
PREVALÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA EM POPULAÇÃO COM MICROCÍTOSE COM MICROCÍTOSE E HIPOCROMIA*

MESQUITA, MM; JENDIROBA, DB; MELO-REIS, PR; SILVA, CB; DIAS-PENNA, KGB; MESQUITA, GA; DA CRUZ, AD; CHEN-CHEN, L

Resumo: a anemia ferropênica, anemia das doenças crônicas, talassemias (alfa e beta) e associações com as hemoglobinas variantes constituem importante causas de anemias microcíticas e hipocrômicas. A talassemia alfa é uma síndrome que envolve genes produtores de globina alfa e representa um grave problema de saúde global. O objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência de talassemia alfa como causa de anemia microcítica e hipocrômica, utilizando-se os métodos laboratoriais clássicos de diagnóstico.

Palavras-chave: Hemoglobinopatia. Talassemia. Microcitose. Hipocromia. Goiás.

No Brasil, anemia ferropênica, anemia das doenças crônicas, talassemias (alfa e beta) e associações com as hemoglobinas variantes constituem importante causas de anemias microcíticas e hipocrômicas (NAOUM; NAOUM, 2004). O diagnóstico laboratorial é imprescindível para o esclarecimento do tipo da anemia (WOH, 2008), pois cada uma apresenta patogênese, prognóstico e tratamento diferentes (MATOS *et al.*, 2008).

Particularmente, a talassemia alfa é uma síndrome que envolve genes produtores de globina alfa e representa um grave problema de saúde global (DIAS-PENNA *et al.*, 2010), pois é a mais comum das desordens genéticas da hemoglobina no mundo (BERNARD *et al.*, 2000) e atinge cerca 10% da

população do Estado de Goiás. Em outras regiões do País, este número poder alcançar até 20% da população. A alta frequência e a diversidade de portadores na população brasileira se devem às diferenças na composição étnica das diferentes regiões e à intensa miscigenação entre as etnias ocorrida ao longo da história do Brasil (MELO-REIS *et al.*, 2006A). As talassemias apresentam ampla distribuição mundial. A frequência de talassemia beta é maior na Europa, em especial na Itália, sendo a causa mais frequente de anemia microcítica e hipocrômica. Um detalhe relevante é que a incidência de talassemia beta só é menor que a incidência da anemia ferropriva. Em outras partes do mundo, Ásia e África, é alta a prevalência de talassemia alfa e hemoglobinas variantes (BONINI-DOMINGOS, 2003; NAOUM, 1999).

A talassemia alfa envolve dois genes: HBA1 e HBA2, que são cópias não- alélicas, naturalmente duplicadas e funcionais, que compõem o agrupamento dos genes da hemoglobina localizado em 16p. A doença é geralmente herdada como herança mendeliana autossômica recessiva. Os loci alfa e beta determinam a estrutura de dois polipeptídios que compõem a estrutura tetramérica da hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$) do adulto. A severidade da condição é diretamente ligada a quantidade de genes normais (3, 2, 1 ou nenhum) resulta em 4 síndromes diferentes para a talassemia alfa.

Morfologicamente, as talassemias são classificadas como anemias microcíticas e hipocrômicas. Os valores dos índices hematimétricos dessas anomalias, principalmente o VCM e HCM, apresentam-se diminuídos. O red cell distribution width (RDW) também se apresenta alterado, indicando intensa anisocitose, que é definida como sendo a variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos (SILVA; HASHIMOTO, 1999). Esse índice se deve a evolução tecnológica ocorrida nas metodologias laboratoriais para a quantificação da variação das medidas das hemácias (FAILACE, 1995; NAOUM, 1997). O índice de anisocitose (RDW) é um parâmetro útil na diferenciação das anemias microcíticas e hipocrômicas. Neste aspecto, nas anemias ferropriva o RDW é alto enquanto que nas talassemias é baixo. No primeiro caso, o RDW indica heterogeneidade dos eritrócitos, enquanto no segundo homogeneidade da população eritrocitária (FAILACE, 1995; MELO *et al.*, 2002; MELO-REIS, 2006B).

Apesar das formas graves das talassemias serem diagnosticadas facilmente, formas mais leves podem ser interpretadas e tratadas como anemia ferropriva. No entanto, as talassemias não respondem ao tratamento medicamentoso devido sua etiologia (PEARSON *et al.*, 1973; CUNNINGHAM, RISING, 1977). O objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência de talassemia alfa como causa de anemia microcítica e hipocrômica, utilizando-se os métodos laboratoriais clássicos de diagnóstico.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de sangue utilizadas para a realização deste estudo foram colhidas em conformidade com as diretrizes apontadas na Resolução no 196/1998-CONEP do Conselho Nacional de Saúde. A doação consensual e voluntária foi precedida da assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido pelos participantes. A proposta do estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Santa

Casa de Misericórdia de Goiânia. Foram excluídos do estudo, todos os casos que possuíam conhecimento prévio da sua condição genética de heterozigoto ou de homozigoto para as hemoglobinopatias.

No período de maio de 2005 a agosto de 2006 foram avaliadas 1084 amostras de sangue, de pacientes que procuraram o serviço de apoio ao diagnóstico oferecido pelo Laboratório de Estudo e Pesquisa de Anemias Hereditárias Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum (LEPAH), do Departamento de Biomedicina da Pontifícia Universidade Católica de Goiás para realização de exames.

As amostras sanguíneas foram obtidas mediante a punção venosa periférica dos participantes. As amostras foram coletadas diretamente em tubo a vácuo contendo 10 g/dl de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) como anticoagulante. Cada amostra foi identificada, recebendo o número de registro, iniciais do nome, idade e data de coleta em cada tubo. Todas as amostras foram analisadas e estudadas LEPAH. Os métodos laboratoriais empregados no presente estudo foram:

Eritrograma: Contagem de células realizada eletronicamente em contador hematólogo (ABX Pentra 60®, Montpellier, França). No exame, foram determinados número de hemácias, dosagem de hemoglobina, valor do hematócrito, índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina celular média (HCM), concentração da hemoglobina celular média (CHCM) e anisocitose (RDW). Os resultados da hematimetria associados à análise visual da morfologia eritrocitária são importantes para compor as informações técnicas necessárias para se chegar ao diagnóstico laboratorial das anemias microcíticas e hipocrômicas (NAOUM, 1997).

A identificação de beta talassemia menor foi realizada por eletroforese de hemoglobina em pH alcalino. As dosagens de A2 por cromatografia de coluna foram confirmadas por HPLC, que permitiu estimar a distribuição percentual das hemoglobinas A, A2 e fetal. Além dessas metodologias, foram também confeccionados esfregaços italianos, para a observação da poiquilocitose sugestiva de beta talassemia. Posteriormente, esfregaços sanguíneos corados pelos corantes habituais (azul de metileno e eosina) da hematologia laboratorial para confirmação das alterações da morfologia, tamanho e cor das hemácias de cada um dos indivíduos deste trabalho.

Todos os dados obtidos dos procedimentos acima descritos foram, primeiramente, anotados na ficha de resultados. Posteriormente, transcritos para uma planilha de cálculo do Excel®2007 (Microsoft Corporation, EUA) para a análise estatística descritiva, teste de Tukey e ANOVA. Para as inferências estatísticas, estabeleceu-se um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

Do total de 1084 amostras de sangue periférico recebidas no LAPAH para diagnóstico hematológico, 224 (20,7%) atenderam ao critério de inclusão no estudo, pois se apresentaram com anemia microcítica e hipocromica. Da população estudada, 135 (60,3%) eram do sexo feminino e 89 (39,7%), do sexo masculino. Os resultados obtidos das análises para identificação de hemoglobinas variantes estão contidos Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos perfis hemoglobínicos observados em 224 casos de anemia microcítica e hipocrômica, atendidos no LAPAH/PUC Goiás de maio de 2005 a agosto de 2006, por sexo

Perfil eletroforético	Mulheres	F(%) ¹	Homens	F(%)	Total	F(%)
AA	67	29,9	56	25,0	123	54,9
AH (talassemia alfa)	27	12,1	15	6,7	42	18,8
AA com A ₂ diminuída	24	10,8	7	3,1	31	13,8
AA com A ₂ aumentada	6	2,7	4	1,8	10	4,5
ASH (talassemia alfa/HbS)	5	2,2	4	1,8	9	4,0
ACH (talassemia alfa/HbC)	2	0,9	1	0,4	3	1,3
AS	3	1,3	2	0,9	5	2,2
AC	1	0,4	0	0,0	1	0,4
Total	135	60,3	89	39,7	224	100,0

Legenda: ¹Frequência percentual.

Anemia hereditária foi diagnosticada em 70 pacientes, perfazendo 31,3% dos casos. A talassemia alfa (Hb AH) foi a alteração hemoglobínica mais prevalente, encontrada em 42 indivíduos (18,8%), e sua identificação laboratorial foi realizada por meio de eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose em pH alcalino e comprovada pela pesquisa intra-eritrocitária de agregados de Hemoglobina H (NAOUM, 1999). A segunda alteração mais prevalente foi a diminuição da fração A₂ em 31 indivíduos (13,80%), especialmente observada nas mulheres do presente grupo de estudo.

Os resultados do teste de análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação múltipla de Tukey encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Distribuição percentual por sexo dos perfis hemoglobínicos, valores de VCM e de RDW encontrados nos 224 casos de anemia microcítica e hipocrômica diagnosticados no LAPAH/PUC Goiás, no período de maio de 2005 a agosto de 2006

Perfil eletroforético	VCM MÉDIO			RDW MÉDIO			Total
	Mulheres	Homens	p	Mulheres	Homens	p	
AA	75,0	76,2	0,14	15,3	15,1	0,43	123
AH (talassemia alfa)	73,8	74,4	0,46	15,8	16,1	0,87	42
AA com A ₂ diminuída	71,0	73,2	0,01	16,2	16,6	0,72	31
AA com A ₂ aumentada	66,4	68,1	0,20	11,3	11,5	0,91	10
ASH (talassemia alfa/HbS)	75,6	78,2	0,25	14,9	14,5	0,98	9
ACH (talassemia alfa/HbC)	77,3	79,1	0,34	15,2	14,9	0,74	3
AS	74,2	76,5	0,10	12,4	13,0	0,92	5
ACH	73,3	-	-	0,1	-	-	1
Total							224

Foram comparados o VCM, o sexo dos indivíduos e as alterações no perfil hemoglobínico. Não houve diferença ($p>0,05$) entre os valores do VCM para indivíduos com alfa talassemia, o mesmo foi constatado em relação a distribuição do sexo dos indivíduos. Para os perfis, também não houve diferença quanto comparados VCM e RDW médio para os dois grupos, de acordo com perfil eletroforético. Comparando-se o valor médio do RDW para os grupos de acordo com o perfil eletroforético, não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$).

DISCUSSÃO

A anemia microcítica e hipocrômica constitui um problema de saúde pública atingindo cerca de 30% da população do mundo (WHO, 2008). A causa mais comum para este tipo de anemia é a deficiência de ferro na dieta. Entretanto, outras causas como a ocorrência de anemias hereditárias que cursam com microcitose e hipocromia também contribuem para agravar este problema de saúde. No Brasil, a grande heterogeneidade genética caracterizada pela intensa miscigenação racial da população contribui para elevar a incidência das anemias hereditárias (CASTRO et al., 2008). Por isso, é necessário na abordagem ambulatorial dos portadores de microcitose e hipocromia com ou sem anemia sejam relacionados com a diversidade étnica de cada região. Adicionalmente, O diagnóstico laboratorial correto e preciso das diferentes etiologias das anemias é importante para o indivíduo e sua família, pois evita que os pacientes sejam submetidos a tratamentos desnecessários e possibilita a orientação adequada das famílias acerca dos riscos relativos da doença e o aconselhamento genético adequado para as anemias hereditárias.

De fato, as anemias microcíticas e hipocrômicas com implicações hereditárias são importantes no sentido de se obter conhecimentos relativos à antropologia e movimentos migratórios das populações, bem como, contribuições para a saúde pública e para as políticas públicas de saúde. Em estudos realizados previamente indicaram uma prevalência de anemias hereditárias de cerca de 10% na população de Goiás (MELO-REIS et al., 2006b; CASTRO et al., 2008). No presente estudo, a prevalência de anemias hereditárias em coorte populacional com anemia microcítica e hipocrômica foi de 36,6%. Os dados sugerem que as anemias hereditárias representam cerca de um terço das anemias microcíticas e hipocrômicas em Goiás, sendo que a talassemia alfa correspondeu a 47,5% do diagnóstico. A distribuição das anemias hereditárias em Goiás refletiu a formação étnica e genética do povo brasileiro, caracterizada pela intensa miscigenação de populações européias, africanas e asiáticas. A alfa talassemia é freqüente nas populações asiáticas e africanas, enquanto que a beta talassemia é prevalente na população italiana.

Por outro lado, a prevalência observada de talassemia alfa foi de 17,4%. Os resultados do presente estudo contribuem para validar a importância de se levar em consideração a composição étnica os fatores nutricionais dos pacientes para se promover o diagnóstico adequado da talassemia alfa. As sutis diferenças entre os dados regionais no Brasil reforçam a importância das variações populacionais regionais, em consonância com as orientações de Naoum (1997), que registrou uma prevalência próxima a 25% de talassemia alfa em brasileiro afro- descendentes.

Outro dado relevante foi o encontro de 4,5% em indivíduos com perfil eletroforético AA e com dosagem de hemoglobina A2 aumentada e média do RDW aproximada de 11%. Nesse caso, a homogeneidade da população eritrocitária, caracterizando a beta talassemia menor. Esses dados, segundo Melo-Reis et al. (2006), reforçam a contribuição antropológica de italianos e dos povos da Península Ibérica e Mediterrâneo na constituição genética da população de Goiás.

Foi constatada também valores da hemoglobina A2 menor que 2% em 14% da população estudada. Esses dados sugerem anemia carencial, especialmente a ferropênica. Os resultados deste destacam que cerca de 1,4:10 casos de anemia microcítica e hipocrômica em Goiás ocorre devido as carências nutricionais da população. A anemia ferropriva representa, provavelmente, o problema nutricional mais importante da população brasileira, com severas consequências econômicas e sociais. Estes dados podem servir para orientar as políticas públicas municipais que visam a redução dos agravos à saúde humana causados pela deficiência nutricional e para a promoção da fortificação dos alimentos como controle da anemia ferropriva. As anemias carenciais resultam em custo adicional aos recursos do Ministério da Saúde brasileiro em termos de tratamentos e perdas de produtividade e de dias de trabalho, além de ser a causa subjacente à grande parte dos baixos rendimentos escolares, no território nacional.

Não era esperado encontrar na população estudada, indivíduos heterozigotos para a hemoglobina S (Hb AS). Entretanto, três (2,3%) e um (0,5%) apresentaram heterozigose para a hemoglobina S (Hb AS) e para hemoglobina C (Hb AC). Estes indivíduos apresentaram idade média de 58,5 anos. A ocorrência concomitante de ferropenia sugere uma relação com a doença crônica nestes pacientes.

No questionário respondido pelo indivíduo do estudo, 90% deles tinham recebido tratamento para a anemia com ferro e vitaminas por mais de uma vez. Entretanto, como era de se esperar, não apresentaram melhora. Já 30% dos indivíduos que apresentaram microcitose e hipocromia, e perfil eletroforético AA, receberam tratamento medicamentoso e melhoram a anemia, e alguns voltaram a ter anemia, sugerindo relação com situações de perda crônica de sangue ou carência alimentar.

O VCM diminuído nos indivíduos heterozigotos para as HbS e Hb C é justificado pela associação destas hemoglobina com a Hb H. Para detecção dessas associações foram realizadas além das eletroforeses alcalina e ácida, a pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H, teste de falcização e HPLC. A associação dos heterozigotos com Hb H resultou na observação de em uma população eritrocitária heterogênea.

THALASSAEMIA ALPHA PREVALENCE IN POPULATION WITH HYPOCHROMIC AND MICROCYTIC

Abstract: iron deficiency anemia, anemia of chronic disease, thalassemia (alpha and beta), and associations with hemoglobin variants are important causes of microcytic and hypochromic anemias. Alpha thalassemia is a syndrome that involves producing alpha globin genes and represents a serious global health problem. The aim of this study was to determine the prevalence of thalassemia as a cause of microcytic and hypochromic anemia, using the classical diagnostic laboratory methods.

Keywords: *Hemoglobinopathies. Thalassemia. Microcytosis. Hypochromia. Goiás.*

Referências

- BERNARD, J., J. P. LÉVY, B. VARET. J. P. CLAUVEL. J. D. RAIN & Y. SULTAN. 2000. Hematologia. 9^a Ed. Medsi. Rio de Janeiro, RJ. 368 p.
- BONINI-DOMINGOS, C. R., BONINI-DOMINGOS, A. C., CHINELATO, A. R., ZAMARO, P. J. A. & CALDERAN, P. H. O. 2003. Interação entre Hb C [$\beta 6(A3) \text{Glu} \rightarrow \text{Lys}$] e IVS II-654 (C>T) beta-talassemis no Brasil. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 25 (2): 115-121.
- CASTRO, F.S., SILVA, N. A., MELO-REIS, P.R., DIAS-PENNA, K.G.B., SILVA, C. B., BRANDÃO, N.A.A. et al . 2008. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 30(1) 24-28
- CUNNINGHAM L.O., RISING, J.A. 1977. Erythrocytic microcytosis: clinical implications in 100 patients. Am J Med Sci, 273:149-55.
- DALAND, G. A.; CASTLE, W.B. 1948. A simple and rapid method for demonstrating sickling of the red blood cells: the use of reducing agents. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, v. 33, p. 1082-8.
- DIAS-PENNA, KG, MELO-REIS, PR, MESQUITA, MM, SILVA, JB, BATUAS, LAM. 2010. Dificuldades na identificação laboratorial da talassemia alfa. J J. Bras. Patol. Med. Lab., 46 (2).
- FAILACE, R. Hemograma. Manual de Interpretação. 1995. Artes médicas. 3^a ed. Porto Alegre-RS. 198 p.
- MATOS, JF.; DUSSE, LMS.; STUBBERT; RVC.; LAGES; GFG.; E CARVALHO, MG. 2008. Índice de anisocitose eritrocitária (RDW): diferenciação das anemias microcíticas e hipocrômicas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter..30(2), 120-123.
- MELO, M. R.; PURINI, M. A. Et. al., 2002. Uso de índices hematimétricos no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas: uma abordagem a ser adotada?. Rev. Assoc. Med. Bras, 48(3):222-224
- MELO-REIS, P. R. ARAÚJO, L. M. M et. al. 2006A. A importância do diagnóstico precoce na prevenção das anemias hereditárias. Rev. bras. hematol. hemoter., 28(2): 149-152.
- MELO-REIS, PR, NAOUM, PC, DINIZ-FILHO, JAF, DIAS-PENNA, KGB, MESQUITA, MM, BALESTRA, FA et al . 2006B. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes no estado de Goiás, Brasil. J. Bras. Patol. Med. Lab., Rio de Janeiro, 42 (6).
- NAOUM, P. C. 1997. Hemoglobinopatias e Talassemias. Sarvier Ed. Livros Médicos. São Paulo, SP. 171 p.
- NAOUM, P. C. Eletroforese, técnicas e diagnósticos. 1999. 2. ed. São Paulo: Santos. NAOUM, P. C. & NAOUM, F. A. 2004 – Doença das Células Falciformes. Sarvier – São Paulo-SP. 224 p.
- SIQUEIRA, A. M. F., A. C. FETT-CONTE, L. N. B. BORIN & C. R. BONINI-DOMINGOS. 2002. Diagnóstico de hemoglobinopatias em recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto –SP. Revista Bras. hematol. hemoter., 24 (4):302-05
- SUB, D. D. et al. 1996. Influence of Hemoglobin S Adducts on Hemoglobin A2 quantification by HPLC. Clinical Chemistry 42(7): 1113-1114.
- TIMMANN, C., MOENKEMEYER, F., EVANS, J. A., FOERSTER, B., TANNICH, E., HAASE, S., SIEVERTSEN, J., KOHNE, E., HORSTMAN, R. D. 2005. Diagnosis of - Thalassemias by Determining the Ratio of the Two α -Globin Gene Copies by Oligonucleotide Hybridization and Melting Curve Analysis. Clin Chem 51:1711.
- WHO - World Health Organization. 2008. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia / Edited by Bruno de Benoist, Erin McLean, Ines Egli and Mary Cogswell. Acessado em 20/01/2010. Disponível em:http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/9789241596657/en/index.html

* Recebido em: 02.03.2012.
Aprovado em: 12.03.2012.

MAURO MEIRA DE MESQUITA
Laboratório de Estudos e Pesquisa de Anemias Hereditárias Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum (LEPAH).

DAVID BARQUETI JENDIROBA
LEPAH.

PAULO ROBERTO DE MELO REIS
LEPAH.

CLAUDIO B. SILVA
LEPAH.

KARLLA GREICK BATISTA DIAS PENNA
EPAH.

MESQUITA, GA
LEPAH.

APARECIDO DIVINO DA CRUZ
Núcleo de Pesquisas Replicon, Departamento de Biologia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

LEE CHEN CHEN
Laboratório de Radiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Goiás.