

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TIAGO HESSEL TORMEN

FREQUÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA (DELEÇÃO ALFA3.7) EM PACIENTES  
PORTADORES DE DOENÇAS FALCIFORMES EM CURITIBA - PARANÁ

CURITIBA  
2015

TIAGO HESSEL TORMEN

FREQUÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA (DELEÇÃO ALFA3.7) EM PACIENTES  
PORTADORES DE DOENÇAS FALCIFORMES EM CURITIBA - PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente com área de concentração em Onco-Hematologia Pediátrica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Albonei Dudeque Pianovski

CURITIBA  
2015

# *Termo de Aprovação*

*Tiago Hessel Tormen*

## **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE TALASSEMIA ALFA (DELEÇÃO ALFA3.7) EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME EM CURITIBA - PARANÁ**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de *Mestre em*  
*Saúde da Criança e do Adolescente* com área de concentração em  
*Hemato-Oncologia Pediátrica* no **Programa de Pós-  
Graduação Mestrado e Doutorado em Saúde da Criança e do  
Adolescente**, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná

A Banca Examinadora foi composta pelos Professores:

*Professora Doutora Mara Albonei Dudeque Pianovski* – Professora do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da UFPR; **Orientadora e Presidente da Banca Examinadora.**

*Professora Doutora Almeriane Maria Weffort Santos* - Professora Associada da Universidade Federal do Paraná - Curso de Farmácia - Departamento de Análises Clínicas - UFPR; **Primeira Examinadora.**

*Professor Doutor Rubens Cat* - Professor Adjunto do Departamento de Pediatria da UFPR; **Segundo Examinador.**

*Professora Doutora Regina Paula Guimarães Vieira Cavalcante da Silva* - Professora Adjunta do Departamento de Pediatria da UFPR; **Primeira Suplente.**

Curitiba, 17 de novembro de 2015

*Assinatura*  
*Professora Mônica Nunes Lima Cat*

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação - Mestrado e Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente

A  
Carolina  
Daniel  
Rafael

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mara Albonei Dudeque Pianovski pela orientação, amizade, estímulo e paciência para realização dessa pesquisa, pelo exemplo de docência e exercício ético da medicina.

Ao Prof. Dr. Gerald Picheth pela imprescindível orientação no planejamento dos testes moleculares e por acreditar na necessidade do trabalho multidisciplinar para progresso da pesquisa.

À doutoranda Luiza Cristina Gobor pela supervisão, auxílio e paciência na execução dos testes moleculares e ao Laboratório de Bioquímica da UFPR pela estrutura e insumos.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mônica Nunes Lima Cat pela colaboração e revisão da análise estatística.

À Dr<sup>ª</sup>. Leniza Costa Lima Lichtvan pelo auxílio na revisão dos dados clínicos, pelo exemplo de companheirismo, exercício impecável da medicina e docência.

À Dr<sup>ª</sup>. Débora Silva Carmo pelos dados epidemiológicos dos pacientes diagnosticados através do programa de triagem neonatal e pelos muitos momentos em que me ausentei, desde a residência médica, para realização desta pesquisa.

À Dr<sup>ª</sup> Carolina Martins de Almeida Peixoto e demais médicos do Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital Erasto Gaertner pela compreensão nos momentos em que precisei me ausentar.

Ao Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças e à Associação Paranaense de Apoio à Criança com Neoplasia pelo auxílio com insumos.

À equipe do Serviço de Hematologia Pediátrica do HC-UFPR por manter a visão de que assistência e pesquisa podem coexistir, pelo esmero no registro dos dados dos pacientes nos prontuários e pelo auxílio na coleta dos dados clínicos. Em especial à secretária Luzia Santos por sua disposição e prontificação em ajudar sempre.

Aos meus pais Raul Antônio Tormen e Ana Luisa Hessel Tormen pelo incentivo, amor e exemplo de dedicação profissional e docência.

À minha irmã Cristiane Hessel Tormen Devincenzi pelo incentivo no exercício da medicina.

À minha esposa Carolina Borges de Oliveira Ronzelli Tormen pelo auxílio em cada passo na elaboração desse trabalho (inclusive com a co-autoria dos textos em inglês), pelo carinho, paciência e amor incondicional.

Ao meu filho Daniel Ronzelli Tormen pela alegria sem fim e pela compreensão nos muitos momentos em que ouviu que “o papai tem que trabalhar”.

Ao meu filho Rafael Ronzelli Tormen que desde o ventre materno me incentiva a seguir em frente.

Ao meu Deus e Pai a quem é devida toda honra, glória e louvor, e que me permitiu descobrir uma pequena parte do que Ele já sabia antes mesmo de eu nascer.

“Antes eu te conhecia só por ouvir falar, mas  
agora eu te vejo com os meus próprios olhos.”  
Jó 42.5 - NTLH

## RESUMO

As doenças falciformes (DF) são as hemoglobinopatias mais comuns no mundo e a talassemia alfa é considerada a doença genética mais comum na população mundial. A associação das duas alterações é relacionada a um melhor prognóstico nos pacientes com doença falciforme, porém o diagnóstico da talassemia alfa necessita de técnicas moleculares geralmente não disponíveis aos médicos assistentes. Apesar de alguns estudos brasileiros terem verificado a prevalência de talassemia alfa nos pacientes com doença falciforme, não há dados sobre a população paranaense. Os objetivos desse estudo foram: verificar a prevalência de talassemia alfa em crianças assintomáticas e em pacientes com doença falciforme de Curitiba, através de técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), identificando a deleção alfa3.7; verificar se os pacientes com doença falciforme com ou sem talassemia alfa apresentam manifestações clínicas semelhantes; identificar parâmetros hematimétricos que possam sugerir a associação das doenças falciformes com talassemia alfa. Foram avaliadas 62 crianças com diagnóstico de DF e 94 crianças assintomáticas em idade escolar. A mediana de idade do grupo com DF foi de sete anos, e do grupo controle foi de 10 anos. Das 62 crianças do grupo com DF, 30 tinham o genótipo SS, 22 o genótipo SC e 10 o genótipo S $\beta$ . Os pacientes com genótipo SS apresentaram menos eritrócitos, menor nível de hemoglobina, maior número de leucócitos e plaquetas, VCM, HCM e RDW mais altos e maior porcentagem de reticulócitos que os grupos SC e S $\beta$ . Já os pacientes com genótipo S $\beta$  apresentaram maior porcentagem de Hb A2 que os genótipos SS e SC. Em relação às manifestações clínicas, mais pacientes com genótipo SS apresentaram dactilite ou precisaram de transfusão de concentrado de hemácias, quando comparados com os pacientes com genótipo SC. A prevalência de talassemia alfa no grupo com DF foi de 9,67%, sendo 8,06% heterozigotos e 1,61% homozigotos (frequência alélica de 0,056). No grupo controle, a prevalência foi de 3,19%, todos heterozigotos (frequência alélica de 0,015). Quando analisados todos os pacientes com doença falciforme, a presença de talassemia alfa não influenciou os parâmetros hematológicos, incluindo a porcentagem de Hb A2, ou as manifestações clínicas (acidente vascular encefálico, dactilite, sequestro esplênico e síndrome torácica aguda, número de internações por infecção, crises álgicas e número de transfusões de concentrado de hemácias). Quando analisados somente dos pacientes com genótipo SS, a porcentagem de Hb A2 foi maior na associação com talassemia alfa. Já nos pacientes com genótipo SC, o RDW foi mais alto nos pacientes com talassemia alfa. Comparado com estudos de outros estados, a prevalência de talassemia alfa em nessa amostra foi pequena, provavelmente porque a herança genética de talassemia alfa em nosso país seja mais relacionada à imigração de africanos, com uma pequena contribuição da imigração europeia. Apesar de se observarem as mesmas alterações relatadas na literatura em relação aos parâmetros hematológicos e manifestações clínicas, não houve significância estatística em nosso estudo, provavelmente pela baixa prevalência de talassemia alfa.

Palavras-chave: Talassemia alfa. Prevalência. Anemia Falciforme. Doença Falciforme. Curitiba. Paraná.



## ABSTRACT

The sickle cell diseases are the most common hemoglobinopathies and alpha-thalassemia is considered the most common genetic disease worldwide. The association of this two diseases is related to a better prognosis in patients with sickle cell disease. However, the diagnosis of alpha-thalassemia involves molecular techniques usually unavailable to the attending physicians. Even though there is Brazilian data on alpha-thalassemia prevalence on patients with sickle cell disease, there is no data on the population of Curitiba. The aims of this study were to verify the prevalence of alpha-thalassemia on healthy children and in patients with sickle cell disease in Curitiba, using the protein chain reaction (PCR) techniques, searching for the alpha3.7 deletion; to verify whether the patients with sickle cell disease, with or without alpha-thalassemia, present similar clinical manifestations and to identify hematimetric parameters that may suggest the association of sickle cell diseases with alpha-thalassemia. Sixty two children with sickle cell disease and 94 healthy children were evaluated. The median of the sickle cell disease group age was 7 years, and for the control group was 10 years. From the 62 children with sickle cell disease, 30 had the SS genotype, 22 had the SC genotype and 10 had the S $\beta$  genotype. Patients with SS genotype presented less erythrocytes, lower hemoglobin levels, more leukocytes and platelets, higher MCV, MCH and RDW and higher percentage of reticulocytes than the SC and S $\beta$  groups, besides higher hemoglobin F percentage than the SC group. Patients with S $\beta$  genotype presented higher hemoglobin A2 percentage than the patients with SS and SC genotypes. Concerning to the clinical manifestations, more patients with SS genotype presented dactylitis or needed red cells concentrate transfusion when compared to patients with SC genotype. The alpha-thalassemia prevalence on the sickle cell disease group was 9,67%. Of this, 8,06% were heterozygous and 1,61% were homozygous (allelic frequency of 0,056). On the control group the prevalence was 3,19%, all heterozygous (allelic frequency of 0,015). When all the sickle cell disease patients were analyzed, the presence of alpha-thalassemia did not influenced the hematological parameters, including the hemoglobin A2 and hemoglobin F percentages, or the clinical manifestations (stroke, dactylitis, splenic sequestration, acute thoracic syndrome, number of admissions caused by infection or pain crisis, and the number of red cell concentrate transfusions). When only the genotype SS patients were analyzed, the hemoglobin A2 percentage was higher when there was alpha-thalassemia association. In patients with the SC genotype, the RDW was higher in patients with alpha-thalassemia. When compared with other Brazilian states, the alpha-thalassemia prevalence in our sample was lower, probably because the genetic inheritance of the alpha-thalassemia in our country is related to the immigration from African countries, with a small contribution from European immigration. Even though we observed the same alterations reported in the literature on hematological parameters and clinical manifestations, there was no statistic significance in our data, probably due to the low alpha-thalassemia prevalence.

Key-words: Alpha-Thalassemia. Prevalence. Sickle cell anemia. Sickle cell disease. Curitiba. Paraná.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA NORMAL DO ADULTO.....	19
FIGURA 2 -	GENES DO GRUPAMENTO ALFA.....	20
FIGURA 3 -	GENES DO GRUPAMENTO BETA.....	20
FIGURA 4 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS CADEIAS DE HEMOGLOBINA AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO HUMANO.....	21
FIGURA 5 -	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS PRINCIPAIS HEMOGLOBINOPATIAS E TALASSEMIAS.....	22
FIGURA 6 -	GENÓTIPOS DAS TALASSEMIAS ALFA.....	32
FIGURA 7 -	MECANISMO DE RECOMBINAÇÃO DESIGUAL ORIGINANDO A DELEÇÃO ALFA3.7.....	32
FIGURA 8 -	NÚMERO DE ERITRÓCITOS ESTRATIFICADO POR GENÓTIPO DA DOENÇA FALCIFORME.....	50
FIGURA 9 -	CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA ESTRATIFICADA POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME.....	51
FIGURA 10 -	VCM ESTRATIFICADO POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME.....	51
FIGURA 11 -	HCM ESTRATIFICADA POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME.....	52
FIGURA 12 -	RDW ESTRATIFICADO POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME.....	52
FIGURA 13 -	NÚMERO DE LEUCÓCITOS ESTRATIFICADO POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME.....	53
FIGURA 14 -	NÚMERO DE PLAQUETAS ESTRATIFICADO POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME.....	53
FIGURA 15 -	PORCENTAGEM DE RETICULÓCITOS ESTRATIFICADA POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME.....	54
FIGURA 16 -	PORCENTAGEM DE HEMOGLOBINA A2 ESTRATIFICADA POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME.....	55

FIGURA 17 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR AMPLIFICADOS.....	58
FIGURA 18 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR AMPLIFICADOS.....	59
FIGURA 19 - PREVALÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA POR GRUPO.....	60
FIGURA 20 - INFLUÊNCIA DA TALASSEMIA ALFA NA CONCENTRAÇÃO DE HB A2 EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.....	64
FIGURA 21 - INFLUÊNCIA DA TALASSEMIA ALFA NO RDW EM PACIENTES COM DOENÇA SC.....	64

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	FREQUÊNCIA GÊNICA APROXIMADA DE ALGUMAS HEMOGLOBINOPATIAS, CLASSIFICADAS POR REGIÕES DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS).....	22
QUADRO 2 -	RESUMO DAS ANORMALIDADES MOLECULARES DAS HEMOGLOBINAS VARIANTES.....	23
QUADRO 3 -	DADOS HEMATOLÓGICOS DE PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS DE DOENÇAS FALCIFORMES.....	26
QUADRO 4 -	ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS DIFERENTES GENÓTIPOS TALASSÊMICOS.....	33
QUADRO 5 -	SÍNDROMES CLÍNICAS DA TALASSEMIA ALFA.....	34
QUADRO 6 -	EFEITOS DA TALASSEMIA ALFA NAS CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DA DOENÇA FALCIFORME.....	35
QUADRO 7 -	EFEITOS DA TALASSEMIA ALFA EM EVENTOS CLÍNICOS AGUDOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES.....	36
QUADRO 8 -	SEQUÊNCIA DE PRIMERS E TAMANHO DE AMPLICON ESPERADO.....	42

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	MIX DE PCR PADRONIZADO.....	43
TABELA 2 -	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES QUANTO AO SEXO E IDADE ESTRATIFICADOS POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME.....	47
TABELA 3 -	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME QUANTO AO SEXO E IDADE NA PRESENÇA OU NÃO DE TALASSEMIA ALFA.....	48
TABELA 4 -	CARACTERIZAÇÃO DAS CRIANÇAS DO GRUPO CONTROLE QUANTO AO SEXO E IDADE NA PRESENÇA OU NÃO DE TALASSEMIA ALFA.....	48
TABELA 5 -	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ESTRATIFICADOS POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME.....	49
TABELA 6 -	VARIANTES DE HEMOGLOBINA ESTRATIFICADAS POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME.....	54
TABELA 7 -	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ESTRATIFICADAS POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME.....	57
TABELA 8 -	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS OBSERVADAS A PARTIR DA ANÁLISE DE DNA.....	58
TABELA 9 -	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ESTRATIFICADOS PELA PRESENÇA DE TALASSEMIA ALFA.....	62
TABELA 10 -	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ESTRATIFICADAS PELA PRESENÇA DE TALASSEMIA ALFA.....	63
TABELA 11 -	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS NO GRUPO DE PACIENTES COM GENÓTIPO SS, ESTRATIFICADOS PELA PRESENÇA DE TALASSEMIA ALFA.....	64

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AF	- Anemia falciforme
AV	- Amplitude de variação
AVE	- Acidente vascular encefálico
CEGEMPAC	- Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CHCM	- Concentração de hemoglobina corpuscular média
DF	- Doença falciforme
DP	- Desvio padrão
DNA	- Ácido deoxirribonucleico
dNTP	- Deoxinucleotídeo
FEPE	- Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional
Hb	- Hemoglobina
Hb A	- Hemoglobina A
Hb A2	- Hemoglobina A2
Hb BART	- Hemoglobina BART
Hb F	- Hemoglobina Fetal
Hb H	- Hemoglobina H
Hb S	- Hemoglobina S
HC-UFPR	- Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HCM	- Hemoglobina corpuscular média
Ht	- Hematócrito
LCR	- Região controladora de locus
LIS	- Gene da Lisencefalia 1
N	- Não
PCR	- Reação em cadeia de polimerase ou <i>Protein Chain Reaction</i>
RDW	- <i>Red cell distribution width</i>
S	- Sim
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
SE	- Sequestro esplênico
STA	- Síndrome torácica aguda
TAE	- Tris-acetato-EDTA

- Tal- $\alpha$  - Talassemia alfa
- Tal- $\beta$  - Talassemia beta
- UFPR - Universidade Federal do Paraná
- VCM - Volume corpuscular médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 OBJETIVOS.....	17
1.1.1 Objetivo primário.....	17
1.1.2 Objetivos secundários.....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1 A HEMOGLOBINA.....	19
2.2 ANORMALIDADES HEREDITÁRIAS DA SÍNTESE DA HEMOGLOBINA.....	22
2.2.1 Doenças falciformes.....	24
2.2.1.1 Anemia.....	26
2.2.1.2 Crises Vaso-oclusivas.....	26
2.2.1.3 Infecções recorrentes.....	27
2.2.1.4 Sequestro esplênico.....	28
2.2.1.5 Síndrome torácica aguda.....	28
2.2.1.6 Priapismo.....	29
2.2.1.7 Acidente vascular encefálico.....	29
2.2.1.8 Crise aplástica.....	30
2.2.2 Talassemia alfa.....	30
2.2.3 Associação de alfa talassemia e doença falciforme.....	35
<b>3 MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>37</b>
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	37
3.2 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO.....	37
3.3 CASUÍSTICA.....	37
3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	38
3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	38
3.6 POPULAÇÃO DE ESTUDO E AMOSTRA.....	38
3.7 AMOSTRA.....	38
3.8 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	39
3.9 VALIDADE.....	39
3.10 PROCEDIMENTOS.....	40
3.10.1 Coleta de amostras.....	40
3.10.2 Extração de DNA.....	40



3.10.3 Reação de PCR.....	42
3.10.4 Coleta de dados clínicos e laboratoriais.....	44
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
3.11.1 Técnica de amostragem.....	45
3.12 ÉTICA EM PESQUISA.....	46
3.13 FOMENTO PARA PESQUISA, PROFISSIONAIS E SERVIÇOS ENVOLVIDOS.....	46
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	47
4.2 ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE DOENÇA FALCIFORME COM PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	49
4.3 DIAGNÓSTICO E PREVALÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA.....	56
4.4 ASSOCIAÇÃO DE TALASSEMIA ALFA COM PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	60
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
5.1 AMOSTRA.....	65
5.2 DOENÇA FALCIFORME.....	67
5.3 TALASSEMIA ALFA.....	69
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>84</b>
<b>PRODUÇÃO ACADÊMICA.....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em 06 de julho de 2001, o Ministério da Saúde implantou o Programa Nacional de Triagem Neonatal, sendo o Paraná o primeiro estado contemplado com um Serviço de Referência Nacional em Triagem Neonatal (BRASIL, 2006). A partir desse ano, todo recém-nascido no estado do Paraná passou a ser testado para diversas hemoglobinopatias, com aumento do número de diagnósticos e menor morbimortalidade dos pacientes.

Hemoglobinopatias são alterações nos genes da globina que determinam hemoglobinas variantes e/ou talassemias, com manifestações clínicas variáveis. Estudos realizados no Brasil mostram alta prevalência de hemoglobinopatias S e C, além de talassemias alfa e beta (WAGNER, 2010).

A anemia falciforme é determinada pela homozigose da Hb S, que é resultado de uma única mutação no sexto códon do gene da globina beta (KAN, 1978<sup>1</sup> citado por LINDENAU, 2009). A heterozigose da Hb S, quando associada a outras hemoglobinopatias (Hb C, D, alfa ou beta talassemia) é denominada doença falciforme, apresentando um espectro amplo de manifestações clínicas.

A talassemia alfa é alteração genética mais comum na síntese da hemoglobina, afetando mais de 5% da população mundial (VICHINSKY, 2012). Resulta de um desequilíbrio na síntese das cadeias alfa da hemoglobina devido principalmente à deleção de um ou ambos os genes da globina alfa, sendo a deleção alfa3.7 a mais frequente (BEZERRA, 2009).

Assim como nas doenças falciformes, há uma substancial heterogeneidade no fenótipo da talassemia alfa, resultado da diversidade de alterações genéticas. A inativação de um único gene da globina alfa resulta em um fenótipo de portador silencioso (ausência de sintomas e hemograma normal). Inativação de dois genes causa traço de talassemia alfa, cujos portadores são assintomáticos e apresentam microcitose sem anemia.

Já a inativação de três dos quatro genes da globina alfa resulta em produção significativa de Hb H, uma forma de hemoglobina composta de quatro cadeias beta. Pacientes com Hb H têm talassemia alfa intermédia ou doença da hemoglobina H,

1 KAN, Y.W.; DOZY, A.M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: Relationship to sickle mutation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.75, n.11, p.5631-5635, 1978.

que causa anemia moderada a grave, um grau leve de eritropoese ineficaz e esplenomegalia. A inativação dos quatro genes da globina alfa resulta na produção excessiva de Hb BART (forma de Hb composta de quatro cadeias gama) e anemia grave, geralmente progredindo para hidropsia fetal (VINCHINSKY, 2012).

A prevalência de talassemia alfa é maior em populações de origem mediterrânea, enquanto que as doenças falciformes ocorrem predominantemente em afro-descendentes. Estudos nacionais evidenciam maior frequência da associação entre as duas alterações quando comparado a outros países, provavelmente devido à miscigenação da população brasileira (BEZERRA, 2009).

Essa associação tem sido relacionada a um curso menos agressivo da doença em pacientes homocigotos para hemoglobina S (anemia falciforme), com menos episódios de crises de falcização (BONINI-DOMINGOS *et al*, 2000) e de acidentes vasculares encefálicos (BELISÁRIO; VIANA, 2010).

Entretanto, a frequência da associação entre doença falciforme e talassemia alfa, bem como os aspectos clínicos e hematológicos dessa associação, é uma área ainda inexplorada no estado do Paraná. A identificação de determinantes da gravidade do quadro clínico da anemia falciforme pode contribuir, ainda, para um manejo mais adequado e diferenciado da doença e, conseqüentemente, para melhor qualidade de vida e aumento da sobrevida dos pacientes acometidos por essa doença.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo primário

Verificar a prevalência de talassemia alfa em crianças hígdas e em pacientes com doença falciforme do estado do Paraná.

### 1.1.2 Objetivos secundários

a) Verificar se os pacientes com doença falciforme com ou sem talassemia alfa apresentam manifestações clínicas semelhantes;

b) Identificar parâmetros hematimétricos que possam sugerir a associação das doenças falciformes com talassemia alfa.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A HEMOGLOBINA

A hemoglobina humana é uma molécula tetramérica composta por duas cadeias globínicas do tipo alfa ( $\alpha$  ou  $\zeta$ ) e duas cadeias do tipo beta ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  ou  $\epsilon$ ). Cada cadeia se liga a um grupo protético heme, que consiste de um anel tetrapirrólico de protoporfirina IX, contendo um átomo de ferro central no estado reduzido ( $\text{Fe}^{2+}$ ) que se liga de forma reversível à molécula de  $\text{O}_2$ , transportando-a dos pulmões aos tecidos (BEUTLER, 2006) (Figura 1).

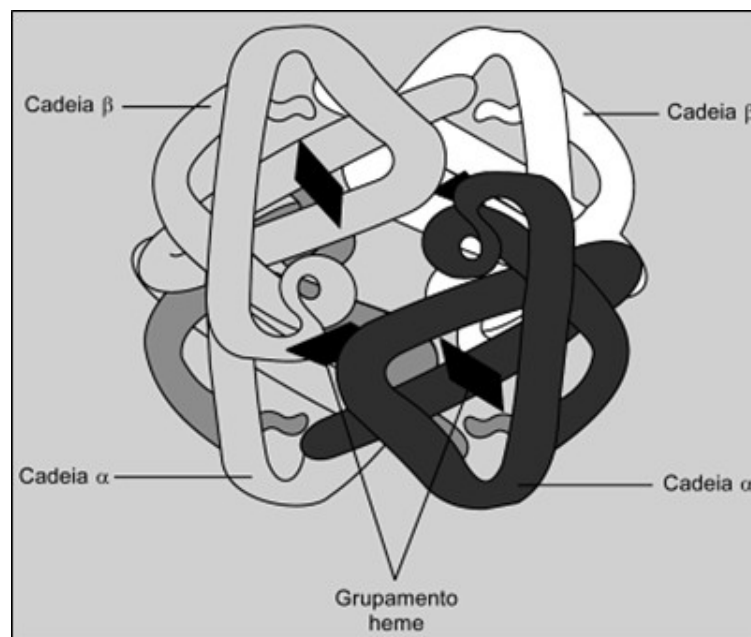


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA NORMAL DO ADULTO

FONTE: Robinson (2007)

NOTA: Há duas cadeias alfa e duas cadeias beta, cada uma ligada a um grupamento heme.

O agrupamento de genes da globina alfa ( $\zeta$ ,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) está localizado no cromossomo 16 (Figura 2) e o grupamento de genes da globina beta ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\beta$ ) está localizado no cromossomo 11 (Figura 3). Curiosamente, os genes estão

presentes, em ambos os cromossomos, na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento humano.

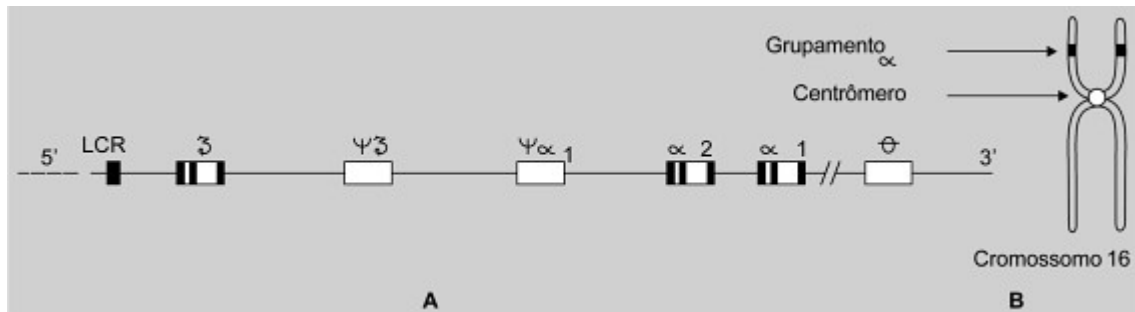


FIGURA 2 - GENES DO GRUPAMENTO ALFA

FONTE: Robinson (2007)

NOTA: A – Representação esquemática dos genes do grupamento alfa da fração globínica da hemoglobina; B – localização do grupamento alfa no cromossomo 16.

Os genes que codificam as cadeias globínicas são formados por três éxons e dois íntrons (CLARK; THEIN, 2004). Os genes  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  compreendem aproximadamente 1 a 2 kb de DNA e resultam da duplicação de um gene ancestral comum (HIGGS, 1993). O segmento de DNA de 26 kb, no qual estes genes estão inseridos, e o extenso segmento (150 kb) que flanqueia o grupamento são parte de uma longa região rica em guanina-citosina (G-C), que confere ao grupamento alfa a característica de ser replicado precocemente no ciclo celular (HIGGS, 1993; HIGGS *et al.*, 2005).

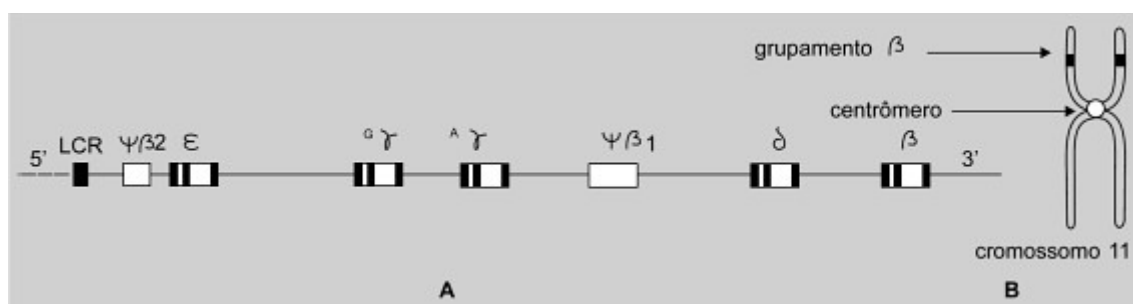


FIGURA 3 - GENES DO GRUPAMENTO BETA

FONTE: Robinson (2007)

NOTA: A - Representação esquemática dos genes do grupamento beta da fração globínica da hemoglobina; B – Localização do grupamento beta no cromossomo 11.

Apesar da proteína codificada pelos dois genes ser idêntica, alguns autores verificaram que a expressão de mRNA do gene  $\alpha_2$  é cerca de três vezes maior que a

do gene  $\alpha 1$ , provavelmente resultante de diferenças na regulação da transcrição dos dois genes (WEATHERALL, 2001).

Uma vez que estas cadeias se agrupam aos pares para formar as diversas hemoglobinas presentes ao longo da vida, é necessário um rígido e coordenado controle de sua expressão gênica, juntamente com o grupo heme, a fim de promover a adequada e equilibrada produção das hemoglobinas humanas nos diferentes estágios do desenvolvimento (CLARK; THEIN, 2004) (4).

Durante a vida fetal, o tipo predominante de hemoglobina é a hemoglobina Fetal (Hb F -  $\alpha 2\gamma 2$ ). Durante o período pós-natal, a Hb F é gradualmente substituída pela hemoglobina A (Hb A -  $\alpha 2\beta 2$ ). A hemoglobina A2 (Hb A2 -  $\alpha 2\delta 2$ ) é um tipo minoritário de hemoglobina presente no adulto, que representa menos de 2,5% da hemoglobina circulante em indivíduos normais (FRENETTE; ATWEH, 2007).

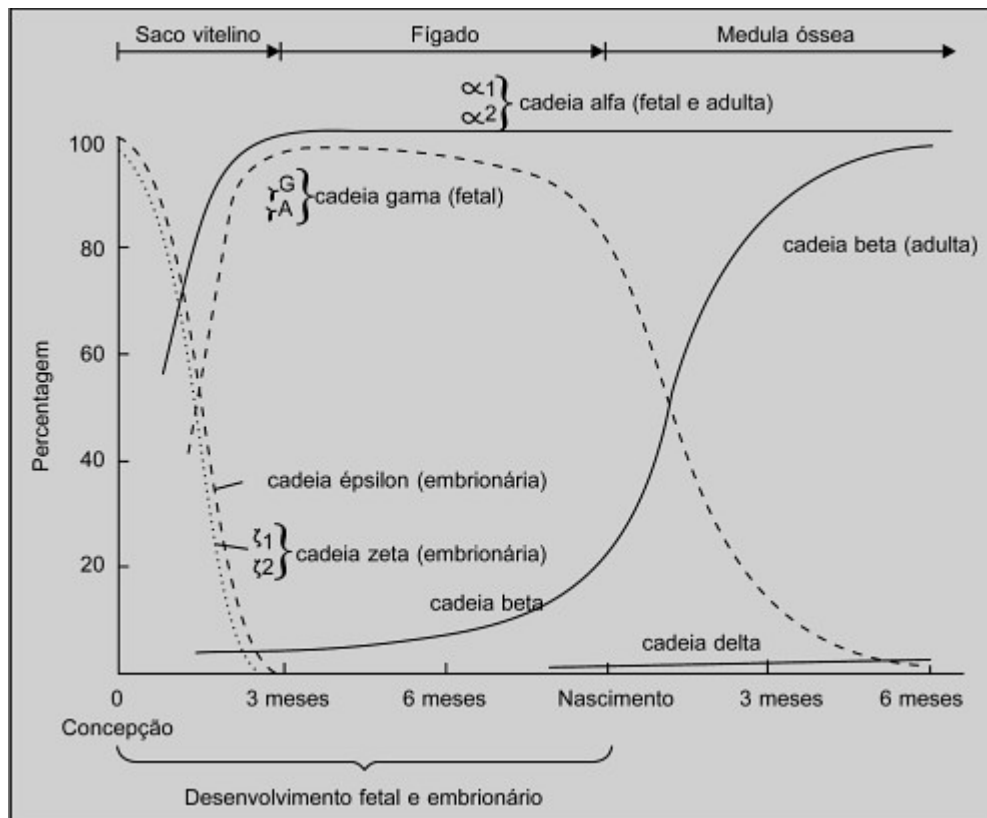


FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS CADEIAS DE HEMOGLOBINA AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO HUMANO.

FONTE: Robinson (2007)

## 2.2 ANORMALIDADES HEREDITÁRIAS DA SÍNTESE DA HEMOGLOBINA

Estima-se que 7% da população mundial apresenta algum distúrbio hereditário da hemoglobina, sendo o grupo de doenças monogênicas humanas mais frequente no mundo. Apesar de serem encontradas com mais frequência nas regiões tropicais (Figura 5), são amplamente distribuídas pelo globo, devido às migrações populacionais (WEATHERALL, 2001) (Quadro 1).

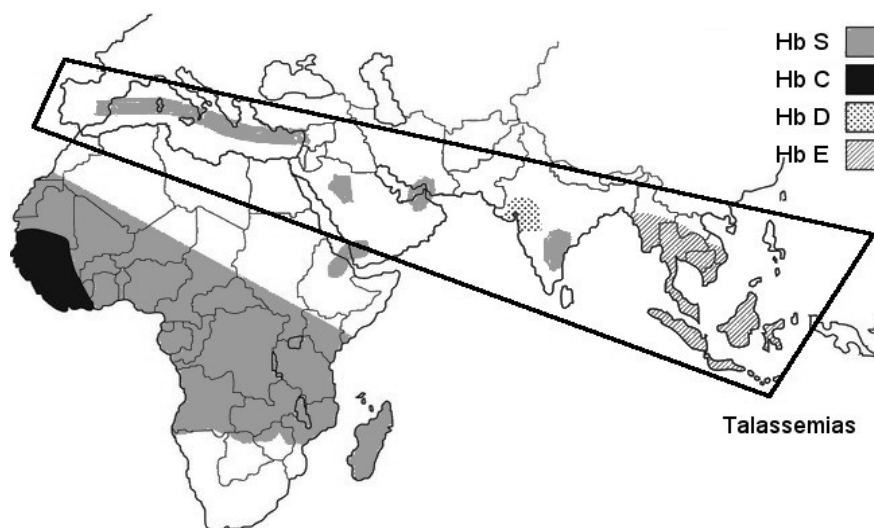


FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS PRINCIPAIS HEMOGLOBINOPATIAS E TALASSEMIAS  
 FONTE: Randolf (2015)

REGIÕES DA OMS	Hb S	Hb C	Hb E	Tal $\beta$	Tal $\alpha^0$	Tal $\alpha^+$
África Subsaariana	1-38	0-21	0	0-12	0	10-50
Américas	1-20	0-10	0-20	0-3	0-5	0-40
Mediterrâneo Oriental	0-60	0-3	0-2	2-18	0-2	1-60
Europa	0-30	0-5	0-20	0-19	1-2	0-12
Sudoeste Asiático	0-40	0	0-70	0-11	1-30	3-40
Pacífico Ocidental	0	0	0	0-13	0	2-60

QUADRO 1 - FREQUÊNCIA GÊNICA APROXIMADA DE ALGUMAS HEMOGLOBINOPATIAS, CLASSIFICADAS POR REGIÕES DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS)  
 FONTE: Weatherall (2006)



As anormalidades hereditárias da síntese da hemoglobina podem ser divididas em dois grupos: aquelas caracterizadas por variantes da hemoglobina estruturalmente anormais e aquelas nas quais uma ou mais das cadeias normais de polipeptídeos da hemoglobina são sintetizados em uma taxa reduzida. O termo “hemoglobinopatia” é usado para designar as primeiras, enquanto o termo “talassemias” as últimas (LUKENS, 2003).

Mais de 1.000 variantes estruturais da hemoglobina já foram descritas, das quais mais de 75% resultam da substituição de um único aminoácido (Quadro 2). Na Hb S, por exemplo, a valina substitui o ácido glutâmico na sexta posição desde o N-terminal da cadeia de globina  $\beta$  (BAIN, 2006).

ANORMALIDADES MOLECULARES	CADEIA $\alpha$	CADEIA $\beta$	CADEIA $\delta$	OUTRAS	TOTAL
Substituição de um aminoácido	253	405	34	67	759
Substituição de dois aminoácidos	1	23	0	5	29
Deleções	9	12	0	0	21
Inserções	5	2	0	0	7
Deleções e inserções	0	11	0	0	11
Extensão de cadeias	9	9	0	0	18
Fusões	0	9	8	1	18
Total	277	471	42	73	863

QUADRO 2 - RESUMO DAS ANORMALIDADES MOLECULARES DAS HEMOGLOBINAS VARIANTES

FONTE: Wang (2003)

NOTA: O número total de hemoglobinas variantes é 854. Cada uma das nove fusões são relatadas em duas colunas.

As doenças falciformes são as hemoglobinopatias mais comuns no mundo (WANG, 2003), enquanto a talassemia alfa é considerada a doença genética mais comum na população mundial (BORGNA-PIGNATTI; GALANELLO, 2003).

### 2.2.1 Doenças falciformes

As doenças falciformes constituem um conjunto de doenças genéticas autossômicas recessivas caracterizadas pela presença de, pelo menos, um alelo mutante  $\beta^S$  e o fenótipo com a concentração de Hb S superior a 50% (ASHLEY-KOCH *et al*, 2000; NAOUM, 2000; STUART; NAGEL, 2004). Os genótipos da DF mais comuns são: SS, SC, S-tal $\beta^+$ , S-tal $\beta^0$  (JANUARIO, 2002).

Destaca-se a anemia falciforme, geneticamente determinada pela homozigose do gene da hemoglobina S (Hb SS). O genótipo SS apresenta maior gravidade clínica e hematológica e maior morbidade e mortalidade (FRENETTE; ATWEH, 2007). A doença é fruto de uma mutação de ponto no gene da globina  $\beta$ , determinando uma hemoglobina variante, denominada S, ao invés da Hb A, típica do adulto. Essa mutação se caracteriza pela substituição de um nucleotídeo no sexto códon do gene da globina  $\beta$  e, assim, a codificação de uma valina ao invés do ácido glutâmico (GUASCH *et al*, 1999). Os indivíduos com traço falciforme (heterozigotos AS) apresentam em um cromossomo o alelo  $\beta$  normal e no outro o alelo mutante  $\beta^S$ , produzindo, fundamentalmente, uma mistura de Hb A e Hb S (Hb AS). São assintomáticos, não sendo o traço falciforme classificado como doença (ASHLEY-KOCH, 2000).

Quando um alelo  $\beta^S$  coexiste com um alelo causador de talassemia  $\beta$  (Tal- $\beta$ ) a gravidade da DF depende do tipo de mutação que causa a Tal- $\beta$ . As Tal $\beta$  são resultado de diversos alelos mutantes do gene da globina  $\beta$  que resultam na transcrição de níveis significativamente diminuídos de mRNA para produção de cadeias beta ou até mesmo da não produção de mRNA (STEINBERG, 2008). Quando o alelo talassêmico  $\beta$  coexistente causa a completa inativação do gene  $\beta$ , a DF resultante é conhecida como S-talassemia  $\beta^0$  (S-tal $\beta^0$ ) e a gravidade clínica tende a ser semelhante à da anemia falciforme (SS) (SERJEANT *et al*, 1979). Entretanto, quando o alelo talassêmico  $\beta$  coexistente causa a diminuição da transcrição do gene  $\beta$ , a DF resultante é conhecida como S-talassemia  $\beta^+$  (S-tal $\beta^+$ ), caracterizada por um amplo espectro de gravidade clínica que depende do nível de comprometimento da produção de cadeias beta (SERJEANT *et al*, 1973).

Estudos genéticos e arqueológicos indicam que o alelo  $\beta^S$  mutante é evolutivamente recente, com estimativas de que a mutação ocorreu pela primeira

vez entre 3.000 a 10.000 anos atrás (FLINT *et al*, 1993; CURRAT *et al*, 2002). Sabe-se que o alelo  $\beta^S$  confere uma vantagem seletiva aos portadores do traço falciforme, protegendo-os contra a malária. Esta pressão seletiva levou à persistência do alelo  $\beta^S$  em regiões endêmicas para a malária (AIDOO *et al*, 2002) e o aumento rápido da sua frequência ao longo de várias gerações (HANCHARD *et al*, 2007).

O fenótipo clínico dos pacientes com doença falciforme é extremamente variável e influenciado por diversos fatores. Entre eles estão o genótipo do paciente (SS, SC, S-tal $\beta$ ); fatores genéticos que podem influenciar no processo de polimerização da Hb S, no fenômeno de falcização e na hemólise; fatores genéticos que alteram a resposta individual à doença, a suas complicações ou ao tratamento e a fatores ambientais (local onde vive o paciente, prevalência de doenças infecto-contagiosas, condições socioeconômicas e acesso à assistência médica).

As hemoglobinas A e fetal, mesmo em concentrações elevadas, não formam estruturas organizadas dentro das hemácias, quer quando oxigenadas ou desoxigenadas. As moléculas de Hb S, por outro lado, quando desoxigenadas, se organizam em longos polímeros de filamentos duplos, que por sua vez se associam em feixes com um duplo filamento central rodeado de seis filamentos duplos de polímeros. Esses feixes de “cristais”, dentro das hemácias, podem ser vistos à microscopia eletrônica e determinam deformações das células. A deformação mais conhecida é provocada por feixes de polímeros se organizando mais ou menos paralelamente, dando à hemácia uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice” ou “falcizada”, embora as hemácias anormais possam assumir um amplo espectro de alterações morfológicas (ZAGO; PINTO, 2007).

Em condições de desoxigenação prolongada, há enrijecimento da membrana das hemácias, encurtando sua sobrevivência na circulação (hemólise), além de expressão de proteínas de membrana que levam ao aumento da adesão das hemácias ao endotélio, ativação de granulócitos e plaquetas, ativação da cascata de coagulação, vasoconstrição e reação inflamatória exacerbada (FRENETTE; ATWEH, 2007).

A seguir serão consideradas as principais manifestações clínicas das doenças falciformes.

### 2.2.1.1 Anemia

A anemia na doença falciforme é do tipo hemolítica, causada pela menor sobrevivência das hemácias falcizadas. Há aumento da bilirrubina indireta, hiperplasia eritróide da medula e elevação dos reticulócitos (ZAGO; PINTO, 2007). Cerca de um terço das hemácias lisadas sofrem hemólise intravascular e cerca de dois terços são removidas da circulação pelos macrófagos na circulação esplênica (MCINTYRE; PRECOTT; ZIMMERMAN, 2003). Além da hemólise, outros fatores podem contribuir para gênese ou agravamento da anemia: carência de folato, insuficiência renal, crises aplásticas e esplenomegalia (ZAGO; PINTO, 2007).

Entre as doenças falciformes, há diferentes graus de anemia, bem como diferenças nos índices hematimétricos (Quadro 3).

	SS 92 CASOS	S-tal $\beta^0$ 32 CASOS	S-tal $\beta^+$ 6 CASOS	SC 26 CASOS
Hb (g/dL)	7,7 $\pm$ 1,5	8,0 $\pm$ 1,7	10,0 $\pm$ 0,7	11,0 $\pm$ 1,5
HCM (pg)	30,2 $\pm$ 4,1	22,9 $\pm$ 2,5	21,5 $\pm$ 2,3	29,1 $\pm$ 3,2
HbA2 (%)	2,5 $\pm$ 0,4	4,3 $\pm$ 1,0	4,3 $\pm$ 0,8	-
HbF (%)	7,4 $\pm$ 6,7	11,6 $\pm$ 7,3	9,8 $\pm$ 8,6	2,8 $\pm$ 2,8

QUADRO 3 - DADOS HEMATOLÓGICOS DE PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS DE DOENÇAS FALCIFORMES

FONTE: Zago e Pinto (2007)

A piora aguda da anemia, por aumento da hemólise, não está fisiopatológica e temporalmente relacionada às crises vaso-oclusivas. Se não reconhecida ou não tratada, a queda na concentração de hemoglobina pode ser tão grave que causa insuficiência cardíaca e morte em horas (WANG, 2003).

### 2.2.1.2 Crises Vaso-oclusivas

As crises vaso-oclusivas ou crises de dor representam as manifestações clínicas mais comuns e características da doença falciforme (DAGA, 2009). São caracterizadas por episódios de oclusão microvascular em um ou vários locais,

causando dor e inaptidão, acompanhada por inflamação local (STUART; NAGEL, 2004). Os episódios são recorrentes, com duração de horas ou dias, podendo chegar a semanas, embora mais comumente tenham de cinco a sete dias de duração (BELISÁRIO, 2010).

A oclusão microvascular inicia predominantemente em áreas localizadas da medula óssea, levando a necrose tecidual. Mediadores inflamatórios ativam fibras nervosas nociceptivas aferentes, causando a resposta de dor. As áreas afetadas são ossos longos, costelas, esterno, coluna e pelve, geralmente com envolvimento de múltiplos sítios. Oclusão microvascular do córtex e perióstio pode ocasionalmente simular um quadro de osteomielite. Pode ocorrer dor abdominal que simule abdome agudo, devido a oclusão dos vasos mesentéricos (STUART; NAGEL, 2004).

Já a dactilite (síndrome mão-pé) é caracterizada por edema doloroso das mãos e pés, que afeta crianças menores de três anos. Corresponde a um processo inflamatório complexo, iniciado por necrose da medula óssea nas porções distais dos membros. Por isso, a dor é acompanhada de sinais inflamatórios evidentes, como edema e calor (ZAGO; PINTO, 2007).

A maioria dos episódios de crise de dor pode ser tratada ambulatorialmente, com uma combinação de agentes anti-inflamatórios, hidratação oral e analgésicos (BRASIL, 2006).

### 2.2.1.3 Infecções recorrentes

A infecção é a principal manifestação presente na anemia falciforme no início da infância, a complicação mais comum que requer hospitalização e a causa mais frequente de morte em todas as idades (REES *et al.*, 2003). A base fisiológica para aumento da suscetibilidade à infecção relaciona-se, em grande parte, à perda da função esplênica. Inicialmente, observa-se esplenomegalia consequente à congestão da polpa esplênica, em virtude da obstrução por grandes quantidades de células falcizadas, acompanhada de hemorragias ao redor dos corpúsculos de Malpighi. A oclusão vascular provoca repetidos microinfartos, tornando o órgão fibrótico e atrófico (DAGA, 2009). Na ausência da função do baço, os antígenos

particulados não estimulam uma resposta antigênica adequada e ocorre aumento do número de infecções por germes encapsulados.

#### 2.2.1.4 Sequestro esplênico

Definido como aumento de volume do baço, associado à diminuição da concentração de hemoglobina ( $\geq 2,0$  g/dL), reticulocitose e trombocitopenia (em alguns casos), o sequestro esplênico pode levar a anemia aguda, choque hipovolêmico e morte (STUART; NAGEL, 2004).

Na anemia falciforme, o hipoesplenismo e autoinfarto esplênico surgem já nos primeiros dois anos de vida, podendo levar ao sequestro esplênico, geralmente nos primeiros cinco anos de vida. Na doença SC o desenvolvimento é mais lento, com apresentações mais tardias. A alta concentração de Hb F é fator protetor (STEINBERG, 2008).

Coortes internacionais evidenciam que a incidência de sequestro esplênico varia de 7-30%. No Brasil, uma coorte realizada em Minas Gerais evidenciou incidência de 10,2 primeiros episódios por 100 pacientes/ano, com recorrência de 57,3% (BELISÁRIO, 2010).

#### 2.2.1.5 Síndrome torácica aguda

A síndrome torácica aguda (STA) é uma causa frequente de internação e a maior causa de óbito em adultos jovens com doença falciforme. É caracterizada por febre, dor torácica, sibilância, tosse e hipóxia. Ao raio X observa-se infiltrado pulmonar novo que acomete pelo menos um segmento completo de pulmão. Fatores de risco incluem genótipo SS, baixas concentrações de Hb F e leucocitose (STUART; NAGEL, 2004).

A STA pode ser precedida de dor torácica em 10-20% dos episódios. Nesses casos, os outros sintomas se estabelecem 24 a 72 horas após a busca por

atendimento, sugerindo que pacientes com dor torácica devam ser monitorados cuidadosamente (STEINBERG, 2008).

Episódios recorrentes predisõem a doença pulmonar crônica, incluindo hipertensão pulmonar (STUART; NAGEL, 2004).

#### 2.2.1.6 Priapismo

Priapismo é uma falha dolorosa da detumescência que pode ser resultado do excesso de descarga de neurotransmissores contráteis, obstrução das vênulas de drenagem, disfunção do mecanismo intrínseco de detumescência ou relaxamento persistente do músculo liso intracavernoso. A apresentação clínica envolve tanto episódios isolados, como um padrão recorrente, geralmente noturno, com episódios mais intensos com menor intervalo. As duas apresentações podem levar a impotência (STUART; NAGEL, 2004).

Ocorre em 40% dos homens com doença falciforme e os episódios podem durar de minutos a várias horas, causando dor excruciante. É um exemplo notável da vasculopatia relacionada à hemólise e pacientes que apresentam priapismo têm maior incidência de acidente vascular encefálico, hipertensão pulmonar, insuficiência renal e úlceras de perna (STEINBERG, 2008).

#### 2.2.1.7 Acidente vascular encefálico

A maior complicação da DF na infância é o acidente vascular encefálico (AVE), causado por estenose e oclusão de grandes vasos. A anemia leva a aumento da velocidade de fluxo cerebral, enquanto as hemácias falcizadas e redução na biodisponibilidade de óxido nítrico lesam o endotélio, causando dano vascular cerebral. Os AVE são mais comuns em pacientes com anemia falciforme (Hb SS), com menor incidência nas doenças falciformes (SC e S-tal $\beta$ ). Eventos subclínicos e infartos silenciosos são ainda mais comuns que os AVE (STEINBERG, 2008).

Em um grande estudo de coorte, a apresentação de um primeiro AVE foi maior entre dois e cinco anos de idade (1,02 casos por 100 pacientes), com incidência decrescente entre os 10-19 anos (0,41 casos por 100 pacientes) (STUART; NAGEL, 2004). Já na idade adulta, é descrito aumento da incidência relacionado a idade (11% aos 20 anos, 15% aos 30 anos, 24% aos 45 anos de idade) (STEINBERG, 2008).

Anormalidades cognitivas são frequentes após um AVE. A prevenção primária é possível através do *screening* por ultrassonografia com *Doppler* transcraniano, seguida por transfusões de troca conforme o risco de AVE (ADAMS *et al.*, 1998).

#### 2.2.1.8 Crise aplástica

Nas anemias hemolíticas crônicas, a parada temporária da eritropoese leva a anemia grave, quadro conhecido como crise aplástica. Apesar de a maioria dos indivíduos apresentar recuperação espontânea em alguns dias, a anemia pode levar à descompensação cardíaca e eventualmente a óbito (se a anemia e reticulocitopenia não forem identificadas e a anemia adequadamente tratada). A infecção pelo parvovírus B19 é responsável pela maioria dos casos (STUART; NAGEL, 2004).

#### 2.2.2 Talassemia alfa

As talassemias apresentam como principal característica o desequilíbrio na síntese de determinado tipo de cadeia de globina, com consequente produção deficiente de hemoglobina. São encontradas em praticamente todos os grupos étnicos e localizações geográficas, sendo frequentes na região do Mediterrâneo, nas regiões equatoriais e subequatoriais da Ásia e África, países do Oriente Médio, além de Índia e Tailândia (WEATHERALL; PROVAN, 2000; FORGET; COHEN, 2005).



Diferentemente da talassemia  $\beta$ , na qual a maioria das alterações se deve a mutações pontuais no gene beta, o principal mecanismo molecular das talassemias alfa consiste em deleções, que removem um ou ambos os genes que codificam as cadeias  $\alpha$  (FORGET; PERSON, 1995). Como essas cadeias são compartilhadas pelas hemoglobinas A, A2 e Fetal, a produção deficiente é refletida em ambas as fases do desenvolvimento. No feto, uma taxa reduzida destas cadeias leva a um excesso na produção de cadeias  $\gamma$ , que se tetramerizam ( $\gamma_4$ ) formando a Hb BART. No adulto, as cadeias beta em excesso se tetramerizam ( $\beta_4$ ) originando a Hb H (WEATHERALL; CLEGG, 2001; FORGET; COHEN, 2005).

Como existem dois genes alfa por genoma haploide, sendo quatro numa célula diploide normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ), as talassemias alfa são classificadas em  $\alpha^+$  ( $-\alpha$ ) e  $\alpha^0$  ( $--$ ), conforme o número de genes comprometidos no cromossomo, levando, respectivamente, à redução parcial ou total da síntese de cadeias  $\alpha$  (KATTAMIS *et al.*, 1996).

A talassemia  $\alpha^0$  resulta de grandes deleções que removem todo ou parte do grupamento gênico alfa e/ou seu elemento regulatório (HS 40), deixando os genes  $\alpha$  sem expressão. Por outro lado, a talassemia  $\alpha^+$  ocorre mais frequentemente devido a deleções menores que removem apenas um desses genes (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

Os diferentes haplótipos talassêmicos alfa podem se combinar formando diferentes genótipos, que variam conforme a quantidade de genes deletados: heterozigose da talassemia  $\alpha^+$  ( $-\alpha/\alpha$ ), com deleção de um gene alfa; talassemias  $\alpha^+$  homozigoto ( $-\alpha/-\alpha$ ), com perda de um gene alfa em cada cromossomo; talassemias  $\alpha^0$  heterozigoto ( $--/\alpha\alpha$ ), com perda de dois genes alfa no mesmo cromossomo; interação  $\alpha^0/\alpha^+$  ( $--/-\alpha$ ), com deleção de três genes alfa e a síndrome da hidropsia fetal por Hb BART, com ausência dos quatro genes  $\alpha$  ( $--/--$ ) (WEATHERALL; PROVAN, 2000) (Figura 6).

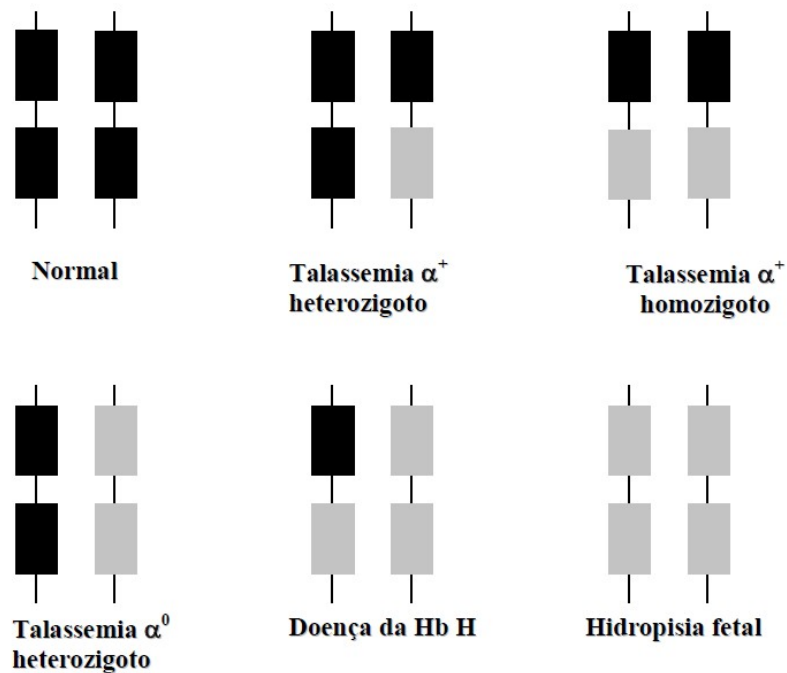


FIGURA 6 - GENÓTIPOS DAS TALASSEMIAS ALFA

FONTA: Modificado pelo autor (2015)

NOTA: Em preto os genes normais e em cinza os genes deletados

A forma mais frequente de talassemias  $\alpha^+$  envolve a deleção de um dos genes alfa duplicados ( $\alpha_1$  ou  $\alpha_2$ ), sendo representadas principalmente pelas deleções  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$  (essa menos frequente na nossa população) (Figura 7) (FORGET; PEARSON, 1995).

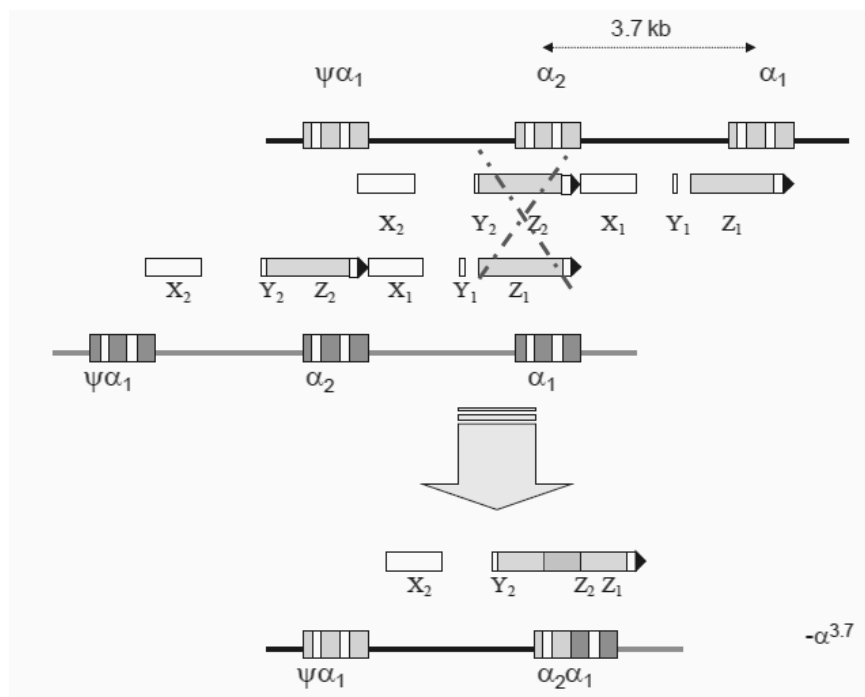


FIGURA 7 - MECANISMO DE RECOMBINAÇÃO DESIGUAL ORIGINANDO A DELEÇÃO ALFA3.7

FONTA: Wang (2003)

Os diversos quadros clínicos e laboratoriais associados à talassemia alfa são resultantes da heterozigose, da homozigose ou da interação das duas principais formas de talassemia alfa ( $\alpha^0$  e  $\alpha^+$ ) (Quadro 4) (BEZERRA, 2009).

TIPOS	GENÓTIPOS	ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS
Talassemia $\alpha^+$ heterozigótica	$-\alpha/\alpha$ ou $\alpha\alpha/\alpha^T\alpha$	1-2% de Hb BART, ao nascimento, com alterações hematológicas mínimas ou ausentes, no adulto.
Talassemia $\alpha^+$ homozigótica	$-\alpha/-\alpha$ ou $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$	5-10% de Hb BART, ao nascimento, com discretas microcitose e hipocromia, no adulto.
Talassemia $\alpha^0$ heterozigótica	$--/\alpha\alpha$	5-15% de Hb BART, ao nascimento, com discretas microcitose e hipocromia, no adulto.
Interação $\alpha^+/\alpha^0$ ou Doença da hemoglobina H	$--/-\alpha$ ou $--/\alpha^T\alpha$	25-50% de Hb BART, ao nascimento e 2-40% de Hb H, na vida adulta. Apresenta hemácias microcíticas e hipocrômicas, anisopoiquilocitose e reticulocitose.
Talassemia $\alpha^0$ homozigótica ou Hidropsia Fetal	$--/--$	Cerca de 80% de Hb BART, traços de Hb H e 10 a 20% de Hb Portland. Condição incompatível com a vida.

QUADRO 4 - ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS DIFERENTES GENÓTIPOS TALASSÊMICOS

FONTE: Modificado pelo autor (2015)

NOTA:  $\alpha^T$  = mutação de ponto, não deleccional.

A heterozigose da talassemia  $\alpha^+$ , também denominada clinicamente de “portador silencioso”, caracteriza-se pela deleção de um único gene  $\alpha$  e apresenta discretas alterações hematológicas, por vezes até mesmo ausentes (WEATHERALL, 2006).

As formas heterozigota da talassemia  $\alpha^0$  ( $--/\alpha\alpha$ ) e homozigota da talassemia  $\alpha^+$  ( $-\alpha/-\alpha$ ) são caracterizadas pela deleção de dois genes da globina alfa. São clinicamente normais, porém apresentam microcitose e hipocromia mais acentuadas

que a forma descrita anteriormente e são denominadas clinicamente por traço de talassemia alfa (WEATHERALL, 2006).

A interação das formas  $\alpha^+$  e  $\alpha^0$  resulta na doença da hemoglobina H, que está associada à deleção de três genes  $\alpha$ . Com apenas um único gene funcional, a síntese das cadeias alfa está fortemente diminuída e com isso são formados tetrâmeros de cadeias  $\beta$  em excesso, que se tornam mais evidentes (Hb H) (WEATHERALL, 2006).

A homozigose da talassemia  $\alpha^0$  (---) corresponde a hidropsia fetal por Hb BART, que tem como consequência a morte intrauterina ou algumas horas após o nascimento (WEATHERALL 2006).

As apresentações clínicas da talassemia alfa são resumidas no Quadro 5.

SÍNDROME	NÚMERO DE GENES DELETADOS	CONCENTRAÇÃO DE HB BART AO NASCIMENTO (%)	APRESENTAÇÃO CLÍNICA
Portador silencioso	1	1-2	Assintomático
Traço de talassemia alfa	2	3-10	Hipocromia e microcitose discreta
Doença da hemoglobina H	3	25	Anemia hemolítica moderada, presença de Hb H
Hidropsia fetal	4	80-100	Morte intrauterina ou logo após o parto

QUADRO 5 - SÍNDROMES CLÍNICAS DA TALASSEMIA ALFA

FONTE: Modificado pelo autor (2015)

### 2.2.3 Associação de alfa talassemia e doença falciforme

A possibilidade da coexistência da talassemia alfa interferir no curso clínico da anemia falciforme vem sendo investigada exaustivamente, pois há evidências de atenuação do quadro clínico na vigência da interação em comparação com a anemia falciforme isoladamente (BELISÁRIO, 2010).

Os efeitos da associação das duas alterações, em comparação com a DF isolada, incluem: aumento do número de hemácias, hematócrito e Hb total; diminuição da contagem de reticulócitos; valores reduzidos de VCM, HCM e CHCM; menor número de leucócitos e menor concentração intraeritrocitária de Hb S (BEZERRA 2009) (Quadro 6).

ÍNDICES HEMATOLÓGICOS	EFEITO DA TALASSEMIA ALFA
Número de hemácias	Aumenta
Hb total	Aumenta
VCM	Reduz
HCM	Reduz
Hematócrito	Aumenta
CHCM	Reduz
Hb F	Provavelmente sem relação
Hb A2	Controverso
Plaquetas	Sem influência
Reticulócitos	Reduz
Células falcêmicas irreversíveis	Reduz
Leucócitos	Controverso
Células densas	Reduz
Taxa de hemólise	Reduz

QUADRO 6 - EFEITOS DA TALASSEMIA ALFA NAS CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DA DOENÇA FALCIFORME  
 FONTE: Modificado pelo autor (2015)

Além desses efeitos nos parâmetros hematológicos, leva a diferentes efeitos na reologia das hemácias, como por exemplo, maior deformabilidade celular, menor quantidade de células irreversivelmente falcizadas e menores graus de desidratação e fragilidade celular. Juntos, esses fatores contribuem para uma polimerização reduzida da desoxihemoglobina S, processo atenuado de falcização dos eritrócitos e menor grau de hemólise. Entretanto, esta associação não é sempre benéfica, uma vez que a viscosidade sanguínea aumentada decorrente das taxas mais elevadas de hemoglobina pode favorecer a interação célula-célula na microvasculatura, levando a episódios de vaso-oclusão (STEINBERG, 1998; BALLAS, 2001; BEZERRA, 2009).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	EFEITO DA TALASSEMIA ALFA
Episódios de dor	Aumento da frequência
AVE	Efeito protetor
<i>Doppler</i> transcraniano alterado	Efeito protetor
Síndrome torácica aguda	Efeito protetor
Sequestro esplênico	Aumento da frequência
Crise aplástica	Efeito protetor
Priapismo	Efeito protetor
Dactilite	Aumento da frequência
Bacteremia	Efeito protetor
Infecções	Sem relação

QUADRO 7 - EFEITOS DA TALASSEMIA ALFA EM EVENTOS CLÍNICOS AGUDOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES

FONTE: Modificado pelo autor (2015)

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 TIPO DE ESTUDO**

Trata-se de estudo observacional, analítico, transversal, com coleta de dados de prontuário retrospectiva e coleta de amostras prospectiva.

#### **3.2 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO**

A coleta das amostras e dados de prontuários foi realizada no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do HC-UFPR, no período de setembro de 2012 a setembro de 2015. A padronização da técnica de PCR e processamento das amostras foi realizado no Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC) no período de setembro de 2012 a dezembro de 2014 e no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Análises Clínicas da UFPR, no período de fevereiro de 2015 a setembro de 2015.

#### **3.3 CASUÍSTICA**

Para o grupo com doença falciforme, foram selecionados pacientes atendidos no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do HC-UFPR, que é o serviço de referência para encaminhamento dos pacientes diagnosticados com doença falciforme na triagem neonatal do estado do Paraná. Ao todo, são 250 pacientes diagnosticados no serviço, de um total de 300 pacientes diagnosticados no Paraná.

Para o grupo controle, foram utilizadas amostras de crianças hígdas, do banco de amostras do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Análises Clínicas da UFPR, coletadas em estudo epidemiológico em escolas de Curitiba.

### 3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos pacientes com DF em acompanhamento regular no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do HC-UFPR, cujos responsáveis concordaram com a participação no estudo e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido.

### 3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo pacientes com dados conflitantes em prontuário, cujas amostras coletadas foram inviáveis para análise ou cujos responsáveis não autorizaram a participação no estudo.

### 3.6 POPULAÇÃO DE ESTUDO E AMOSTRA

Para o grupo de pacientes com doença falciforme, dos 66 pacientes que preencheram os critérios de inclusão no período estudado, 62 fazem parte da população do estudo, pois quatro foram excluídos por inviabilidade da amostra coletada.

Para o grupo controle, foram analisadas 94 amostras de crianças híidas.

### 3.7 AMOSTRA

A amostra foi selecionada por conveniência, sendo inseridos os pacientes em ordem de comparecimento à consulta regular, até que fosse atingido o tamanho de amostra calculada.



### 3.8 VARIÁVEIS DE ESTUDO

As variáveis estudadas foram a presença da deleção alfa<sup>3.7</sup>, quantificação de hemoglobina A<sub>2</sub>, número de hemácias, nível de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), RDW, porcentagem de reticulócitos, número de leucócitos, neutrófilos e plaquetas e a ocorrência de STA, sequestro esplênico, dactilite, AVE, necessidade de internação por infecção ou crise algica nos últimos 12 meses e necessidade de transfusão de concentrado de hemácias nos últimos 12 meses. Foi realizado controle das seguintes variáveis interferentes: idade e sexo.

### 3.9 VALIDADE

O Ambulatório de Hematologia Pediátrica do HC-UFPR recebeu durante anos todos os casos de hemoglobinopatias do estado do Paraná diagnosticadas no Programa de Triagem Neonatal (teste do pezinho), através de convênio firmado com a Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE). A validade externa dos resultados é plausível por tratar-se de uma população de estudo representativa da população de base.

### 3.10 PROCEDIMENTOS

#### 3.10.1 Coleta de amostras

As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do HC – UFPR por técnicos de enfermagem do serviço, em frascos com EDTA, no dia da consulta e como parte da rotina de exames laboratoriais. As amostras foram conservadas em geladeira por até 48 horas e transportadas para o Laboratório de Bioquímica do Departamento de Análises Clínicas da UFPR.

#### 3.10.2 Extração de DNA

A extração de DNA seguiu protocolo, adaptado de Lahini, 1991:

- Os tubos de EDTA foram centrifugados a 3000rpm por 25 minutos, extraído 900µL de “*buffy coat*” e armazenado em tubo tipo *ependorf* de 1,6mL. Sobre o *buffy coat* previamente separado, foram adicionados 900µL de TKM1 contendo Triton X-100 2,5% (ou NP-40 2,5%); homogeneizados em vórtex com agitação vigorosa; centrifugados por 8 minutos a 14.500 rpm; desprezado quase todo o sobrenadante, deixando aproximadamente 1mL.

- Adicionados novamente 900µL de TKM1 contendo Triton X-100 2,5% (ou NP-40 2,5%); homogeneizado em vórtex; centrifugado por 8 minutos a 14.500rpm; desprezado quase todo o sobrenadante, deixando mais ou menos 1mL.

- Completado o volume do tubo com TKM1 (sem Triton X-100 ou NP-40); homogeneizado em vórtex; centrifugado por 8 minutos a 14.500rpm; desprezado todo o sobrenadante.

- Adicionados 900µL de TKM1 (sem Triton X-100 ou NP-40); homogeneizado em vórtex; centrifugado por 8 minutos a 14.500rpm; desprezado o sobrenadante.

- Adicionados 900µL de água ultra-pura para remover o excesso de tampão; homogeneizado em vórtex; centrifugado por 5 minutos a 13.400rpm; desprezado o sobrenadante.

- Adicionados ao sedimento 20µL de SDS 20% (previamente solubilizado em banho-maria) + 120µL de água ultra-pura; homogeneizado em vórtex até dissolver bem o sedimento; incubado em bloco termostático a 65°C por aproximadamente 3 horas; a cada hora a 65°C, homogeneizados os microtubos em vórtex, dado um “*short spin*” na centrifuga e devolvido ao bloco termostático até completa solubilização do material; retirado do aquecimento e deixado atingir a temperatura ambiente (sem refrigeração).

- Adicionados 100µL de NaCl 6M; homogeneizado em vórtex; centrifugado por 10 minutos a 13.400 rpm; transferido o sobrenadante para um novo microtubo de 1,6mL.

- Adicionados 700µL de etanol absoluto gelado; homogeneizado lentamente por inversão; centrifugado por 5 minutos a 13.400rpm; desprezado o sobrenadante.

- Adicionados 700µL de etanol 70% (preparado no dia do uso); homogeneizado lentamente por inversão; centrifugado por 5 minutos a 13.400rpm; desprezado o sobrenadante. Repetido por duas vezes.

- Secado o material a 37°C em bloco termostático por 12 horas.

- Com o material seco, hidratado com 100µL de água ultra-pura estéril; homogeneizado levemente por inversão e deixado 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente.

- Incubado por aproximadamente 3 horas a 65°C. A cada hora a 65°C, homogeneizado levemente por inversão, dado um “*short spin*” na centrifuga e devolvido ao bloco termostático até completa solubilização do material.

- A concentração do DNA extraído foi medida no espectrofotômetro *NanoDrop® 2000*.

- O DNA extraído foi diluído para concentração de 100ng/dL.

### 3.10.3 Reação de PCR

A reação de PCR foi baseada no protocolo de Tan (2010) utilizando-se os *primers* LIS1-F, LIS1-R,  $\alpha$ 2/3.7-F, 3.7/20.5-R,  $\alpha$ 2-R (diluídos em concentração de 10pmol/ $\mu$ L), esperando-se a amplificação dos amplicons: LIS (2350 bp), gene  $\alpha$ 2 (1800bp) e gene mutado  $-\alpha$ 3.7 (2022-2029 bp) (Quadro 8). A identidade dos amplicons foi obtida pela determinação do tamanho do fragmento amplificado. Visto que a deleção alfa3.7 remove parte do gene globina  $\alpha$ 2, sua amplificação, juntamente com a amplificação de um alelo de deleção, indica que a mutação encontra-se em heterozigose. Como controle positivo para o sucesso da amplificação do DNA, foi utilizado um segmento de 2.350 pb, referente à região 3' não transcrita do gene *LIS 1* (fator plaquetário), localizado no cromossomo 17p13.3.

NOME	5' - 3'	GENBANK ID	CONC.	AMPLICON
LIS1-F	ATACCATGGTTACCCCATTGAGC	HSLIS10:510	0.5 $\mu$ M	LIS1 3'UTR (2350 bp)
LIS1-R	AGGGCTCATTACATGTGGACCC	HSLIS10:2859	0.5 $\mu$ M	
$\alpha$ 2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	HUMHBA4:5676	0.2 $\mu$ M	$-\alpha$ 3.7 jxna (2022/2029 bp)
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	HUMHBA4:11514	0.2 $\mu$ M	
$\alpha$ 2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	HUMHBA4:5676	0.2 $\mu$ M	Gene $\alpha$ 2 (1800 bp)
$\alpha$ 2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	HUMHBA4:7475	0.2 $\mu$ M	

QUADRO 8 - SEQUÊNCIA DE *PRIMERS* E TAMANHO DE AMPLICON ESPERADO  
 FONTE: Modificado pelo autor (2015)

As reações de PCR foram realizadas utilizando o Kit comercial Qiagen® *Multiplex PCR*, composto de: “*Master Mix*” (“*HotStarTaq*”® DNA Polimerase, “*Multiplex PCR Buffer*” – com 6mM de MgCl<sub>2</sub> – e dNTP Mix), *Q-Solution* e Água livre de RNase. O Mix foi padronizado para um total de 10 $\mu$ L (Tabela 1).

TABELA 1 - MIX DE PCR PADRONIZADO

REAGENTE (CONCENTRAÇÃO)	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME ( $\mu$ L)
Água livre de RNase		1,4
<i>Primers mix</i> [10 pmol/ $\mu$ L]		
LIS1-F	0,5 $\mu$ M	0,5
LIS1-R	0,5 $\mu$ M	0,5
$\alpha$ 2/3.7-F	0,2 $\mu$ M	0,2
3.7/20.5-R	0,2 $\mu$ M	0,2
$\alpha$ 2-R	0,2 $\mu$ M	0,2
<i>Q solution</i> [5X]	0,5X	1,0
<i>Master Mix</i> [2X]	1X	5,0
Amostra de DNA (100ng/ $\mu$ L)		1,0
Volume final		10,0

FONTE: O autor (2015)

Com relação aos ciclos da PCR, estabeleceu-se: ativação da enzima *hot start* e desnaturação do DNA a 96 C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos de 98 C por 45 segundos para desnaturação do DNA, 60 C durante 90 segundos para anelamento dos iniciadores, 72 C por 135 segundos para a o da DNA polimerase, seguido por uma extensão final de 5 minutos a 72 C.

Para resolu o dos produtos da PCR, 10 $\mu$ L do amplicon, adicionado de 4 $\mu$ L do tampão de corrida *loadingdye* (glicerol, xilenocianol e azul de bromofenol) foram aplicados em gel de agarose 1%. A corrida de eletroforese foi condicionada a 40 volts (23mA) durante 4 horas em cuba (Horizon, 18cm) contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no transiluminador de luz ultravioleta, após imersão do gel de agarose em soluço contendo brometo de etídio (10 $\mu$ g/mL) por 5 minutos, para análise dos fragmentos amplificados. A determina o do genótipo do sujeito da pesquisa foi realizada de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados, quando comparados com o padrão de peso molecular 1000pb (1Kb *ladder DNA marker* 300-10000bp - Axygen Biosciences).

#### 3.10.4 Coleta de dados clínicos e laboratoriais

A coleta dos dados clínicos (idade, sexo, diagnóstico da doença falciforme, ocorrência de: SE, STA, dactilite, AVE, necessidade de internações por infecção e crise álgica nos últimos 12 meses, necessidade de transfusões de concentrado de hemácias nos últimos 12 meses) e laboratoriais (concentração de hemoglobina A2; número de hemácias, nível de hemoglobina, VCM, HCM, RDW, número de leucócitos, neutrófilos, plaquetas e porcentagem de reticulócitos) foi realizada por meio de revisão de prontuários, levando-se em conta o último hemograma e eletrofose de Hb coletadas. Os dados foram registrados em planilha do *software Microsoft® Excel*.

#### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados quantitativos foram expressos como média  $\pm$  1 desvio padrão (DP), ou pela mediana na presença de coeficiente de variação maior que 30%. As prevalências foram expressas pelas porcentagens correspondentes ao item analisado e limites de confiança a 95%.

Para verificar a possível associação dos genótipos de talassemia alfa com aspectos clínicos e hematológicos da doença, os pacientes foram analisados independentemente de acordo com o genótipo, ou seja, SS, SC, S-talassemia  $\beta$ . Cada grupo foi subdividido segundo a ausência ou presença de talassemia alfa.

O estudo estatístico, realizado com *software* "R" compreendeu:

- Análise univariada da associação dos genótipos de DF com níveis de Hb, VCM, HCM, RDW, hemácias, leucócitos, neutrófilos, plaquetas, Hb A2 e porcentagem de reticulócitos (variáveis contínuas), através da comparação das médias de três grupos utilizando a análise de variância (ANOVA One-Way) para variáveis com a distribuição normal e com homocedasticidade, ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para variáveis assimétricas e/ou sem homocedasticidade. Adicionalmente, utilizou-se o teste de Tukey para comparação

de cada par de médias dos diferentes grupos e assim constatar em quais grupos as diferenças ocorriam.

- Confeção de tabelas de frequência.
- Para associação das variáveis descritas acima com a presença ou não de talassemia alfa utilizou-se o teste t de Student ou de Mann-Whitney para as variáveis com distribuição normal ou assimétricas, respectivamente.
- A verificação da distribuição normal ou assimétrica dos valores das variáveis contínuas foi feita utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para verificação do pressuposto de homocedasticidade foi utilizado o teste de homogeneidade da variância.
- Análise univariada da associação dos genótipos de talassemia alfa e DF com a ocorrência ou não de sequestro esplênico, AVE, STA, dactilite, necessidade de transfusão de concentrado de hemácias, internação por infecção ou crise algica (variáveis nominais), utilizando-se o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher quando o valor esperado de alguma célula da tabela de contingência era inferior a 5.

Uma associação foi considerada estatisticamente significativa quando a probabilidade de erro alfa foi igual ou inferior a 0,05. Todo o estudo estatístico foi processado utilizando o programa R.

### 3.11.1 Técnica de amostragem

Para cálculo do tamanho da amostra, foi utilizado o teste de comparação entre duas proporções (LWANGA; LEMESHOW, 1991), considerando-se uma prevalência de talassemia alfa na população em geral de 5,2% (MELO-REIS *et al.*, 2006) e na população com anemia de 32,9% (BEZERRA, 2010), com nível de significância de 5%, poder do teste de 95% e teste de hipótese monocaudal. O tamanho da amostra calculado para cada grupo foi de 42 pacientes. Como o cálculo do tamanho da amostra considerou dados de outras populações (já que não há estudos de prevalência de talassemia alfa na população estudada), pode ter ocorrido erro do tipo 2.

### 3.12 ÉTICA EM PESQUISA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR (Anexo 1). Todos os responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1). Para os pacientes com idade igual ou maior a 12 anos foi aplicado também o Termo de Assentimento (Apêndice 2).

A consulta aos prontuários foi feita de modo a garantir o sigilo das informações pessoais de cada sujeito da pesquisa. Os pesquisadores envolvidos se comprometeram a utilizar o material biológico e os dados coletados exclusivamente para os fins previstos no projeto de pesquisa.

### 3.13 FOMENTO PARA PESQUISA, PROFISSIONAIS E SERVIÇOS ENVOLVIDOS

Os insumos para padronização da técnica de PCR e execução das análises moleculares foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Bioquímica da UFPR e pelo CEGEMPAC. O material para coleta das amostras foi fornecido pelo HC-UFPR. Os kits de PCR para análise das amostras foram pagos pelo autor.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No grupo dos pacientes com DF, das 62 crianças, 30 (48%) eram do sexo masculino e 32 (52%) do sexo feminino. A idade dos pacientes com DF variou de 0 a 16 anos (mediana de 7 anos).

As Tabelas 2 e 3 resumem a caracterização da amostra quanto ao sexo e idade, estratificada segundo o genótipo da DF e presença ou não de talassemia alfa.

Em 30 pacientes o genótipo da DF foi SS, em 22 pacientes foi SC e em 10 pacientes foi S $\beta$ . Em três pacientes a talassemia alfa foi associada ao genótipo SS, em dois ao SC e em um ao S $\beta$ .

TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES QUANTO AO SEXO E IDADE ESTRATIFICADOS POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME

GRUPOS	SEXO	N(%)	MEDIANA DA IDADE(ANOS)	AV
Genótipo SS	M	16 (53)	8,7	1,4-13,2
	F	14 (47)	5,4	0,8-14
	Total	30	7,6	0,8-13,2
Genótipo SC	M	9 (40)	7,9	1,0-16,5
	F	13 (60)	7,0	0,6-13,5
	Total	22	7,1	0,6-16,5
Genótipo S $\beta$	M	5 (50)	4,1	0,8-13,2
	F	5 (50)	9,7	0,8-16,5
	Total	10	8,1	0,8-16,5

FONTE: O autor (2015)

NOTA: AV: Amplitude de variação

TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME QUANTO AO SEXO E IDADE NA PRESENÇA OU NÃO DE TALASSEMIA ALFA

GRUPOS	SEXO	N(%)	MEDIANA DA IDADE (ANOS)	AV
Talassemia alfa presente	M	3 (50)	1,6	0,8-8,4
	F	3 (50)	5,5	1,3-12,1
	Total	6	3,5	0,8-12,1
Talassemia alfa ausente	M	27 (48)	8,7	1,0-16,5
	F	29 (52)	7,0	0,6-16,5
	Total	56	7,6	0,6-16,5

FONTE: O autor (2015)

NOTA: AV: Amplitude de variação

Já no grupo controle, das 94 crianças, 45 (48%) eram do sexo masculino e 49 (52%) do sexo feminino. A idade variou entre 6 e 14 anos (mediana de 10 anos). A Tabela 4 resume a caracterização das crianças do grupo controle quanto ao sexo e idade, estratificada segundo a presença ou não de talassemia alfa.

TABELA 4 - CARACTERIZAÇÃO DAS CRIANÇAS DO GRUPO CONTROLE QUANTO AO SEXO E IDADE NA PRESENÇA OU NÃO DE TALASSEMIA ALFA

GRUPOS	SEXO	N(%)	MEDIANA DA IDADE (ANOS)	AV
Talassemia alfa presente	M	2	9,5	9,0-10,0
	F	1	8,0	8,0-8,0
	Total	3	9,0	8,0-10,0
Talassemia alfa ausente	M	43	10,0	6,0-11,0
	F	48	10,0	7,0-14,0
	Total	91	10,0	6,0-14,0

FONTE: O autor (2015)

NOTA: AV: Amplitude de variação

## 4.2 ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE DOENÇA FALCIFORME COM PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A Tabela 5 resume os parâmetros hematológicos estratificados por genótipo de DF.

TABELA 5 - PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ESTRATIFICADOS POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME

PARÂMETRO	GENÓTIPO	MÉDIA ± DP	MEDIANA	AV	p
Eritrócitos (milhões/mm <sup>3</sup> )	SS	2,7 ± 0,5	2,6	1,8-4,2	< 0,001 <sup>1</sup>
	SC	4,2 ± 0,7	4,2	3,1-6,1	
	Sβ	4,7 ± 0,8	4,9	2,9-5,4	
Hemoglobina (g/dL)	SS	8,2 ± 1,1	8,1	6,8-10,6	< 0,001 <sup>1</sup>
	SC	10,8 ± 0,8	10,8	9,5-12,9	
	Sβ	10,5 ± 2,2	10,7	6,8-13,5	
VCM (fL)	SS	87,8 ± 9,6	86,5	67,2-107,1	< 0,001 <sup>1</sup>
	SC	72,1 ± 10,2	69,4	45,7-92,9	
	Sβ	65,2 ± 5,7	66,3	55,5-73,3	
HCM (pg)	SS	30,7 ± 4,1	30,4	23,0-39,9	< 0,001 <sup>1</sup>
	SC	26,1 ± 3,7	25,7	15,5-34,0	
	Sβ	22,3 ± 2,2	22,8	19,4-26,2	
RDW (%)	SS	20,6 ± 3,2	20,6	15,8-29,3	< 0,001 <sup>1</sup>
	SC	17,0 ± 1,9	16,9	13,9-20,4	
	Sβ	18,0 ± 3,2	16,1	14,4-23,1	
Leucócitos (células/mm <sup>3</sup> )	SS	13.140 ± 4.668	12.335	6.860-30.140	< 0,05 <sup>2</sup>
	SC	10.542 ± 3.091	10.520	4.090-19.130	
	Sβ	9.541 ± 2.837	8.695	5.320-14.330	
Neutrófilos (células/mm <sup>3</sup> )	SS	5.515 ± 2.468	5.327	1.415-10.730	0,33 <sup>2</sup>
	SC	5.344 ± 2.210	5.273	1.528-10.410	
	Sβ	4.503 ± 2.740	3.489	1.690-11.320	
Plaquetas (células/mm <sup>3</sup> )	SS	414.733 ± 64.019	398.000	95.000-887.000	< 0,05 <sup>2</sup>
	SC	337.772 ± 161.871	327.500	136.000-762.000	
	Sβ	258.700 ± 179.057	243.500	175.000-375.000	
Reticulócitos (%)	SS	15,3 ± 7,7	14,0	3,4-34,6	< 0,001 <sup>2</sup>
	SC	3,8 ± 1,5	3,6	1,2-6,5	
	Sβ	4,9 ± 7,1	1,8	1,0-22,3	

FONTE: O autor (2015)

NOTA: AV: Amplitude de variação; DP: Desvio padrão; <sup>1</sup>ANOVA one way; <sup>2</sup>Kruskal-Wallis

Quando analisados os genótipos de DF dois a dois, o número de eritrócitos e a concentração de hemoglobina foram mais baixos nos pacientes com anemia

falciforme, enquanto VMC, HCM, RDW, número de leucócitos e plaquetas e porcentagem de reticulócitos foram mais altos no genótipo SS. Não houve diferença entre os grupos SC-S $\beta$  (Figuras 8 a 15).

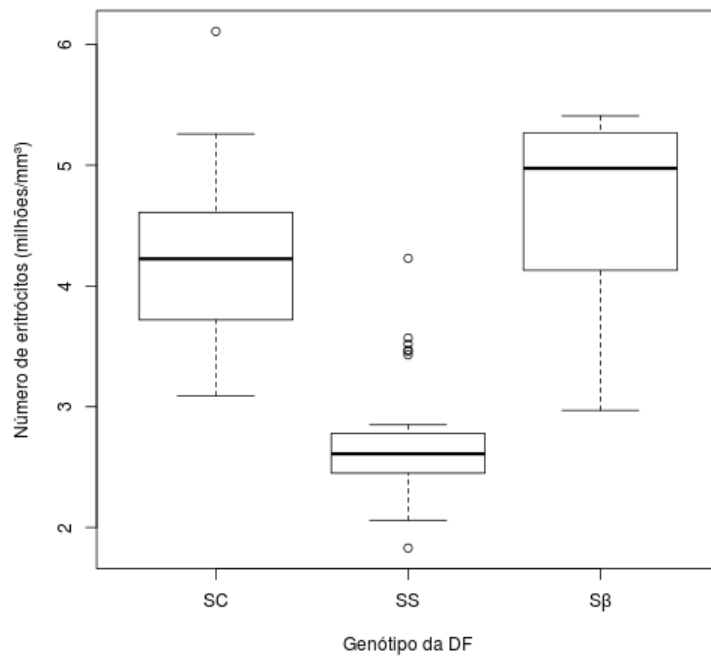


FIGURA 8 - NÚMERO DE ERITRÓCITOS ESTRATIFICADO POR GENÓTIPO DA DOENÇA FALCIFORME

FONTE: O autor (2015)

NOTA:  $p < 0,001$  (ANOVA *one way*).

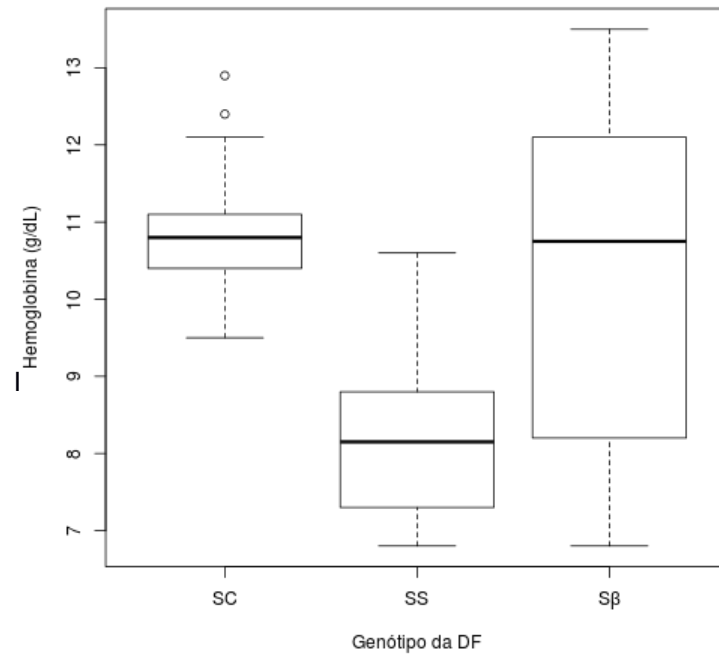


FIGURA 9 - CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA ESTRATIFICADA POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME

FONTE: O autor (2015)

NOTA:  $p < 0,001$  (ANOVA *one way*).

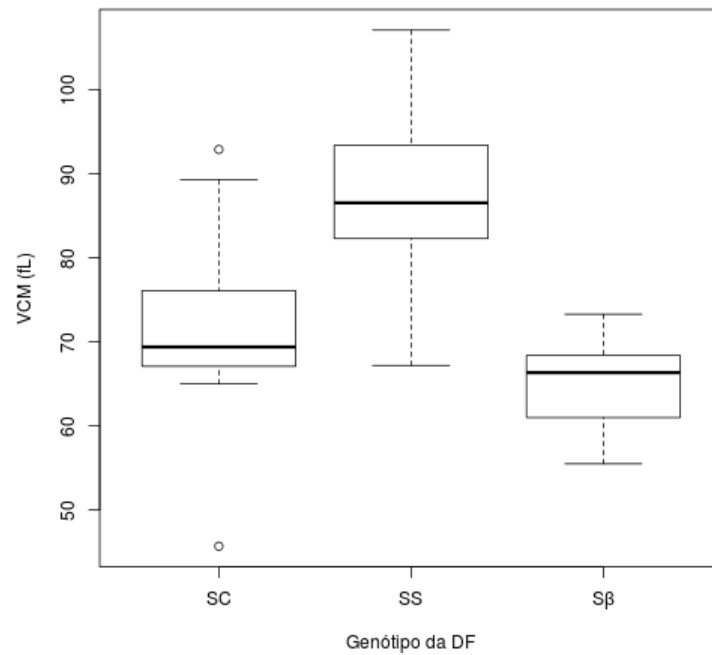


FIGURA 10 - VCM ESTRATIFICADO POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME

FONTE: O autor (2015)

NOTA:  $p < 0,001$  (ANOVA *one way*).

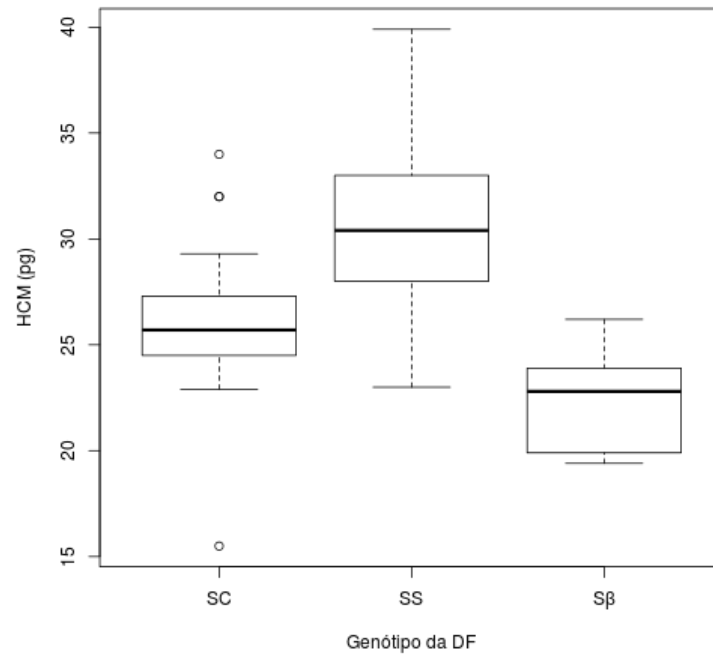


FIGURA 11 - HCM ESTRATIFICADA POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME

FONTE: O autor (2015)

NOTA:  $p < 0,001$  (ANOVA *one way*).

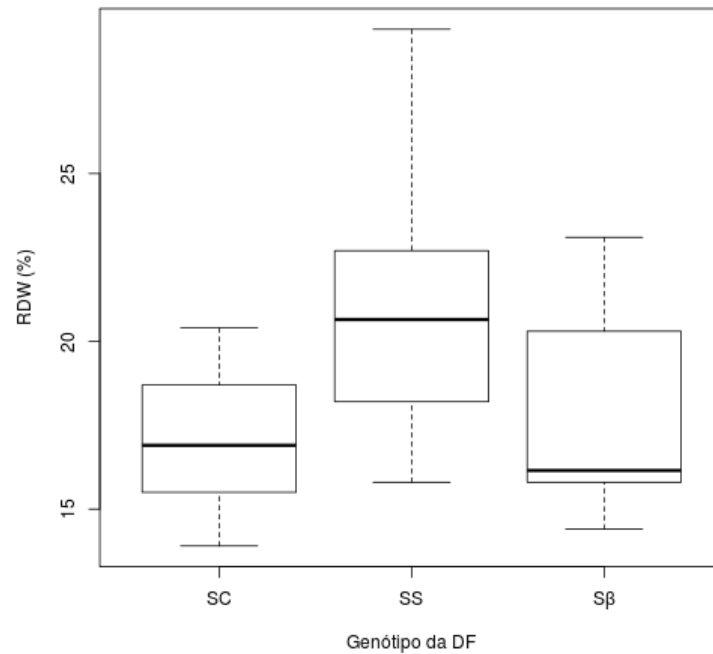


FIGURA 12 - RDW ESTRATIFICADO POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME

FONTE: O autor (2015)

NOTA:  $p < 0,001$  (ANOVA *one way*).

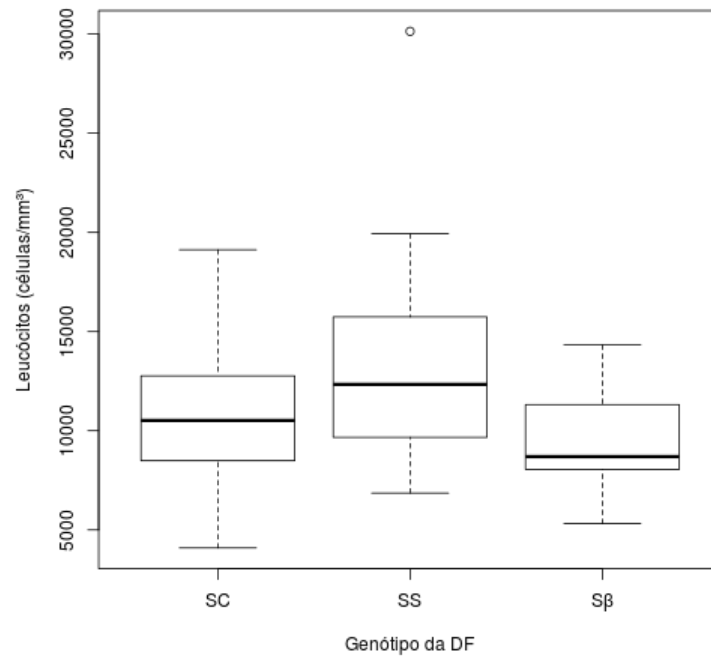


FIGURA 13 - NÚMERO DE LEUCÓCITOS ESTRATIFICADO POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME

FONTE: O autor (2015)

NOTA:  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis).

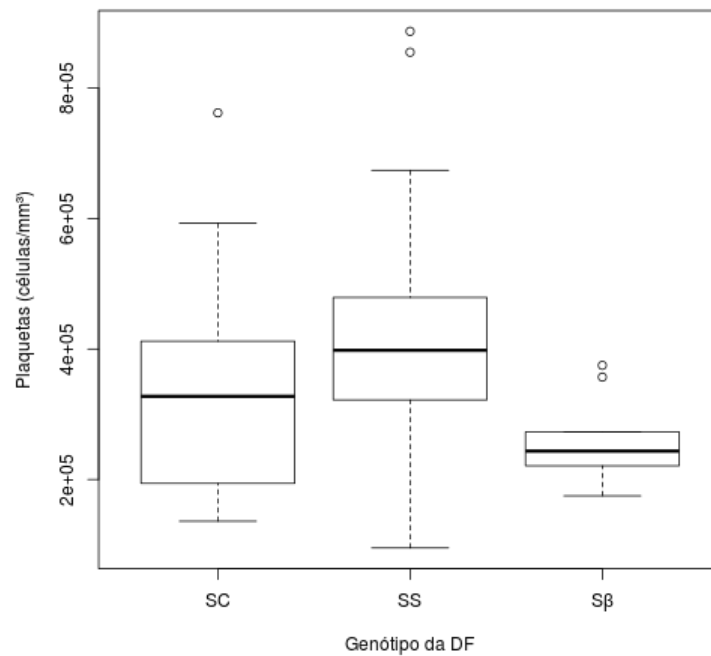


FIGURA 14 - NÚMERO DE PLAQUETAS ESTRATIFICADO POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME

FONTE: O autor (2015)

NOTA:  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis).

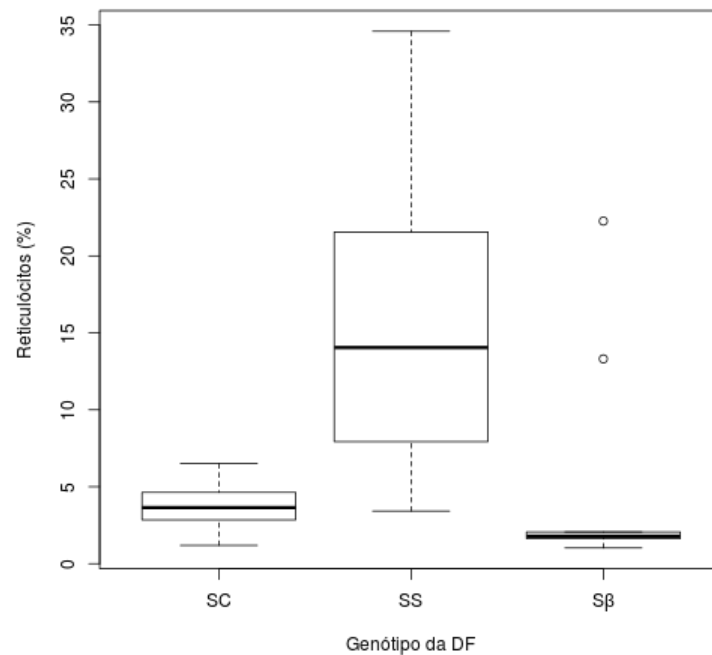


FIGURA 15 - PORCENTAGEM DE RETICULÓCITOS ESTRATIFICADA POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME

FONTE: O autor (2015)

NOTA:  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis).

Em relação à porcentagem de Hb A2, o valor de Hb A2 foi maior no grupo Sβ quando comparado com os grupos SS ( $p < 0,001$ ) e SC ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença entre os grupos SS-SC (Tabela 6) (Figura 16).

TABELA 6 - HB A2 ESTRATIFICADA POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME

HEMOGLOBINA	GENÓTIPO	MÉDIA ± DP	MEDIANA	AV	$p$
A2 (%)	SS	2,6 ± 0,7	2,6	1,1 – 3,4	< 0,001 <sup>1</sup>
	SC	2,1 ± 1,8	3,0	0 – 4,3	
	Sβ	4,5 ± 0,5	4,6	3,7 – 5,3	

FONTE: O autor (2015)

NOTA: AV: Amplitude de variação; <sup>1</sup> Kruskal-Wallis



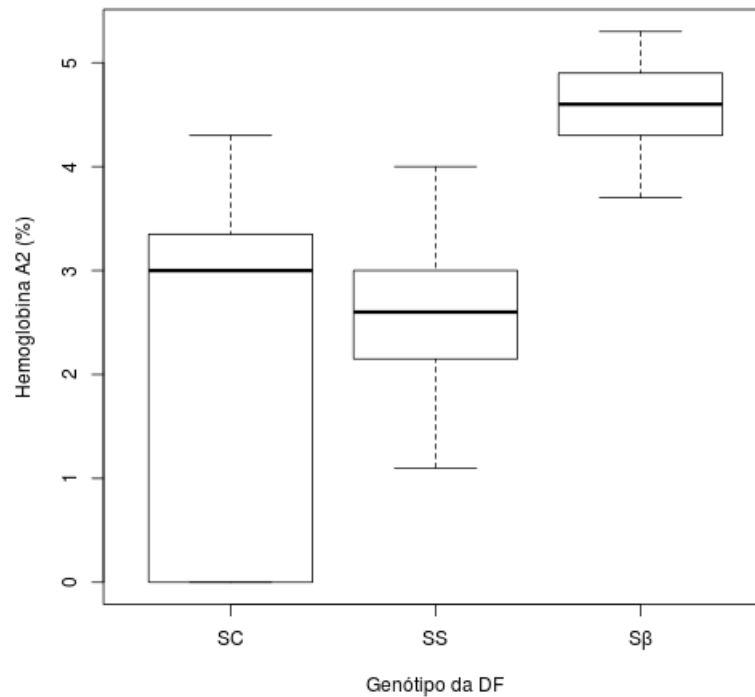


FIGURA 16 - PORCENTAGEM DE HEMOGLOBINA A2 ESTRATIFICADA POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME

FONTE: O autor (2015)

NOTA:  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis).

Três dos 62 pacientes (4,8%) apresentaram algum episódio de acidente vascular encefálico (AVE), 13 (21%) dactilite, 10 (16,1%) sequestro esplênico (SE) e 9 (14,5%) pelo menos um episódio de síndrome torácica aguda (STA). Quando comparados os grupos segundo os genótipos de DF, os pacientes com genótipo SS apresentaram mais episódios de dactilite que os do grupo SC ( $p < 0,01$ ) (Tabela 7).

O número de pacientes com genótipo SS que precisaram receber transfusões de concentrado de hemácias nos últimos 12 meses foi significativamente maior, quando comparado com o genótipo SC ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença quando comparados os grupos SC-Sβ (Tabela 7).

TABELA 7 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ESTRATIFICADAS POR GENÓTIPO DE DOENÇA FALCIFORME

MANIFESTAÇÃO CLÍNICA	GENÓTIPO	n (% <sup>1</sup> )
Acidente vascular encefálico	SS	2 (6,7)
	SC	1 (4,5)
	Sβ	0
Dactilite	SS	11 (36,7) <sup>2,3</sup>
	SC	1 (4,5) <sup>2,3</sup>
	Sβ	1 (10) <sup>2</sup>
Sequestro esplênico	SS	7 (23,3)
	SC	3 (13,6)
	Sβ	0
Síndrome torácica aguda	SS	7 (23,3)
	SC	1 (4,5)
	Sβ	1 (10)
Internação por infecção <sup>5</sup>	SS	11 (36,7)
	SC	6 (27,3)
	Sβ	1 (10)
Internação por crise álgica <sup>5</sup>	SS	4 (13,3)
	SC	4 (18,2)
	Sβ	0
Transusão de concentrado de hemácias <sup>5</sup>	SS	8 (26,7) <sup>4</sup>
	SC	0 <sup>4</sup>
	Sβ	0

FONTE: O autor (2015)

NOTA: <sup>1</sup>Porcentagem em relação ao total de pacientes do genótipo de DF; <sup>2</sup>p < 0,01 (Qui-quadrado de Pearson); <sup>3</sup>p < 0,001 (Teste exato de Fisher); <sup>4</sup>p < 0,001 (Teste exato de Fisher); <sup>5</sup> Pacientes que apresentaram eventos nos últimos 12 meses

#### 4.3 DIAGNÓSTICO E PREVALÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA

As amostras dos 62 pacientes com diagnóstico de DF e das 94 crianças híginas (controle) foram submetidas à investigação da deleção alfa3.7 através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional. Exemplos dos resultados obtidos após eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR investigados para essa deleção podem ser observados na Figura 17 (homozigose para talassemia alfa) e na Figura 18 (heterozigose para talassemia alfa).

A talassemia alfa (deleção alfa3.7) foi detectada em seis indivíduos do grupo com DF, representando uma prevalência de 9,67% (Figura 19), sendo cinco (8%) heterozigotos e um (1,6%) homozigoto para a deleção (Tabela 8). A frequência do alelo -alfa3.7 na amostra de pacientes com DF foi de 0,056 (sete em 124 cromossomos).

No grupo controle, a talassemia alfa (deleção alfa3.7) foi detectada em três indivíduos, todos heterozigotos (Tabela 8), representando uma prevalência de 3,19% (Figura 19). A frequência do alelo -alfa3.7 na amostra de crianças híginas foi de 0,015 (três em 188 cromossomos).

TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS OBSERVADAS A PARTIR DA ANÁLISE DE DNA

GENÓTIPO	FREQUÊNCIA NO GRUPO DOENÇA	FREQUÊNCIA NO GRUPO
	FALCIFORME (%)	CONTROLE (%)
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	56 (90,3) <sup>1</sup>	91 (96,81) <sup>1</sup>
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	5 (8,06) <sup>1</sup>	3 (3,19) <sup>1</sup>
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	1 (1,61) <sup>1</sup>	0 <sup>1</sup>
Total	62 (100)	94 (100)

FONTE: O autor (2015)

NOTA: <sup>1</sup>p=0,17 (Qui-quadrado de Pearson com correção de Yates)

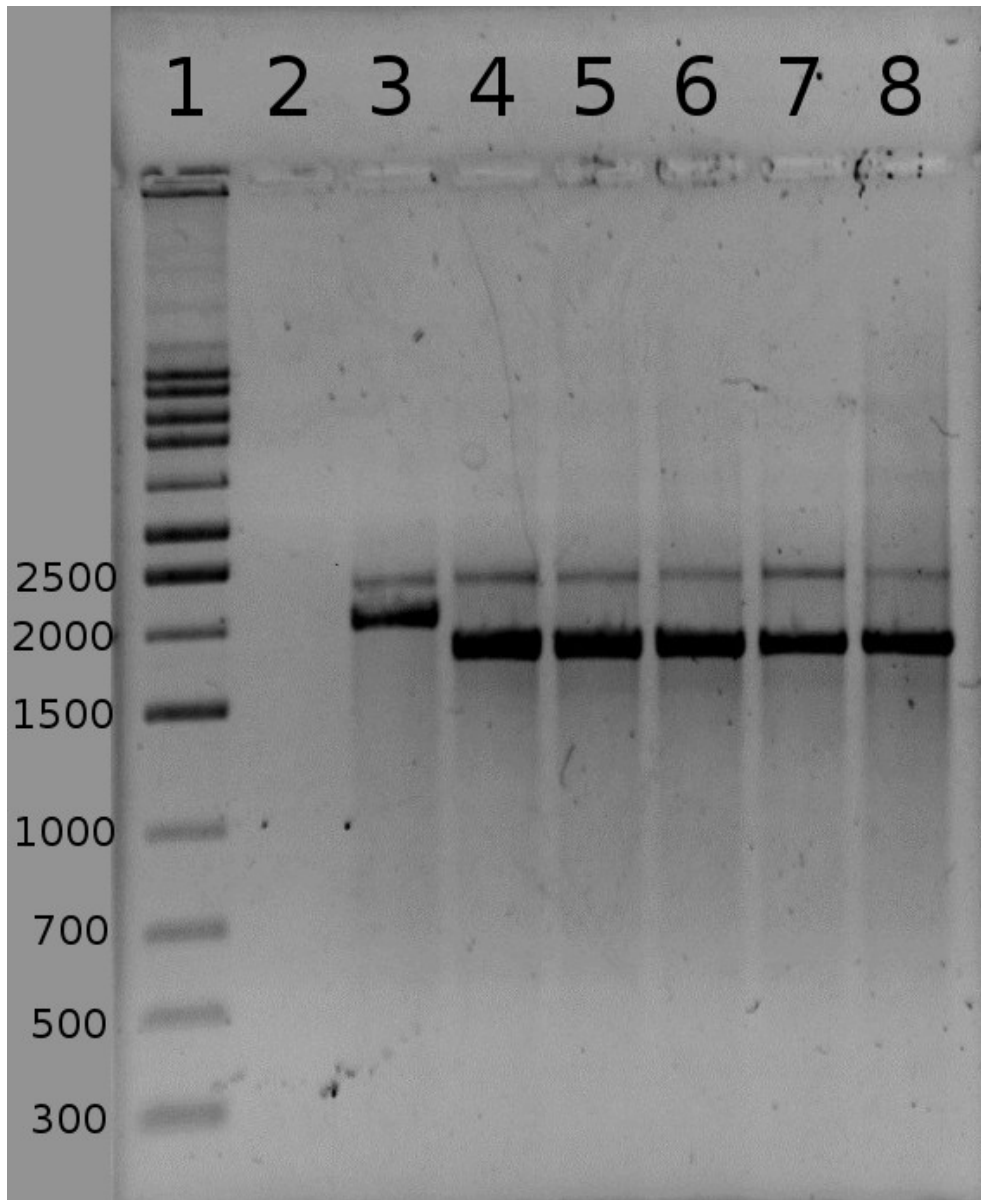


FIGURA 17 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR AMPLIFICADOS

FONTE: O autor (2015)

NOTA: 1: Marcador de massa

2: Branco

3: Amostra com homozigose da deleção alfa3.7. Banda LIS (controle interno – 2350 Pb) + banda com deleção alfa3.7 (2022 - 2029 pb)

4-8: Amostras sem deleção alfa3.7. Banda LIS (controle interno – 2350 pB) + banda do gene da globina alfa sem deleção alfa3.7 (1800 pB)

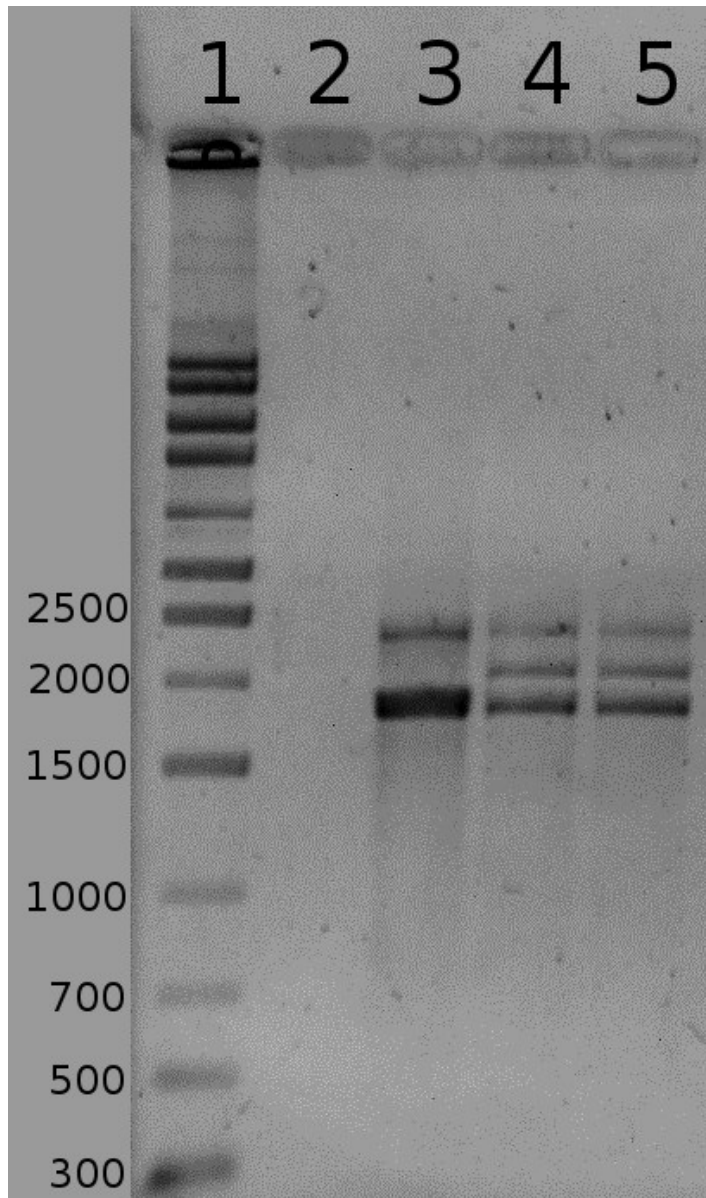


FIGURA 18 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR AMPLIFICADOS

FONTE: O autor (2015)

NOTA: 1: Marcador de massa

2: Banco

3: Amostra sem deleção alfa3.7. Banda LIS (controle interno – 2350 pb) + banda do gene da globina alfa sem deleção alfa3.7 (1800 pb)

4 e 5: Amostras com heterozigose da deleção alfa3.7. Banda LIS (controle interno – 2350 pb) + banda com deleção alfa3.7 (2022 – 2029 pb) + banda do gene da globina alfa sem deleção alfa3.7 (1800 pb)

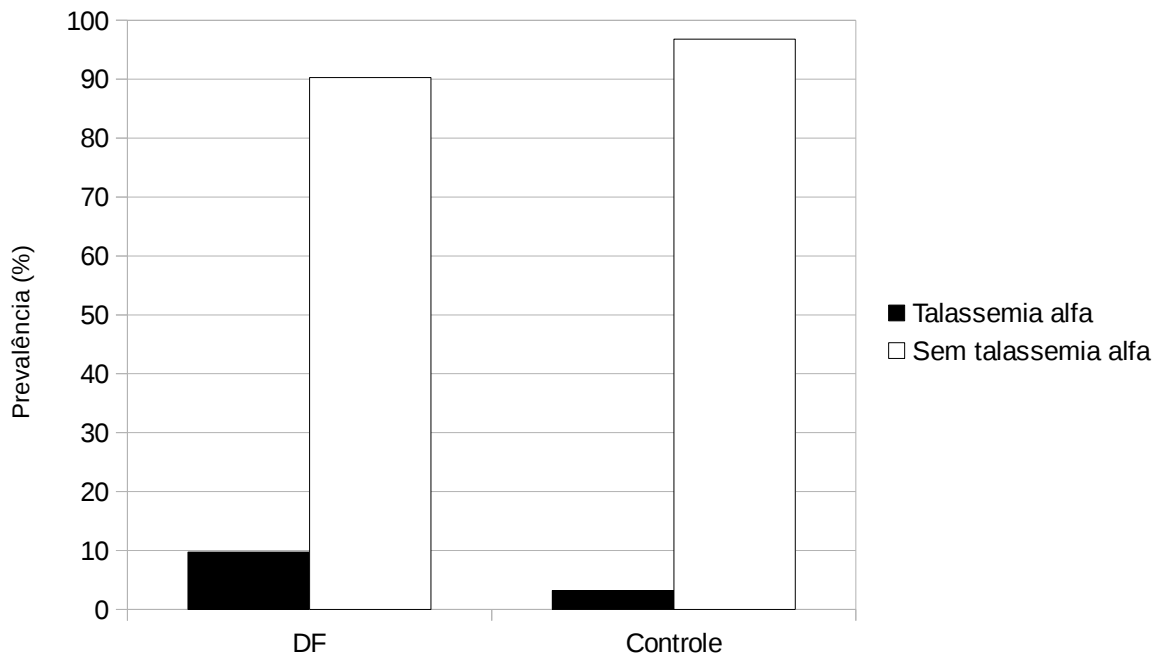


FIGURA 19 - PREVALÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA POR GRUPO

FONTE: O Autor (2015)

NOTA:  $p = 0,17$  (Teste exato de Fisher); DF = Doença Falciforme

#### 4.4 ASSOCIAÇÃO DE TALASSEMIA ALFA COM PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A Tabela 9 resume os parâmetros hematológicos estratificados por presença ou não de talassemia alfa. Não houve diferença entre os grupos em relação aos parâmetros hematológicos, incluindo a porcentagem de Hb A2.

A presença de talassemia alfa não influenciou na ocorrência de AVE, dactilite, SE e STA, e também não alterou a necessidade de internação por infecção, crises algica ou transfusões de concentrado de hemácias (Tabela 10).

Quando analisados somente os pacientes com um determinado genótipo de DF (SS, SC ou S $\beta$ ), a presença de talassemia alfa também não alterou as manifestações clínicas. Já em relação aos parâmetros hematológicos, nos pacientes com genótipo SS (Tabela 11), o nível de Hb A2 foi estatisticamente maior nos casos de associação com talassemia alfa ( $p < 0,05$ ) (Figura 20). Nos pacientes com genótipo SC, o RDW foi estatisticamente mais alto nos pacientes com talassemia alfa ( $p < 0,05$ ) (Figura 21).

TABELA 9 - PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ESTRATIFICADOS PELA PRESENÇA DE TALASSEMIA ALFA

PARÂMETRO	TAL- $\alpha$	MÉDIA $\pm$ DP	MEDIANA	AV	$p$
Eritrócitos (milhões/mm <sup>3</sup> )	Sim	3,82 $\pm$ 1,40	3,42	2,58-6,11	0,65 <sup>1</sup>
	Não	3,55 $\pm$ 1,01	3,49	1,83-5,41	
Hemoglobina (g/dL)	Sim	8,36 $\pm$ 1,50	7,95	6,90-10,80	0,09 <sup>1</sup>
	Não	9,63 $\pm$ 1,77	10,00	6,80-13,50	
VCM (fL)	Sim	68,80 $\pm$ 16,24	67,95	45,70-91,90	0,16 <sup>1</sup>
	Não	79,65 $\pm$ 12,42	78,75	55,50-107,10	
HCM (pg)	Sim	23,28 $\pm$ 5,33	23,55	15,50-31,00	0,07 <sup>1</sup>
	Não	28,17 $\pm$ 4,60	27,40	19,40-39,90	
RDW (%)	Sim	21,73 $\pm$ 4,59	20,00	16,80-29,30	0,15 <sup>1</sup>
	Não	18,60 $\pm$ 2,93	18,05	13,90-25,10	
Leucócitos (células/mm <sup>3</sup> )	Sim	11.838 $\pm$ 3.542	11.545	8.430-17.890	0,85 <sup>2</sup>
	Não	11.616 $\pm$ 4.221	11.116	4.090-30.140	
Neutrófilos (células/mm <sup>3</sup> )	Sim	6.007 $\pm$ 3.074	4.820	3.006-10.730	0,65 <sup>2</sup>
	Não	5.214 $\pm$ 2.350	5.125	1.415-11.320	
Plaquetas (células/mm <sup>3</sup> )	Sim	277.333 $\pm$ 132.982	303.500	95.000-412.000	0,28 <sup>2</sup>
	Não	371.357 $\pm$ 169.685	346.000	136.000-887.000	
Reticulócitos (%)	Sim	7,51 $\pm$ 8,01	4,24	1,19-21,55	0,31 <sup>2</sup>
	Não	9,78 $\pm$ 8,36	6,69	1,02-34,59	
Hb A2 (%)	Sim	3,60 $\pm$ 0,87	3,2	3,0-4,6	0,27 <sup>2</sup>
	Não	2,88 $\pm$ 1,31	3,0	0,0-5,3	

FONTE: O autor (2015)

NOTA: AV: Amplitude de variação; <sup>1</sup>Teste T de Student; <sup>2</sup> Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney

TABELA 10 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ESTRATIFICADAS PELA PRESENÇA DE TALASSEMIA ALFA

MANIFESTAÇÃO CLÍNICA	TAL- $\alpha$	n (% <sup>1</sup> )
Acidente vascular encefálico	Sim	0 (0)
	Não	3 (5,4)
Dactilite	Sim	2 (33,3)
	Não	11 (19,6)
Sequestro esplênico	Sim	2 (33,3)
	Não	8 (14,3)
Síndrome torácica aguda	Sim	0 (0)
	Não	9 (16,1)
Internação por infecção <sup>2</sup>	Sim	1 (16,7)
	Não	17 (30,4)
Internação por crise álgica <sup>2</sup>	Sim	1 (16,7)
	Não	7 (12,5)
Transfusão de concentrado de hemácias <sup>2</sup>	Sim	1 (16,7)
	Não	7 (12,5)

FONTE: O autor (2015)

NOTA: CH: Concentrado de Hemácias; <sup>1</sup>Porcentagens em relação ao total de casos com (6) ou sem (56) talassemia alfa; <sup>2</sup> Pacientes que apresentaram eventos nos últimos 12 meses



TABELA 11 - PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS NO GRUPO DE PACIENTES COM GENÓTIPO SS, ESTRATIFICADOS PELA PRESENÇA DE TALASSEMIA ALFA

PARÂMETRO	TAL- $\alpha$	MÉDIA $\pm$ DP	MEDIANA	AV	p
Eritrócitos (milhões/mm <sup>3</sup> )	Sim	2,7 $\pm$ 0,1	2,7	2,6-2,8	0,90 <sup>1</sup>
	Não	2,7 $\pm$ 0,5	2,6	1,8-4,2	
Hemoglobina (g/dL)	Sim	7,3 $\pm$ 0,6	7,1	6,9-8,0	0,07 <sup>1</sup>
	Não	8,3 $\pm$ 1,1	8,2	6,8-10,6	
VCM (fL)	Sim	81,0 $\pm$ 10,5	80,4	70,9-91,9	0,33 <sup>1</sup>
	Não	88,6 $\pm$ 9,4	87,2	67,2-107,1	
HCM (pg)	Sim	27,2 $\pm$ 3,5	26,3	24,2-31,0	0,17 <sup>1</sup>
	Não	31,1 $\pm$ 4,0	30,5	23,0-39,9	
RDW (%)	Sim	23,7 $\pm$ 6,4	25,1	16,8-29,3	0,44 <sup>1</sup>
	Não	20,2 $\pm$ 2,7	20,5	15,8-25,1	
Leucócitos (células/mm <sup>3</sup> )	Sim	13.116 $\pm$ 4.730	13.030	8.430-17.890	0,99 <sup>1</sup>
	Não	13.142 $\pm$ 4.752	12.160	6.860-30.140	
Neutrófilos (células/mm <sup>3</sup> )	Sim	6.695 $\pm$ 3.587	5.473	3.878-10.730	0,55 <sup>2</sup>
	Não	5.384 $\pm$ 2.372	5.182	1.415-9.343	
Plaquetas (células/mm <sup>3</sup> )	Sim	278.000 $\pm$ 162.410	334.000	95.000-405.000	0,25 <sup>2</sup>
	Não	429.925 $\pm$ 177.017	400.000	158.000-887.000	
Reticulócitos (%)	Sim	13,3 $\pm$ 7,8	12,2	6,0-21,5	0,55 <sup>2</sup>
	Não	15,6 $\pm$ 7,8	14,7	3,4-34,6	
Hb A2 (%)	Sim	3,1 $\pm$ 0,1	3,1	3,0-3,2	<0,05 <sup>1</sup>
	Não	2,6 $\pm$ 0,7	2,6	1,1-3,4	

FONTE: O autor (2015)

NOTA: AV: Amplitude de variação; <sup>1</sup> Teste t de Student; <sup>2</sup> Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney; n=30

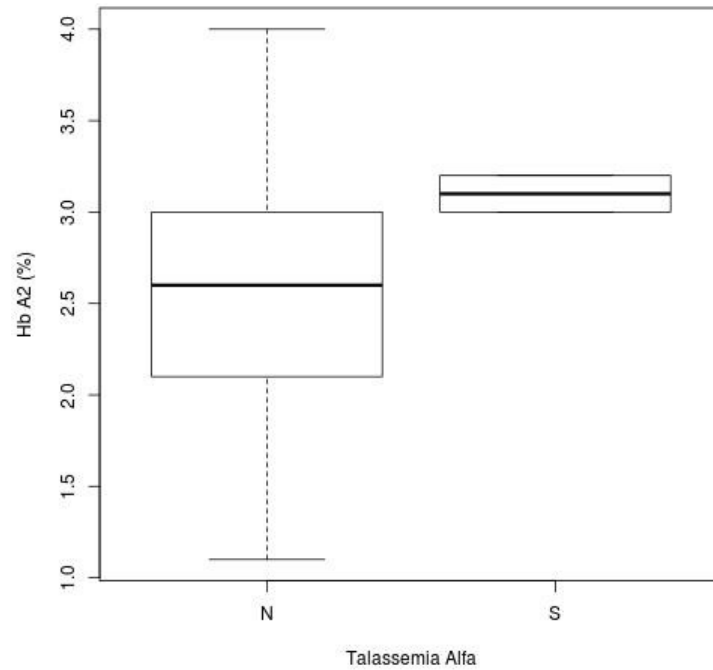


FIGURA 20 - INFLUÊNCIA DA TALASSEMIA ALFA NA CONCENTRAÇÃO DE HB A2 EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

FONTE: O autor (2015)

NOTA:  $p < 0,05$  (Teste t de Student). Tendência central: Média.  
 Box: desvio padrão. N: pacientes sem talassemia alfa;  
 S: pacientes com talassemia alfa

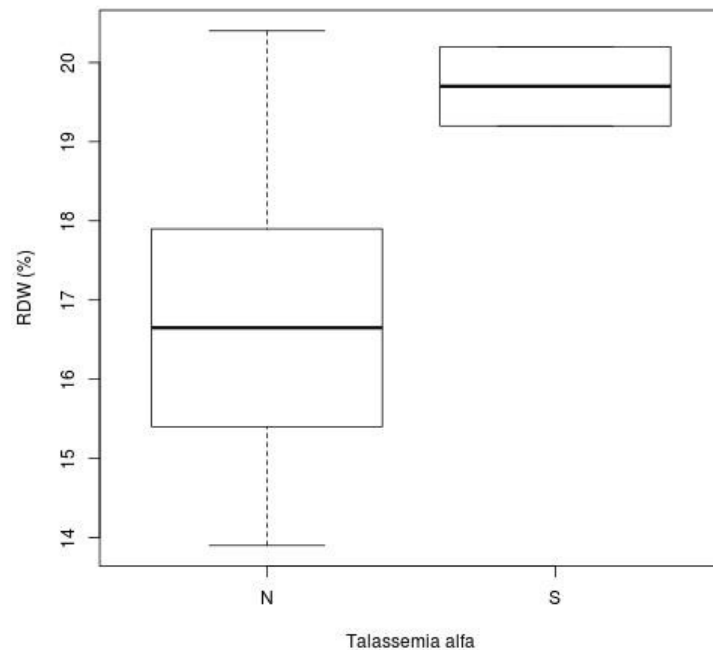


FIGURA 21 - INFLUÊNCIA DA TALASSEMIA ALFA NO RDW EM PACIENTES COM DOENÇA SC

FONTE: O autor (2015)

NOTA:  $p < 0,05$  (Teste t de Student). Tendência central: Média.  
 Box: desvio padrão. N: pacientes sem talassemia alfa;  
 S: pacientes com talassemia alfa

## 5 DISCUSSÃO

O principal objetivo do presente trabalho foi verificar a prevalência de Tal- $\alpha$  nos pacientes com DF. A hipótese de que a prevalência de Tal- $\alpha$  nesse grupo seria maior que a da população em geral é baseada em vários fatores:

- primeiro, pela alta prevalência da Tal- $\alpha$  em determinadas populações. Estudos populacionais americanos relatam uma prevalência de 25% de heterozigose para talassemia alfa em negros assintomáticos (LUKENS, 2003). Um estudo brasileiro em pacientes com microcitose, sem diagnóstico, descreve uma prevalência de Tal- $\alpha$  de 32,9% (45,7% nos pacientes de raça negra) (BEZERRA, 2009);

- segundo, pela herança étnica do sul do Brasil. Enquanto a prevalência de DF é maior entre os afrodescendentes, é nos povos mediterrâneos e asiáticos que estão as maiores prevalências de Tal- $\alpha$ . O Brasil – e nesse aspecto a região Sul em particular – promoveu a miscigenação desses povos pelas imigrações africanas, europeias e asiáticas ao longo da história;

- terceiro, pela dificuldade diagnóstica da Tal- $\alpha$ . Enquanto as doenças falciformes podem ser diagnosticadas pela eletroforese de hemoglobina (com identificação das variantes de hemoglobina), a heterozigose da Tal- $\alpha$  apresenta pouca ou nenhuma alteração tanto nos parâmetros hematológicos, como nas manifestações clínicas. Pequenas alterações nos índices hematimétricos, por exemplo, passam facilmente despercebidos diante das várias alterações que as DF promovem. Os testes moleculares são o padrão ouro para diagnóstico porém têm custo muito alto para serem realizados em população assintomática.

### 5.1 AMOSTRA

Em várias províncias do Brasil, nos anos 1800, a política imigratória visava o preenchimento de vagas deixadas pelos ex-escravos nas grandes fazendas de café. Entretanto no Paraná, desde a emancipação da província, em 1853, o estímulo

migratório se deu para povoamento de áreas pouco habitadas. Na Europa, vários eram os motivos para a emigração, entre eles a revolução industrial e o crescimento populacional, os problemas políticos (principalmente a unificação da Alemanha com a Itália) e a expectativa de uma vida melhor nas Américas. O Brasil Meridional se mostrava mais atraente para os imigrantes europeus, pela necessidade de colonizadores, e não somente de trabalhadores (ANDREAZZA; NIDALIN, 1994).

Partindo-se do pressuposto que a população do Paraná tem uma herança genética europeia importante, imaginava-se que a prevalência de talassemia alfa em pacientes com anemia pudesse girar em torno de 40%.

A falta de dados paranaenses sobre a população assintomática motivou a coleta de um grupo controle, composto por 94 crianças em idade escolar. Apesar da maior herança genética europeia no sul do Brasil, a prevalência de Tal- $\alpha$  nesse grupo foi de 3,19%. Poucos são os estudos em outras populações do Brasil, mas as estimativas são de uma prevalência de 10-20%, com alguns relatos de 22,2%, em indivíduos assintomáticos (CANÇADO, 2006).

Baseado nessa possível diferença entre os pacientes com DF e as crianças hígdas, a amostra mínima calculada foi de 42 casos. Optou-se por selecionar a amostra por conveniência, na ordem que os pacientes chegavam para sua consulta regular, o que agilizou a coleta de amostras e otimizou o uso dos insumos para extração de DNA. No total, foram coletadas 66 amostras, sendo 62 aptas para análise (4 apresentaram concentração de DNA muito baixa e não se observou amplificação do controle LIS, apesar das tentativas de aumento da concentração de DNA e dos reagentes).

Embora a amostragem seja 50% maior do que o cálculo original, a baixa prevalência de Tal- $\alpha$  no grupo de pacientes com DF exigiria uma amostra de 264 indivíduos para o que teste estatístico pudesse rejeitar a hipótese de igualdade das prevalências entre os grupos.

Diferente de outros estudos, a amostra concentrou-se em crianças, com mediana de idade de 7 anos. Daga (2009), estudando a variabilidade genética do exon 1 do gene da globina beta na população do Paraná, apresentou uma mediana de 30 anos no grupo de pacientes com DF. Lidani, Barros e Bovo (2015) verificaram a relação entre prevalência da hemoglobina S e origem étnica de indivíduos no estado do Paraná, porém também em população de adultos. Watanabe (2007) estudou recém-nascidos no estado do Paraná, para verificar a prevalência de

anemia falciforme, portanto sem acessar informações clínicas dos pacientes, já que a coleta se deu ao nascimento e aos 6 meses de idade.

## 5.2 DOENÇA FALCIFORME

Com o advento do programa de triagem neonatal, o diagnóstico das DF é realizado no primeiro mês de vida na maioria dos pacientes paranaenses (WATANABE, 2007). Poucos são os pacientes que se apresentam com anemia hemolítica ou até mesmo com manifestações clínicas mais tardias das DF, sem ter um diagnóstico prévio. Os parâmetros hematológicos, entretanto, são muito importantes no diagnóstico diferencial dessas doenças. A associação com talassemia  $\beta$ , por exemplo, deve ser suspeitada já no hemograma e confirmada com a quantificação da hemoglobina A2 (LUKENS, 2003).

Lukens (2003) descreve um VCM mais baixo na doença SC e uma HCM mais alta, relacionada a um distúrbio da membrana celular, que gera efluxo de potássio e água e leva à desidratação da hemácia. No presente estudo, o VCM se mostrou mais baixo na doença SC em relação à anemia falciforme, porém com HCM também mais baixo. Na amostra de Zago e Pinto (2007), entretanto, a HCM média nos pacientes com doença SC foi de 29,1 *versus* 30,2 nos pacientes com anemia falciforme.

Wang (2003) relatou VCM e HCM menores nos pacientes com genótipo  $S\beta$ , o que se confirmou na amostra estudada.

Os níveis de hemoglobina e número de eritrócitos são classicamente mais baixos na anemia falciforme, o que foi compatível com os dados do presente estudo (LUKENS, 2003; ZAGO; PINTO, 2007). A porcentagem de reticulócitos foi maior no grupo SS, quando comparado com os grupos SC e  $S\beta$ . Os dados de vários autores evidenciam maior hemólise nos pacientes homozigotos para hemoglobina S (WEATHERALL; PROVAN, 2000; LUKENS, 2003; ZAGO; PINTO, 2007; DAGA, 2009).

O RDW foi mais alto no grupo SS em relação aos grupos SC e  $S\beta$ , o que é compatível com a literatura. É descrita uma relação direta do RDW com a

porcentagem de reticulócitos e baixo nível de hemoglobina, o que também aconteceu na amostra aqui estudada (THAME *et al.*, 1991).

O número elevado de leucócitos tem relação com as infecções de repetição e liberação de mediadores inflamatórios pelo endotélio vascular (WEATHERALL; PROVAN, 2000; ZAGO; PINTO, 2007), estando aumentado nos pacientes com genótipo SS em relação aos com genótipos SC e S $\beta$  no presente estudo.

O número de plaquetas pode estar aumentado nos pacientes com anemia falciforme, o que se confirmou neste trabalho e se explica pela diminuição da função do baço (WANG, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2013).

A porcentagem de hemoglobina A2 é o índice mais importante para suspeita do diagnóstico de S-talassemia  $\beta$ . Nos pacientes desta amostra, a hemoglobina A2 foi mais alta nos pacientes com genótipo S $\beta$  em relação ao grupo SS, o que também é relatado em outras populações (WEATHERALL; PROVAN, 2000; WANG, 2003; ZAGO; PINTO, 2007).

Adegoke *et al.* (2015) analisaram 240 crianças da Nigéria, com média de idade de 2,6 anos, sendo 90% com genótipo SS e 10% com genótipo SC. A incidência de AVE (2,9%), STA (11%) e necessidade de internação por infecção (23%) foram semelhantes aos dados do Paraná. A necessidade de transfusão de concentrado de hemácias (25,8%), assim como a de internação por dactilite (33,1%) e crise álgica (66,3%) foram maiores na amostra nigeriana. Naquele país não há programa de triagem neonatal, e as crianças participantes do estudo foram diagnosticadas quando procuraram o pronto atendimento já com manifestações clínicas.

Belissário (2010) analisou 221 crianças acompanhadas no Hemocentro e Belo Horizonte/MG, triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais, com idade média de 6,49 anos, sendo 94% com genótipo SS e 6% com genótipo S $\beta$ . A incidência de AVE (3,8%) foi semelhante à incidência no Paraná (4,8%). Já o número de casos de SE (30,3%) foi quase o dobro da amostra aqui estudada (16,1%), provavelmente pelo maior número de pacientes com genótipo SS.

No Paraná o grupo com anemia falciforme, pelo maior grau de hemólise e vaso-oclusão, apresentou mais casos de dactilite e mais necessidade de transfusões de concentrado de hemácias quando comparado com os grupos SC e S $\beta$ .

### 5.3 TALASSEMIA ALFA

No presente estudo optou-se por utilizar uma técnica de PCR convencional para detecção da talassemia alfa. Diferentes técnicas de PCR já foram estabelecidas para identificação das formas deletoriais e não deletoriais de talassemia alfa. Comparadas às técnicas de análise por restrição enzimática, a tecnologia envolvida na PCR é mais simples, fidedigna, rápida e executável (KATTAMIS *et al.*, 1996).

O espectro de alterações genéticas varia muito entre diferentes populações. A mais frequente, entretanto, é a deleção alfa3.7. Além de ser a mais frequente no mundo nesse grupo de pacientes, sua prevalência é ainda maior nas populações africana e mediterrânea. No Brasil, um estudo gaúcho com 493 indivíduos que utilizou a técnica de PCR *multiplex* descrita por Tan *et al.* (2001) para busca das deleções alfa3.7, alfa4.2, alfa20.5, -SEA e -MED só encontrou a deleção alfa3.7 na sua população (WAGNER, 2010). Em outro estudo brasileiro, de 339 adultos, sendo 169 com talassemia alfa, somente em um paciente ocorreu uma deleção -MED e em cinco uma mutação não deletorial. Nos demais, a deleção alfa3.7 foi responsável pela talassemia alfa (BORGES *et al.*, 2001).

Optou-se então por estabelecer a técnica de PCR descrita por Tan *et al.* (2001), porém utilizando somente os *primers* que amplificavam o controle interno (LIS), o gene alfa e o gene mutado (com deleção alfa3.7). A simplificação tornou a reação mais barata e a interpretação mais fidedigna (já que no caso da PCR *multiplex*, as bandas inespecíficas podem ser confundidas com outras ampliações).

Como dito anteriormente, a prevalência de talassemia alfa nas crianças assintomáticas em idade escolar foi de 3,19% (todos heterozigotos) e no grupo de pacientes com doença falciforme foi de 9,67% (8,06% heterozigotos e 1,61% homozigotos). O resultado foi inferior à prevalência encontrada na Bahia, Minas Gerais e São Paulo (FIGUEIREDO *et al.*, 1996; ADORNO *et al.*, 2005; BELISSARIO; VIANA, 2010), porém semelhante à encontrada no Rio Grande do Sul. Nesse estado, a frequência alélica da mutação alfa3.7 em indivíduos com anemia falciforme foi de 0,14 (LINDENAU, 2009). No presente estudo, foi de 0,056.

Estudo realizado em Salvador (Bahia) analisando o sangue do cordão umbilical de 590 recém-nascidos, observou a presença de talassemia alfa em 114 (22,2%; todos com a deleção alfa3,7), dos quais 101 (19,7%) eram heterozigotos e 13 (2,5%) homozigotos (ADORNO *et al.*, 2005).

Tomé-Alves *et al.* (2000), analisando a presença concomitante de talassemia alfa em pacientes brasileiros portadores de hemoglobina S em heterozigose (Hb AS) com anemia, observaram que das 1002 amostras de sangue analisadas, 16 (1,59%) pacientes apresentavam a interação Hb AS/talassemia alfa.

Couto *et al.* (2003), estudando a associação de talassemia (deleção alfa3.7) em indivíduos portadores de hemoglobinopatia C, observaram frequência de talassemia alfa de 21,7% na forma heterozigótica e de 0,9% na forma homozigótica.

Borges *et al.* (2001) observaram frequência de talassemia alfa (deleção alfa3.7) de 49,9% em indivíduos com microcitose e hipocromia sem anemia, provenientes da região Sudeste.

Em uma coorte com 221 crianças (média de idade de 6,5 anos) com doença falciforme (SS ou S-talassemia  $\beta$ ), Belissário (2010) identificou 63 indivíduos heterozigotos para talassemia alfa (28,5%) e 3 homozigotos (1,35%), com uma prevalência de 29,9% e frequência alélica de 0,156. O estudo foi realizado em Minas Gerais e evidenciou uma prevalência de talassemia alfa no grupo de pacientes com doença falciforme três vezes superior a este estudo.

Wagner (2010), estudando 493 indivíduos assintomáticos do Rio Grande do Sul, encontrou uma prevalência de talassemia alfa entre os eurodescendentes de 4,5% (total de 201 indivíduos). Nos afrodescendentes do mesmo estudo, a prevalência foi de 23% (total de 197 indivíduos). Os dados, com significância estatística, sugerem que a alta prevalência de heterozigose para talassemia alfa em indivíduos assintomáticos está mais relacionada à herança africana que à herança europeia, o que pode explicar prevalências maiores tanto na população em geral, quanto nos pacientes com doença falciforme, em estados onde a imigração de escravos foi mais acentuada.

Em relação aos parâmetros hematológicos, não houve diferença entre os grupos com e sem talassemia alfa nesta amostra, quando os pacientes não foram classificados segundo o genótipo da doença falciforme. A presença de talassemia alfa tampouco alterou as manifestações clínicas desses pacientes. Entretanto, quando analisados somente os pacientes com anemia falciforme, o nível de Hb A2



foi maior no grupo com talassemia alfa, o que é compatível com a literatura (BALLAS *et al.*, 1997).

Belissário e Viana (2010) analisaram pacientes com anemia falciforme estratificados nos grupos: sem talassemia alfa; com talassemia alfa em heterozigose; com talassemia alfa em homozigose. Nos pacientes sem talassemia alfa, o número de leucócitos foi maior e a porcentagem de reticulócitos foi mais alta. Além disso, justificado pela menor produção das cadeias alfa, o VCM e HCM foram mais baixos. Outros estudos encontraram dados semelhantes (HIGGS *et al.*, 1982; MOUÉLÉ *et al.*, 1999, 2000; BERNAUDIN *et al.*, 2008). Da presente amostra, apesar de se observarem as mesmas alterações, não houve significância estatística, provavelmente pela baixa frequência de talassemia alfa. O efeito protetor da talassemia alfa se traduziria em menos hemólise (porcentagem de reticulócitos mais baixa) e menos inflamação tecidual (leucócitos mais baixos) (MOUÉLÉ *et al.*, 1999).

Uma limitação do estudo foi o tamanho da amostra, calculado baseado em dados de outros estados, onde a prevalência de talassemia alfa é maior. Apesar disso, agora sabedores da prevalência do Paraná, o estudo da interação de talassemia alfa com as doenças falciformes pode ser complementado em estudos futuros, já que a técnica de PCR para identificação da deleção alfa3.7 foi bem estabelecida e os dados coletados demonstram uma tendência à confirmação do que é relatado em outras populações, o que pode ser confirmado com o aumento da amostra.

## 6 CONCLUSÕES

A análise de um grupo de pacientes com DF e de um grupo controle com crianças hígdas do estado do Paraná permitiu as seguintes conclusões:

1) A prevalência de talassemia alfa (deleção alfa3.7) em crianças hígdas foi de 3,19%, enquanto que no grupo de pacientes com DF foi de 9,67% (diferença sem significado estatístico). Ambas estão abaixo do relatado pela literatura para outros estados.

2) Não houve diferença entre os pacientes com e sem talassemia alfa em relação às manifestações clínicas.

3) Os pacientes com associação de talassemia alfa e anemia falciforme (genótipo SS) apresentaram maior porcentagem de hemoglobina A2 quando comparados aos pacientes com genótipo SS sem talassemia alfa. Os pacientes com associação de doença SC e talassemia alfa apresentaram maior RDW quando comparados aos pacientes com doença SC sem talassemia alfa. Nas demais associações, não houve diferença em relação aos parâmetros hematológicos.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.J. *et al.* Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. **New England Journal of Medicine**, v.339, n.1, p.5-11, 1998.
- ADEGOKE, S.A. *et al.* Sickle cell disease clinical phenotypes in children from South-Western, Nigeria. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v.18, n.1, p.95-101, 2015.
- ADORNO, E.V. *et al.* Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, n.1, p.292-298, 2005.
- AIDOO, M. *et al.* Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. **Lancet**, v.359, n.9314, p.1311-1312, 2002.
- AMARATUNGA, C.; FAIRHURST, R.M. Alpha+ thalassemia antagonizes the malaria-protective effects of sickle-cell trait. **EbioMedicine**, v.1, p.8-9, 2014.
- ANDREAZZA, M.L.; NADALIN, S.O. O cenário da colonização do Brasil Meridional e a família imigrante. **Revista Brasileira de Estudos de População**, v.11, n.1, p.61-87, 1994.
- ASHLEY-KOCH, A. *et al.* Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. **American Journal of Epidemiology**, v.151, n.9, p.839-45, 2000.
- BAIN, B.J. **Haemoglobinopathy diagnosis**, 2.ed. Oxford: Backwell Publishing, 2006.
- BALLAS, S.K. *et al.* Is Hb A2 elevated in adults with sickle-alpha-thalassemia (beta(S)/beta(S); -alpha/-alpha)? **Hemoglobin**, v.21, n.5, p.405-450, 1997.
- BALLAS, S.K. Effect of alpha-globin genotype on the pathophysiology of sickle cell disease. **Pediatric Pathology and Molecular Medicine**, v.20, p.107-121, 2001.

BELISÁRIO, A.R. **Genótipos da talassemia alfa e haplótipos do agrupamento de genes da globina beta como moduladores da gravidade na doença falciforme em crianças do programa estadual de triagem neonatal de Minas Gerais matriculadas no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas**. 178f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

BELISÁRIO, A.R. *et al.* Alpha-thalassemia protects against cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.70, n.8, p.645-649, 2012.

BELISÁRIO, A.R.; VIANA, M.B. Efeitos da Talassemia Alfa nas manifestações clínicas e hematológicas da Anemia Falciforme: uma revisão sistemática. **Revista de Medicina de Minas Gerais**, v.20, n.1, p.312-321, 2010.

BERNAUDIN, F. *et al.* G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v.112, n.10, p.4314-4317, 2008.

BEUTLER, E. Disorders of hemoglobin structure: sickle cell anemia and related abnormalities. In: LICHTMAN, M.A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, V.; KAVSHANSKY, K.; PRCHAL, J.T. (Ed.). **Williams Hematology**. 7.ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2006. p.667-700.

BEZERRA, C.M. **Diagnóstico molecular da talassemia alfa+ (deleção -alfa3.7) em indivíduos com microcitose e/ou hipocromia atendidos no hemocentro Dalton Barbosa Cunha em Natal**. 93f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

BONINI-DOMINGOS, C.R. *et al.* Hemoglobinas AS/Alfa talassemia – importância diagnóstica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.22, n.3, p.388-394, 2000.

BORGES, E. *et al.* High prevalence of alpha-thalassemia among individual with microcytosis and hypochromia without anemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.759-762, 2001.

BORGNA-PIGNATTI, C.; GALANELLO, R. Thalassemias and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis. In: GREER, J.P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.N. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 11th. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2003. p.1078-1117.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Triagem Neonatal: oficinas regionais de qualificação da gestão**. Brasília, 2006.

BRUNETTA, D.M. *et al.* Manejo das complicações agudas da doença falciforme. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.43, n.3, p.231-7, 2010.

CANÇADO, R.D. Alpha thalassemias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.28, n.2, p.81-87, 2006.

CAMILO-ARAÚJO, R.F. *et al.* Molecular analysis and association with clinical and laboratory manifestations in children with sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.36, n.5, p.334-339, 2014.

CLARK, B. E.; THEIN, S.L. **Molecular diagnosis of haemoglobin disorders**. *Clinical & Laboratory Haemology*, v. 26, p. 159-176, 2004.

COSTA, J.C.R.; FLORES, T.R.P.; PUNDEK, M.R.Z. **Análise da triagem neonatal no Paraná, em 2004**. 31f. Trabalho de conclusão (Especialização em Saúde Pública) – Instituto Brasileiro de Pós Graduação e Extensão, Curitiba, 2005.

COUTO, F.D.; *et al.* Alpha-thalassemia 2, 3.7 kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: a molecular and hematological analysis, **Clinical & Laboratory Haematology**, v.25, n.1, p.29-34, 2003.

CURRAT, M. *et al.* Molecular analysis of the beta-globin gene cluster in the Niokholo Mandenka population reveals a recent origin of the beta(S) Senegal mutation. **American Journal of Human Genetics**, v.70, n.1, p.207-223, 2002.

DAGA, D.R. **Variabilidade genética do exon 1 do gene da beta globina humana em indivíduos normais e portadores da hemoglobina S**. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

DODE, C.; *et al.* Rapid analysis of  $\alpha$ -3.7 thalassemia and alpha alpha alpha anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. **British Journal of Haematology**, v.82, p.105-111, 1992.

FERRAZ, M.H.C.; MURAO, M. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, n.3, p.218-222, 2007.

FLINT, J. *et al.* Why are some genetic diseases common? Distinguishing selection from other processes by molecular analysis of globin gene variants. **Human Genetics**, v.91, n.2, p.91-117, 1993.

FIGUEIREDO, M.S.; *et al.* Effect of  $\alpha$ -thalassemia and  $\beta$ -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. **American Journal of Hematology**, v.53, p.72-76, 1996.

FORGET, B.G.; COHEN, A.R. Thalassemia syndromes. In: HOFFMAN, R.; *et al.* **Hematology: Basic Principles and Practice**. 4th ed. Livingstone: Elsevier Churchill, 2005. p.557-589.

FORGET, B.G.; PERSON, H.A. Hemoglobin Synthesis and the Thalassemias. In: HANDIN, R.I.; LUX, S.E.; STOSSEL, T.P. **Blood: principles and practice of hematology**. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1995. p.1525-1578.

FRENETTE, P.S.; ATWEH, G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, n.4, p.850-858, 2007.

GUASCH, A. *et al.* Evidence that microdeletions in the alpha globin gene protect against the development of sickle cell glomerulopathy in humans. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.10, n.5, p.1014-1019, 1999.

HANCHARD, N. *et al.* Classical sickle beta-globin haplotypes exhibit a high degree of long-range haplotype similarity in African and Afro-Caribbean populations. **BMC Genetics**, v.8, p.52, 2007.

HIGGS, D.R.; *et al.* The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. **New England Journal of Medicine**, v.306, n.24, p.1441-1446, 1982.

HIGGS, D.R.  $\alpha$ -thalassemia. **Baillière's Clinical Haematology**. v.6, n.1, p.117-150, 1993.

HIGGS, D.R.; GARRICK, D.; ANGUITA, E.; DE GOBBI, M.; HUGHES, J.; MUERS, M.; VERNIMMEN, D.; LOWER, K.; LAW, M.; ARGENTARO, A.; DEVILLE, M.A.; GIBBONS, R. Understanding alpha-globin gene regulation: Aiming to improve the management of thalassemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1054, p.92-102, 2005.

JANUARIO, J.N. **Incidência da doença falciforme em um milhão de nascidos vivos em Minas Gerais (1998-2001)**. 124f. Dissertação (Mestrado em Pediatria) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

KATTAMIS, A.C. *et al.* Human alpha-thalassemia syndromes: detection of molecular defects. **American Journal of Hematology**, v.53, p.81-91, 1982.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER JÚNIOR, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.19, p.5444, 1991.

LIDANI, K.C.; BARROS, R.F.; BOVO, F. Relationship between the prevalence of hemoglobin S and the ethnic background of blood donors in Paraná state. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.51, n.4, p.212-217, 2015.

LINDENAU, J.D. **Frequência de mutações nos genes das cadeias alfa e beta da hemoglobina no Rio Grande do Sul**. 19f. Trabalho de graduação (Bacharelado em Ciências biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

LUBEGA, I. *et al.* Alpha thalassemia among sickle cell anaemia patients in Kampala, Uganda. **African Health Sciences**, Kampala, v.15, n.3, p.682-689, 2015.

LUKENS, J.N. Abnormal Hemoglobins: General Principles. In: GREER, J.P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.N. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 11th. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2003. p.1018-1031.

LWANGA, S.K.; LEMESHOW, S. **Sample size determination in health studies: a practical manual**. Geneva, World Health Organization, 1991.

- MCINTYRE, T.M.; PRECOTT, S.; ZIMMERMAN, G.A. Cell-cell interactions: meucocyte-endothelial interactions. **Current Oppinion in Hematology**, v.10, p.150-158, 2003.
- MELO-REIS, P.R. *et al.* Prevalência de talassemia e hemoglobinas variantes no estado de Goiás, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.42, n.6, p.425-430, 2006.
- MOUÉLÉ, R. *et al.* Sickle-cell disease in Brazzaville, Congo: genetical, hematological, biochemical and clinical aspects. **Acta Haematologica**, v.101, n.4, p.178-184, 1999.
- MOUÉLÉ, R. *et al.* alpha-thalassemia in Bantu population from Congo-Brazzaville: its interaction with sickle cell anemia. **Human Heredity**, v.50, n.2, p.118-125, 2000.
- NAOUM, P.C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.22, n.1, p.05-22, 2000.
- NOGUEIRA, K.D.A.; *et al.* Diagnóstico laboratorial da anemia falciforme. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v.6, n.4, 2013.
- ODAME, I. Thalassemia. The Hospital for Sick Children, University of Toronto, 2009. Apresentação oral.
- RANDOLF, T.R. Hemoglobinopathies (Structural Defects in Hemoglobin). Disponível em <<http://clinicalgate.com/hemoglobinopathies-structural-defects-in-hemoglobin/>>. Acesso em: 08/10/2015.
- REES, D.C.; *et al.* Guidelines for the management of acute painful crisis in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v.120, n.5, p.744-752, 2003.
- ROBINSON, W.M.; BORGES-OSÓRIO, M.R. **Genética para odontologia**. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- SERJEANT, G.R. *et al.* The clinical features of sickle-cell thalassaemia in Jamaica. **British Journal of Haematology**, v.24, n.1, p.19-30, 1973.



SERJEANT, G.R. *et al.* Comparison of sickle cell-beta<sup>0</sup> thalassaemia with homozygous sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v.41, n.1, p.83-93, 1979.

STUART, M.J.; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v.365, p.1343-1360, 2004.

SUEMASU, C.N. *et al.* Characterization of alpha thalassaemic genotypes by multiplex ligation-dependent probe amplification in the Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.44, n.1, p.16-22, 2011.

STEINBERG, M.H. Pathophysiology of sickle cell disease. **Baillière's Clinical Haematology**. v.11, n.1, p.163-184, 1998.

STEINBERG, M.H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: Overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **TheScientificWorldJournal**, v.8, p.1295-1324, 2008.

THAME, M. *et al.* The red cell distribution width in sickle cell disease - is it of clinical value? **Clinical & Laboratory Haematology**, v.13, n.3, p.229-237, 1991.

TOMÉ-ALVES, R. *et al.* Hemoglobinas AS/alfa talassemia – importância diagnóstica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.22, n.3, p.388-394, 2000.

TAN, A.S.C. *et al.* A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay of alpha-thalassemia. **Blood**, v.98, p.250-251, 2001.

VICHINSKY, E. Advances in the treatment of alpha-thalassemia. **Blood Reviews**, Philadelphia, v.265, p.531-534, 2012.

WAGNER, S.C. **Bases moleculares das hemoglobinas variantes e talassemias no Rio Grande do Sul**. 113f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

WAGNER, S.C. *et al.* Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes com anemia não ferropênica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.27, n.1, p.37-42, 2005.

WANG, W.C. Sickle cell Anemia and other sickling syndromes. In: GREER, J.P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.N. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 11th. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2003. p.1032-1072.

WATANABE, A.M. **Prevalência da anemia falciforme no estado do Paraná**. 122f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) – Departamento de clínica médica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v.79, n.8, p.704-712, 2001.

WEATHERALL, D.J.; PROVAN, A.B. Red cells I: inherited anaemias. **Lancet**, v.355, p.1169-1175, 2000.

WEATHERALL, D.J. Disorders of globin synthesis: The thalasseмии. In: LICHTAMAN, M. *et al.* **Williams Hematology**, 7. ed. McGraw-Hill Medical, New York, 2006. p.633-666.

WENNING, M.R.S.C. *et al.* Alpha-globin genes: thalasseemic and structural alteration in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.33, p.1041-1045, 2000.

ZAGO, M.A.; PINTO, A.C.S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.29, n.3, p.207-214, 2007.

**APÊNDICES**

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	43
APÊNDICE 2 – TERMO DE ASSENTIMENTO.....	44

## APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro paciente ou responsável:

Meu nome é Tiago Hessel Tormen. Sou médico no Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e estou realizando uma pesquisa sob orientação da Dra. Mara Albonei Dudeque Pianovski. Queremos descobrir se alguns pacientes que têm doença falciforme também apresentam uma doença chamada alfa talassemia, que pode fazer a sua anemia ser pior.

Para poder participar dessa pesquisa, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, me peça para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

A participação nesse estudo é voluntária e se você decidir não participar ou quiser desistir a qualquer momento, tem absoluta liberdade de fazê-lo. Ao assinar esse termo, você concorda que na próxima coleta de sangue do paciente \_\_\_\_\_ seja reservada uma amostra para o exame que pode fazer o diagnóstico de alfa talassemia.

Não haverá nenhum custo a mais para você, e você também não receberá nenhum pagamento por participar do estudo.

Nós iremos coletar informações sobre o tratamento e atual estado de saúde do paciente, mas sua identidade será mantida no mais rigoroso sigilo. Serão omitidas todas as informações que permitam identificá-lo(a). Você tem direito de saber o resultado do exame assim que eles estiverem prontos.

Se você ou seus parentes tiver(em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar a mim (**Dr. Tiago Hessel Tormen**) no telefone **(41) 8859.8150**. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: **3360-1896**. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científico e não científico que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

#### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

Nome e assinatura do responsável pelo paciente: .....  
Curitiba, ..... (data)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_  
Dr. Tiago Hessel Tormen  
Curitiba, .....

## APÊNDICE 2 – TERMO DE ASSENTIMENTO

### TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

(Adolescentes maiores de 12 anos menores de 18 anos)

**Título do projeto:** Diagnóstico molecular de talassemia alfa em pacientes com doença falciforme.

**Investigador:** Dr. Tiago Hessel Tormen.

**Local da Pesquisa:** Serviço de Hematologia Pediátrica do HC-UFPR.

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 140 – Curitiba – PR.

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de descobrir se você tem uma doença chamada alfa talassemia. Saber isso pode nos ajudar com o seu tratamento. Poderemos, por exemplo, “vigiar mais de perto” se você poderá ter alguma outra doença no futuro, e tentar eviá-la.

Caso você aceite participar você deve assinar esse termo, me autorizando a pegar um pouco de sangue na sua próxima coleta (você não precisará coletar sangue de novo). Alguns dados que temos no seu prontuário também serão pesquisados (como sua idade, por exemplo). Depois que fizermos o teste para saber se você tem alfa talassemia, seu sangue será descartado em um lixo especial. Em nenhum momento seu nome será divulgado para ninguém. Somente você e seus pais saberão se você tem a doença ou não (além dos médicos que estão te acompanhando).

A sua participação é voluntária. Caso você opte por não participar não terá nenhum prejuízo no seu atendimento e/ou tratamento.

#### Contato para dúvidas:

Se você ou os responsáveis por você tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar o investigador do estudo: **Dr. Tiago Hessel Tormen**, telefone **(41) 3209.6666** ou **8859.8150**. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone **3360-1041**. O CEP é constituído por um grupo de profissionais de diversas áreas, com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada da pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

#### DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito. Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento DE ASSENTIMENTO INFORMADO.

Nome: .....

Curitiba, .....

Dr. Tiago Hessel Tormen

**ANEXOS**

ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....46

## ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - HCUFPR

### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE TALASSEMIA ALFA (DELEÇÃO -alfa3.7) EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

**Área Temática:**

**Pesquisador:** Tiago Hessel Tormen

**Versão:** 2

**Instituição:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

**CAAE:** 05855212.1.0000.0096

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 67935

**Data da Relatoria:** 09/08/2012

#### Apresentação do Projeto:

Hemoglobinopatias são alterações nos genes da globina que determinam hemoglobinas variantes e/ou talassemias, com manifestações clínicas variáveis em seus portadores. Estudos realizados no Brasil mostram alta prevalência de hemoglobinopatias S e C, além de talassemias alfa e beta. Este é um estudo observacional, descritivo, quantitativo, de coleta ambispectiva. Os pesquisadores coletaram dados de prontuários de pacientes com doença falciforme e, durante consulta de rotina, coletarão amostra para realização de diagnóstico molecular de alfa talassemia (pesquisa da deleção -alfa3.7 por PCR).

#### Objetivo da Pesquisa:

Verificar a frequência de alfa talassemia nos pacientes portadores de doença falciforme atendidos no ambulatório de hematologia pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR). Verificar se os pacientes com doença falciforme com ou sem alfa talassemia apresentam fenótipo semelhante.b) Identificar parâmetros hematimétricos que possam sugerir a associação das duas patologias.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos físicos mínimos e psicológicos (apreensão e expectativa de resultados).  
Benefício é estabelecer se há um fenótipo que ajude no prognóstico de pacientes com ambas as doenças.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Durante consulta de rotina os pacientes serão convidados a participar da pesquisa e, após assinatura do termo de consentimento, será obtida amostra de sangue periférico em papel filtro. As amostras serão processadas em reações simples com os primers e protocolos descritos por Dode et al.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os TCLE e termos de assentimento estão adequados.

**Recomendações:**

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

sem pendências

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

CURITIBA, 06 de Agosto de 2012

---

Assinado por:  
Renato Tambara Filho



## PRODUÇÃO ACADÊMICA

### **Prevalência de alfa talassemia em crianças assintomáticas no estado do Paraná**

Tiago H Tormen: Especialista em Hematologia Pediátrica

Mara A. D. Pianovski: Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente

Leniza C. L. Lichtvan: Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente

Geraldo Picheth: Doutor em Bioquímica e Biologia Molecular

Luiza C. Gobor: Mestre em Biotecnologia Industrial

Serviço de Hematologia Pediátrica

Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Paraná

Autor responsável: Tiago Hessel Tormen

Rua General Carneiro, 6 – Alto da Glória – Curitiba – PR

(41) 3204-2551 / tiago@tormen.com

#### Resumo:

A talassemia alfa é alteração genética mais comum na síntese da hemoglobina, afetando mais de 5% da população mundial. Resulta de um desequilíbrio na síntese das cadeias alfa da hemoglobina devido principalmente à deleção de um ou ambos os genes da globina alfa, sendo a deleção alfa3.7 a mais frequente. Com o objetivo de verificar a prevalência de talassemia alfa em crianças assintomáticas do estado do Paraná, foram coletadas amostras de 94 crianças assintomáticas, em idade escolar, de três escolas da cidade de Curitiba – Paraná. As amostras foram processadas e submetidas a técnica de PCR para identificação da deleção alfa3.7. A talassemia alfa foi detectada em três crianças, todas heterozigotas, representando uma prevalência de 3,19%. A frequência do alelo -alfa3.7 foi de 0,015 (três em 188 cromossomos). A prevalência de talassemia alfa (deleção alfa3.7) em crianças assintomáticas no estado do Paraná foi de 3,19%, o que está abaixo do relatado pela literatura de outros estados.

#### *Abstract:*

*Alpha-Thalassemia is the most common genetic hemoglobin disease, affecting 5% of the world's population. It is the result of an unbalanced synthesis of the globin's alpha chain, mostly due to the deletion of one or both genes of alpha globin. The deletion -alpha3.7 is the most frequent of them. This study aims to verify the prevalence of alpha-thalassemia in healthy children in the state of Paraná – Brazil. Ninety four samples were collected, all from children from three schools in Curitiba – Paraná. The samples were processed and analyzed by PCR reaction to identify the -alpha3.7 deletion. Alpha-thalassemia was detected in three children, all heterozygous, with a prevalence of 3,19%. The -alpha3.7 allelic frequency was 0,015 (three in 188 chromosomes). The alpha-thalassemia prevalence in asymptomatic children in the state of Paraná was 3.19%, which is lower than the prevalence of other states of Brazil.*

### **Introdução:**

A talassemia alfa é alteração genética mais comum na síntese da hemoglobina, afetando mais de 5% da população mundial (1). Resulta de um desequilíbrio na síntese das cadeias alfa da hemoglobina devido principalmente à deleção de um ou ambos os genes da globina alfa, sendo a deleção alfa3.7 a mais frequente (2).

Há uma substancial heterogeneidade no fenótipo da talassemia alfa, resultado da diversidade de alterações genéticas. A inativação de um único gene da globina alfa resulta em um fenótipo de portador silencioso (ausência de sintomas e hemograma normal). Inativação de dois genes causa traço de talassemia alfa, cujos portadores são assintomáticos e apresentam microcitose sem anemia.

Já a inativação de três dos quatro genes da globina alfa resulta em produção significativa de Hb H, uma forma de hemoglobina composta de quatro cadeias beta. Pacientes com Hb H têm talassemia alfa intermédia, ou doença da hemoglobina H, que causa anemia moderada a grave, um grau leve de eritropoese ineficaz e esplenomegalia. A inativação dos quatro genes da globina alfa resulta na produção excessiva de Hb BART (forma de Hb composta de quatro cadeias gama) e anemia grave, geralmente progredindo para hidropsia fetal (1).

A prevalência de talassemia alfa é maior em populações de origem mediterrânea e africana. Estudos americanos evidenciam até 25% de prevalência de talassemia alfa em afrodescendentes assintomáticos (3).

Em várias províncias do Brasil, nos anos 1800, a política imigratória visava o preenchimento de vagas deixadas pelos ex-escravos nas grandes fazendas de café. Entretanto no Paraná, desde a emancipação da província, em 1853, o estímulo migratório se deu para povoamento de áreas pouco habitadas. Na Europa, vários eram os motivos para a emigração, entre eles a revolução industrial e o crescimento populacional, os problemas políticos (principalmente a unificação da Alemanha com a Itália) e a expectativa de uma vida melhor nas Américas. O Brasil Meridional se mostrava mais atraente para os imigrantes europeus, pela necessidade de colonizadores, e não somente de trabalhadores (4).

Partindo-se do pressuposto que a população do Paraná tem uma herança genética europeia importante e uma boa influência da imigração africana, supõe-se uma alta prevalência de talassemia alfa em indivíduos assintomáticos.

O objetivo desse trabalho é verificar a prevalência de talassemia alfa em crianças em idade escolar, assintomáticas, no estado do Paraná.

#### **Métodos:**

Foram coletadas amostras de 94 crianças assintomáticas, em idade escolar, de três escolas da cidade de Curitiba – Paraná. Foram incluídas crianças que não declararam nenhuma patologia, e excluídas aquelas cujos responsáveis não autorizaram a participação no estudo. Foram analisadas as seguintes variáveis: idade, sexo e diagnóstico de talassemia alfa. Os dados foram analisados no software R.

As amostras de sangue foram coletadas em frasco de EDTA e o DNA foi extraído conforme protocolo descrito por Lahini (5). Após a extração, o DNA foi diluído para a concentração padrão de 100ng/dL.

A reação de PCR foi baseada no protocolo de Tan (6) utilizando-se os *primers* LIS1-F, LIS1-R,  $\alpha 2/3.7$ -F, 3.7/20.5-R,  $\alpha 2$ -R (diluídos em concentração de 10 pmol/ $\mu$ L), esperando-se a amplificação dos amplicons: LIS (2350 bp), gene  $\alpha 2$  (1800bp) e gene mutado  $-\alpha 3.7$  (2022-2029 bp) (Tabela 1). A identidade dos amplicons foi obtida pela determinação do tamanho do fragmento amplificado. Visto que a deleção  $\alpha 3.7$  remove parte do gene globina  $\alpha 2$ , sua amplificação, juntamente com a amplificação de um alelo de deleção, indica que a mutação encontra-se em heterozigose. Como controle positivo para o sucesso da

amplificação do DNA, foi utilizado um segmento de 2.350 pb, referente à região 3' não transcrita do gene LIS 1 (fator plaquetário), localizado no cromossomo 17p13.3.

As reações de PCR foram realizadas utilizando o Kit comercial Qiagen® Multiplex PCR, composto de: “*Master Mix*” (“*HotStarTaq*”® DNA Polimerase, “*Multiplex PCR Buffer*” – com 6mM de MgCl<sub>2</sub> – e dNTP Mix), Q-Solution e Água livre de RNase. O Mix foi padronizado para um total de 10 µL (Tabela 2).

Com relação aos ciclos da PCR, estabeleceu-se: ativação da enzima *hot start* e desnaturação do DNA a 96°C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos de 98°C por 45 segundos para desnaturação do DNA, 60°C durante 90 segundos para anelamento dos iniciadores, 72°C por 135 segundos para ação da DNA polimerase, seguido por uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Para resolução dos produtos da PCR, 10 µL do amplicon, adicionado de 4µL do tampão de corrida *loadingdye* (glicerol, xilenocianol e azul de bromofenol) foram aplicados em gel de agarose 1%. A corrida de eletroforese foi condicionada a 40 volts (23 mA) durante 4 horas em cuba (Horizon, 18cm) contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no transiluminador de luz ultravioleta, após imersão do gel de agarose em solução contendo brometo de etídio (10µg/mL) por 5 minutos, para análise dos fragmentos amplificados. A determinação do genótipo do sujeito da pesquisa foi realizada de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados, quando comparados com o padrão de peso molecular 1000 pb (1Kb ladder DNA marker 300-10000 bp - Axygen Biosciences).

### **Resultados:**

Das 94 crianças, 45 (48%) eram do sexo masculino e 49 (52%) do sexo feminino. A idade variou entre 6 e 14 anos (mediana de 10 anos). A Tabela 4 resume a caracterização das crianças do grupo controle quanto ao sexo e idade, estratificada segundo a presença ou não de talassemia alfa.

A talassemia alfa<sup>+</sup> (deleção alfa3.7) foi detectada em três crianças, todas heterozigotas (Tabela 3) (Figura 1), representando uma prevalência de 3,19% (Figura 1). A frequência do alelo -alfa3.7 foi de 0,015 (três em 188 cromossomos).

### **Discussão:**

Em nosso trabalho optamos por utilizar uma técnica de PCR convencional para detecção da talassemia alfa. Diferentes técnicas de PCR já foram

estabelecidas para detecção das formas deletoriais e não deletoriais de talassemia alfa. Comparadas às técnicas de análise por restrição enzimática, a tecnologia envolvida na PCR é mais simples, fidedigna, rápida e executável (7).

O espectro de mutações da talassemia varia muito entre diferentes populações. A mais frequente das mutações, entretanto, é a deleção alfa3,7. Não obstante ser a mais frequente no mundo, sua prevalência é ainda maior nas populações africana e mediterrânea. No Brasil, um estudo gaúcho com 493 indivíduos que utilizou a técnica de PCR multiplex descrita por Tan (6) para busca das deleções alfa3,7, alfa4,2, alfa20,5, -SEA e -MED só encontrou a deleção alfa3,7 na sua população (WAGNER, 2010). Em outro estudo brasileiro, de 339 adultos, sendo 169 com talassemia alfa, somente em um paciente ocorreu uma deleção -MED e em cinco uma mutação não deletorial. Nos demais, a deleção alfa3,7 foi responsável pela talassemia alfa (BORGES, 2001).

Optamos então por estabelecer a técnica de PCR descrita por Tan (6), porém utilizando somente os *primers* que amplificavam o controle interno (LIS), o gene alfa e o gene mutado (com deleção alfa3,7). A simplificação tornou a reação mais barata, e a interpretação mais fidedigna (já que no caso da PCR *multiplex*, as bandas inespecíficas podem ser confundidas com outras amplificações).

Como dito anteriormente, a prevalência de talassemia alfa nas crianças assintomáticas em idade escolar foi de 3,19% (todos heterozigotos). O resultado foi inferior a prevalência encontrada na Bahia, Minas Gerais e São Paulo (8, 9, 10).

Estudo realizado em Salvador, Bahia, através da análise do sangue do cordão umbilical de 590 recém-nascidos, observou a presença de talassemia alfa em 114 recém-nascidos (22,2%; todos com a deleção alfa3,7), dos quais 101 (19,7%) eram heterozigotos e 13 (2,5%) homozigotos (8).

Tomé-Alves (2000), analisando a presença concomitante de talassemia alfa em pacientes brasileiros portadores de hemoglobina S em heterozigose (Hb AS) com anemia, observou que das 1002 amostras de sangue analisadas, 16 (1,59%) pacientes apresentavam a interação Hb AS/talassemia alfa.

Couto (11), estudando a associação de talassemia (deleção alfa3,7) em indivíduos portadores de hemoglobinopatia C, observou frequência de talassemia alfa de 21,7% na forma heterozigótica e de 0,9% na forma homozigótica.

Borges (12) observou frequência de talassemia alfa (deleção alfa3.7) de 49,9% em indivíduos com microcitose e hipocromia sem anemia, provenientes da região Sudeste.

Em uma coorte com 221 crianças (média de idade de 6,5 anos) com doença falciforme (SS ou S-talassemia  $\beta$ ), Belissário (2010) identificou 63 indivíduos heterozigotos para talassemia alfa (28,5%) e 3 homozigotos (1,35%), com uma prevalência de 29,9% e frequência alélica de 0,156. O estudo foi realizado em Minas Gerais e evidenciou uma prevalência de talassemia alfa no grupo de paciente com doença falciforme três vezes superior à nossa amostra.

Wagner (13), quando estudando 493 indivíduos assintomáticos do Rio Grande do Sul, encontrou uma prevalência de talassemia alfa entre os eurodescendentes de 4,5% (total de 201 indivíduos). Nos afrodescendentes do mesmo estudo, a prevalência foi de 23% (total de 197 indivíduos). Os dados, com significância estatística, sugerem que a alta prevalência de heterozigose para talassemia alfa em indivíduos assintomáticos está mais relacionada à herança africana que à herança europeia, o que pode explicar prevalências maiores em estados onde a imigração de escravos foi mais acentuada.

### **Conclusão:**

A prevalência de talassemia alfa (deleção alfa3.7) em crianças assintomáticas no estado do Paraná foi de 3,19%, o que está abaixo do relatado pela literatura de outros estados.

## Referências Bibliográficas

- 1 VICHINSKY, E. Advances in the treatment of alpha-thalassemia. *Blood Reviews*, Philadelphia, v.265, p.531-534, 2012.
- 2 BEZERRA, C.M. Diagnóstico molecular da talassemia alfa+ (deleção -alfa3.7) em indivíduos com microcitose e/ou hipocromia atendidos no hemocentro Dalton Barbosa Cunha em Natal, Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.
- 3 WANG, W.C. Sickle Cell Anemia and Other Sickling Syndromes. In: GREER, J.P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.n. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11th. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2003. p.1032-1072.
- 4 ANDREAZZA, M.L.; NADALIN, S.O. O cenário da colonização do Brasil Meridional e a família imigrante. *Rev.Bras. Estudos Pop.*v.11, n.1, p.61-87, 1994.
- 5 LAHIRI, D.K.; NURNBERGER JÚNIOR, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, v.19, n.19, p.5444, 1991.
- 6 TAN, A.S.C; QUAH, T.C. *et al.* A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay of alpha-talassemia. *Blood*, v.98, p.250-251, 2001.
- 7 KATTAMIS, A.C.; CAMASCHELLA, C.; *et al.* Human alpha-thalassemia syndromes: detection of molecular defects. *American Journal of Hematology*, v.53, p.81-91, 1982.
- 8 ADORNO, E.V.; *et al.* Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad. Saúde Pública*, v.21, n.1, p.292-298, 2005.
- 9 BELISÁRIO, A.R. Genótipos da talassemia alfa e haplótipos do agrupamento de genes da globina beta como moduladores da gravidade na doença falciforme em crianças do programa estadual de triagem neonatal de Minas Gerais matriculadas no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas, Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010a.
- 10 FIGUEIREDO, M.S.; *et al.* Effect of  $\alpha$ -Thalassemia and  $\beta$ -Globin Gene Cluster Haplotypes on the Hematological and Clinical Features of Sickle-Cell Anemia in Brazil. *American Journal of Hematology*, v.53, p.72-76, 1996.

11 COUTO, F.D.; *et al.* alpha-Thalassemia 2, 3.7 kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: a molecular and hematological analysis, Clin Lab Haematology, v.25, n.1, p.29-34, 2003.

12 BORGES, E.; WENNING, M.R.S.C.; *et al.* High prevalence of alpha-thalassemia among individual with microcytosis and hypochromia without anemia. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v.34, p.759-762, 2001.

13 WAGNER, S.C. Bases moleculares das hemoglobinas variantes e talassemias no Rio Grande do Sul. 113f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.



TABELA 1 - SEQUÊNCIA DE *PRIMERS* E TAMANHO DE AMPLICON ESPERADO

NOME	5' - 3'	GENBANK ID	CONC.	AMPLICON
LIS1-F	ATACCATGGTTACCCATTGAGC	HSLIS10:510	0.5 $\mu$ M	LIS1 3'UTR (2350 bp)
LIS1-R	AGGGCTCATTACATGTGGACCC	HSLIS10:2859	0.5 $\mu$ M	
$\alpha$ 2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	HUMHBA4:5676	0.2 $\mu$ M	- $\alpha$ 3.7 jxna (2022/2029 bp)
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	HUMHBA4:11514	0.2 $\mu$ M	
$\alpha$ 2/3.7-F	Acima	Acima		Gene $\alpha$ 2 (1800 bp)
$\alpha$ 2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	HUMHBA4:7475	0.2 $\mu$ M	

FONTE: Modificado pelo autor (2015)

TABELA 2 - MIX DE PCR PADRONIZADO

REAGENTE (CONCENTRAÇÃO)	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME ( $\mu\text{L}$ )
Água livre de RNase		1,4
<i>Primers mix</i> [10 pmol/ $\mu\text{L}$ ]		
LIS1-F	0,5 $\mu\text{M}$	0,5
LIS1-R	0,5 $\mu\text{M}$	0,5
$\alpha$ 2/3.7-F	0,2 $\mu\text{M}$	0,2
3.7/20.5-R	0,2 $\mu\text{M}$	0,2
$\alpha$ 2-R	0,2 $\mu\text{M}$	0,2
Q solution [5X]	0,5X	1,0
Master Mix [2X]	1X	5,0
Amostra de DNA (100ng/ $\mu\text{L}$ )		1,0
Volume final		10,0

FONTE: O autor (2015)

TABELA 3 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS OBSERVADAS A PARTIR DA ANÁLISE DE DNA

GENÓTIPO	FREQUÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA (%)
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	91 (96,81)
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	3 (3,19)
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	0
Total	94 (100)

FONTE: O autor (2015)

TABELA 4 - CARACTERIZAÇÃO DAS CRIANÇAS DO GRUPO CONTROLE QUANTO AO SEXO E IDADE NA PRESENÇA OU NÃO DE TALASSEMIA ALFA

GRUPOS	SEXO	n(%)	MEDIANA DA IDADE(ANOS)	AV
Talassemia alfa presente	M	2	9,5	9,0-10,0
	F	1	8,0	8,0-8,0
	Total	3	9,0	8,0-10,0
Talassemia alfa ausente	M	43	10,0	6,0-11,0
	F	48	10,0	7,0-14,0
	Total	91	10,0	6,0-14,0

FONTE: O autor (2015)  
 AV: Amplitude de variação

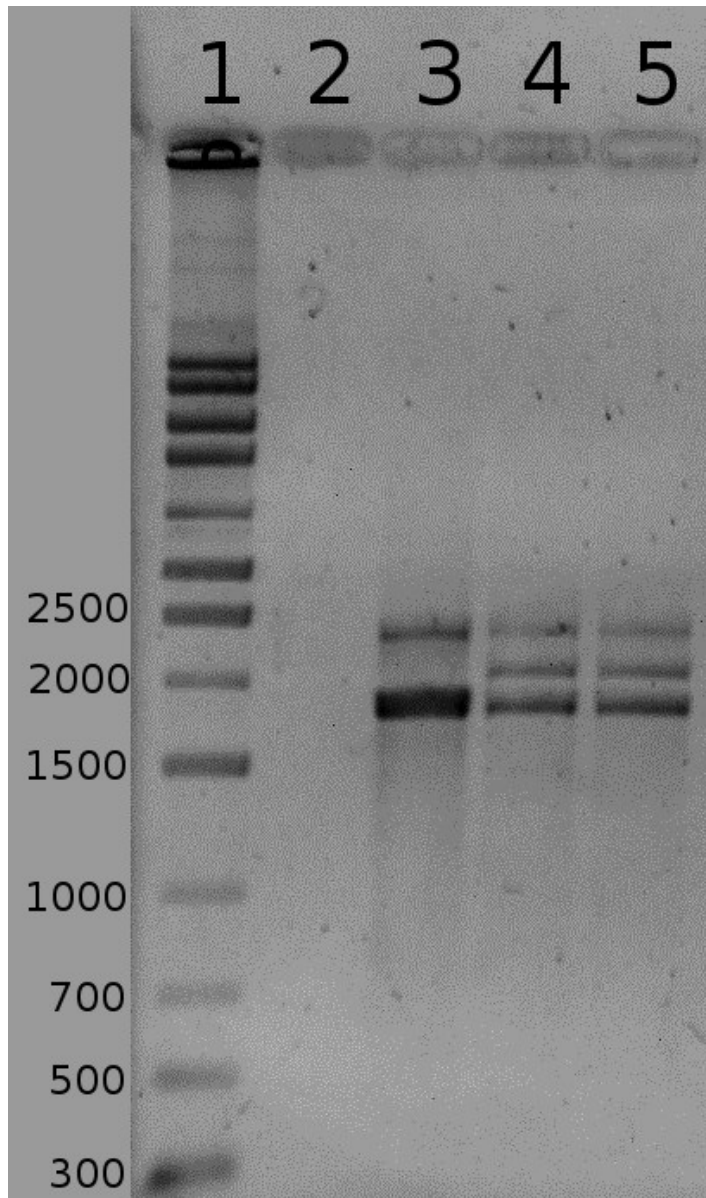


FIGURA 1 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR AMPLIFICADOS

FONTE: O autor (2015)

1: Marcador de massa

2: Banco

3: Amostra sem deleção alfa3.7. Banda LIS (controle interno – 2350 pb) + banda do gene da globina alfa sem deleção alfa3.7 (1800 pb)

4 e 5: Amostras com heterozigose da deleção alfa3.7. Banda LIS (controle interno – 2350 pb) + banda com deleção alfa3.7 (2022 – 2029 pb) + banda do gene da globina alfa sem deleção alfa3.7 (1800 pb)

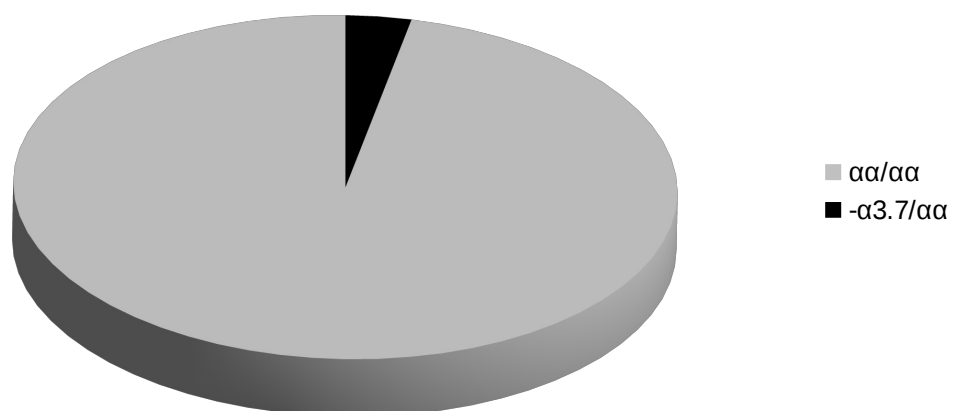


FIGURA 2 - PREVALÊNCIA DE TALASSEMIA ALFA EM CRIANÇAS HÍGIDAS NO ESTADO DO PARANÁ  
FONTE: O autor (2015)