UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

ESTUDO DE PREVALÊNCIA DE HEMOGLOBINOPATIAS NA CIDADE DE BOM JARDIM DE GOIÁS

MESTRANDO EM BIOLOGIA
Menandes Alves de Souza Neto

ORIENTADOR:
Prof. Dr.Luiz Artur Mendes Bataus
Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Goiás

Goiânia
Setembro de 2007

DEDICATÓRIA

Aos meus avôs, pais, irmãos, esposa e filha.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Goiás, especialmente ao meu orientador prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus e colegas do Laboratório de bioquímica e engenharia genética.

À Universidade Católica de Goiás em especial à professora Ms. Karla Greike Batista Dias Pena e a toda equipe do LEPAH.

À Fundação de Ensino Superior de Rio Verde.

A toda equipe do Laboratório Jardim América, especialmente meu tio Dr. Amado Barbosa de Jesus.

Às minhas estagiárias Jaqueline Barbosa e Ana Lucia Munaro.

À Prefeitura Municipal de Bom Jardim de Goiás e aos funcionários do PETI.

A todas as crianças e famílias envolvidas na realização deste trabalho.

RESUMO

As hemoglobinopatias formam um grupo de patologias de origem genética associadas à síntese da molécula de hemoglobina. Durante a síntese da hemoglobina pode ocorrer a substituição de um aminoácido, o que resultará em uma hemoglobina variante. Outras alterações podem ocorrer em relação à expressão de um dos genes globina, tendo como conseqüência uma ausência ou uma produção insuficiente de uma das globinas. Estas últimas são chamadas de Talassemias. As hemoglobinopatias apresentam freqüências muito diversificadas, e normalmente estão relacionadas com a distribuição étnica da população. Nesse trabalho foram avaliadas 195 crianças participantes do Programa de Erradicação do Trabalho Infantil na cidade de Bom Jardim de Goiás. As amostras foram submetidas à análise do perfil eritrocitário, dosagem de ferro sérico, eletroforese alcalina em acetato de celulose, análise por HPLC e pesquisa de corpúsculos de hemoglobina H. Das 195 amostras analisadas, 17 crianças apresentaram concentração hemoglobina total menor que a concentração considerada como normal essas crianças foram classificadas como anêmicas. Com relação aos outros índices hematimétricos avaliados, VCM 14%, HCM 23%, RDW 19% e concentração de ferro sérico 16% apresentaram alterações. A análise do eritrograma não permite tirar conclusões sobre as possíveis anemias. Assim as amostras foram submetidas à avaliação por eletroforese alcalina em acetato de celulose. Das 195 crianças, 184 (94,35 %) apresentaram o perfil eletroforético normal (AA) e 11 (5,65 %) apresentaram hemoglobinas variantes. Dente as amostras que apresentaram perfil alterado, observou-se que 10 (5,14 %) eram portadoras de traço falciforme, hemoglobina S e apenas 1 (0,51%) apresentou hemoglobina C. Os resultados da eletroforese alcalina foram confirmados por utilizando avaliação por HPLC. Visando saber qual dos genitores era portador e se eram homozigotos ou heterozigotos para esse caráter, amostras de sangue de alguns pais foram colhidas e avaliadas por eletroforese alcalina e por HPLC. Dos pais que se submeteram à avaliação, apenas um dos genitores era heterozigoto. A grande incidência encontrada sugere que existe a necessidade de se realizar outros estudos, amostrando um número maior de crianças da Cidade de Bom Jardim de Goiás, de tal forma se ter um dado preciso sobre a incidência e os tipos de hemoglobinopatias prevalentes na cidade. A introdução da pesquisa por eletroforese alcalina como rotina no laboratório municipal seria de grande ajuda para auxiliar na prescrição de tratamentos adequados aos pacientes portadores de hemoglobinopatias.

ABSTRACT

The hemoglobinopathies are forming a group of diseases of genetic origin associated with the synthesis of hemoglobin molecule. During the synthesis of hemoglobin may be the replacement of one amino acid, which would result in a hemoglobin variant. Other changes may occur in relation to an expression of genes globin, with the result an absence or insufficient production of one of globins. The latter are called Talassemias. The hemoglobinopathies have very different frequencies, and usually are related to the ethnic distribution of the population. In this work were evaluated 195 children participating in the Program for the Eradication of Child Labor in the city of Bom Jardim of Goiás. The samples were submitted to the analysis of the profile eritrocitário, dosage of serum iron, electrophoresis in alkaline cellulose acetate, analysis by HPLC and search for corpúsculos of hemoglobin H. Of the 195 samples tested, 17 children had total hemoglobin concentration lower than the concentration seen as normal, these children were classified as anemic. On the other indexes evaluated, VCM 14%, HCM 23%, RDW 19% and concentration of serum iron 16% showed changes. The analysis of eritrocit group does not draw conclusions on the possible anemias. Once the samples were submitted for evaluation by electrophoresis in alkaline cellulose acetate. Of the 195 children, 184 (94.35%) had the profile eletrophoretic normal (AA) and 11 (5.65%) had hemoglobin variants. Tooth samples that had changed profile, it was observed that 10 (5.14%) were carriers of trace sickle cell, hemoglobin S and only 1 (0.51%) presented hemoglobin C. The results of electrophoresis alkaline were confirmed by using assessment by HPLC. To know which of the parents was carrying and whether heterozygotes were homozigotos or for that character, samples of blood from some parents were collected and evaluated by electrophoresis alkaline and by HPLC. Of the parents who submitted the assessment, only one of the parents was heterozygote. The large incidence found suggests that there is a need to conduct further studies, showing a greater number of children of the City of Bom Jardim de Goiás, so has a particular need on the incidence and types of hemoglobinopathies prevalent in the city. The introduction of search by electrophoresis alkaline as routine in the laboratory hall would be of great help to assist in the provision of appropriate treatment for patients with hemoglobinopathies.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Estrutura terciária da cadeia β da hemoglobina A. As cadeias de aminoácidos em segmentos espiralados ou helicoidais estão unidas por curtos segmentos não helicoidais. 13

FIGURA 2 Representação esquemática mostrando a organização dos genes de globina do cromossomo 16. 14

FIGURA 3 Representação esquemática mostrando a organização dos genes de globina do cromossomo 11. 14

FIGURA 4 Esquema representativo dos sítios onde ocorrem deleção nos genes α2 e α1 e junção dos fragmentos intermediários formando um único gene. 17

FIGURA 5 Mobilidade eletroforética de hemoglobinas em acetato de celulose. 26

FIGURA 6 Gráfico apresentando os percentuais de crianças com valores normais e anormais da hemoglobina total, onde observamos em azul (8%) o percentual de crianças com valores abaixo da referência e em grená o percentual de crianças com valores normais (92%). 33

FIGURA 7 Gráfico que apresenta o número de crianças com valores normais e anormais do VCM, onde em azul (14%) temos o percentual de crianças com valores abaixo da referência e em grená observamos o percentual de crianças consideradas normais em relação ao VCM (86%). 34

FIGURA 8 Gráfico que apresenta o percentual de crianças com alteração no HCM, em azul observamos o percentual de crianças com valores abaixo da referência (23%), e em grená observamos o percentual de crianças consideradas normais em relação ao HCM (77%). 34

FIGURA 9 Gráfico que apresenta o número de crianças com alterações em relação ao RDW, onde observamos em azul a porcentagem de crianças com valores alterados em relação ao RDW (19%), e em grená o percentual de crianças consideradas normais (81%). 35

FIGURA 10 Gráfico que apresenta o número de crianças com valores normais em azul (79%), em amarelo observamos os valores acima do de referência (5%) e em grená o percentual abaixo do valor de referência (16%). 36

FIGURA 11 Padrão eletroforético das hemoglobinas de algumas amostras analisadas e um perfil de hemoglobina AC utilizada como controle. 36

FIGURA 12 Cromatograma obtido por analise por HPLC das amostras dos pacientes números 8 e 43. Onde podemos observar os índices de retenção para cada fração hemoglobínica. 37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Valores de referência adotados no trabalho.	23
TABELA 2	Eritrograma e dosagem de ferro sérico das 195 amostras.	28
TABELA 3	Perfil eletroforético das amostras contendo hemoglobinas variantes, detectadas por eletroforese alcalina em acetato de celulose.	37
TABELA 4	Caracterização quantitativa e qualitativa das hemoglobinas presentes nas amostras com perfil eletroforético alterado.	38
TABELA 5	Caracterização quantitativa e qualitativa das hemoglobinas presentes nas amostras com perfil eletroforético alterado.	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Hemoglobina A adulto com perfil eletroforético normal

AC – Hemoglobina C com perfil eletroforético de traço para hemoglobina C

AS – Hemoglobina S com perfil eletroforético de traço falciforme

CHCM – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

EDTA – Ácido Di-etileno Tetracético

Hb – Hemoglobina total

Hb F – Hemoglobina fetal

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

mL – Mililitros

nm – Nanômetros

OMS – Organização mundial de saúde

PETI – Programa de Erradicação do Trabalho Infantil

RDW – Índice de Anisocitose

TEB – Tampão Tris- EDTA-borato

VCM – Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
1.1 Hemoglobina 12
1.2 Estrutura dos genes da globina 13
1.3 Hemoglobinas Variantes 14
1.3.1 Hemoglobina S 15
1.3.2 Hemoglobina C 15
1.4 Talassemias 16
1.4.1 Alfa Talassemia 16
1.4.1.1 Tipos de talassemia α: 17
1.5 Beta talassemias 18
1.6 Aspectos clínicos 19
1.6.1 Tipos de beta talassemia: 19
1.7 Hemoglobinopatias mistas 20
2 JUSTIFICATIVA 21
3 OBJETIVOS 22
3.1 Objetivo geral 22
3.2 Objetivos Específicos 22
4 MATERIAIS E MÉTODOS 23
4.1 Amostragem e coleta de material 23
4.2 Eritrograma e análise da morfologia eritrocitária (LEWIS; BAIN; BATES, 2006) 23
4.3 Realização da dosagem de ferro sérico 24
4.4 Preparo de hemolisados 24
4.5 Eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino (Marengo-Rowe, 1965) 25
4.6 Pesquisa de Corpúsculos de Heinz e agregados de hemoglobina H (Payannopoulos & Stamatayannopoulos, 1974) 26
4.7 Análise de hemoglobina por HPLC 27
5 RESULTADOS 28
5.1 Caracterização dos índices hematimétricos e dosagem de ferro sérico 28

5.2 Dosagem de hemoglobina total 33
5.3 Análise do volume corpuscular médio 33
5.4 Dosagem de hemoglobina corpuscular média 34
5.5 Concentração da hemoglobina corpuscular média 35
5.6 Índices de anisocitose (RDW) 35
5.7 Dosagem de ferro sérico 35
5.8 Eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino 36
5.9 Análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) 37
5.10 Pesquisa de hemoglobinas variantes nos progenitores das crianças com hemoglobinas variantes 38
5.11 Pesquisa de corpúsculos de hemoglobina H 39
6 DISCUSSÃO 40
6.1 Dosagem de Hemoglobina total 40
6.2 Volume Corpuscular Médio (VCM) 41
6.3 Hemoglobina corpuscular média 41
6.4 Concentração de hemoglobina corpuscular média 42
6.5 Índice de anisocitose 42
6.6 Dosagem de ferro sérico 43
6.7 Análise global do eritrograma 43
6.8 Eletroforese alcalina em acetato de celulose 44
6.9 Análise de hemoglobinas por HPLC 45
7 CONCLUSÕES 46
8 PERSPECTIVAS 47
REFERÊNCIAS 48
ANEXOS 51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hemoglobina

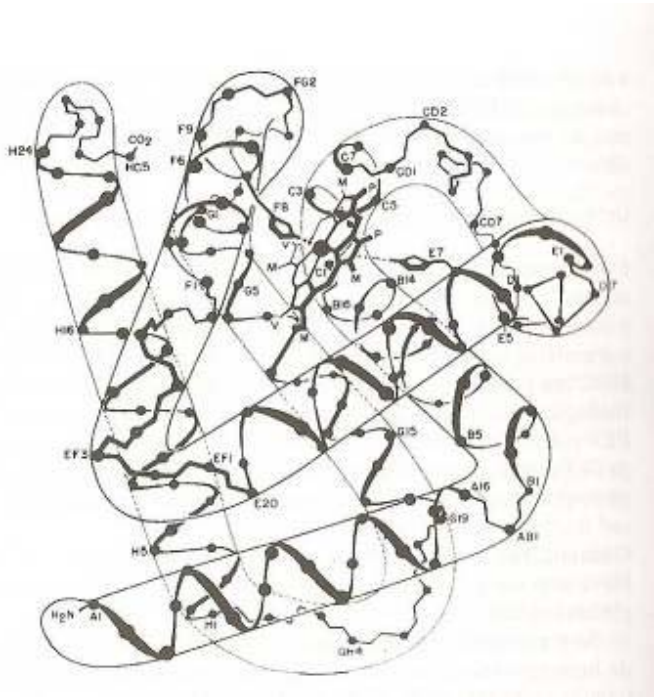
A molécula de hemoglobina é grosseiramente esférica, com um diâmetro aproximado de 5,5 nm e tem como principal papel exercer as trocas gasosas que permitirão o metabolismo dos seres vivos. É constituída de quatro subunidades, as quais estão ligadas a um grupamento heme (ferro porfirina), que é o local de captação e liberação de O_2. (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Na formação do tetrâmero da hemoglobina são encontradas 2 cadeias alfa sintetizadas pelo cromossomo 16 e duas cadeias globínicas sintetizadas pelo cromossomo 11, sendo que estas podem ser beta ou gama. O cromossomo 11 ainda é responsável pela síntese de cadeias menos comuns como as globinas δ e ε.

Nos adultos humanos normais encontramos a chamada hemoglobina A (Hb A), com percentual maior que 95%, sendo esta composta por duas cadeias α e duas cadeias β, representada por $\alpha_2\beta_2$, encontramos ainda em média de 2,5 a 3 % de hemoglobina A_2, representada por $\alpha_2\delta_2$ e encontramos ainda cerca de 1% a hemoglobina fetal (Hb F), predominante principalmente no período fetal.

Foram ainda descritos três hemoglobinas embrionárias Hb Portaland ($\zeta_2\gamma_2$), Hb Gower-1 ($\zeta_2\varepsilon_2$) e Hb Gower-2 ($\alpha_2\varepsilon_2$). Estas hemoglobinas não são encontradas após o nascimento e acredita-se que a cadeia ζ seja um análogo embrionário da cadeia α. (BURTIS; ASHWOOD, 1998).

As cadeias de globina são formadas por seqüências de 141 aminoácidos na cadeia α e 146 nas cadeias β, δ e γ. Cada cadeia contém segmentos helicoidais separados por curtos segmentos não espiralados e se enovela sobre si mesma, para formar uma fenda que ira acomodar o grupamento heme.



Fonte: Burtis e Ashwood (1998, p.686).

FIGURA 1 – Estrutura terciária da cadeia β da hemoglobina A. As cadeias de aminoácidos em segmentos espiralados ou helicoidais estão unidas por curtos segmentos não helicoidais.

O grupamento heme encontra-se ligado as cadeias globínicas através de ligações covalentes ente os átomos de ferro ao grupo imidazol da histidina proximal na posição 92 da cadeia β e na posição 87 da cadeia α. O imidazol da cadeia distal está ligado na posição 63 para cadeia β e na posição 58 na cadeia α.

1.2 Estrutura dos genes da globina

Os genes que determinam a estrutura das cadeias α e ζ são dispostos linearmente no cromossomo 16 conforme a Figura 2:

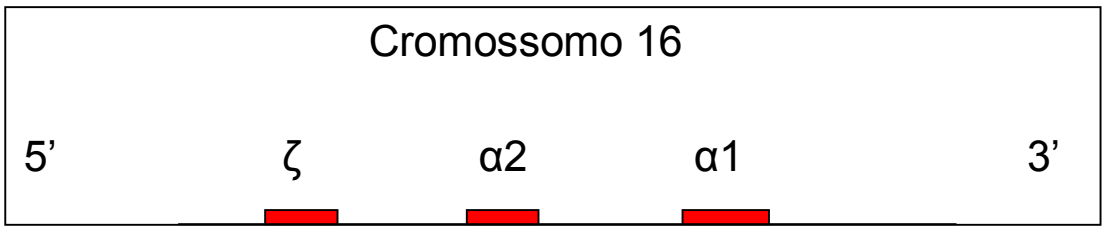


FIGURA 2 – Representação esquemática mostrando a organização dos genes de globina do cromossomo 16.

Nesta seqüência encontramos um gene embrionário ζ, um par de genes funcionais para globina α.

Na Figura 3 observamos que os genes β, γ, δ estão agrupados no cromossomo 11, numa região chamada de complexo genômico γδβ. A seqüência dos genes é:

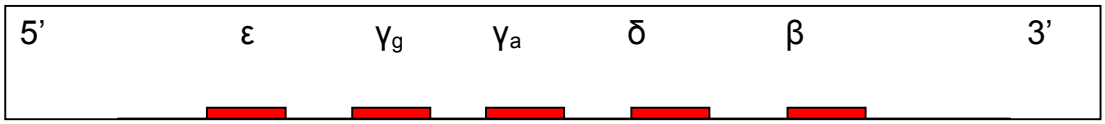


FIGURA 3 – Representação esquemática mostrando a organização dos genes de globina do cromossomo 11.

Dois genes codificam as cadeias γ o designado γ_g codifica uma alanina na posição 136 e isoleucina ou treonina na posição 75. O gene γ_a codifica glicina na posição 136 e uma isoleucina na posição 75 (LORENZI, 2006; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

1.3 Hemoglobinas Variantes

Atualmente existem mais de 900 variações na molécula de hemoglobina, segundo Huisman (1998) algumas não trazem grandes complicações e permitem aos seus portadores uma vida normal, porém existem outras situações onde os portadores destas podem apresentar inúmeras complicações e distúrbios metabólicos. Segundo a OMS existem 270 milhões de pessoas no mundo que carregam os genes que determinam à presença de hemoglobinas anormais.

Segundo Silva e Ramalho (1997) as hemoglobinopatias são as doenças genéticas de maior incidência no Brasil e no mundo. Estas alterações ocorrem em função de alterações nos genes que codificam as cadeias das globinas. Quando a alteração ocorre em um gene estrutural ocorrerá uma hemoglobina variante, quando a alteração resulta em produção deficiente de uma das cadeias, ocorre uma Talassemia. As talassemias são classificadas de acordo com a cadeia envolvida, por exemplo, quando existe comprometimento da cadeia α denomina-se de α-talassemia.

1.3.1 Hemoglobina S

Caracteriza-se por uma substituição do sexto aminoácido da cadeia beta, o acido glutâmico é substituído por uma valina. Tal substituição ocorre devido a mutação no sexto códon da cadeia beta (GAG → GTG), onde a base nitrogenada adenina (A) e substituída pela timina (T). A mudança desse aminoácido altera a carga elétrica, já que a valina é um aminoácido neutro e o acido glutâmico é um aminoácido carregado negativamente. Isso faz com que a Hb S tenha uma migração eletroforética mais lenta que a Hb A. Essa alteração permite separar essas proteínas por eletroforese em acetato de celulose (LORENZI, 2006; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

Como a hemoglobina é um tetrâmero formado por dois pares de cadeias, o indivíduo pode apresentar dois genótipos em relação à anemia falciforme. Por ser heterozigoto, ou seja, tem um gene normal e outro mutado sendo denominado de AS ou pode ser homozigoto para esse caráter, sendo denominado de SS. Quando ocorre em homozigose (SS) o indivíduo apresenta anemia falciforme e sintomas clínicos bastante graves. Quando ocorre em heterozigose (AS) o individuo é chamado de portador de traço falcêmico, sendo na maioria das vezes um portador assintomático. A gravidade da anemia falciforme varia de acordo com a região, sexo e idade do paciente.

Nos membros inferiores são observadas frequentemente, úlceras nas pernas. O paciente fora das crises, não apresenta qualquer sinal de doença ativa e sente-se geralmente confortável. Observamos que a maioria dos pacientes terá problemas relacionados a infartos em regiões de carga crítica como cabeça do fêmur podendo levar a necrose desta.

1.3.2 Hemoglobina C

É a segunda hemoglobina variante mais freqüente, ocorre pela substituição do acido glutâmico por uma lisina, essa mudança ocorre no sexto aminoácido da cadeia beta. Ocorre a substituição de um aminoácido carregado negativamente por um carregado positivamente, essa alteração faz com que a Hb C tenha uma migração eletroforética mais lenta que as Hb A e Hb S, quando analisadas por eletroforese alcalina em acetato de celulose (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

Indivíduos heterozigotos (AC) na maioria dos casos são assintomáticos, podendo apresentar em esfregaços sanguíneos hipocromia e microcitose. Indivíduos homozigotos (CC) podem apresentar anemia hemolítica acompanhada de hepatoesplenomegalia e dores ósseas e

abdominais (OLIVEIRA, 1990). Apesar de serem assintomáticos, é muito importante detectar os indivíduos heterozigotos, principalmente como forma de se prevenir a formação de indivíduos homozigotos.

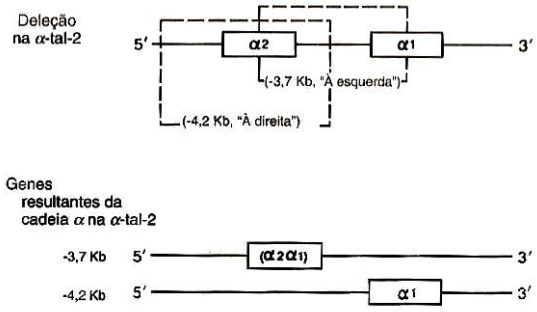
1.4 Talassemias

O termo talassemia surgiu para designar uma anemia predominante no mediterrâneo, deriva do grego talassos que significa oceano. Constituem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias autossômicas recessivas caracterizadas pela deficiência total ou parcial da síntese das cadeias α (alfa talassemia) ou β (beta talassemia). Devido à ausência total ou parcial de uma das cadeias ocorrerá a formação de aglomerados das cadeias não pareadas nas células eritróides levando a formação de precipitados intracelulares e a uma destruição precoce destes eritrócitos pelo sistema mononuclear fagocitário (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

1.4.1 Alfa Talassemia

A alfa talassemia parece ser o distúrbio genético mais comum dos seres humanos. Aproximadamente 30 % dos negros norteamericanos apresentam alfa talassemia, a prevalência elevada também e encontrada em povos do sudeste asiático e ainda em povos de descendência mediterrânica com percentual um pouco menor, aproximadamente 20 %. As expressões clínicas variam de assintomáticos (nos casos menos graves) até casos incompatíveis com a vida.

A maioria das alfa talassemias é resultado da deleção de um gene de globina alfa. A forma mais branda de alfa talassemia ocorre quando há deleção de apenas um gene é chamada de α-2, uma condição inofensiva em adultos e geralmente sem expressão clínica e hematológica. No caso mais comum ocorre numa deleção em uma porção do gene α2 e uma porção do gene α1, com a união dos nucleotídeos intermediários. Conforme a Figura 4:



Fonte: Burtis e Ashwood (1998, p.689).

FIGURA 4 – Esquema representativo dos sítios onde ocorrem deleção nos genes α2 e α1 e junção dos fragmentos intermediários formando um único gene.

Os dois genes podem ser deletados no mesmo cromossomo ou cada um dos genes pode estar presente em um cromossomo diferente. A homozigose para cromossomo duplamente deletado da talassemia α-1 resulta da incapacidade do feto produzir qualquer hemoglobina, exceto as hemoglobinas fetais. Outro grupo interessante de alfa talassemia ocorre quando há uma mutação códon de parada da tradução. Nessa mutação o códon de parada é mutado para outro códon e a tradução continua ocorrendo, havendo uma extensão do comprimento do peptídeo de 141 para 172 aminoácidos. A mais comum destas é a hemoglobina *Constant spring*.

A deleção de um dos pares dos genes alfa globínicos (α -/αα) causa a Talassemia α +, enquanto a deleção de ambos os pares (--/αα) resultam na grave Talassemia α °. Na talassemia α há formação de cadeia 4 (Hemoglobina de Bart) que é o correspondente embrionário da Hemoglobina H, pela falta de produção de cadeia α. Se a formação desses agrupamentos de cadeias γ 4 for excessivo haverá incompatibilidade com a vida. Essa é a forma MAJOR de talassemia α (α °), hidropsia fetal. Após os 4 meses de vida quando haveria a troca da Hb F pela Hb A, na falta de cadeias α as cadeias β formam o tetrâmero β 4 que se precipitam na membrana da hemácia levando à destruição das mesmas (anemia hemolítica).

1.4.1.1 Tipos de talassemia α:

Portador assintomático:

Normalmente essa patologia está associada a deleção de um gene α. Não existem manifestações hematológicas, as hemácias são normocíticas, as Hb A2 e HbF apresentam concentrações normais. Há uma leve diminuição da síntese de cadeias alfa, que somente é notada no período neonatal, quando pequenas proporções de Hb de Bart podem ser vista na

eletroforese alcalina em acetato de celulose, embora sua ausência não exclua a doença. Após o período neonatal, esta condição é reconhecida mais freqüentemente em pais ou mães de pacientes com Doença de hemoglobina H. As mutações, geralmente deleções que provocam esse quadro são comuns em populações do sudoeste da Ásia, ocorrendo também em negros americanos e brasileiros (BURTIS; ASHWOOD, 1998).

Traço α Talassêmico:

Caracteriza-se por uma anemia hipocrômica microcítica leve, devido à mutação ou deleção de dois dos quatro genes alfa. O nível de Hb A2 apresenta-se baixo ou na faixa inferior à da normalidade. No período neonatal, quantidades significativas de Hb de Bart são notadas (3% a 8%) e há microcitose nos eritrócitos do sangue do cordão. É muito comum em orientais, sendo prevalente no sudeste da Ásia. Cerca de 2% a3% da população negra tem este traço (BURTIS; ASHWOOD, 1998).

Doença da Hb H:

É uma patologia que apresenta quadro clínico moderadamente grave. Assemelha-se com a Talassemia β intermédia, com alterações ósseas e esplenomegalia. Ocorre principalmente em orientais e ocasionalmente em brancos. É rara em negros. A eletroforese alcalina em acetato de celulose demonstra a Hb H, correspondendo de 3 a 30% da hemoglobina total. Pode também ser visualizada em lâminas frescas de sangue periférico coradas com azul de cresil brilhante (NAOUM; NAOUM, 2004).

Hidropsia Fetal de síndrome de Hemoglobina de Bart:

Esta é forma mais grave das α Talassemias, está correlacionada com a ausência total de síntese de cadeias α. Os fetos afetados geralmente são prematuros e natimortos ou morrem logo após o nascimento. Esta síndrome ocorre principalmente em chineses, porém a migração de pessoas do sudeste da Ásia para o Brasil, parece estar relacionada ao aumento de casos na população Brasileira. Análise do sangue dessas pessoas por eletroforese alcalina em acetato de celulose revela predominância da Hb de Bart.

1.5 Beta talassemias

Nas beta talassemias há um decréscimo, ou ausência, de produção de cadeias beta. Ao contrário da anemia falciforme, não há qualquer alteração na estrutura primária da cadeia. Ao que tudo indica, uma serie de defeitos genéticos são responsáveis por diminuir a expressão de cadeias beta.

Todos os genes responsáveis pela beta talassemia são alélicos ou intimamente ligados aos genes estruturais da cadeia beta. No caso de heterozigotia indicará o

comprometimento de ambos o lócus relacionado com a produção das cadeias beta (LENINGHER et al., 1995).

A) Conseqüências da síntese deficiente de cadeias beta

A primeira conseqüência observada é o decréscimo da hemoglobina A. Como mecanismo de defesa para suprir a deficiência da produção dessa hemoglobina, haverá um aumento na produção das cadeias gama e consequentemente um aumento de Hb F. Haverá também o aumento da produção das cadeias alfa no interior dos eritrócitos.

Talvez a estimulação dos genes que comandam a síntese das cadeias gama e a formação de uma quantidade apreciável de HB F, que supra parcialmente a anemia deste paciente, seja o futuro do tratamento deste tipo de patologia (LEE et al, 1998).

São conhecidos dois tipos de defeito na síntese de cadeias beta, o primeiro e denominado β°(tipo Ferrara) onde a formação de cadeias beta é nula. Já no segundo a forma β+ (tipo Sicília) há uma formação mínima de cadeias beta, mesmo no homozigoto. É o tipo mais encontrado na África e obviamente, nos afrodecendentes (OLIVEIRA, 1990).

1.6 Aspectos clínicos

1.6.1 Tipos de beta talassemia:

Talassemia beta heterozigótica (ou traço beta talassêmico, talassemia menor).

Indivíduos com um gene globina beta deletado são em geral assintomáticos e não apresentam anemia. Alguns pacientes apresentam uma discreta esplenomegalia. Na cito-morfologia do sangue periférico verifica-se anisocitose, microcitose, hipocromia, poiquilocitose e presença de células em alvo. O prognóstico normalmente é bom e não há necessidade de tratamento, sendo apenas aconselhável o estudo familiar e o aconselhamento genético (OLIVEIRA, 1990).

Talassemia beta homozigótica (ou talassemia maior ou doença de Cooley)

A anemia surge no primeiro ano de vida e é usualmente muito grave, podendo atingir cifras de até 2 g/dL de hemoglobina total. Os sintomas comuns à anemia estão sempre presentes e por vezes desencadeiam insuficiência cardíaca. O exame físico revela modificações ósseas características, com aspecto malaio devido a expansão do tecido eritropoético nos espaços paranasais e no arco do zigomático. Quase sempre há hepatoesplenomegalia. O sangue periférico revela inúmeras hemácias hipocrômicas e microcíticas, hemácias em alvo e numerosos eritroblastos, ao ponto de às vezes ser chamada

também de anemia eritroblástica.

Os pacientes muitas vezes sobrevivem com reposições transfusionais. A esplenomegalia torna-se maciça. Na infância há indicação para remoção do baço, devido a fenômenos mecânicos abdominais e o excesso de macrofagia. Com a esplenectomia, o número de eritroblastos aumenta, assim como o número de plaquetas e leucócitos. Porém a melhora é temporária, já que logo o fígado expande-se e passa a exercer a macrofagia exagerada. Geralmente o paciente tem insuficiência cardíaca em torno de 15 anos (OLIVEIRA, 1990).

Talassemia intermediária ou intermédia.

Em alguns grupos de pacientes as manifestações clinicas são menos intensas do que na talassemia maior, mas também não apresentam sinais da mesma como os portadores de traço α talassêmico. A síndrome caracteriza-se por anemia, com anisomicrocitose e achado clínico de esplenomegalia.

Estes pacientes em geral atingem 3 ou 4 décadas de vida, não necessitam a não ser em casos excepcionais, de transfusão sangüínea (OLIVEIRA, 1990).

1.7 Hemoglobinopatias mistas

Ocorre em pacientes que apresentam mais de uma alteração relacionada com os genes de cadeia globínicas. Podem ser alterações quantitativas e qualitativas.

Hb S/ beta talassemia.

Mais comum dentre as hemoglobinopatias mistas é a associação da Hb S com beta talassemia, conhecida também como doença microdrepanocítica ou de Silvestroni e Bianco (BURTIS; ASHWOOD, 1998). Os pacientes exibem fenômenos vásculos oclusivos encontrados na anemia falciforme, esplenomegalia e os aspectos dos esfregaços com hemácias hipocrômicas e afoiçadas (drepanócito). O diagnóstico só é efetuado com segurança através do estudo dos progenitores, onde um é portador da hemoglobina S e o outro da beta talassemia.

Hb S/C

Ocorre da interação entre um individuo portador de hemoglobina S e um portador de hemoglobina C. Nesta condição os níveis de hemoglobina são mais altos do que na anemia falciforme, geralmente acima de 9 mg/dL. Esta patologia apresenta altos riscos de fenômenos trombóticos. Geralmente o portador deste tipo de hemoglobinopatias apresenta bom prognostico e geralmente não necessita de tratamento (OLIVEIRA, 1990).

2 JUSTIFICATIVA

Foi observado uma grande incidência de crianças com alterações hematológicas em seus hemogramas que não respondiam ao tratamento com ferro. Suspeitou-se então de casos de hemoglobinopatias, porém não foi encontrado na bibliografia disponível nenhum dado sobre a incidência destes distúrbios na região de Bom Jardim de Goiás.

Para fazer um levantamento da prevalência de hemoglobinopatias na população dessa região do estado de Goiás, foram escolhidas crianças que participam do Programa de erradicação do trabalho infantil na cidade de Bom Jardim de Goiás, por se tratar de crianças onde foram observados inúmeros casos de anemia com características ferroprivas (microcitose e hipocromia), porém sem resposta ao tratamento com sulfato ferroso ou ferro quelato. Outro fator importante para escolha do grupo amostral é a afirmação de Naoum (1997), quanto mais precoce o diagnóstico das hemoglobinopatias for realizado, melhor e mais adequado será o acompanhamento clinico, evitando distúrbios orgânicos graves pelo acúmulo de ferro.

O levantamento de dados sobre a prevalência de hemoglobinopatias é importantíssimo para a realização de trabalhos de orientação e tratamento adequado aos portadores e familiares.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Detectar, identificar, caracterizar e determinar a incidência de hemoglobinopatias em crianças da cidade de Bom Jardim de Goiás.

3.2 Objetivos Específicos

1 - Triagem para identificar crianças com quadro de anemia pela análise do eritrograma;

2 - Dosagens da concentração de ferro sérico para triar pacientes com alterações hematológicas não associadas ao metabolismo de ferro (anemias não ferropênicas);

3 - Realizar a eletroforese alcalina em acetato de celulose para identificar possíveis hemoglobinas variantes;

4 - Realizar análise por HPLC para avaliação qualitativa e quantitativa de hemoglobinas variantes;

5 - Oferecer subsídios para um diagnóstico adequado auxiliando no tratamento dos portadores de hemoglobinopatias

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem e coleta de material

Foi realizada a colheita de sangue venoso em 195 crianças de 3 a 14 anos que participam do programa de erradicação do trabalho infantil (PETI) na cidade de Bom Jardim de Goiás, onde foram esclarecidas as dúvidas dos pais ou responsáveis e também foi assinado o termo de consentimento livre e esclarecido informado segundo as orientações da resolução 196/96 do conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, conforme protocolo número 065/2005. Foram colhidos 10 mL de sangue venoso onde 5 mL foram colocados em tubos do sistema vacuteiner (Becton e dickson) contendo EDTA e os outros 5 mL foram centrifugados para a obtenção do soro.

4.2 Eritrograma e análise da morfologia eritrocitária (LEWIS; BAIN; BATES, 2006)

Os valores obtidos no dia 19 de outubro de 2006 foram através de equipamentos automatizados (micros 60 ABX) específicos para avaliação hematológica. Os índices para os pacientes colhidos nos dias 13,14 de fevereiro de 2007 foram obtidos em equipamento ABX centra 60. Os índices observados foram obtidos através de cálculos padronizados pela O.M.S., sendo eles os seguintes; volume corpuscular médio (VCM); concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM); hemoglobina corpuscular média (HCM) e ainda foi analisado o índice de anisocitose (RDW).

TABELA 1 – Valores de referência adotados no trabalho

Valores de referência	
Hb total	> 11 g/dL
VCM	> 73 ft
HCM	> 26,5 pg
CHCM	31,5 g/dL
RDW	> 15 %
Ferro sérico	> 50 e < 150 µg/dL

(A) Volume corpuscular médio (VCM):

É o volume médio das hemácias expressos em fentolitros.

Interpretação: Estes dados variam de acordo com a idade do paciente em adultos valores abaixo de 80 ft indica microcitose e valor acima de 97 ft indica macrocitose para adultos. Já em crianças de 4 a 14 anos o valor de referência é de 73 ft, valores abaixo indicam microcitose e valores acima de 99 ft indicam macrocitose.

B) Hemoglobina Corpuscular média (HCM)

É o conteúdo médio de hemoglobina nas hemácias expresso em picogramas.

Interpretação: Valor normal: entre 26,5 e 33,5 pg.

Valor abaixo do valor de referência pode indicar microcitose, hipocromia ou ambos. Um valor alto é indicativo de macrocitose.

C) Concentração de hemoglobina corpuscular media (CHCM)

É a porcentagem de hemoglobina em 100 mL de hemácias.

Interpretação: valor normal: 31,5 a 35 g/dL

Valor abaixo da média indica hipocromia; enquanto um valor acima é encontrado apenas em casos de esferocitose marcada. Em esfregaço sangüíneo a fresco corado pela coloração panótica (Instant proov- new proov) foi analisado o tamanho, a forma e a coloração dos eritrócitos. Foi realizada também a contagem diferencial de leucócitos para avaliar a distribuição e morfologia dos glóbulos brancos.

D) Índice de anisocitose (RDW)

Indica a diferença de tamanho entre os eritrócitos, valores acima de 15 % indicam a liberação de hemácias imaturas na corrente sangüínea.

4.3 Realização da dosagem de ferro sérico

Foi realizada a dosagem de ferro sérico para o descarte de anemias ferroprivas, para a dosagem foi utilizado o kit da labtest para dosagem de ferro e o sistema automatizado da Roche diagnostics Selectra 2. Os valores de normais estão situados entre 50 e 150 μg/dL

4.4 Preparo de hemolisados

Para a realização da eletroforese alcalina em acetato de celulose afim de caracterizar as hemoglobinas qualitativamente se fez necessário à preparação de hemolisados pelos seguintes procedimentos:

Hemolisado rápido com saponina (Naoum, 1999, com modificações)

Reativo hemolisante

Saponina P A	1 g
Água destilada	q.s.p.100 mL

Procedimento:

Em placa de Kline, foi misturado um volume de sangue com um volume de reativo hemolisante, após homogeneizar com auxílio de um bastão plástico até a hemólise total da mistura. O hemolisado foi então submetido à eletroforese alcalina.

4.5 Eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino (Marengo-Rowe, 1965)

Técnica utilizada para a quantificação e qualificação das hemoglobinas normais e anormais. Devido à migração eletroforética diferenciada pela substituição de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas.

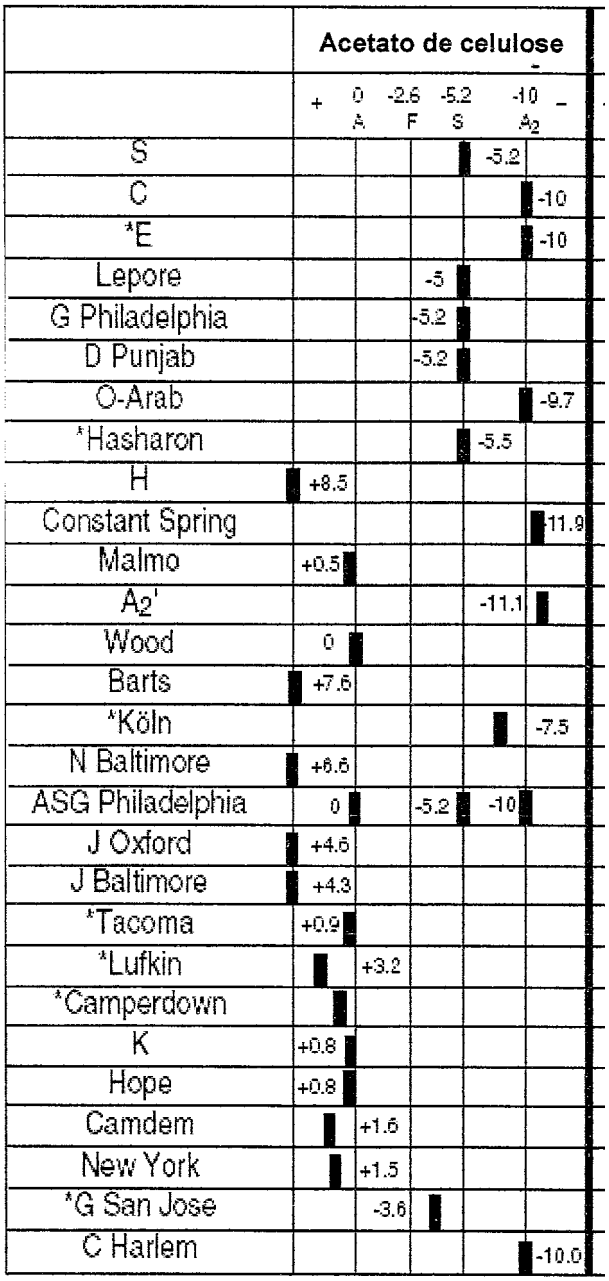
Reagentes:

Tampão tris-EDTA-borato pH 8,5 (TEB)

- Tris hidroximetilaminometano	10,2 g
- Ácido etildiaminotetracético	0,6 g
- Ácido Bórico	3,2 g
- Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Procedimento:

As fitas de acetato de celulose foram embebidas por 15 minutos em tampão TEB pH 8,5. As fitas foram secas entre duas folhas de papel toalha para retirar o excesso de solução tampão e colocadas na cuba de eletroforese. As amostras foram aplicadas na extremidade da fita no pólo negativo. A cuba foi ligada com tensão de 300 volts por 40 min. Foram analisadas as frações, devido à migração na tira de acetato, conforme a Figura 5:



Fonte: Hemoglobin... (2007).

FIGURA 5 – Mobilidade eletroforética de hemoglobinas em acetato de celulose.

4.6 Pesquisa de Corpúsculos de Heinz e agregados de hemoglobina H (Payannopoulos & Stamatayannopoulos, 1974)

Princípio: os corpúsculos de inclusão de hemoglobina H são formados por cadeias betas oriundas da desnaturação do tetrâmero da hemoglobina. Após a coloração como azul de cresil, esses corpúsculos apresentam-se dispostos homogeneamente no interior dos eritrócitos como pequenos pontos azulados.

Procedimento:

Foram colocados 50 μL de sangue total em tubo de ensaio pequeno e adicionados 100 μL de solução de azul de cresil brilhante. Após a homogeneização do tubo, o mesmo foi incubado a 37 ° C por 30 minutos. Foram confeccionados esfregaços finos e examinados ao microscópio com objetiva de imersão.

Interpretação: A presença de hemoglobina H nos eritrócitos aparece como fina granulação distribuída homogeneamente, caracterizando um portador de alfa talassemia.

4.7 Análise de hemoglobina por HPLC

Principio: Foi utilizado o equipamento Variant e kit de análise para beta talassemia heterozigota BIO-RAD. Este equipamento e respectivo software associam a HPLC à cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, onde duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição com controles de gradientes pré-programados, passam através de uma coluna analítica de alta pressão. Um fotômetro de filtro de comprimento de onda duplo (415 e 690 nm) monitora a eluição da hemoglobina na coluna, detectando as alterações de absorvância a 415 nm. O filtro secundário corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura dos tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorvância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorvância x tempo. Os dados de análises provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção, que é o tempo transcorrido ente a injeção da amostra ate o ápice do pico da hemoglobina.

Assim, cada fração de hemoglobina tem um tempo de retenção característico.

Procedimento:

Foi colocado em tubo de ensaio, 5 μL de sangue total com 1 mL de solução hemolisante fornecida pelo kit de análise. Após homogeneização ate hemólise total, a amostra foi e acondicionada em eppendorf colocada no aparelho, que realizou a analises pré-programadas.

Interpretação: A quantificação das diferentes frações de hemoglobina em uma amostra e a identificação do perfil de variantes, comparando os valores obtidos com os valores padrões de calibração.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos índices hematimétricos e dosagem de ferro sérico

As amostras de sangue contendo EDTA a 5% foram homogeneizadas e analisadas automaticamente utilizando o aparelho Micros 60 – ABX. Esse equipamento permite analisar os índices hematimétricos. Neste trabalho foram quantificados os seguintes índices: Hb, VCM, HCM, RDW. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 1. Os valores de referência considerados normais estão descritos na página 15. Os resultados discrepantes dos valores de referência encontram-se destacados na Tabela 1.

TABELA 2 – Eritrograma e dosagem de ferro sérico das 195 amostras

Número	Sexo	IDADE	Hb	VCM	RDW	HCM	CHCM	FERRO
1	M	10	13,9	84	14,3	29,7	35,2	68
2	F	7	13,3	80	14,4	27,3	34,3	68
3	F	8	11,8	84	14,7	28,9	34,4	41
4	M	11	14,9	80	14,3	27,5	34,2	58
5	M	5	11,4	74	15,1	24,7	33,5	52
6	M	7	10,9	80	14,7	27,8	34,8	48
7	M	11	12,5	78	14,6	26,9	34,4	178
8	M	9	13,2	83	13,9	28,7	34,8	87
9	M	12	13,2	80	14,2	27,8	35,0	47
10	M	10	12,3	80	15,8	27,1	34,0	154
11	M	8	10,8	86	14	29,4	34,1	60
12	F	12	14,2	81	12,9	28,2	34,6	47
13	M	12	15	83	14,4	28,4	34,5	59
14	F	10	14,1	81	13,8	27,8	34,3	49
15	F	10	13,6	80	13,3	27,9	34,9	86
16	F	10	12,7	81	14,1	28,3	35,3	81
17	F	14	11	77	15,5	25,6	33,4	64
18	F	8	14	83	13,7	28,4	34,1	85

Continua

Hb é o valor da hemoglobina total em g/dL;VCM é o volume corpuscular médio expresso em fL.;RDW é o índice de anisocitose expresso em %;HCM é a hemoglobina corpuscular média expressa em pg.;CHCM é a concentração da hemoglobina celular média expressa em g/dL e FERRO refere-se à dosagem de ferro sérico com valores em µg/dL.

...continua

19	M	11	13	80	13,9	28,2	35,2	80
20	M	6	13,5	76	13,8	25,8	34,0	38
21	M	7	13	80	13,5	28,1	35,1	60
22	F	10	14,9	83	13,8	29,0	35,0	55
23	M	10	14,3	82	13,3	28,9	35,1	101
24	F	11	12,9	84	13,9	29,2	34,8	45
25	F	9	13,5	80	14,5	27,7	34,7	66
26	M	7	12,5	80	14,2	27,4	34,4	83
27	M	4	9	84	17,6	28,9	34,5	65
28	M	14	12,3	79	14,1	27,0	34,2	44
29	M	11	12,9	75	13,9	24,8	33,2	69
30	F	10	13,4	82	13,6	28,7	35,0	95
31	M	9	13,4	77	14,6	26,6	34,6	33
32	F	10	13,4	78	14,1	26,9	34,6	125
33	M	10	12,7	74	14	25,2	33,9	41
34	F	12	14,1	82	14,6	28,7	35,2	118
35	M	11	13,4	84	13,4	29,4	35,2	80
36	M	7	12,3	78	14	27,2	34,9	74
37	M	8	11,7	86	13,8	30,0	35,0	41
38	M	12	13,6	82	13,8	29,8	36,2	67
39	F	13	13,4	86	13,7	30,5	35,4	64
40	F	7	12,7	72	14,9	24,6	34,1	48
41	M	7	13,6	82	13,8	29,1	35,5	102
42	M	10	12,7	74	14,5	25,9	34,8	44
43	F	10	13,6	78	13,8	28,8	37,0	94
44	F	9	11,5	82	13,9	29,2	35,8	108
45	F	8	12,3	77	15,5	26,3	34,0	53
46	F	9	12,1	78	14,8	27,7	35,5	28
47	M	13	13,3	82	14,2	29,3	35,6	63
48	M	7	13,8	77	13,6	27,5	35,9	79
49	F	10	12,7	78	14,2	27,5	35,4	56
50	F	10	12,5	81	13,6	29,3	36,4	73
51	F	10	13,4	77	14,3	27,3	35,2	59
52	F	8	11,8	78	13,6	28,5	36,3	73
53	F	9	12,8	79	14,1	28,4	36,1	105
54	F	8	12,1	80	14,3	28,8	36,0	60
55	M	8	12	72	13,9	25,9	36,1	74
56	F	7	11,6	74	13,8	27,3	36,9	50
57	M	9	13	72	15,7	25,2	35,0	65
58	F	6	12,3	75	13,9	26,5	35,2	77
59	F	6	12	79	14	28,3	35,8	55
60	F	11	14	83	13,9	28,9	34,8	65
61	M	11	13	77	14,9	26,3	34,2	56
62	F	10	13,1	81	13,6	29,0	35,8	57
63	M	7	12,7	81	13,6	28,6	35,2	58

Continua

Hb é o valor da hemoglobina total em g/dL;VCM é o volume corpuscular médio expresso em fL.;RDW é o índice de anisocitose expresso em %;HCM é a hemoglobina corpuscular média expressa em pg.;CHCM é a concentração da hemoglobina celular média expressa em g/dL e FERRO refere-se à dosagem de ferro sérico com valores em µg/dL.

...continua

64	F	11	12,7	71	15,1	24,1	34,1	71
65	M	12	13,4	81	14,5	28,3	35,1	90
66	M	7	13,8	78	14,5	28,5	36,4	56
67	M	12	14,7	83	13,8	30,6	36,8	91
68	M	15	15,1	86	13,7	30,1	35,1	75
69	F	7	12,8	76	14,3	26,6	35,1	203
70	F	9	13	78	13,6	27,2	35,0	83
71	F	6	12,9	69	14,8	23,6	34,4	40
72	M	11	13,7	81	13,9	29,9	36,7	154
73	M	8	13,6	78	14,1	28,2	36,0	91
74	M	13	12,9	77	14,9	27,5	35,6	76
75	F	12	14,1	83	15,2	28,6	34,5	65
76	M	4	11,5	74	15,3	27,1	36,5	146
77	F	9	11,6	74	15	25,3	34,1	89
78	M	11	12,7	76	15,2	26,6	35,2	70
79	F	10	11,6	71	14,8	24,7	34,6	83
80	F	8	11,5	72	15,2	24,6	34,4	62
81	M	8	11,8	77	15,1	27,3	35,5	105
82	M	8	12,3	79	15	27,6	35,2	130
83	M	8	11,1	79	14,4	28,0	35,3	48
84	F	9	12,8	80	13,4	28,9	36,1	164
85	M	11	13,6	81	14,2	28,3	35,2	90
86	F	7	10,6	79	13,7	28,5	36,0	51
87	M	12	13	76	14,9	26,5	35,0	80
88	F	7	10,3	70	15,3	25,9	36,7	100
89	F	12	12,7	80	14,6	28,9	36,1	80
90	F	10	12,5	82	14,9	29,0	35,4	77
91	F	9	10,3	78	15,1	27,4	35,2	107
92	M	13	12,6	78	14,8	28,1	35,9	33
93	M	9	11,8	71	15,9	24,6	34,4	65
94	M	8	12,1	77	14,2	27,7	36,1	68
95	M	8	11,1	77	14,5	28,9	37,5	60
96	M	9	13,3	81	14,3	29,0	35,6	63
97	F	6	12,4	78	14,9	27,5	35,4	65
98	F	10	12,6	84	13,4	30,3	35,9	73
99	M	11	13.8	79	13,3	28,6	36,1	110
100	M	12	13,6	78	14	27,3	34,9	69
101	M	10	12,8	81	13,5	28,7	35,6	140
102	F	8	11,5	79	14	28,4	35,9	76
103	M	12	14,3	81	14,4	29,0	36,0	63
104	M	10	12,2	75	13,9	25,5	34,2	88
105	M	7	10,8	78	13,2	27,6	35,2	112
106	F	9	11,2	72	14,6	25,1	34,9	114
107	F	8	11,8	78	14,6	28,6	36,8	116
108	M	7	12,2	76	15,3	26,2	34,7	61

Continua

Hb é o valor da hemoglobina total em g/dL;VCM é o volume corpuscular médio expresso em fL.;RDW é o índice de anisocitose expresso em %;HCM é a hemoglobina corpuscular média expressa em pg.;CHCM é a concentração da hemoglobina celular média expressa em g/dL e FERRO refere-se à dosagem de ferro sérico com valores em µg/dL.

...continua

109	F	10	13,1	77	15,1	27,6	35,8	127
110	M	12	14,3	80	14,5	27,9	35,0	95
111	M	14	13	76	15,6	25,5	33,7	81
112	M	11	13,2	77	15,3	27,8	36,0	104
113	M	14	12,6	79	13,5	29,0	36,5	72
114	F	7	11,1	71	15,4	24,7	34,7	123
115	M	12	13,6	78	14,8	28,0	35,9	80
116	M	12	12,5	78	14,7	28,0	36,0	77
117	M	7	11,3	72	17,1	25,5	35,5	50
118	F	12	12,6	76	15,2	26,8	35,4	73
119	F	13	12,7	78	14,7	27,7	35,4	50
120	M	10	16	75	15	27,1	35,9	40
121	M	10	12,5	72	14,9	25,4	35,4	60
122	F	8	10,7	74	14,6	26,3	35,4	100
123	M	6	12,3	77	14,6	27,3	35,5	74
124	F	12	13,4	77	14,2	27,2	35,6	72
125	F	9	11,3	71	14,6	24,6	34,7	146
126	M	11	12,2	84	13,4	32,6	38,9	56
127	F	9	14,1	80	13,7	29.8	37,0	271
128	M	11	12,8	75	14,8	27,2	36,0	146
129	F	8	12	80	14,1	29,5	36,7	95
130	M	12	13,4	79	14,4	28,9	36,6	281
131	M	9	12,8	78	14,2	28,3	36,5	114
132	M	11	11,9	68	14,7	24,2	35,5	79
133	F	7	12,1	76	14,3	27,1	35,8	66
134	F	9	12,3	74	13,8	26,5	35,8	229
135	F	9	12,1	78	13,8	29,2	37,4	59
136	F	10	12,5	73	14,6	26,1	36,6	73
137	F	7	11,4	77	14,9	28,5	36,8	59
138	F	6	12,8	71	14,8	25,2	35,8	48
139	F	9	12,8	77	14,5	27,7	36,3	52
140	M	8	10,6	74	16	26,4	35,8	76
141	M	9	11,1	76	15.2	27,5	36,3	57
142	F	8	9,6	71	16,2	25,2	35,4	69
143	F	5	10,8	71	15,1	25,5	36,0	147
144	F	7	9,7	63	15,3	22,5	35,5	77
145	F	3	12,5	65	15,5	22,3	34,4	48
146	F	7	10,5	73	14,8	26,0	35,8	84
147	M	10	10,7	80	15,5	30,0	37,5	328
148	F	10	12	73	14,1	27,1	37,0	372
149	M	7	11,3	74	14,1	26,3	35,8	110
150	M	8	13,6	80	14,1	29,0	36,0	77
151	M	10	12,9	80	13,9	29,1	36,5	91
152	F	11	13,1	80	13,7	29	36,4	77
153	F	13	11,7	82	14,5	29,2	35,7	67

Continua

Hb é o valor da hemoglobina total em g/dL;VCM é o volume corpuscular médio expresso em fL.;RDW é o índice de anisocitose expresso em %;HCM é a hemoglobina corpuscular média expressa em pg.;CHCM é a concentração da hemoglobina celular média expressa em g/dL e FERRO refere-se à dosagem de ferro sérico com valores em µg/dL.

...continua

154	M	13	13,2	70	15	23,9	34,1	101
155	F	11	12,3	84	14,1	30,6	36,5	87
156	F	13	14,8	80	13,8	28,7	35,8	127
157	M	3	11,5	72	15,9	27,1	37,6	93
158	F	5	11	78	13,9	27,8	35,8	63
159	F	9	13,8	75	13,7	26,3	35,3	84
160	F	9	12,7	76	14,8	27,0	35,4	51
161	F	13	12,8	76	16,3	26,9	35,3	61
162	M	10	13,9	76	15,3	27,4	35,9	77
163	F	12	12,7	77	15,7	27,2	35,2	65
164	M	9	13,6	79	14,3	28,3	35,8	79
165	F	8	10,9	70	14,5	24,6	34,9	58
166	M	10	12,5	78	14,5	27,7	35,7	145
167	F	8	12	78	15,1	28,1	36,2	58
168	M	10	12,1	79	14,9	28,3	36,0	112
169	M	9	12,2	80	15,5	30,0	37,6	78
170	M	12	13,1	82	14,6	30,2	36,7	103
171	M	13	11,9	72	14,5	25,7	35,6	66
172	M	14	14,7	78	14,7	28,0	35,9	85
173	M	8	11,5	83	14,1	29,6	35,5	46
174	F	11	13,2	82	14	29,5	36,1	86
175	M	5	11,2	70	15,2	26,8	38,0	67
176	M	11	9,5	71	14,8	26,2	36,8	60
177	F	14	13,4	78	14,5	28,3	36,2	97
178	F	12	13,3	84	12,6	30,8	36,6	81
179	F	11	13,2	80	14,6	28,5	35,7	62
180	M	6	12	76	14,5	27,6	36,2	97
181	F	13	12,5	79	14,1	28,1	35,6	76
182	F	4	11	76	14,1	27,9	36,6	117
183	F	3	11	78	14,4	28,3	36,1	108
184	F	11	13,1	78	15,4	27,7	35,4	89
185	F	3	12,9	74	14,9	26,7	36,2	44
186	F	12	12,5	72	15	25,1	34,8	88
187	F	14	12	73	14,6	26,5	36,2	73
188	F	14	11,8	83	15,5	31,4	37,0	78
189	F	14	11,5	84	14,4	30	35,6	77
190	F	14	14,2	82	14,6	28,7	35,1	77
191	F	14	11,2	65	15,8	22,1	34,2	116
192	F	14	12,9	79	14,1	27,9	35,4	88
193	F	14	14,2	80	14,7	29,3	36,4	106
194	F	14	12,2	83	14,1	29,5	35,6	52
195	F	14	12	80	14	27,7	34,1	60

Hb é o valor da hemoglobina total em g/dL;VCM é o volume corpuscular médio expresso em fL.;RDW é o índice de anisocitose expresso em %;HCM é a hemoglobina corpuscular média expressa em pg.;CHCM é a concentração da hemoglobina celular média expressa em g/dL e FERRO refere-se à dosagem de ferro sérico com valores em µg/dL.

5.2 Dosagem de hemoglobina total

A concentração de hemoglobina total das 195 crianças testadas 16, ou seja, 8 % apresentaram valores menores que 11 g/dL. Esses dados sugerem que se trata de crianças com anemia (Figura 6). E 179 crianças apresentaram valor da dosagem de hemoglobina total acima de 11 g/dL (92%).

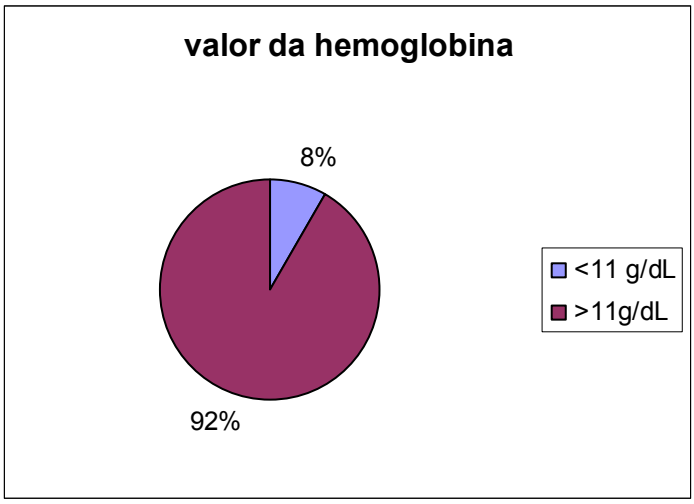


FIGURA 6 – Gráfico apresentando os percentuais de crianças com valores normais e anormais da hemoglobina total, onde observamos em azul (8%) o percentual de crianças com valores abaixo da referência e em grená o percentual de crianças com valores normais (92%).

5.3 Análise do volume corpuscular médio

Esse dado é importante para avaliar o tamanho e o volume dos eritrócitos. Nesse trabalho adotaram-se como valores de referência acima de 73 fentolitros. Foram detectadas 28 crianças (14%) com valores de VCM menores que os valores de referência (Figura 7), sendo então considerados com microcitose.

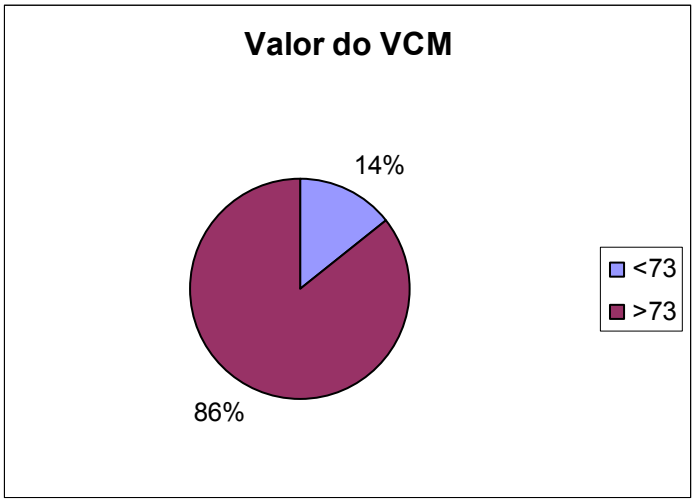


FIGURA 7 – Gráfico que apresenta o número de crianças com valores normais e anormais do VCM, onde em azul (14%) temos o percentual de crianças com valores abaixo da referência e em grená observamos o percentual de crianças consideradas normais em relação ao VCM (86%).

5.4 Dosagem de hemoglobina corpuscular média

Esse dado releva a concentração de hemoglobina presente nos eritrócitos. Conforme a tabela I ainda pode-se observar que 44 (23%) crianças apresentam o HCM abaixo do valor de referência, conforme a Figura 8 abaixo:

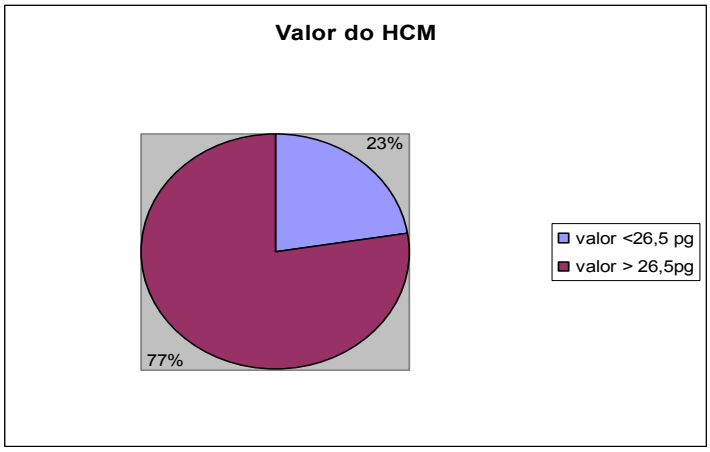


FIGURA 8 – Gráfico que apresenta o percentual de crianças com alteração no HCM, em azul observamos o percentual de crianças com valores abaixo da referência (23%), e em grená observamos o percentual de crianças consideradas normais em relação ao HCM (77%).

5.5 Concentração da hemoglobina corpuscular média

Esse dado leva em consideração a concentração de hemoglobina em 100 eritrócitos. Os dados apresentados na tabela I mostram que todas as amostras encontram-se dentro dos valores de referência.

5.6 Índices de anisocitose (RDW)

Esse dado leva em consideração o percentual de variação do tamanho dos eritrócitos. Onde 157 crianças apresentaram o índice de anisocitose dentro do valor de referência (81%), e 38 (19%) apresentaram valores considerados anormais, indicando uma possível produção aumentada de eritrócitos.

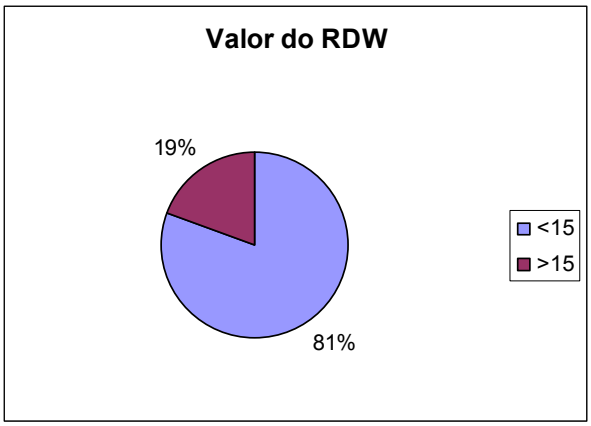


FIGURA 9 – Gráfico que apresenta o número de crianças com alterações em relação ao RDW, onde observamos em azul a porcentagem de crianças com valores alterados em relação ao RDW (19%), e em grená o percentual de crianças consideradas normais (81%).

5.7 Dosagem de ferro sérico

Para a dosagem de ferro sérico foi utilizado o soro das amostras de sangue coletadas. (a quantificação foi realizada utilizando o aparelho Selectra II Roche – Diagnostic). Os valore de referência estão descritos na página 15. Segundo a Tabela 1, 10 crianças (5%) apresentaram valores acima dos valores de referência, 32 apresentaram valores abaixo da referência adotada (16%) e ainda 153 crianças apresentaram o valor da dosagem de ferro normal (79%) conforme a Figura 10:

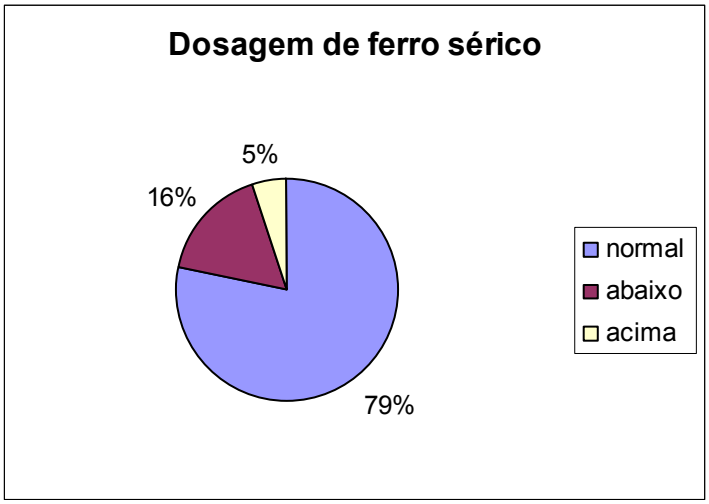


FIGURA 10 – Gráfico que apresenta o número de crianças com valores normais em azul (79%), em amarelo observamos os valores acima do de referência (5%) e em grená o percentual abaixo do valor de referência (16%).

5.8 Eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino

As amostras de sangue foram hemolisadas utilizando saponina 1%. O hemolisado foi analisado por eletroforese alcalina em acetato de celulose. O padrão de migração eletroforética foi comparado com o mapa descrito na Figura 5.

Na Figura 11 podemos observar o padrão eletroforético das hemoglobinas de algumas amostras analisadas e um perfil de hemoglobina AC utilizada como controle.

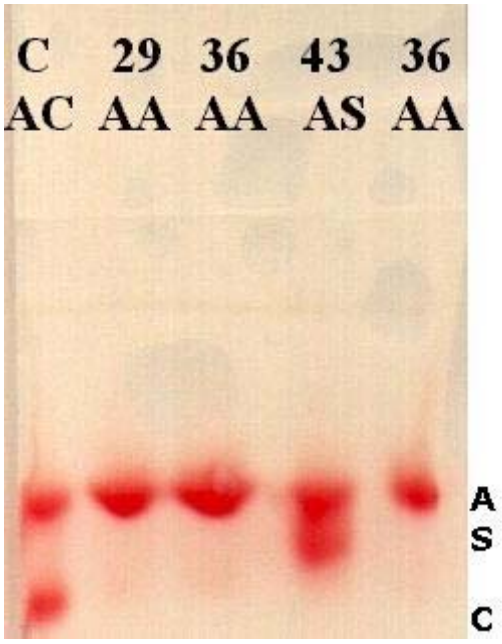


FIGURA 11 – Padrão eletroforético das hemoglobinas de algumas amostras analisadas e um perfil de hemoglobina AC utilizada como controle.

Das 195 amostras, 184 (94,35 %) apresentaram o perfil eletroforético normal (AA). Onze amostras apresentaram perfil alterado, sendo uma AC (0,51%) e 10 AS (5,12 %) conforme pode ser observado na Tabela 2.

TABELA 3 – Perfil eletroforético das amostras contendo hemoglobinas variantes, detectadas por eletroforese alcalina em acetato de celulose

Número	Padrão eletroforético
88	AC
7	AS
8	AS
43	AS
71	AS
86	AS
94	AS
130	AS
131	AS
138	AS
139	AS

5.9 Análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

As 11 amostras que apresentaram perfil eletroforético alterado foram analisadas por HPLC. A análise por HPLC permite confirmar o perfil eletroforético, permitindo quantificar as hemoglobinas presentes na amostra. Na Figura 12 pode-se ver o resultado dessa análise.

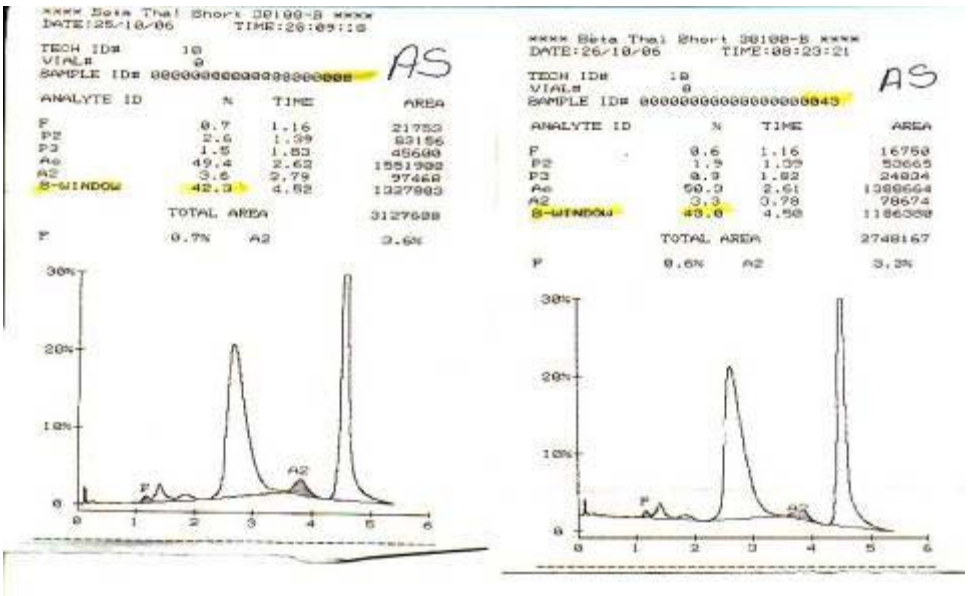


FIGURA 12 – Cromatograma obtido por analise por HPLC das amostras dos pacientes números 8 e 43. Onde podemos observar os índices de retenção para cada fração hemoglobínica.

Através do HPLC foi possível calcular os percentuais hemoglobínicos dos pacientes com hemoglobinas variantes, os resultados encontram-se na Tabela 3.

TABELA 4 – Caracterização quantitativa e qualitativa das hemoglobinas presentes nas amostras com perfil eletroforético alterado

Número	Padrão eletroforético	% HB F	%A2	% HB S	% HB C	% HB A
7	AS	0,6	0,7	42,2	0	56,5
8	AS	0,7	3,6	42,3	0	53,4
43	AS	0,6	3,3	43	0	53,1
71	AS	0,4	3	43,9	0	52,7
88	AC	1,4	2,7	2,9	39,5	53,5
86	AS	0,5	2,0	40,8	0	56,7
94	AS	0,2	3,6	41,7	0,7	53,8
130	AS	0,5	3,5	41,7	0	54,3
131	AS	0,2	3,6	43,6	0	52,6
138	AS	0,3	3,6	40,5	0	55,6
139	AS	0,4	3,3	42,5	0	53,8

5.10 Pesquisa de hemoglobinas variantes nos progenitores das crianças com hemoglobinas variantes

O sangue dos pais de algumas crianças portadoras de hemoglobinas variantes foi avaliado. As amostras foram avaliadas por eletroforese alcalina em acetato de celulose e por HPLC. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos.

TABELA 5 – Caracterização quantitativa e qualitativa das hemoglobinas presentes nas amostras com perfil eletroforético alterado

Paciente	Perfil eletroforético	% HB S	% HB F	% HB C	% HB A2	% HB A
Mãe	AA	0	0,2	0	2,2	97,8
43	AS	46,2	0,1	0	4,1	49,7
Pai	AS	43,8	0,2	0	4,4	51,8
Mãe	AA	0	0,3	0	1,9	98,1
139	AS	42,8	0,5	0	4,3	52,9
138	AA	0	0,3	0	2	97,7
Mãe	AA	0	0,5	0	2,3	97,2
Pai	AS	43	0,6	0	3,6	52,8
130	AS	43,5	0,3	0	3,6	52,6
131	AS	43,5	0,5	0	2,7	53,3
Pai	AS	45,8	0,4	0	2,7	51,1
Mãe	AA	0	0,6	0	3,7	95,7
7	AS	42,2	0,7	0,6	0.7	56,5
8	AS	42,3	0.7	0,7	3.6	53,4

5.11 Pesquisa de corpúsculos de hemoglobina H

As amostras que apresentaram o padrão AS foram submetidas à pesquisa intraeritrocitária de Hemoglobina H. Nenhuma das amostras apresentou a presença de corpúsculos de hemoglobina H.

6 DISCUSSÃO

A cidade de Bom Jardim de Goiás esta localizada no noroeste goiano, estando a 360 km da cidade de Goiânia. Segundo dados do IBGE (2007) a cidade apresenta 8368 habitantes. Para se fazer um estudo da prevalência de hemoglobinopatias nessa cidade, optou-se por trabalhar com crianças. As crianças foram escolhidas uma vez que os dados da literatura sugerem que quanto mais precoce for realizado o diagnóstico, melhor será acompanhamento ou tratamento dos portadores. Dos 8368 habitantes, 2160 encontram-se na faixa etária de 0 a 14 anos. Neste trabalho foram analisadas 195 crianças de 0 a 14 anos, representando 9,02 % do total de crianças nesta faixa etária.

Entre as crianças analisadas nesse trabalho, 52 % eram do sexo feminino e 48 % pertenciam ao sexo masculino. Os dados mostram que o grupo amostral encontra-se bastante equilibrado nesse aspecto. Entretanto esse equilíbrio não seria necessário, uma vez que é conhecido que as hemoglobinopatias são patologias de origem genética não relacionada ao sexo, portanto mesmo que houvesse uma grande diferença, não haveria influência na incidência das hemoglobinopatias.

O primeiro passo desse trabalho foi fazer um eritrograma de todas as amostras de sangue coletadas. O eritrograma foi realizado no contador automatizado de células ABX micros 60, o qual fornece dados para a classificação morfológica das anemias. A dosagem de hemoglobina é o índice utilizado pela Organização mundial de saúde como critério para caracterização de presença de anemia.

6.1 Dosagem de Hemoglobina total

Neste trabalho consideramos como normal o índice de hemoglobina total maior que 11,0 g/dL, já que este é o valor de referência para as pessoas desta faixa etária (0 a 14 anos) conforme o manual do fabricante do aparelho utilizado para as dosagens(ABX micros 60). Em relação à dosagem total de hemoglobina (Hb) observou-se que 16 crianças (8%) apresentaram valores abaixo da referência (Tabela 1). Assim 16 crianças apresentaram quadro de anemia. Para se caracterizar o tipo de anemia é necessário observar os outros parâmetros

do eritrograma, como o VCM, HCM e ainda outras técnicas como a eletroforese alcalina e a dosagem de ferro ou ferritina (NAOUM; NAOUM, 2004).

6.2 Volume Corpuscular Médio (VCM)

Nesse trabalho utilizou-se como valor de referência valores superiores a 73 fL. Dentre as amostras analisadas 28 crianças (14%) apresentaram valores inferiores ao valor considerado normal. Esse dado sugere que estas crianças seriam classificadas como eritrócitos microcíticos. A microcitose não é uma característica exclusiva da anemia ferropriva, além desta podemos citar ainda a hemoglobinopatias como causa de microcitose. Este dado mostra a importância da realização de exames específicos como a dosagem de ferro e ferritina para descarte de anemias relacionadas ao ferro. Dentre as crianças utilizadas no trabalho apenas 4 apresentaram idade menor do que 4 anos porem estas foram incluídas no mesmo grupo para analise dos valores de referência para VCM.

Dentre os grupos de crianças portadoras de anemias variantes apenas 3 apresentaram valores abaixo da referência para VCM. Segundo Wagner et al. (2005), Melo et al. (2002), Leoneli et al. (2000), Clarke e Higgins (2000), existe associação entre hemoglobinopatias e microcitose. Dentre os pacientes com VCM abaixo da referência apenas 8 apresentaram hemoglobina total abaixo do valor de referência (11 g/dL).

6.3 Hemoglobina corpuscular média

A hipocromia também esta associada as hemoglobinopatias conforme Leoneli et al. (2000); Clarke e Higgins (2000); Orlando et al. (2000). Baseado no valor de HCM observamos que 40 crianças cerca de 31 % apresentou valores abaixo da referência para HCM, este dado sugere que estas crianças apresentam quadro de hipocromia. Já que devido a menor concentração de hemoglobina no interior do eritrócito, isto resultará numa maior passagem de luz, caracterizando a hemácia hipocrômica através da microscopia de luz. No grupo das portadoras de hemoglobinopatias este dado é de 27,27 %, ou seja, a minoria das crianças portadoras de hemoglobinopatias apresentaram alterações em relação a concentração de hemoglobina corpuscular media. Corroborando a bibliografia este fato ocorre principalmente pelo fato destas crianças apresentarem heterozigose. Dentre o grupo de crianças que apresentaram HCM baixo23 apresentaram também VCM baixo, portanto são classificadas como hipocrômicas e microciticas. As talassemias alfa e beta apesar de

possuírem grande variabilidade laboratorial são caracterizadas como anemias microciticas e hipocrômicas apresentando desde quadros leves até quadro bastante severos (OLIVEIRA et al., 2006). Já os portadores das hemoglobinas variantes como a S e C quando em heterozigose não apresentam alterações laboratoriais alguma ou quando apresentam são bastante discretas. Porém, quando em homozigose as alterações são bastantes características (NAOUM; NAOUM, 2004).

6.4 Concentração de hemoglobina corpuscular média

Um fator importante de ser observado é que nenhuma das crianças estudadas apresentou alteração de CHCM, segundo Finch e Hilman (2001) e Nascimento (2003), o CHCM é insensível para a diferenciação das anemias por carência de ferro e as causadas pela deficiência na síntese da molécula de hemoglobina.

6.5 Índice de anisocitose

Em condições normais, a medula óssea lança na corrente sangüínea, hemácias com volumes bastante semelhantes. A diferença de tamanho entre os eritrócitos é chamada de anisocitose. Existe, portanto uma anisocitose fisiológica e uma anisocitose indicativa de liberação de hemáceas imaturas, normalmente ocorrendo quando há uma queda da síntese de hemoglobinas ou perdas sangüíneas. Observamos 38 (19%) apresentou valor de RDW aumentado, indicando uma liberação pela medula de células imaturas. Dentre o grupo de crianças portadoras de hemoglobinas variantes Apenas duas apresentaram rdw acima do valor de referência. E dentre todas que apresentaram alteração em relação ao rdw observamos em 18 alterações em outros índices hematimétricos, como hemoglobina total ou HCM abaixo dos valores de referência. Estes dados sugerem a realização de métodos específicos para a diferenciação das possíveis causas de anemias ou variações hematimétricas.

Como pode se observar eritrograma traz muitas informações para o clinico. Essas informações são importantes para detectar e classificar as anemias. Entretanto estas informações não são suficientes para um diagnóstico conclusivo. Assim outras metodologias devem ser utilizadas para auxiliar um diagnóstico adequado, resultando em tratamento clínico adequado com a realidade do paciente.

6.6 Dosagem de ferro sérico

O ferro é um elemento imprescindível na formação da molécula de hemoglobina, portanto a ingesta insuficiente ou uma má absorção deste, pode levar o organismo a diminuição da síntese de hemoglobina. As anemias relacionadas ao metabolismo do ferro são geralmente classificadas como hipocrômicas e microciticas, portanto a realização de exames como a dosagem de ferro ou ferritina é importante para a diferenciação entre as causas das anemias.

Foram realizadas as dosagens de ferro sérico para que fossem descartadas as anemias ferroprivas. Observamos que 32 crianças (16%) apresentaram valores abaixo da referência, dentre as portadoras de hemoglobinopatias apenas 1 apresentou valor abaixo de referência. Provavelmente sem a realização de outras metodologias esta criança seria tratada com reposição de ferro, sendo inútil para a realização de melhorias no quadro clínico da criança.

Já 153 crianças cerca de 79% foram consideradas normais e 10 crianças, cerca de 5%, apresentaram valores acima da referência a principal suspeita para estes valores muito acima do valor de referência é que estas crianças não devem ter obedecido ao jejum necessário para a realização desta dosagem.

Dentre as crianças que apresentaram a dosagem de ferro abaixo do índice de referência apenas 7 apresentaram outras alterações hematimétricas como hemoglobina total abaixo de 11 g/dL sugerindo anemias ferropênicas. Estas crianças foram encaminhadas ao medico pediatra e foram tratadas com sulfato ferroso e quando necessário com acido fólico.

6.7 Análise global do eritrograma

Tomando os dados do eritrograma pode-ser observar que 16 crianças apresentaram uma concentração de hemoglobina total menor que o valor de referência. Esse dado sugere que essas crianças estão com anemia. Dessas crianças, 06 apresentam microcitose, oito apresentam um índice de anisocitose maior que o de referência. Apenas uma das crianças apresentou concentração de ferro inferior ao valor normal, a qual poderia ser classificada como ferropriva. Não é possível fazer um diagnóstico acurado sobre o tipo de anemia, utilizando apenas os dados do eritrograma.

A utilização de outras metodologias é fundamental para se obter um diagnóstico preciso, que permita ao médico desenvolver um tratamento adequado para o paciente.

6.8 Eletroforese alcalina em acetato de celulose

O perfil eletroforético das amostras analisadas foi comparado com o mapa de mobilidade eletroforética das hemoglobinas (figura 5).

Das 195 crianças submetidas a analise, 184 (cerca de 84 %) apresentaram perfil eletroforético normal, 10 pacientes apresentaram perfil eletroforético condizente para traço falciforme e apenas 1 paciente apresentou traço para hemoglobina C. Estes dados condizem com os trabalhos realizados por Melo et al. (2002) com doadores de sangue das cidades de Uberlândia e cidades subjacentes, em estudo realizado Bonini-Domingos (2004) que demonstrou que o traço falciforme é a hemoglobina variante mais encontrada. Apesar de ser uma técnica bastante confiável, a eletroforese alcalina não distingue todas as hemoglobinas variantes, pois algumas apresentam o mesmo perfil eletroforético de migração (ZAMARO et al., 2002).

Dentre as crianças portadoras de hemoglobinas variantes apenas 3 apresentaram variações consideráveis nos índices hematimétricos. Tal fato demonstra a necessidade da realização de triagens especificas para hemoglobinas variantes e talassemias, já que dificilmente seriam diagnosticadas como portadoras, podendo gerar prole heterozigota.

A eletroforese alcalina em acetato de celulose é uma ferramenta indispensável para a triagem por ser uma técnica não muito onerosa, porém existem hemoglobinas com o mesmo perfil de migração eletroforética como a HbS e a HbD. Para a diferenciação destas e de outras hemoglobinas com mesmo padrão eletroforético se faz necessário a realização de outras técnicas como a eletroforese acida ou HPLC.

Das 11 crianças portadoras de hemoglobinas variantes, 06 não apresentaram nenhuma variação no eritrograma, apenas duas apresentaram anemia, quatro eram microcíticas e apenas uma apresentou mais de um parâmetro alterado.

Como a incidência dessas hemoglobinopatias é relativamente alta, entorno de 5%, levando-se em consideração que a maioria das crianças portadoras não apresentou alteração nos índices do eritrograma, é de fundamental importância a introdução da pesquisa de hemoglobinas variantes como rotina nos laboratórios municipais, principalmente quando o sangue das crianças for analisado pela primeira vez. Tal medida seria de fundamental importância para evitar tratamentos inócuos, que até mesmo poderiam ser prejudiciais as crianças, quando se tratar de beta talassemia por exemplo. A pesquisa utilizando a eletroforese alcalina em acetato de celulose é uma metodologia bem barata que seria muito útil na detecção de crianças portadoras de hemoglobinas variantes.

6.9 Análise de hemoglobinas por HPLC

Dente as metodologias utilizadas para diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias, a análise por HPLC é a mais precisa, entretanto é uma metodologia pouco acessível a maioria dos laboratórios clínicos devido seu custo ser bastante oneroso.

Joutovsky, Hadzi-Nesic e Nardi (2004) afirmaram em seu trabalho que a técnica de HPLC é excelente, segura, reprodutível e uma ótima ferramenta para a identificação direta de hemoglobinas variantes e talassemias com alto grau de precisão na quantificação de suas frações sendo superior à eletroforese convencional. Neste trabalho todos os resultados obtidos confirmaram os resultados da eletroforese alcalina.

A técnica do HPLC nos permite a analise quantitativa de cada fração hemoglobínica, permitindo a conclusão diagnostica mais rápida e precisa do que outras metodologias. Observando os dados da tabela III podemos informar que apenas o paciente número 88 apresentou valor um pouco acima do valor de referência para a dosagem de Hb F, porém como este paciente é portador de traço apara hemoglobina C este aumento não traz nenhuma implicação. Todos os pacientes apresentaram valores de hemoglobina A_2 dentro dos valores de referência descartando a hipótese de algum ser portador de beta talassemia.

Ainda através do HPLC foram estudados os pais de quatro crianças que se apresentaram para estudo familiar e confirmação diagnostica, estes dados são observados na tabela IV que demonstra que todos os genitores do sexo masculino foram os responsáveis pela transmissão do gene mutante.

Um caso bastante interessante é o dos pacientes 138 e 139, onde o paciente número 138 apresenta perfil eletroforético normal enquanto seu irmão o paciente número 139 apresenta padrão eletroforético compatível com traço falciforme. Este dado demonstra a importância do diagnóstico preciso e a orientação genética dos pais.

Outro caso importante é o dos pacientes número 7 e 8 onde seu pai, em outro casamento apresentou outro filho com traço falciforme, demonstrando a importância da orientação genética deste casal.

Segundo Naoum (1999), é bastante comum a incidência de interações ente os traços falciformes e a alfa talassemia, para descartarmos a hipótese destas alterações as amostras dos progenitores e das crianças foram submetidas a pesquisa de corpúsculos de hemoglobina H , encontrados em caso de alfa talassemia. Porém em nenhuma amostra apresentada foi detectada a presença de hemoglobina H.

7 CONCLUSÕES

- 5,65 % das crianças do Programa de erradicação do trabalho infantil da Cidade de Bom Jardim de Goiás avaliadas nesse trabalho apresentaram hemoglobinas variantes;

- 5,14 % são portadores de hemoglobina S (traço falciforme);

- 0,51 % é portador de traço para hemoglobina C;

- Considerando a prevalência hemoglobinopatias encontradas foi confirmada a importância do diagnóstico correto e tratamentos compatíveis com a patologia do paciente. Evitando custos desnecessários, reações adversas a tratamentos errôneos e a orientação genética destes pacientes;

- Foi observada a necessidade de treinamento adequado dos profissionais de saúde para a detecção de hemoglobinopatias.

8 PERSPECTIVAS

Aproximadamente 2000 procedimentos laboratoriais são realizados mensalmente no Laboratório Municipal, deste total, cerca de 37% são realizados em crianças. Observaram-se casos de crianças com alterações hematológicas que não respondem ao tratamento de reposição de ferro. Também foram observados em outros municípios vizinhos inúmeros casos, inclusive foi diagnosticada uma criança no município de Arenópolis portadora de hemoglobina C em heterozigose. Tal fato demonstra a importância da expansão desta pesquisa para os municípios da região e também a importância de uma equipe multi profissional capaz de detectar e tratar corretamente estes pacientes.

Pretende-se continuar o levantamento da incidência de hemoglobinopatias nos moradores da cidade de Bom Jardim de Goiás. Para tal será introduzida na rotina laboratorial analisar, utilizando eletroforese em acetato de celulose, os sangues dos pacientes com idade entre 0-14 anos. Em todos os casos serão explicados os procedimentos a serem utilizados, de tal forma que os pais autorizem, através do termo de consentimento livre e esclarecido a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

BONINI -DOMINGOS, C. R. Thalassemia screening in brazil- results for 20 years. **Rev. Bras. Hamatol. e Hemot.**, v.26, n.4, p.288-289, 2004.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz Fundamentos de química clinica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1998.

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

FINCH, C. A.; HILMAN, R. S. **Manual da serie vermelha.** São Paulo: Santos, 2001. p.191.

HEMOGLOBIN Electrophoresis. Disponível em: <http://www.helena.com/Procedures/Pro015%20Rev6.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2007.

HUISMAN, T. H. J., Usefulness of cation exchange high performance liquid chromatography as a testing procedure. **Pediatrics**, v.83, p.849-851, 1989.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/> Acesso em: 11/09/2007.

JOUTOVSKY, A.; HADZI-NESIC, J.; NARDI, M. A. HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 6000 samples in a clinical diagnostic laboratory**. Clin. Chem**, v.50, n.10, p.1736-1747, 2004.

LEE, R. G.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS J.; LUKENS, J. **Hematologia**. 2.ed. São Paulo: Editora Manole, 1998.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M**. Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEONELI, G. G. et al. Hemoglobinas anormais e dificuldades diagnóstica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**., v.22, n.2, p.396-403, 2000.

LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Hematologia pratica de Dacie e Lewis**. 9.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

LORENZI, T. F. **Atlas de hematologia**: clínica hematológica ilustrada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p86-95.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantification of haemoglobin cellulose acetate. **J. Clin. Path**., v.18, p.790-792, 1965.

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

NAOUM, P. C. **Eletroforese. Técnicas e diagnósticos**. 2 ed. Santos livraria e editora, São Paulo, p 154, 1999.

_____. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997.

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. **Doença das células falciformes.** São Paulo: Sarvier, 2004.

NASCIMENTO, M. L. P. Por que na relação entre a concentração da hemoglobina globular média e a contagem de hemáceas a avaliação do RDW-SD é importante? **News Lab**., v.61, p.94-104, 2003.

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

OLIVEIRA, H. P. **Hematologia Clínica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1990.

ORLANDO, G. M. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**., v.22, p.111-121, 2000.

PAYANNOPOULOS, R.; STAMATAYANNOPOULOS, G. **Stains formo f inclusions bodies. In Standatization of laboratory reagents and methods for detection of haemoglobinopathies .** Atlanta: Hew publications, 1974.

SILVA, R. B. de Paiva e; RAMALHO, A. S. Risks and benefits of genetic screening: the sickle cell trait as a model in a Brazilian population group. **Cadernos da Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.13, n.2, 1997. Disponível em: <http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1997000200018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 02/06/07.

WAGNER, S. C. et al. Prevalência de talassemias e hemoglobinopatias variantes em pacientes com anemia não ferropênica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.,** v.27, n.1, p.37-42, 2005.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. **The Thalassemia Syndromes**. 3.ed. Oxford: Blackwell, 2001.

ZAGO, M. A.; FALCAO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia**: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu, 2004.

ZAMARO, P. J. A. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias semelhantes à HbS. **J. Bras. Patol. Méd. Molec.**, v.38, n.4, p.261-266, 2006.

ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E ENGENHARIA GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você poder procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás sob o número do protocolo 00065/2005

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Linha de Pesquisa: ANEMIAS HEREDITÁRIAS

Projeto: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEMOGLOBINAS VARIANTES E TALASSEMIAS.

Pesquisadora Responsável: Karlla Greick Batista Dias Penna

Telefone para contato: (62)35211493

Pesquisadores participantes:

- Menandes Alves de Souza Neto (UFG)
- Luiz Artur Mendes Bataus (UFG)
- Paulo Roberto de Melo Reis (UCG)

Telefones para contato: (62)35211493 e (62) 39461088

- Será colhida a sua amostra de sangue mediante o seu consentimento, esta amostra será utilizada para fazer exames específicos para o diagnóstico das ANEMIAS HEREDITÁRIAS tais como: hemograma, eletroforese de hemoglobina, prova de resistência à salina 0,36%, pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H, cromatografia líquida de alta performance, teste de falcização e extração de DNA para análise por técnica de PCR.
- O objetivo da pesquisa é saber a prevalência desta doença na nossa população. Não existe nenhum risco, nem desconforto ou lesões que possam ser provocados pela pesquisa e você receberá o resultado no final da pesquisa, previsto para dezembro de 2007.
- Todos os dados são sigilosos e você tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo.
- Nome do pesquisador: _____
- Assinatura do pesquisador: _____
- Data:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E ENGENHARIA GENÉTICA

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG nº. _____ , abaixo assinado, concordo em participar do estudo em ANEMIAS HEREDITÁRIAS, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador _____ _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu atendimento.

Local e data _____

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Observações complementares:

Data de nascimento: ___/___/_____ Idade: _____

Sexo: ( ) se for do sexo feminino D.U.M:: _____

Endereço: _____

_____

Telefone: _____

Naturalidade do paciente: _____ Estado: _____

Naturalidade do pai: _____ Estado: _____

Naturalidade da mãe: _____ Estado: _____

Você já teve anemia? Não ( ) Sim ( )
Já fez tratamento para anemia? Não ( ) Sim ( )
Qual medicamento você usou? _____

Houve melhora com o uso do medicamento? Não ( ) Sim ( )

Atualmente você está em uso de algum Medicamento: _____

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo