



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**TRIAGEM NEONATAL: INVESTIGAÇÃO DE
HEMOGLOBINOPATIAS EM RECÉM-NASCIDOS DA
CIDADE DO SALVADOR - BAHIA**

ELISÂNGELA VITÓRIA ADORNO

Salvador - Bahia - Brasil

2001

13.8)



001706

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Curso De Pós-Graduação em Patologia

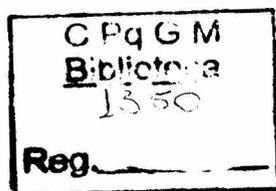
TRIAGEM NEONATAL: INVESTIGAÇÃO DE
HEMOGLOBINOPATIAS EM RECÉM NASCIDOS DA CIDADE
DO SALVADOR - BAHIA.

ELISÂNGELA VITÓRIA ADORNO

Orientadora: MARILDA DE SOUZA GONÇALVES

Dissertação Apresentada para Obtenção do Grau de
Mestre em Patologia Experimental

Salvador - Bahia - Brasil
2001



Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Adorno, Elisângela Vitória

A241 Triagem neonatal: investigação de hemoglobinopatias em recém-nascidos da cidade do Salvador - Bahia. / Elisângela Vitória Adorno. ____
Salvador: UFBA/FIOCRUZ/CPqGM, 2001.
109p.: il.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia./FIOCRUZ-CPqGM, 2001.

1. Triagem neonatal. 2. Hemoglobinopatias. 3. Hemoglobina S
4. Talassemias. I. Título.

CDU: 616.15:612.111

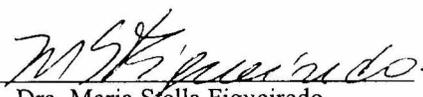
CDU: 616.15:612.111
A241.1

TRIAGEM NEONATAL: investigação de hemoglobinopatias em recém-nascidos
da Cidade do Salvador - Bahia.

ELISÂNGELA VITÓRIA ADORNO

FOLHA DE APROVAÇÃO

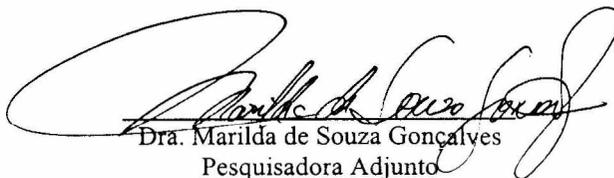
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Maria Stella Figueiredo
Professora Adjunto
Escola Paulista de Medicina - UNIFESP



Dr. Edson Duarte Moreira
Pesquisador Adjunto
CPqGM - FIOCRUZ



Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisadora Adjunto
CPqGM - FIOCRUZ

"A Deus pela vida,

A Marilda por guiar meus passos,
E a meus pais, Virgílio e Otávia,
pelo incentivo, apoio e carinho
dedicados em todos os momentos da
minha vida ".

AGRADECIMENTOS

- À Prof^ª. Dr^ª. Marilda de Souza Gonçalves, pelo empenho e dedicação na orientação do trabalho, sem poupar esforços para garantir o seu bom desenvolvimento, e por compartilhar comigo a sua experiência.
 - Ao Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Chefe do Lab. de Patologia e Biologia Molecular/CPqGM, por garantir a utilização de instalações sob sua chefia e pelo interesse no acompanhamento do trabalho.
 - À direção da Maternidade Tsylla Balbino na pessoa da Enf^a. Edeltrudes do Espírito Santo que proporcionou os meios para que o trabalho fosse realizado naquela unidade.
 - Às auxiliares de enfermagem da Maternidade Tsylla Balbino, Josefina, Edna e Marilene, por realizarem a coleta de sangue do cordão umbilical dos recém-nascidos.
 - À equipe do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, pelo companherismo e amizade. Aos colegas de equipe Arlete Albuquerque, Fábio Couto, Joelma Figueiredo, Cláudio Lima, Maria Teresita e aos estudantes de iniciação científica José Pereira, Luciana Abbehusen e Juliana de Menezes, pelo auxílio na realização deste trabalho.
 - Aos pais ou responsáveis pelos recém-nascidos que concordaram com a participação das crianças neste estudo, submetendo-se aos procedimentos pertinentes, pela disponibilidade e credibilidade oferecidas.
 - Aos Drs. Manoel Barral Netto e Luiz Antônio de Freitas, coordenadores da Pós-Graduação em Patologia UFBA/FIOCRUZ, pelo empenho e eficiência na condução das atividades, e ao corpo de professores do mestrado, pela dedicação demonstrada ao longo do curso. Em especial à secretária do curso, Sr^ª. Rosália Silva, pela amizade, profissionalismo e atenção dispensada em todos os momentos.
 - Ao Dr. Marco Rego, Epidemiologista do CESAT, pela orientação e disponibilidade prestadas, indispensáveis para realização deste trabalho.
 - Às equipes da Biblioteca, do Setor de Informática e de Recursos Audio-visuais, e aos demais funcionários do CPqGM, que sempre se mostraram prontos para prestar o auxílio necessário.
 - A todos aqueles que, mesmo não sendo citados nominalmente, colaboraram direta ou indiretamente para a realização do presente trabalho.
-

FONTES DE FINANCIAMENTO

- CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- Auxílio do Programa de Aperfeiçoamento Profissional (PAPES) - FIOCRUZ.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	III
LISTA DE TABELAS	IV
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	VIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 AS HEMOGLOBINAS E GENES DA GLOBINA	1
1.2 HEMOGLOBINOPATIAS ESTRUTURAIS E DE SÍNTESE	5
1.3 HEMOGLOBINOPATIAS ESTRUTURAIS.....	6
1.4 HEMOGLOBINOPATIAS DE SÍNTESE OU TALASSEMIAS.....	10
1.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE A TALASSEMIA α E HEMOGLOBINAS VARIANTES.....	17
1.6 TRIAGEM NEONATAL.....	18
2 OBJETIVOS.....	21
3 JUSTIFICATIVA.....	22
4 CASUÍSTICA	24
4.1 SELEÇÃO DE RECÉM-NASCIDOS.....	24
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
5.1 COLETA DAS AMOSTRAS	25
5.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS	25
5.3 ANÁLISE DAS HEMOGLOBINAS	25
5.4 ANÁLISE MOLECULAR.....	27
5.4.1 Extração do DNA genômico.....	27
5.4.2 Determinação das talassemias α	28
5.4.2.1 Pesquisa da talassemia $-\alpha^{3,7 \text{ K}\beta}$	30
5.4.2.2 Pesquisa da talassemia $-\alpha^{4,2 \text{ K}\beta}$	31
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
6 RESULTADOS.....	34
6.1 DADOS HEMATOLÓGICOS E ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS	35
6.2 DADOS DA ANÁLISE DE HEMOGLOBINAS	37
6.3 DADOS DA ANÁLISE MOLECULAR PARA TALASSEMIA α	51
6.3.1 Talassemia $\alpha_2^{3,7 \text{ Kb}}$	51
6.3.2 Talassemia $\alpha_2^{4,2 \text{ Kb}}$	71
7 DISCUSSÃO.....	73
8 CONCLUSÕES	88
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
10 ANEXOS.....	103

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Representação dos loci da globina α e não- α humana	3
Figura 1.2. Expressão dos genes da globina em diferentes períodos do desenvolvimento ontogênico humano.	4
Figura 1.3. Representação esquemática dos segmentos homólogos X, Y e Z presentes no grupo de genes da globina α	11
Figura 1.4. A - Diagrama do evento de recombinação recíproca entre as regiões homólogas Z; B - <i>Crossing over</i> à direita do evento ocorrido entre as regiões X	13
Quadro 1.1. Descrição dos vários tipos de talassemia α , seus genótipos, tipos de hemoglobinas e dados hematológicos mais frequentes	16
Figura 5.1 A - Representação da estratégia utilizada na reação de PCR para a pesquisa das talassemias $\alpha_2^{3,7\text{Kb}}$ e $\alpha_2^{4,2\text{Kb}}$; B - Diagrama esquemático dos <i>primers</i> empregados durante as respectivas reações.....	29
Quadro 5.1. Oligonucleotídeos sintéticos (<i>primers</i>) utilizados na reação de PCR destinados à investigação das talassemias $\alpha_2^{3,7\text{Kb}}$ e $\alpha_2^{4,2\text{Kb}}$	32
Figura 6.1. Eletroforese em gel ágar pH 6,0, identificando o padrão eletroforético de hemoglobinas.....	38
Figura 6.2. Representação gráfica da distribuição do perfil de hemoglobinas.	40
Figura 6.3. Gel de agarose a 1% apresentando os fragmentos obtidos na reação de PCR, para a talassemia $\alpha_2^{3,7\text{Kb}}$	52
Figura 6.4. Representação gráfica da distribuição da talassemia $\alpha_2^{3,7\text{Kb}}$	53
Figura 6.5. Gel de agarose a 1% apresentando os fragmentos obtidos na reação de PCR para a talassemia $\alpha_2^{4,2\text{Kb}}$	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1. Médias dos dados laboratoriais hematológicos (Ht, Hb, Hm) e dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM).....	36
Tabela 6.2. Médias e desvios padrões dos dados laboratoriais hematológicos (Ht, Hb, Hm) e dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) nas amostras de RN prematuros e nascidos a termo	37
Tabela 6.3. Distribuição do perfil de hemoglobinas.....	39
Tabela 6.4. Comparação do perfil eletroforético de hemoglobinas entre a amostra de RN prematuros e nascidos a termo.	41
Tabela 6.5. Média de pesos por perfil de hemoglobinas encontrados em 592 RN.	42
Tabela 6.6. Distribuição do perfil de Hb nos vários grupos raciais identificados na amostra de RN.	44
Tabela 6.7. Distribuição do gênero entre os vários padrões de hemoglobina	45
Tabela 6.8. Médias dos valores hematológicos por perfil eletroforético de hemoglobinasN.	46
Tabela 6.9. Médias dos índices hematimétricos, por perfil eletroforético de hemoglobinas no grupo de RN.	46
Tabela 6.10. Análise dos valores médios de Ht, Hm e Hb entre os grupos AF e ASF; AF e ACF; ASF e ACF.	47
Tabela 6.11. Análise dos índices hematimétricos entre os grupos AF e ASF; AF e ACF; ACF e ASF	48
Tabela 6.12. Médias dos valores hematológicos e índices hematimétricos em RN nascidos a termo portadores do perfil de hemoglobinas ACF e AF.....	49
Tabela 6.13. Médias dos valores hematológicos e índices hematimétricos em RN nascidos a termo e portadores do perfil de hemoglobinas ASF e AF.	50
Tabela 6.14. Caracterização do padrão de genes α entre os grupos de RN a termo e prematuros.	54
Tabela 6.15. Valores médios e desvio padrão dos dados hematológicos e índices hematimétricos entre os RN com genes α normais e portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$	55

Tabela 6.16. Média dos dados hematológicos e índices hematimétricos obtidos dos RN nascidos a termo com genes α normais e portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$	56
Tabela 6.17. Distribuição de gênero e raça entre os RN com genes α normais e os portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$	57
Tabela 6.18. Distribuição do perfil de hemoglobinas entre os RN com genes α normais e os portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$	58
Tabela 6.19. Média de pesos entre RN com genes α normais e portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$, distribuídos de acordo com perfil de hemoglobinas.	59
Tabela 6.20. Distribuição do perfil de hemoglobinas entre os RN a termo e prematuros portadores de genes α normais.....	60
Tabela 6.21. Distribuição do perfil de hemoglobinas entre os RN nascidos a termo e prematuros portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$	61
Tabela 6.22. Análise estatística dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre RN a termo e prematuros portadores de genes α normais.....	62
Tabela 6.23. A análise estatística dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre os RN a termo e prematuros portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$	63
Tabela 6.24. Análise estatística dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre RN portadores de genes α normais e de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ com perfil de hemoglobina ASF.....	64
Tabela 6.25. Análise estatística dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre RN portadores de genes α normais e de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ com perfil de hemoglobina ACF	66
Tabela 6.26. Análise estatística dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre RN portadores de genes α normais e de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ com perfil de hemoglobina AF.....	67
Tabela 6.27. Análise estatística dos valores hematológicos em RN com genes α normais entre os grupos AF e ASF; AF e ACF	68
Tabela 6.28. Análise estatística dos índices hematimétricos em RN com genes α normais entre os grupos AF e ASF; AF e ACF.....	69
Tabela 6.29. Análise estatística dos dados hematológicos em RN portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ entre os grupos AF e ASF; AF e ACF	70

Tabela 6.30. Análise estatística dos índices hematimétricos em RN portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7\text{Kb}}$ entre os grupos AF e ASF; AF e ACF.....	71
--	----

RESUMO

TRIAGEM NEONATAL: INVESTIGAÇÃO DE HEMOGLOBINOPATIAS EM RECÉM-NASCIDOS DA CIDADE DO SALVADOR – BAHIA. Investigação da presença de hemoglobinopatias estruturais e de síntese em RN da cidade do Salvador-Bahia-Brasil. **ELISÂNGELA VITÓRIA ADORNO.** As hemoglobinopatias apresentam frequência mundial elevada. No Brasil, tem sido registradas frequências elevadas para a HbS, estimando-se 0,1 a 0,3% de recém-nascidos (RN) com anemia falciforme (SS). A talassemia α apresenta frequência de 20 - 23% entre algumas populações estudadas. Um total de 600 amostras de sangue de cordão umbilical foi investigada. Os RN foram provenientes da Maternidade Pública Tsylla Balbino (SESAB) e as amostras coletadas no período de fevereiro a junho de 2000. A análise de hemoglobinas foi realizada por eletroforese em fitas de acetato de celulose pH 8,9 e em ágar - citrato pH 6,0; os dados hematológicos foram obtidos através de contador de células eletrônico (Coulter Count T - 890). O DNA foi isolado dos leucócitos e utilizado para a investigação das talassemias $\alpha_2^{3,7Kb}$ e $\alpha_2^{4,2Kb}$ por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os dados referentes aos RN foram obtidos através de entrevista às mães, consulta aos prontuários médicos e observação do RN. A análise estatística foi realizada através do software EPI-INFO versão 6.04. Foram encontrados 538 (90,9%) RN com perfil de hemoglobinas normal (AF); 33 (5,6%) heterozigotos para a HbS (ASF), 19 (3,2%) heterozigotos para a HbC (ACF) e 02 (0,3%) homozigotos para a HbC (CF). O peso, gênero e idade gestacional não demonstraram associação com a presença de hemoglobinas anormais. Vinte e seis RN com perfil ASF foram distribuídos de acordo com a classificação racial: 11 (42,30%) foram mulatos, 08 (30,77%) pretos e 07 (26,90%) brancos. A análise hematológica entre os RN com padrão de AF e ASF não demonstrou diferenças estatisticamente significativas. A análise hematológica entre os RN AF e ACF apresentou diferenças significativas para os valores de Ht ($p=0,008$), Hm ($p=0,017$) e CHCM ($p=0,0045$). Os padrões SF e SCF não foram encontrados na análise da presente amostra. A talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ foi detectada em 134 (22,71%) dos RN, entre os quais 120 (20,34%) foram heterozigotos e 14 (2,37%) homozigotos. Dos 30 RN com padrão de hemoglobinas ASF, 10 (33,33%) foram heterozigotos e 01 (3,34%) homozigoto para a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$; entre os 16 RN ACF analisados, 04 (25,0%) foram heterozigotos para a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$. A análise estatística dos valores hematológicos entre os RN com genes α normais e os talassêmicos apresentou diferenças significantes em todos os parâmetros analisados. Entre os RN portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$, os ASF e ACF apresentaram valores de Hb, Ht e Hm menores que os AF, com diferenças significativas. A talassemia $\alpha_2^{4,2Kb}$ não foi encontrada na presente amostra. Os resultados encontrados de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ e de hemoglobinas variantes confirmam as frequências elevadas previamente descritas em nossa região. As análises estatísticas relacionadas ao peso, gênero e idade gestacional não demonstraram correlação com o tipo de hemoglobina presente. A presença da HbC pode modificar os valores hematológicos nos RN, assim como a presença da talassemia α , principalmente quando associada a hemoglobinas variantes. Os dados encontrados no presente estudo, indicam a necessidade da realização de programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias estrutural e de síntese na cidade do Salvador, com posterior seguimento clínico dos portadores e aconselhamento genético às famílias.

Triagem neonatal. Hemoglobinopatia. Hemoglobina S. Talassemias.

ABSTRACT

NEONATAL SCREENING: HEMOGLOBINOPATHIES INVESTIGATION IN NEWBORNS FROM SALVADOR – BAHIA. Investigation structural and synthesis hemoglobinopathies presence in newborn from Salvador – Bahia – Brazil. **ELISÂNGELA VITÓRIA ADORNO.** The hemoglobinopathies have a high worldwide frequency. In Brazil, have been registered a high frequency for S hemoglobin, estimating 0.1 to 0.3% of newborns with sickle cell anemia (SS). Alpha thalassemia has a frequency of 20 to 23% among some population studied. A total of 600 cord blood samples was investigated. The newborns were from Tsylla Balbino Maternity (SESAB) and samples were collected February to June/2000. The hemoglobins were studied by electrophoresis on cellulose acetate strips at pH 8.9 and on agar - citrate pH 6.0; the hematological analysis were carried out by electronic cell counter (Coulter Count T - 890). DNA was isolated from blood leukocytes and the $\alpha_2^{3.7\text{Kb}}$ and $\alpha_2^{4.2\text{Kb}}$ thalassemias were investigated by PCR. (Polymerase Chain reaction). The data from newborns were obtained by questionnaire with the mothers, clinical history prontuaire and newborns personal observation. Statistical analyses were made by EPI-INFO software version 6.04. Five hundred thirty eight (90,9%) newborns were identified like normal hemoglobin pattern (FA), 33 (5,6%) were heterozygous for HbS (ASF), 19 (3,2%) heterozygous for HbC (ACF) and 02 (0,3%) homozygous for HbC (CF). There was not significant association between weight, gender or gestational ages and abnormal hemoglobin presence. The 26 newborn with FAS pattern have the following racial distribution: 11 (42.30%) were mulattos, 08 (30.77%) were blacks and 07 (26.90%) whites. The hematological analysis of newborns with hemoglobin pattern FA and FAS did not have statistical differences. Hematological analysis of FA and FAC newborns showed significant differences for Ht ($p=0.008$), Hm ($p=0.017$) and CHCM ($p=0.0045$). We did not detected newborns samples with pattern FS and FSC. The $\alpha_2^{3.7\text{Kb}}$ thalassemia was detected on 134 (22.71%) newborns, 120 (20,34%) were heterozygous and 14 (2.37%) homozygous. Between, 30 newborn with pattern FAS, 10 (33.33%) were heterozygous and 01 (3.34%) was homozygous; of the 16 newborns with pattern FAC, 04 (25.0%) were heterozygous. The statistical analysis of hematological data among normal and $\alpha_2^{3.7\text{Kb}}$ thalassemia carriers showed significant differences in all parameters analyzed. The comparison of hematological analysis between $\alpha_2^{3.7\text{Kb}}$ thalassemia carriers with normal and abnormal hemoglobin, showed lower concentrations for Hb, Ht and Hm in FAS and FAC than in FA, with statistical significance. The $\alpha_2^{4.2\text{Kb}}$ was not identified. The results found of $\alpha_2^{3.7\text{Kb}}$ thalassemia and variant hemoglobins are in accord to the high frequency previously described in our region. The statistical analysis did not demonstrated association between hemoglobin patterns and weight, gender or gestational age. The hemoglobin C presence modified the hematological data from the newborns studied, as well the alpha thalassemia, mainly when it was associated with variant hemoglobins. This study provides evidence to support the importance of neonatal screening to structural and synthesis hemoglobinopathies in Salvador, with a further follow up for the carriers, focusing on genetic counseling for family of the babies.

Neonatal screening. Hemoglobinopathies. Hemoglobin S. Thalassemias

1. INTRODUÇÃO

1.1 As hemoglobinas e os genes da globina

As hemoglobinas (Hb) humanas constituem um grupo de moléculas com função de promover a absorção, o transporte e a liberação do oxigênio aos tecidos, além do transporte de parte do CO₂ (gás carbônico). A hemoglobina é composta por quatro sub-unidades, cada uma contendo a porção protéica globina e o grupo heme, constituído por um complexo ferro-protoporfirina IX. O átomo de ferro (Fe⁺²) no grupo heme constitui o sítio de ligação do oxigênio, sendo que cada molécula de hemoglobina é capaz de combinar-se com quatro moléculas de oxigênio (BUNN & FORGET, 1986; WEATHERALL & PROVAN, 2000).

Na espécie humana, as mudanças no tipo de hemoglobina ocorrem durante o desenvolvimento ontogênico, sendo determinadas por mecanismos que regulam a expressão dos genes das cadeias da globina. As cadeias polipeptídicas podem ser de seis tipos, designadas por letras gregas: α (alfa), β (beta), γ (gama), δ (delta), ϵ (épsilon) e ζ (zeta), que se agrupam aos pares para compor a globina (BUNN & FORGET, 1986).

Os genes da globina são divididos no grupo α (40Kb), localizado no braço curto do cromossomo 16 e no grupo não- α (60Kb) localizado no braço curto do cromossomo 11. O conjunto de genes das globinas α e não- α é o resultado da duplicação de um gene primordial que existiu há aproximadamente 500 milhões de anos, sendo provavelmente originado de um gene ancestral, com posterior diferenciação ao longo do processo evolutivo (STEINBERG & BENZ JUNIOR, 1995). Fazem parte do grupo de genes α , os genes α^1 e α^2 que estão localizados na região 3', codificados por seqüências de nucleotídeos idênticas, diferindo apenas no segundo íntron; os pseudogenes α ($\Psi \alpha^1$ e $\Psi \alpha^2$); o gene ζ^2 e o seu pseudogene ($\Psi \zeta^1$), além do gene θ^1 (Fig. 1.1 A). Estes pseudogenes, apesar de

possuírem estrutura similar aos seus genes correspondentes, não expressam nenhuma cadeia polipeptídica (STEINBERG & BENZ JUNIOR, 1995; WEATHERAL & PROVAN, 2000).

O grupo de genes não- α reúne seis genes no segmento 5' a 3': o gene ϵ ; dois genes γ (γ^A e γ^G); um pseudogene β ($\psi \beta$) e os genes δ e β . As cadeias polipeptídicas produzidas pelos dois genes γ , diferem no aminoácido localizado na posição 136, podendo ser uma glicina (γ^G) ou alanina (γ^A), decorrente de mecanismos de duplicação e conversão gênica (Fig. 1.1 B). Além disso, a cadeia γ^A possui um sítio polimórfico na posição 75, que pode ser ocupado por uma isoleucina (γ_I^A) ou uma treonina (γ_T^A) (BHAUMICK, 1994; STAMATOYANNOPOULOS & NIENHUIS, 1994; BORDIN et al, 1997; WEATHERAL & PROVAN, 2000).

A organização dos genes da globina humana localizados nos cromossomos 16 e 11 seguem a mesma ordem em que são expressos, sugerindo que mudanças ocorridas na expressão dependem da proximidade e disposição espacial apresentadas. Quanto ao gene θ , ainda não está claro se o seu produto é capaz de participar na formação de uma hemoglobina funcional, uma vez que a sua deleção, comprovadamente não altera o desenvolvimento fetal (RAMALHO, 1986; BHERINGER et al, 1990; WEATHERAL & PROVAN, 2000).

Nos animais vertebrados, paralelamente ao desenvolvimento morfofisiológico que ocorre na gestação, são verificadas mudanças nos diferentes tipos de hemoglobinas características de cada espécie. Na espécie humana, a eritropoese inicia-se nas ilhotas sangüíneas do saco vitelínico, passando ao fígado (5^a a 20^a semana gestacional) e,

subsequentemente ao baço e medula óssea (STAMATOYANNOPOULOS & NIENHUIS, 1994; NAOUM, 1997).

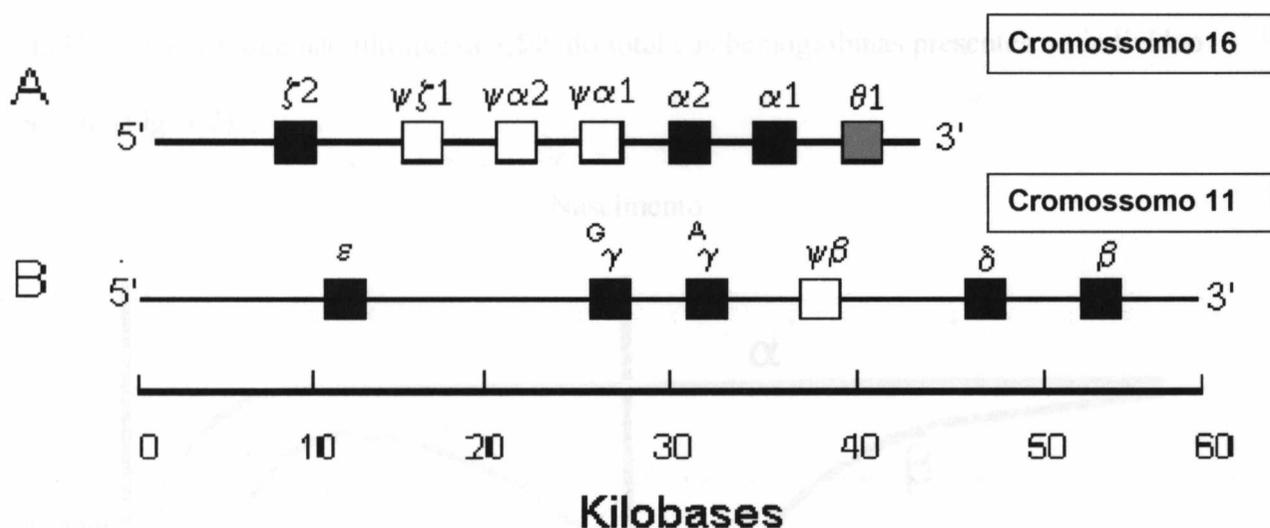


Figura 1.1 Representação dos loci dos genes das globinas α e não- α humana. Em A, estão representados o grupo de genes da globina α , localizado no braço curto do cromossomo 16, fração 16p, 13.3; em B, o grupo de genes da globina não- α , localizado no braço curto do cromossomo 11. Adaptado de WEATHERALL & PROVAN, 2000.

A cadeia ζ é sintetizada logo no início da vida embrionária, sendo rapidamente substituída pela cadeia α . A primeira globina do grupo não- α a ser detectada é a ϵ , que aparece nos primeiros meses após a concepção, sendo logo substituída pelas cadeias γ do período fetal (STEINBERG & BENZ JUNIOR, 1995; NAOUM, 1997). A cadeia β começa a ser sintetizada do segundo ao terceiro mês de vida intra-uterina e, após o nascimento substitui quase totalmente a síntese das cadeias γ da Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$) (*switching*), que após os seis meses de vida representa menos que 2% do total de hemoglobinas, juntamente com

a HbA₁ ($\alpha_2\beta_2$), que corresponde a 95% das hemoglobinas presentes no indivíduo adulto normal. A produção de cadeias δ tem início um pouco antes do nascimento, fazendo parte da HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), que não ultrapassa 3,5% do total das hemoglobinas presentes no indivíduo adulto (Fig. 1.2).

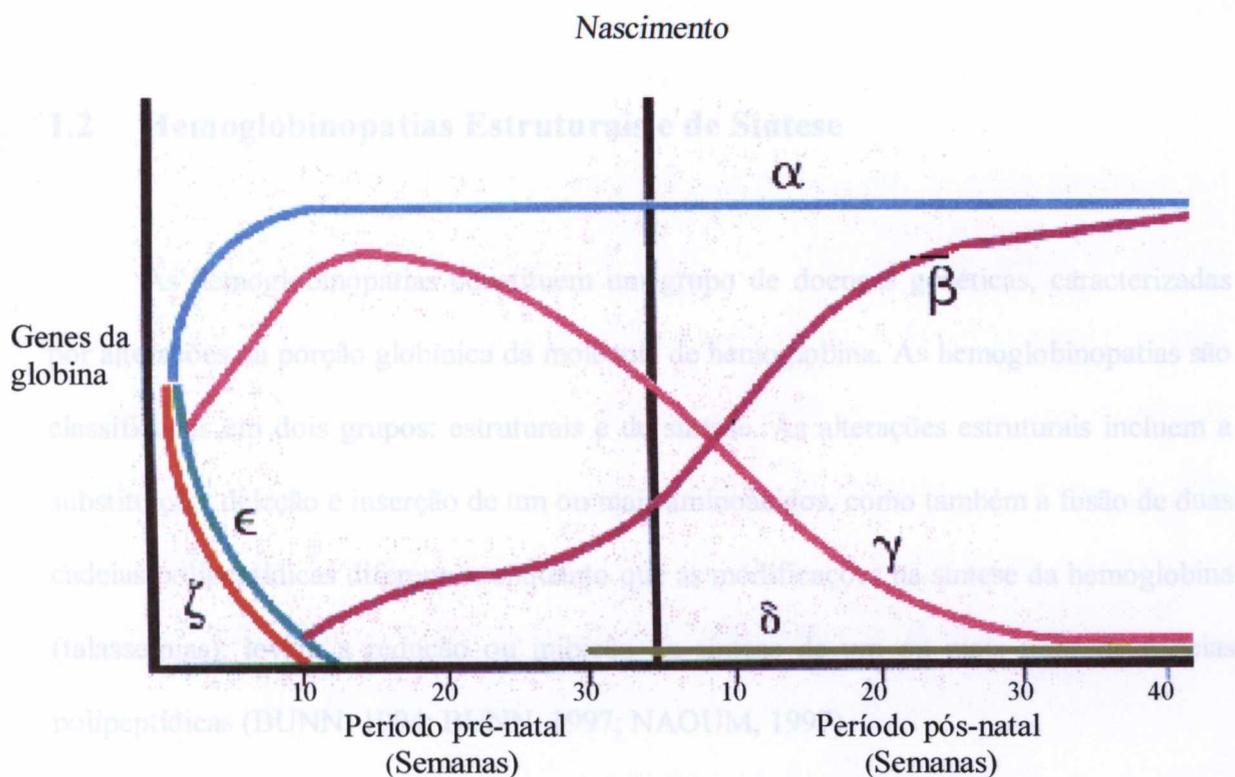


Figura 1.2. Expressão dos genes da globina em diferentes períodos do desenvolvimento ontogênico humano. Adaptado de ISRAELS & ISRAELS, 1998.

Deste modo, os genes da globina participam da composição das hemoglobinas do período embrionário – Hb Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$) e Hb Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$), Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) e Hb Portland II ($\zeta_2\beta_2$); do período fetal – Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$) e da vida adulta - HbA₁ ($\alpha_2\beta_2$) e HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) (RAMALHO, 1986; STAMATOYANNOPOULOS & NIENHUIS, 1994; STEINBERG et al, 1995). O gene ε é ativo durante a vida embrionária e os genes δ e β têm

atividade maior após o nascimento; os dois genes γ são ativos, principalmente, durante a vida fetal, apresentando uma relação de $70\%\gamma^G : 30\%\gamma^A$, que na vida adulta passa a $40\%\gamma^G : 60\%\gamma^A$ (BOOKCHIN et al, 1975; BOOKCHIN et al, 1977; BUNN & FORGET, 1986; BHAUMIK, 1994).

1.2 Hemoglobinopatias Estruturais e de Síntese

As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças genéticas, caracterizadas por alterações da porção globínica da molécula de hemoglobina. As hemoglobinopatias são classificadas em dois grupos: estruturais e de síntese. As alterações estruturais incluem a substituição, deleção e inserção de um ou mais aminoácidos, como também a fusão de duas cadeias polipeptídicas diferentes, enquanto que as modificações na síntese da hemoglobina (talassemias), levam a redução ou inibição da síntese de um ou mais tipos de cadeias polipeptídicas (BUNN, 1994; BUNN, 1997; NAOUM, 1997).

As hemoglobinopatias clinicamente mais importantes são aquelas que envolvem anomalias dos genes α e β , apresentando gravidade variável na dependência da herança, definida pelo caráter dominante, existindo nas formas homozigóticas e heterozigóticas. Alterações envolvendo as cadeias γ , ϵ e ζ são, na maioria das vezes letais, uma vez que são produzidas nos períodos embrionário e fetal (NAGEL et al, 1979; CHARACHE, 1990; NAOUM, 1997).

1.3 Hemoglobinopatias Estruturais

A grande maioria das variantes estruturais da hemoglobina é consequência de mutações pontuais que podem ocorrer nos codons dos genes da globina, resultando na substituição de um único aminoácido. Entre as variantes estruturais mais frequentemente encontradas, podemos citar as HbS, HbC, HbD e HbE (CHARACHE, 1990).

A hemoglobina S (HbS) é caracterizada pela substituição do ácido glutâmico por uma valina, decorrente da mutação pontual $\text{GAG} \rightarrow \text{GTG}$ no sexto códon do gene da globina β , possuindo uma distribuição geográfica preferencial na África Tropical (Central e Ocidental) (DOVER et al, 1981; BHERINGER et al, 1990). A HbS tende a polimerizar-se em baixas tensões de oxigênio, formando estruturas filamentosas (polímeros de HbS deoxigenada) que se depositam nas hemácias, modificando a sua forma e tornando-as falciformes (*sickle-cell*). O fenômeno de falcização pode ser revertido, quando níveis ótimos de oxigênio são novamente atingidos, sendo que após sucessivas falcizações, as hemácias podem adquirir formas irreversivelmente falcizadas (SMITH et al, 1981; ANTONARAKIS et al, 1984; EMBURY, 1995; CHANG et al, 1997).

Os heterozigotos para a HbS são denominados portadores do traço falcêmico (HbAS) e suas hemácias contêm aproximadamente 20 a 45% de HbS, além das hemoglobinas A₁, A₂ e fetal (SMITH et al, 1981; EMBURY, 1995; CHANG et al, 1997; WEATHERALL & PROVAN, 2000). Apesar destes indivíduos serem hematologicamente normais e assintomáticos, em situações de *stress*, onde ocorre uma baixa tensão de oxigênio, pode ocorrer falcização, acompanhada por crises dolorosas e infartamento esplênico (NAOUM, 1997).

Os homocigotos para a HbS (SS) apresentam a anemia falciforme, com os eritrócitos contendo 80% ou mais de HbS. A grande quantidade de HbS causa rigidez dos eritrócitos, levando a obstrução de pequenos e médios vasos sanguíneos, com formação de trombos, infarto de tecidos, acompanhada por fibrose e calcificação (WANG & LUKENS, 1999). Os portadores desta anemia possuem um quadro clínico heterogêneo, apresentando retardo no crescimento e desenvolvimento, além de alterações múltiplas no diversos órgãos, provenientes da hemólise contínua e dos fenômenos de vaso-oclusão (AZEVEDO et al, 1980; BUNN & FORGET, 1986; RAMALHO, 1986; GONÇALVES et al, 1994; SERJEANT et al, 1996; BUNN, 1997). A asplenia funcional que ocorre progressivamente, dificulta a opsonização de bactérias capsuladas, favorecendo a ocorrência de infecções, sendo a maior causa de morbidade e mortalidade entre os indivíduos com anemia falciforme. As crianças com menos de cinco anos de idade, são bastante susceptíveis à infecções bacterianas, principalmente, pelo *Streptococcus pneumoniae*, enquanto que em adultos, usualmente os agentes bacterianos são *Staphylococcus aureus* ou *Haemophilus sp*, além de outras bactérias menos frequentes, tais como, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella sp* e *Shigella* (BUNN & FORGET, 1986; EMBURY, 1995; GILL, et al, 1995; NAOUM & DOMINGOS, 1997).

Apesar dos indivíduos portadores desta anemia possuírem a mesma mutação, vários fatores são descritos por alterarem o quadro clínico da doença, tais como, a presença de talassemia α , variações nos níveis da HbF, tipo de haplótipos que estão ligados à presença ou ausência de sítios polimórficos para endonucleases de restrição localizados no grupo de genes da globina β , mutações nas regiões promotoras dos genes γ^G e γ^A e a presença de variações no segundo sítio hipersensível à DNase I (HS2) da região controladora do locus

da globina β (LCR) (PHILIPSEN et al, 1990; BUNN, 1994; CHANG et al, 1997; GIL, 1998).

Vários estudos realizados no Brasil relatam a freqüência elevada de hemoglobinas anormais. KALMUS em 1957 encontrou 15,7% de freqüência de HbS em habitantes da cidade de Amoreiras - Bahia e PEIXOTO et al (1963) detectaram 4,5% de HbS em habitantes de Paulo Afonso - Bahia. No estudo realizado por AZEVÊDO et al (1980) em 1.200 escolares do estado da Bahia foi registrado a freqüência de 7,4% para os heterozigotos AS, variando de acordo com o grupo racial, atingindo níveis de 4,4% entre os brancos e 14% entre a população negra; RAMALHO (1986) relatou a freqüência alélica do gene β^S em 6,6% em heterozigotos pertencentes as populações negróides do sul e sudeste brasileiros, com uma freqüência estimada para o nascimento de crianças homozigotas de 0,1%. O estudo de várias grupos populacionais, levando em consideração os grupos raciais, demonstrou que a prevalência da HbS era menor na população caucasóide do que na negróide, sendo que na Bahia foi registrada a prevalência de 3,68% entre os caucasóides e de 6,31% entre os negróides (ALVARES FILHO et al, 1995).

A HbD é uma variante que apresenta a mesma mobilidade eletroforética que a HbS em pH alcalino, sendo diferenciada através da eletroforese em pH ácido, na qual apresenta mobilidade semelhante a HbA e pelos testes de falcização e de solubilidade. Na eletroforese em pH alcalino, a posição da HbD também é ocupada por dezenas de outras Hb variantes, das quais cinco receberam o nome de HbD, apesar de se diferenciarem bioquimicamente entre si: a HbD Los Angeles ($\beta 121$ Gln \rightarrow Glu); a HbD Bushman ($\beta 16$ Gli \rightarrow Arg); HbD Ouled Rabah ($\beta 19$ Asn \rightarrow Lis); HbD Iran ($\beta 22$ Glu \rightarrow Gln) e a HbD Idaban ($\beta 87$ Tre \rightarrow

Lis). A HbD mais prevalente é a Los Angeles, encontrado-se na freqüência de 3% entre os povos do noroeste da Índia, sendo raros os relatos de homozigose (NAOUM, 1997; PEREA et al, 1999).

As hemoglobinas E e C também resultam da substituição de aminoácidos na cadeia da globina β . A HbE é decorrente da mutação GAG \rightarrow AAG no *codon* 26 do gene da globina β , resultando na substituição do ácido glutâmico por uma lisina, sendo comum no Sudeste da Ásia, podendo ser encontrado em imigrantes da Europa, América do Norte e Austrália. Os heterozigotos têm 20 a 30% de HbE, são assintomáticos e, geralmente, não apresentam anemia; os homozigotos possuem anemia moderada com presença de numerosas hemácias em alvo (*target cells*) (BUNN & FORGET, 1986; BUNN, 1994; NAOUM, 1997).

A HbC resulta da substituição da guanina por uma adenina (GAG \rightarrow AAG) no sexto códon do gene da globina β , levando à substituição do ácido glutâmico por uma lisina (Glu

Lys) na sexta posição da cadeia β ; esta Hb é comum no Oeste Africano, com freqüência de 7 a 22% na população da Nigéria e Norte de Ghana, respectivamente. Os heterozigotos têm 30 a 40% de HbC, são assintomáticos, não apresentam anemia e possuem de 6 a 40% de hemácias em alvo. Os homozigotos têm anemia moderada, caracterizada por numerosas hemácias em alvo e esplenomegalia (BUNN & FORGET, 1986; BUNN, 1994; NAOUM, 1997).

A HbC apresenta uma freqüência elevada no Brasil, sendo a segunda Hb variante de maior ocorrência depois da HbS; RAMOS et al (1970), encontraram na cidade do Salvador, 1,5% de traço para a HbC (AC), enquanto que OLIVEIRA (1999), em estudo envolvendo

1953 gestantes, registrou 3,28% de heterozigose para a HbC e 0,05% para o estado homozigótico (CC). Os indivíduos portadores da associação entre HbS e HbC, possuem a doença SC, caracterizada por anemia menos grave que a presente na anemia falciforme (SS), exceto pela ocorrência de doença vascular da retina e necrose das extremidade dos ossos longos (BUNN & FORGET, 1986; LANE et al, 1995; BUNN, 1997; NAOUM, 1997).

1.3 Hemoglobinopatias de Síntese ou Talassemias

As síndromes talassêmicas são caracterizadas pela deficiência ou ausência na síntese de cadeias da globina, sendo classificadas de acordo com o gene da globina afetado. Assim, existem vários tipos de talassemias, as quais podem ser classificadas em α , β , γ , δ , $\gamma\beta$, $\epsilon\gamma\beta$ e Persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF). As talassemias α e β são as mais frequentes, devido ao fato de comporem a HbA₁ ($\alpha_2\beta_2$), predominante no indivíduo adulto normal (STEINBERG et al, 1995b; NAOUM, 1997; LUKENS, 1999; WENNING et al, 2000).

As talassemias α envolvem alterações dos genes α^1 e α^2 , cujo principal mecanismo genético é a deleção gênica que pode ocorrer em um ou ambos genes α , existindo também, de forma menos freqüente, as mutações pontuais. Desta forma, a thal α^2 ou α^+ é aquela que apresenta perda de um dos genes α em pelo menos um dos cromossomos ($-\alpha/\alpha\alpha$) e a thal α^1 ou α^0 é aquela caracterizada pela perda de dois genes α no mesmo cromossomo ($—/\alpha\alpha$). Ambas as talassemias são mais prevalentes no Sudeste da Ásia, China, África e na região do Mediterrâneo (ADAMS et al, 1994; FOGLIETTA et al, 1996).

Os genes α estão localizados no braço curto do cromossomo 16, dentro de regiões homólogas, de aproximadamente 4Kb, provavelmente geradas pela duplicação de um gene ancestral, que se subdividiu por deleções e inserções, originando três sub-segmentos, denominados X, Y e Z, que são interrompidos por pequenas regiões não homólogas (I, II, III) (Fig. 1.3) (WEATHERALL & CLEGG, 1981; WEATHERALL, 1995; FOGLIETTA et al, 1996) . Os genes α^1 e α^2 estão localizados nas sub-regiões Z^1 e Z^2 , respectivamente, apresentando seqüências codificadoras idênticas, diferindo apenas no segundo íntron, com a substituição de dois e inserção de sete nucleotídeos e na região 3' não codificante, onde há deleção de um e substituição de dezoito nucleotídeos no gene α^1 (SONATI, 1990; FOGLIETTA et al, 1996).

Estudos envolvendo o mapeamento e seqüenciamento gênico reforçam a presença de homologia em todo o grupo de genes α , provavelmente devido a características genéticas evolucionárias comuns, decorrentes de fenômenos de conversão gênica e eventos de recombinação homóloga desigual (“*crossing-over*”) (SONATI, 1990; BAYSAL & HUISMAN, 1994).

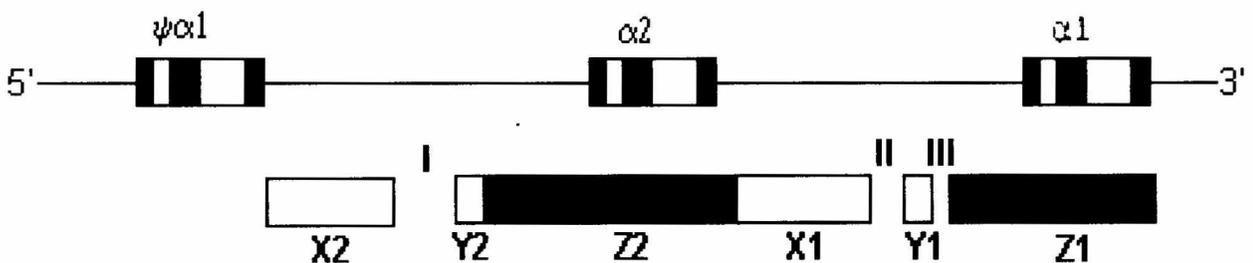


Figura 1.3. Representação esquemática dos segmentos homólogos X, Y e Z presentes no grupo de genes da globina α . Adaptado de SONATI, 1990

O alto grau de homologia presente nos genes α favorece a ocorrência de recombinação (*crossing-over* desigual) durante a meiose, resultando na deleção do gene α em um cromossomo ($-\alpha$) e a ocorrência de triplicação no outro ($\alpha\alpha\alpha$). Assim, a talassemia α^2 pode apresentar-se mais comumente em decorrência de duas deleções, a de 3,7Kb e a de 4,2Kb (DODÉ et al, 1992; NAOUM, 1997).

A talassemia $-\alpha_2^{3.7\text{Kb}}$ pode ser subdividida em dois tipos, a depender da localização do *crossing-over* na região Z; tipo I, quando o *crossing-over* localiza-se à esquerda do sítio para a enzima de restrição Apa I, sendo que o híbrido do gene α possui o sítio para enzima de restrição; e o tipo II, quando o *crossing-over* é a direita do sítio para a mesma enzima de restrição e o gene α híbrido não possui o sítio para a enzima de restrição. Este evento propicia o aparecimento de um gene α em um cromossomo e uma triplicata $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$ no outro (Fig. 1.4 A). A talassemia $-\alpha^{4.2}$ ocorre devido ao *crossing-over* desigual nas regiões homólogas X_2 e X_1 . Neste caso, a deleção resulta na ausência de expressão de um dos genes α em um dos cromossomos e a formação da triplicação $\alpha\alpha\alpha^{4.2\text{Kb}}$ no outro; a deleção de 4.2 kb abrange todo o gene α_2 (FOGLIETTA et al, 1996), mantendo o gene α_1 intacto (BAYSAL & HUISMAN, 1994) (Fig. 1.4 B).

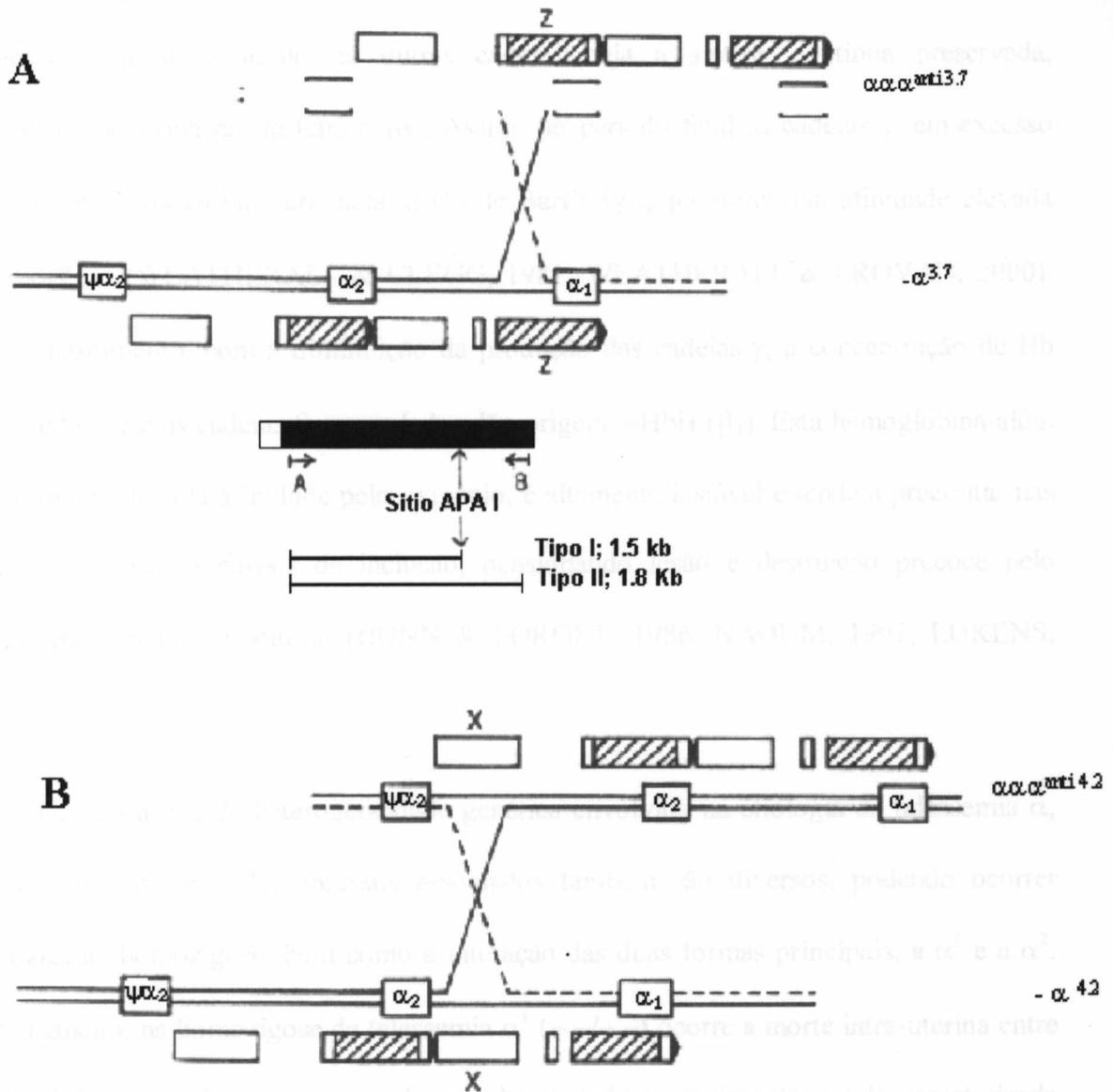


Figura 1.4. Em A, diagrama do evento de recombinação recíproca entre as regiões homólogas Z produzindo a deleção $-\alpha_2^{3.7\text{Kb}}$, a triplicação $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3.7\text{Kb}}$ e a localização do sítio para a enzima de restrição Apa I inserido na região IVS-II do gene α_1 , presente no tipo I, mas não no tipo II da tal- $\alpha_2^{3.7\text{Kb}}$. Em B, *crossing-over* à direita do evento ocorrido entre as regiões X (*crossing-over* a esquerda) produzindo a deleção $-\alpha^{4.2\text{Kb}}$ e a triplicação $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4.2\text{Kb}}$. Adaptado de FOGLIETTA et al, 1996.

A redução das cadeias α , além de ocasionar menor formação de hemoglobina nas hemácias, leva ao acúmulo de outras cadeias cuja a síntese continua preservada, favorecendo a formação de tetrâmeros. Assim, no período fetal as cadeias γ em excesso formam uma hemoglobina anômala, a Hb de Bart's (γ_4), que apresenta afinidade elevada pelo oxigênio (WEATHERALL & CLEGG, 1981; WEATHERALL & PROVAN, 2000). Após o nascimento, com a diminuição da produção das cadeias γ , a concentração de Hb Bart's reduz-se e as cadeias β acumuladas dão origem a HbH (β_4). Esta hemoglobina além de apresentar elevada afinidade pelo oxigênio, é altamente instável e tende a precipitar nas hemácias, formando corpos de inclusão, ocasionando lesão e destruição precoce pelo sistema monocítico fagocitário (BUNN & FORGET, 1986; NAOUM, 1997; LUKENS, 1999).

Devido a grande heterogeneidade genética envolvida na etiologia da talassemia α , os aspectos clínicos e laboratoriais associados também são diversos, podendo ocorrer heterozigose, homozigose, bem como a interação das duas formas principais, a α^1 e a α^2 . Desta maneira, na homozigose da talassemia α^1 ($-/-$) ocorre a morte intra-uterina entre a 34^a e 40^a semana de gestação ou algumas horas após o nascimento, sendo caracterizada por hidropsia fetal, com predomínio da Hb Bart's e pequena quantidade da Hb Portland. Os principais sinais clínicos são palidez, edema, ascite, hidropsia grave e hepatoesplenomegalia, com quadro semelhante a hidropsia fetal decorrente da incompatibilidade do fator Rh. O sangue periférico apresenta microcitose intensa, hipocromia, reticulocitose, e numerosos eritroblastos (WEATHERALL, 1995). A homozigose para a thal α^2 ($-\alpha/-\alpha$) e a heterozigose para a thal α^1 ($-\alpha/\alpha$), caracterizam-se

por anemia moderada, podendo ocorrer alterações morfológicas das hemácias; a heterozigose para a thal α^2 ($-\alpha/\alpha\alpha$) não apresenta alteração detectável, cursando ou não com anemia discreta (HIGGS et al, 1980; BUNN & FORGET, 1986; FOGLIETTA et al, 1996; WEATHERALL & PROVAN, 2000). A heterozigose dupla α^1/α^2 , denominada doença da HbH, apresenta diminuição da HbA₁, com formação de HbH e pequenas quantidades da Hb Bart's. Por ser bastante instável, a HbH precipita no interior dos eritrócitos, formando os corpúsculos de Heinz, que são removidos durante a passagem das células pelo baço. O quadro clínico é muito variável, com anemia caracterizada por hipocromia e poiquilocitose, além de esplenomegalia (HIGGS et al, 1980; BUNN & FORGET, 1986). O Quadro 1.1 descreve os tipos de talassemia α , as principais alterações hematológicas e as hemoglobinas presentes.

Quadro 1.1. Descrição dos vários tipos de talassemia α , seus genótipos, tipos de hemoglobinas e achados hematológicos mais freqüentes

DENOMINAÇÃO	GENÓTIPO α	ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E DE HEMOGLOBINAS
Talassemia α^2 Heterozigótica	$-\alpha / \alpha\alpha$	0 a 3% de Hb Bart's ao nascimento, alterações hematológicas mínimas ou ausentes.
Talassemia α^2 Homozigótica	$-\alpha / -\alpha$	5 a 10% de Hb Bart's ao nascimento, microcitose e hipocromia discretas.
Talassemia α^1 Heterozigótica	$-- / \alpha\alpha$	Similares aos da talassemia α^+ homozigótica
Talassemia α^1 Homozigótica	$-- / --$	Aproximadamente 100% de Hb Bart's - Hidropsia Fetal
Interação α^1 e α^2	$(-- / -\alpha)$	25 a 50% de Hb Bart's ao nascimento; 5 a 30% de Hb H na vida adulta - Doença da Hb H

Adaptado de SONATI, 1990

A talassemia α ocorre com incidência elevada entre os povos da Ásia e Oceania, Oriente Médio e Mediterrâneo, com distribuição universal em todo o continente Africano, apresentando freqüência elevada no Brasil, sendo a deleção $-\alpha_2^{3.7Kb}$ a forma mais comumente encontrada. SONATI (1990) registraram 11,90% de talassemia α em um estudo envolvendo uma população negróide do sudeste do Brasil.

1.5 Associação entre a Talassemia α e Hemoglobinas Variantes

A talassemia α pode estar associada a hemoglobinopatias estruturais, como a HbS e HbC. Alguns trabalhos têm demonstrado que indivíduos com anemia falciforme e deleção dos genes α , possuem sobrevida maior que os indivíduos falcêmicos portadores de genes α normais, indicando que esta associação favorece o curso benigno da doença. O efeito protetor da talassemia α em falcêmicos é decorrente de modificações nos parâmetros hematológicos, com diminuição do grau de hemólise devido a redução da concentração de hemoglobina corpuscular média (MEARS et al, 1983). Estes indivíduos possuem volume corpuscular médio (VCM) diminuído, hemoglobina, hematócrito e número de hemácias aumentados, com redução da contagem de reticulócitos (HIGGS, et al, 1980; ADAMS et al, 1994). O mecanismo desta proteção está associado ao aumento da relação superfície / volume celular, reduzindo as lesões ocorridas na membrana dos eritrócitos provenientes da perda de cátions e desidratação celular. Nas células mais hidratadas e com a concentração intraeritrocitária de HbS reduzida, ocorre diminuição da concentração corpuscular média, com conseqüente retardo da polimerização da HbS desoxigenada (STEINBERG & EMBURY, 1986; WEATHERALL, 1995). A presença da talassemia α^2 em pacientes falcêmicos, além de proporcionar uma sobrevida maior, também reduz a ocorrência de úlceras crônicas na região maleolar de membros inferiores; no entanto, como conseqüência da redução da hemólise e aumento do hematócrito, pode haver elevação da viscosidade sangüínea, com conseqüente aumento dos riscos para a ocorrência de manifestações vasculares oclusivas. Assim, a gravidade e a freqüência das crises de dores ósseas não são reduzidas,

podendo ocorrer complicações clínicas, como a necrose óssea e retinopatias (STEINBERG & EMBURY, 1986; WEATHERALL & PROVAN, 2000).

Nos heterozigotos AS, a associação da talassemia α tem como efeito principal a redução da HbS, que é proporcional ao número de genes α presentes. As cadeias β^S normalmente têm afinidade menor pelas cadeias α do que as β normais, sendo que a talassemia α intensifica a competição entre as cadeias β normais e as variantes, resultando na formação de quantidades menores da HbS. Da mesma forma, a presença da talassemia α em indivíduos heterozigotos para a HbC, provavelmente reduz os níveis da hemoglobina variante, por mecanismo semelhante (SONATI, 1990; STEINBERG, 1996).

1.6 Triagem Neonatal

Em 1987, a conferência *Consensus Development Conference Statement* (NHI,61) recomendou a triagem de hemoglobinopatias em recém-nascidos (RN), visando a diminuição da morbidade e mortalidade por sepsis em crianças com anemia falciforme. Nos Estados Unidos, VICHINSKY et al (1988) encontram uma incidência da doença falciforme em 1/951 nascimentos; na Califórnia, um programa de triagem neonatal para a anemia falciforme realizado durante quatro anos, revelou que entre 2 milhões de crianças analisadas, 492 foram diagnosticadas como portadoras da doença falciforme, sendo que 290 apresentavam padrão SS, 143 SC e 47 possuíam a HbS associada a talassemia beta⁺ (SHAFER et al, 1996). Em países da Europa onde há uma preocupação com o aumento de imigrantes portadores do traço falciforme, vários programas de triagem foram

desenvolvidos com o objetivo de identificar precocemente os indivíduos falcêmicos, assim como, os talassêmicos (VAN DEN DIJS et al, 1992).

Nos Estados Unidos, a triagem para hemoglobinopatias tornou-se obrigatória em muitos estados, com o objetivo de identificar portadores do traço falcêmico e indivíduos com anemia falciforme, reduzindo de forma significativa as taxas de morbidade e mortalidade. Neste país, aproximadamente, 2.000 crianças nascem com anemia falciforme ao ano; 50.000 com traço falciforme e mais de 20.000 com outras hemoglobinas variantes (C, D ou E) (SHAFER et al, 1996). Em estudo desenvolvido entre descendentes de chineses no Canadá, foram encontrados 5% de portadores da talassemia α , sendo que entre os casais portadores desta alteração, 26% foram identificados através do diagnóstico pré-natal, com relato de hidropsia fetal (YONG et al, 1999). Devido a frequência elevada destas hemoglobinopatias na Europa e em países da Ásia, foram também implantados programas de rastreamento neonatal, com o objetivo de identificar precocemente estas doenças (VAN DER DIJS et al, 1992; DAY et al, 1997).

O diagnóstico precoce das hemoglobinopatias, tem demonstrado impacto significativo na morbidade e mortalidade, uma vez que permite a admissão imediata dos RN afetados em programas de assistência médica específica, a educação dos pais e a identificação dos primeiros sinais e sintomas das complicações de risco e na forma de proceder diante da necessidade de uma intervenção médica apropriada. Além disso, a triagem neonatal permite o estabelecimento de profilaxia precoce para infecções. No caso da anemia falciforme, o diagnóstico precoce proporciona a identificação de complicações graves, como o acidente vascular cerebral, bem como a realização do aconselhamento genético (SILLA, 1999).

No Brasil, alguns estados têm implantado programas de triagem neonatal para anemia falciforme, São Paulo, Minas Gerais, Brasília, Pernambuco e Rio Grande do Sul. Minas Gerais iniciou a triagem em RN para detecção de fenilcetonúria e hipotireoidismo em 1993 e para a anemia falciforme em 1998, tendo sido examinadas 605.419 crianças nos primeiros 25 meses, encontrando-se a frequência de 3,2% para heterozigose da HbS, 1,3% para heterozigose da HbC e 0,08% para anemia falciforme (SS). Em Campinas - SP, o programa de triagem neonatal para anemia falciforme foi implantado em 1992, atendendo a 55 maternidades de 35 cidades próximas à região. Até o ano de 1999, foram analisados 155.903 amostras de sangue de recém-nascidos, encontrando-se 2,03% de hemoglobinas variantes, sendo 0,02% homozigotos para Hb anormais, que foram encaminhados para recebimento de assistência médica adequada (SERJEANT, 2000).

Considerando a grande miscigenação racial existente no Brasil e a grande influência dos povos negros nesta região, a triagem de hemoglobinopatias em RN, avaliando características hematológicas, de hemoglobinas e moleculares, contribuirá para o estabelecimento de um programa de aconselhamento genético, prevenção e acompanhamento destas crianças, além de poder colaborar para um melhor entendimento da diversidade étnica da nossa população.

De acordo com o exposto, a realização do presente trabalho, pretende colaborar na obtenção de dados que justifiquem a realização sistemática do rastreamento neonatal para hemoglobinopatias no Estado da Bahia.

2. OBJETIVOS

A realização do presente estudo teve como objetivo geral investigar a presença de hemoglobinopatias estruturais e de síntese em um grupo de RN da cidade do Salvador – Bahia. Diante disso, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

1. Determinar o padrão hematológico e de hemoglobinas na população em estudo;
2. Determinar a frequência das talassemias α^2 , por deleção de 3,7 Kb e 4,2 Kb;
3. Correlacionar os dados de hemoglobinas, hematológicos e molecular.

3. JUSTIFICATIVA

O estudo das hemoglobinopatias em RN proporciona o diagnóstico precoce destas doenças, possibilitando o acompanhamento clínico adequado, melhorando a qualidade de vida e a sobrevivência dos seus portadores. Crianças com anemia falciforme apresentam maior suscetibilidade a infecções bacterianas, particularmente por *S. pneumoniae*, com maior risco de infecção durante os primeiros anos de vida, que associada a crises de seqüestração esplênica, compreendem as principais causas de mortalidade infantil (http://odp.od.nih.gov/consensus/cons/061/061_statement.htm). Nos países onde a triagem neonatal para hemoglobinopatias foi instituída, ocorreu a redução da mortalidade por infecções pneumocócicas de 40% para 10% e a mortalidade geral de 8% para 1,8%, através do uso profilático de antibióticos, imunizações e acompanhamento médico adequado (VICHINSKY et al, 1988; WILLIAMS et al, 1998; JOINER, 2000). No Brasil, o Núcleo de Pesquisas em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Universidade Federal de Minas Gerais, considerado modelo na América do Sul, possui um programa de triagem neonatal para anemia falciforme, que oferece além da assistência médica adequada aos portadores de anemia, o aconselhamento às famílias, envolvendo profissionais de diversos setores da saúde, que trabalham na educação dos familiares com instruções para a detecção precoce das crises de seqüestração esplênica aguda, com redução significativa da morbidade e mortalidade das crianças portadoras, diminuindo com isso as internações hospitalares e os gastos públicos com estes indivíduos (SERJEANT, 2000).

O diagnóstico precoce das talassemias, mostra-se também de grande importância, podendo evitar a administração terapêutica iatrogênica de composto de ferro nos portadores de traços talassêmicos, uma vez que as alterações hematológicas presentes nestas anemias podem ser confundidas com as encontradas na anemia ferropriva (SONATI, 1990; YONG et al, 1999).

O estado da Bahia possui deficiência quanto a instituição de diagnóstico, aconselhamento, acompanhamento dos pacientes, casais e famílias de portadores de anemias genéticas. Portanto, este estudo faz-se necessário, principalmente quando se avalia dados referentes a uma mortalidade infantil de 9,5% para crianças menores de um ano na Bahia e, a frequência elevada de abortos (52,2%). Além disso, o Estado da Bahia apresenta 6,1% de crianças nascidas com icterícias patológicas, 7,7% com peso abaixo do normal e 11,9% com anemia não esclarecida (IDB, 1997).

Considerando que o Estado da Bahia possui uma das maiores frequências do Brasil para as hemoglobinas S e C, atingindo níveis que variam de 7 a 14% e 1,5 a 3,5%, respectivamente, além de 20% de frequência para a talassemia α , o estudo em RN de Salvador proporcionará uma expectativa maior de vida para as crianças portadoras de anemias graves, estimulando a instituição de programa de acompanhamento clínico adequado, que deve ser considerado como uma meta a ser desenvolvida pelo Ministério da Saúde.

4. CASUÍSTICA

4.1 Seleção dos Recém-Nascidos

Foi realizado um inquérito epidemiológico em RN da Maternidade Pública Tsylla Balbino (SESAB), cujas gestantes internadas são originárias de diversos bairros e região metropolitana da cidade do Salvador - Bahia. Esta maternidade atende em média dez mil e quinhentos gestantes por ano, sendo que sua grande maioria é de poder aquisitivo baixo. Durante o período de coleta, fevereiro a junho de 2000, foram registrados dois mil novecentos e cinquenta e oito nascimentos por parto normal, tipo de parto predominante na maternidade, sendo que as amostras coletadas equivaleram a 20,28% (600) do total de RN do período.

A seleção dos RN foi feita ao acaso, utilizando-se como critério de inclusão no estudo, o fato de terem nascido de parto normal, nativos e cujas mães responderam ao questionário contendo informações individuais e referentes a história obstétrica e pregressa (Anexo I). Foi também levado em conta a assinatura do termo de consentimento (Anexo II) pelos pais ou responsáveis dos RN, após informação quanto a finalidade da pesquisa. Foram adotados como critérios de exclusão, a presença de mal formação neonatal, a recusa em assinar o termo de consentimento, bem como o fato de não responder ao questionário.

As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM - FIOCRUZ), onde realizou-se as análises.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletados do cordão umbilical dos RN, 5mL de sangue em EDTA (ácido etileno deaminotetracético sódico), na concentração de 1,5mg/mL (DACIE & LEWIS, 1984; RAMALHO, 1986). A amostra destinou-se a determinação dos valores hematológicos, obtenção do hemolisado para a análise das hemoglobinas e extração do DNA genômico.

5.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

Os valores hematológicos e índices hematimétricos foram determinados em contador eletrônico (*Coulter Count T – 890*) e a análise morfológica das hemácias realizada pela observação microscópica dos esfregaços sangüíneos corados pela técnica de Wright (DACIE & LEWIS, 1984).

5.3 ANÁLISE DAS HEMOGLOBINAS

O hemolisado (solução de hemoglobinas) foi preparado a partir das hemácias obtidas de 2,0mL de sangue, após centrifugação a 1500 rpm (rotações por minuto) (424,8x g) por 10 minutos. As hemácias foram lavadas três vezes em solução salina isotônica (cloreto de sódio a 0,85%), centrifugadas a 1.500 rpm (424,8x g) por 10 min e lisadas em 1,0 volume de água destilada e 0,5 volume de clorofórmio (CHCl₃). Após agitação

vigorosa e centrifugação por 20 min a 3.000 rpm (1.699,2x g), a camada superior que constitui o hemolisado, foi transferida para outro tubo, desprezando-se o estroma e o solvente orgânico que constituíram a camada inferior. Adicionou-se 100µL de solução de cianeto de potássio (KCN a 1%) destinada a conservação da amostra, sendo que o hemolisado foi armazenado a -20° C até o momento da análise (ZAGO, et al, 1983; DACIE & LEWIS, 1984).

A análise qualitativa das hemoglobinas foi realizada através da corrida eletroforética horizontal em gel de ágar a 1% em tampão Citrato – Ácido Cítrico (0,05M) pH 6,0, durante 4:00H a 80mA. O gel foi corado com benzidina (1% em ácido acético) e nitroprussiato de sódio (0,33% em água destilada) na proporção de 1:4 e revelado com água oxigenada (H₂O₂ 10V) (DACIE & LEWIS, 1984). O resultado obtido na eletroforese ácida foi confirmado pela eletroforese em fitas de acetato de celulose, utilizando o tampão tris-borato-EDTA pH 8,9, durante 40 minutos, a 220 Volts (WEATHERALL & CLEGG, 1981). Durante cada corrida eletroforética, foram utilizados padrões de hemoglobina contendo HbS + HbC, HbA + HbS e HbA + HbC, que serviram como referência para análise do tipo de hemoglobina encontrado.

5.4 ANÁLISE MOLECULAR

5.4.1 Extração do DNA genômico

O DNA foi isolado de leucócitos a partir de 100µL de sangue do cordão umbilical, utilizando-se o método direto *GFXTM Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech)*. Inicialmente, adicionou-se 500µL da solução de extração (solução tampão contendo substância caotrópica e detergente) a 100µL de sangue total, seguido de agitação em vortex e incubação por 5 minutos à temperatura ambiente; transferiu-se a mistura de extração para a coluna GFX e centrifugou-se a 8.000 rpm (5.000x g) por 1 minuto, para ligação do DNA à matriz da coluna. Em seguida, adicionou-se 500µL da solução de extração e centrifugou-se a 8.000 rpm (5.000x g) por 1 minuto. Após a centrifugação, acrescentou-se 500µL da solução de lavagem (tampão Tris-EDTA / Etanol Absoluto) e realizou-se centrifugação a 13.000 rpm (12.000x g) por 3 minutos. O DNA foi liberado da matriz adicionando-se 100µL de água deionizada estéril pré-aquecida (70⁰ C), seguido por um período de incubação à temperatura ambiente de 1 minuto e centrifugação a 5.000x g para obtenção do DNA.

5.4.2 Determinação das talassemias α

As talassemias $\alpha_2^{3,7\text{Kb}}$ e $\alpha_2^{4,2\text{Kb}}$ foram pesquisadas pela técnica da reação de polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) (MULLIS & FALLONA, 1987; SAIKI et al, 1988; ERLICH, 1989), utilizando-se oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) destinados a amplificação de seqüências específicas. A reação foi conduzida em termociclador de temperatura (*GeneAmp PCR System 2400 - Perkin Elmer*) e a análise dos fragmentos foi realizada através da corrida eletroforética das amostras coradas pelo azul de bromofenol/xilenocianol/sacarose (0,25%/0,25%/40%) em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (tris-acetato - 0,04M; EDTA - 0,001M), corado pelo brometo de etídio (0,002%) e visualizado sob luz ultra-violeta. Cada reação possuiu controles negativo e positivo, realizados com o objetivo de testar a presença de contaminantes e a confirmação da fidelidade da reação, respectivamente.

A Figura 5.1 apresenta o esquema da estratégia utilizada na reação de PCR para a pesquisa das talassemias $\alpha_2^{3,7\text{ Kb}}$ e $\alpha_2^{4,2\text{ Kb}}$, juntamente com o diagrama esquemático dos *primers* empregados durante as respectivas reações.

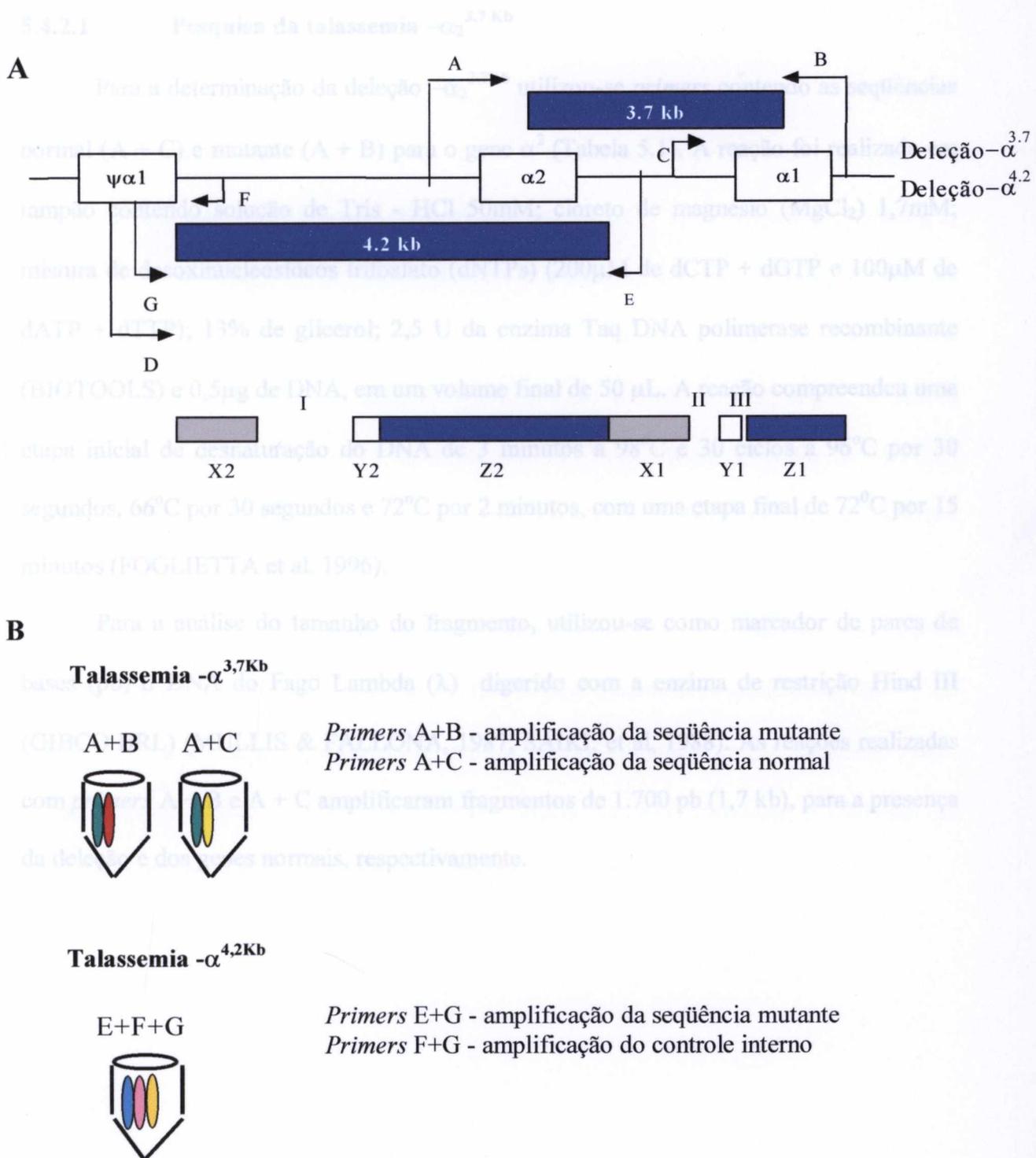


Figura 5.1 A - Representação da estratégia utilizada na reação de PCR para a pesquisa das talassemias $\alpha^{3,7 Kb}$ e $\alpha^{4,2 Kb}$; B - Diagrama esquemático dos *primers* empregados durante as respectivas reações

5.4.2.1 Pesquisa da talassemia $-\alpha_2^{3.7\text{Kb}}$

Para a determinação da deleção $-\alpha_2^{3.7\text{Kb}}$ utilizou-se *primers* contendo as seqüências normal (A + C) e mutante (A + B) para o gene α^2 (Tabela 5.1). A reação foi realizada em tampão contendo solução de Tris - HCl 50mM; cloreto de magnésio (MgCl_2) 1,7mM; mistura de desoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs) (200 μM de dCTP + dGTP e 100 μM de dATP + dTTP); 13% de glicerol; 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase recombinante (BIOTOOLS) e 0,5 μg de DNA, em um volume final de 50 μL . A reação compreendeu uma etapa inicial de desnaturação do DNA de 3 minutos a 98°C e 30 ciclos a 96°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, com uma etapa final de 72°C por 15 minutos (FOGLIETTA et al, 1996).

Para a análise do tamanho do fragmento, utilizou-se como marcador de pares de bases (pb) o DNA do Fago Lambda (λ) digerido com a enzima de restrição Hind III (GIBCO BRL) (MULLIS & FALLONA, 1987; SAIKI, et al, 1988). As reações realizadas com *primers* A + B e A + C amplificaram fragmentos de 1.700 pb (1,7 kb), para a presença da deleção e dos genes normais, respectivamente.

5.4.2.2 Pesquisa da talassemia $-\alpha_2^{4.2Kb}$

Para a determinação da deleção $-\alpha_2^{4.2Kb}$, utilizou-se os *primers* G + F e G + E como controle interno e mutante, respectivamente (Tabela 5.1). Na reação, utilizou-se tampão contendo Tris - HCl 50mM, cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 1,7mM, mistura de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) 200 μ M; 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase recombinante (BIOTOOLS) e 0,5 μ g do DNA, em um volume final de 50 μ L. A reação compreendeu uma etapa inicial de 10 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos, contendo uma etapa final de 72°C por 10 minutos (FOGLIETTA et al, 1996).

A reação de amplificação possuiu um fragmento de 228 pb, representando o controle interno (G + F) e de 1.762 pb (1,762 kb) para a ocorrência da deleção $-\alpha_2^{4.2Kb}$ (G + E), correspondendo a amplificação do gene α_2 normal e mutante, respectivamente. Para a análise do tamanho do fragmento encontrado, utilizou-se como marcador, o DNA de 123 pares de bases (MULLIS & FALLONA, 1987; SAIKI et al, 1988).

Quadro 5.1. Oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) utilizados nas reações de PCR destinadas à investigação das talassemias $\alpha_2^{3.7Kb}$ e $\alpha_2^{4.2Kb}$

Primers talassemia $-\alpha_2^{3.7Kb}$	Localização
seqüência 5'→3'	
A: CCC-TCC-CCC-TCg-CCA-AgT-CCA-CCC-C (direto)	5' Z box α_2
B: ggg-ggg-Agg-CCC-AAg-ggg-CAA-gAA (reverso mutante)	3' α_1
C: ggg-Agg-CCC-ATC-ggg-CAg-gAg-gAA-C (Reverso normal)	5' Y ₁
Primers talassemia $-\alpha_2^{4.2Kb}$	Localização
seqüência 5'→3'	
E: CCC-Tgg-gTg-TCC-Agg-AgC-AAg-CC (Reverso controle interno)	α_1 / α_2
F: ggC-ACA-TTC-gCC-gAC-AgA-gAg-AA (Reverso mutante)	3' $\psi \alpha_1$
G: CCg-gTT-TAC-CCA-TgT-ggT-gCC-TC (Direto)	$\psi \alpha_1$ exon 3

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através da análise do banco de dados criado no *software* EPI-INFO versão 6.04. Foram utilizados os testes estatísticos paramétricos para amostras com distribuição homogênea (ANOVA) e não - paramétricos para aquelas com distribuição heterogênea (Kruskal – Wallis H). Para comparações entre populações com um valor amostral (N) inferior a cinco, foi usado o teste exato de Fisher.

O valor $<0,05$ (5%), relativo à probabilidade (p) do erro tipo I (α), foi estabelecido como limite de significância estatística.

6. RESULTADOS

O inquérito epidemiológico foi constituído por 600 RN, representando 20, 28% dos nascimentos ocorridos na maternidade pública Tsylla Balbino, durante o período de fevereiro a junho de 2000. As mães entrevistadas apresentaram média de idade de 23,15 anos (DP \pm 6,00); as informações relativas às características raciais, gênero, peso, prematuridade e intercorrências ao nascimento, foram obtidas durante entrevista, observação do RN e consulta ao prontuário.

Os dados relativos à distribuição racial foram obtidos de 577 RN, sendo constituídos por 98 brancos (17%), 309 mulatos (53,60%) e 170 (29,50%) pretos. Em adultos, a classificação racial é determinada pela associação de características típicas como, cor da pele, forma dos lábios e do nariz e tipo de cabelo (ALVARES FILHO et al, 1995); atualmente, não existe um critério adotado como padrão para estabelecimento da classificação racial, principalmente, entre povos cujas origens étnicas são diversas. No presente estudo, os critérios adotados foram a observação da cor dos mamilos, da bolsa escrotal, além dos cabelos e características da face, classificando-os em três grupos: brancos, mulatos e pretos (AZEVEDO et al, 1980). Quanto a distribuição do gênero, 297 (51,47%) RN foram do gênero feminino e 280 (48,53%) do gênero masculino.

Com relação à prematuridade, dentre os 577 RN, 63 (10,92%) nasceram de parto prematuro, sendo que 18 (3,12%) nasceram de 07 meses e 44 (7,80%) de 08 meses. Destes, 33 (52,4%) foram do gênero feminino, 30 (47,60%) do masculino; 15 (23,81%) foram brancos, 37 (58,73%) mulatos e 11 (17,46%) pretos. Dentre os 514 (89,08%) nascimentos a termo, 263 (45,58%) foram do gênero feminino e 251 (43,50%) do masculino; a distribuição racial apresentou 83 (14,38%) brancos, 271 (46,97%) mulatos e 160 (27,73%) pretos.

A média de peso dos RN foi de 3,152 Kg ($\pm 0,530$), com 297 (51,47%) do gênero feminino e 280 (48,53%) do masculino. Os RN a termo apresentaram média de peso ao nascimento de 3,22 Kg ($\pm 0,469$) e os prematuros de 2,52 Kg ($\pm 0,62$), com os últimos apresentando peso dentro dos limites estabelecidos como padrão de normalidade (2,50 Kg) (NOBREGA et al, 1995).

6.1 Dados hematológicos e hematimétricos

Os dados laboratoriais hematológicos: hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb) e contagem de hemácias (Hm) e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram obtidos das 600 amostras.

A análise dos parâmetros hematológicos dos 600 RN revelou a média de Hb de 14,71 g/dL (DP \pm 1,83), Ht de 46,08% (DP \pm 6,05) e Hm de $4,26 \times 10^6$ (DP \pm 0,57), enquanto que os índices hematimétricos, demonstraram média de 108,37 fL (DP \pm 5,90) para o VCM; 34,71 pg (DP \pm 3,83) para a HCM e 32,03 % (DP \pm 2,97) para a CHCM. As médias dos dados hematológicos e índices hematimétricos com os desvios padrões respectivos, encontram-se na Tabela 6.1.

Considerando que estes valores poderiam estar sendo influenciados pela inclusão de RN prematuros, foram verificados os valores hematológicos e os índices hematimétricos entre os RN prematuros e nascidos a termo (Tabela 6.2), demonstrando diferenças estatisticamente significativas nos dados hematológicos. Dentre os RN nascidos a termo a média de Hb foi de 14,84 g/dL (DP \pm 1,75), de Ht 46,58 % (DP \pm 6,23) e de Hm $4,31 \times 10^6/L$

(DP± 0,57); o VCM de 108,41fL (DP± 6,02), a HCM de 34,72 pg (DP± 4,10) e a CHCM de 32,03 % (DP± 3,26). Entre os RN prematuros, a média de Hb foi de 14,16 g/dL (DP± 1,91); de Ht 4,91 % (DP± 5,33) e de Hm $4,12 \times 10^6/L$ (DP± 0,54); de VCM 109,17fL (DP± 5,31); de HCM 34,45 pg (DP± 2,96) e de CHCM 31,54 % (DP± 2,10).

Tabela 6.1. Médias dos dados laboratoriais hematológicos (Ht, Hb, Hm) e dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) em RN - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia - fevereiro a junho de 2000

Variáveis	Valores de referência (WALLAC, 2000) Média (± DP)	Média (± DP) N = 600
Dados hematológicos		
Ht (%)	57,0 (± 13,0)	46,08 (± 6,05)
Hb (g/dL)	19,5(± 4,5)	14,71 (± 1,83)
Hm ($\times 10^6/L$)	5,4 (± 1,3)	4,26 (± 0,57)
Índices hematimétricos		
VCM (fL)	108,0 (± 6,5)	108,37 (± 5,90)
HCM (pg)	36,0 (± 3,0)	34,71 (± 3,83)
CHCM (%)	34,0 (± 2)	32,03 (± 2,97)
DP - Desvio Padrão	N = Número de RN analisados	

Tabela 6.2. Médias e desvios padrões dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm) e dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) nas amostras de RN prematuros e nascidos a termo - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia - fevereiro a junho de 2000

	RN prematuro (N = 63)	RN a Termo (N = 514)	valor - P
Dados Hematológicos			
Hb (g/dL)	14,16 (\pm 1,91)	14,71 (\pm 1,83)	*0,005
Ht (%)	44,91 (\pm 5,33)	46,58 (\pm 6,23)	*0,05
Hm x10 ⁶ /L	4,12 (\pm 0,54)	4,31 (\pm 0,57)	*0,019
Índices Hematimétricos			
VCM (fL)	109,17 (\pm 5,31)	108,41 (\pm 6,02)	*0,350
HCM (pg)	34,45 (\pm 2,96)	34,72 (\pm 4,10)	**0,680
CHCM (%)	31,54 (\pm 2,10)	32,03 (\pm 3,26)	**0,830

N - número de RN *ANOVA** Kruskal - Wallis H

6.2 Dados da análise de hemoglobinas

A Figura 6.1 apresenta os resultados referentes aos padrões de hemoglobinas identificados através da eletroforese em gel de ágar (pH 6,0), confirmado pela eletroforese em acetato de celulose (pH 8,9).

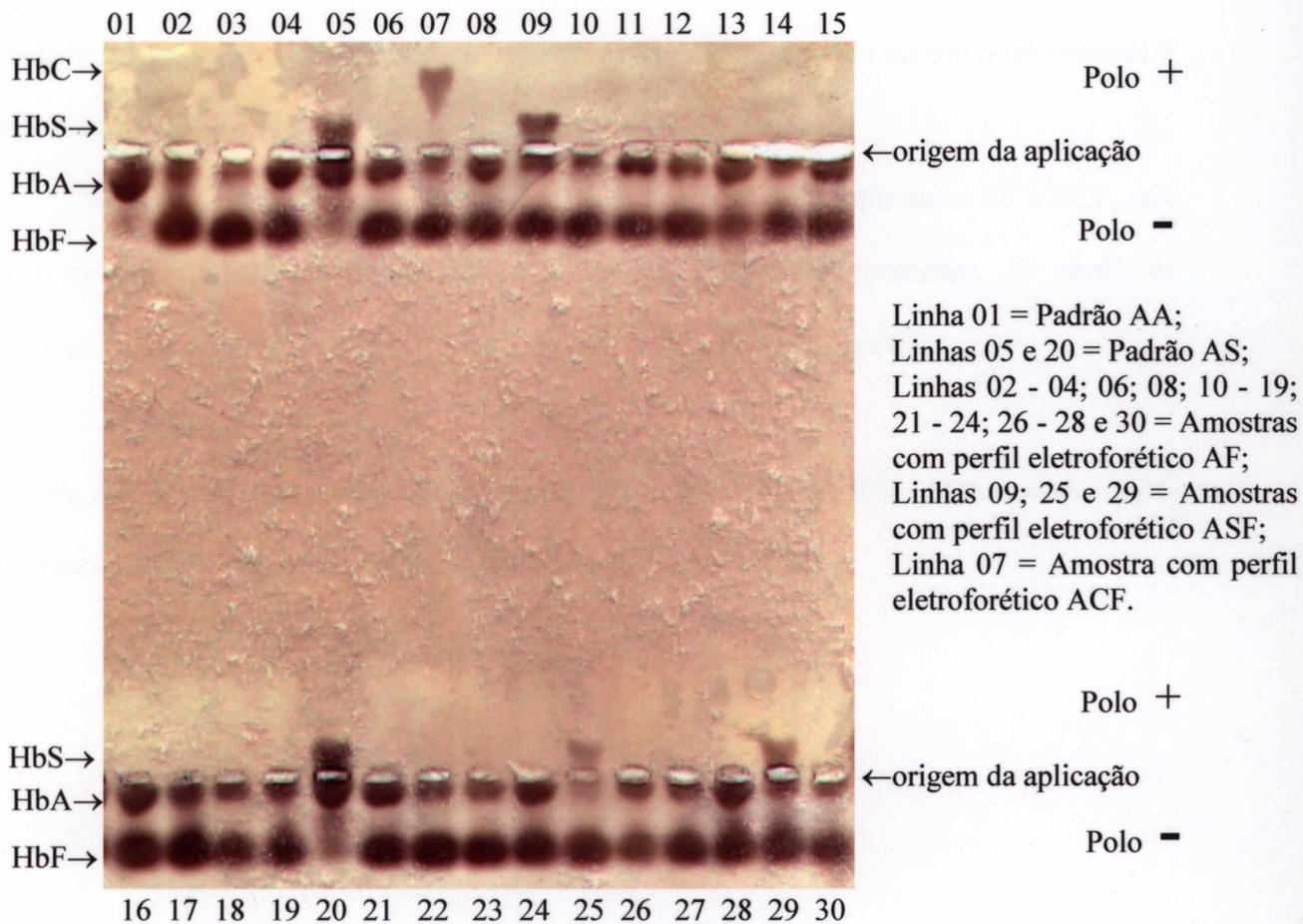


Figura 6.1. Eletroforese em gel de agar pH 6,0, identificando o padrão eletroforético de hemoglobinas presentes nos RN - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Dentre as 600 amostras, somente 592 tiveram o padrão hemoglobinas determinado, com a seguinte distribuição: 538 (90,9%) apresentaram perfil eletroforético AF, composto pela presença das hemoglobinas normais A e F; 33 (5,6%) apresentaram perfil ASF, composto pelas hemoglobinas normais A e F e pela hemoglobina variante S; 19 (3,2%) apresentaram perfil ACF (0,3%), composto pelas hemoglobinas normais A e F e pela hemoglobina variante C; 02 apresentaram perfil eletroforético CF, composto pela hemoglobina normal F e pela hemoglobina variante C.

No presente estudo, não foram detectados os perfis eletroforéticos SF e SCF, que correspondem a anemia falciforme e a doença SC, respectivamente. O perfil de hemoglobinas encontrado está apresentado na Tabela 6.3 e na Figura 6.2.

Tabela 6.3. Distribuição do perfil de hemoglobinas presentes em RN - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia - fevereiro a junho de 2000

Perfil de hemoglobinas	N (%)
ACF	19 (3,2)
AF	538 (90,9)
ASF	33 (5,6)
CF	02 (0,3)
Total	592 (100)

N = Número de RN analisados

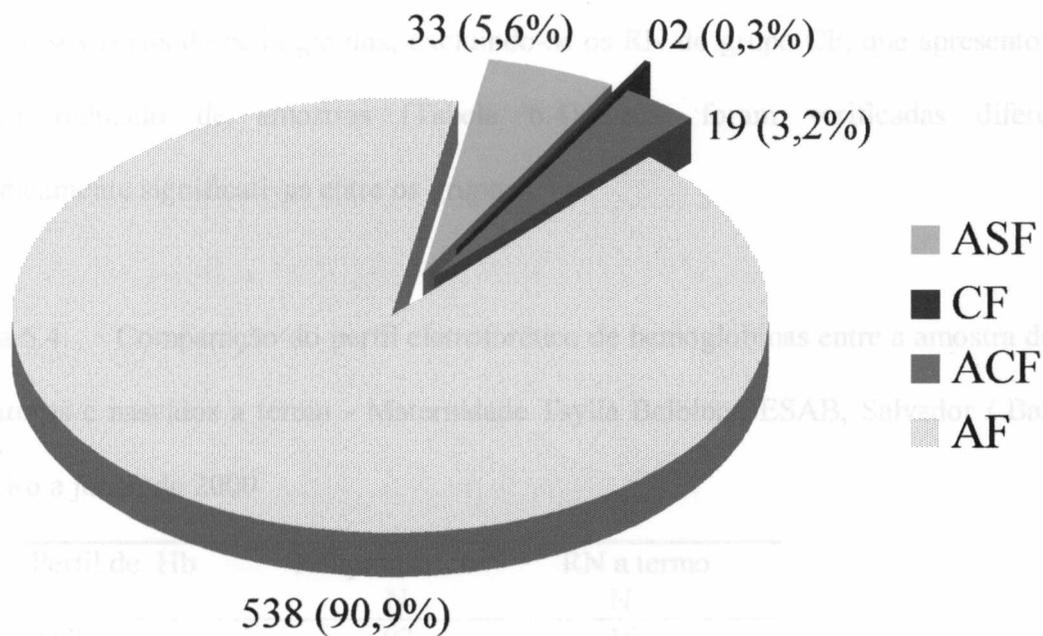


Figura 6.2. Representação gráfica da distribuição do perfil de hemoglobinas em RN - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia - fevereiro a junho de 2000

O perfil eletroforético de hemoglobinas foi analisado em 462 RN nascidos a termo, sendo 418 (90,48%) AF; 16 (3,46%) ACF; 26 (5,63%) ASF e 02 (0,43%) CF. Entre os prematuros, 57 foram analisados, sendo 53 (93%) AF; 02 (3,5%) ACF e 02 (3,5%) ASF. Para avaliar a significância estatística dos dados, foram realizadas análises comparativas dos diversos perfis de hemoglobina, excluindo-se os RN do grupo CF, que apresentou um número reduzido de amostras (Tabela 6.4). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Tabela 6.4. Comparação do perfil eletroforético de hemoglobinas entre a amostra de RN prematuros e nascidos a termo - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Perfil de Hb	RN prematuro N	RN a termo N
ACF	02	16
AF	53	418
Teste Fisher p = 1,00		
ASF	02	26
AF	53	418
Teste Fisher p = 0,76		
ACF	02	16
ASF	02	26
Teste Fisher p = 0,64		

*N - Número de RN analisados

Com relação a distribuição do padrão de hemoglobinas, os RN portadores do perfil AF apresentaram média de peso de 3,15 Kg (DP± 0,54); os ASF de 3,13 Kg (DP± 0,46) e os ACF de 3,08 Kg (DP± 0,40), não havendo diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,92$). A análise estatística das médias dos pesos dentro do grupo dos RN com perfil de hemoglobinas AF comparados às dos grupos ASF e ACF, não demonstrou diferenças significantes, com $p = 0,89$ e $p = 0,70$, respectivamente; a análise entre os grupos de RN com perfil de hemoglobinas ACF e ASF, também não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,65$) (Tabela 6.5). Os RN com perfil de hemoglobina CF foram excluídos da análise.

Tabela 6.5. Média de pesos por perfil de hemoglobinas encontrados em 592 RN - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Perfil de Hb	N	Média de peso (\pm DP)
AF	538	3,15 (\pm 0,54)
ASF	33	3,13 (\pm 0,46)
$*p = 0,87$		
AF	538	3,15 (\pm 0,54)
ACF	19	3,08 (\pm 0,40)
$*p = 0,60$		
ACF	19	3,08 (\pm 0,40)
ASF	33	3,13 (\pm 0,46)
$*p = 0,71$		
DP - Desvio padrão	$*ANOVA$	

A distribuição do perfil de hemoglobinas entre os grupos raciais encontrados foi verificada em 513 RN. Os RN portadores do perfil eletroforético AF foram distribuídos da seguinte maneira: 78 (16,67%) brancos, 256 (54,70%) mulatos e 134 (28,63%) pretos; entre os ACF, 01 (5,56%) foi branco, 14 (77,78%) mulatos e 03 (16,67%) pretos; entre os ASF, 07 (26,90%) foram brancos, 11 (42,30%) mulatos e 08 (30,77%) pretos. O RN com perfil CF foi classificado como preto (Tabela 6.6). A análise estatística foi realizada pelo teste de Fisher, encontrando-se no grupo de RN com perfil ACF e AF, $p = 0,21$ entre os brancos e mulatos; $p = 1,00$ entre os brancos e pretos; entre os RN mulatos e pretos, a análise foi realizada pelo teste de Mantel-Haenszel com $p = 0,15$. No grupo de RN com perfil ASF e AF, os resultados da análise com o teste de Mantel-Haenszel foram: $p = 0,13$ entre os brancos e mulatos; $p = 0,45$ entre os brancos e pretos e $p = 0,49$ entre os RN mulatos e pretos, não tendo sido verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados. Analisando-se a distribuição da HbS dentro dos grupos raciais, foi detectada a frequência de 2,37% de HbS entre os RN mulatos; 1,72% entre os pretos e 1,51% entre os brancos.

Tabela 6.6. Distribuição do perfil de Hemoglobinas nos vários grupos raciais identificados na amostra de RN - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Classificação racial dos RN (N = 513)	Gêneros N = 507				
	Feminino N (%)		Masculino N (%)		
	ACF N (%)	AF N (%)	ASF N (%)	CF N (%)	
Branco N = 86	01 (5,56)	78 (16,67)	10 (4,07)	07 (26,90)	-
Mulato N= 281	14 (77,78)	10 (54,70)	08 (3,11)	11 (42,30)	-
Preto N = 146	03 (16,67)	134 (28,63)	08 (30,77)	01 (100)	
Total	18 (100)	468 (100)	26 (100)	01 (100)	

N= Número de RN analisados

A Tabela 6.7 apresenta os dados relativos a distribuição dos vários perfis de hemoglobinas e gêneros. Dos RN com perfil AF, 236 (90,08%) foram do gênero feminino e 227 (92,65%) do masculino; entre os ACF, 10 (3,82%) foram do gênero feminino e 08 (3,27%) do masculino e entre os ASF, 16 (6,11%) foram do gênero feminino e 10 (4,08%) do masculino; os RN CF foram do gênero masculino .

Tabela 6.7. Distribuição do gênero entre os vários padrões de hemoglobina em RN - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Perfil de hemoglobinas	Gêneros N = 507	
	Feminino N (%)	Masculino N (%)
AF	236 (90,08)	227 (92,65)
ASF	16 (6,11)	10 (4,08)
ACF	10 (3,82)	08 (3,27)
Total	262 (100)	245 (100)

N - Número de RN Teste χ^2 p = 0,55

As Tabelas 6.8 e 6.9 apresentam as médias dos dados hematológicos e índices hematimétricos por tipo de hemoglobinas, respectivamente, tendo sido verificada significância estatística entre os valores de CHCM ($p = 0,015$). As Tabelas 6.10 e 6.11 analisam os valores hematológicos e índices hematimétricos no grupo de RN com perfil eletroforético normal, comparado-os com os RN portadores de hemoglobinas variantes. A análise estatística entre os RN com perfil de hemoglobinas AF (normal) e ASF para os dados hematológicos e índices hematimétricos, não apresentou diferenças estatisticamente significativas. A análise estatística realizada entre os RN com perfil de hemoglobinas AF e ACF apresentou diferença estatisticamente significativa para Ht, Hm e CHCM, com valores de $p = 0,008$, $0,017$ e $0,0045$ respectivamente. A análise dos dados hematológicos e índices hematimétricos realizada entre os grupos ACF e ASF, não apresentou diferenças estatisticamente significativas. A análise estatística relativa aos grupos AF e CF, não foi realizada, devido ao fato do último apresentar apenas 02 RN.

Tabela 6.8. Médias dos valores hematológicos por perfil eletroforético de hemoglobinas no grupo de RN - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia –fevereiro a junho de 2000

Perfil de Hb	Hb (g/dL)	Ht (%)	Hm ($\times 10^6/L$)
N = 592	Média (\pm DP)	Média (\pm DP)	Média (\pm DP)
ACF (N = 19)	14,44 (\pm 1,82)	42,62 (\pm 7,63)	3,97 (\pm 0,66)
AF (N = 538)	14,74 (\pm 1,80)	46,36 (\pm 6,00)	4,28 (\pm 0,56)
ASF (N = 33)	14,26 (\pm 2,21)	44,98 (\pm 8,70)	4,17 (\pm 0,77)
CF (N = 02)	14,35 (\pm 4,17)	43,80 (\pm 12,30)	3,83 (\pm 1,00)
	*p = 0,43	**p = 0,091	**p = 0,12

N - Número de RN analisados DP - Desvio Padrão *ANOVA **Kruskal - Wallis H

Tabela 6.9. Médias dos índices hematimétricos por perfil eletroforético de hemoglobinas no grupo de RN - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia –fevereiro a junho de 2000

Perfil de Hb	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
N = 592	Média (\pm DP)	Média (\pm DP)	Média (\pm DP)
ACF (N = 19)	107,04 (\pm 4,38)	37,48 (\pm 8,59)	35,12(\pm 8,50)
AF (N = 538)	108,47 (\pm 6,18)	34,58 (\pm 3,69)	31,88 (\pm 2,67)
ASF (N = 33)	107,86 (\pm 6,32)	34,52 (\pm 3,73)	32,00 (\pm 2,84)
CF (N = 04)	114,05 (\pm 2,05)	37,40 (\pm 0,99)	32,75 (\pm 0,21)
	*p = 0,134	*p = 0,234	*p = 0,015

N - Número de RN analisado DP - Desvio Padrão * Kruskal – Wallis H

Tabela 6.10. Análise dos valores médios de Ht, Hm e Hb entre os grupos AF e ASF; AF e ACF; ASF e ACF em RN - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Perfil de Hemoglobinas		Valores hematológicos (Média ± DP)		
Perfil de Hemoglobinas	Ht (%)	HCM	Hm (10 ⁶ /L)	CHC
AF (N = 538)	46,36 (± 6,00)	34,58	4,29 (± 0,56)	31,4
ASF (N = 33)	44,98 (± 8,70)	34,52	4,17 (± 0,77)	32,1
	*p = 0,15	*p = 0,16	**p = 0,19	
AF (N = 538)	46,36 (± 6,00)	34,58	4,29 (± 0,56)	31,4
ACF (N = 19)	42,62 (± 7,63)	37,48	3,93 (± 0,66)	35,1
	**p = 0,008	**p = 0,017	**p = 0,47	
ACF (N = 19)	42,62 (± 7,63)	37,48	3,97 (± 0,66)	35,1
ASF (N = 33)	44,98 (± 8,70)	34,52	4,17 (± 0,77)	32,1
	**p = 0,33	**p = 0,35	*p = 0,74	

N - Número de RN analisados DP - Desvio Padrão *Kruskal - Wallis H **ANOVA

A análise estatística dos valores hematológicos e índices hematemétricos entre os grupos de RN nascidos a termo e com perfil eletroforético ACF (N = 16) e AF (N = 400), está apresentada na Tabela 6.12; foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas médias do Ht e CHCM, com valores de p = 0,033 e p = 0,008, respectivamente. A análise realizada entre os RN a termo e com perfil eletroforético AF (N = 400) e ASF (N = 26) não demonstrou diferença estatisticamente significativa (Tabela 6.13).

Tabela 6.11. Análise dos índices hematimétricos entre os grupos AF e ASF; AF e ACF; ACF e ASF em RN - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia –fevereiro a junho de 2000

Perfil de Hemolobinas	Índices hematimétricos (Média ± DP)		
	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
AF (N = 538)	108,47 (± 6,18)	34,58 (± 3,69)	31,88 (± 2,67)
ASF (N = 33)	107,86 (± 6,32)	34,52 (± 3,73)	32,00 (± 2,84)
	*p = 0,59	*p = 0,935	*p = 0,80
AF (N = 538)	108,47 (± 6,18)	34,58 (± 3,69)	31,88 (± 2,67)
ACF (N = 19)	107,04 (± 4,38)	37,48 (± 4,59)	35,12 (± 8,50)
	*p = 0,32	**p = 0,51	*p = 0,0045
ACF (N = 19)	107,04 (± 4,38)	37,48 (± 4,59)	35,12 (± 8,50)
ASF (N = 33)	107,86 (± 6,32)	34,52 (± 3,73)	32,00 (± 2,84)
	*p = 0,62	**p = 0,75	*p = 0,07

N - Número de RN analisado DP - Desvio Padrão *ANOVA **Kruskal - Wallis H

A análise estatística dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre os grupos de RN nascidos a termo e com perfil eletroforético ACF (N = 16) e AF (N = 400), está apresentada na Tabela 6.12; foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas médias do Ht e CHCM, com valores de $p = 0,033$ e $p = 0,008$, respectivamente. A análise realizada entre os RN a termo e com perfil eletroforético AF (N = 400) e ASF (N = 26) não demonstrou diferença estatisticamente significativa (Tabela 6.13).

Tabela 6.13. Médias dos valores hematológicos e índices hematimétricos em RN a termo e portadores do perfil de hemoglobinas ASF e AF - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia - fevereiro a junho de 2000

Tabela 6.12. Médias dos valores hematológicos e índices hematimétricos em RN a termo portadores do perfil de hemoglobinas ACF e AF - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Valores hematológicos	RN a termo		Valor - p
	Perfil ACF	Perfil AF	
	N = 16	N = 400	
Ht (%)	42,54 (DP± 8,17)	46,71(DP± 6,04)	* 0,033
Hb (g/dL)	14,53 (DP± 1,34)	14,85(DP± 1,74)	**0,47
Hm (10 ⁶ /L)	3,99 (DP± 0,72)	4,32 (DP± 0,55)	**0,22
Índices hematimétricos			
VCM (fL)	106,39 (DP± 3,89)	108,57 (DP± 6,19)	** 0,16
HCM (pg)	37,80 (DP± 9,35)	34,62 (DP± 3,88)	*0,76
CHCM (%)	35,62 (DP±9,22)	31,89 (DP± 2,88)	* 0,008

N = Número de RN

*Kruskal - Wallis H

**ANOVA

Tabela 6.13. Médias dos valores hematológicos e índices hematimétricos em RN a termo e portadores do perfil de hemoglobinas ASF e AF - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia –fevereiro a junho de 2000

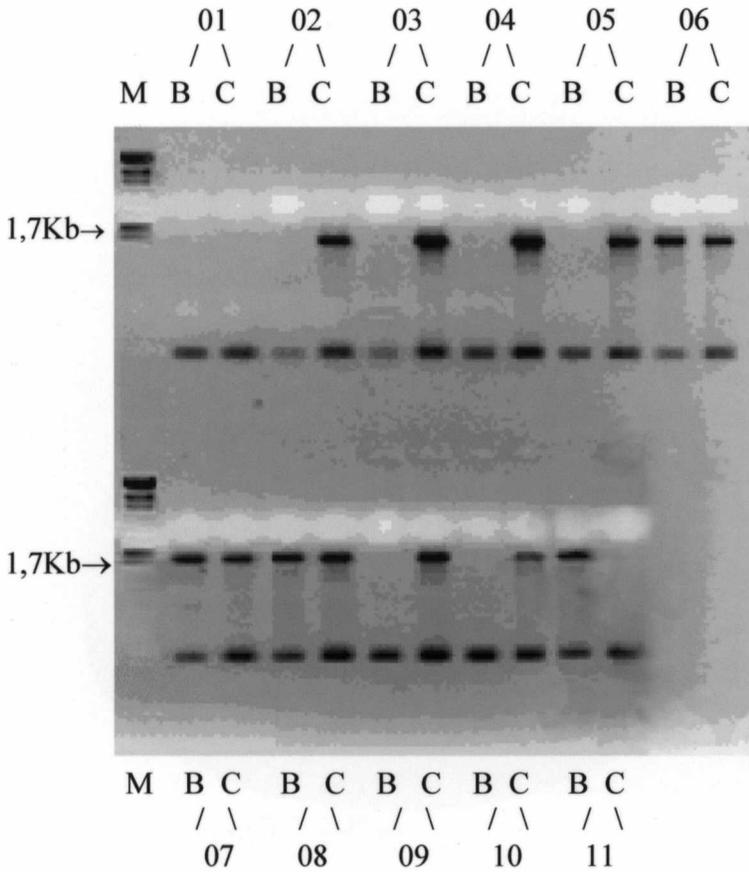
RN a termo			
Valores hematológicos	Perfil ASF N = 26	Perfil AF N = 400	Valor - p
Ht (%)	44,83 (DP± 9,23)	46,71(DP± 6,04)	* 0,117
Hb (g/dL)	14,15 (DP± 2,21)	14,85 (DP± 1,74)	**0,054
Hm (x10 ⁶ /L)	4,19 (DP± 082)	4,32 (DP± 0,55)	* 0,158
Índices hematimétricos			
VCM (fL)	107,11 (DP± 3,89)	108,57 (DP± 6,19)	** 0,257
HCM (pg)	34,23 (DP± 4,12)	34,62 (DP± 3,88)	** 0,627
CHCM (%)	31,95 (DP± 3,20)	31,89 (DP± 2,88)	* 0,923
N = Número de RN		*Kruskal - Wallis H	**ANOVA

6.3 Dados da análise molecular para talassemia α

6.3.1 Talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$

A Figura 6.3 apresenta gel de agarose a 1%, demonstrando os fragmentos obtidos na reação de PCR para a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$, com identificação dos indivíduos heterozigotos e normais.

A caracterização da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ foi realizada em 590 RN, apresentando 456 (77,29%) portadores de genes α normais e 134 (22,71%) portadores deste tipo de talassemia, sendo 120 (20,34%) heterozigotos e 14 (2,37%) homozigotos. A Figura 6.4 apresenta a representação gráfica da distribuição da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ entre os RN estudados.



Polo -

M = Marcador de pares de bases Fago λ Hind III;
 Amostras 01B e 01C = controles negativos mutante e normal
 Amostras 02 a 05; 09 e 10 = RN portadores de genes α **normais**, apresentando amplificação do fragmento de 1,7 Kb apenas no tubo A + C; **Talassemia - $\alpha^{4,2Kb}$**
 Amostras 06 a 08 = RN **heterozigotos** para a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ apresentando amplificação do fragmento de 1,7 Kb nos tubo A + C e A+B;
 Amostra 11 = RN **homozigoto** para a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ apresentando amplificação do fragmento de 1,7 Kb apenas no tubo A+B.

Polo +

Figura 6.3. Gel de agarose a 1% apresentando os fragmentos obtidos na reação de PCR para a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$, demonstrando RN portadores de genes α normais, heterozigotos e homozigoto para esta alteração - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

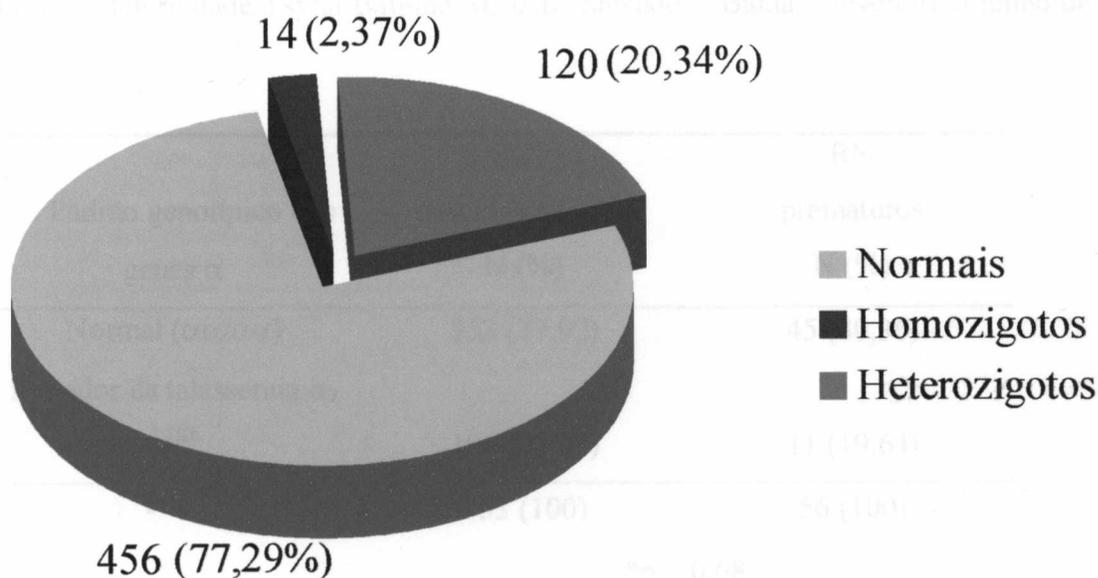


Figura 6.4. Representação gráfica da distribuição da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ encontrada em

RN - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

A Tabela 6.14 apresenta a distribuição dos RN com genes α normais e dos portadores da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$. Entre os RN a termo, a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ foi identificada em 100 (22,08%) e em 11 (19,64%) dos RN prematuros. Dos RN a termo e portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$, 90 (90,00%) foram heterozigotos e 10 (10,00%) homozigotos; entre os RN prematuros, 10 (90,91%) foram heterozigotos e 01 (9,09%) homozigoto.

Tabela 6.14. Caracterização do padrão de genes α entre os grupos de RN a termo e prematuros - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Padrão genotípico dos genes α	RN	RN
	nascidos a termo N (%)	prematuros N (%)
Normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	353 (77,92)	45 (80,36)
Portador da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$	100 (22,08)	11 (19,64)
Total	453 (100)	56 (100)
*p = 0,68		
Heterozigoto ($\alpha-/\alpha\alpha$) para a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$	90 (19,87)	10 (17,86)
Homozigoto para a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$	10 (2,21)	01 (1,78)
Total	100 (22,08)	11 (19,64)
**p = 1,00		

N = Número de RN analisados

* Mantel-Haenszel

** Teste de Fisher

A Tabela 6.15 apresenta os dados referentes a distribuição dos valores hematológicos (Ht, Hm, Hb) e índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) em 556 RN com genes α normais e portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$, onde encontrou-se diferenças estatisticamente significativas em todos os parâmetros analisados. Os RN com genes α normais apresentaram a média de peso de 3,15 Kg (DP \pm 0,54) e os portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ média de peso de 3,14 Kg (DP \pm 0,51), com $p = 0,94$, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Tabela 6.15. Valores médios e desvio padrão dos dados hematológicos e índices hematimétricos entre os RN com genes α normais e portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / BA – fevereiro a junho de 2000

	Portadores de Genes α normais N = 429	Portadores da Tal $\alpha_2^{3,7Kb}$ N = 127	Valor - p
Dados hematológicos			
Hb (g/dL)	14,92 (DP \pm 1,81)	14,28 (DP \pm 1,69)	*0,00046
Ht (%)	46,78 (DP \pm 6,10)	44,96 (DP \pm 6,45)	*0,004
Hm (x10 ⁶ /L)	4,25 (DP \pm 0,55)	4,42 (DP \pm 0,63)	**0,0003
Índices hematimétricos			
VCM (fL)	110,15 (DP \pm 4,53)	102,59 (DP \pm 6,20)	**< 0,00001
HCM (pg)	35,31 (DP \pm 3,75)	32,59 (DP \pm 3,35)	**< 0,00001
CHCM (%)	32,07 (DP \pm 3,07)	31,76 (DP \pm 2,69)	**< 0,00001

DP = Desvio padrão N = Número de RN analisados *ANOVA **Kruskal - Wallis H

A Tabela 6.16 apresenta as médias dos valores hematológicos entre os RN nascidos a termo portadores de genes α normais e portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$, demonstrando diferença estatisticamente significativa para os valores encontrados, com exceção dos valores de CHCM.

Tabela 6.16. Média dos dados hematológicos e índices hematimétricos obtidos dos RN nascidos a termo com genes α normais e portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia –fevereiro a junho de 2000

	RN a termo		Valor - p
	Portadores de genes α normais N = 386	Portadores da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ N = 117	
Dados hematológicos			
Hb (g/dL)	15,13 (\pm 1,65)	14,23 (\pm 1,73)	*< 0,00001
Ht (%)	47,34 (\pm 6,05)	44,83 (\pm 6,88)	*0,0006
Hm ($\times 10^6/L$)	4,30 (\pm 0,55)	4,41 (\pm 0,65)	**0,0098
Índices hematimétricos			
VCM (fL)	110,19 (\pm 4,48)	102,64 (\pm 6,22)	**< 0,00001
HCM (pg)	35,42 (\pm 3,89)	32,55 (\pm 3,56)	*< 0,00001
CHCM (%)	32,17 (\pm 3,24)	31,73 (\pm 3,02)	*0,22

DP = Desvio padrão N = Número de RN analisados *ANOVA **Kruskal - Wallis H

A tabela 6.17 apresenta a distribuição dos portadores de talassemia entre os gêneros e os vários grupos raciais. Dentre os RN, 503 foram analisados quanto a presença de talassemia $\alpha_2^{3,7 \text{ Kb}}$, encontrando-se 199 RN do gênero feminino normais e 62 portadores desta alteração; entre o gênero masculino, 193 foram normais e 49 portadores. Dentre os RN brancos, 68 apresentaram genes α normais e 21 foram portadores da talassemia $\alpha_2^{3,7 \text{ Kb}}$; entre o grupo dos mulatos, 211 apresentaram genes α normais e 56 portadores; entre os pretos, encontrou-se 112 RN com genes α normais e 35 portadores deste tipo de alteração.

Tabela 6.17. Distribuição de gênero e raça entre os RN com genes α normais e portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7 \text{ Kb}}$ - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia –fevereiro a junho de 2000

Variáveis	Portadores de genes α normais	Portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7 \text{ Kb}}$	Total N (%)
Gênero			
Feminino	199 (76,25)	62 (23,75)	261 (100)
Masculino	193 (79,75)	49 (20,25)	242 (100)
	*p = 0,34		
Classificação racial			
Branco	68 (76,40)	21 (23,60)	89 (100)
Mulato	211 (79,03)	56 (20,97)	267 (100)
Preto	112 (76,19)	35 (23,81)	147 (100)
	**p = 0,55		

N = Número de RN analisado

* Mantel-Haenszel

**Teste χ^2

A distribuição do perfil de hemoglobinas entre os RN com genes α normais e portadores da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ é apresentada na Tabela 6.18. Quinhentos e vinte sete RN tiveram caracterizados o perfil de hemoglobinas e o genótipo para talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$; entre os RN com genes α normais, 373 (92,33%) apresentaram perfil eletroforético AF, 19 (4,70%) foram ASF e 12 (2,97%) foram ACF; entre os RN portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$, 108 (87,80%) apresentaram perfil AF, 11 (8,94%) foram ASF e 4 (3,25%) foram ACF; os 02 RN com perfil de hemoglobinas CF, apresentaram genes α normais.

Tabela 6.18. Distribuição do perfil de hemoglobinas entre os RN com genes α normais e portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Perfil de Hemoglobinas	Genes α normais N (%)	Portadores da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ N (%)
AF	373 (92,33)	108 (87,80)
ASF	19 (4,70)	11 (8,94)
ACF	12 (2,97)	04 (3,25)
Total	404 (100)	123 (100)

N = Número de RN analisado Teste χ^2 - p = 0,20

Entre os RN com perfil ASF (N = 30), 19 (63,33%) apresentaram genes α normais e 11 (36,67%) foram portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$, sendo 10 (33,33%) heterozigotos e 1 (3,34%) homozigoto; entre os RN com padrão ACF (N = 16), 12 (75%) apresentaram genes α normais e 4 (25%) foram portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ em heterozigose.

Os RN com perfil de hemoglobinas AF (481) apresentaram a média de peso de 3,14 Kg (DP±0,57) entre aqueles com genes α normais e 3,14 Kg (DP±0,50) entre os portadores da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$; os RN com perfil ASF apresentaram 3,23 Kg (DP±0,45) entre os RN com genes α normais e 3,07 Kg (DP±0,41) entre os que apresentaram talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$; os RN com perfil ACF tiveram peso de 3,07 Kg (DP±0,47) entre aqueles com genes α normais e de 2,97 Kg (DP±0,33) entre os portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$. A análise estatística realizada entre os grupos, não demonstrou diferença significativa. Os RN com perfil CF, por serem apenas 02, não foram incluídos na análise (Tabela 6.19).

Tabela 6.19. Média de pesos entre RN com genes α normais e portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$, distribuídos de acordo com o perfil de hemoglobinas - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Perfil de hemoglobinas	Média de peso (Kg) \pm DP		Valor - p
	Portadores de genes α normais	Portadores da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$	
AF (N = 481)	3,14 (\pm 0,57)	3,14 (\pm 0,50)	*0,97
ASF (N = 30)	3,23 (\pm 0,45)	3,07 (\pm 0,41)	*0,38
ACF (N = 16)	3,07 (\pm 0,47)	2,97 (\pm 0,33)	*0,73

DP - Desvio padrão

N = Número de RN analisado

* ANOVA

O perfil de hemoglobinas entre os RN com genes α normais foi investigada em 353 RN nascidos a termo e 45 prematuros portadores de genes α normais (Tabela 6.20). Entre os nascidos a termo, 11 (3,12%) apresentaram perfil ACF; 325 (92,08%) perfil AF; 15

(4,25%) ASF e 02 (0,57%) perfil CF; entre os RN prematuros, 01 (2,22%) apresentou perfil ACF e 44 (97,78%) perfil AF.

Tabela 6.20. Distribuição do perfil de hemoglobinas entre os RN a termo e prematuros portadores de genes α normais - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Perfil de hemoglobinas	Genes α normais N = 398	
	RN a termo	RN prematuro
ACF	11 (3,12%)	01 (2,22%)
AF	325 (92,08%)	44 (97,78%)
ASF	15 (4,25%)	-
CF	02 (0,57%)	-
Total	353 (100)	45(100)

N = Número de RN analisados

A análise estatística realizada pelo teste de Fisher, comparando-se os grupos de RN a termo e prematuros com diferentes perfis de hemoglobinas, não demonstrou diferenças estatisticamente significativas com $p = 1,00$ para os RN com perfis ACF e AF; $p = 0,24$ entre os ASF e AF e $p = 0,44$ entre os RN com perfis ASF e ACF.

O perfil de hemoglobinas foi determinado entre 100 RN a termo e 11 prematuros portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ (Tabela 6.21); entre os RN a termo, 03 (3,0%) apresentaram perfil ACF; 88 (88,0%) AF; 09 (9,0%) ASF. Entre os RN prematuros, 01 (9,09%) apresentou perfil ACF; 08 (72,73%) foram AF e 02 foram ASF (18,80 %).

Comparando-se os vários tipos de hemoglobina, encontrou-se: $p = 0,26$ para os RN AF e ACF; $p = 1,00$ para os AF e ASF e $p = 1,00$ para os ACF e ASF.

Tabela 6.21. Distribuição do perfil de hemoglobinas entre os RN a termo e prematuros portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Perfil de hemoglobinas	Portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ N = 111	
	RN a termo N (%)	RN prematuro N (%)
ACF	03 (3,0%)	01 (9,09%)
AF	88 (88,0%)	08 (72,73%)
ASF	09 (9,0%)	02 (18,80%)
Total	100 (100)	11 (100)

N = Número de RN analisados

A Tabela 6.22 apresenta as médias dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre os RN a termo (N = 353) e prematuros (N = 45) portadores de genes α normais. A análise estatística das médias dos valores hematológicos mostrou diferenças significativas entre os dois grupos, sendo que o mesmo não foi observado com relação aos índices hematimétricos.

Tabela 6.22. Análise estatística dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre RN a termo e prematuros portadores de genes α normais - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Valores hematológicos	Portadores de genes α normais		Valor - p
	RN a termo N = 353	RN prematuro N = 45	
Ht (%)	47,34 (DP \pm 6,05)	44,60 (DP \pm 5,33)	*0,005
Hm ($\times 10^6$)	4,30 (DP \pm 0,55)	4,04 (DP \pm 0,47)	*0,003
Hb (g/dL)	15,13 (DP \pm 1,65)	14,01 (DP \pm 2,00)	**0,0009
Índices hematimétricos			
VCM (fL)	110,19 (DP \pm 4,48)	110,44 (DP \pm 4,23)	*0,74
HCM (pg)	35,43 (DP \pm 3,89)	34,72 (DP \pm 3,09)	**0,69
CHCM (%)	32,17 (DP \pm 3,24)	31,42 (DP \pm 2,39)	**0,57

DP = Desvio padrão N = Número de RN analisados *ANOVA **Kruskal - Wallis H

Na Tabela 6.23 são apresentadas as médias dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre os RN a termo (N=100) e prematuros (N=11) portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$. A análise entre os dois grupos não demonstrou diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 6.23. A análise estatística dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre os RN a termo e prematuros portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

Portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$			
N = 111			
Valores hematológicos	RN a termo	RN prematuro	Valor - p
	N = 100	N = 11	
Ht (%)	44,83 (DP± 6,88)	45,16(DP± 6,01)	*0,89
Hm (x10 ⁶ /L)	4,42 (DP±0,65)	4,39 (DP±0,74)	*0,11
Hb (g/dL)	14,23 (DP±1,73)	14,35 (DP±1,70)	*0,84
Índices hematimétricos			
VCM (fL)	102,64 (DP±6,22)	103,62 (DP±7,04)	*0,64
HCM (pg)	32,56(DP±3,56)	33,02 (DP±2,82)	*0,70
CHCM (%)	31,73 (DP±3,02)	31,84 (DP±0,83)	**0,16

DP = Desvio padrão N = Número de RN analisados *ANOVA **Kruskal - Wallis H

As análises dos parâmetros hematológicos foram realizadas entre os RN com perfil de hemoglobinas ASF portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ e aqueles com genes α normais. Entre os RN com genes α normais, encontrou-se os seguintes resultados: Hb 14,93 (\pm 1,82); Ht 47,87 (\pm 8,35); Hm 4,33 (\pm 0,80); VCM 110,77 (\pm 3,50); HCM 34,94 (\pm 3,38) e CHCM 31,52 (\pm 31,52); entre os RN portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ encontrou-se: Hb 13,20 (\pm 2,34); Ht 40,29 (\pm 7,79); Hm 3,87 (\pm 0,76); VCM 104,41 (\pm 4,30); HCM 34,44 (\pm

4,76) e CHCM 32,97 (\pm 3,28). Os resultados de Hb, Ht e VCM demonstraram diferenças estatisticamente significativas, com $p = 0,038$, $p = 0,025$ e $p = 0,0002$, respectivamente (Tabela 6.24).

Tabela 6.24. Análise estatística dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre RN portadores de genes α normais e de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ com perfil de hemoglobina ASF - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / BA – fevereiro a junho de 2000

Perfil de hemoglobina ASF			
N = 30			
Variáveis	Portadores de genes α normais	Portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$	Valor - p
	N = 19	N = 11	
Hb (g/dL)	14,93 (DP \pm 1,82)	13,2 (DP \pm 2,34)	* 0,038
Ht (%)	47,87 (DP \pm 8,35)	40,29 (DP \pm 7,79)	* 0,025
Hm ($10^6/L$)	4,33 (DP \pm 0,80)	3,87 (DP \pm 0,76)	* 0,144
VCM (fL)	110,77 (DP \pm 3,5)	104,41 (DP \pm 4,30)	* 0,0002
HCM (pg)	34,94 (DP \pm 3,38)	34,44 (DP \pm 4,06)	* 0,73
CHCM (%)	31,52 (DP \pm 2,76)	32,97 (DP \pm 3,28)	* 0,22

N = Número de RN analisado

DP - Desvio padrão

* ANOVA

A mesma análise foi realizada entre os RN com perfil de hemoglobinas ACF. Entre os RN com genes α normais, encontrou-se os seguintes resultados: Hb 15,17 (\pm 1,08); Ht 44,87 (\pm 7,07); Hm 4,13 (\pm 0,62); VCM 108,57 (\pm 3,83); HCM 37,89 (\pm 9,28) e CHCM 34,97 (\pm 8,84); entre os RN portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ encontrou-se: Hb 13,20 (\pm 0,89); Ht 37,10 (\pm 0,11); Hm 3,58 (\pm 0,94); VCM 103,48 (\pm 4,68); HCM 38,87 (\pm 10,44) e CHCM 37,80 (\pm 11,34). Foram encontradas diferenças significativas nos valores de Hb e VCM, com $p = 0,0055$ e $p = 0,046$, respectivamente (Tabela 6.25). Entre os RN com perfil de hemoglobina AF com genes α normais, encontrou-se: Hb 14,89 (\pm 1,80); Ht 46,72 (\pm 6,10); Hm 4,24 (\pm 0,55); VCM 110,23 (\pm 4,69); HCM 35,28 (\pm 3,46) e CHCM 32,03 (\pm 2,68); entre os portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ os resultados obtidos foram: Hb 14,43 (\pm 1,59); Ht 45,61 (\pm 5,93); Hm 4,50 (\pm 0,56); VCM 102,30 (\pm 6,52); HCM 32,19 (\pm 2,59) e CHCM 31,46 (\pm 1,55). As análises estatísticas realizadas, demonstraram diferenças significantes, com exceção do Ht (Tabela 6.26).

Tabela 6.25. Análise estatística dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre RN portadores de genes α normais e de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ com perfil de hemoglobina ACF - Maternidade Tsylla Albino/SESAB, Salvador / BA – fevereiro a junho de 2000

Perfil de hemoglobina ACF			
N = 16			
Variáveis	Portadores de genes α normais N = 12	Portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ N = 04	Valor - p
Hb (g/dL)	15,17 (\pm 1,08)	13,20 (\pm 0,89)	* 0,0055
Ht %	44,87 (\pm 7,07)	37,10 (\pm 0,11)	* 0,11
Hm ($10^6/L$)	4,13 (\pm 0,62)	3,58 (\pm 0,94)	* 0,19
VCM (fL)	108,57 (\pm 3,83)	103,48 (\pm 4,68)	* 0,046
HCM (pg)	37,89 (\pm 9,28)	38,87 (\pm 10,44)	* 0,83
CHCM (%)	34,97 (\pm 8,84)	37,80 (\pm 11,34)	* 0,59

N = Número de RN analisado

DP - Desvio padrão

* ANOVA

Tabela 6.26. Análise estatística dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre RN portadores de genes α normais e de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ com perfil de hemoglobina AF - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / BA – período: fevereiro / junho de 2000

Perfil de hemoglobina AF			
N = 481			
Variáveis	Portadores de genes α normais N = 373	Portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ N = 108	Valor - p
Hb (g/dL)	14,89 (\pm 1,80)	14,43 (\pm 1,59)	* 0,018
Ht %	46,72 (\pm 6,10)	46,61 (\pm 5,93)	* 0,10
Hm ($10^6/L$)	4,24 (\pm 0,55)	4,50 (\pm 0,56)	* 0,00002
VCM (fL)	110,23 (\pm 4,69)	102,30 (\pm 6,52)	* < 0,00001
HCM (pg)	35,28 (\pm 3,46)	32,19 (\pm 2,59)	* < 0,00001
CHCM (%)	32,03 (\pm 2,68)	31,46 (\pm 1,55)	** < 0,00001

N = Número de RN analisado DP - Desvio padrão * ANOVA ** Kruskal - Wallis H

Nas Tabelas 6.27 e 6.28 estão apresentadas as análises estatísticas dos dados hematológicos e índices hematimétricos entre os grupos de RN com perfis de hemoglobinas AF e ASF; AF e ACF portadores de genes α normais. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos estudados, com exceção para o CHCM entre os grupos AF e ACF ($p = 0,034$).

Tabela 6.27. Análise estatística dos valores hematológicos em RN com genes α normais entre os grupos AF e ASF; AF e ACF - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / BA – fevereiro a junho de 2000

RN portadores de genes α normais			
N = 404			
	Hb (g/dL)	Ht (%)	Hm ($10^6/L$)
AF (N = 373)	14,89 (DP \pm 1,80)	46,72 (DP \pm 6,10)	4,24 (DP \pm 0,55)
ASF (N = 19)	14,93 (DP \pm 1,82)	47,87 (DP \pm 8,35)	4,33 (DP \pm 0,80)
	** p = 0,94	* p = 0,90	* p = 0,91
AF (N = 373)	14,89 (DP \pm 1,80)	46,72 (DP \pm 6,10)	4,24 (DP \pm 0,55)
ACF (N = 12)	15,17 (DP \pm 1,08)	44,87 (DP \pm 7,07)	4,13 (DP \pm 0,62)
	* p = 0,61	** p = 0,30	** p = 0,49

N = Número de RN analisado DP = Desvio padrão * Kruskal - Wallis H **ANOVA

Tabela 6.28. Análise estatística dos índices hematimétricos em RN com genes α normais entre os grupos AF e ASF; AF e ACF - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / BA – fevereiro a junho de 2000

RN portadores de genes α normais			
N = 404			
	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
AF (N = 373)	110,23 (DP \pm 4,69)	35,29 (DP \pm 3,46)	32,03 (DP \pm 2,67)
ASF (N = 19)	110,77 (DP \pm 12,26)	34,94 (DP \pm 3,38)	31,52 (DP \pm 2,76)
	** p = 0,62	** p = 0,67	** p = 0,42
AF (N = 373)	110,23 (DP \pm 4,69)	35,29 (DP \pm 3,46)	32,03 (DP \pm 2,67)
ACF (N = 12)	108,57 (DP \pm 3,83)	37,89 (DP \pm 9,28)	34,97 (DP \pm 8,84)
	** p = 0,22	* p = 0,91	* p = 0,034

N = Número de RN analisado DP = Desvio padrão * Kruskal - Wallis H ** ANOVA

As Tabelas 6.29 e 6.30 demonstram a análise dos dados hematológicos e índices hematimétricos realizada em RN portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ nos grupos AF e SF; AF e ACF.

Tabela 6.29. Análise estatística dos dados hematológicos em RN portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7 Kb}$ entre os grupos AF e ASF; AF e ACF - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / BA – fevereiro a junho de 2000

RN portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7 Kb}$			
N = 123			
Perfil de hemoglobinas	Hb (g/dL)	Ht (%)	Hm ($10^6/L$)
AF (N = 108)	14,43 (DP± 1,59)	45,61 (DP± 5,93)	4,50 (DP± 0,56)
ASF (N = 11)	13,02 (DP± 2,34)	40,29 (DP± 7,79)	3,87 (DP±0,76)
	** p = 0,03	* p = 0,03	* p = 0,008
AF (N = 108)	14,43 (DP± 1,59)	45,61 (DP± 5,93)	4,50 (DP± 0,56)
ACF (N = 04)	13,20 (DP± 0,89)	37,1 (DP± 10,13)	3,57 (DP± 0,94)
	** p = 0,13	** p = 0,007	** p = 0,002
DP = Desvio padrão	* Kruskal - Wallis H	**ANOVA	

Tabela 6.30. Análise estatística dos índices hematimétricos em RN portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7 \text{ Kb}}$ entre os grupos AF e ASF; AF e ACF - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / BA – fevereiro a junho de 2000

RN portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7 \text{ Kb}}$			
N = 123			
Perfil de hemoglobinas	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
AF (N = 108)	102,30 (DP± 6,52)	32,19 (DP± 2,59)	31,46 (DP± 1,55)
ASF (N = 11)	104,41 (DP± 4,30)	34,44 (DP± 4,06)	32,97 (DP± 3,27)
	** p = 0,32	* p = 0,09	* p = 0,13
AF (N = 108)	102,30 (DP± 6,52)	32,19 (DP± 2,59)	31,46 (DP± 1,55)
ACF (N = 04)	103,47 (DP± 4,68)	38,87 (DP± 10,44)	37,80 (DP± 11,34)
	** p = 0,72	** p < 0,00001	** p = 0,028

N = Número de RN analisado DP = Desvio padrão * Kruskal - Wallis H **ANOVA

6.3.2 Talassemia $\alpha_2^{4,2 \text{ Kb}}$

A presença de talassemia $\alpha_2^{4,2 \text{ Kb}}$ foi investigada pela técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos sintéticos para a identificação das seqüências normal e mutante. A Figura 6.5 apresenta o gel de agarose a 1%, demonstrando indivíduos normais para esta forma de talassemia. No presente estudo, não foram detectados portadores da talassemia $\alpha_2^{4,2 \text{ Kb}}$.

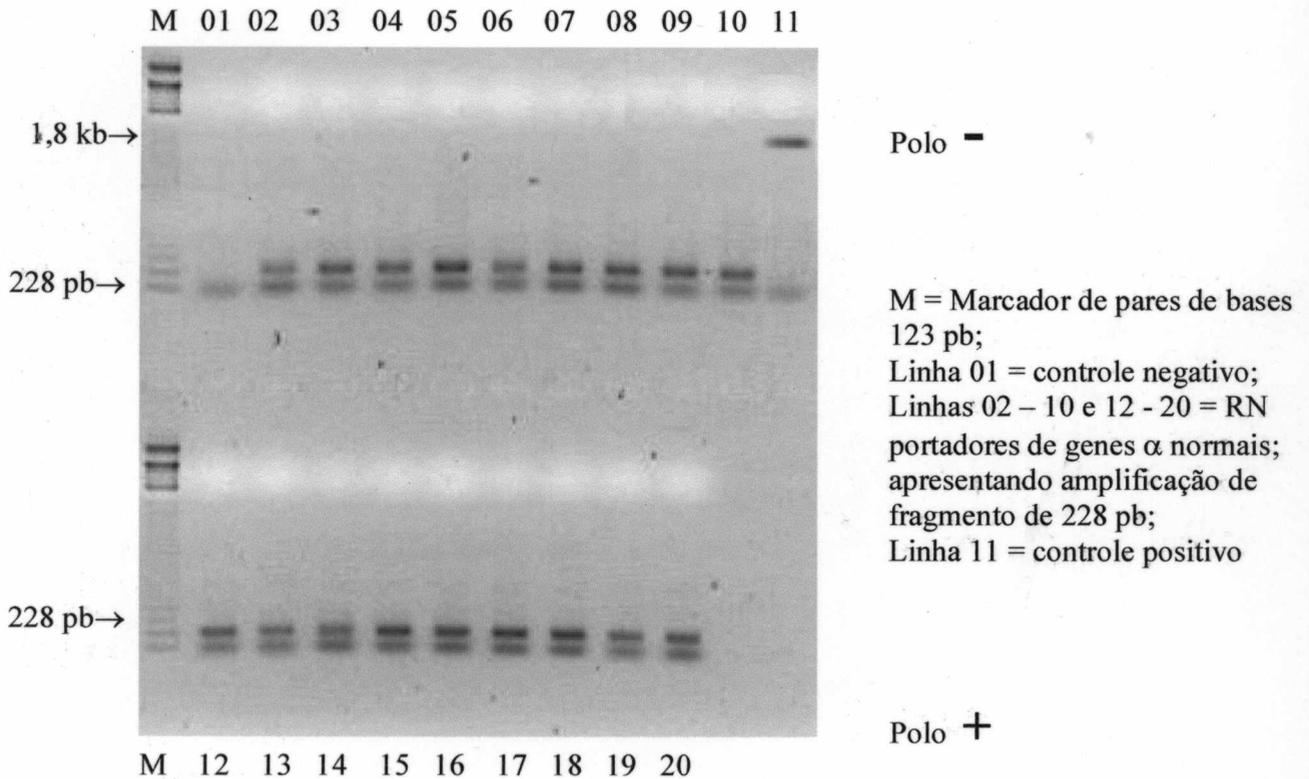


Figura 6.5. Gel de agarose a 1% dos fragmentos obtidos na reação de PCR para a talassemia $\alpha_2^{4,2Kb}$, demonstrando RN portadores de genes α normais - Maternidade Tsylla Balbino/SESAB, Salvador / Bahia – fevereiro a junho de 2000

7. DISCUSSÃO

A população brasileira é bastante heterogênea, com participação ativa da imigração ocorrida durante o período de 1850 a 1950, que contribuiu com a vinda de mais de cinco milhões de indivíduos. (AZEVEDO, 1973).

De acordo com esta diversidade imigratória, quatro tipos étnicos foram fundamentais na formação da população brasileira: os portugueses, representando os caucasóides, que descobriram o país e o colonizaram desde o século XVI até a Independência; os negros, originários da África, a partir do século XVI até 1850 e destinados ao trabalho escravo durante a economia canavieira, a mineração e a lavoura cafeeira; os ameríndios, primeiros senhores da terra e atualmente reduzidos a algumas dezenas de milhares, concentrados no Norte, especialmente na Amazônia, região Centro - Oeste e Nordeste; os mestiços, surgidos do cruzamento entre estes três grupos étnicos e representados pelos caboclos (descendentes de brancos e ameríndios), mulatos (cruzamento entre brancos e negros) e cafusos (descendentes de brancos e ameríndios) (AZEVEDO, 1973; FREYRE, 2000).

Todas estas observações fornecem as bases para a grande diversidade de tipos étnicos que compõem a população brasileira. Cumpre ressaltar que um dos fatores mais marcantes na história do Brasil foi a grande influência africana, fazendo-se presente de forma mais ou menos intensa, a depender da região do país e da diversidade étnica dos imigrantes.

As várias nacionalidades, convivendo simultaneamente, introduziram na população brasileira diversas patologias, entre estas, as anormalidades hereditárias da hemoglobina, com predomínio das talassemias e da anemia falciforme, sendo a última considerada um problema de saúde pública na África e posteriormente em todo o Novo Mundo, inclusive

no Brasil (AZEVEDO et al, 1980; AZEVEDO et al, 1982; BUN & FORGET, 1986; RAMALHO, 1986; SONATI 1990).

A amostra de RN investigada no presente estudo foi constituída por 53,60% (309) de mulatos, 29,50% (170) de pretos e 17,0% (98) de brancos, confirmando as observações realizadas por KRIEGER et al (1965), que descreveram um grau de panmixia de raças em aproximadamente 97% na população do Nordeste brasileiro. Esta miscigenação racial também foi documentada por AZEVEDO et al (1981), em estudo conduzido na Ilha de Itaparica, situada na Baía de Todos os Santos a 12Km de Salvador, onde ficou evidenciando o crescimento da população de mulatos, acompanhado pelo decréscimo dos brancos, reduzidos a um terço no período de 20 anos.

O peso médio adotado como valor de referência para os RN a termo foi de 2,5Kg (NÓBREGA, 1995). A média de peso no total de RN estudados foi de 3,15Kg (DP±0,53), sendo que entre os nascidos a termo, a média foi de 3,22Kg (DP±0,47) e entre os prematuros foi de 2,52Kg (DP±0,62). O grupo de prematuros, como esperado, apresentou na sua maioria, valores de peso inferiores ao estabelecido como normal; um fato importante foi o encontro de RN a termo apresentando valores no limite inferior, indicando uma provável influência relacionada a origem da população estudada, uma vez que a Instituição participante do estudo, atende predominantemente a mulheres de classe sócio-econômica baixa.

O estudo das características hematológicas apresentou média de Hb de 14,71 g/dL ($\pm 1,83$); Ht de 46,08% ($\pm 6,05$); Hm de $4,26 \times 10^6$ L ($\pm 0,57$); VCM de 108, 37 fL ($\pm 5,9$); HCM de 34,71 pg ($\pm 3,8$) e CHCM 32,03% ($\pm 2,97$). Comparando os resultados obtidos com os valores de referências adotados (WALLACH, 2000),: Hb de 19,5 g/dL ($\pm 4,5$); Ht

de 57,0% (± 13); Hm de $5,4 \times 10^6/L$ ($\pm 1,3$); VCM de 108 fL ($\pm 6,5$); HCM de 36 pg (± 3) e CHCM de 34% (± 2), observou-se que a população estudada apresentou valores hematológicos médios situados no limite inferior da normalidade. Estes resultados também são previsíveis, uma vez que os valores adotados como padrão são americanos. A utilização destes valores de referência deve-se ao fato de não haver, até o presente momento, valores referenciais para a nossa população; com isso, os resultados obtidos no presente estudo poderão contribuir para estabelecimento dos nossos valores hematológicos de referência em RN. A análise das características hematológicas entre os grupos de RN prematuros e nascidos a termo, demonstrou diferenças estatisticamente significativas para os valores de Hm, Ht e Hb, sendo ainda menores quando comparados aos padrões anteriormente descritos (WALLACH, 2000).

A análise das hemoglobinas presentes na amostra, demonstrou que 90,9% (538) dos RN apresentaram perfil eletroforético normal e, 9,1% (54) apresentaram as hemoglobinas variantes S ou C. Destes, 5,6% (33) apresentaram a HbS em heterozigose (AS); 3,2% (19) a HbC em heterozigose (AC) e 0,3% (02) a HbC em homozigose (CC). No Brasil, a distribuição das hemoglobinopatias é muito variável, tendo sido registrado na região de Campinas (São Paulo) por RAMALHO et al (1976), a presença de 2,72% de portadores do traço falciforme em 220 RN analisados; na Bahia 10,8% destas alterações foram encontradas em 1.200 crianças em idade escolar (AZEVEDO et al, 1980); RAMALHO em 1986 registrou freqüência de 6,6% do gene da HbS entre a população negróide do sudeste do país. De acordo com estes dados, o estabelecimento de programas de triagem neonatal para estas doenças genéticas têm sido desenvolvido no país, demonstrando freqüências elevadas para as hemoglobinas variantes, principalmente a HbS. Em estudo recentemente

realizado em 478 RN de Niterói (Rio de Janeiro), RIBEIRO et al (2000) encontraram a prevalência de 5,43% de hemoglobinas variantes; em Araraquara (São Paulo), o estudo de 1.366 RN, revelou a frequência de 6,2% de hemoglobinopatias (OLIVEIRA et al, 2000); no Rio Grande do Sul, o estudo realizado em 333 neonatos revelou o encontro de um indivíduo portador da HbS para cada 55 nascimentos (SILLA, 1999). No estado de Pernambuco, BANDEIRA et al (1999) estudando as características de RN portadores de HbS, encontrou 5,1% com traço falciforme e 0,2% com heterozigose dupla para as hemoglobinas S e C; em Minas Gerais, o programa de triagem neonatal analisou 605.419 RN, detectando 3,2% de crianças com traço falciforme, 1,3% com HbC em heterozigose e 0,08% de portadores de anemia falciforme (SS) (SERJANT, 2000).

Na cidade do Salvador, a associação de pais e amigos dos excepcionais (APAE), através do programa da Secretária de Saúde de rastreamento neonatal para hemoglobinopatias, conveniado ao Sistema Único de Saúde – SUS, analisou 1503 RN utilizando a técnica de HPLC, detectando 3,12% de RN com traço falciforme; 2,06% com HbC em heterozigose; 0,07% de RN com HbD em heterozigose; 0,07% com dupla heterozigose para as hemoglobinas S e D e 0,4% com doença falciforme SC (PIMENTEL et al, 2000).

Comparando-se os resultados obtidos no presente estudo com os descritos pela APAE em Salvador, podemos observar frequências diferentes para a presença da HbS, além da detecção da Hb variante D. Estes fatos podem ser justificados pela diferença no tamanho da amostra analisada, onde a APAE estudou uma amostra 2,5 vezes maior que a referida no presente estudo, aumentando a possibilidade de detecção de hemoglobinas variantes mais raras, além do encontro de homozigotos para a Hb S, cuja frequência descrita em adultos negróides da nossa população é de 0,1% (RAMALHO, 1986; SILVA et al, 1993); além

disso, a técnica de HPLC apresenta um poder de resolução superior à eletroforese ácida, assim como uma maior sensibilidade na detecção de pequenas quantidades de hemoglobinas na presença de concentrações elevadas de HbF, como ocorre nos RN (VAN DER DIJS et al, 1992). Cumpre ressaltar que a maternidade pública Tsylla Balbino, cujas amostras foram estudadas no presente trabalho, atende a um grande contingente de mulheres negróides, com uma população de RN caracterizada por 74,70% de mulatos e pretos, aumentando a probabilidade de encontrar indivíduos portadores da HbS, uma vez que a presença desta hemoglobina está diretamente relacionada à proporção de pretos e mulatos da amostra (ZAGO et al, 1983; ZAGO et al, 1992). Além disso, as frequências de HbS (5,6%) e HbC (3,5%) descritas na nossa amostra, também confirmam, geneticamente, a possibilidade aumentada para o diagnóstico de indivíduos SC e SS em nosso meio. Desta forma, estes resultados reforçam a necessidade da implantação de medidas urgentes, no sentido de estabelecer programas de triagem neonatal para hemoglobinopatias em todo o estado da Bahia.

Entre as técnicas mais utilizadas nos programas de triagem neonatal para hemoglobinopatias, estão as eletroforeses em pH ácido e alcalino. Como vantagens destas técnicas, incluem-se a simplicidade e o baixo custo, além de serem consideradas como métodos padrões para a determinação do perfil de hemoglobinas, com emprego mundial em programas de triagem que envolvem grande número de amostras. Suas desvantagens são a necessidade de utilizar as duas técnicas eletroforéticas em conjunto, além da resolução limitada para a identificação de algumas hemoglobinas variantes raras. Além das técnicas de eletroforese citadas, a focalização isoelétrica (IF) tem sido empregada em muitos programas de triagem neonatal, com excelente resolução na separação das hemoglobinas HbA, HbS, HbC, HbD e HbF; no entanto, o seu custo elevado tem limitado a sua utilização.

Outra técnica empregada é a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), que possui sensibilidade e reprodutibilidade altas, além de poder diferenciar e quantificar diversos tipos de hemoglobinas anormais em um curto período de tempo; neste caso, o custo elevado para a sua implantação restringe a sua utilização, principalmente em regiões onde a população possui baixo poder aquisitivo (VAN DER DIJS et al, 1992; <http://odp.od.nih.gov/consensus/cons/061/061_statement.htm>; SHAFER et al, 1996).

Em relação à prematuridade, analisou-se possíveis associações entre o tipo de hemoglobina presente e o período gestacional do RN, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas. A análise estatística da média de peso dos RN com diferentes perfis de hemoglobina, também não demonstrou diferenças significativas, apesar da média de peso dos RN com perfil eletroforético normal ter sido superior às médias dos pesos dos RN portadores de Hb variantes. Estes dados confirmam os resultados de BAILL & WITTER (1986) em estudo caso-controle realizado em RN de Baltimore - Estados Unidos da América, e os de BANDEIRA et al (1999) que analisaram RN de Pernambuco, onde também não foram encontradas diferenças estatísticas significantes para os pesos dos RN.

A distribuição do perfil de hemoglobinas entre os grupos raciais demonstrou que 42,30% (11) dos RN portadores da HbS estavam concentrados na população de RN mulatos, 30,77% (08) entre os pretos e 26,90% (07) entre os brancos. Estes resultados sugerem que triagem neonatal para hemoglobinopatias não deve ser baseada em critérios de cor ou raça do RN e dos seus progenitores, uma vez que a população brasileira, principalmente as das regiões do Norte e Nordeste, apresentam grande miscigenação racial, justificando a sua realização de forma universal. Apesar do gene da globina S ter sido historicamente trazido para o Brasil pelos africanos, este não mais se restringe à população

de pretos ou mulatos, apresentando-se entre indivíduos fenotípicamente brancos. Estes resultados confirmam os achados de AZEVÊDO et al (1980) que encontraram a frequência de 4,4% de portadores de traço falciforme entre crianças brancas do estado da Bahia; também estão de acordo com o trabalho realizado por BANDEIRA et al (1999), que detectou a frequência de 4,6% de traço falciforme entre RN provenientes de mães brancas no estado de Pernambuco.

No presente estudo, foi registrada a frequência de 3,82% (10) para o perfil ACF entre os RN do gênero feminino e 3,27% (08) do masculino; 6,11% (16) dos portadores da HbS foram do gênero feminino e 4,08% (10) do gênero masculino, porém sem significância estatística. CHANG et al (1995) encontraram diferenças significativas para a média de hemoglobina fetal entre os gêneros, com maior percentagem no gênero feminino, sugerindo que esta diferença esteja associada ao cromossomo X, cuja produção da HbF é controlada por um locus (*X-linked FCP locus*) no Xp22.2, o que talvez explique um quadro clínico menos grave em mulheres falcêmicas, o que pode estar levando a uma sobrevida maior destas pacientes. Embora o gene da globina β^S não tenha sido frequentemente relacionado ao sexo, existem controvérsias quanto a este aspecto, KRAMER et al (1978), em estudo realizado em 3.976 RN pretos de New-Haven - Estados Unidos da América, descreveu o predomínio da HbS em RN do gênero feminino. FOSTER et al (1981) confrontaram estes dados, analisando 70.000 RN de Kingston - Jamaica, registrando 10,1% de traço falciforme no gênero masculino e 10,01% no feminino; BANDEIRA et al (1999) também não encontraram diferenças significativas para a presença das hemoglobinas S e C entre os gêneros.

A análise dos valores hematológicos e índices hematimétricos entre os RN com diferentes tipos de hemoglobina demonstrou diferenças estatisticamente significativas para os valores de CHCM, com valores mais elevados para o grupo ACF, provavelmente devido ao aumento da viscosidade interna e do conteúdo total de cálcio presente nas hemácias contendo a HbC, fato comprovado pelo encontro de valores significativos relacionados às análises dos valores de Ht, Hm e CHCM entre os grupos AF e ACF (LUKENS, 1999). Estas mesmas observações não foram descritas nas análises realizadas entre os grupos AF e ASF e, entre os ACF e ASF, demonstrando a ausência dos fenômenos relatados acima entre os RN portadores de HbS.

O período neonatal foi por muito tempo considerado o período apropriado para a investigação da talassemia α , através da correlação do provável genótipo α do indivíduo com a quantidade de Hb de Bart's em corrida eletroforética realizada em pH alcalino. No entanto, após o nascimento, com a substituição das cadeias γ pelas β , o nível da Hb de Bart's diminui progressivamente, dificultando a sua determinação. Além disso, apesar da Hb de Bart's estar sempre relacionada à presença da talassemia α , nem todos os RN portadores desta alteração produzem níveis detectáveis desta hemoglobina, como o ocorrido nos portadores da forma heterozigótica para a talassemia α^2 (portador silencioso) (SONATI, 1990). Hoje, com o grande avanço das técnicas de biologia molecular, é possível a identificação destas condições, favorecendo a compreensão das alterações moleculares envolvidas.

No presente estudo, a caracterização da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ demonstrou a frequência de 22,71% (134) de indivíduos portadores, sendo 20,34% (120) heterozigotos e 2,37% (14) homozigotos. A talassemia α possui prevalência elevada em populações de todo o mundo,

tendo sido registrada na população negra dos Estados Unidos da América, a frequência de 30% desta alteração em heterozigose e 2% em homozigose; na Nigéria o estudo da talassemia α revelou 20% de RN com níveis detectáveis de Hb de Bart's e, na Jamaica estudos populacionais estimam a frequência de 25% de portadores heterozigotos (HIGGS et al, 1980; STEINBERG & EMBURY, 1986; ADAMS et al, 1994). No Brasil, SONATI (1990) registrou a frequência de 23,4% para a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ em estudo realizado em 47 indivíduos negróides de São Paulo. Na cidade do Salvador, ADORNO et al (1998) estudaram 50 gestantes com perfil eletroforético de hemoglobinas AA e encontrou a frequência de 17,20% de portadores da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$. As diferenças entre os resultados descritos nestes estudos, deve-se principalmente ao fato deste último não ter sido realizado em indivíduos caracterizados como negróides e sim em amostra da população geral. COUTO (1999), realizou o estudo da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ em gestantes com perfil de hemoglobinas AA e AC da cidade do Salvador, demonstrando a frequência total de 23%. De acordo com o descrito, os nossos resultados confirmam a frequência elevada da talassemia α na população estudada, demonstrando a importância de sua detecção através de programas de triagem neonatal.

A presença da talassemia α^2 quando verificada entre os RN a termo e prematuros, não revelou diferenças estatisticamente significativas, tendo sido encontrados 19,87% (90) de heterozigotos e 2,21% de homozigotos entre os RN a termo; 17,86% (10) de heterozigotos e 1,78% (01) de homozigotos entre os RN prematuros. VAN DER DIJS et al (1992) sugerem que a presença da talassemia, pode diminuir a idade gestacional do RN, estando diretamente relacionada ao número de genes α ativos e conseqüentemente à

quantidade de Hb de Bart's formada, com base no fato de que a redução da quantidade de HbF pode conduzir a diminuição da captação de oxigênio da circulação materna.

A análise das características hematológicas entre os RN com genes α normais e os portadores de talassemia α^2 , demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos; a mesma análise estatística, excluindo-se os RN prematuros, também demonstrou diferenças significantes em todos os parâmetros, com exceção do CHCM ($p = 0,22$). De acordo com a literatura, na ausência de deficiência de ferro ou de associação com hemoglobinas anormais, a simples presença da talassemia em RN conduz a alterações nos padrões hematológicos, com diminuição do VCM e do HCM (LUKENS, 1999), diferente do que acontece nos adultos, onde a presença da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ em heterozigose não causa alteração detectável, podendo ou não cursar com anemia discreta e, a homozigose caracteriza-se por uma anemia moderada, podendo apresentar alterações morfológicas das hemácias, sendo frequentemente descrita a presença de hemácias microcíticas (BUNN & FORGET, 1986; WEATHERAL & PROVAN, 2000). Desta forma, as diferenças encontradas nos dados hematológicos dos RN com talassemia $\alpha_2^{3,7 Kb}$ comparados aos RN com genes α normais, sugerem que a presença da talassemia α , contribuiu para a redução significativa, não apenas dos índices hematimétricos, mas também dos valores hematológicos. Portanto, o diagnóstico da talassemia α através da biologia molecular mostra-se necessário, uma vez que a demonstração da Hb de Bart's por eletroforese pode fornecer diagnóstico falso negativo para os portadores da talassemia $\alpha_2^{3,7 Kb}$ em heterozigose; e, a interpretação inadequada do conjunto destes achados pode levar a administração iatrogênica de compostos ferrosos nos RN, podendo acarretar a precipitação

de fenômenos ligados a sobrecarga de ferro, como a hemocromatose, que possui frequência ainda desconhecida na nossa população.

A presença da talassemia α não demonstrou associação com o gênero do RN. Quando se analisou a presença de talassemia entre os gêneros dos RN estudados, 23,75% (62) indivíduos portadores de talassemia foram do gênero feminino e 20,25% (49) do masculino, apesar de uma forma grave de retardamento mental estar relacionada à presença da doença da HbH e ao cromossomo X (WEATHERALL, 1995). Levando-se em conta a presença da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ entre os grupos raciais, encontramos a frequência de 23,60% (21) portadores deste tipo de alteração entre os RN brancos; 20,97% (56) entre os mulatos e 23,81% (35) entre os pretos, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, não sendo verificada associação entre a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ e os diversos grupos raciais que compõem a nossa população. Estes resultados reafirmam a grande miscigenação racial, uma vez que a talassemia α apresenta distribuição em todo o continente Africano, sendo a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ o tipo mais predominante, com contribuição irrelevante dos países Asiáticos para a frequência da talassemia α em nossa região (STAMATOYANNOPOULOS & NIENHUIS, 1994).

No presente estudo, a distribuição da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ entre os RN com diferentes perfis de hemoglobinas, demonstrou a frequência de 36,67% (11) de talassemia entre os RN ASF, sendo 33,33% (10) heterozigotos e 3,34% (01) homozigotos, resultados superiores aos descritos por SONATI (1990), que encontrou 18,2% de talassemia α^2 em negróides portadores de traço falcêmico (AS) e COSTA et al (1994) que encontraram a frequência de 22% de talassemia α^2 em 41 indivíduos falcêmicos da região sudeste do país. Assim, estes

resultados reafirmam a alta frequência deste tipo de talassemia na população do Estado da Bahia, estando acima daqueles descritos em outras localidades do Brasil e dos Estados Unidos, constituindo-se em um dos fatores que podem estar contribuindo para que os indivíduos portadores de anemia falciforme da cidade do Salvador apresentem um quadro clínico menos grave, como observado por QUEIROZ (1996) que relatou frequências menores para colelitíase entre os falcêmicos portadores de talassemia α no estado da Bahia. O encontro da frequência elevada de talassemia α entre os RN com perfil ASF, indica que os portadores destas duas condições, provavelmente, devem apresentar um risco reduzido ainda maior para a ocorrência de determinadas complicações clínicas descritas em heterozigotos AS, como a probabilidade de crises de falcização ao serem submetidos a cirurgias que utilizem anestésicos por períodos prolongados (NAOUM & DOMINGOS, 1997).

A associação da talassemia α com a HbC, provavelmente, diminui os níveis desta hemoglobina em indivíduos AC, pelo mesmo mecanismo que ocorre na associação com a HbS (ADAMS et al, 1994). No presente trabalho, foi verificada a presença da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ em heterozigose em 25% dos RN com perfil de hemoglobinas ACF, dados que estão de acordo com os demonstrados por COUTO (1999), que relatou a frequência de 23% de talassemia α^2 em gestantes AC de Salvador, sendo 21% heterozigotas e 2% homozigotas.

Considerando o tipo de hemoglobina e a presença da talassemia, foram analisados os pesos dos RN, não tendo sido encontrado diferença significativa entre os resultados, embora as médias dos pesos dos RN portadores de talassemia estivessem sempre abaixo da

média de pesos dos RN com genes α normais, tornando-se ainda mais pronunciada quando houve associação da talassemia com hemoglobinas variantes.

Com o objetivo de verificar se a talassemia α juntamente com a presença da hemoglobina variante poderia estar interferindo no período de duração da gestação, o perfil de hemoglobinas foi investigado entre os RN prematuros e nascidos a termo com genes α normais e portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$, não tendo sido encontrada nenhum tipo de associação. Apesar dos resultados não terem demonstrado significância estatística, o acompanhamento de gestantes apresentando tais alterações, pode conduzir a obtenção de informações relativas à prematuridade e a sua correlação com estas hemoglobinas.

Os efeitos da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ sobre a HbS foi investigada através da comparação das características hematológicas dos RN que apresentavam perfil de hemoglobinas ASF com genes α normais e os portadores de talassemia. Foram encontrados valores menores para a Hb, Ht e VCM nos RN com perfil ASF portadores de talassemia, com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. A talassemia α quando associada a anemia falciforme, melhora o curso clínico da doença, diminuindo a concentração intraeritrocitária da HbS, com redução do grau de hemólise (ADAMS et al, 1994); a interação da talassemia α e a heterozigose da HbS tem como efeito, a redução da quantidade de HbS, que é proporcional ao número de genes α . Assim, o genótipo da globina α pode ser considerado determinante das alterações hematológicas em indivíduos com traço falcêmico, observando-se diminuição do VCM e da Hb (HIGGS et al, 1980; STEINBERG & EMBURY, 1986). A mesma análise realizada em RN com perfil de hemoglobinas ACF, demonstrou diferenças estatisticamente significativas para os valores de Hb e VCM. Entre

os RN com perfil eletroforético normal AF, verificou-se que aqueles portadores de talassemia apresentavam valores hematológicos e índices hematimétricos inferiores aos RN com genes α normais, com diferenças significativas em todos os parâmetros, com exceção do Ht.

Comparando-se as características hematológicas entre os RN com perfil de hemoglobinas normal e variante dentro do grupo dos RN portadores de talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$, verificou-se que a análise entre os RN com os perfis AF e ASF; AF e ACF, demonstrou valores hematológicos sempre inferiores nos RN que apresentavam hemoglobina variante (S ou C), com diferenças estatisticamente significativas em todos os parâmetros, exceto para os valores de Hb no grupo AF e ACF, fato que não foi observado para os valores hematológicos dos RN AF e ASF; AF e ACF com genes α normais. Estes resultados sugerem que a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ quando associada a hemoglobinas variantes nos RN, interfere de maneira mais acentuada sobre as características hematológicas, reduzindo a níveis ainda menores os valores de VCM, Hb e Ht.

A talassemia $\alpha_2^{4,2Kb}$, freqüente entre asiáticos, raramente encontrada em negros e no Mediterrâneo, não foi identificada neste estudo.

Assim, o presente estudo confirmou a presença elevada de hemoglobinopatias em nosso meio, revelando a Bahia como o estado que possui as maiores freqüências para a HbS e talassemia α^2 do Brasil, detectadas em programas de triagem neonatal. Além disso, a identificação destas alterações possibilita o diagnóstico seguro e o tratamento adequado dos seus portadores, podendo contribuir com dados inéditos e de grande relevância para a compreensão da diversidade destas doenças genéticas. Diante do conjunto de resultados

encontrados, não há dúvidas sobre a necessidade de implantação de um programa de triagem neonatal em nosso estado, visando a identificação precoce, não apenas de hemoglobinas variantes, mas também de talassemias, buscando colaborar para a orientação dos familiares e instituição de aconselhamento genético, a fim de proporcionar uma qualidade de vida melhor aos portadores destas alterações.

8. CONCLUSÕES

1. Os valores hematológicos e índices hematimétricos mostraram-se abaixo dos valores de referência adotados. As médias de Hb, Ht e Hm apresentaram diferenças estatisticamente significativas) entre os grupos de RN a termo e prematuros, $p=0,005$; $p=0,021$ e $p=0,019$, respectivamente, com valores muito inferiores aos padrões referenciais, indicando que a origem sócio-econômica da população de RN estudada interferiu nos dados relatados;
2. Foram encontrados 33 (5,6%) RN com traço falciforme, 19 (3,2%) com heterozigose para HbC e 02 (0,3%) com homozigose para HbC, confirmando a presença de freqüências elevadas destas hemoglobinopatias em nossa região. O tipo de hemoglobina presente não interferiu na média de peso ao nascimento, não demonstrou associação com o período da gestação, nem com o gênero do RN;
3. Não foram identificados RN com perfil de hemoglobinas SF e SCF, no entanto a freqüências elevadas de RN com perfil ASF e ACF, sugerem a probabilidade aumentada de indivíduos SS e SC na nossa população. Entre os RN com perfil ASF, 42,30% foram mulatos, 30,77% pretos e 26,92% foram brancos, comprovando a grande miscigenação racial e descaracterizando a HbS como alteração exclusiva entre indivíduos pretos, principalmente na região estudada, reforçando a necessidade da triagem neonatal para hemoglobinopatias de forma universal;
4. A análise estatística das características hematológicas entre os RN com perfil eletroforético AF e ASF não demonstrou significância, ao contrário dos RN com perfil eletroforético ACF, que revelou diferenças estatisticamente significativas para os valores de Ht ($p=0,008$), Hm ($p=0,017$) e CHCM ($p=0,0045$), indicando que a presença da HbC influencia o perfil hematológico apresentado pelos RN;

5. A talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ foi detectada em 134 (22,71%) dos RN, destes 14 (2,37%) foram caracterizados como homozigotos e 120 (20,34%) como heterozigotos, sem diferenças estatísticas significantes entre os RN prematuros e nascidos a termo, não apresentando correlação com a idade gestacional. Também não houve associação da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ com o gênero, assim como não interferiu com o peso das crianças ao nascimento;
6. A presença da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ foi detectada em 11 (36,67%) RN com perfil ASF, sendo 10 (33,33%) heterozigotos e 01 (3,34%) homozigotos e em 4 (25,0%) RN com perfil ACF, sendo todos heterozigotos, indicando a frequência elevada desta alteração entre os RN portadores de hemoglobinas anormais acima dos valores descritos em estudos realizados em outras regiões do país, nos Estados Unidos e Jamaica;
7. A presença da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ em RN com perfil ASF influenciou os valores de Hb, Ht e Hm, reduzindo-os significativamente, quando comparados aos RN com perfil de hemoglobinas AF, $p=0,03$; $p=0,03$ e $p=0,008$, respectivamente. Entre os RN com perfil ACF e AF portadores de talassemia, houve diferenças significantes para os valores de Ht e Hm, HCM e CHCM, $p=0,007$; $p=0,002$; $p<0,00001$ e $p=0,028$, respectivamente;
8. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na análise comparativa dos valores hematológicos entre os RN portadores de hemoglobinas variantes e os RN com perfil AF que apresentavam genes α normais. Estes dados confirmam a influência da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ sobre as características hematológicas dos RN portadores de hemoglobinas variantes;

9. Não foram encontrados RN portadores da talassemia $\alpha_2^{4,2\text{Kb}}$, indicando que este tipo de alteração não está presente em frequências semelhantes à talassemia $\alpha_2^{3,7\text{Kb}}$ na nossa população;
10. A identificação dos portadores de hemoglobinas variantes e de talassemia, associado aos resultados obtidos com a análise hematológica, demonstram a importância da triagem neonatal de forma sistemática em todo estado da Bahia, possibilitando o diagnóstico precoce e adequado destas doenças. Desta forma, a triagem neonatal para hemoglobinopatias estruturais e de síntese, permite a realização de tratamento e acompanhamento médico apropriados aos indivíduos portadores destas alterações, possibilitando o início de medidas profiláticas, bem como o esclarecimento aos familiares sobre os primeiros sinais e sintomas das complicações de risco, através do aconselhamento genético.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. J.; KUTLAR, A.; McKIE, V.; CARL, E.; NICHOLS, F. T.; LIU, J. C.; McKIE, K.; CLARY, A. Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. **Am. J. Hematol.**, **45**: 279-82, 1994.

ADORNO, E.; ALBUQUERQUE, A.; REIS, M.G.; GONÇALVES, M.S. Caracterização molecular da talassemia- α^2 em uma população de Salvador - Bahia. **Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemot.**, **20** (suplemento): 97, 1998.

ALVARES FILHO, F.; NAOUM, P. C.; MOREIRA, H. W.; CRUZ, R.; MANZATO, A. J.; DOMINGOS, C. R. B. Distribución geográfica etaria y racial de la hemoglobina S en Brasil. **Sangre**, **40** (2): 97-102, 1995.

ANTONARAKIS, S. E.; BOEHM, C. D.; SERJEANT, G. R.; THEISEN, C.E.; DOVER, G. J.; KAZAZIAN JUNIOR, H. H. Origin of the β^S -globin gene in blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **81**: 853-56, 1984.

AZEVÊDO, E. Historical note on inheritance of sickle cell anemia. **Am. J. Hum. Genet.**, **25**: 457-58, 1973.

AZEVÊDO, E. S. Subgroup studies of black admixture within a mixed population of Bahia, Brazil. **Ann. Hum. Genet. Londers**, **44**: 55-60, 1980.

AZEVÊDO, E. S.; ALVES, A. F. P.; SILVA, M. C. B. O.; SOUZA, M. G. F.; LIMA, A. M. V. M. D.; AZEVÊDO, W. C. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. **Am. J. Phys. Anthropol.**, **53**: 509-12, 1980.

AZEVEDO, E. S.; SILVA, K. M. C.; SILVA, M. C. B. O.; LIMA, A. M. V. M. D.; FORTUNA, C. M. M.; SANTOS, M. G. Genetic and anthropological studies in the island of Itaparica, Bahia, Brazil. **Hum. Hered.**, **31**: 353-57, 1981.

AZEVEDO, E. S.; FORTUNA, C. M. M.; SILVA, K. M. C.; SOUZA, M.G.F.; MACHADO, M.A.; LIMA, A.M.V.M.; AGUIAR, M.E.; ABÉ, K.; EULÁLIO, M.C.M.N.; CONCEIÇÃO, M.M.; SILVA, M.C.B.O.; SANTOS, M.G. Spread and diversity of human populations in Bahia, Brazil. **Hum. Biol.**, **54 (2)**: 329-41, 1982.

BAILL, I.C.; WITTER, F.R. Sickle cell trait and its association with birthweith and urinary tract infections in pregnancy. **Inst. J. Gynecol. Obstet.**, **33**:19-21, 1986.

BANDEIRA, F.M.G.C.; LEAL, M.C.; SOUZA, R.R.; FURTADO, V.C.; GOMES, Y.M.; MARQUES, N.M. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina "S" detectados através de triagem em sangue de cordão umbilical. **J. Pediatr., Rio de Janeiro**, **75 (3)**: 167-71, 1999.

BAYSAL, E. & HUISMAN, T.H.J. Deteccion of common deletional α - thalassemia – 2 determinants by PCR. **Am. J. Hematol.**, **46**: 208–13, 1994.

BEHRINGER, R. R.; RYAN, T. M.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L.; TOWNES, T. M. Human γ - to β -globin gene switching in transgenic mice. **Gene Develop.**, **4**: 380-89, 1990.

BHAUMIK, K. Fetal hemoglobin synthesis in sickle cell anemia: some molecular considerations. **Am. J. Hematol.**, **46**:101-06, 1994.

BOOKCHIN, R.M.; NAGEL, R.L.; BALAZS, T. Role of hybrid tetramer formation in gelation of haemoglobin S. **Nature**, **256**: 667-68, 1975.

BOOKCHIN, R.M.; BALAZS, T.; NAGEL, R.L.; TELLEZ, I. Polymerisation of haemoglobin SA hybrid tetramers. **Nature**, **269**: 526-27, 1977.

BORDIN, S.; CRESPI, V.G.; BASSÈRES, D.S.; DUARTE, A.S.S.; MELO, M.B.; GRIGNOLI, C.R.E.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. Different rates of recombination among polymorphic short tandem repeats of the β -globin gene cluster in β^S chromosomes. **Blood**, **90**: 444, 1997.

BUNN, H.F. Sickle hemoglobin and other hemoglobin mutants. In: STAMATOYANNOPOULOS, G.; NIENHUIS, A.W., MAJERUS, P.W.; VARNUS, H. **The molecular basis of blood diseases**. 2 ed, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994, cap. 6, p. 207-56

BUNN, H.F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, **337**: 762-69, 1997.

BUNN, H. F. & FORGET, B. G. **Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects**. Philadelphia, PA: Saunders, 1986.

CHANG, Y.C.; SMITH, K.D.; MOORE, R.D.; SERJEANT, G.R.; DOVER, G.J. An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, β -globin haplotypes, α -globin gene number, gender, and age. **Blood**, **85**:1111-17, 1995.

CHANG, Y.C.; MAIER-REDELSPERGER, M.; SMITH, K.D.; CONTU, L.; DUCROCQ, R.; MONTALEMBERT, M.; BELLOY, M.; ELION, J.; DOVER, G.J.; GIROT, R. The relative importance of the X-linked FCP locus and β -globin haplotypes in determining haemoglobin F levels: a study of SS patients homozygous for β^S haplotypes. **Br. J. Haematol.**, **96**: 806-14, Nov. 1997.

CHARACHE, S. Fetal hemoglobin, sickling, and sickle cell disease. **Adv. Pediatr.**, **37**: 1-31, 1990.

COSTA, F.F.; ARRUDA, V.R.; GONÇALVES, M.S.; MIRANDA, S.R.P.; CARVALHO, M.H.; SONATI, M.F.; SAAD, S.O.T.; GESTEIRA, F.; FERNANDES, D.; NASCIMENTO, M.L.; QUEIROZ, I.L. β^S -gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from two regions of Brazil. **Am. J. Hematol.**, **46**: 96-7, 1994.

COUTO, F.D. **Investigação molecular da talassemia alfa 2, deleção 3,7kb, em uma população de gestantes heterozigotas para a HbC, na cidade de Salvador-BA.** Salvador, 1999. 53 p. Monografia, Instituto de Biologia, UFBA, 1999.

DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. **Practical haematology.** 6.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1984.

DAY, S.W.; BRUNSON, G.E.; WANG, W.C. Successful newborn sickle cell trait counselling program using health department nurses. **Pediatric Nursing**, **23 (6)**:,557-561, Dec. 1997.

DODÉ, C.; KRISHNAMOORTHY, R.; LAMB, J.;ROCHETE, J. Rapis analysis of - $\alpha^{3.7}$ thalassemia and $\alpha\alpha^{anti 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. **Br. J. Haematol.**, **82**: 105-111, 1992.

DOVER, G.J.; BOYER, S.H.; PEMBREY, M.E. F-cell production in sickle cell anemia: regulation by genes linked to β - hemoglobin locus. **Science**, **211**: 1441-1443, 1981.

EMBURY, S. H. The clinical pathophysiology of sickle cell disease. **Ann. Rev. Med.**, **37**: 361-376, 1986.

EMBURY, S.H. Sickle cell disease. In: HOFFMAN, R.; BENZ JUNIOR, E. J.; SHATTIL, S. J.; FURIE, B.; COHEN, H. J.; SILBERSTEIN, L. E. **Hematology**. 2.ed. New York: Churdhill Livingstone, **1995**: 611-40.

ERLICH, H.A. **PCR Techenology - priciples and aplications for DNA amplification**. New York: Stockton Press, 1989.

FOGLIETTA, E.; DEIDDA, G.; GRAZIANE, B., MODIANO, G.; BIANCO, I. Detection of α -globin gene disorders by a simple PCR methodology. **Haematologica**, **84**: 387-396, 1996.

FOSTER, K.; FORBES, M; HAYES, R.;SERJEANT, G.R. Cord blood screening for sickle hemoglobinopathies: evidence against a female preponderance of HbS. **J. Peditr.**, **98**: 79-81, 1981.

FREYRE, G. Casa-grande & senzala. **Introdução à história da sociedade patriarcal no Brasil**. 40 ed. Rio de Janeiro: Ed. Record, 2000.

GILL, F.M.; SLEEPER, L.A.; WEINER, S.J.; BROWN, A.K.; BELLEVUE, R.; GROVER, R.; PEGELOW, C.H.; VICHINSKY, E. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. **Blood**, **86**: 776-783, 1995.

GIL, I.C.P. **Influência dos haplótipos do gene da globina beta em manifestações clínicas selecionadas de pacientes com hemoglobinpatia SC e C homozigota**. 1998. 85 f. Dissertação (Mestrado em Hematologia) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

GONÇALVES, M.S.; NECHTMAN, J.F.; FIGUEIREDO, M.S.; KERBAUY, J.; ARRUDA, V.R.; SONATI, M.F.; SAAD, S.O.T.; COSTA, F.F.; STOMING, T.A. Sickle cell disease in a brasilian population from São Paulo: a study of the β^S haplotypes. **Hum. Hered.**, **44**: 322-327, 1994.

HIGGS, D.R.; PRESSLEY, L.; CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J.; SERJEANT, G.R. α Thalassemia in black populations. **The Johns Hopkins Medical Journal**, **146 (6)**: 300-310, June. 1980.

IDB 97 - Indicadores e dados básicos. **Rede interagencial de informações para a saúde**. Ministério da Saúde, Brasília, 1997. Disponível em: < <http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 28 de nov. 2000.

ISRAELS, L.G. & ISRAELS, E.D. **Mecanismos in hematology**. Canada: Core health services Inc, 1998.

JOINER, C.H. Universal newborn screening for hemoglobinopathies. **J. Pediatr.** **136**: 145-146, 2000

KALMUS, H. Defective colour vision, P.t.c. tasting and drepanocytosis in samples from fifteen Brazilian populations. **Ann. Hum. Genetic.**, **21**: 313-317, 1957.

KRAMER, M.S., ROOKS, Y.; PEARSON, H.A. Cord blood screening for sickle hemoglobinopathies: evidence for a female preponderance of HbS. **J. Pediatr.**, 1978

KRIEGER, H.; MORTON, N.E.; MI, M.P.; AZEVÊDO, E.; FREIRE-MAIA, A.; YASUDA, N. Racial admixture in north-eastern Brazil. **Ann. Hum. Genet.**, **29**: 113-125, 1965.

LANE, P.A.; O'CONNELL, J.L.; LEAR, J.L.; ROGERS, Z.R.; WOODS, G.M.; HASSELL, K.L.; WETHERS, D.L.; LUCKEY, D.W.; BUCHANAN, G.R. Functional asplenia in hemoglobin SC disease. **Blood**, **85 (8)**: 2238-2244, Apr. 1995.

LUKENS, J.N. The thalassemia and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis In: LEE, C.W.; FOSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.P.;

RODGERS, G.M. **Wintrobe's clinical hematology**. 10th ed Baltimore: Williams & Wilkins, 1999, cap. 53, p. 1405-1448.

MEARS, J.G.; LACHMAN, H.M.; LABIE, D.; NAGEL, R. Alpha - thalassemia is related to prolonged survival in sickle cell anemia. **Blood**, **62 (2)**: 286-290, Aug. 1983.

MULLIS, K. B. & FALLONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase - catalized chain reaction. **Meth. Enzimol.**, **155**: 335-350, 1987.

NAGEL, R.L.; BOOKCHIN, R.M.; JHONSON, J.; LABIE, D.; WAJCMAN, H.; ISAAC-SODEYE, W.A.; HONG, G.R.; SCHILIRO, G.; CROOKSTON, J.H.; MATSUTOMO, W.A. Structural basis of the inhibitory effects of hemoglobin F and hemoglobin A₂ on the polymerization of hemoglobin S. **Proc. Natl. acad. Sci. USA**, **76**: 670-672, 1979.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE STATEMENT. **NIH 61**: Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies. p. 01-21, Apr. 1987. Disponível em: <http://odp.od.nih.gov/consensus/cons/061/061_statement.htm>. Acesso em: 05 de jul. 2000.

NAOUM, P.C. **Hemoglobinopatias e talassemias**, São Paulo: Sarvier, 171p, 1997.

NÓBREGA, F.J.; LOPES, A.L.; BRASIL, A.D. Antropometria do recém-nascido brasileiro. In: ALVES FILHO, N. CORRÊA, M.D. **Manual de perinatologia**. 2^a. ed. Rio de Janeiro: Medici, 1995

OLIVEIRA, J.L.B. **Contribuição ao estudo da freqüência de hemoglobinopatias estruturais e sua influência no aparecimento de manifestações clínicas em gestantes de uma maternidade de Salvador - Bahia**. 1999. 93 f. Dissertação (Mestrado em Assistência Materno-Infantil) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

✕ OLIVEIRA, F.S.; DA CUNHA, S.P.; FURTADO, R.M., SANTANA, R.K.; MONTEIRO, S.C.M.; BERTHOLO, L.C.; MOREIRA, H.W. Hemoglobinas em recém-nascidos por focalização isoeétrica. In: 34º CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA E MEDICINA LABORATORIAL, 36 (3), 2000, Florianópolis. **Jornal Brasileiro de Patologia Clínica**. Rio de Janeiro, 2000. p. 78.

PEIXOTO, L.I.S.; PEDREIRA, C.M.; LOPES, K.M. Estudo genético de uma comunidade nordestina (Paulo Afonso, Bahia). **Ci. Cult.** v. 15, p. 1991, 1963.

PEREA, F.J.; CASAS-CASTANEDA, M.; VILLALOBOS-ARAMBULA, A.R.; BARAJAS, H.; CAMACHO, A.; HERMOSILLO, R.M.; IBARRA, B. D - Los - Angeles associated with HbS or beta - thalassemia in Mexican mestizo families. **Hemoglobin**, 23 (3) 231-237, Aug. 1999.

PHILIPSEN, S.; TALBOT, D.; FRASER, P.; GROSVELD, F. The β -globin dominant control region: hypersensitive site 2. **EMBO J.**, 9: 2159-67, 1990.

✕ PIMENTEL, H.; FONTES, M.I.M.M.; PURIFICAÇÃO, A.C.; PRATES, S. Rastreamento neonatal de hemoglobinopatias utilizando HPLC no estado da Bahia. In: 34º CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA E MEDICINA LABORATORIAL, 36 (3), 2000, Florianópolis. **Jornal Brasileiro de Patologia Clínica**. Rio de Janeiro, 2000. p. 160.

QUEIROZ, I.M.L.P. **Características clínicas, hematológicas e genéticas em pacientes homozigotos para a hemoglobinopatia S da Bahia e de São Paulo**. São Paulo, 1996. 111 f. Dissertação (Mestrado em Hematologia) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

RAMALHO, A.S. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. Ribeirão Preto: **Soc. Bras. Genética**, 1986.

RAMALHO, A.S.; JORGE, R.N.; OLIVEIRA, J.A.; PEDREIRA, D.A. Hemoglobina S em recém-nascidos brasileiros. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro, **41**: 9-10, 1976.

RAMOS, K.M.L.; PEDREIRA, C.M. Estimativas da frequência da Hb-C em grupos populacionais da Bahia. **IN: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA**, p. 22, 1970. Salvador.

RIBEIRO, G.S.; GINABREDA, M.G.P.; MANHÃS, M.M.; PORDEUS, V.A.; GOMES, R.L.C. Prevalência de hemoglobinopatia S em neonatos. In: 34º CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA E MEDICINA LABORATORIAL, 36 (3)., 2000, Florianópolis. **Jornal Brasileiro de Patologia Clínica**. Rio de Janeiro, 2000. p. 38.

SAIKI, R.K.; GEELFOND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer - directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, **239**: 487-491, 1988.

SERJEANT, G.R. Screening for sickle-cell disease in Brazil. **The Lancet**, **356 (8)**: 168-169, July. 2000.

SERJEANT, G.R.; SERJEANT, B.; ROPER, D.; HIGGS, D. Determinants of hemoglobin level in steady-state homozygous sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, **92**: 143-149, 1996.

SHAFER, F.E.; LOREY, F.; CUNNINGHAM, G.C.; KLUMPP, C.; VINCKINSKY, E.; LUBIN, B. Newborn screenign for sickle cell disease: 4 years of experience from California's newborn screenign program. **J. Pediatr. Hematol. Oncol., Philadelphia**, **8 (1)**: 36-41, 1996.

SILLA, L.M.R. doença falciforme: um grave e desconhecido problema de saúde pública no Brasil. **J. Pediatr.** 1999.

SILVA, R.B.P.; RAMALHO, A.S.; CASSORLA, R.M.S. A anemia falciforme como problema de saúde pública no Brasil. **Rev. Saude Públ.**, **27**: 54-58, 1993.

SMITH II, C.M.; KUETTNER, J.F.; TUREY, D.P.; BURRIS, S.M.; WHITE, J.G. Variable deformability of irreversibly sickled erythrocytes. **Blood**, **58**: 71-77, 1981.

SONATI, M.F. **Talassemia alfa com deficiência gênica em uma população negróide brasileira**. São Paulo, 1990. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, 1990.

STAMATOYANNOPOULOS, G. & NIENHUIS, A.W. Hemoglobin switching In: STAMATOYANNOPOULOS, G.; NIENHUIS, A.W., MAJERUS, P.W.; VARNUS, H. **The molecular basis of blood diseases**. 2 ed, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994, cap. 4, p. 107-156.

STEINBERG, M. H. Modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. **Hemoglobin**, **20**: 1-19, 1996.

STEINBERG, M. H. & BENZ JUNIOR, E. J. Hemoglobin synthesis, structure, and function. In: HOFFMAN, R.; BENZ JUNIOR, E. J.; SHATTIL, S. J.; FURIE, B.; COHEN, H. J.; SILBERSTEIN, L. E. **Hematology**. 2.ed. New York: Churdhill Livingstone, 1995a. p. 458-68.

STEINBERG, M.H.; BALLAS, S.K.; BRUNSON, C.Y.; BOOKCHIN, R. Sickle cell anemia in septuagenarians. **Blood**, **86**: 3997- 4002, 1995.

STEINBERG, M.H. & EMBURY, S.H. α - Thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **Blood**, **68 (5)**: 985-990, Nov. 1986.

STEINBERG, M.H.; HSU, H.; NAGEL, R.L.; MILNER, P.F.; ADAMS, J.G.; BENJAMIN, L.; FRYD, S.; GILLETTE, P.; GILMAN, J.; JOSIFOVSKA, O.;

HELLMAN-ERLINGSSON, S.; SAFAYA, S.; HUEY, L.; RIEDER, R.F. Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. **Am. J. Hematol.**, **48**: 175-181, 1995b.

STEINBERG, M. H.; LU, Z.; BARTON, F. B.; TERRIN, M. L.; CHARACHE, S.; DOVER, G. J. Multicenter study of hydroxyurea. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. **Blood**, **89**: 1078-1088, 1997.

VAN DER DIJS, F.P.L.; VAN DEN BERG, G.A.; SCHERNER, J.G.; MUSKIET, F.D.; LANDMAN, H.; MUSKIET, F.A.J. Screening cord blood for hemoglobinopathies and thalassemia by HPLC. **Clin. Chem.** **38 (9)**: 1864-1869, 1992

VICHINSKY E.; HURST, D.; EARLES, A. Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality. **Pediatrics**, **81**: 749-55, 1988.

WALLACH, J. **Interpretation of diagnostic tests**. 7 ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. 1026 p.

WANG, C.W.& LUKENS J.N. Sickle cell anemia and other sickling syndromes. In: LEE, G.R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.N.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.P.; RODGERS, G.M. **Wintrobe's clinical hematology**. 10th. ed. Baltimore: Williams & wilkins, 1999, cap. 51, p. 1346-1404.

WEATHERALL, D.J. The thalassemias. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COOLER, B.S.; KIPPS, T.J. **Williams hematology**. 5 ed. New York: Mc.Graw - Hill, Inc., 1995, cap. 55, p. 581-585.

WEATHERALL, D.J. & CLEGG, J.B. **The thalassemia syndromes**. 3.ed. Oxford: Blackwell, 1981.

WEATHERALL, D.J. & PROVAN, A.B. Red cells I: inherited anaemias. **The Lancet**, **355**: 1169-1175, Apr. .2000

WENNING, M.R.S.C.; KIMURA, E. M. ; COSTA; F.F.; SAAD, S.T.O.; GERVÁSIO, S.; DE JORGE, S.B.; BORGES, E.; SILVA, N.M., SONATI, M.F. α - Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. **Braz. J. Med. Biol. Res**, **33** (9): 1041-1045, 2000.

WILLIAMS, C.; HARRAD, R.A.; SPARROW, J.M.; HARVEY, I.; GOLDING, J. Future of preschool vision screening. **BMI**, **316**: 937, March. 1998.

YONG, K.N.; WADSWORTH, L.D.; LANGLOIS, S.; YONG, S.L.; WILSON, R.D. Thalassemia carrier screening and prenatal diagnosis among the British Columbia (Canada) population of Chinese descent. **Clin. Genet.**, **55**: 20-25, 1999.

ZAGO, M. A.; COSTA, F. F.; TONE, L. G.; BOTTURA, C. Hereditary hemoglobin disorders in a brasilian population. **Hum. Hered.**, **33**: 125-129, 1983.

ZAGO, M. A.; FIGUEIREDO, M. S.; OGO, S. H. Bantu β^S cluster haplotype predominates among brasilian blacks. **Am. J. Phys. Anthropol.**, **88**: 295-298, 1992

10. ANEXOS

**QUESTIONÁRIO APLICADO ÀS MÃES OU RESPONSÁVEIS PELOS RECÉM -
NASCIDOS**

Anexo I

Nome da Mãe: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Idade: _____ Grupo Sangüíneo: _____ Grupo Racial: _____

01. Quantas vezes já engravidou? _____

02. Já teve aborto? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, quantas vezes abortou?

() ESPONTÂNEOS () PROVOCADOS

03. Teve acompanhamento pré - natal? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, apresentou algum problema?

() SIM () NÃO

Qual? () Pneumonia

() Infecção Urinária

() Dores Ósseas

() Anemia

() Pré - eclâmpsia

() Outros:

04. Já teve algum parto prematuro (filho nasceu antes do tempo)?

() SIM () NÃO

Em caso de SIM, quantos partos prematuros? _____

05. Já teve algum óbito fetal intra - uterino (filho morreu dentro do útero)?

() SIM () NÃO

Em caso de SIM, quantos óbitos fetais intra - uterino? _____

06. Fez uso de cigarros durante a gestação? ()SIM () NÃO

07. Fez uso de álcool durante a gestação? ()SIM () NÃO

08. Fez uso de alguma outra droga? ()SIM () NÃO

Em caso de SIM, qual o tipo? _____

09. Conhece casos de Anemia Falciforme na família? _____

10. Sexo do Recém - Nascido: () F () M

11. Grupo Racial do Recém - Nascido: _____ Peso do RN: _____

12. Recém - nascido é prematuro? ()SIM ()NÃO

Em caso de SIM, qual o período? _____

13. Recém - Nascido apresentou algum problema? ()SIM ()NÃO

Em caso de SIM, qual?

() Icterícia

() Doença Respiratória

() Outros: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO**Anexo II**

Eu, _____ (nome do pai ou responsável), com 18 anos de idade ou mais, detentor de integral competência para dar ao menor _____ (nome do recém-nascido) o consentimento para participar como voluntário do estudo denominado Triagem Neonatal: Investigação de Hemoglobinopatias em Recém-nascidos da Cidade do Salvador - Bahia, sob a coordenação de Dra. Marilda de Souza Gonçalves. As implicações de sua participação voluntária, incluindo a natureza, duração e objetivo do estudo, os métodos e meios através dos quais deve ser conduzido e as inconveniências e riscos que podem ser naturalmente esperados foram explicados por _____ (nome do investigador) no _____ (endereço e telefone).

Entendo também que eu tenho permissão para a qualquer momento revogar o meu consentimento e retirar o paciente do estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de direitos. Entretanto, o paciente poderá ser solicitado a realizar exame, caso o médico que o assiste, julgue-os necessários para sua saúde e bem estar. Minha recusa em permitir que meu filho ou tutelado participe do estudo não resultará em punições ou perdas de benefícios a que ele/ela tenha direito.

Nome do responsável (letra de forma) _____

Assinatura do responsável _____ **Data** ___ / ___ / ___

Endereço _____ Número de identidade _____

Número no estudo _____

Eu presenciei a explicação acima descrita, confirmando a oportunidade concedida ao responsável de formular perguntas e testemunho a assinatura do pai ou responsável pelo menor neste documento.

Nome da testemunha-1 (letra de forma) _____

Assinatura da testemunha-1 _____ **Data** __/__/__

Nome da testemunha - 2 (letra de forma) _____

Assinatura da testemunha-2 _____ **Data** __/__/__

Nome do investigador (letra de forma) _____

Assinatura do investigador _____ **Data** __/__/__

EXPLICAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO

Título do estudo

“Triagem Neonatal: Investigação de Hemoglobinopatias em Recém-nascidos da Cidade do Salvador - Bahia”

Investigador principal

Dra. Marilda de Souza Gonçalves – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – BA
- Faculdade de Farmácia – Universidade Federal da Bahia

Informações sobre a sua participação

As anemias são doenças que podem ocorrer mais freqüentemente por falta de alimentação adequada, por parasitoses, mas também existe uma causa muito encontrada na nossa população e que pode ser herdada do pai e da mãe, devido a um defeito na substância que se une ao oxigênio e o leva por todo o nosso corpo. Esta substância é chamada de hemoglobina e uma das doenças mais comuns decorrente desta alteração é a anemia falciforme.

A anemia falciforme é uma doença grave e os indivíduos transmissores da herança representam 7% da nossa população; da mesma forma, a talassemia alfa constitui um tipo de doença, que pode ser confundida com anemia por deficiência de ferro, atingindo aproximadamente 20% da nossa população. Por isso, é importante realizar estudos nos recém-nascidos e descobrir se eles apresentam a doença, para que possam iniciar o tratamento precocemente, evitando possíveis complicações clínicas graves.

Por estes motivos, você está sendo convidado a participar de uma pesquisa médica, que envolverá diagnóstico, assistência e informações sobre estas anemias hereditárias. É

importante que você entenda os princípios gerais que se seguem a realização do presente estudo e que serão explicados a seguir: a) sua participação é totalmente voluntária; b) você poderá interromper sua participação antes ou em qualquer momento do estudo. Sua recusa em participar não envolverá punições ou perda dos direitos constituídos; c) depois de lidas as explicações, você pode fazer qualquer pergunta necessária ao seu entendimento

Objetivo do estudo

O objetivo deste estudo é fornecer o diagnóstico precoce destas anemias, com acompanhamento médico ao portador. Caso você concorde em participar, deve permitir a coleta de 5 mL de sangue do cordão umbilical, que será realizado na sala de parto pela equipe responsável e, destinados à realização das análises laboratoriais.

Duração da sua participação

O tempo previsto para a realização do nosso estudo será de aproximadamente 02 (dois) anos. Entretanto, todos os portadores da anemia serão assistidos pela equipe médica da Fundação Hemocentro da Bahia (HEMOBA) para acompanhamento clínico e aconselhamento genético.

Riscos, danos e desconfortos

O sangue será coletado por pessoal habilitado e especializado, utilizando materiais novos, estéreis e descartáveis.

Benefícios

A participação neste projeto proporcionará benefícios aos indivíduos portadores de anemia, uma vez que possibilitará a realização do diagnóstico precoce, melhorando o acompanhamento clínico, laboratorial e de aconselhamento genético.

Compromisso com a confidencialidade da identidade do voluntário

Os registros da participação da criança no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos responsáveis e da equipe participante do projeto e do médico que o acompanhará.

Novos achados significativos

Qualquer informação importante que surgir durante a sua participação no estudo e que possa contribuir para o melhor desenvolvimento clínico da doença em estudo será levada imediatamente ao seu conhecimento e do seu médico.

Cuidados médicos

Os participantes do estudo serão atendidos para acompanhamento no HEMOBA. As análises laboratoriais serão realizadas no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular / CPqGM-FIOCRUZ.

**Pessoas e locais a serem contactados para a obtenção de respostas, e
formulação de perguntas e maiores informações**

Por favor entre em contato com uma das pessoas abaixo descritas, caso você necessite de maiores esclarecimentos.

Dra. Marilda de Souza Gonçalves – Coordenadora do projeto – Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ / Tel: 356-8783 R- 265

Dra. Isa Lyra - Médica - Especialista em Hematologia - Centro de Hematologia e Hemoterapia / HEMOBA / Tel: 357 - 2496

Dra. Ângela Zanette - Médica - Especialista em Hematologia - Centro de Hematologia e Hemoterapia / HEMOBA / Tel: 357 - 2496

Elisângela Vitória Adorno - Farm. Bioquímico que desenvolverá a tese de doutorado com a realização do presente projeto no Laboratório LPBM – CPqGM – FIOCRUZ / Tel : 356-8783 R- 265

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar

Atesto o recebimento da cópia deste acordo, que é constituído pelos termos de explicação e de consentimento.

Nome do pai/responsável (letra de forma) _____

Assinatura do pai/responsável _____ **Data** ____ / ____ / ____

Nome da testemunha 1 (letra de forma) _____

Assinatura da testemunha 1 _____ **Data** ____ / ____ / ____

Nome da testemunha 2 (letra de forma) _____

Assinatura da testemunha 2 _____ **Data** ____ / ____ / ____