

**IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA DA GAP-PCR PARA O RASTREIO
REGIONAL DAS DELEÇÕES $-\alpha^{3.7}$ E $-\alpha^{4.2}$ EM PACIENTES COM SUSPEITA
CLÍNICA DE TALASSEMIA ALFA EM CAMPOS DOS GOYTACAZES**

KATRINE DA SILVA LEONARDO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JULHO DE 2015**

IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA DA GAP-PCR PARA O RASTREIO REGIONAL DAS DELEÇÕES $-\alpha^{3.7}$ E $-\alpha^{4.2}$ EM PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE TALASSEMIA ALFA EM CAMPOS DOS GOYTACAZES

Mestranda: Katrine da Silva Leonardo

Orientador: Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta

Coorientador: Dr. João Tadeu Damian Souto Filho

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como um dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, sob a orientação do Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta e a coorientação do Dr. João Tadeu Damian Souto Filho.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JULHO DE 2015**

IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA DA GAP-PCR PARA O RASTREIO REGIONAL DAS DELEÇÕES $-\alpha^{3.7}$ E $-\alpha^{4.2}$ EM PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE TALASSEMIA ALFA EM CAMPOS DOS GOYTACAZES

KATRINE DA SILVA LEONARDO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como um dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, sob a orientação do Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta e a coorientação do Dr. João Tadeu Damian Souto Filho.

Aprovada em 29 de julho de 2015.

Comissão Examinadora:

Dr^a Claudia Caixeta Franco Andrade (Doutora em Genética) – USP

Dr^a Maria Cristina Pessoa dos Santos (Doutora em Saúde da Criança e da Mulher) – FIOCRUZ

Dr^a Regina Célia de Souza Campos Fernandes (Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – FMC

Dr. João Tadeu Damian Souto Filho (Mestre em Clínica Médica) – FMC (Coorientador)

Prof. Enrique Medina-Acosta (Doutor em Parasitologia Médica e Molecular) – UENF (Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho certo nas minhas escolhas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta, meu orientador, pela disponibilidade e compreensão que demonstrou desde logo, por acreditar em mim e pelo seu inestimável contributo científico para este trabalho.

Ao Dr. João Tadeu Damian Souto Filho, meu coorientador, pela parceria e pela confiança em acreditar no meu trabalho. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho. Muito obrigada por doar uma pequena parte de seu imenso conhecimento.

Aos amigos (Cinthya Dessaune Neves, Diego Sá Leal de Oliveira, Fabrício Brum Machado, Filipe Brum Machado, Graziela de Sá Machado Araújo, Juliana Ywasaki Lima, Laís Gomes Sarlo, Luísa Mignone Paixão, Maria Emilce da Rosa Francelino, Milena Amendro Faria, Priscilla Gratival Pereira, Rita de Cássia Pestana Siqueira, Ronaldo da Silva Francisco Junior, Thais Louvain de Souza, Thiago Barbosa de Souza e Viviane Lamim Lovatel) que fizeram parte desses momentos, me ajudando e incentivando.

Em especial ao Antônio Francisco Alves da Silva, que esteve sempre ao meu lado dando força, ajudando no trabalho e dando os melhores conselhos.

À Rita Escocard, Zila Macedo e os profissionais do Hospital Geral de Guarus que me deram apoio técnico.

Aos profissionais do Hospital Escola Álvaro Alvim, em especial ao Rodney Rodrigues do Amaral pela colaboração na elaboração dos exames hematológicos, sempre disposto a ajudar.

A todos os professores da pós-graduação em Biociências e Biotecnologia pelo aprendizado.

A todos os amigos da Universidade Estadual do Norte Fluminense pelo carinho.

Ao Hemocentro Regional de Campos que permitiu minha liberação do trabalho para a realização deste.

Ao Dr. Isaac Lima da Silva Filho pela gentileza e colaboração com o envio da amostra controle.

As Doutoradas: Claudia Caixeta Franco Andrade, Maria Cristina Pessoa dos Santos e Regina Célia de Souza Campos Fernandes por aceitarem prontamente o convite para a participação como membros titulares na banca para defesa desta dissertação.

À FAPERJ pelo auxílio financeiro.

Por último...

A pessoa que está comigo todos os dias e que me deu apoio em todas as etapas, meu noivo Juliano Gomes Barreto. Obrigada por me ensinar, me escutar e me apoiar. Agradeço pelo esforço que fez para me compreender e entender que era importante para mim. Sua dedicação comigo e abdicação de alguns momentos para si mesmo é a mais profunda demonstração de carinho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização esquemática do grupamento de genes que codificam as cadeias do tipo alfa (A) e do tipo beta (B) da globina.	15
Figura 2. Representação esquemática dos subsegmentos homólogos X, Y e Z dos genes responsáveis pela síntese da globina alfa.	15
Figura 3. Comparação entre a sequência de aminoácidos da proteína codificada pelos genes <i>HBA2</i> e <i>HBA1</i>	16
Figura 4. Deleções no aglomerado de genes que codificam as cadeias do tipo alfa da globina.....	18
Figura 5. Mecanismo de recombinação desigual envolvendo os genes que codificam a cadeia alfa.....	20
Figura 6. Posição física e tamanho dos produtos esperados do ensaio da Gap-PCR.	38
Figura 7. Localização esquemática dos iniciadores nos loci.....	39
Figura 8. Representação esquemática da separação eletroforética dos produtos obtidos por Gap-PCR em gel de agarose..	40
Figura 9. Perfil eletroforético dos produtos de amplificação por Gap-PCR.....	49
Figura 10. Pesquisa intraeritrocitária de hemoglobina H (Caso 1393F).....	59
Figura 11. Pesquisa intraeritrocitária de hemoglobina H (Caso 1534).....	59
Figura 12. Pesquisa intraeritrocitária de hemoglobina H (Caso 1618).....	60
Figura 13. Distribuição de idade no grupo de pacientes portadores e não portadores da deleção $-\alpha^{3.7}$	62

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1. Distribuição percentual da população segundo autodeclaração – Brasil e Campos dos Goytacazes (2010).....	26
Tabela 2. Iniciadores a serem utilizados para identificação das principais deleções ($-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$) da talassemia alfa.	37
Tabela 3. Caracterização dos principais genótipos de talassemia alfa de acordo com o tamanho do fragmento resultante da metodologia Gap-PCR (validados <i>in silico</i>).	37
Tabela 4. Talassemia alfa e outras alterações hematológicas encontradas	43
Tabela 5. Valores de referência dos exames hematológicos e bioquímicos.	48
Tabela 6. Diagnóstico baseado em exames hematológicos versus diagnóstico baseado no exame molecular.	50
Tabela 7. Padrão de hereditariedade na população estudada.....	54
Tabela 8. Possíveis associações entre a condição heterozigota para a deleção - $\alpha^{3.7}$ e as variáveis hematológicas.	55
Tabela 9. Possíveis associações entre a condição homozigota para a deleção - $\alpha^{3.7}$ e as variáveis hematológicas.	55
Tabela 10. Regiões brasileiras estudadas para talassemia.	64
Quadro 1. Resultados dos exames hematológicos e bioquímicos realizados nos pacientes investigados.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
ATMDS	Síndrome mielodisplásica associada à talassemia alfa
β	Beta
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CI	Intervalo de confiança
CNS	Conselho Nacional de Saúde
δ	Delta
ϵ	Épsilon
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FA	Fosfatase alcalina
FMC	Faculdade de Medicina de Campos
FMS	Fundação Municipal de Saúde
γ	Gama
GGT	Gama Glutamil Transpeptidase
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HEAA	Hospital Escola Álvaro Alvim
HGG	Hospital Geral de Guarus
kb	Kilobases
LDH	Lactato Desidrogenase
μ	Mu ou Micro
MPM	Marcador de Peso Molecular
MRE	Elemento de Regulação a Montante
MS	Ministério da Saúde
NUDIM	Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGD	Diagnóstico Genético Pré Implantacional
ψ	Psi
RR	Risco relativo
SMD	Síndrome mielodisplásica
SUS	Sistema Único de Saúde

θ	Theta
TGO	Transaminase Glutâmica Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmica Pirúvica
TIBC	Capacidade Total de Ligação do Ferro
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
VCM	Volume Corpuscular Médio
ζ	Zeta

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS E QUADRO	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vi
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. As talassemias: Aspectos genéticos e moleculares	14
1.2. Manifestações clínicas e hematológicas.....	23
1.3. Associação da talassemia alfa com doença falciforme	24
1.4. Perfil populacional de Campos dos Goytacazes	25
1.5. Diagnóstico indireto	26
1.6. Diagnóstico direto.....	27
1.7. Relevância do diagnóstico molecular	28
1.8. Hospital Geral de Guarus	30
1.9. Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular	31
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. HIPÓTESE DO ESTUDO.....	31
4. META DO PROJETO	32
5. OBJETIVOS.....	32
5.1. Objetivo Geral.....	32
5.2. Objetivos Específicos	32
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
6.1. Tipo de estudo.....	33
6.2. Aspectos éticos	33
6.3. Sujeitos da pesquisa	33
6.4. Coleta de dados	34
6.5. Material biológico.....	34

6.6. Exames hematológicos e bioquímicos.....	35
6.7. Iniciadores utilizados no ensaio da Gap-PCR	35
6.8. Desenho experimental para identificação das deleções.....	39
6.9. DNA genômico de referência.....	40
6.10. Extração de DNA genômico	41
6.11. Quantificação de DNA genômico.....	41
6.12. Padronização do método de Gap-PCR	41
6.13. Eletroforese em gel de agarose.....	42
6.14. Análise dos dados	42
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
7.1. Caracterização da população estudada	42
7.2. Exames hematológicos e bioquímicos.....	43
7.3. Exame molecular	49
7.4. Padrão de hereditariedade	54
7.5. Exame molecular versus exames hematológicos e bioquímicos.....	54
7.6. Relação entre a presença da deleção e o fator idade	61
7.7. Frequência na população estudada	62
7.8. Frequência de talassemia alfa no Brasil e no mundo	63
7.9. Relevância do diagnóstico através do exame molecular.....	66
7.10. Fortalecendo a interiorização da Genética no SUS.....	67
8. CONCLUSÕES.....	68
9. REFERÊNCIAS	69
ANEXO A - TERMO DE ANUÊNCIA LIVRE E ESCLARECIDO.....	77
ANEXO B - DECLARAÇÃO DO HOSPITAL GERAL DE GUARUS	78

RESUMO

Introdução: A talassemia alfa é uma hemoglobinopatia autossômica, recessiva, caracterizada pela destruição dos eritrócitos. As alterações gênicas que causam talassemia alfa são resultantes da deficiência de um, dois, três ou quatro genes alfa-globina, sintênicos no cromossomo 16, causada principalmente por deleção ou raramente por mutação pontual. As deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ são as mais comuns e atingem apenas um gene. A frequência global de portadores de talassemia alfa é de 5-20% e no Brasil de 10-20%. O volume médio do eritrócito abaixo do valor de referência é fortemente associado à presença de talassemia alfa em homozigose.

Justificativa: Talassemia alfa deve ser considerada no diagnóstico diferencial de anemia. O diagnóstico molecular da talassemia alfa é importante para garantir que o paciente talassêmico não seja tratado inadequadamente com ferro, evitando assim danos aos tecidos, disfunção de órgãos e até morte. O diagnóstico precoce dessa hemoglobinopatia resulta em melhor qualidade de vida e assim aumenta a sobrevida dos acometidos.

Objetivo geral: Investigar a ocorrência das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ através da metodologia de Gap-PCR em pacientes com suspeita clínica de talassemia alfa atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hospital Geral de Guarus no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

Métodos: Estudo transversal em 70 pacientes sob assinatura do Termo de Anuência Livre e Esclarecido, com coleta retrospectiva de dados secundários. DNA genômico de amostras de sangue foram genotipados para as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ pela metodologia de Gap-PCR. Resultado do exame molecular foi comparado com os exames hematológicos e bioquímicos.

Resultados: Dos 70 pacientes, 40 (57,1%) foram identificados como portadores da deleção $-\alpha^{3.7}$. Destes, 17 (24,3%) são indivíduos heterozigotos ($-\alpha/\alpha$) e 23 (32,8%) homozigotos ($-\alpha/-\alpha$). A deleção $-\alpha^{4.2}$ não foi encontrada. Cada paciente dos núcleos familiares aqui investigados herdou a deleção $-\alpha^{3.7}$. Uma paciente com deleção $-\alpha^{3.7}$ em homozigose apresentou diagnóstico clínico de retardo mental. Nesse caso, afastou-se a possibilidade de o retardo mental estar associado com a talassemia alfa. Nenhum dos pacientes estudados apresentou a talassemia alfa causada por deleção de mais de um gene. Análise da distribuição por faixa etária revelou maior número de talassêmicos com idade entre 11 e 20 anos. Dentre os portadores, 20% apresentaram volume médio do eritrócito na faixa do valor de referência.

Conclusões: Com a implementação do método de Gap-PCR

conseguimos rastrear as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ em 70 pacientes com suspeita clínica de talassemia alfa em Campos dos Goytacazes. O estudo mostrou que a deleção $-\alpha^{3.7}$ é mais prevalente que a deleção $-\alpha^{4.2}$ na população estudada e que a deleção $-\alpha^{3.7}$ foi encontrada em mais da metade dos indivíduos suspeitos. Muitos jovens que apresentavam anemia a esclarecer foram identificados como portadores e assim terão melhor qualidade de vida sem as complicações clínicas causadas pelo tratamento incorreto. Este estudo é o primeiro a investigar a talassemia alfa através de exames moleculares na população de Campos dos Goytacazes. Ele confirma que o diagnóstico hematológico nem sempre é conclusivo. Por outro lado, o diagnóstico através da metodologia da Gap-PCR é de resolução específica.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular; Hemoglobinopatia; Gap-PCR; Talassemia alfa.

ABSTRACT

Introduction: Alpha thalassemia is a recessive, autosomal hemoglobinopathy characterized by the destruction of red blood cells. The genetic changes that cause alpha thalassemia result from a deficiency of one, two, three or four of the syntenic alpha-globin genes located on chromosome 16, mainly caused by a deletion or rarely by a point mutation. $-\alpha^{3.7}$ and $-\alpha^{4.2}$ deletions are the most common and affect only one gene. The worldwide frequency of alpha thalassemia is 5-20% and in Brazil ranges 10-20%. The average volume of red cells below the reference value is strongly associated with the presence of alpha thalassemia homozygous. **Rationale:** A scenario of alpha thalassemia should be considered in the differential diagnostic of anemia. Molecular diagnostic of alpha thalassemia is important to ensure that the thalassemia patients are not inadequately treated with iron, thereby preventing tissue damage, organ dysfunction, and even death. Early diagnosis of this hemoglobinopathy results in better quality of life and thus increases survival of the affected. **Objective:** To investigate the occurrence of deletions $-\alpha^{3.7}$ and $-\alpha^{4.2}$ by Gap-PCR methodology in patients with clinical suspicion of alpha thalassemia recruited at the Hematology Clinic of Hospital Geral de Guarus in Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. **Methods:** Transversal study in 70 patients under signed consent, with retrospective collection of secondary data. Genomic DNA blood samples were genotyped for the $-\alpha^{3.7}$ $-\alpha^{4.2}$ deletions by Gap-PCR methodology. Result of the molecular tests was compared with hematological and biochemical exams. **Results:** Of the 70 patients, 40 (57.1%) were identified as carriers of the $-\alpha^{3.7}$ deletion. Of these, 17 (24.3%) are heterozygous individuals ($-\alpha/\alpha$) and 23 (32.8%) homozygotes ($-\alpha/-\alpha$). The $-\alpha^{4.2}$ deletion was not found in this study. Each patient from the nuclear families here investigated inherited the $-\alpha^{3.7}$ deletion. A patient with homozygous $-\alpha^{3.7}$ deletion presented clinical diagnosis of mental retardation. In this case, the possibility of the mental retardation being associated with alpha thalassemia was ruled out. None of the patients had alpha thalassemia caused by deletion of more than one gene. Distribution analysis by age group showed a higher number of thalassemia among patients aged 11 and 20 years. Among carriers, 20% had a mean erythrocyte volume in the reference value range. **Conclusions:** With the implementation of Gap-PCR method, we are able to track the $-\alpha^{3.7}$ and $-\alpha^{4.2}$ deletions in 70 patients with clinical suspicion of alpha thalassemia in Campos dos

Goytacazes. The study showed that the $-\alpha^{3.7}$ deletion is more prevalent than the $-\alpha^{4.2}$ deletion in the population studied and that the $-\alpha^{3.7}$ deletion was found in more than half of the subjects. Many young patients who had anemia were identified as carriers, and, thus, will have better quality of life without clinical complications caused by incorrect treatment. This study is the first to investigate the alpha thalassemia through molecular tests in the population of Campos dos Goytacazes. It confirms that the hematological diagnosis is not always conclusive. On the other hand, the diagnosis through Gap-PCR methodology is of specific resolution.

Keywords: Alpha thalassemia; Gap-PCR; Hemoglobinopathy; Molecular diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. As talassemias: Aspectos genéticos e moleculares

A hemoglobina humana é uma proteína globular, que consiste em duas cadeias alfa (α) e duas cadeias beta (β). As quatro cadeias conjugam o grupo prostético heme, que liga reversivelmente uma molécula de oxigênio e a transporta dos pulmões para os tecidos periféricos (Perutz *et al.*, 1960; Nienhuis, 1986).

As talassemias alfa e beta constituem um grupo de doenças monogênicas, autossômicas, recessivas e com distribuição mundial em torno de 5 a 20%. Na talassemia alfa o defeito genético resulta da alteração quantitativa na produção das cadeias do tipo alfa da globina que junto às cadeias beta e o grupamento heme formam a hemoglobina (Forget e Cohen, 2005; Weatherall, 2006). A redução da síntese de uma das cadeias de globina pode levar a formação de moléculas de hemoglobina anormal, causando anemia, sintoma característico de apresentação da talassemia.

O aglomerado de genes que codificam as cadeias do tipo alfa da globina (Figura 1A) está localizado na região telomérica 16p13.3 do braço curto do cromossomo 16. Esse aglomerado compreende cerca de 30 kilobases (kb) e inclui o gene zeta (ζ), que se expressa durante o desenvolvimento embrionário, dois pseudogenes ($\psi\zeta$ e $\psi\alpha_1$), o gene mu (μ), dois genes alfa (α_2 e α_1 , também denominados *HBA1* e *HBA2*) e o gene theta (θ) (Higgs, 1993; Hughes *et al.*, 2005). Já o grupamento de genes que codificam as cadeias do tipo beta da globina (Figura 1B), localizado na região 11p15.5 do braço curto do cromossomo 11, compreende cerca de 65 kb e inclui o gene épsilon (ϵ) expresso durante o desenvolvimento embrionário, os genes gama expressos no feto ($^G\gamma$ e $^A\gamma$), o pseudogene ($\psi\beta$) e os genes delta (δ) e beta (β) que são expressos em adultos (Fritsch *et al.*, 1980).

Os genes *HBA1* e *HBA2* são parálogos com identidade de sequência maior do que 96%, resultado da duplicação de um gene ancestral comum, ocorrida há milhões de anos. Ambos os genes são compostos de três éxons (I, II e III) e dois íntrons (IVS-1 e IVS-2) (Higgs *et al.*, 1989). Cada um desses genes está localizado dentro de uma região homóloga de 4 kb de comprimento, onde cada região é dividida em três subsegmentos homólogos, denominados X, Y e Z

(Figura 2), separados por três segmentos não homólogos, denominados I, II e III (Lacerra *et al.*, 2004).

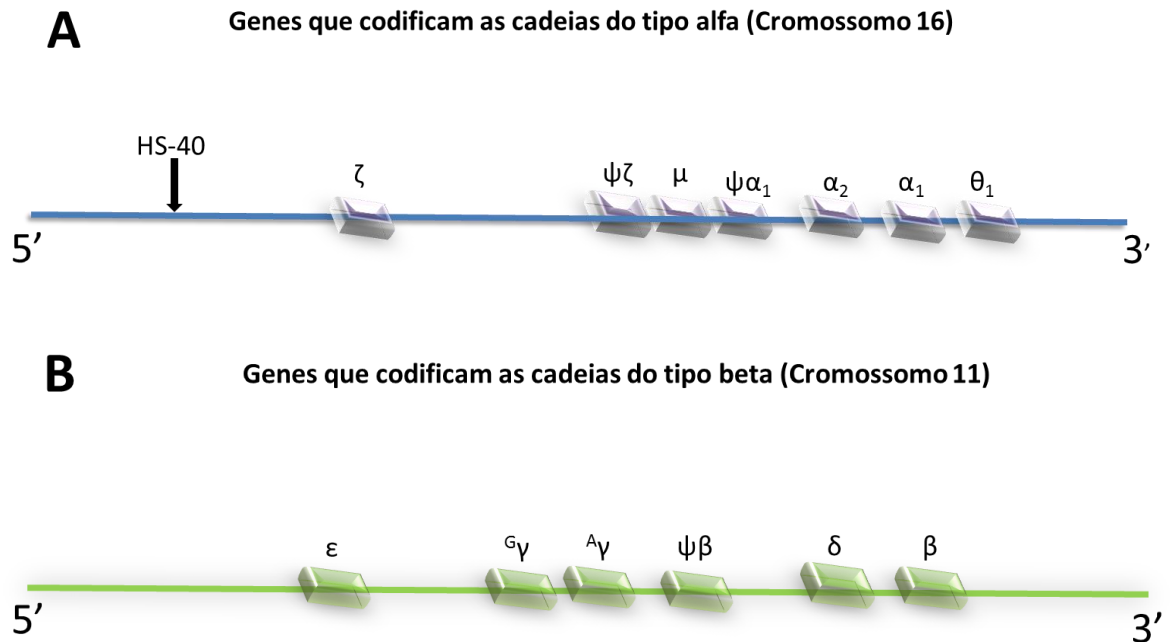


Figura 1. Localização esquemática do grupamento de genes que codificam as cadeias do tipo alfa (A) e do tipo beta (B) da globina. Adaptado de (Schechter, 2008).

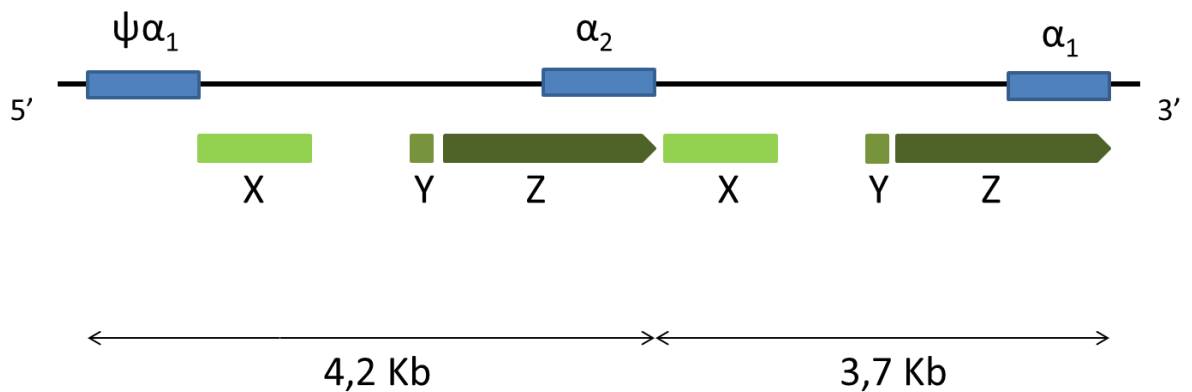


Figura 2. Representação esquemática dos subsegmentos homólogos X, Y e Z dos genes responsáveis pela síntese da globina alfa. Os genes α_2 e α_1 estão localizados dentro de dois segmentos duplicados altamente homólogos. Estes segmentos são subdivididos em três subsegmentos homólogos X, Y e Z. Adaptado de (Higgs *et al.*, 1984).

Apesar dos éxons dos genes α_1 e α_2 serem muito semelhantes e codificarem proteínas idênticas (Figura 3), o gene α_2 apresenta expressão duas a três vezes maior que o gene α_1 na produção total de cadeias do tipo alfa (Liebhaber *et al.*, 1986). Porém, o mRNA de α_1 é traduzido com maior rapidez e, por isso, a diferença da expressão entre os genes α_2 e α_1 não é tão grande como se poderia esperar (Naoum, 1997).

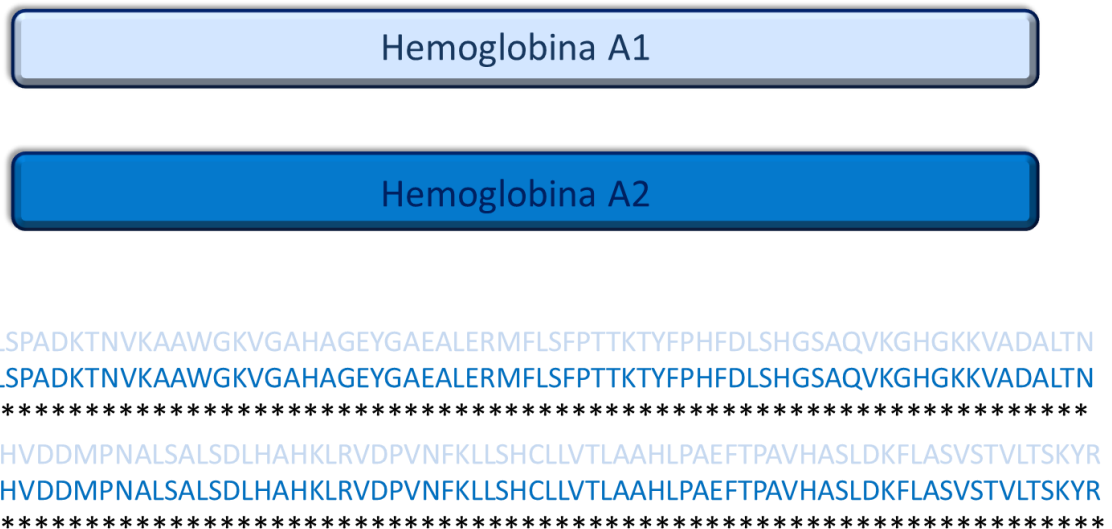


Figura 3. Comparação entre a sequência de aminoácidos da proteína codificada pelos genes *HBA2* e *HBA1*. Alinhamento das sequências de referência, acessos NCBI NP_000549.1 e NP_000508.1 pelo programa CLUSTALW.

Mutações que afetam os genes que codificam as cadeias polipeptídicas da hemoglobina podem causar alterações na síntese das globinas (Weatherall, 2004). Além das mutações que afetam os genes, ocorrem também mutações na região de regulação, chamada região HS-40, que é hipersensível a DNase I. Essa sequência foi mais tarde denominada α -MRE - Principal Elemento Regulatório alfa (Ribeiro e Sonati, 2008).

O α -MRE é um elemento regulador, formado por um fragmento de 350 pares de bases (pb) que controla a expressão dos genes alfa. Esse elemento está localizado a 40 kb a montante do gene zeta no cromossomo 16, e sua integridade é essencial para expressão dos genes. As deleções que removem essa sequência silenciam a expressão dos genes do aglomerado à jusante do α -MRE (Jarman *et al.*, 1991; Ribeiro e Sonati, 2008).

As deleções envolvendo o α -MRE são raras, mas caracterizam uma categoria particular de talassemia alfa determinante em que os genes alfa são fisicamente intactos, mas funcionalmente inativos (Romao *et al.*, 1991).

Até o momento, foram descritas mais de 15 deleções envolvendo o α -MRE, 11 dessas já foram totalmente caracterizadas: - ($\alpha\alpha$) RA, ($\alpha\alpha$) SCO, ($\alpha\alpha$) CMO, ($\alpha\alpha$) IDF, ($\alpha\alpha$) TAT, ($\alpha\alpha$) MB, ($\alpha\alpha$) MM ($\alpha\alpha$) IC ($\alpha\alpha$) TI ($\alpha\alpha$) IJ, ($\alpha\alpha$) ZW - que de um modo geral, ocasionaram a remoção de 3.4 a 160 kb da região situada à montante do *cluster* alfa (Hatton *et al.*, 1990; Liebhaber *et al.*, 1990; Wilkie *et al.*, 1990; Romao *et al.*, 1991; Flint *et al.*, 1994; Wenning *et al.*, 2002; Hartevelde *et al.*, 2005; Viprakasit *et al.*, 2006; Ribeiro e Sonati, 2008; Phylipsen *et al.*, 2010). Nestes casos, o comprometimento do α -MRE ocasiona a supressão da expressão dos genes alfa no cromossomo afetado, culminando com a diminuição dos valores do volume corpuscular médio (VCM < 80 fL) e de hemoglobina corpuscular média (HCM < 25 pg), quadro este similar ao apresentado por pacientes que contêm dois genes alfa afetados (Ribeiro e Sonati, 2008).

A talassemia denominada α^0 é caracterizada pela ausência da produção da cadeia alfa, pois a mutação atinge os dois genes alfa em *cis*. Os tipos de talassemia α^0 têm distribuição geográfica limitada. Até o presente momento, foram descritas 12 deleções associadas com talassemia α^0 . As deleções mais comuns que causam a talassemia α^0 são denominadas --^{SEA}, --^{FIL}, --^{THAI}, comuns no sudeste da Ásia, e --^{MED} e - $\alpha^{20.5}$, que ocorrem com mais frequência no Mediterrâneo (Figura 4) (Tan *et al.*, 2001). Análises detalhadas sugerem que as quebras na região do aglomerado de genes e pseudogenes que sintetizam as cadeias do tipo alfa são estruturalmente similares aos que ocorrem nas translocações cromossômicas que originam algumas doenças malignas (Naoum, 1997).

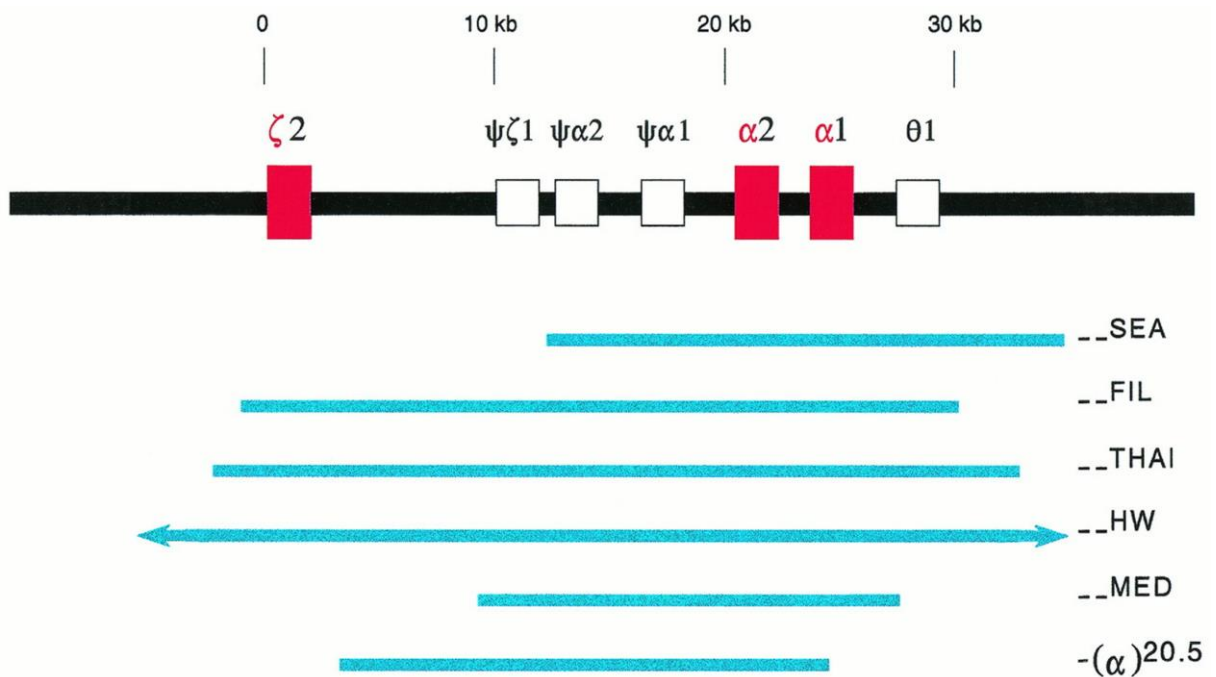


Figura 4. Deleções no aglomerado de genes que codificam as cadeias do tipo alfa da globina. Os três genes ativos $\zeta 2$, $\alpha 2$, $\alpha 1$ estão representados pela caixa vermelha. Os quatro pseudogenes estão representados pela caixa branca. A extensão das deleções é apresentada com linhas azuis sólidas (Chui e Wayne, 1998).

Por outro lado, a síntese reduzida de cadeia alfa configura a talassemia α^+ , que é o defeito molecular mais comum. As deleções mais comuns que causam a talassemia α^+ são: $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$, que atingem apenas um gene que codifica a síntese da cadeia alfa (Tan *et al.*, 2001).

A deleção $-\alpha^{3.7}$ é originada por recombinação meiótica (*crossing-over*) desigual, entre as regiões homólogas do tipo Z, que elimina 3.7 kb de DNA (Figura 5A). A resolução do *crossing-over* produz um só gene α_2/α_1 híbrido no cromossomo com a deleção de 3.7 kb, enquanto no outro cromossomo há inserção de um gene α_2/α_1 híbrido entre os genes α_2 e α_1 .

A deleção $-\alpha^{4.2}$ é originada por recombinação meiótica (*crossing-over*) desigual, entre as regiões homólogas do tipo X, que elimina 4.2 kb de DNA (Figura 5B). A resolução desse evento de recombinação produz um só gene α_1 no cromossomo com a deleção de 4.2 kb, enquanto no outro cromossomo há inserção de um gene α_2 entre os genes α_2 e α_1 . O cromossomo com genes triplicados tende a se perder nas divisões celulares subsequentes. Assim sendo, existem gametas normais e gametas portando a deleção $-\alpha^{3.7}$ ou a deleção $-\alpha^{4.2}$ (Higgs *et al.*, 1984).

A deleção $-a^{3.7}$ é heterogênea em relação à localização exata do ponto de quebra (*breakpoint*), com três subtipos diferentes conhecidos (I, II ou III) (Ballas, 2001).

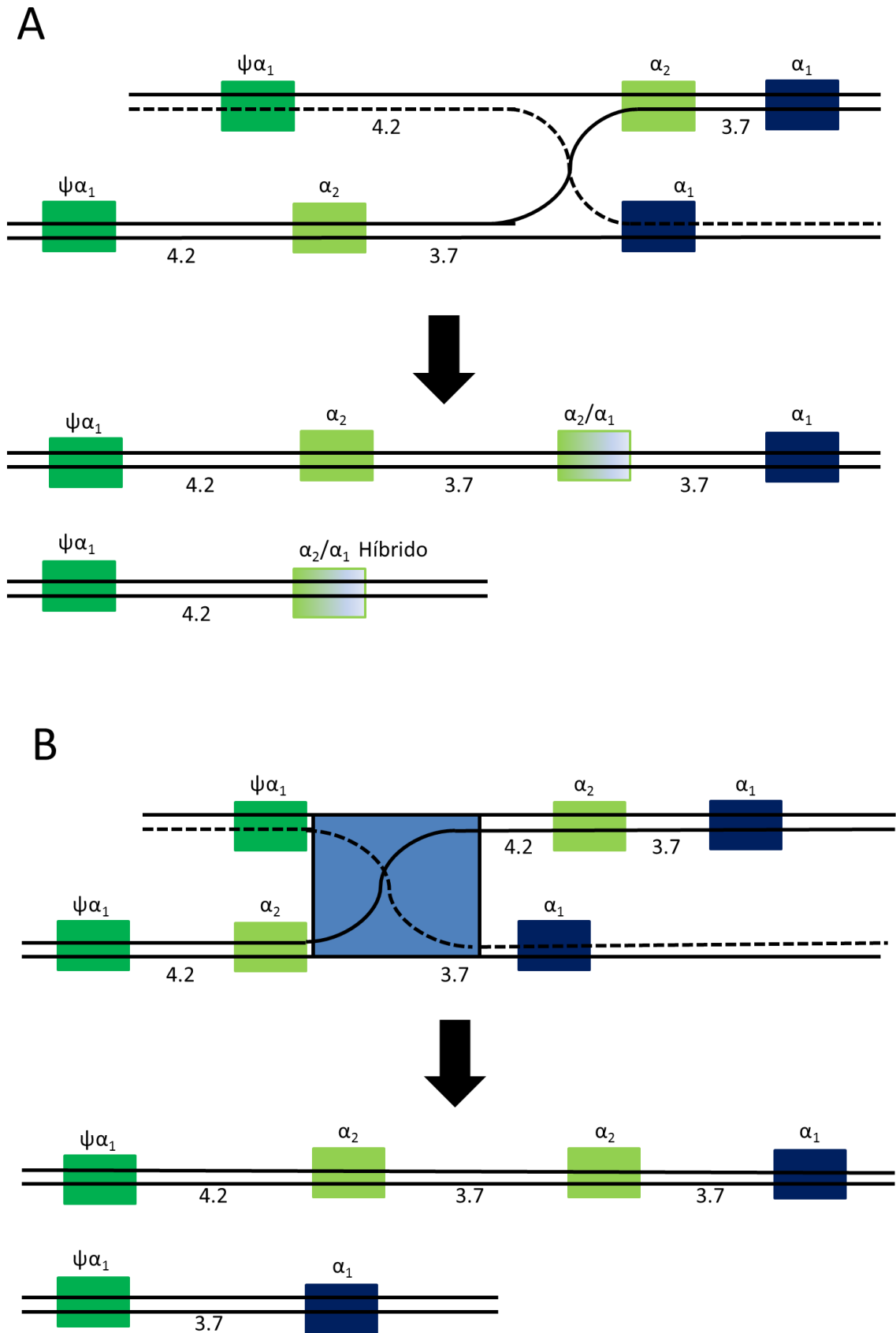


Figura 5. Mecanismo de recombinação desigual envolvendo os genes que codificam a cadeia alfa. A) Deleção $\alpha^{3.7}$. B) Deleção $\alpha^{4.2}$. Adaptado de (Wang et al., 2003).

Cerca de 90% das mutações nos genes alfa são deleções e apenas 10% mutações pontuais, raras, restritas a determinadas regiões geográficas (Naoum, 1997; Tadmouri *et al.*, 2006).

A deleção do(s) gene(s) alfa provavelmente foi trazida para o Brasil por escravos africanos e em menor grau por colonos portugueses, haja vista que nenhuma deleção dos genes alfa foi encontrada em tribos ameríndias (Zago *et al.*, 1995).

A talassemia alfa também pode ser adquirida, sendo secundária a um processo patológico primário, por exemplo: doenças linfóides e mieloproliferativas, anemia sideroblástica, doenças crônicas como Chagas e diabetes melito. Todos os casos confirmados e descritos na literatura apresentam pontos comuns: corpos de inclusão de hemoglobina H intraeritrocitária, concentrações de hemoglobina H por eletroforese variável entre 10 e 60% e redução da síntese de cadeias alfa da globina (Zago *et al.*, 2004; Steensma *et al.*, 2005). A talassemia alfa é uma comorbidade patogênica secundária em 5% dos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (Castro *et al.*, 2008).

Um caso aparte, relatou talassemia alfa adquirida associada ao retardo mental, nesse estudo nenhum dos pais dos indivíduos com este tipo de associação era portador do defeito para talassemia alfa. Análises citogenéticas efetuadas nesses indivíduos não revelaram anormalidades importantes no cromossomo 16. Admite-se, atualmente, que em casos cujo complexo gênico alfa apresenta-se intacto, a expressão dos genes alfa pode ser afetada por deleção dos seus genes vizinhos (Harvey *et al.*, 1990).

Ainda associado à talassemia alfa não adquirida, menciona-se à síndrome conhecida como talassemia alfa associada ao retardo mental ligado ao X. O gene *ATRX* codifica uma proteína que desempenha um papel essencial na regulação da expressão de outros genes através de um processo de remodelação da cromatina (Xue *et al.*, 2003). A proteína *ATRX* parece regular a expressão dos genes *HBA1* e *HBA2*. A expressão anormal de genes adicionais é a provável causa no atraso do desenvolvimento, características faciais distintivas, e os outros sinais e sintomas dessa síndrome. Mais de 125 mutações no gene *ATRX* foram identificados. As mutações somáticas do gene *ATRX* têm sido encontradas em alguns casos de síndrome mielodisplásica (SMD). Quando a talassemia alfa ocorre em pessoas com SMD, a combinação dos distúrbios é muitas vezes

referida como Síndrome mielodisplásica associada à talassemia alfa (ATMDS) (Steensma *et al.*, 2005). É importante considerar a síndrome ATRX em casos de pacientes do sexo masculino com deficiência intelectual e sinais anormais na substância branca no exame de ressonância magnética cerebral, mesmo em pacientes sem dimorfismo facial e/ou anormalidades hematológicas (Lee *et al.*, 2015).

Outro caso que envolve a talassemia alfa associada com má formação facial e atraso mental é conhecido como síndrome ATR-16. Essa síndrome é causada por deleção, que elimina cerca de 2 Mb, numa porção distal no braço curto do cromossomo 16 na região 16p13.3 Não se conhece o gene causador dessa síndrome complexa. O gene *SOX8* é um dos genes eliminados nos pacientes com essa síndrome. As proteínas SOX formam uma grande família de fatores de transcrição e são conhecidas por desempenharem um papel importante no desenvolvimento embrionário. O gene *SOX8* codifica a proteína que pode estar envolvida no desenvolvimento e função do cérebro. A expressão de *sox8* no cérebro e na medula espinal de ratos em desenvolvimento, juntamente com forte expressão no primeiro e segundo arcos branquiais e invaginações nasais, é consistente com o envolvimento desse gene. No entanto, uma vez que esta síndrome está sempre associada com grandes deleções, ainda não é possível identificar firmemente *SOX8* como o gene responsável por ATR-16 (Pfeifer *et al.*, 2000; Steinberg *et al.*, 2009).

A deficiência na síntese de cadeias do tipo alfa provoca o excesso de cadeia do tipo beta, que leva a formação de tetrâmeros de cadeias beta (em adultos) ou cadeias gama (em neonatos). O tetrâmero de cadeias beta constitui a hemoglobina H e o tetrâmero de cadeias gama a hemoglobina de Bart (Forget e Cohen, 2005; Weatherall, 2006).

As hemoglobinas H e de Bart apresentam maior afinidade pelo oxigênio do que a hemoglobina A1 (hemoglobina normalmente presente em adultos). Como consequência, quantidades insuficientes de oxigênio serão liberadas para os tecidos, o que resulta em anóxia tecidual (Chui *et al.*, 2003).

A produção dessas hemoglobinas resulta em danos nos eritrócitos (Forget e Cohen, 2005; Weatherall, 2006). A hemoglobina H pode precipitar-se sobre a membrana do eritrócito e diminuir a sua sobrevivência (Naoum, 1997). A fagocitose ocorre devido à rigidez desses eritrócitos. Esta propriedade retarda a passagem

dos eritrócitos através da microvasculatura (Olivieri e Weatherall, 2009). Se a hemoglobina H ou de Bart estiver presente nos eritroblastos poderá comprometer a eritropoiese (Naoum, 1997). A apoptose de eritroblastos contendo essas hemoglobinas provavelmente ocorre devido à perda da assimetria normal dos fosfolipídios da membrana, particularmente a exposição de fosfatidilserina na superfície da célula talassêmica (Boas *et al.*, 1998; Kuypers *et al.*, 1998; Pootrakul *et al.*, 2000; Schrier, 2002).

1.2. Manifestações clínicas e hematológicas

O indivíduo que apresenta deleção de um gene alfa ($-\alpha/\alpha$) é chamado de portador silencioso (ou talassemia alfa mínima); deleção de dois genes alfa ($--/\alpha$) ou ($-\alpha/-\alpha$) é conhecido como portador do traço alfa-talassêmico (ou talassemia alfa menor); de três genes alfa ($--/-\alpha$) portador da doença da hemoglobina H (ou talassemia alfa intermédia). Já indivíduos que apresentam deleção dos quatro genes alfa ($--/--$) não sobrevivem, pois, essa condição é incompatível com a vida. Essa patologia é conhecida como síndrome da hidropsia fetal (Naoum, 1997).

O traço α^+ talassêmico ($-\alpha/-\alpha$) e o traço α^0 talassêmico ($--/\alpha$) caracterizam-se por apresentarem eritrócitos hipocrômicos (eritrócitos pálidos devido à pequena quantidade de hemoglobina - geralmente entre 11,0 e 13,0 g/dl), valor de VCM entre 75 e 80 fL (valor de referência: 80 – 96 fL), anisopoiquilocitose discreta e presença de hemoglobina de Bart entre 5% a 10% ao nascimento. A hemoglobina H formada na vida adulta é rapidamente proteolisada pelo próprio eritrócito, o que dificulta a sua detecção (Weatherall, 2004; Sonati e Costa, 2006).

A interação das formas α^0 e α^+ ($--/-\alpha$; três genes alfa afetados) resulta na doença da hemoglobina H. Os indivíduos portadores dessa forma apresentam 25% a 50% de hemoglobina de Bart ao nascimento e 5% a 30% de hemoglobina H na vida adulta. As alterações hematológicas do paciente com hemoglobina H são mais acentuadas e clinicamente caracterizam pela presença de eritrócitos hipocrômicos (hemoglobina entre 8,0 e 11,0 g/dl), microcíticos (VCM entre 55 e 65 fL), com poiquilocitose, policromatofilia e eritrócitos em alvo, icterícia e esplenomegalia (Weatherall, 2004; Sonati e Costa, 2006).

A homozigose da talassemia α^0 ($--/--$) denominada hidropsia fetal, é a forma mais grave das síndromes alfa-talassêmicas, sendo causa de morte intrauterina ou morte logo após o nascimento. Nesses casos, a eletroforese de hemoglobina

mostra a presença de quase 100% de hemoglobina de Bart e, no sangue periférico observa-se hipocromia, microcitose e anisopoiquilocitose intensa, além do aumento significativo da porcentagem de eritroblastos (Weatherall, 2004; Sonati e Costa, 2006).

1.3. Associação da talassemia alfa com doença falciforme

A anemia falciforme é uma doença autossômica recessiva caracterizada pelo estado homozigoto da hemoglobina S (Hemoglobina S; 6 (A1) Glu>Val), variante resultante de uma mutação de ponto no gene beta da globina (*HBB:c.20A>T*) (Steinberg, 2008).

As moléculas de hemoglobina S formam polímeros alongados que modificam o citoesqueleto dos eritrócitos, dando origem à forma característica de foice, em situações como: hipóxia, desidratação e acidose. Os principais determinantes das manifestações clínicas da anemia falciforme são: fenômenos vaso-oclusivos e a hemólise acentuada (Stuart e Nagel, 2004; Frenette e Atweh, 2007).

Estudos relatam que a coexistência de talassemia alfa pode modificar as características clínicas e hematológicas da anemia falciforme (Embury *et al.*, 1982; Higgs *et al.*, 1982). A talassemia alfa inibe a polimerização da hemoglobina S na doença falciforme e diminui a anemia hemolítica (Steinberg *et al.*, 1984; Tome-Alves *et al.*, 2000).

A associação com talassemia alfa é muito comum, podendo atingir cerca de 20% da população falcêmica (Neto e Pitombeira, 2003; Tadmouri *et al.*, 2006).

Sabe-se que indivíduos com talassemia alfa também apresentam efeito protetor contra *Plasmodium falciparum* (protozoário parasita que causa a malária). Os eritrócitos dos indivíduos alfa-talassêmicos quando parasitados apresentam dificuldade de aderência às células endoteliais microvasculares e aos monócitos. Consequentemente, evita os efeitos pró-inflamatórios da citoaderência (Krause *et al.*, 2012).

Acredita-se que a seleção natural seja a responsável por elevar e manter alta a frequência da talassemia em várias regiões do mundo onde a malária é endêmica ou que tenha sido. A evidência tem crescido constantemente, confirmando que a malária é de fato a principal força por trás da alta frequência de hemoglobinopatias hereditárias. Quatro fontes sustentam essa afirmação: a

semelhança entre as distribuições de malária e hemoglobinopatias em escalas locais, regionais e globais; predições da idade histórica da população; estudos clínicos realizados em áreas endêmicas de malária; estudos tanto *in vitro* e *ex vivo* (Williams e Weatherall, 2012).

Em estudos realizados em Papua Nova Guiné observou-se que indivíduos com talassemia alfa apresentavam expressão reduzida do receptor de complemento (CR1) na superfície dos eritrócitos. O CR1 é um receptor que medeia à adesão de eritrócitos não infectados pelo *P. falciparum*. *In vitro*, os eritrócitos não infectados aderem aos eritrócitos infectados e formam rosetas (Cockburn *et al.*, 2004).

Estudos realizados no Quênia e em Gana mostraram que, indivíduos que herdaram apenas uma das hemoglobinopatias (talassemia alfa ou anemia falciforme) adquiriram um efeito fortemente protetor contra *P. falciparum*, mas os indivíduos que herdaram ambas hemoglobinopatias não apresentaram efeitos protetores (Williams *et al.*, 2005; May *et al.*, 2007).

1.4. Perfil populacional de Campos dos Goytacazes

Campos dos Goytacazes é o maior município do estado do Rio de Janeiro, com uma área de 4.031,9 Km², e o décimo município em população no interior do Brasil com 480.648 habitantes (Ibge, 2010b). Está localizado na região Norte Fluminense.

Dados do Censo 2010 do IBGE mostram o percentual de mais de 50% da população do Brasil é negra ou parda (Tabela 1). O dado se repete no município de Campos dos Goytacazes, que tem forte história ligada à escravidão (Ibge, 2010a; Cidac/Pmcg, 2014). No século XVIII, o município de Campos dos Goytacazes tinha 35.688 (63,72%) escravos numa população de 56.000 habitantes. No que diz respeito às procedências, os inventários *post-mortem* e os registros de batismo demonstraram que a maioria dos escravos vinha da África Central (Soares, 2010).

Tabela 1. Distribuição percentual da população segundo autodeclaração – Brasil e Campos dos Goytacazes (2010).

Cor	Brasil (%)	Campos dos Goytacazes (%)
Branca	47,70	47,73
Preta	7,60	14,50
Parda	43,10	37,08
Amarela ou indígena	1,50	1,09
Não declararam	0,00	0,04

Uma consulta exploratória sobre a prevalência de pacientes com anemia persistente realizada no Ambulatório de Hematologia do Hospital Geral de Guarus no município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro sugere que exista uma alta prevalência de talassemia alfa entre esses indivíduos.

E, apesar disso, as pessoas com suspeita clínica de talassemia alfa apresentam grandes dificuldades de acesso ao exame confirmatório, pois tem que se deslocar para os grandes centros e ainda enfrentam filas de espera, em decorrência da grande demanda. Identificar e informar o diagnóstico de talassemia alfa para indivíduos com suspeita clínica impactarão favoravelmente na confiança e no bem-estar dos pacientes acometidos.

1.5. Diagnóstico indireto

A grande dificuldade do diagnóstico da talassemia alfa está relacionada à metodologia empregada para a avaliação dessa hemoglobinopatia.

O diagnóstico de talassemia alfa em recém-nascidos é possível através da presença de hemoglobina de Bart que desaparece até 6 meses após o nascimento. A hemoglobina de Bart pode ser detectada por eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino (8,6 - 8,9) e sua confirmação deve ser feita em tampão fosfato (pH 6,5 - 7,0). No entanto, concentrações muito reduzidas dessa hemoglobina, geralmente inferiores a 1%, dificultam sua detecção. Todavia, a hemoglobina de Bart é instável, pois desnatura rapidamente e assim sua análise exige processamento rápido da amostra. Estima-se que cerca de 50% dos indivíduos talassêmicos heterozigotos (α -/ $\alpha\alpha$) não são detectados por essa técnica (Dias-Penna *et al.*, 2010).

Após os 6 meses de idade, o diagnóstico de talassemia por eletroforese convencional torna-se mais difícil, ou até impossível, pois a hemoglobina de Bart

não está presente nos eritrócitos. Alternativamente se investiga a presença de corpos de inclusões em eritrócitos após incubação com Azul de Cresil Brilhante. Os corpos de inclusão são formados pela precipitação dos tetrâmeros de cadeias beta, denominados hemoglobina H (Naoum, 1997).

A pesquisa da hemoglobina H no sangue periférico é um teste relativamente simples e de baixo custo. Entretanto, trata-se de uma técnica de coloração e visualização ao microscópio com grande variabilidade, já que é um método subjetivo (Dias-Penna *et al.*, 2010).

A hemoglobina H também pode ser detectada por eletroforese em pH alcalino. O hemolisado deve ser preparado em tampão fisiológico sem a presença de solventes orgânicos (Weatherall, 2004; Sonati e Costa, 2006).

A presença de hemoglobina H nos exames hematológicos confirma o diagnóstico de talassemia alfa, mas a sua ausência não permite a exclusão do diagnóstico, principalmente em caso de portador silencioso (Thompson *et al.*, 1989; Skogerboe *et al.*, 1992; Trent, 2006; Naoum e Bonini-Domingos, 2007).

O problema com a investigação de hemoglobina H reside em que, a sua detecção pode não ser confirmada em amostras seriadas, haja vista que há resultados contraditórios, o que limita a validação (Dias-Penna *et al.*, 2010).

Resumindo, o diagnóstico indireto da talassemia alfa, principalmente em suas formas mais brandas é difícil e às vezes é inconclusivo. A hemoglobina H deve ser confirmada por diferentes técnicas, sendo associada à morfologia eritrocitária e exames realizados em diferentes períodos, devendo, sempre que possível, ser confirmada por métodos de diagnóstico direto (Dias-Penna *et al.*, 2010).

1.6. Diagnóstico direto

As deleções causadoras das diferentes formas de talassemia alfa podem ser identificadas por hibridação com sondas pela técnica de *Southern blot* utilizando DNA genômico digerido com enzimas de restrição cujos sítios de reconhecimento flanqueiam a região de deleção. A aplicação desta técnica a qualquer programa de triagem em larga escala é extremamente difícil, apesar de ter sido útil para o diagnóstico individual.

Com o advento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a detecção das deleções em indivíduos com suspeita de talassemia alfa tornou-se

relativamente simples (Olivieri *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 2000; Shaji *et al.*, 2000). Essa metodologia é limitada pelo tamanho do fragmento alvo a ser amplificado. Para pequenas deleções, menos de um kilobase, o produto de amplificação terá tamanho menor que o produto sem a deleção. O fragmento menor resultante é o alelo com a deleção. Porém, para grandes deleções, como é o caso da talassemia alfa, a distância entre os dois iniciadores flanqueados é grande demais para amplificar eficientemente o alelo selvagem e o produto só é obtido a partir do alelo com a deleção. Neste caso o alelo selvagem pode ser detectado através do método de Gap-PCR (Lederer *et al.*, 2009) ou por PCR de longa distância (Foord e Rose, 1994). O princípio do método de Gap-PCR baseia-se na amplificação ao longo de um dos pontos de interrupção usando um iniciador complementar a sequência excluída e um complementar ao DNA.

Uma das vantagens da utilização da Gap-PCR é a multiplexação de iniciadores em uma única reação para alvos diferentes, por exemplo, as duas principais deleções de talassemia alfa ($-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$). A escolha das posições para os iniciadores é estratégica para permitir amplificar longos fragmentos que não são gerados facilmente pela técnica de PCR convencional, devido à distância entre os iniciadores que flanqueiam a deleção. Gap-PCR além de ser um método confiável para o diagnóstico pré-natal de talassemias alfa (Ko *et al.*, 1992), é também especialmente vantajoso para detectar portadores silenciosos (Zhou *et al.*, 2002).

1.7. Relevância do diagnóstico molecular

Na ausência de um diagnóstico definitivo, o paciente com suspeita de talassemia alfa corre o risco de ser tratado de forma inadequada com suplementos de ferro para curar a anemia persistente. As consequências causadas por esse tratamento errado são muitas. Quando a saturação de transferrina no soro é superior a 70%, espécies livres de ferro são formadas e são eles os principais responsáveis para a geração de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies causam danos aos tecidos, disfunção de órgãos e morte (Fibach e Rachmilewitz, 2008). O crescimento normal e o desenvolvimento podem ser alcançados na primeira década de vida (Piomelli *et al.*, 1974). No entanto, o dano induzido pelo ferro para o sistema hipotálamo-hipofisário pode causar retardo de crescimento puberal e no desenvolvimento sexual, mesmo quando se inicia o

tratamento com quelante de ferro na infância. Portanto, avaliações endócrinas anuais são recomendadas, incluindo medidas de pâncreas, tireóide, paratiróide, função gonadal e saúde óssea com nutricionista (De Sanctis *et al.*, 2004).

A terapia quelante de ferro nos pacientes alfa-talassêmico tem sido a única opção para amenizar o estresse oxidativo. A intolerância à terapia quelante é considerada a principal causa de morte em pacientes com acúmulo de ferro (Rachmilewitz e Giardina, 2011).

Com o diagnóstico molecular, o acometido será direcionado ao tratamento correto, e até mesmo, se necessário, encaminhado aos programas de aconselhamento genético. Nesses programas, profissionais são habilitados a conscientizar os indivíduos dos seus problemas, sem privar do direito de decisão reprodutiva.

Como a talassemia alfa é uma doença autossômica recessiva, os portadores do alelo mutante são assintomáticos. Casais em que ambos são portadores da mutação ($--/\alpha\alpha$) ou ($--/-\alpha$) apresentam um risco de 25% de ter um feto com hidropsia.

A interrupção da gravidez é uma opção para mães grávidas com fetos hidróticos, embora seja uma das maneiras mais difíceis de lidar com a aceitação do diagnóstico da doença (Cheung *et al.*, 1996; Chiu *et al.*, 2002).

O governo chinês já preconiza o diagnóstico pré-natal da talassemia alfa. Todavia, o Diagnóstico Genético Pré-Implantacional (PGD) é considerado como uma alternativa para o diagnóstico pré-natal (Xu *et al.*, 2009). O estabelecimento de um protocolo de diagnóstico molecular proporciona uma oportunidade de evitar as consequências adversas, como: interrupção da gravidez.

Quantidades adequadas de DNA fetal podem ser obtidas de forma segura em torno da 10^a semana de gestação, pela biópsia de vilo corial e até a 18^a semana de gestação, pela amniocentese para fazer o diagnóstico pré-natal para talassemia alfa. Uma tecnologia que utiliza o DNA fetal obtido a partir de plasma materno ou do sangue periférico materno foi também desenvolvida, mas não é rotineiramente usada (Cheung *et al.*, 1996; Chiu *et al.*, 2002).

Além de evitar o tratamento incorreto com ferro e permitir o aconselhamento de pais portadores, o diagnóstico correto reduz a angústia de pacientes por conta das sucessivas consultas e internações baseadas em diagnósticos incorretos. Por outro lado, evita investigações hematológicas

desnecessárias (que são realizadas para elucidar a etiologia microcitose e/ou hipocromia).

A implantação do diagnóstico molecular no Sistema Único de Saúde (SUS) é vantajosa já que, sem o diagnóstico correto, o paciente apresenta mais gasto com medicamentos, consultas e internações.

É importante destacar que não há estudos relatando talassemia alfa na região Norte Fluminense, já que foi feita uma busca de artigos científicos indexados no PubMed e na Bireme com os descritores “talassemia”, “talassemia” e “Campos dos Goytacazes” sem restrição de data de publicação e idiomas e nenhum resultado foi encontrado.

1.8. Hospital Geral de Guarus

Hospital Geral de Guarus (HGG), mantido pela Fundação Municipal de Saúde (FMS) de Campos dos Goytacazes, pessoa jurídica de direito público, integrante da administração indireta do Município de Campos dos Goytacazes/RJ, com sede à Av. Senador José Carlos Pereira Pinto, número 400, Parque Calabouço, Guarus, é um braço importante para saúde no município que oferece a população um total de 31 especialidades médicas, dentre essas, hematologia.

O desenvolvimento de programa para diagnóstico, tratamento e controle da talassemia alfa não é fácil porque requer a inclusão de abordagem genética em sistemas de saúde (Modell e Darlison, 2008). No Brasil foi instituído o Programa Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias, no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS de acordo com a Portaria MS nº 1.018 de 2005. Em junho de 2011, esse programa foi inaugurado no município de Campos dos Goytacazes. Hoje, o programa já tem registro de 250 pessoas cadastradas. Além de Campos dos Goytacazes, o Programa Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias, também atende aos pacientes de outros quatro municípios do Norte e Noroeste Fluminense: São Francisco de Itabapoana, São João da Barra, São Fidélis e Bom Jesus do Itabapoana. A estrutura de atendimento conta com uma equipe formada por oito profissionais: duas assistentes sociais, uma enfermeira, duas assistentes administrativas e dois médicos pediatras e um médico hematologista (Datusus, ; Fernandes, 2014).

1.9. Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular

Sediado no Hospital Escola Álvaro Alvim (HEAA), o Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular (NUDIM) é órgão executor do convênio/parceria técnico-acadêmica e científica entre a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e a Faculdade de Medicina de Campos (FMC). O espaço físico do NUDIM é de aproximadamente 350 m²; consta de 5 áreas para atendimento especializado: Serviço Social, Secretaria e Administração, Coordenação Científica e Confecção de Laudos, Coleta de amostras biológicas, Análises moleculares. Desde o ano de 2002, o Núcleo assiste à comunidade em procedimentos de exames de DNA (tipagem molecular) visando à: determinação de vínculo genético filial e familiar (maternidade e paternidade, irmandade, meia-irmandade); investigação de paternidade por reconstrução com suposto pai falecido; rastreio de cromossomopatias.

2. JUSTIFICATIVA

Talassemia alfa deve ser considerada no diagnóstico diferencial de anemia. O diagnóstico molecular da talassemia alfa é importante para garantir que o paciente talassêmico não seja tratado inadequadamente com ferro, evitando assim danos aos tecidos, disfunção de órgãos e até morte. O diagnóstico precoce dessa hemoglobinopatia aumenta a sobrevida e qualidade de vida dos acometidos, atenuando as complicações clínicas.

No Brasil, pouco se sabe sobre as frequências das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$. Poucas regiões foram estudadas (Tabela 10). No estado do Rio de Janeiro existe apenas um (1) estudo que investigou a presença da deleção $-\alpha^{3.7}$.

3. HIPÓTESE DO ESTUDO

A prevalência de pacientes com suspeita de talassemia alfa no Ambulatório de Hematologia em Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro é alta (28% dos 250 pacientes cadastrados).

As deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ são as mutações mais comuns responsáveis pela talassemia alfa. Essas deleções predominam em todas as partes do mundo onde a talassemia alfa está presente, com diferentes frequências (Kattamis *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 2001; Harteveld e Higgs, 2010).

Dados do Censo 2009/2010 do IBGE mostram que mais de 50% da população de Campos dos Goytacazes é negra ou parda (Ibge, 2010a; Cidac/Pmcg, 2014). Existem registros que comprovam que Campos dos Goytacazes tem forte história ligada à escravidão. A maioria era procedente da África Central (Soares, 2010).

A deleção $-\alpha^{3.7}$ é a mutação mais prevalente na África subsaariana (Kattamis *et al.*, 1996; Higgs e Weatherall, 2009).

Desta forma, a nossa hipótese de trabalho é que a frequência da deleção $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ da talassemia alfa na população estudada é alta.

4. META DO PROJETO

Este projeto visa introduzir o método de Gap-PCR como método direto para o diagnóstico de talassemia alfa em pacientes atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hospital Geral de Guarus em Campos dos Goytacazes, referência para anemia falciforme e hemoglobinopatias. Dessa forma, o serviço que já abrange o atendimento e cuidado com o paciente, irá também dispor de um método confiável para o diagnóstico dessa hemoglobinopatia. Esse trabalho também tem o compromisso de enfatizar a importância dos programas de aconselhamento genético, para alertar casais em que são ambos portadores da mutação ($--/\alpha\alpha$) correm um risco de 25% de ter um feto com hidropsia sem privar do direito de decisão reprodutiva.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Investigar a ocorrência das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ através da metodologia de Gap-PCR em pacientes com suspeita clínica de talassemia alfa atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hospital Geral de Guarus no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

5.2. Objetivos Específicos

- Implementar o método de Gap-PCR para o rastreio regional das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ em pacientes com suspeita clínica de talassemia alfa em Campos dos Goytacazes;
- Determinar a frequência da deleção $-\alpha^{3.7}$ na população estudada;
- Determinar a frequência da deleção $-\alpha^{4.2}$ na população estudada;

- Determinar o tipo de deleção α^0 , se presente na população estudada;
- Comparar os resultados dos exames hematológicos e bioquímicos ao resultado do exame molecular de cada paciente do estudo;
- Fornecer dados aos profissionais hematologistas interessados em aprimorar a atenção voltada a esses pacientes.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Tipo de estudo

Estudo transversal de população fechada de pacientes (n = 70) com suspeita de talassemia alfa atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hospital Geral de Guarus no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

6.2. Aspectos éticos

Os objetivos deste estudo estão inseridos no contexto dos projetos de pesquisa “Desenvolvimento de testes moleculares rápidos, altamente eficientes e econômicos para o diagnóstico de doenças genéticas humanas: Fortalecendo a interiorização da Genética no SUS” e “Implantação do ambulatório de genética médica do Hospital Escola Álvaro Alvim: rumo à interiorização do diagnóstico genético na rede de saúde” aprovados pela Comissão Regional de Ética em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Campos, com folhas de rosto FR278769 (13 de maio de 2010) e FR278771 (19 de agosto de 2009), respectivamente.

A inclusão dos sujeitos da pesquisa neste projeto foi voluntária por meio de assinatura do Termo de Anuência Livre e Esclarecido (Anexo A).

O levantamento de dados secundários foi feito com o consentimento do Dr. Wilson Rodrigues Cabral Filho (Diretor Geral do Hospital Geral de Guarus) (Anexo B). Ele também deu autorização para que o nome da instituição possa constar no trabalho, bem como em futuras publicações na forma de artigo científico.

6.3. Sujeitos da pesquisa

As características da população estudada estão associadas ao motivo da realização do teste genético e à percepção do risco associado suspeita de talassemia alfa, uma vez que se trata de amostra intencional, cuja seleção e participação estão primariamente vinculadas à indicação da testagem.

Pacientes com suspeita clínica de talassemia alfa, voluntários da pesquisa, atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hospital Geral de Guarus, foram encaminhados ao Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular (NUDIM) pelo médico hematologista Dr. João Tadeu Damian Souto Filho. Os pacientes foram elegíveis segundo os seguintes critérios de inclusão: pacientes com anemia persistente (valor de hemoglobina abaixo de 13,0 g/dl, eritrócitos hipocrômicos e microcíticos). Os critérios de exclusão foram: pacientes com índices hematimétricos com valores dentro do parâmetro de normalidade (segundo o valor de referência) e pacientes anêmicos por deficiência alimentar.

6.4. Coleta de dados

Dados secundários de pacientes (n = 70) com suspeita de talassemia alfa atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hospital Geral de Guarus no município de Campos dos Goytacazes foram coletados retrospectivamente. Essa coleta foi feita com a autorização do médico hematologista Dr. João Tadeu Damian Souto Filho. Os dados secundários foram transcritos a partir de informações arquivadas em computadores da instituição. Fizeram parte dos dados levantados para a pesquisa: nome, sexo, idade, endereço, telefone e diagnóstico clínico.

Os dados coletados foram acessados apenas pelos pesquisadores responsáveis (ENRIQUE MEDINA-ACOSTA, coordenador da pesquisa, JOÃO TADEU DAMIAN SOUTO FILHO, médico hematologista, e KATRINE DA SILVA LEONARDO, pesquisadora técnica), que se comprometeram a mantê-los em absoluto sigilo.

A fim de garantir à confidencialidade, as informações e/ou resultados foram divulgados em eventos científicos e serão publicados na forma de artigo científico com codificação dos nomes por sequências numéricas, de acordo com a Resolução CNS n° 466 de 2012.

6.5. Material biológico

A amostra de sangue foi coletada sem dissociação dos dados levantados. A coleta foi feita através de punção venosa dos pacientes, em 2 tubos contendo anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) na concentração de 1/50 e 1 tubo sem anticoagulante. Essa coleta foi realizada no NUDIM. Um tubo de coleta com EDTA e o tubo sem anticoagulante foi repassado ao laboratório de

Análises Clínicas do Hospital Escola Álvaro Alvim a fim de atualizar os dados referentes aos exames hematológicos e bioquímicos. O segundo tubo coletado com EDTA ficou sob a posse do NUDIM para Pesquisa intraeritrocitária de hemoglobina H, extração de DNA genômico e investigação molecular da patologia em questão. A análise determinou a presença ou ausência da deleção investigada. Essa informação foi utilizada de maneira sigilosa para predizer o estado de portador dessa alteração genética.

6.6. Exames hematológicos e bioquímicos

Os exames realizados foram: hemograma completo (contagem de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média), contagem de reticulócitos, dosagem de gama glutamil transpeptidase, ferro, ferritina, transferrina, saturação da transferrina, transaminase glutâmica oxalacética, transaminase glutâmica pirúvica, bilirrubina total, bilirrubina direta, bilirrubina indireta, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase, eletroforese de hemoglobina A1, hemoglobina A2, hemoglobina Fetal, hemoglobina S.

A fim de investigar a presença de hemoglobina H intraeritrocitária foi realizado uma pesquisa com corante Azul de Cresil Brilhante em sangue total. Para realização deste teste foi necessário incubar 2 gotas de sangue total com anticoagulante EDTA mais 4 gotas do corante por 30 minutos a 37°C. Seguiu-se com a confecção do esfregaço sanguíneo em lâmina e visualização das células em microscópio óptico. Todas as lâminas foram fotografadas para arquivar os dados.

6.7. Iniciadores utilizados no ensaio da Gap-PCR

A seleção dos iniciadores para amplificação da região de interesse foi baseada no protocolo Gap-PCR (Lederer *et al.*, 2009). Para validar *in silico* os iniciadores da referência, foram utilizados os seguintes critérios: anelamento dos iniciadores a um único sítio no genoma (região de interesse); reduzido potencial de auto complementariedade; ausência de formação de *hairpin*; ausência de auto-anelamento; nenhuma formação de dímeros; temperatura de anelamento do iniciador entre 58-60°C; e conteúdo de bases citosina e guanina entre 40-60%. Para essa validação foi utilizado o programa livre e *online* *OligoCalc - Oligonucleotide Properties Calculator*

(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Os iniciadores indicados no protocolo Gap-PCR (Lederer *et al.*, 2009) não atenderam aos critérios citados.

Novos iniciadores foram redesenhados (Tabela 2) afastando poucos pares de bases (máximo de 38 pb) acima ou abaixo em relação aos iniciadores do protocolo de (Lederer *et al.*, 2009). Para garantir a especificidade, manteve-se o tamanho dos iniciadores com comprimento ótimo entre 18–22 pb. Esses novos iniciadores foram validados *in silico* utilizando a ferramenta *OligoCalc*. E dessa vez, os critérios citados foram satisfatoriamente atendidos, com exceção do iniciador (P3) que tinha potencial para formação de *hairpin*. Essa questão foi resolvida após a mudança da base nitrogenada citosina por uma base nitrogenada guanina na região 5' do iniciador P3. A validação *in silico* foi feita utilizando ferramentas online: *iPCR-UCSC* - University of California Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>) e *BLAST-PCR-NCBI* - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Foi obtida a amplificação, *in silico*, de três fragmentos com tamanhos de 1.996 pb para a deleção de 3.7 kb, 1.775 pb para o alelo sem a deleção e 1.607 pb para a deleção de 4.2 kb (Tabela 3 e figura 6).

Os iniciadores utilizados foram sintetizados pela Life Technologies Corporation.

Tabela 2. Iniciadores a serem utilizados para identificação das principais deleções ($-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$) da talassemia alfa.

Iniciadores	Localização	Sequência
DS16221920F (P1)	chr16:221920	tcccctcacctacattctgc
DS16221920R (P2)	chr16:227733	agcaaatgcatcctcaaagc
DS16223694R (P3)	chr16:223694	gtttattcaaagaccaggaagg
DS16219256F (P4)	chr16:219256	acacccttcccagtttacc
DS16219256R (P5)	chr16:225109	tgccaccctcttctgactct

Tabela 3. Caracterização dos principais genótipos de talassemia alfa de acordo com o tamanho do fragmento resultante da metodologia Gap-PCR (validados *in silico*).

Genótipo	Iniciadores usados	Distância entre os iniciadores (pb)	Tamanho do amplicon (pb)	Validação <i>in silico</i>	Figura 6
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	P1 + P2	5.814	1.996	chr16:221920+227733	A
$-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$	P4 + P5	5.854	1.607	chr16:219256+225109	B
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	P1 + P3	1.775	1.775	chr16:221920+223694	C
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	P1 + P2 e P1 + P3	5.814 e 1.775	1.996 e 1.775		
$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	P4 + P5 e P1 + P3	5.854 e 1.775	1.607 e 1.775		

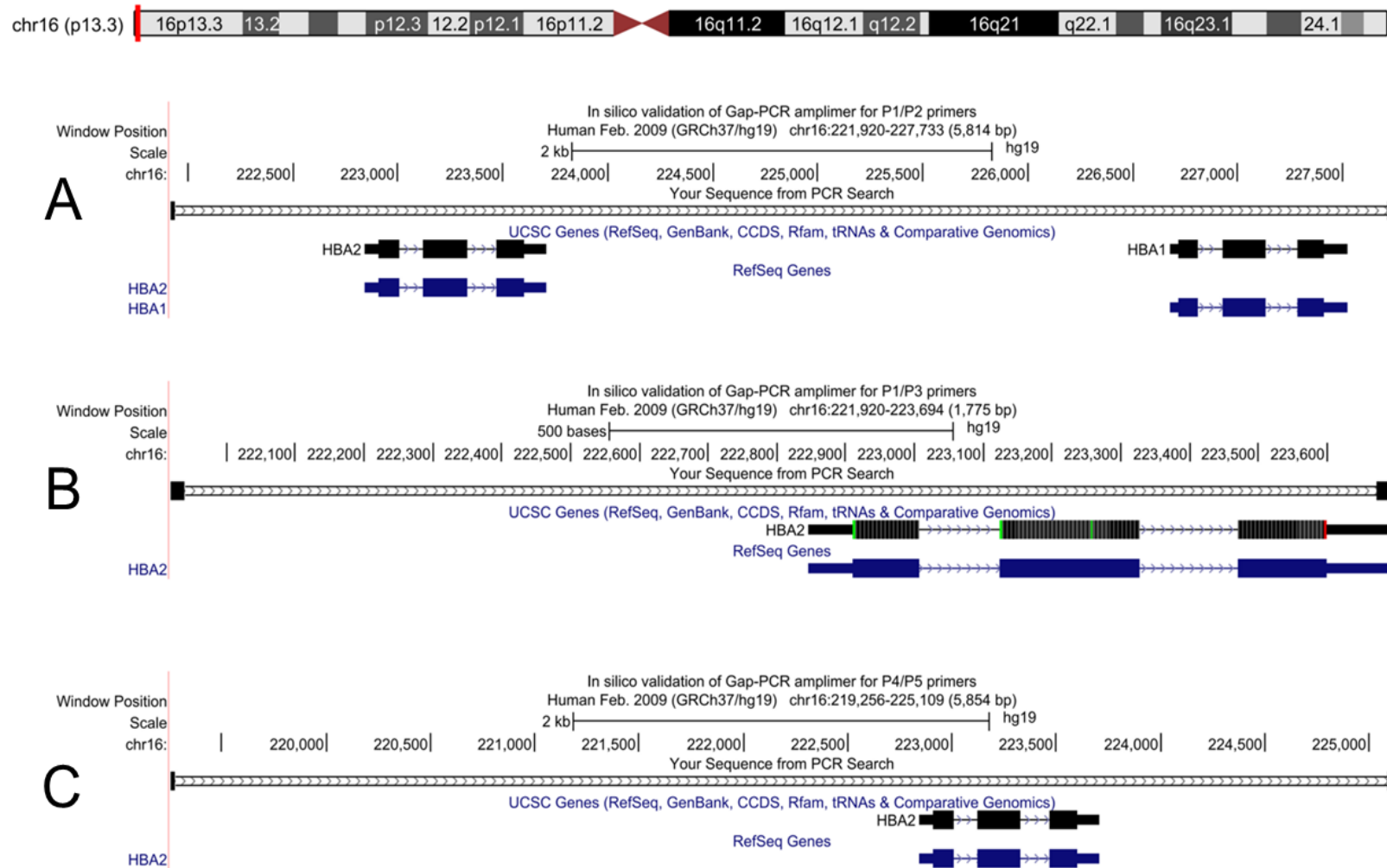


Figura 6. Posição física e tamanho dos produtos esperados do ensaio da Gap-PCR. Captura de imagem dos produtos utilizando a ferramenta *PCR in silico* no browser UCSC. Os iniciadores P1, P2, P4 e P5 estão localizados na região intergênica flangeadora dos genes *HBA2-HBA1*. O iniciador P3 está localizado no éxon 3 do gene *HBA2*. (A) Produto de 5.814 pb (P1 e P2); (B) Produto de 1.775 pb (P1 e P3). (C) Produto de 5.854 pb (P4 e P5).

6.8. Desenho experimental para identificação das deleções

Para identificar as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ foi utilizado a metodologia de Gap-PCR (Lederer *et al.*, 2009) que permite amplificar transversalmente as deleções utilizando iniciadores que flanqueiam os pontos de quebra (*breakpoints*), conforme desenho mostrado na Figura 7.

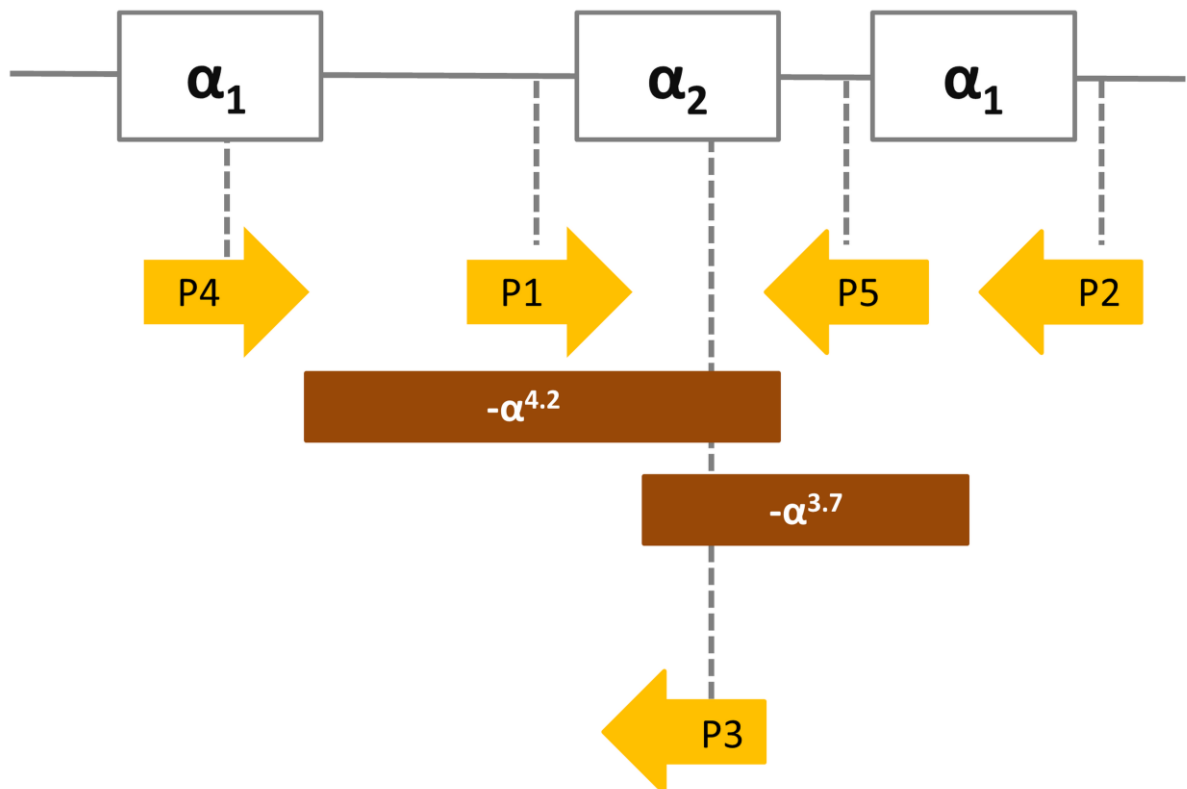


Figura 7. Localização esquemática dos iniciadores nos loci. Os iniciadores P1 e P3 são responsáveis pela amplificação do alelo selvagem. Os iniciadores P1 e P2 amplificam o fragmento com a deleção $-\alpha^{3.7}$. Par de iniciadores P4 e P5 amplifica o fragmento com a deleção $-\alpha^{4.2}$.

A região entre os iniciadores P1 a P5 tem 3.190 pb. A amplificação desse grande fragmento não ocorre nas condições do ensaio. Por essa razão há necessidade de utilizar o iniciador P3. A região compreendida entre os iniciadores P1 e P3 tem apenas 1.775 pb e, portanto, ocorre a amplificação. De P1 até P2 e de P4 até P5 também não ocorre amplificação, pela mesma razão que P1 e P5. Portanto indivíduos não acometidos só apresentarão o produto de 1.775 pb. Já os indivíduos que apresentam uma das deleções ($-\alpha^{3.7}$ ou $-\alpha^{4.2}$) apresentarão um produto de tamanho menor que a sequência de um indivíduo não acometido. Os iniciadores P1 e P2 geram um produto de 1.996 pb num indivíduo com a deleção -

$\alpha^{3.7}$. Os iniciadores P4 e P5 geram um produto de 1.607 pb num indivíduo com a deleção $-\alpha^{4.2}$ (Figura 8).

Um indivíduo homocigoto para uma das deleções não apresentará um produto de 1.775 pb, que apareceria em um indivíduo não acometido. Isso porque os iniciadores P1 e P3 foram estrategicamente desenhados para se anelar a região onde ocorre a deleção, ou seja, o produto de 1.996 pb não aparecerá, pois, o iniciador P1 não conseguirá se anelar (região eliminada), o mesmo ocorre com o produto de 1.607 pb.



Figura 8. Representação esquemática da separação eletroforética dos produtos obtidos por Gap-PCR em gel de agarose. A coluna 1 (esquerda para direita) corresponde ao Marcador de Peso Molecular 100 pb; as colunas 2 e 3 representam amostras homocigotas para a deleção $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ respectivamente; 4 representa amostra sem deleção ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) e as colunas 5 e 6 representam amostras heterocigotas para a deleção $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ respectivamente.

6.9. DNA genômico de referência

DNA genômico controle positivo para a deleção $-\alpha^{3.7}$ foi cedido pelo Dr. Isaac Lima da Silva Filho (Tecnologista da Fundação Oswaldo Cruz – RJ). Como controle negativo foi utilizada amostra de um indivíduo com os resultados do hemograma dentro dos parâmetros de normalidade e ausência dos fragmentos característicos das deleções ($-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$).

6.10. Extração de DNA genômico

Amostras coletadas foram submetidas à técnica de extração do DNA genômico utilizando o kit *Illustra™ blood genomicPrep* - GE Healthcare Life Sciences - UK, conforme a especificação do fabricante.

6.11. Quantificação de DNA genômico

O DNA extraído foi quantificado de forma direta utilizando o aparelho de espectrofotometria *NanoDrop® 2000* - Thermo Scientific.

6.12. Padronização do método de Gap-PCR

Foram avaliados os efeitos das seguintes variáveis: concentração do DNA alvo (100 – 200 ng) e condições de amplificação (quantidades de ciclos e temperatura de anelamento). A enzima Platinum®Taq DNA Polymerase - Life Technologies Corporation - foi utilizada para a amplificação dos fragmentos de acordo com a especificação do fabricante.

A validação dos iniciadores foi feita com uma amostra controle negativo (ausência dos fragmentos característicos das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$) e uma amostra controle positivo para a deleção $-\alpha^{3.7}$. As amostras foram submetidas à amplificação através do método de Gap-PCR utilizando os iniciadores específicos (P1 + P3) e (P1 + P2), respectivamente. Este ensaio foi realizado de acordo com as seguintes condições: (i) concentração de iniciadores de 10 mM (ii) Tampão com 20 mM de Tris-HCl (pH 8), 40 mM de NaCl, 2 mM de Na₂SO₄, 0,1 mM de EDTA, 1 mM de Ditioneitol, estabilizantes e 50% (v/v) de glicerol (iii) 50 mM de MgCl₂ (iv) dNTP na concentração de 10 mM (v) amostra de DNA normalizadas para 200 ng; (vi) 1,25 U da enzima Platinum Taq DNA Polymerase (vii) água destilada para completar o volume final de 50 µL (viii) ciclos térmicos com *hotstart* a 96°C por 15 minutos, desnaturação a 98°C por 45 segundos, anelamento a 59°C por 90 segundos, extensão 72°C por 135 segundos, e extensão final a 72°C por 60 minutos. Essas condições foram mantidas para todas as amostras testadas.

Os iniciadores P4 e P5 não foram validados por falta de controle positivo para a deleção $-\alpha^{4.2}$. Porém a falta desse controle não invalida a análise já que *in silico* a reação ocorre e a enzima é capaz de amplificar o produto esperado.

6.13. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação obtidos pelo método de Gap-PCR foram submetidos à separação eletroforética em géis de agarose a 0,7% em tampão TAE 1X (100 volts durante 240 minutos) e em seguida foram fotodocumentados pelo sistema MF-ChemiBis 3.2 - DNR Bio-Imaging Systems Ltda. O Marcador de Peso Molecular (MPM) 100 pb DNA Step Ladder - Promega Biotecnologia do Brasil Ltda - foi utilizado como referência.

6.14. Análise dos dados

Os dados secundários, os resultados da genotipagem e os resultados dos testes hematológicos e bioquímicos foram gerenciados utilizando o programa Epidata Versão 3.1 e analisados com o programa EpiData Analysis V2.2.1.171. para determinação das frequências das deleções investigadas e comparação entre os resultados dos exames hematológicos e o exame molecular (Lauritsen e Bruus, 2000-2008).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Caracterização da população estudada

A população estudada constou de 24 pacientes do sexo masculino (34,28%) e 46 (65,71%) do sexo feminino, todos incluídos por suspeita clínica de talassemia alfa e que não tinham diagnóstico molecular para as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ dos genes alfa-globina. Os pacientes se originaram de duas localidades: Campos dos Goytacazes, RJ (n=65) e Alegre, ES (n=5). A distribuição de comorbidades hematológicas foi a seguinte: talassemia beta (n=5), traço falciforme (n=5), talassemia beta e traço falciforme (n=1) e leucopenia (n=2). Para 65 pacientes os valores de ferro foram dentro do parâmetro de normalidade (valor de referência: 50 a 150 $\mu\text{g/dL}$). Cinco pacientes apresentaram anemia ferropriva (Tabela 4).

A população estudada incluiu 14 casos de parentesco biológico de 1º grau e 2º grau para examinar o padrão de herança das deleções em estudo. Esses 14 casos compreenderam nove binômios mãe-filho(a), dois binômios pai-filho(a), um trio mãe, pai e filho e um par de irmãos plenos.

Com exceção de cinco pacientes que apresentaram anemia ferropriva quando da inclusão, a conduta terapêutica foi a de não incluir ferro suplementar.

Todos os pacientes foram contatados e compareceram ao NUDIM. Os 70 pacientes receberam os devidos esclarecimentos sobre a pesquisa e decidiram por aceitar a participar. Assim, esse trabalho integra 100% do recrutamento por busca ativa dos sujeitos da pesquisa, configurando uma população muito importante.

Tabela 4. Talassemia alfa e outras alterações hematológicas encontradas:

	A*	B	C	D	E
Deleção $-\alpha^{3.7}$ em homozigose	0	2	0	1	1
Deleção $-\alpha^{3.7}$ em heterozigose	0	1	1	2	1
Ausência da deleção $-\alpha^{3.7}$	5	2	0	2	0

*(A) Talassemia alfa + beta, (B) Talassemia alfa + traço falciforme, (C) Talassemia alfa + beta + traço falciforme, (D) Talassemia alfa + anemia ferropriva, (E) Talassemia alfa + leucopenia.

7.2. Exames hematológicos e bioquímicos

Para cada paciente foram solicitados exames laboratoriais para avaliar 23 parâmetros hematológicos e bioquímicos relevantes a suspeita clínica de talassemia alfa. A cobertura dos exames foi de 93% (1.497 testes efetuados e 113 testes não efetuados por causa de material insuficiente ou indisponível). A maior deficiência da cobertura foi para o teste de dosagem da ferritina, que exigiu envio da amostra para fora da cidade. Atenta-se ao fato que para os parâmetros mais informativos nesse diagnóstico (volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média) a cobertura foi 100%. O quadro 1 resume os principais achados laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) nesses pacientes. Os valores de referência se encontram listados na tabela 5. Os resultados dos exames hematológicos e bioquímicos foram comparados com o resultado do exame molecular (vide seção 7.5).

Quadro 1. Resultados dos exames hematológicos e bioquímicos realizados nos pacientes investigados.

Caso	VCM	HCM	Ht.	Hgb.	CHCM	Erit.	Ferro	Ferri	Transf.	S. Tr.	Retic.	BT	BD	BI	LDH	Fal.	GGT	TGO	TGP	HbA1	HbA2	HbF	HbS
1263F1	61,11	19,00	34,10	10,60	31,09	5,58	76,00	MI	280,00	27,40	MI	1,50	0,80	0,70	399,00	282,00	17,00	25,00	13,00	MI	9,00	MI	MI
1274M	66,07	20,65	36,80	11,50	31,25	5,57	147,00	56,00	240,00	61,25	1,20	1,20	0,50	0,70	340,00	41,00	22,00	25,00	23,00	92,40	5,70	1,90	0,00
1565F	60,07	18,66	36,70	11,40	31,06	6,11	56,00	41,90	480,00	11,67	1,20	0,70	0,60	0,10	362,00	188,00	14,00	31,00	24,00	93,40	5,10	1,50	0,00
1357	74,06	24,90	35,40	11,90	33,62	4,78	98,00	MI	320,00	30,62	MI	0,50	0,30	0,20	249,00	422,00	32,00	31,00	23,00	95,80	2,70	1,50	0,00
1646F	62,73	21,54	33,50	11,50	34,33	5,34	93,00	53,50	290,00	32,06	4,80	0,80	0,50	0,30	393,00	48,00	15,00	13,00	16,00	96,90	2,80	0,30	0,00
1263F2	77,38	25,94	34,90	11,70	33,52	4,51	59,00	MI	380,00	15,53	1,00	1,10	0,80	0,30	489,00	319,00	10,00	28,00	9,00	95,90	2,80	1,30	0,00
1274F1	61,60	18,10	42,50	12,60	29,65	6,96	86,00	59,80	300,00	28,66	0,60	1,20	0,60	0,60	402,00	296,00	31,00	30,00	41,00	93,60	5,60	0,80	0,00
1274F2	61,59	17,62	38,80	11,10	28,61	6,30	93,00	MI	300,00	31,00	MI	1,30	0,60	0,70	425,00	309,00	27,00	24,00	23,00	93,60	5,30	1,10	0,00
1329	62,76	19,02	39,60	12,00	30,30	6,31	65,00	MI	400,00	16,25	1,40	1,30	0,40	0,90	382,00	31,00	31,00	21,00	19,00	MI	MI	MI	MI
1649F1	74,76	28,07	31,70	11,90	37,54	4,24	62,00	6,00	396,00	15,65	1,20	0,50	0,30	0,20	569,00	117,00	8,00	29,00	17,00	95,60	2,90	1,50	0,00
1649F2	79,06	30,07	35,50	13,50	38,03	4,49	74,00	20,00	400,00	18,50	1,10	0,50	0,30	0,20	425,00	203,00	11,00	23,00	17,00	96,40	2,80	0,80	0,00
1654F	73,56	27,11	33,10	12,20	36,86	4,50	83,00	19,40	395,00	21,01	1,20	0,60	0,50	0,10	395,00	163,00	17,00	27,00	12,00	96,60	3,20	0,20	0,00
1354	94,27	31,77	36,20	12,20	33,70	3,84	84,00	MI	MI	MI	MI	0,60	0,30	0,30	381,00	MI	13,00	19,00	8,00	96,60	2,60	0,80	0,00
1356	83,76	29,70	36,10	12,80	35,46	4,31	100,00	MI	MI	MI	MI	0,70	0,40	0,30	391,00	244,00	15,00	27,00	15,00	95,40	3,00	1,60	0,00
1382	84,84	29,10	34,70	11,90	34,29	4,09	86,00	MI	380,00	22,63	0,80	0,60	0,40	0,20	447,00	265,00	9,00	39,00	27,00	98,10	1,90	0,00	0,00
1264	86,88	29,70	35,10	12,00	34,19	4,04	52,00	MI	400,00	13,00	MI	0,80	0,50	0,30	425,00	MI	24,00	19,00	18,00	97,50	2,50	0,00	0,00
1269F1	87,80	30,77	33,10	11,60	35,50	3,77	107,00	MI	240,00	44,58	1,20	0,70	0,50	0,20	335,00	46,00	19,00	20,00	13,00	97,30	2,60	0,10	0,00
1560F	81,13	28,68	33,10	11,70	35,35	4,08	43,00	37,90	460,00	93,47	1,10	0,70	0,40	0,30	508,00	190,00	18,00	32,00	15,00	94,50	2,80	2,70	0,00
1636M	86,65	28,07	31,80	10,30	32,39	3,67	61,00	79,90	300,00	20,33	1,40	0,70	0,50	0,20	293,00	46,00	32,00	18,00	14,00	58,60	3,70	0,70	37,00

Quadro 1 (cont.)

Caso	VCM	HCM	Ht.	Hgb.	CHCM	Erit.	Ferro	Ferri	Transf.	S. Tr.	Retic.	BT	BD	BI	LDH	Fal.	GGT	TGO	TGP	HbA1	HbA2	HbF	HbS
1638F	82,49	27,92	32,50	11,00	33,85	3,94	60,00	49,60	400,00	15,00	1,80	1,00	0,60	0,40	374,00	157,00	10,00	37,00	11,00	96,10	3,20	0,70	0,00
1650M	85,55	29,62	36,10	12,50	34,63	4,22	43,00	74,10	380,00	11,31	5,00	0,50	0,40	0,10	495,00	151,00	52,00	27,00	20,00	97,10	2,60	0,30	0,00
1650F1	83,80	30,38	33,10	12,00	36,25	3,95	120,00	43,30	270,00	44,44	1,40	0,50	0,30	0,20	585,00	150,00	7,00	35,00	16,00	96,60	3,10	0,30	0,00
1650F2	90,98	32,79	33,30	12,00	36,04	3,66	45,00	5,40	430,00	10,46	1,20	0,40	0,20	0,20	379,00	51,00	9,00	25,00	16,00	96,70	2,90	0,40	0,00
1393F	81,26	28,54	37,30	13,10	35,12	4,59	50,00	MI	320,00	15,62	MI	1,00	MI	MI	434,00	373,00	13,00	20,00	8,00	56,60	0,60	3,00	39,80
1393P	85,64	29,74	40,20	13,80	34,33	4,64	87,00	MI	260,00	33,46	1,00	1,10	0,40	0,70	322,00	83,00	13,00	14,00	9,00	96,90	2,80	0,30	0,00
1564F	80,34	27,48	42,10	14,40	34,20	5,24	73,00	32,20	460,00	15,87	0,70	1,40	0,90	0,50	440,00	55,00	19,00	24,00	29,00	MI	MI	MI	MI
1539	103,18	35,45	45,40	15,60	34,36	4,40	84,00	MI	400,00	21,00	0,80	1,00	0,60	0,40	456,00	33,00	19,00	26,00	8,00	97,30	2,60	0,10	0,00
1647F	86,71	32,43	38,50	14,40	37,40	4,44	150,00	60,00	262,00	57,25	0,80	0,80	0,50	0,30	404,00	35,00	38,00	24,00	33,00	96,70	3,20	0,10	0,00
1648F	85,61	32,95	45,20	17,40	38,50	5,28	109,00	99,50	300,00	36,33	0,80	0,50	0,30	0,20	336,00	73,00	49,00	15,00	34,00	96,90	2,90	0,20	0,00
1649P	84,82	32,79	41,90	16,20	38,66	4,94	130,00	100,10	287,00	45,29	0,60	1,10	0,90	0,20	419,00	51,00	10,00	24,00	16,00	96,80	2,90	0,30	0,00
1529	70,25	21,48	31,40	9,60	30,57	4,47	72,00	MI	400,00	18,00	1,40	2,30	1,80	0,50	826,00	22,00	24,00	54,00	19,00	96,90	2,70	0,40	0,00
1252	77,17	25,58	36,50	12,10	33,15	4,73	46,00	34,30	480,00	9,58	1,00	0,90	0,40	0,50	422,00	144,00	17,00	32,00	13,00	65,90	3,80	1,40	28,90
1508F2	76,33	25,16	35,80	11,80	32,96	4,69	134,00	MI	380,00	35,26	1,00	0,50	0,30	0,20	534,00	241,00	14,00	30,00	10,00	95,00	3,00	2,00	0,00
1617M	77,19	24,78	35,20	11,30	32,10	4,56	29,00	MI	480,00	6,04	1,20	0,50	0,30	0,20	574,00	100,00	20,00	26,00	21,00	MI	MI	MI	MI
1618	75,20	25,07	27,90	9,30	33,33	3,71	36,00	MI	500,00	7,20	2,10	0,80	0,50	0,30	711,00	63,00	12,00	31,00	16,00	90,00	5,60	19,40	66,00
1653	65,14	21,51	32,70	10,80	33,03	5,02	100,00	72,20	320,00	31,25	1,80	0,60	0,40	0,20	483,00	74,00	33,00	25,00	26,00	96,90	2,80	0,30	0,00
1613F	65,78	19,58	37,30	11,10	29,76	5,67	39,20	MI	520,00	7,53	1,80	0,80	0,50	0,30	647,00	293,00	5,00	40,00	18,00	MI	MI	MI	MI
1625F	78,07	25,15	38,80	12,50	32,22	4,97	47,00	14,50	380,00	12,36	0,60	0,80	0,50	0,30	457,00	212,00	20,00	29,00	26,00	96,70	2,80	0,50	0,00

Quadro 1 (cont.)

Caso	VCM	HCM	Ht.	Hgb.	CHCM	Erit.	Ferro	Ferri	Transf.	S. Tr.	Retic.	BT	BD	BI	LDH	Fal.	GGT	TGO	TGP	HbA1	HbA2	HbF	HbS	
1608M	79,90	28,23	33,40	11,80	35,33	4,18	85,00	47,00	360,00	29,80	1,20	0,80	0,20	0,60	588,00	110,00	20,00	28,00	38,00	96,90	2,90	0,20	0,00	
1608P	77,16	28,21	40,20	14,70	36,57	5,21	105,00	195,30	285,00	36,84	0,90	0,90	0,40	0,50	522,00	119,00	22,00	38,00	40,00	96,80	3,00	0,20	0,00	
1269M	88,92	28,98	31,30	10,20	32,59	3,52	101,00	MI	280,00	36,07	1,00	0,50	0,30	0,20	348,00	65,00	34,00	26,00	16,00	97,10	2,90	0,00	0,00	
1543F	83,02	28,54	35,20	12,10	34,38	4,24	156,00	MI	258,00	60,47	0,90	0,60	0,30	0,30	290,00	46,00	96,00	18,00	14,00	96,60	3,00	0,40	0,00	
1355M	82,54	28,12	36,40	12,40	34,07	4,41	95,00	38,70	300,00	31,67	2,00	0,50	0,30	0,20	MI	50,00	26,00	17,00	19,00	97,00	2,60	0,40	0,00	
1613M	82,10	26,34	39,90	12,80	32,08	4,86	53,00	MI	460,00	11,52	0,60	0,50	0,30	0,20	281,00	72,00	11,00	20,00	7,00	MI	MI	MI	MI	
1614F	80,17	25,86	37,20	12,00	32,26	4,64	140,00	53,60	300,00	46,66	1,10	0,70	0,50	0,20	606,00	316,00	137,00	39,00	24,00	96,00	2,90	1,10	0,00	
1627M	90,57	28,54	36,50	11,50	31,51	4,03	100,00	213,30	400,00	25,00	0,60	0,70	0,40	0,30	630,00	114,00	52,00	43,00	44,00	97,20	2,60	0,20	0,00	
1275	89,44	28,87	38,10	12,30	32,28	4,26	104,00	23,40	260,00	40,00	0,80	0,80	0,20	0,60	416,00	33,00	10,00	22,00	13,00	97,10	2,60	0,30	0,00	
1390	77,98	23,34	29,40	8,80	29,93	3,77	30,00	MI	420,00	7,14	2,00	0,80	0,60	0,20	305,00	77,00	123,00	40,00	20,00	97,60	2,10	0,30	0,00	
1562F	72,26	22,90	28,40	9,00	31,69	3,93	102,00	64,00	380,00	26,84	0,90	0,80	0,50	0,30	473,00	39,00	91,00	31,00	7,00	97,30	2,50	0,20	0,00	
1391M	74,61	23,40	33,80	10,60	31,36	4,53	44,00	MI	MI	MI	1,60	1,10	0,30	0,80	273,00	63,00	18,00	17,00	9,00	97,00	2,60	0,40	0,00	
1249	72,64	22,74	36,10	11,30	31,30	4,97	MI	MI	MI	MI	1,60	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	66,40	3,90	0,30	29,40
1330	78,35	24,24	33,30	10,30	30,93	4,25	96,00	MI	320,00	30,00	MI	1,40	0,30	1,10	343,00	69,00	30,00	33,00	22,00	96,50	3,20	0,30	0,00	
1543M	75,34	23,52	33,00	10,30	31,21	4,38	103,00	MI	460,00	22,39	2,50	0,60	0,40	0,20	309,00	57,00	19,00	13,00	8,00	MI	MI	MI	MI	
1561F	62,63	19,40	35,20	10,90	30,97	5,62	40,00	39,70	500,00	8,00	1,10	0,70	0,40	0,30	368,00	98,00	22,00	39,00	16,00	96,70	2,40	0,90	0,00	
1531	78,11	24,68	36,40	11,50	31,59	4,66	124,00	MI	MI	MI	1,20	0,60	0,40	0,20	460,00	240,00	19,00	28,00	18,00	96,10	2,90	1,00	0,00	
1617F	70,94	21,84	35,40	10,90	30,79	4,99	46,00	MI	400,00	11,50	2,30	0,50	0,30	0,20	450,00	86,00	22,00	21,00	11,00	MI	MI	MI	MI	
1608F	72,78	22,38	36,10	11,10	30,75	4,96	74,00	MI	400,00	18,50	1,00	0,50	0,30	0,20	389,00	170,00	15,00	25,00	20,00	93,90	2,50	3,60	0,00	

Quadro 1 (cont.)

Caso	VCM	HCM	Ht.	Hgb.	CHCM	Erit.	Ferro	Ferri	Transf.	S. Tr.	Retic.	BT	BD	BI	LDH	Fal.	GGT	TGO	TGP	HbA1	HbA2	HbF	HbS
1625M	73,73	22,40	36,20	11,00	30,39	4,91	58,00	52,40	390,00	14,87	0,90	1,10	0,70	0,40	322,00	80,00	33,00	19,00	10,00	96,80	2,80	0,40	0,00
1355F	78,30	26,17	36,80	12,30	33,42	4,70	141,00	MI	220,00	64,09	MI	0,50	0,20	0,30	415,00	348,00	MI	32,00	13,00	MI	MI	MI	MI
1534	78,76	25,78	33,00	10,80	32,73	4,19	140,00	MI	400,00	35,00	2,00	1,10	0,50	0,60	529,00	29,00	14,00	20,00	7,00	96,40	2,60	1,00	0,00
1603	73,22	23,43	35,00	11,20	32,00	4,78	114,00	MI	265,00	43,02	1,20	1,60	1,00	0,60	400,00	78,00	268,00	59,00	95,00	96,90	2,20	0,10	0,00
1280	73,32	21,34	37,10	10,80	29,11	5,06	47,00	MI	420,00	11,19	MI	0,50	0,20	0,30	477,00	256,00	22,00	33,00	10,00	96,50	2,80	0,70	0,00
1281	73,05	21,75	39,30	11,70	29,77	5,38	55,00	MI	380,00	14,47	MI	0,40	0,20	0,20	331,00	179,00	12,00	24,00	12,00	96,10	2,70	1,20	0,00
1391F	75,35	24,85	38,20	12,60	32,98	5,07	56,00	MI	320,00	17,50	0,60	1,20	0,40	0,80	380,00	194,00	10,00	28,00	10,00	97,40	2,50	0,10	0,00
1392	76,91	23,71	37,30	11,50	30,83	4,85	135,00	MI	240,00	56,25	1,00	1,80	0,70	1,10	371,00	75,00	44,00	33,00	32,00	96,90	2,60	0,50	0,00
1508F1	67,26	21,42	38,00	12,10	31,84	5,65	179,00	MI	220,00	81,36	1,00	1,30	0,90	0,40	552,00	264,00	16,00	28,00	12,00	97,50	2,50	0,00	0,00
1530	69,74	22,88	37,80	12,40	32,80	5,42	80,00	MI	400,00	20,00	1,40	0,70	0,50	0,20	533,00	284,00	10,00	34,00	15,00	69,60	4,20	0,20	25,80
1546F	72,28	23,14	37,80	12,10	32,01	5,23	140,00	MI	350,00	40,00	1,20	0,60	0,40	0,20	261,00	44,00	11,00	19,00	16,00	96,60	2,60	0,80	0,00
1508F3	71,24	22,98	43,10	13,90	32,25	6,05	233,00	MI	490,00	47,55	0,80	0,60	0,40	0,20	371,00	68,00	27,00	22,00	8,00	96,40	2,90	0,70	0,00
1503	83,76	27,29	35,60	11,60	32,58	4,25	21,00	MI	440,00	4,77	1,20	0,80	0,30	0,50	261,00	79,00	11,00	20,00	10,00	97,60	2,40	0,00	0,00

M: mãe; P: pai;

MI: material insuficiente ou indisponível

Erit: eritrócitos; Hgb: hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; Ret: reticulócitos; GGT: Gama Glutamil Transpeptidase; Ferri: ferritina; Transf: transferrina; S. Tr.: saturação da transferrina; TGO: transaminase glutâmica oxalacética; TGP: transaminase glutâmica pirúvica; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; Fal: fosfatase alcalina; LDH: lactato desidrogenase; HbA1: hemoglobina A1; HbA2: hemoglobina A2; HbF: hemoglobina fetal; HbS: hemoglobina S.

Preenchido com a cor rosa: Paciente heterozigoto para a deleção $\alpha^{3.7}$; preenchido com a cor azul claro: Paciente homozigoto para a deleção $\alpha^{3.7}$; preenchido com a cor roxa: Paciente sem a deleção $\alpha^{3.7}$ e sem a deleção $\alpha^{4.2}$; preenchido com a cor azul escuro: Resultado maior que o valor de referência; preenchido com a cor vermelho: Resultado menor que o valor de referência.

Tabela 5. Valores de referência dos exames hematológicos e bioquímicos.

	Valores de referência	Unidades	Método
Eritrócitos*	4,2 a 6,0	Milhões/mm ³	Citometria automatizada
Hemoglobina*	13,5 a 16,0	g/%	Citometria automatizada
Hematócrito*	37 a 51	%	Citometria automatizada
Volume Corpuscular Médio	80 a 96	fl	Citometria automatizada
Hemoglobina Corpuscular Média	27 a 32	pg	Citometria automatizada
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média	32 a 36	%	Citometria automatizada
Contagem de Reticulócitos	0,5 a 1,5	%	Coloração supra vital
Gama Glutamil Transferase	HOMEM: Até 55 MULHER: Até 38	U/L	Colorimétrico enzimático
Ferro sérico	50 a 150	µg/dL	Colorimétrico enzimático
Ferritina sérica	HOMEM: 24,0 a 336 MULHER: 11 a 307	ng/mL	Imunoenzimático
Transferrina	250 a 410	µg/dL	Colorimétrico
Capacidade de Saturação da Transferrina	20 a 55	%	Colorimétrico
Transaminase Oxalacética	Até 40	U/mL	Cinético
Transaminase Pirúvica	Até 41	U/mL	Cinético
Bilirrubina Total	Até 1,2	mg/dL	Colorimétrico
Bilirrubina Direta	Até 0,4	mg/dL	Colorimétrico
Bilirrubina indireta	Até 0,8	mg/dL	Colorimétrico
Fosfatase alcalina	HOMEM: Até 115 MULHER: Até 105	U/L	Cinético
Desidrogenase láctica	207 a 414	U/L	Cinético
Hemoglobina A1	94,3 a 96,5	%	Cromatografia Líquida de Alta Performance
Hemoglobina A2	2,5 a 3,7	%	Cromatografia Líquida de Alta Performance
Hemoglobina Fetal	Até 2,0	%	Cromatografia Líquida de Alta Performance
Hemoglobina S	Ausente		Cromatografia Líquida de Alta Performance

Os valores de referência emitidos no laudo dos exames do HEAA e *(Lorenzi, 2011).

7.3. Exame molecular

O trabalho determinou o estado de portador ou não portador das deleções - $\alpha^{3.7}$ e - $\alpha^{4.2}$ - em pacientes com suspeita clínica de talassemia alfa. Para essa finalidade foi introduzida no laboratório NUDIM o método de Gap-PCR. A interpretação desse método é simples, pois se baseia na distinção do tamanho dos produtos obtidos. Assim, indivíduos não acometidos pelas deleções - $\alpha^{3.7}$ e - $\alpha^{4.2}$ apresentaram um produto de 1.775 pb. Indivíduos com a deleção - $\alpha^{3.7}$ apresentaram um produto de 1.996 pb e indivíduo com a deleção - $\alpha^{4.2}$ apresentaram um produto de 1.607 pb (Figura 9). Os resultados para os 70 pacientes investigados a partir do método de Gap-PCR encontram-se mencionados na tabela 6.

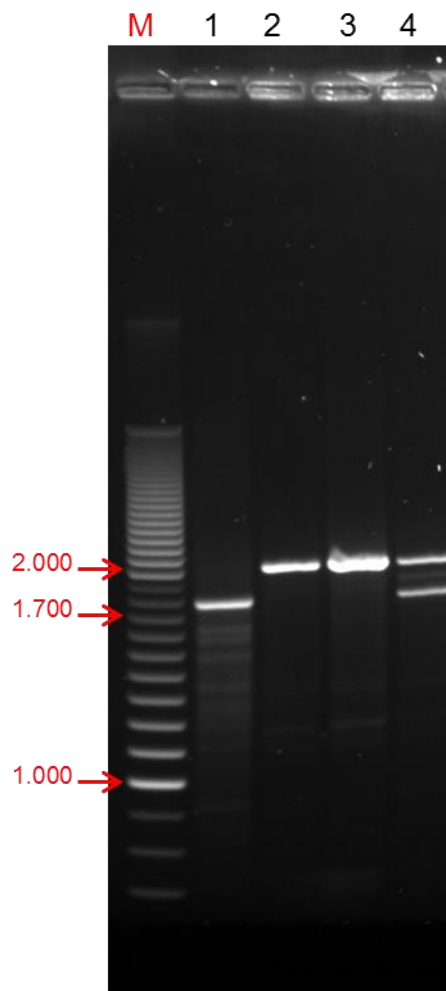


Figura 9. Perfil eletroforético dos produtos de amplificação por Gap-PCR. Gel de agarose 0,7% após coloração com gel red e visualização em luz ultravioleta. (M) Marcador de Peso Molecular 100 pb. (1) DNA genômico alvo controle negativo para as deleções - $\alpha^{3.7}$ e - $\alpha^{4.2}$; (2) DNA genômico alvo controle positivo homocigoto para a deleção - $\alpha^{3.7}$; (3) DNA genômico alvo do paciente (Caso 1249) homocigoto para a deleção - $\alpha^{3.7}$; (4) DNA genômico alvo do paciente (Caso 1252) heterocigoto para a deleção - $\alpha^{3.7}$.

Tabela 6. Diagnóstico baseado em exames hematológicos versus diagnóstico baseado no exame molecular.

Caso	Sexo	Nascimento	Diagnóstico Hematológico	Diagnóstico Molecular
1274M	F	04/05/1980	Talassemia alfa + beta	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1274F1	M	09/11/1997	Talassemia alfa + beta	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1274F2	M	13/09/2002	Talassemia alfa + beta	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1565F	M	21/02/2003	Talassemia alfa + beta	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1646F	F	04/08/1980	Talassemia alfa + beta	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1393F	M	28/12/2002	Talassemia alfa + traço falciforme	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1636M	F	10/10/1958	Talassemia alfa + traço falciforme	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1252	F	03/01/2007	Talassemia alfa + traço falciforme	Heterozigoto - α 3.7
1249	F	02/02/1999	Talassemia alfa + traço falciforme	Homozigoto - α 3.7
1530	M	28/06/2000	Talassemia alfa + traço falciforme	Homozigoto - α 3.7
1618	F	30/12/1978	Talassemia alfa + beta + traço falciforme	Heterozigoto - α 3.7
1539	F	22/05/1958	Talassemia alfa + anemia ferropriva	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1650F1	M	26/06/2008	Talassemia alfa + anemia ferropriva	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1508F2	M	02/11/2008	Talassemia alfa + anemia ferropriva	Heterozigoto - α 3.7
1529	F	01/01/1967	Talassemia alfa + anemia ferropriva	Heterozigoto - α 3.7
1503	F	21/05/1991	Talassemia alfa + anemia ferropriva	Homozigoto - α 3.7
1275	F	19/04/1958	Talassemia alfa + leucopenia	Heterozigoto - α 3.7
1281	M	07/08/2000	Talassemia alfa + leucopenia	Homozigoto - α 3.7
1263F1	F	03/12/2003	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2

Tabela 6 (cont.)

Caso	Sexo	Nascimento	Diagnóstico Hematológico	Diagnóstico Molecular
1263F2	F	19/06/2008	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1264	F	19/04/1989	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1269F1	F	20/02/1978	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1329	F	03/03/1959	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1354	F	02/02/1947	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1356	F	22/04/2005	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1357	M	24/12/2006	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1382	M	29/12/2005	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1393P	M	01/08/1981	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1560F	F	18/02/2004	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1564F	M	02/02/2001	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1638F	F	14/11/2008	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1647F	F	22/12/1982	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1648F	M	19/10/1998	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1649P	M	28/07/1988	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1649F1	F	08/03/2012	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1649F2	M	25/08/2009	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1650M	F	04/09/1971	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1650F2	F	10/09/1992	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2

Tabela 6 (cont.)

Caso	Sexo	Nascimento	Diagnóstico Hematológico	Diagnóstico Molecular
1654F	M	05/10/2005	Talassemia alfa	Ausência - α 3.7 e - α 4.2
1269M	F	18/07/1960	Talassemia alfa	Heterozigoto - α 3.7
1355M	F	10/11/1979	Talassemia alfa	Heterozigoto - α 3.7
1543F	F	10/11/1984	Talassemia alfa	Heterozigoto - α 3.7
1608M	F	19/07/1987	Talassemia alfa	Heterozigoto - α 3.7
1608P	M	12/12/1988	Talassemia alfa	Heterozigoto - α 3.7
1613F	M	03/06/2011	Talassemia alfa	Heterozigoto - α 3.7
1613M	F	07/06/1989	Talassemia alfa	Heterozigoto - α 3.7
1614F	M	01/03/2007	Talassemia alfa	Heterozigoto - α 3.7
1617M	F	24/10/1962	Talassemia alfa	Heterozigoto - α 3.7
1625F	M	25/06/2002	Talassemia alfa	Heterozigoto - α 3.7
1627M	F	15/11/1946	Talassemia alfa	Heterozigoto - α 3.7
1653	F	26/11/1981	Talassemia alfa	Heterozigoto - α 3.7
1280	F	10/11/2007	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1330	F	08/09/1950	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1355F	M	24/05/2004	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1390	F	07/09/1935	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1391M	F	02/06/1977	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1391F	M	06/06/2006	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7

Tabela 6 (cont.)

Caso	Sexo	Nascimento	Diagnóstico Hematológico	Diagnóstico Molecular
1392	F	03/06/1987	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1508F1	M	16/12/2001	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1508F3	M	13/11/1996	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1531	M	25/05/2008	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1534	F	16/12/1926	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1543M	F	22/08/1961	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1546F	F	27/01/1984	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1561F	F	02/05/1958	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1562F	F	17/03/1947	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1603	F	29/06/1972	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1608F	F	22/09/2008	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1617F	F	03/08/1996	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7
1625M	F	27/11/1972	Talassemia alfa	Homozigoto - α 3.7

Paciente: (M) mãe; (P) pai; (F) filho.

Sexo: (M) masculino; (F) feminino.

7.4. Padrão de hereditariedade

Para avaliar a possibilidade de ocorrência de mutação de novo nos portadores, determinamos o padrão de herança em seis núcleos familiares. Em todos os seis casos a deleção foi identificada em pelo menos um dos progenitores. Em um caso, ambos os progenitores foram diagnosticados como portadores. Esses dados sugerem a transmissão da mutação em todos os casos estudados (Tabela 7).

Tabela 7. Padrão de hereditariedade na população estudada.

Família	Caso	Diagnóstico Molecular
1	1608M	Heterozigoto $-\alpha^{3.7}$
	1608P	Heterozigoto $-\alpha^{3.7}$
	1608F	Homozigoto $-\alpha^{3.7}$
2	1355M	Heterozigoto $-\alpha^{3.7}$
	1355F	Homozigoto $-\alpha^{3.7}$
3	1391M	Homozigoto $-\alpha^{3.7}$
	1391F	Homozigoto $-\alpha^{3.7}$
4	1617M	Heterozigoto $-\alpha^{3.7}$
	1617F	Homozigoto $-\alpha^{3.7}$
5	1543M	Homozigoto $-\alpha^{3.7}$
	1543F	Heterozigoto $-\alpha^{3.7}$
6	1625M	Homozigoto $-\alpha^{3.7}$
	1625F	Heterozigoto $-\alpha^{3.7}$

7.5. Exame molecular versus exames hematológicos e bioquímicos

7.5.1. Pacientes com talassemia alfa $-\alpha^{3.7}$ em heterozigose

Um dos parâmetros de extrema importância, que na maioria das vezes está diminuído na talassemia alfa, é o VCM. O VCM mede o tamanho dos eritrócitos e é um dos parâmetros do exame hemograma. Indivíduos traço alfa talassêmicos ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) apresentam eritrócitos hipocrômicos com hemoglobina geralmente entre 11,0 e 13,0 g/dL e valor de VCM entre 75 e 80 fL. (Weatherall, 2004; Sonati e Costa, 2006).

Dos 17 pacientes heterozigotos para a deleção $-\alpha^{3.7}$ apenas 10 (58,82%) apresentaram valores de VCM abaixo do valor de referência. Análise estatística através do teste de Fisher mostra ($p=0,7759$), ou seja, não há correlação entre o valor de VCM e a condição de heterozigoto para a deleção $-\alpha^{3.7}$.

Nenhuma variável hematológica apresentou valor de ($p < 0,05$), ou seja, nenhuma variável hematológica tem correlação com a presença de talassemia alfa em heterozigose (Tabela 8).

Tabela 8. Possíveis associações entre a condição heterozigota para a deleção - $\alpha^{3.7}$ e as variáveis hematológicas.

Variável hematológica	Análise estatística (Teste de Fisher)
Contagem baixa de eritrócitos	RR=1,04 (CI: 0,39-2,74) Fisher <i>exact</i> $p=1,0000$ RR=2,36 (CI: 0,35-15,71) Fisher <i>exact</i>
Dosagem baixa de hemoglobina	$p=0,4376$
Hematócrito baixo	RR=0,90 (CI: 0,38-2,12) Fisher <i>exact</i> $p=1,0000$
Baixo VCM	RR=0,84 (CI: 0,37-1,95) Fisher <i>exact</i> $p=0,7759$
Dosagem baixa da HCM	RR=1,01 (CI: 0,44-2,34) Fisher <i>exact</i> $p=1,0000$
Dosagem baixa da CHCM	RR=0,41 (CI: 0,13-1,29) Fisher <i>exact</i> $p=0,1429$
Dosagem elevada de HbF	RR=1,10 (CI: 0,19-6,39) Fisher <i>exact</i> $p=1,0000$

7.5.2. Pacientes com talassemia alfa - $\alpha^{3.7}$ em homozigose

Três variáveis hematológicas apresentaram valor de ($p < 0,05$). São elas: VCM abaixo do valor de referência, dosagem baixa da HCM e dosagem baixa da CHCM. Esses resultados mostram que esses três parâmetros estão fortemente associado à presença de talassemia alfa em homozigose (Tabela 9).

Tabela 9. Possíveis associações entre a condição homozigota para a deleção - $\alpha^{3.7}$ e as variáveis hematológicas.

Variável hematológica	Análise estatística (Teste de Fisher)
Contagem baixa de eritrócitos	RR=0,51 (CI: 0,17-1,49) Fisher <i>exact</i> $p=0,2317$
Dosagem baixa de hemoglobina	RR=3,25 (CI: 0,50-21,23) Fisher <i>exact</i> $p=0,2541$
Hematócrito baixo	RR=1,12 (CI: 0,54-2,33) Fisher <i>exact</i> $p=1,0000$
Baixo VCM	RR=13,00 (CI: 1,86-90,87) Fisher <i>exact</i> $p=0,0000$ RR=15,56 (CI: 2,22-109,02) Fisher <i>exact</i>
Dosagem baixa da HCM	$p=0,0000$
Dosagem baixa da CHCM	RR=3,59 (CI: 1,78-7,25) Fisher <i>exact</i> $p=0,0003$
Dosagem elevada de HbF	RR=0,75 (CI: 0,13-4,26) Fisher <i>exact</i> $p=1,0000$

O VCM em 22 (95,65%) dos 23 pacientes homozigotos para a deleção - $\alpha^{3.7}$ foi abaixo do valor de referência. Análise estatística mostra risco relativo igual a 13, ou seja, há forte correlação entre o valor de VCM e a condição de homozigose para a deleção - $\alpha^{3.7}$.

O risco relativo (RR) estima a magnitude da correlação entre ter a talassemia alfa (em homozigose ou heterozigose) e a condição estudada nas variáveis. RR indica quantas vezes a ocorrência da condição estudada no indivíduo com talassemia alfa é maior do que no indivíduo sem a talassemia alfa. A dosagem baixa da HCM é a condição que tem maior ocorrência nos pacientes com a deleção $-\alpha^{3.7}$ em homozigose.

A diferença observada no valor de VCM entre pacientes homozigotos e heterozigotos é explicada pelo fato de indivíduo com a deleção em homozigose apresentar 50% a menos na produção de cadeias alfa quando comparado a um indivíduo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Enquanto o indivíduo com a deleção em heterozigose apresenta 25% a menos. Assim, a microcitose é maior nos 23 pacientes homozigotos.

Um estudo em área de alta prevalência de talassemia alfa mostrou que é importante considerar a suspeita de talassemia alfa até mesmo em pacientes com anemia que apresenta VCM dentro do valor de referência (80 a 96 fL) no qual a causa da anemia não é por deficiência de ferro. Nesse caso, a frequência de talassemia alfa foi de 32,63% (Chan *et al.*, 2001). No presente trabalho, a frequência de pacientes com valor de VCM normal entre os 40 pacientes com talassemia alfa foi de 20%. Destaca-se, portanto, a importância do diagnóstico através de exames moleculares.

As alterações hematológicas do paciente com doença de hemoglobina H são: eritrócitos hipocrômicos (hemoglobina entre 8,0 e 11,0 g/dl), microcíticos (VCM entre 55 e 65 fL) (Weatherall, 2004; Sonati e Costa, 2006). Dois (2,85%) pacientes apresentaram esse perfil, mas nenhum deles com exame molecular positivo para a doença de hemoglobina H. Um paciente é homozigoto para a deleção $-\alpha^{3.7}$ e o outro não apresenta nenhuma das deleções investigadas.

7.5.3. Pacientes com talassemia alfa e outra doença hematológica

Cinco pacientes (1274M, 1274F1, 1274F2, 1565F e 1646F) da população estudada foram incluídos por comorbidade com talassemia beta. Eles apresentaram dosagem de hemoglobina A1 baixa e hemoglobina A2 elevada, como o esperado. Diferentemente dos pacientes sem essa comorbidade, onde essa característica não é padrão.

Cinco pacientes (1530, 1249, 1252, 1393F e 1636M) apresentaram comorbidade com traço falciforme. Neles foi confirmada a presença de hemoglobina S. Porém, a comorbidade não influenciou nos valores do hemograma quando comparado aos pacientes cuja suspeita de talassemia alfa foi afastada pelo teste molecular, isto é, apresentado apenas traço falciforme. Quanto aos marcadores de hemólise, nenhum indivíduo apresentou dosagem de bilirrubina indireta elevada, confirmando que a talassemia alfa diminui a anemia hemolítica na anemia falciforme (Steinberg *et al.*, 1984; Tome-Alves *et al.*, 2000).

Um indivíduo (1618) apresentou duas comorbidades: talassemia beta e traço falciforme. Porém, essas comorbidades não influenciaram os valores do hemograma quando comparado aos pacientes cuja suspeita de talassemia alfa foi afastada pelo teste molecular. Como encontrado em pacientes com talassemia alfa e talassemia beta, esse paciente apresentou dosagem de hemoglobina A1 baixa e hemoglobina A2 elevada. O teste hematológico foi confirmativo para hemoglobina S. A dosagem de bilirrubina indireta estava dentro dos valores de referência.

Cinco pacientes (1503, 1508F2, 1529, 1539 e 1650F1) apresentaram comorbidade com anemia ferropriva. Apenas um paciente (1503) apresentou os marcadores de deficiência de ferro alterados.

7.5.4. Pesquisa intraeritrocitária de hemoglobina H

A pesquisa da hemoglobina H no sangue periférico é uma técnica de coloração e visualização ao microscópio com grande variabilidade, já que a hemoglobina H é rapidamente proteolisada pelo próprio eritrócito, o que dificulta a sua detecção (Weatherall, 2004; Sonati e Costa, 2006).

Esfregaços sanguíneos foram preparados, a fim de investigar a presença de hemoglobina H intraeritrocitária. As figuras 10 e 11 mostram esfregaços sanguíneos para pesquisa da hemoglobina H com resultados negativos em paciente homozigoto para deleção $-\alpha^{3.7}$ e paciente sem a deleção $-\alpha^{3.7}$, respectivamente. A figura 12 mostra o esfregaço sanguíneo com resultado positivo para a pesquisa de hemoglobina H em paciente heterozigoto para a deleção $-\alpha^{3.7}$.

Apenas em 1 (1,42%) dos 70 pacientes foi possível visualizar eritrócitos com corpos de inclusão de hemoglobina H. Esse dado demonstra a subjetividade e a baixa sensibilidade da técnica.

A presença de hemoglobina de Bart não foi visualizada, uma vez que ela desaparece até 6 meses após o nascimento e o paciente mais jovem apresenta 3 anos de idade.

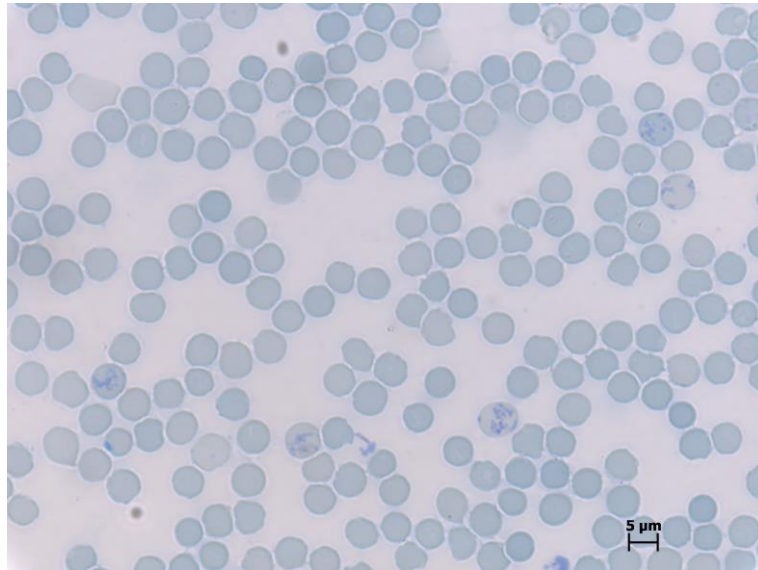


Figura 10. Pesquisa intraeritrocitária de hemoglobina H (Caso 1393F). Foto de esfregaço sanguíneo em lâmina corado com Azul de Cresil Brilhante e visualizado por microscopia óptica. Resultado da pesquisa: negativo. Resultado Gap PCR: ausência da deleção $-\alpha^{3.7}$ e ausência da deleção $-\alpha^{4.2}$.

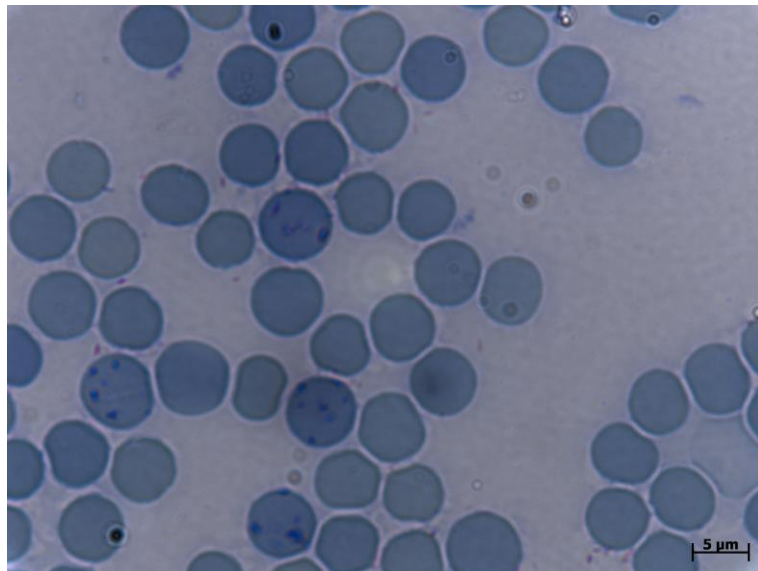


Figura 11. Pesquisa intraeritrocitária de hemoglobina H (Caso 1534). Foto de esfregaço sanguíneo em lâmina corado com Azul de Cresil Brilhante e visualizado por microscopia óptica. Resultado da pesquisa: negativo. Resultado Gap PCR: homocigoto para a deleção $-\alpha^{3.7}$.

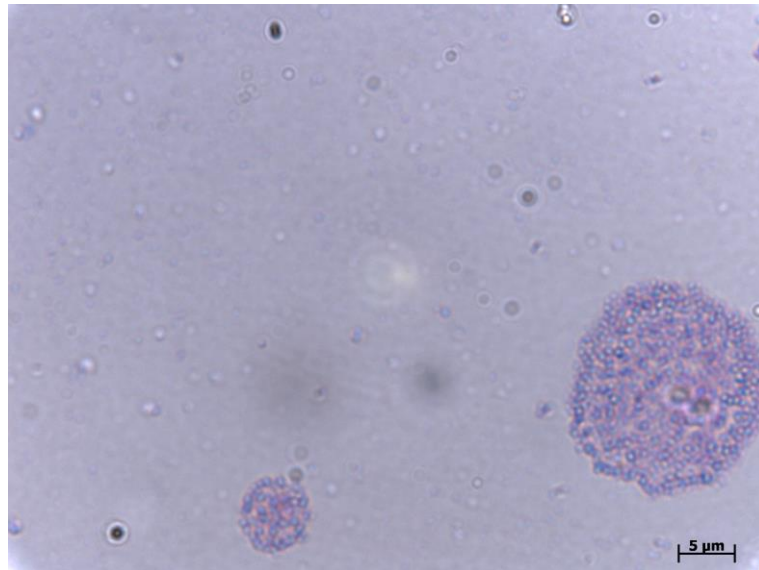


Figura 12. Pesquisa intraeritrocitária de hemoglobina H (Caso 1618). Foto de esfregaço sanguíneo em lâmina corado com Azul de Cresil Brillhante e visualizado por microscopia óptica. Resultado da pesquisa: positivo. Resultado Gap PCR: heterozigoto para a deleção $-\alpha^{3,7}$.

7.6. Relação entre a presença da deleção e o fator idade

A maioria das crianças que nasce com uma doença crônica em países de alta renda sobrevive, enquanto a maioria das crianças que nascem em países de baixa renda morre antes de 5 anos de idade. Hemoglobinopatias contribuem com o equivalente a 3,4% de mortalidade em crianças com menos de 5 anos em todo o mundo ou 6,4% na África (Modell e Darlison, 2008).

A faixa etária dos pacientes da população estudada foi entre 3 e 88 anos. Dos 70 pacientes, 14 (20%) tem idade superior a 50 anos. Essa taxa alta de idade avançada justifica-se por serem pacientes acompanhados por hematologista que tem como conduta o tratamento correto para esse tipo de anemia, ou seja, apesar de serem pacientes com anemia hipocrômica e microcítica não têm deficiência de ferro. Por esse motivo, eles não são submetidos ao tratamento com ferro medicamentoso.

Análise da distribuição por faixa etária de pacientes portadores e não portadores da deleção $-\alpha^{3.7}$ revelou um maior número de homozigotos para a deleção $-\alpha^{3.7}$ com idade entre 11 e 20 anos (Figura 13). O diagnóstico molecular definitivo constitui um marco importante na vida desses pacientes, uma vez que o diagnóstico obtido ainda jovem proporcionará melhor qualidade de vida, atenuando as complicações clínicas causadas pelo tratamento incorreto.

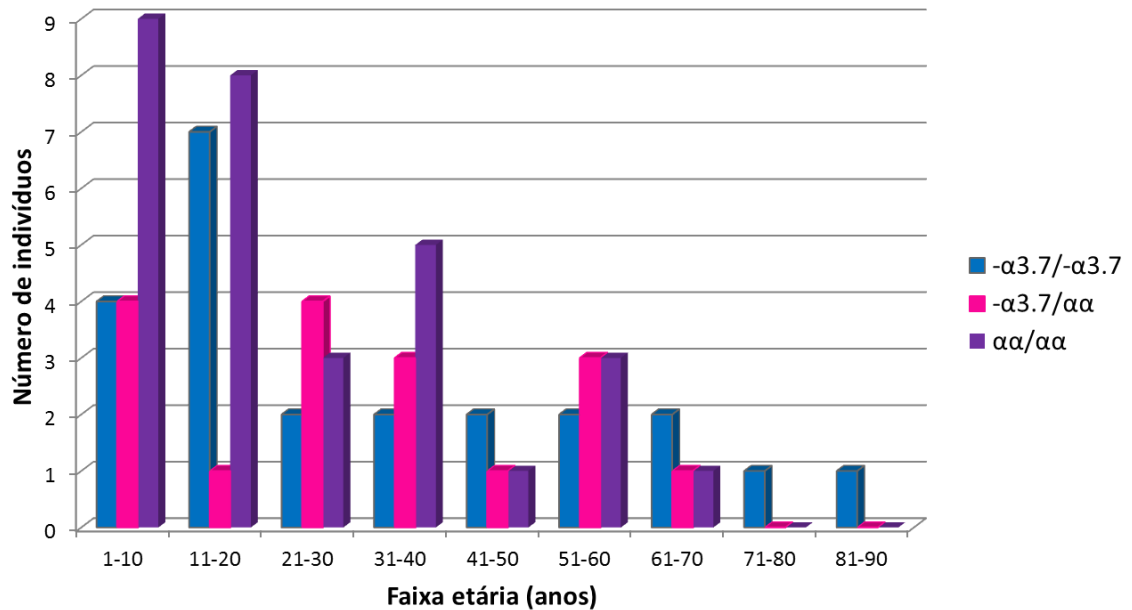


Figura 13. Distribuição de idade no grupo de pacientes portadores e não portadores da deleção $-\alpha^{3.7}$.

7.7. Frequência na população estudada

Dos 70 casos, 40 (57,1%) foram identificados como portadores da deleção que elimina 3.700 pb entre os genes *HBA2* e *HBA1*, conhecida como deleção $-\alpha^{3.7}$ da talassemia alfa. Destes, 17 (24,3%) são indivíduos portadores silenciosos e 23 (32,8%) são indivíduos traço alfa talassêmicos. Todos os portadores foram da cidade de Campos dos Goytacazes, RJ. Assim sendo, 30 (42,8%) dos pacientes com suspeita de talassemia alfa não são portadores da deleção $-\alpha^{3.7}$. Isso afirma a importância de fazer o teste molecular uma vez que apenas o exame hematológico não é suficiente para fechar o diagnóstico de talassemia alfa.

Um trabalho confirmou que a distribuição da talassemia alfa é extremamente heterogênea dentro de diferentes países e até mesmo dentro de pequenas distâncias geográficas (Weatherall, 2010).

A alta frequência de portadores de talassemia alfa na população brasileira pode estar relacionada à composição étnica nas diferentes regiões, refletindo o histórico de miscigenação entre americanos, europeus (Portugueses) e escravos africanos desde os tempos da colonização (Pereira *et al.*, 1973; Zago e Costa, 1985).

Nenhum dos casos analisados apresentou a deleção que elimina 4.200 pares de bases entre os genes *HBA2* e *HBA1* conhecida como deleção $-\alpha^{4.2}$ da talassemia alfa.

Nenhum dos pacientes investigados apresentou a talassemia α^0 , portanto nenhum casal corre risco de ter filhos com hidropsia fetal.

O estudo não exclui a possibilidade de que os 30 pacientes com suspeita de talassemia alfa que sejam portadores de outra deleção ou mutação pontual (Naoum, 1997; Tadmouri *et al.*, 2006) que diminua a expressão dos genes alfa, ou em genes proximais (Harvey *et al.*, 1990) ou até em genes distantes, como por exemplo, a mutação no gene *ATRX* (cromossomo X) que parece regular a expressão dos genes *HBA1* e *HBA2* (Steensma *et al.*, 2005). Para elucidar essa questão é necessário realizar testes adicionais para avaliar a expressão gênica, como: RT-PCR e investigar a presença de uma mutação pontual através do sequenciamento.

As deleções envolvendo a região α -MRE silenciam a expressão dos genes alfa, mantendo-os fisicamente intactos, mas funcionalmente inativos (Romao *et al.*, 1991). Esse tipo de mutação causa a diminuição dos valores de VCM < 80 fL e de HCM < 25 pg (Ribeiro e Sonati, 2008), quadro este apresentado em 8 (26,6%) dos 30 pacientes da pesquisa classificados como indivíduos que não apresentaram deleções entre os genes *HBA2* e *HBA1*.

Os pacientes diagnosticados como indivíduos que não apresentaram deleções entre os genes *HBA2* e *HBA1* precisam ser avaliados para solucionar a causa dessa anemia. As possibilidades de anemia carencial e das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ já foram afastadas.

7.8. Frequência de talassemia alfa no Brasil e no mundo

A prevalência mundial de talassemia alfa está estimada entre 5 a 20% (Weatherall e Clegg, 2001). A talassemia foi originada em regiões tropicais e subtropicais, mas agora é comum em todo o mundo devido à migração (Weatherall e Clegg, 2001). A deleção $-\alpha^{3.7}$ da talassemia alfa predomina em todas as regiões brasileiras já estudadas (Tabela 10) (Cancado, 2006). Apesar da elevada frequência da talassemia alfa no Brasil, essa é a hemoglobinopatia menos investigada em nosso meio (Ballas, 2001).

Tabela 10. Regiões brasileiras estudadas para talassemia.

Região	Total das amostras	Descrição	Presença da deleção $-\alpha^{3.7}$	Deleção $-\alpha^{3.7}$ em homozigose	Deleção $-\alpha^{3.7}$ em heterozigose	Presença da deleção $-\alpha^{4.2}$	Técnica de investigação	Referência
BA	590	Cordão umbilical de recém-nascidos	114 (22,2%)	13 (2,5%)	101 (19,7%)	0	Variante de HPLC	(Adorno <i>et al.</i> , 2005)
RN	713	Adultos não aparentados	80 (11,2%)	1 (0,1%)	79 (11,1%)	Não pesquisou	PCR	(Alcoforado <i>et al.</i> , 2012)
RS	493	Indivíduos não aparentados ascendência Europeu e Africano	53 (10,7%)	0% brasileiro ascendente de Europeu	9 (4,5%) brasileiro ascendente de Europeu	0	PCR multiplex	(Wagner <i>et al.</i> , 2010)
				3 (1,6%) brasileiro ascendente de Africano	41 (21,5%) brasileiro ascendente de Africano			
PA	220	Indivíduos com anemia com e sem microcitose e hipocromia; sem anemia	30 (13,63%)	1 (1%) anemia com microcitose e hipocromia	20 (19,4%) anemia com microcitose e hipocromia	Não pesquisou	Gap PCR multiplex	(Souza <i>et al.</i> , 2009)
				0% Anemia sem microcitose e hipocromia	1 (9%) anemia sem microcitose e hipocromia			
				1 (9,1%) sem anemia	7 (6,6%) sem anemia			
BA	106	Mulheres grávidas com HbAC	12 (11,3%)	1 (0,9%)	11 (10,4%)	Não pesquisou	PCR	(Couto <i>et al.</i> , 2003)

Tabela 10 (cont.)

Região	Total das amostras	Descrição	Presença da deleção - $\alpha^{3.7}$	Deleção - $\alpha^{3.7}$ em homozigose	Deleção - $\alpha^{3.7}$ em heterozigose	Presença da deleção - $\alpha^{4.2}$	Técnica de investigação	Referência
RJ	99	Crianças com anemia falciforme	21 (21,2%)	3 (3%)	18 (18,2%)	0	PCR	(Filho <i>et al.</i> , 2010)
RN	319	Indivíduos com microcitose e hipocromia	105 (32,9%)	12 (3,8%)	93 (29,1%)	Não pesquisou	PCR	(Bezerra, 2009)
SP	339	98 adultos negros e 241 caucasianos com microcitose e hipocromia	169 (49,9%)	18 (5,3%)	145 (42,8%)	0	PCR com enzimas de restrição	(Borges <i>et al.</i> , 2001)
RJ	70	Indivíduos com microcitose e hipocromia	40 (57,1%)	23 (32,8%)	17 (24,3%)	0	Gap-PCR	Presente trabalho

7.9. Relevância do diagnóstico através do exame molecular

Este estudo é o primeiro a investigar a talassemia alfa através de exames moleculares na população de Campos dos Goytacazes. Ele confirma as referências que, o diagnóstico hematológico nem sempre é conclusivo, principalmente em casos das formas mais brandas da talassemia alfa. Por outro lado, o diagnóstico genético molecular para as deleções dos genes alfa é de resolução específica.

O prestígio maior do diagnóstico molecular é o poder de discriminar a posição da deleção em indivíduos com traço da talassemia. Essa classificação ocorre para indivíduos com deleção de dois genes alfa. O exame permite identificar se houve a deleção de dois genes alfa no mesmo cromossomo ($--/\alpha\alpha$) ou dois genes alfa em cromossomos diferentes ($-\alpha/-\alpha$). O exame hematológico não faz essa distinção, apenas assiste na identificação do traço alfa talassêmico ($--/\alpha\alpha$) ou ($-\alpha/-\alpha$). Essa distinção é essencial para prevenir casais com a deleção ($--/\alpha\alpha$) de terem filhos com a síndrome da hidropsia fetal.

A frequência da talassemia alfa pode ser maior do que a demonstrada nesse estudo, se a pesquisa for feita na população em geral. Assim, será possível identificar os portadores silenciosos. Esses, apresentam exames hematológicos com os resultados dentro dos valores de referência (Origa *et al.*, 1993).

Os dados alcançados com essa pesquisa evidenciam a necessidade de introduzir na rotina do laboratório de análises clínicas o diagnóstico molecular específico para talassemia alfa, a fim de aumentar a sobrevida e qualidade de vida dos acometidos, atenuando as complicações clínicas e prevenindo a síndrome da hidropsia fetal.

Outro aspecto relevante, a partir do exame molecular, foi poder elucidar a origem da talassemia na paciente 1608F que apresenta deleção $-\alpha^{3.7}$ em homozigose e diagnóstico clínico de retardo mental. Tal associação é possível (Harvey *et al.*, 1990; Wilkie *et al.*, 1990; Pfeifer *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2003). Porém, os relatos disponíveis referem à talassemia alfa adquirida em decorrência de mutação no gene *ATRX* ou pela síndrome ATR-16, o que claramente não é o nosso caso. O presente estudo mostrou que no caso 1608F a talassemia alfa foi de origem hereditária, visto que ambos os progenitores são portadores da deleção $-\alpha^{3.7}$. Sabendo que a síndrome ATR-16 elimina cerca de 2 Mb incluindo os dois genes alfa, a hipótese de associação talassemia versus retardo mental por essa

causa foi rejeitada, já que o teste molecular evidenciou que um gene alfa, dos dois presentes em um cromossomo, está intacto (deleção $-\alpha^{3.7}$) no paciente 1608F. Contudo, essa investigação não descarta a possibilidade de comorbidade entre talassemia hereditária e a síndrome ATR-X agravando mais o quadro de anemia.

7.10. Fortalecendo a interiorização da Genética no SUS

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou o desenvolvimento global de um programa que integra o diagnóstico, tratamento e controle da talassemia alfa através do aconselhamento genético. O programa deve incluir também a vigilância, a divulgação de informação, sensibilização e rastreio da talassemia. A OMS levou em consideração todos os seguintes fatores: o papel dos serviços de genética na melhoria da saúde a nível mundial, o impacto das hemoglobinopatias sobre a mortalidade global e pelo sofrimento dos pacientes e famílias afetadas pela doença, o reconhecimento que a prevalência da talassemia varia entre as comunidades, o fato de talassemia e outras hemoglobinopatias não serem reconhecidas como prioridades em saúde pública e a falta mundial atual de acesso a serviços de genética segura e adequada (Report, 2006).

As hemoglobinopatias são comumente um ponto de entrada para abordagens genéticas em sistemas de saúde (Alwan e Modell, 2003; Castillo Taucher, 2007).

Ainda não é possível promover o acesso do exame molecular de forma equitativa aos serviços públicos de saúde, mas através de pesquisas como essa é possível promover estratégias em Programa de Atenção Integral às Pessoas com Hemoglobinopatias, garantindo o acesso ao exame e prevenção de complicações que podem ser evitadas a partir do diagnóstico para talassemia alfa.

Dados globais sugerem uma redução de 16% nos nascimentos de crianças com talassemia. A maior parte da redução é atribuída à informação para reduzir a reprodução de casais com risco, em vez do diagnóstico pré-natal (Modell e Darlison, 2008).

Esses dados implicam diretamente na importância desse trabalho, que fornece um suporte para pesquisa aplicada em talassemia e para o aconselhamento genético.

8. CONCLUSÕES

A pesquisa mostrou que a deleção $-\alpha^{3.7}$ é mais prevalente que a deleção $-\alpha^{4.2}$ na população estudada e que a deleção $-\alpha^{3.7}$ foi encontrada em mais da metade dos indivíduos suspeitos;

Todos os pacientes aparentados da população estudada herdaram a mutação;

Muitos jovens que apresentavam anemia a esclarecer obtiveram um diagnóstico e terão melhor qualidade de vida sem as complicações clínicas causadas pelo tratamento incorreto;

Este estudo confirma que o diagnóstico hematológico nem sempre é conclusivo;

Por outro lado, o diagnóstico através da metodologia da Gap-PCR é de resolução específica.

9. REFERÊNCIAS

Adorno, E. V., Couto, F. D., *et al.* Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. Cad Saude Publica, v.21, n.1, Jan-Feb, p.292-8. 2005.

Alcoforado, G. H. D. M., Bezerra, C. M., *et al.* Prevalence of alpha-thalassemia 3.7 kb deletion in the adult population of Rio Grande do Norte, Brazil. Genetics and Molecular Biology, v.35, n.3 DO - 10.1590/S1415-47572012005000049, 2012///Jul-Sep, p.594-598. 2012.

Alwan, A. e Modell, B. Recommendations for introducing genetics services in developing countries. Nat Rev Genet, v.4, n.1, Jan, p.61-8. 2003.

Ballas, S. K. Effect of alpha-globin genotype on the pathophysiology of sickle cell disease. Pediatr Pathol Mol Med, v.20, n.2, Mar-Apr, p.107-21. 2001.

Bezerra, C. M. Molecular diagnosis of α^+ thalassemia (- $\alpha^{3.7}$ deletion) in individuals with microcytosis and/or hypochromia treated in the Dalton Barbosa Cunha Blood center, Natal, Brazil. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., v.32, n.1, Feb. 2010, p.no.1. 2009.

Boas, F. E., Forman, L., *et al.* Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.6, Mar 17, p.3077-81. 1998.

Borges, E., Wenning, M. R. S. C., *et al.* High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.34, n.6, p.759-762. 2001.

Cancado, R. D. Alpha thalasseмии. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v.28, n.2, p.86-87. 2006.

Castillo Taucher, S. Services for the care and prevention of birth defects. Reduced report of a World Health Organization and March of Dimes Foundation meeting. Rev Med Chil, v.135, n.6, Jun, p.806-13. 2007.

Castro, F. S., Silva, N. A., *et al.* Prevalence of thalasseмии and variant hemoglobins in patients with systemic lupus erythematosus. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v.30, n.1, p.24-28. 2008.

Chan, L. C., Ma, S. K., *et al.* Should we screen for globin gene mutations in blood samples with mean corpuscular volume (MCV) greater than 80 fL in areas with a high prevalence of thalassaemia? J Clin Pathol, v.54, n.4, Apr, p.317-20. 2001.

Cheung, M. C., Goldberg, J. D., *et al.* Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood. Nat Genet, v.14, n.3, Nov, p.264-8. 1996.

- Chiu, R. W., Lau, T. K., *et al.* Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. Lancet, v.360, n.9338, Sep 28, p.998-1000. 2002.
- Chui, D. H., Fucharoen, S., *et al.* Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. Blood, v.101, n.3, Feb 1, p.791-800. 2003.
- Chui, D. H. e Wayne, J. S. Hydrops fetalis caused by alpha-thalassemia: an emerging health care problem. Blood, v.91, n.7, Apr 1, p.2213-22. 1998.
- Cidac/Pmcg. Centro de Informações e Dados de Campos. Campos dos Goytacazes. 2015 2014.
- Cockburn, I. A., Mackinnon, M. J., *et al.* A human complement receptor 1 polymorphism that reduces Plasmodium falciparum rosetting confers protection against severe malaria. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.1, Jan 6, p.272-7. 2004.
- Couto, F. D., De Albuquerque, A. B., *et al.* Alpha-Thalassemia 2, 3.7 kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: a molecular and hematological analysis. Clin Lab Haematol, v.25, n.1, Feb, p.29-34. 2003.
- Datasus. Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde. 2015.
- De Sanctis, V., Eleftheriou, A., *et al.* Prevalence of endocrine complications and short stature in patients with thalassaemia major: a multicenter study by the Thalassaemia International Federation (TIF). Pediatr Endocrinol Rev, v.2 Suppl 2, Dec, p.249-55. 2004.
- Dias-Penna, K. G. B., Melo-Reis, P. R. D., *et al.* Difficulty on laboratory identification of alpha thalassemia. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.46, n.2, p.91-97. 2010.
- Embury, S. H., Dozy, A. M., *et al.* Concurrent sickle-cell anemia and alpha-thalassemia: effect on severity of anemia. N Engl J Med, v.306, n.5, Feb 4, p.270-4. 1982.
- Fernandes, M. HGG é referência no atendimento a pacientes falciforme. 2015 2014.
- Fibach, E. e Rachmilewitz, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. Curr Mol Med, v.8, n.7, Nov, p.609-19. 2008.
- Filho, I. L. S., Ribeiro, G. S., *et al.* The frequency of β -globin gene haplotypes, a thalassemia and genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase, factor V Leiden and prothrombin genes in children with sickle cell disease in Rio de Janeiro, Brazil. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., v.32, n.1, Feb. 2010. 2010.
- Flint, J., Craddock, C. F., *et al.* Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. Am J Hum Genet, v.55, n.3, Sep, p.505-12. 1994.

- Foord, O. S. e Rose, E. A. Long-distance PCR. PCR Methods Appl, v.3, n.6, Jun, p.S149-61. 1994.
- Forget, B. G. e Cohen, A. R. Thalassemia Syndromes. In: R. Hoffman, E. J. Benz Jr, *et al* (Ed.). Hematology: Basic Principles and Practice. Livingstone: Elsevier Churchill, v.4, 2005. Thalassemia Syndromes, p.557-89
- Frenette, P. S. e Atweh, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. J Clin Invest, v.117, n.4, Apr, p.850-8. 2007.
- Fritsch, E. F., Lawn, R. M., *et al*. Molecular cloning and characterization of the human beta-like globin gene cluster. Cell, v.19, n.4, Apr, p.959-72. 1980.
- Harteveld, C. L. e Higgs, D. R. Alpha-thalassaemia. Orphanet J Rare Dis, v.5, p.13. 2010.
- Harteveld, C. L., Voskamp, A., *et al*. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. J Med Genet, v.42, n.12, Dec, p.922-31. 2005.
- Harvey, M. P., Kearney, A., *et al*. Occurrence of the alpha thalassaemia-mental retardation syndrome (non-deletional type) in an Australian male. J Med Genet, v.27, n.9, Sep, p.577-81. 1990.
- Hatton, C. S., Wilkie, A. O., *et al*. Alpha-thalassemia caused by a large (62 kb) deletion upstream of the human alpha globin gene cluster. Blood, v.76, n.1, Jul 1, p.221-7. 1990.
- Higgs, D. R. Alpha-Thalassaemia. Baillieres Clin Haematol, v.6, n.1, Mar, p.117-50. 1993.
- Higgs, D. R., Aldridge, B. E., *et al*. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. N Engl J Med, v.306, n.24, Jun 17, p.1441-6. 1982.
- Higgs, D. R., Hill, A. V., *et al*. Independent recombination events between the duplicated human alpha globin genes; implications for their concerted evolution. Nucleic Acids Research, v.12, n.18 AN - PMC320136, 1984/09/25, p.6965-6977. 1984.
- Higgs, D. R., Vickers, M. A., *et al*. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. Blood, v.73, n.5, Apr, p.1081-104. 1989.
- Higgs, D. R. e Weatherall, D. J. The alpha thalassaemias. Cell Mol Life Sci, v.66, n.7, Apr, p.1154-62. 2009.
- Hughes, J. R., Cheng, J. F., *et al*. Annotation of cis-regulatory elements by identification, subclassification, and functional assessment of multispecies conserved sequences. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.28, Jul 12, p.9830-5. 2005.

Ibge. Distribuição percentual da população, por cor ou raça - Brasil - 1999/2009. Rio de Janeiro. 2015 2010a.

_____. Sinopse do Censo Demográfico. Rio de Janeiro. 2013 2010b.

Jarman, A. P., Wood, W. G., *et al.* Characterization of the major regulatory element upstream of the human alpha-globin gene cluster. Mol Cell Biol, v.11, n.9, Sep, p.4679-89. 1991.

Kattamis, A. C., Camaschella, C., *et al.* Human alpha-thalassemia syndromes: detection of molecular defects. Am J Hematol, v.53, n.2, Oct, p.81-91. 1996.

Ko, T. M., Tseng, L. H., *et al.* Carrier detection and prenatal diagnosis of alpha-thalassemia of Southeast Asian deletion by polymerase chain reaction. Hum Genet, v.88, n.3, Jan, p.245-8. 1992.

Krause, M. A., Diakite, S. A., *et al.* Alpha-Thalassemia impairs the cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. PLoS One, v.7, n.5, p.e37214. 2012.

Kuypers, F. A., Yuan, J., *et al.* Membrane phospholipid asymmetry in human thalassemia. Blood, v.91, n.8, Apr 15, p.3044-51. 1998.

Lacerra, G., Fiorito, M., *et al.* Sequence variations of the alpha-globin genes: scanning of high CG content genes with DHPLC and DG-DGGE. Hum Mutat, v.24, n.4, Oct, p.338-49. 2004.

Lauritsen, J. e Bruus, M. EpiData Data Entry, Data Management and basic Statistical Analysis System. Odense Denmark: EpiData Association 2000-2008.

Lederer, C. W., Basak, A. N., *et al.* An electronic infrastructure for research and treatment of the thalassemias and other hemoglobinopathies: the Euro-mediterranean ITHANET project. Hemoglobin, v.33, n.3, p.163-76. 2009.

Lee, J. S., Lee, S., *et al.* Alpha-thalassemia X-linked intellectual disability syndrome identified by whole exome sequencing in two boys with white matter changes and developmental retardation. Gene, Apr 30. 2015.

Liebhaber, S. A., Cash, F. E., *et al.* Human alpha-globin gene expression. The dominant role of the alpha 2-locus in mRNA and protein synthesis. J Biol Chem, v.261, n.32, Nov 15, p.15327-33. 1986.

Liebhaber, S. A., Griese, E. U., *et al.* Inactivation of human alpha-globin gene expression by a de novo deletion located upstream of the alpha-globin gene cluster. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.23, Dec, p.9431-5. 1990.

Liu, Y. T., Old, J. M., *et al.* Rapid detection of alpha-thalassaemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. Br J Haematol, v.108, n.2, Feb, p.295-9. 2000.

Lorenzi, T. F. Manual de Hematologia. Propedeutica e Clinica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2011. 724 p.

May, J., Evans, J. A., *et al*. Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria. Jama, v.297, n.20, May 23, p.2220-6. 2007.

Modell, B. e Darlison, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. Bull World Health Organ, v.86, n.6, Jun, p.480-7. 2008.

Naoum, P. C. Hemoglobinopatias e talassemias. SAO PAULO: Sarvier. 1997. 171 p.

Naoum, P. C. e Bonini-Domingos, C. R. Dificuldades no diagnostico laboratorial das hemoglobinopatias. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v.29, n.3, p.226-228. 2007.

Neto, G. C. G. e Pitombeira, M. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.39, n.1, p.51-56. 2003.

Nienhuis, A. W. Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects. Cell, v.48, n.5, p.731. 1986.

Olivieri, N. F., Chang, L. S., *et al*. An alpha-globin gene initiation codon mutation in a black family with HbH disease. Blood, v.70, n.3, Sep, p.729-32. 1987.

Olivieri, N. F. e Weatherall, D. J. Clinical Aspects of betaThalassemia and Related Disorders. In: M. H. Steinberg, B. G. Forget, *et al* (Ed.). Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. New York: Cambridge University Pres, v.2, 2009. Clinical Aspects of betaThalassemia and Related Disorders, p.391-404

Origa, R., Moi, P., *et al*. Alpha-Thalassemia. In: R. A. Pagon, M. P. Adam, *et al* (Ed.). GeneReviews. Seattle, 1993. Alpha-Thalassemia, p.1993-2015

Pereira, J. M., Callado, A. N., *et al*. Investigation on a family with alpha-thalassemia. Rev Bras Pesqui Med Biol, v.6, n.6, Nov-Dec, p.349-53. 1973.

Perutz, M. F., Rossmann, M. G., *et al*. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-A. resolution, obtained by X-ray analysis. Nature, v.185, n.4711, Feb 13, p.416-22. 1960.

Pfeifer, D., Poulat, F., *et al*. The SOX8 Gene Is Located within 700 kb of the Tip of Chromosome 16p and Is Deleted in a Patient with ATR-16 Syndrome. Genomics, v.63, n.1, 2000/1/1/, p.108-116. 2000.

Phylipsen, M., Prior, J. F., *et al*. Thalassemia in Western Australia: 11 novel deletions characterized by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. Blood Cells Mol Dis, v.44, n.3, Mar 15, p.146-51. 2010.

Piomelli, S., Karpatkin, M. H., *et al*. Hypertransfusion regimen in patients with Cooley's anemia. Ann N Y Acad Sci, v.232, n.0, p.186-92. 1974.

Pootrakul, P., Sirankapracha, P., *et al.* A correlation of erythrokinetics, ineffective erythropoiesis, and erythroid precursor apoptosis in thai patients with thalassemia. Blood, v.96, n.7, Oct 1, p.2606-12. 2000.

Rachmilewitz, E. A. e Giardina, P. J. How I treat thalassemia. Blood, v.118, n.13, Sep 29, p.3479-88. 2011.

Report. Executive Board 118th session. WORLD HEALTH ORGANIZATION. GENEVA: 29-31 MAY 2006, p.51-193. 2006

Ribeiro, D. M. e Sonati, M. F. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia. Genet Mol Res, v.7, n.4, p.1045-53. 2008.

Romao, L., Osorio-Almeida, L., *et al.* Alpha-thalassemia resulting from deletion of regulatory sequences far upstream of the alpha-globin structural genes. Blood, v.78, n.6, Sep 15, p.1589-95. 1991.

Schechter, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. Blood, v.112, n.10, Nov 15, p.3927-38. 2008.

Schrier, S. L. Pathophysiology of thalassemia. Curr Opin Hematol, v.9, n.2, Mar, p.123-6. 2002.

Shaji, R. V., Srivastava, A., *et al.* A single tube multiplex PCR method to detect the common alpha+ thalassemia alleles. Blood, v.95, n.5, Mar 1, p.1879-80. 2000.

Skogerboe, K. J., West, S. F., *et al.* Screening for alpha-thalassemia. Correlation of hemoglobin H inclusion bodies with DNA-determined genotype. Arch Pathol Lab Med, v.116, n.10, Oct, p.1012-8. 1992.

Soares, M. S. African presence and marriage among the slaves at Campos dos Goitacazes (1790-1831). Curitiba: UFPR, v.52. 2010. 75-90 p. (História: Questões & Debates)

Sonati, M. F. e Costa, F. F. Talassemias alfa. In: A. C. Lopes e V. Amato Neto (Ed.). Tratado de Clínica médica. São Paulo: Roca, 2006. Talassemias alfa, p.1932-38

Souza, A. E., Cardoso, G. L., *et al.* Alpha-thalassemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian Amazon region: Santarem, Para State. Genet Mol Res, v.8, n.2, p.477-81. 2009.

Steensma, D. P., Gibbons, R. J., *et al.* Acquired alpha-thalassemia in association with myelodysplastic syndrome and other hematologic malignancies. Blood, v.105, n.2, Jan 15, p.443-52. 2005.

Steinberg, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. ScientificWorldJournal, v.8, p.1295-324. 2008.

Steinberg, M. H., Forget, B. G., *et al.* Disorders of hemoglobin - Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. New York: Cambridge University Press,. 2009. 884 p.

Steinberg, M. H., Rosenstock, W., *et al.* Effects of thalassemia and microcytosis on the hematologic and vasoocclusive severity of sickle cell anemia. Blood, v.63, n.6, Jun, p.1353-60. 1984.

Stuart, M. J. e Nagel, R. L. Sickle-cell disease. Lancet, v.364, n.9442, Oct 9-15, p.1343-60. 2004.

Tadmouri, G. O., Al Ali, M. T., *et al.* CTGA: the database for genetic disorders in Arab populations. Nucleic Acids Res, v.34, n.Database issue, Jan 1, p.D602-6. 2006.

Tan, A. S., Quah, T. C., *et al.* A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. Blood, v.98, n.1, Jul 1, p.250-1. 2001.

Thompson, C. C., Ali, M. A., *et al.* Positional effect of cis/trans alpha globin gene deletions on the formation of "H" bodies. Am J Hematol, v.31, n.4, Aug, p.242-7. 1989.

Tome-Alves, R., Marchi-Salvador, D. P., *et al.* Hemoglobins AS/alpha thalassemia: diagnostic importance. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v.22, n.3, p.388-394. 2000.

Trent, R. J. Diagnosis of the haemoglobinopathies. Clin Biochem Rev, v.27, n.1, Feb, p.27-38. 2006.

Viprakasit, V., Hartevelde, C. L., *et al.* A novel deletion causing alpha thalassemia clarifies the importance of the major human alpha globin regulatory element. Blood, v.107, n.9, May 1, p.3811-2. 2006.

Wagner, S. C., Castro, S. M. D., *et al.* Prevalence of common alpha-thalassemia determinants in south Brazil: importance for the diagnosis of microcytic anemia. Genetics and Molecular Biology, v.33, n.4, p.641-645. 2010.

Wang, W., Ma, E. S., *et al.* Single-tube multiplex-PCR screen for anti-3.7 and anti-4.2 alpha-globin gene triplications. Clin Chem, v.49, n.10, Oct, p.1679-82. 2003.

Weatherall, D. J. Thalassaemia: the long road from bedside to genome. Nat Rev Genet, v.5, n.8, Aug, p.625-31. 2004.

_____. Disorders of globin synthesis: The thalassemias. In: M. A. Lichtman, T. J. Kipps, *et al* (Ed.). Williams Hematology. New York, v.7, 2006. Disorders of globin synthesis: The thalassemias, p.675–707

_____. Thalassemia as a global health problem: recent progress toward its control in the developing countries. Ann N Y Acad Sci, v.1202, Aug, p.17-23. 2010.

Weatherall, D. J. e Clegg, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bull World Health Organ, v.79, n.8, p.704-12. 2001.

Wenning, M. R., Harteveld, C. L., *et al.* Hemoglobin H disease resulting from the association of the - alpha 3.7 rightward deletion and the (alpha alpha) MM deletion in a Brazilian patient. Eur J Haematol, v.69, n.3, Sep, p.179-81. 2002.

Wilkie, A. O., Buckle, V. J., *et al.* Clinical features and molecular analysis of the alpha thalassemia/mental retardation syndromes. Cases due to deletions involving chromosome band 16p13.3. Am J Hum Genet, v.46, n.6, Jun, p.1112-26. 1990.

Williams, T. N., Mwangi, T. W., *et al.* Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha-thalassemia and the sickle cell trait. Nature genetics, v.37, n.11 DO - 10.1038/ng1660 AN - PMC3521056, 2005/11/, p.1253-1257. 2005.

Williams, T. N. e Weatherall, D. J. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. Cold Spring Harb Perspect Med, v.2, n.9, Sep, p.a011692. 2012.

Xu, Y. W., Zeng, Y. H., *et al.* Preimplantation genetic diagnosis for alpha-thalassaemia in China. J Assist Reprod Genet, v.26, n.7, Jul, p.399-403. 2009.

Xue, Y., Gibbons, R., *et al.* The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.19, Sep 16, p.10635-40. 2003.

Zago, M. A. e Costa, F. F. Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.79, n.3, p.385-8. 1985.

Zago, M. A., Falcao, R. P., *et al.* Hematologia: fundamentos e pratica. Sao Paulo: Atheneu. 2004. 1042 p.

Zago, M. A., Melo Santos, E. J., *et al.* Alpha-globin gene haplotypes in South American Indians. Hum Biol, v.67, n.4, Aug, p.535-46. 1995.

Zhou, Y. Q., Xiao, G. F., *et al.* Evaluation of clinical application of gap-PCR as a routine method for alpha-thalassemia carrier detection. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, v.22, n.5, May, p.434-6. 2002.

ANEXO A - TERMO DE ANUÊNCIA LIVRE E ESCLARECIDO**CASO NUDIM**

XXXX	X
------	---

Eu **XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX**, identidade **XXXXXXXX-X**, paciente encaminhado pelo Dr. João Tadeu Damian Souto Filho, declaro que dou **ANUÊNCIA** à transferência do material biológico de mim coletado para o Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular - NUDIM, sediado no Hospital Escola Álvaro Alvim, visando ao **DESENVOLVIMENTO DE PESQUISA CIENTÍFICA DE INTERESSE COMUNITÁRIO** com fins de validação da metodologia para diagnóstico molecular de talassemia alfa. Declaro estar ciente de que minha identidade será mantida sob sigilo absoluto, e que todas as dúvidas que porventura ocorram durante o processo desta pesquisa serão devidamente esclarecidas, e que não haverá nenhum tipo de constrangimento ou ação em contra, caso decida por revogar a autorização aqui concedida para utilização das informações obtidas a partir dos estudos da amostra biológica coletada, a qualquer momento. Declaro não ter nenhum tipo de interesse econômico, em qualquer época, sobre os possíveis resultados alcançados durante as etapas subsequentes do andamento deste exame, deixando claro ser o meu interesse particular nessa pesquisa somente o de colaborador anônimo para o desenvolvimento científico em meu benefício.

Em campos dos Goytacazes, XX de XXXXXXXX de XXXX.

Assinatura do paciente

ANEXO B - DECLARAÇÃO DO HOSPITAL GERAL DE GUARUS



ESTADO DO RIO DE JANEIRO
PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPOS DOS GOYTACAZES
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
HOSPITAL GERAL DE GUARUS



Programa de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias

DECLARAÇÃO

Eu **JOÃO TADEU DAMIAN SOUTO FILHO**, CPF 053.600.227-44, Médico hematologista, CRM 52.73816-6, do Hospital Geral de Guarus – HGG, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, declaro para ciência do CONEP que sou integrante da equipe executora do projeto de pesquisa intitulado **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS DELEÇÕES $-a^{3,7}$ E $-a^{4,2}$ EM PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE TALASSEMIA ALFA ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE HEMATOLOGIA NO MUNICÍPIO DE CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ**, sob a coordenação do Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF.


Trata-se de um estudo transversal em coorte de população fechada de pacientes (n=70), voluntários que apresentam achados laboratoriais indicativos de talassemia alfa. O objetivo do estudo é identificar as possíveis deleções dos genes alfa-globina em pacientes com suspeita clínica de talassemia alfa.

O estudo requererá a amostragem por conveniência de pacientes com suspeita clínica de talassemia alfa, por mim atendidos no Ambulatório de Hematologia do HGG, com levantamento de dados secundários coletados retrospectivamente. Os pacientes serão encaminhados ao Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular – NUDIM, sede Hospital Escola Álvaro Alvim para averiguação genética das deleções pelo método Gap-PCR. A amostragem será sob a assinatura de Termo de Anuência - Consentimento Livre e Esclarecido.

Para este estudo serão incluídos pacientes com anemia persistente (valor de hemoglobina abaixo de 13,0 g/dl, hemácias hipocrômicas e microcíticas), porém com valores de ferro e transferrina dentro do parâmetro de normalidade e excluídos os pacientes com índices hematimétricos com valores dentro do parâmetro de normalidade, seguindo o valor de referência e pacientes anêmicos por deficiência alimentar.

Ressaltamos que os dados coletados serão mantidos em absoluto sigilo de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS/MS) 196/96 que trata da Pesquisa envolvendo Seres Humanos. Salientamos ainda que tais dados serão utilizados tão somente para realização deste estudo.

Campos dos Goytacazes, RJ, 16 de setembro de 2014.

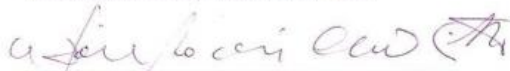


JOÃO TADEU DAMIAN SOUTO FILHO

CPF 053.600.227-44

Médico Hematologista, CRM 52.73816-6.

Autorização do responsável pelo HGG



WILSON RODRIGUES CABRAL FILHO

Diretor Geral do Hospital Geral de Guarus - HGG

Hospital Geral de Guarus - HGG
Av. José Carlos Pereira Pinto, 400 – Calabouço – Campos dos Goytacazes – RJ
Telefone: (22) 2726-1164 e (22)2726-1100