hb A₂ levels. **Br. J. Haematol.**, 1993, 84(1): 166-168.
36. Willcox M, Brohult J, Sirleaf V, Bengtsson E. Malaria and haemoglobin A₂ levels in northern Liberia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 1979, 73(2): 209-211.
37. Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. **J. Clin Path.**, 1965, 18(6): 790-792.
38. Bain BJ, Amos RJ, Bareford D et al. (BCSH). Guideline – The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. **British J Haematol**, 1998, 101(4): 783-792.

39. Milone G, Calaciura A, Granata P, Sortino G. HbA2 evaluation: comparison between microchromatography on DEAE cellulose column and conventional acetate electrophoresis. **Boll Soc Ital Biol Sper**, 1981, 7(17): 1777-1782.
40. Gallanello R, Barella S, Ideo A, Gasperini D, Rosatelli C, Paderi L, Paglietti E, Sollaino C, Perseu L, Loi D, et al. Genotype of subjects with borderline hemoglobin A2 levels: Implication for beta-thalassemia carrier screening. **Am. J. Hematol.**, 1994, 46(2): 79-81.
41. Salzano FM, Rocha FJ, Tondo CV. Hemoglobin types and gene flow in Porto Alegre, Brazil. **Acta Genetica et Statistica Medica**, 1968, 18: 449-457.
42. Sonati MF, Kaeda J, Kimura EM, Costa FF, Luzzatto L. Mild clinical expression of S- β thalassemia in a Brazilian patient with the β^+ IVS-I-6 (T \rightarrow C) mutation. **Genetics and Molecular Biology**. 1998, 21(4): 431-433.
43. Lemberg J. Estrutura étnica e contatos de raças. In: Lemberg J. **Os dois Brasis**. 12ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1984, p.85-100.

Table 1 – General characteristics of blood donors in the present study.

		n	%
<u>Gender</u>	Male	377	62
	Female	231	38
	Total	608	100
<u>Ethnic group</u>	Caucasian	437	71.9
	Brazilian Caucasian	157	25.8
	Black	12	2.0
	Indigenous	2	0.3
	Total	608	100
<u>Education</u>	Illiterate	4	0.7
	Elementary education incomplete	194	31.9
	Elementary education complete	104	17.1
	High school incomplete	55	9.1
	High school complete	134	22.0
	University incomplete	69	11.3
	University complete	48	7.9
	Total	608	100
<u>Place of birth</u>	Caxias do Sul	251	41.3
	Neighboring towns (Italian colonization)	210	34.5
	Other towns in Rio Grande do Sul	132	21.7
	Other Brazilian states	12	2.0
	Other countries	3	0.5
	Total	608	100

Table 2- Mean red blood cell indices of 608 blood donors analyzed.

Sample	Mean	Standard deviation	Range
Hematocrit%	41.9	3.82	30.1—52.2
Hemoglobin g/dL	14.3	1.35	10.4—17.9
MCV fl	89.6	4.05	72.9—105
MHC pg	30.4	1.49	23.5—35.0
MHCH g/dL	34.0	0.88	30.0—35.7
RDW %	12.7	0.84	10.5—17.0

Table 3 – Distribution of different electrophoretic patterns according to ethnic groups.

Ethnic group	Hb AA	Hb AC	Hb AS	Hb AH
Caucasian	430 (98.4%)	0 (0%)	4 (0.9%)	3 (0.7%)
Brazilian Caucasian	154 (98.1%)	1 (0.6%)	1 (0.6%)	1 (0.6%)
Indigenous	2 (100.0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Black	11 (91.7%)	0 (0%)	1 (8.3%)	0 (0%)

Table 4 – Distribution of Hb A₂ levels in different ethnic groups.

Ethnic group	Hb A ₂ levels	
	> 3.5%	≤ 3.5%
Caucasian	49 (11.2%)	388 (88.8%)
Brazilian Caucasian	11 (7.1%)	145 (92.9%)
Indigenous	0	2 (100%)
Black	0	12 (100%)

Triagem de Hemoglobinopatias em Doadores de Sangue em Área de Colonização Italiana do Rio Grande do Sul, Brasil.

Lisot^{*1,2}, C.L.A.; Passos^{*3}, M.V.S.; Silva Júnior^{*3}, W.A.; Paixão^{*3}, B.M.C.; Silla^{*1,2}, L M. R.

^{*1} Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos 2350, sala 2235, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003, Brasil

^{*2} Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos 2400, 2º andar, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003, Brasil

^{*3} Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica, Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Centro de Terapia Celular. Rua Tenente Catão Roxo, 2501, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, CEP 14051-140, Brasil

Autor para correspondência: Cristina Lucia Alberti Lisot

Endereço: Eça de Queiróz, 639/203 Porto Alegre CEP 90035-007

Fone: (51) 3328 4221 Endereço eletrônico: crisliz@hotmail.com

Fontes de Financiamento: FIPE/Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Hemocentro Regional de Caxias do Sul

Título abreviado: Hemoglobinopatias em doadores de sangue de Caxias do Sul.

Resumo

No Rio Grande do Sul houve, no século XIX, uma forte corrente migratória de italianos que se estabeleceram na região da serra gaúcha. A alta prevalência de beta talassemia em italianos e a participação dos mesmos na formação étnica da cidade de Caxias do Sul e arredores conduziram-nos à investigação de uma amostra de 608 doadores de sangue do Hemocentro Regional de Caxias do Sul.

Apesar da influencia étnica, encontramos 1,81% de hemoglobinas anormais (0,16% Hb AC, 0,99% Hb AS e 0,66% Hb AH) um padrão similar com estudo do interior do Estado do Rio Grande do Sul para alterações qualitativas.

Para as talassemias, as técnicas mais comuns, cruzadas com seqüenciamento de DNA, em nossas mãos, não foram capazes de esclarecer anormalidades quantitativas da hemoglobina. Este resultado pode ser atribuído a alterações genéticas ainda não conhecidas, a limitações técnicas ou, mais simplesmente, a um grau de miscigenação maior do que o suspeitado inicialmente.

Palavras-chave: Hemoglobinopatias, doadores de sangue, eletroforese, seqüenciamento gênico.

Introdução

As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças hereditárias que se caracterizam por apresentarem distúrbios qualitativos ou quantitativos na síntese das cadeias polipeptídicas da hemoglobina (1). É corrente o conhecimento de que as diferentes doenças da hemoglobina estão relacionadas com a etnia (2, 3).

No sul do Brasil houve um grande fluxo de imigrantes italianos no final do século XIX, que se estabeleceram em Caxias do Sul e arredores. Os imigrantes eram principalmente de Piedmont, no norte da Itália (4), onde a prevalência de indivíduos portadores de beta talassemia varia de 0,4% a 20% (5). Na cidade de Porto Alegre, em uma amostra de 704 indivíduos, a prevalência de heterozigotos para beta talassemia, entre os caucasóides, foi de 1,1%. Os participantes deste estudo eram candidatos a uma vaga de trabalho no Instituto de Pesquisas Biológicas da Secretaria da Saúde do Rio Grande do Sul ou doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 62% possuíam ancestrais italianos (6).

Com a miscigenação da população brasileira, a hemoglobina S deixou de ser restrita à população negróide e a beta talassemia deixou de ser uma característica restrita à população caucasóide de origem Mediterrânea (1).

As hemoglobinopatias têm sido estudadas no Brasil quanto à prevalência e distribuição em regiões e grupos raciais valendo-se para este propósito das mais variadas populações e técnicas analíticas. As populações mais freqüentemente estudadas são os recém-nascidos e doadores de sangue (3,7-23). Nos recém-nascidos, por exemplo, a prevalência de hemoglobina S varia de 1,2% em Porto Alegre (8) a 2,8% na região nordeste do Brasil (7).

A região de Caxias do Sul, devido a colonização italiana, oferece uma oportunidade ímpar para avaliar a prevalência de hemoglobinopatias no estado do Rio Grande do Sul. Os fatos de que no interior do estado existe somente um estudo publicado de prevalência de hemoglobinopatias em doadores de sangue (19), que ações em prol da assistência a portadores são os principais argumentos para a triagem populacional de hemoglobinopatias (2, 14, 23-27) e que a transfusão de hemácias contendo hemoglobina S podem resultar em efeitos indesejáveis pela possibilidade de falcização no receptor, bem como pela alteração no produto estocado (28) nos levou a investigar a prevalência de hemoglobinopatias em doadores de sangue e sua associação com a etnia.

Metodologia

Desenhou-se um estudo transversal para avaliar a prevalência de hemoglobinopatias em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Caxias do Sul, no período de abril a dezembro de 2001. Este Hemocentro constitui o principal centro de doação de sangue na região da serra do Rio Grande do Sul. Recebe cerca de 12.000 doações por ano provenientes de Caxias do Sul, Antônio Prado, Flores da Cunha, Vacaria, Carlos Barbosa, Bento Gonçalves, Bom Jesus, Gramado, Canela, Nova Petrópolis, São Marcos, Cotiporã e Feliz.

Consideram-se elegíveis os doadores com mais de 50 Kg, com idade entre 18 e 60 anos, hemoglobina entre 13 e 17 g/dL para homens e para as mulheres entre 12 e 16 g/dL além de aptos na triagem clínica.

A seleção dos participantes foi feita de maneira aleatória uma vez por semana, sendo sorteado um dia na semana, e neste dia um turno de doação. Todos os doadores

aptos que se apresentaram nos dias e turnos sorteados foram convidados a participar do estudo. Os que aceitaram preencheram consentimento informado (anexo página 138).

Para o estudo, uma amostra adicional de sangue periférico em EDTA foi coletada de cada doador, perfazendo um total de 608 amostras.

O IBGE estabelece cinco opções para cor ou raça na nossa população, a saber: branca, preta, parda, amarela e indígena (11) que foram categorizados como grupos étnicos em nosso estudo consecutivamente da seguinte maneira: caucasóide, negróide, caucasóide brasileiro, oriental e indígena. A classificação nos grupos étnicos foi feita a partir da observação de três colaboradores treinados, levando em consideração a cor da pele, dos olhos, espessura dos lábios e características do cabelo (8, 29).

O hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), *red cell distribution width* (RDW) e dosagem de hemoglobina foram obtidos através de contador eletrônico de células Coulter®ACT-DIFF.

Na triagem inicial foi realizada eletroforese em pH 8,6 com tampão tris-borato de hemolisado preparado com sangue total e saponina a 1%, aplicado sobre suporte de acetato de celulose. A seguir, foi realizada eletroforese com a finalidade quantitativa através da aplicação de 20 µl de hemolisado obtido com água destilada e extraído com clorofórmio, sobre suporte de acetato de celulose, em pH 8,6 com tampão tris-borato. A quantificação de hemoglobina A₂ foi feita por eluição aquosa e leitura de absorbância em espectrofotômetro Analyser® a 410 nm. Tanto eletroforeses onde foram encontradas hemoglobinas variantes, quanto dosagens de Hb A₂ superiores ao valor de referência que é de 3,5%, foram repetidas em duplicata e confirmadas. Eletroforese ácida pH 6,2 em suporte de gel ágar-citrato foi realizada para confirmar frações hemoglobínicas

diferentes de A, A₂, F e H.

As amostras com dosagens de HbA₂ superior a 3.5% foram submetidas aos seguintes procedimentos: extração e amplificação do DNA por PCR e seguinte reação de seqüenciamento da região situada na posição -20 até + 270 do gene beta da hemoglobina em seqüenciador MegaBACE®, com primers 5'GGCAGAGCCATCTATTGCTT3' e 5'GTTATGGGCAACCCTAAGGT3'.

Análise estatística

Os resultados foram analisados através de estatísticas descritivas utilizando a distribuição de frequências e o teste exato de Fisher, usando o Statistical Package for Social Science (SPSS, versão 10.0, Chicago, Illinois) e EPI-INFO (versão 6.04 B, CDC, Atlanta).

Resultados

Aproximadamente 9.000 pessoas doaram sangue entre abril e dezembro de 2001. Dentre estas, 864 foram randomicamente sorteados e 70,4% aceitaram participar do estudo.

Destaca-se na Tabela 1 que a maior parte dos doadores eram homens (62%), com primeiro grau incompleto (31,9%), naturais de Caxias do Sul (41,3%) e predominantemente caucasóides (71,9%).

Os índices hematimétricos para a população estudada foram normais (Tabela 2). A média dos níveis de hematócrito e da concentração de hemoglobina foi de 44,0% e 15,0 g/dL para os indivíduos do sexo masculino e 38,5% e 13,0 g/dL para o feminino. Não houve diferença estatisticamente significativa nos índices hematimétricos entre os

dois grupos. A porcentagem de hemoglobina A₂ foi analisada em 607 amostras já que existiu uma heterozigose para hemoglobina C.

Na população do estudo foram encontrados 71 (11,68%) indivíduos afetados, destes, 1 (0,16%) tinha HbAC, 4 (0,66%) com possível alfa talassemia por apresentarem padrão eletroforético Hb AH, 6 (0,99%) com Hb AS e 60 (9,87%) que sugeriam beta talassemia por apresentarem Hb A₂ acima do valor de referência para a técnica utilizada. Na Tabela 3 podemos ver a distribuição dos diferentes padrões eletroforéticos de acordo com o grupo étnico.

O VCM, CHCM e RDW dos 60 indivíduos com níveis de Hb A₂ aumentados foram 91,3 fl ($\pm 4,68$), 33,5 g/dL ($\pm 1,35$) e 12,8 % ($\pm 0,82$), respectivamente. Cem por cento destes eram do grupo caucasóide ou caucasóide brasileiro (Tabela 4). No entanto, neste grupo o seqüenciamento do gene da beta globina da posição -20 até a +270 não mostrou qualquer anormalidade.

Discussão

Os dados obtidos pela eletroforese de hemoglobina e dosagem de Hb A₂ sugerem que cerca de 12% dos doadores de sangue do Hemocentro Regional de Caxias do Sul são portadores assintomáticos de hemoglobinopatias. Destes, 60 (9,87%) seriam portadores do traço beta talassêmico e foram classificados como indivíduos caucasóides e caucasóides brasileiros; 6 (0,99%) apresentaram Hb AS com aproximadamente 67% destes no grupo étnico caucasóide; 4 (0,66%) caucasóides e caucasóides brasileiros com possível alfa talassemia e 1 (0,16%) caucasóide brasileiro heterozigoto para Hb C (Hb AC).

A ausência de alterações no segmento do gene para a beta globina estudado, no entanto, reduz para 1,81% ou 11 doadores portadores assintomáticos de hemoglobinopatias dos quais 4 (0,66%) com possível alfa talassemia e 7 (1,15%) portadores de genes para hemoglobinopatias qualitativas. Estes resultados descrevem uma população de doadores de sangue em Caxias do Sul com dados compatíveis aos encontrados por Marcks et al. (1995) em Santa Maria – RS de 1,2% (19).

No estudo feito por Melo et. al. (2000) em 23.981 doadores de sangue de Uberlândia, MG, e cidades subjacentes, os autores encontraram 820 (3,42%) portadores de hemoglobinopatias, distribuídas entre os seguintes tipos: Hb AS (2,48%), Hb AC (0,73%), beta talassemia menor (0,13%), Hb AD (0,05%) e outros tipos (0,03%) (17). No Rio Grande do Norte, foram estudados 630 doadores do Núcleo de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal e os autores encontraram 15 (2,38%) indivíduos com hemoglobinas anormais; a prevalência do traço falciforme foi de 2,22% na amostra analisada como um todo e de 2,72% entre os indivíduos negróides, enquanto o genótipo AC foi detectado apenas em um indivíduo, dando uma prevalência em torno de 0,16% na amostra estudada (1). No estudo desenvolvido no Laboratório de Hemoglobinas

/UNESP de São José do Rio Preto, São Paulo, por Orlando et al. no ano 2000 (16), das 262 amostras testadas em doadores de sangue 13 (4,96%) apresentaram hemoglobinas anormais, dentre os quais 2 (0,76%) com HbAS, 3 (1,14%) com Hb AC, 5 (1,90%) com suspeita de alfa talassemia, 1 (0,38%) com suspeita de beta talassemia e 2 (0,76%) com outros tipos de hemoglobinas; quando os autores correlacionaram a presença de hemoglobinas anormais segundo a origem racial encontraram 2 (0,76%) de Hb AS, 2 (1,14%) Hb AC, 5 (1,90%) alfa talassemia e 1 (0,38%) de beta talassemia entre os indivíduos classificados como caucasóides; entre os não-caucasóides foi encontrado 1 (0,38%) indivíduo com Hb AC e 2 (0,76%) com outras hemoglobinas. A heterogeneidade étnica da população brasileira, além de variações técnicas, impede a comparação dos resultados deste estudo com os demais. No entanto, a Hb S está presente e foi a mais freqüente hemoglobinopatia identificada neste e em outros estudos (13, 14, 16, 22). Existe, naturalmente, uma relação com o contingente de africanos que povoaram as diversas regiões. A partir das regiões litorâneas, do sudeste do país para o norte há um aumento na prevalência de Hb S. Por outro lado, em São José do Rio Preto, a prevalência do gene S parece ser da mesma ordem de grandeza que a encontrada em Caxias do Sul (0,76 e 0,99%, respectivamente) (16). São Paulo foi o outro estado da Federação que recebeu imigrantes italianos (2, 4). Em 262 doadores de sangue o traço talassêmico alfa e beta estavam presentes em 1,9 e 0,38% respectivamente (16), embora este estudo não tenha sido complementado por investigação molecular.

Sabe-se que os carreadores heterozigotos (estigma beta talassêmico) são clinicamente assintomáticos. Qualquer valor de hemoglobina A₂ entre 3,5% e 8% é considerado como indicativo de beta-talassemia (30).

Inúmeros estudos apontam que valores de dosagem de Hb A₂ aumentados

podem ser usados como meio de triagem para beta talassemia e que a presença de valores limítrofes tanto para os índices hematimétricos bem como valores normais de Hb A₂ não excluem a presença desta doença (31-35). Por outro lado, a elevação nos níveis de hemoglobina A₂, considerada classicamente como indicativo da presença de beta talassemia, pode ser encontrada em várias situações adquiridas e congênitas (35). Níveis temporariamente elevados desta hemoglobina já foram descritos em situações de hipertireoidismo, anemia megaloblástica ou malária (35, 36).

O fato de não termos encontrado alterações no segmento estudado do gene da beta globina dá margem para a especulação de limitação técnica na dosagem de HbA₂ (37, 38). Milone et al. (1981) compararam técnicas de dosagem de Hb A₂ e demonstraram que para a técnica de quantificação por eluição, num total de 46 amostras normais 6 foram falso-positivas. Com base nestes dados deveríamos esperar encontrar 79 amostras falso-positivas para a população deste estudo o que não foi estatisticamente diferente das 60 amostras encontradas (39). Se admitirmos esta hipótese, admitimos uma miscigenação maior do que a suspeitada inicialmente.

Entretanto, não podemos desconsiderar a possibilidade de haver alterações na porção do gene não seqüenciada, além de alguma variação no DNA referente ao gene da delta globina que poderia supra-regular a síntese destas cadeias (35, 40). Os achados no estudo italiano de Gasperini et al. (1993) demonstraram a existência de um traço genético que se manifesta por isolado aumento de Hb A₂ e ausência de lesões no gene da beta globina, que foi seqüenciado da posição -620 a +1630. Os autores não comunicaram explicação clara para tal achado, porém postulam a presença de um defeito em algum outro segmento do genoma (35).

Estudos mais aprofundados são necessários para resolver esta questão. Por hora

resta a indagação do real significado da elevação de Hb A₂ para o diagnóstico da beta talassemia.

Um dos grandes fatores limitantes deste estudo para encontrar traço beta talassêmico típico (hematócrito normal, VCM diminuído e Hb A₂ aumentada) parece ter sido o tamanho amostral, além de a seleção de doadores aptos naturalmente excluir indivíduos anêmicos.

Para finalizar, é curioso, mas não surpreendente nos dias de hoje, que a presença do traço falcêmico se fez também nos indivíduos classificados como caucasóides. Existem muitos fatores que influenciaram o fluxo gênico de caucasóide para negróides e vice-versa (41, 42). Entre eles Salzano et al. (1968) citam (a) a incidência de grupos étnicos em regiões de contato, (b) cruzamento ao acaso, (c) fertilidade e mortalidade do híbrido/não-híbrido (41). Fato indiscutível é que a população brasileira está "branqueando", resultado da miscigenação e dos vieses na categorização da cor da pele. Depois de ter constituído, no princípio do século XIX uma pequena minoria (apenas 25%), os "brancos" constituem hoje a grande maioria (43).

Os resultados deste estudo permitem concluir que a população de doadores de sangue em Caxias do Sul é similar, em termos de alterações qualitativas, a outras populações do interior do estado, independente da etnia. Quando abordada a presença de alterações quantitativas, as técnicas empregadas não foram capazes de esclarecer a presença ou ausência de traços destas patologias.

Agradecimentos

Agradecemos à equipe da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Centro de Terapia Celular, na pessoa do Dr. Marco Antonio Zago, por possibilitar o seqüenciamento das amostras.

Referências Bibliográficas

1. Bezerra TM, Andrade SR. Investigação sobre a prevalência de hemoglobinas anormais entre doadores de sangue. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 1991, 23(4): 117-118.
2. Zago MA. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. **Revista Paulista de Medicina**, 1986, 104(6): 300-304.
3. Tondo CV, Salzano FM. Abnormal hemoglobins in a Brazilian Negro population. **American Journal of Human Genetics**, 1962, 14: 401-409.
4. Frosi VM, Mioranza C. Inícios da imigração – Processos de estabelecimento. In: Frosi VM, Mioranza C. **Imigração Italiana no Nordeste do Rio Grande do Sul**. Co-edições Universidade de Caxias do Sul/Instituto Superior Brasileiro Italiano de Estudos e Pesquisas. Porto Alegre: Movimento. 1975, p.38-42.
5. Tentori L, Marinucci M, Massa A, Giuliani A, Mavilio F. Le emoglobinopatie in Italia: Distribuzione Geografica e Criteri per lo Screening. **Recenti Prog Med**, 1981, 71(2): 148-169.
6. Freitas EM, Rocha FJ. Detection of beta-thalassemia heterozygotes among caucasians from Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev Bras Genet**, 1983, 6(1): 185-188.
7. Ginabreda MGP, Sá E, Fonseca AA. Anemia falciforme e triagem neonatal. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2000, 22(Suplemento):22.
8. Daudt LE, Zechmaister D, Portal L, Camargo Neto E, Silla LMR, Giugliani R. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 2002, 18(3): 833-841.
9. Leonelli GG, Canalli AA, Bonini-Domingos CR. Caracterização de Hemoglobina G em família residente no interior do estado de São Paulo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2000, 22(Suplemento):22.
10. Pedrollo E, Hutz MH, Salzano FM. Alpha-thalassemia frequency in newborn children from Porto Alegre, Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, 1990, 13(3): 573-581.
11. Wagner SC. **Identificação de talassemia alfa e outras hemoglobinopatias no Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica, Porto Alegre: UFRGS, 2002.
12. Bandeira FMGC, Leal MC, Souza RR, Furtado VC, Gomes YM, Marques NM. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina S detectado através de triagem em sangue de cordão umbilical. **Jornal de Pediatria**, 1999, 75(3): 167-71.
13. Ducatti RP, Teixeira AEA, Galão HÁ, Bonini-Domingos CR, Fett-Conte AC. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-

- nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2001, 23(1): 23-29.
- 14.Viana-Baracioli LMS, Bonini-Domingos CR, Pagliusi RA, Naoum PC. Prevenção de hemoglobinopatias a partir de estudo em gestantes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2001, 23(1): 31-39.
- 15.Prudêncio BCAB, Covas DT, Bonini-Domingos CR. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de hemoglobina S (Hb S) em doadores de sangue. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2000, 22(2): 99-109.
- 16.Orlando GM, Naoum PC, Siqueira FAM, Bonini-Domingos CR. Diagnóstico diferencial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2000, 22(2): 111-121.
- 17.Melo SMA, Arantes SCF, Botelho Filho A, Rocha AFS. Prevalência de Hemoglobinopatias em Doadores de Sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia – MG. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2000, 22(Suplemento):51.
- 18.Tavares Neto J, Bernardes R. Hemoglobinas anormais em doadores de sangue de Sobradinho (Distrito Federal, Brasil). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 1980, 12(1/4): 55-60.
- 19.Marcks L, Zimmermann AP, Farias I, Buzatti E. Estudo da prevalência de hemoglobinopatias em doadores do banco de sangue do Hospital Universitário de Santa Maria. **Revista Científica AMECS**, 1995, 4: 31-34.
- 20.Fabritius H, Millan J, Le Corroller Y. Systematic screening of hemoglobinopathies in blood donors in Guadeloupe (french West Indies). **Rev. Fr. Transf. Immunohematol.**, 1978, 21(4): 937-950.
- 21.Fabritius H, Millan J, Le Corroller Y. Results of 3 years of screening of abnormal hemoglobins in the blood donors of Guadeloupe (French Antilles). **Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales**, 1978, 71(2): 216-220.
- 22.Carvalho MG, Souza MO, Silva MBS, Oliveira JMC, Cardoso ICRA, Carvalho IP, Santos CMFR, Oliveira HM, Lopes MSSN, Lira LR. Hemoglobinas anormais: perfil estatístico em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 1994, 26(2): 39-40.
- 23.Ramalho AS. Hemoglobina S em doadores de sangue brasileiros. **AMB Revista da Associação Médica Brasileira**, 1976, 22(12): 467-468.
- 24.Ramalho AS, Paiva e Silva RB, Teixeira RC, Compri MB. Hemoglobin screening: response of a Brazilian community to optional programs. **Caderno de Saúde Pública**. 1999, 15(3): 591-595.
- 25.Fleury MK, Lima JCS. Resultados de um programa preventivo para hemoglobinopatias na cidade do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, 1989, 25(2):

42-46.

26. Compri MB, Polimeno NC, Stella MB, Ramalho AS. Programa comunitário de hemoglobinopatias hereditárias em população estudantil brasileira. **Revista de. Saúde Pública.** 1996, 30(2): 187-195.
27. Angastiniotis M, Modell B. Global Epidemiology of Hemoglobin Disorders. Cooley's Anemia Seventh Symposium. **Annals of the New York Academy of Sciences;** Published by the New York Academy of Sciences Any AA9 850. Editor Alan R. Cohen, 1998, (850): 51-69.
28. Marques Júnior JFC. Transfusão de hemácias contendo hemoglobina S. **Bolet. Soc. Brás. Hematol. Hemot.**, 1994, 16(166):229-232.
29. Krieger H, Morton NE, Mi MP, Azevedo E, Freire-Mais A, Yasuda N. Racial admixture in north-eastern Brazil. **Ann Human Genet.** 1965; 29(2):113-125.
30. Rocha HHG. Estudo comparativo de duas metodologias para determinação da hemoglobina A₂. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 1999, 21(2): 89-90.
31. Metaxotou-Mavromati A, Kattamis C, Matathia L, Tzetis M, Kanavakis E. Clinical haematological, and genetic studies of type 2 normal Hb A₂ beta thalassemia. **J. Med. Genet.**, 1988, 25(3): 195-199.
32. Madan N, Sikka M, Sharma S, Rusia U. Haematological parameters and Hb A₂ levels in beta-thalassemia trait with coincident iron deficiency. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, 1998, 41(3): 309-313.
33. Fortova H, Slavikova V, Musil F, Suttar J, Brabec V. Diagnosis of beta-thalassemia on the basis of Hb A₂ determination. **Vnitr. Lek.**, 1995, 41(5): 302-306.
34. Rosatelli MC, Pishedda A, Meloni A, Saba L, Pomo A, Travi M, Fattore S, Cao A. Homozygous beta-thalassemia resulting in the beta-thalassaemia carrier state phenotype. **Br. J. Haematol.**, 1994, 88(3): 562-565.
35. Gasperini D, Cao A, Paderi L, Barella S, Paglietti E, Perseu L, Loi D, Galanello R. Normal individuals with high Hb A₂ levels. **Br. J. Haematol.**, 1993, 84(1): 166-168.
36. Willcox M, Brohult J, Sirleaf V, Bengtsson E. Malaria and haemoglobin A₂ levels in northern Liberia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 1979, 73(2): 209-211.
37. Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. **J. Clin Path.**, 1965, 18(6): 790-792.
38. Bain BJ, Amos RJ, Bareford D et al. (BCSH). Guideline – The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. **British J Haematol**, 1998, 101(4): 783-792.
39. Milone G, Calaciura A, Granata P, Sortino G. HbA₂ evaluation: comparison between

microchromatography on DEAE cellulose column and conventional acetate electrophoresis. **Boll Soc Ital Biol Sper**, 1981, 7(17): 1777-1782.

40. Gallanello R, Barella S, Ideo A, Gasperini D, Rosatelli C, Paderi L, Paglietti E, Sollaino C, Perseu L, Loi D, et al. Genotype of subjects with borderline hemoglobin A2 levels: Implication for beta-thalassemia carrier screening. **Am. J. Hematol.**, 1994, 46(2): 79-81.
41. Salzano FM, Rocha FJ, Tondo CV. Hemoglobin types and gene flow in Porto Alegre, Brazil. **Acta Genetica et Statistica Medica**, 1968, 18: 449-457.
42. Sonati MF, Kaeda J, Kimura EM, Costa FF, Luzzatto L. Mild clinical expression of S- β thalassemia in a Brazilian patient with the β^+ IVS-I-6 (T \rightarrow C) mutation. **Genetics and Molecular Biology**. 1998, 21(4): 431-433.
43. Lemberg J. Estrutura étnica e contatos de raças. In: Lemberg J. **Os dois Brasis**. 12ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1984, p.85-100.

Tabela 1 - Características gerais dos doadores de sangue estudados.

		n	%
Gênero	Homens	377	62
	Mulheres	231	38
	Total	608	100
Grupo étnico	Caucasóides	437	71,9
	Caucasóides brasileiros	157	25,8
	Negróides	12	2,0
	Indígenas	2	0,3
	Total	608	100
Escolaridade	Não alfabetizado	4	0,7
	1º grau incompleto	194	31,9
	1º grau completo	104	17,1
	2º grau incompleto	55	9,1
	2º grau completo	134	22,0
	3º grau incompleto	69	11,3
	3º grau completo	48	7,9
	Total	608	100
Local de nascimento	Caxias do Sul	251	41,3
	Cidades Vizinhas de colonização italiana	210	34,5
	Outras cidades do Rio Grande do Sul	132	21,7
	Outros estados do Brasil	12	2,0
	Outros países	3	0,5
	Total	608	100

Tabela 2- Índices hematimétricos médios nos 608 doadores estudados.

Amostra	Média	Desvio padrão	Amplitude de variação
Hematócrito%	41,9	3,82	30,1—52,2
Hemoglobina g/dL	14,3	1,35	10,4—17,9
VCM fl	89,6	4,05	72,9—105
HCM pg	30,4	1,49	23,5—35,0
CHCM g/dL	34,0	0,88	30,0—35,7
RDW %	12,7	0,84	10,5—17,0

Tabela 3 – Distribuição dos diferentes padrões eletroforéticos de acordo com os grupos étnicos.

Grupo Étnico	Hb AA	Hb AC	Hb AS	Hb AH
Caucasóide	430 (98,4%)	0 (0%)	4 (0,9%)	3 (0,7%)
Caucasóide brasileiro	154 (98,1%)	1 (0,6%)	1 (0,6%)	1 (0,6%)
Indígena	2 (100,0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Negróide	11 (91,7%)	0 (0%)	1 (8,3%)	0 (0%)

Tabela 4 – Distribuição da dosagem de Hb A₂ nos diferentes grupos étnicos.

Grupo Étnico	Dosagem de Hb A ₂	
	> 3,5%	≤ 3,5%
Caucasóide	49 (11,2%)	388 (88,8%)
Caucasóide brasileiro	11 (7,1%)	145 (92,9%)
Indígena	0	2 (100%)
Negróides	0	12 (100%)

ANEXOS

OFÍCIO DE AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA

Ilma. Sra.

Diretora do Hemocentro Regional de Caxias do Sul

Senhora Diretora,

Vimos respeitosamente solicitar autorização para realização da pesquisa de Hemoglobinopatias em Doadores de Sangue desta instituição. Enviamos em anexo cópia do projeto de pesquisa, colocando-nos a sua inteira disposição para quaisquer esclarecimentos adicionais.

Contando com sua especial atenção, subscreve-mo-nos.

Atenciosamente,

Cristina Lucia Lizott

Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla
Orientadora

Caxias do Sul, RS, de de 2000.

CONSENTIMENTO INFORMADO

TRIAGEM DE HEMOGLOBINOPATIAS EM DOADORES DE SANGUE DO HEMOCENTRO REGIONAL DE CAXIAS DO SUL

As hemoglobinopatias são doenças passadas de pais para filhos e podem se manifestar em vários graus de intensidade, desde assintomático até uma forte presença de anemia. Exatamente por estas doenças se apresentarem sem sintomatologia clínica, o senhor(a) pode “carregar” um gene alterado sem saber.

O objetivo do nosso trabalho é identificar portadores de hemoglobinopatias, que não possuam sintomas clínicos, e por isso são aceitos como doadores de sangue e jamais procurariam um médico, para podermos aconselhá-lo(a) e conscientizá-lo(a) da importância futura que este conhecimento trará. Por exemplo, se um casal que é portador assintomático de alguma hemoglobinopatia vem a gerar um filho, existe uma probabilidade deste filho manifestar a doença de forma mais grave, com implicações no crescimento, vontade de brincar ou aprender e disposição da criança.

Para realizarmos o teste eletroforese de hemoglobina será necessário fazer um exame adicional no sangue que o senhor(a) está doando. Não será necessária punção extra àquela que será feita para os exames de rotina.

Caso haja alguma alteração o senhor(a) será atendido por médicos especializados, será informado e aconselhado em como conviver conscientemente com esta pequena alteração.

Eu, _____, que assino e identifico este documento, declaro ter recebido explicação clara e completa sobre a pesquisa acima mencionada. Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa.

A assinatura, neste consentimento informado, dará autorização ao pesquisador do estudo para utilizar os dados obtidos nos testes, quando se fizerem necessários, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando minha identidade.

Caxias do Sul, _____ de _____ de 200 .

Assinatura do entrevistador

Assinatura do pesquisado

HEMOCENTRO REGIONAL DE CAXIAS DO SUL
Resultado de Exames

Número da doação: Nº: XXXXXVVVV	Doador: YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY	Coleta: ZZZZZZZZZZ
---------------------------------------	---	-----------------------

Amigo Doador

O resultado do teste adicional (eletroforese de hemoglobina) que o senhor(a) permitiu realizar no sangue doado está normal; isto quer dizer que sua hemoglobina executa todas as suas funções perfeitamente bem, além das proporções esperadas estarem normais. Também significa que o paciente que vai receber seu sangue estará recebendo um componente de ótima qualidade.

Gostaríamos de agradecer a gentileza da doação e da colaboração com o avanço científico.

Esperamos Ter-lhe atendido a contento e sanado suas dúvidas, caso o senhor(a) necessite de maiores esclarecimentos estamos ao seu dispor, é só dirigir-se ao balcão e pedir uma entrevista com o médico(a). Seja sempre bem vindo a esta instituição, pois seu sangue é nossa alma. Obrigada.

HEMOCS

ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA pH Alcalino – Acetato de Celulose

Padrão eletroforético de Hb XY
Dosagem de hemoglobina A2: XX %

ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA pH Alcalino – Acetato de Celulose

Padrão eletroforético de Hb XY

ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS	Resultado	Limites
Hematócrito	XXX %	(35.0-60.0)
Hemoglobina	XXX g/dL	(11.0-18.0)
VCM	XXX fl	(80.0-99.9)
HCM	XXX pg	(27.0-31.0)
CHCM	XXX g/dL	(33.0-37.0)
RDW	XXX %	(11.6-13.7)

Cristina Lizott
Responsável Técnico (Imunohematologia) CRF 5267

Ficha doadores que participam do estudo de Prevalência de Hemoglobinopatias

N°

Data da coleta:

Nome:

Origem étnica:

N° da doação:

Ht %	
Hb g/dL	
VCM fL	
HCM pg	
CHCM g/dL	
RDW %	
Hb A ₂ %	

Eletroforese em pH alcalino

Tampão tris-borato

Eletroforese em pH ácido

Tampão citrato



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

141

GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
SAÚDE CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

As Comissões Científicas e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que integram o Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação em Saúde Científica e Comissão de Pesquisa Ética em Saúde, aprovaram o seguinte:

Número: 00.029

Título: **VIAGEM DE ADMINISTRADORES EM CASOS DE SAQUE DE NEURÓTIPO BETA EM CASOS DOUS.**

Assunto: **caso clínico de febre súbita e distúrbios de consciência.**

- O mesmo foi aprovado por uma adequada forma de consentimento, inclusive quanto ao seu termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde) e as Resoluções Normativas de COPE/HCPA, visando a que seja cumpridas todas as medidas sobre o processo de Pesquisa.

Porto Alegre, 20 de março de 2006

Prof.^a **Ilma Helena de Souza**
Coordenadora do GPPG e CERP/HCPA

