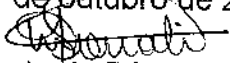


UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**ELIANE BORGES**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Ciências Biomédicas.

Campinas, 17 de outubro de 2000.

  
Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati  
Orientadora

***CONTRIBUIÇÃO DA TALASSEMIA  $\alpha$  COMO CAUSA DE  
MICROCITOSE E HIPOCROMIA EM UMA POPULAÇÃO  
BRASILEIRA***

**CAMPINAS  
2000**

**ELIANE BORGES**

**CONTRIBUIÇÃO DA TALASSEMIA  $\alpha$  COMO CAUSA DE  
MICROCITOSE E HIPOCROMIA EM UMA POPULAÇÃO  
BRASILEIRA**

*Tese apresentada à Faculdade  
de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do  
título de Mestre em Ciências  
Médicas (Área de Concentração  
Patologia Clínica)*

***Orientadora: Profa.Dra. Maria de Fátima Sonati***

***Campinas  
2000***

|             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| UNIDADE     | Bc                                  |
| N.º CHAMADA | UNICAMP                             |
|             | B644c                               |
| V.          | Ex.                                 |
| TOMBO BC    | 44090                               |
| PROC.       | 16-392/01                           |
| C           | <input type="checkbox"/>            |
| D           | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREC.       | R\$ 41,00                           |
| DATA        | 25/04/01                            |
| N.º CPD     |                                     |

CM-00154697-8

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS/  
UNICAMP**

B644c      Borges, Eliane  
                   Contribuição da talassemia  $\alpha$  como causa de microtose e  
                   hipocromia em uma população brasileira / Eliane Borges.  
                   Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador: Maria de Fátima Sonati  
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
 Ciências Médicas.

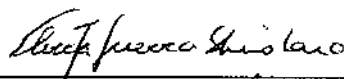
1. Talassemia . 2. Anemia. 3. População - Brasil.  
 I. Maria de Fátima Sonati. II. Universidade Estadual de Campinas.  
 Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

# Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

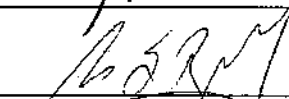
Orientador: Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

## Membros:

1. Profa. Dra. Elvira Maria G. Simões



2. Prof. Dr. Sigisfredo Luis Brunelli



3. Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17.10.00

## ***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais, José Carlos e Diva,  
aos meus tios Eli e Cida,  
por tão grande amor e dedicação,  
e à minha filha Luiza,  
sem dívida, uma dádiva  
e motivação para mim.*

## *AGRADECIMENTOS*

À Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati, pela oportunidade e contribuição preciosa em minha vida acadêmica.

Aos Professores do Departamento de Patologia Clínica, que contribuíram direta ou indiretamente na minha formação profissional.

Às amigas Elza Miyuki Kimura, Sirley Gervásio, Simone Sant'Anna e Cinira Soledade, pela grande colaboração, incentivo e amizade.

À Márcia Regina Wenning, pelo auxílio que muito contribuiu na finalização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Hemoglobinopatias, Dorival, Denise, Daniela, Simone Bordignon e Nádia, pela compreensão e paciência.

À Profa. Dra. Helena Z.W Grotto, pelas discussões quanto ao monitoramento do status de ferro dos pacientes analisados.

À Bióloga Carmen A.C. Aguiar, pelo importante auxílio na determinação da ferritina sérica.

Ao Biólogo Ronei Luciano Mamoni, pela grande ajuda e amizade.

Aos Amigos do Laboratório de Hematologia, pelo incentivo no dia-a-dia e pela amizade.

À Comissão de Pesquisa Estatística da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, e em especial ao Helymar, pelas análises estatísticas envolvidas neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo suporte financeiro destinado à execução deste trabalho (Auxílio à Pesquisa - Processo 98/14532-2).

# ***SUMÁRIO***

PÁG.

**RESUMO.....xiii**

**ABSTRACT.....xix**

**INTRODUÇÃO GERAL.....25**

**CAPÍTULO 1: “*High Prevalence of  $\alpha$ -Thalassemia Among Individuals with  
Microcytosis and Hypochromia without Anemia*”.....51**

**DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS.....79**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....93**

**APÊNDICES (1, 2 e 3).....105**

*Resumo*



## Resumo

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

A microcitose e a hipocromia, sem o concomitante aumento da HbA<sub>2</sub>, podem ser resultantes da presença de talassemia  $\alpha$ , de anemia por deficiência de ferro ou, ocasionalmente, da anemia de doenças crônicas. Não raramente, indivíduos com microcitose e hipocromia, sem anemia e sem a elevação da HbA<sub>2</sub>, são detectados em exames hematológicos de rotina. Com o objetivo de investigar qual a contribuição da talassemia  $\alpha$  nestes casos, foram analisados 339 indivíduos adultos (98 negróides e 241 caucasóides), atendidos nos ambulatórios do Hospital das Clínicas da Unicamp, com exceção do ambulatório de Hematologia Clínica, apresentando níveis de hemoglobina (Hb)  $\geq 12\text{g/dL}$  para mulheres e  $14\text{g/dL}$  para homens, volume corpuscular médio das hemácias (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM)  $\leq 80\text{fl}$  e  $27\text{pg}$ , respectivamente, e percentuais de Hb A<sub>2</sub> normais ou diminuídos ( $\leq 3.4\%$ ). Foram triadas, pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e análise com enzimas de restrição, as mutações que mais comumente causam talassemia  $\alpha$  nas populações de descendência africana e mediterrânea (deleções  $-\alpha^{3,7}$ ,  $-\alpha^{4,2}$ ,  $--^{\text{MED}}$ ,  $-(\alpha)^{20,5}$  e as formas não delecionais  $\alpha^{\text{Hph}}\alpha$ ,  $\alpha^{\text{NcoI}}\alpha$ ,  $\alpha\alpha^{\text{NcoI}}$  e  $\alpha^{\text{Tsaudi}}\alpha$ ), estas últimas pela primeira vez investigadas na população brasileira. Cento e sessenta e nove indivíduos (49,9%) apresentaram talassemia  $\alpha$ , sendo 100 caucasóides (29,5%) e 69 negróides (20,4%). Entre os caucasóides, 89 (36,9%) eram heterozigotos da deleção  $-\alpha^{3,7}$  ( $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ ), 6 (2,5%) eram homozigotos ( $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ ), 4 (1,7%) apresentaram a forma não delecional  $\alpha^{\text{Hph}}\alpha$  em heterozigose ( $\alpha^{\text{Hph}}\alpha/\alpha\alpha$ ) e 1 (0,4%) apresentou a deleção  $--^{\text{MED}}$ , em heterozigose ( $--^{\text{MED}}/\alpha\alpha$ ). Entre os negróides, 56 (57,1%) apresentaram o genótipo  $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ , 12 (12,2%) o

genótipo  $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$  e 1 (1,0%) apresentou a mutação  $\alpha^{\text{HphI}}\alpha$ , em heterozigose ( $\alpha^{\text{HphI}}\alpha/\alpha\alpha$ ). Estes resultados demonstram que a talassemia  $\alpha$  é uma importante causa de microcitose e hipocromia em indivíduos sem anemia na população analisada, contribuindo com cerca de 50% dos casos (48% deles causados pela deleção  $-\alpha^{3,7}$  e cerca de 2% por outras mutações, como a  $-\alpha^{\text{MED}}$  e a  $\alpha^{\text{HphI}}\alpha$ ). Apesar de ocorrer com altas frequências em populações negras, a presença da deleção  $-\alpha^{3,7}$  nos caucasóides é provavelmente devida ao elevado grau de miscigenação da população brasileira. Os dados aqui obtidos são de relevância clínica, uma vez que a microcitose e a hipocromia são comumente interpretadas como sinais de deficiência de ferro.

***Abstract***

## *Abstract*

Microcytosis and hypochromia, without the concomitant increase of HbA<sub>2</sub>, may be caused by  $\alpha$ -thalassemia, sideropenia or, occasionally, chronic disease anemia. Not rarely, individuals with microcytosis and hipochromia, without anemia and elevated HbA<sub>2</sub>, are detected on routine hematologic examination. In order to investigate the contribution of  $\alpha$ -thalassemia in these cases, 339 individuals (98 Blacks and 241 Caucasians), attended as outpatients at UNICAMP University Hospital, with the exception of those from the Clinical Hematology ambulatories, showing total Hb  $\geq 12\text{g/dl}$  for women and  $14\text{g/dl}$  for men, MCV and MCH  $\leq 80\text{fl}$  and  $27\text{pg}$ , respectively, and normal or decreased Hb A<sub>2</sub> ( $\leq 3,4\%$ ), were analyzed. Using PCR and restriction enzymes, the most common mutations causing  $\alpha$ -thalassemia in African and Mediterranean populations ( $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $--^{\text{MED}}$ ,  $-(\alpha)^{20.5}$  and nondeletional  $\alpha^{\text{Hph}}\alpha$ ,  $\alpha^{\text{NcoI}}\alpha$ ,  $\alpha\alpha^{\text{NcoI}}$  and  $\alpha^{\text{Tsaudi}}\alpha$  forms) were investigated, the latter for the first time among Brazilian people. One hundred sixty nine individuals (49,9%) showed  $\alpha$ -thalassemia: 100 Caucasians (29,5%) and 69 Blacks (20,4%). Among Caucasians, 89 (36,9%) were  $-\alpha^{3.7}$  heterozygotes ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ), 6 (2,5%) homozygotes ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ), 4 (1,7%) were heterozygous for the nondeletional  $\alpha^{\text{HphI}}\alpha$  ( $\alpha^{\text{HphI}}\alpha/\alpha\alpha$ ) and 1 (0,4%) was heterozygous for  $--^{\text{MED}}$  deletion ( $--^{\text{MED}}/\alpha\alpha$ ). Among Blacks, 56 (57,1%) had the  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  genotype, 12 (12,2%) the  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  genotype and 1 (1,0%) was heterozygous for  $\alpha^{\text{HphI}}\alpha$  ( $\alpha^{\text{HphI}}\alpha/\alpha\alpha$ ). These results demonstrate that, in the analyzed population,  $\alpha$ -thalassemia is an important cause of microcytosis and hypochromia in individuals without anemia, contributing with about 50% of the cases (48% caused by the  $-\alpha^{3.7}$  deletion and around 2% by other mutations,

such as --<sup>MED</sup> and  $\alpha^{\text{HphI}}$ ). Although the  $-\alpha^{3.7}$  deletion is known to occur at high frequencies in African descendants, its presence among Caucasians is probably due to the elevated degree of miscegenation of the Brazilian population. The data obtained here are of clinical relevance, once microcytosis and hypochromia are very often interpreted as indicators of iron deficiency.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

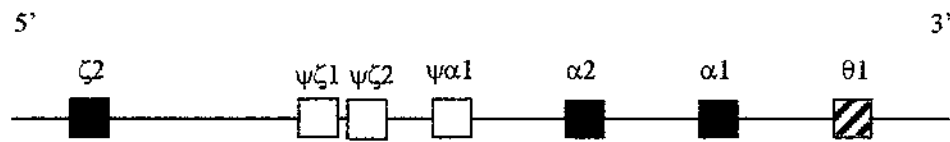
*Introdução Geral*

## INTRODUÇÃO

A hemoglobina (Hb) humana, uma proteína globular de peso molecular de 68.000 daltons, está localizada no interior dos glóbulos vermelhos; é formada por dois pares de cadeias globínicas, cada uma delas contendo seu grupo heme próprio, que se liga reversivelmente à molécula de oxigênio, cumprindo assim a função primária desta proteína, que é o transporte de  $O_2$ . Seis tipos de Hb são normalmente formados nos diferentes períodos de vida do indivíduo: a Hb Gower I ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), a Hb Gower II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ), e a Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ), encontradas no período embrionário; a Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ), predominante durante a vida fetal, e as Hbs A ( $\alpha_2\beta_2$ ) e  $A_2$  ( $\alpha_2\delta_2$ ), características da vida adulta, com percentuais de 95 e 2-3%, respectivamente. Em relação à Hb F, dois tipos de cadeias  $\gamma$  entram em sua composição, dependendo do aminoácido encontrado na posição 136: glicina ( $\gamma^G$ ) ou alanina ( $\gamma^A$ ) (Forget, 1979; Bunn & Forget, 1986; Hoffbrand & Pettit, 1993).

Os genes responsáveis pela síntese das cadeias globínicas estão separados em 2 *clusters*; o *cluster*  $\alpha$  está localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3), e inclui um gene da cadeia embrionária  $\zeta$  ( $\zeta_2$ ), 3 pseudogenes ( $\psi\zeta_1$ ,  $\psi\alpha_2$ ,  $\psi\alpha_1$ ), os genes  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$  e um gene de função indeterminada ( $\theta_1$ ), arrançados na seguinte ordem: 5'- $\zeta_2$ - $\psi\zeta_1$ - $\psi\alpha_2$ - $\psi\alpha_1$ - $\alpha_2$ - $\alpha_1$ - $\theta_1$ -3' (fig.1); o *cluster*  $\beta$  está localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5), e é composto pelos genes  $\varepsilon$ ,  $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ,  $\delta$  e  $\beta$  (5'- $\varepsilon$ - $\gamma^G$ - $\gamma^A$ - $\delta$ - $\beta$ -3'). Todos esses genes têm cerca de 1 a 2 kb, são compostos por 3 exons e 2 introns, e se expressam na ordem em que se encontram no cromossomo (5'→3'). O

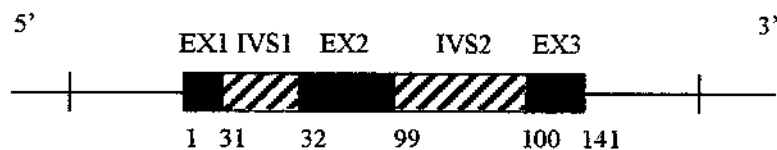
equilíbrio de síntese entre os genes dos agrupamentos  $\alpha$  e  $\beta$  é importante para formação dos tetrâmeros funcionais (Bunn e Forget, 1986; Weatherall e col, 1990).



**Figura 1 - AGRUPAMENTO ALFA (braço curto do cromossomo 16)**

- gene funcional
- pseudogene
- gene de função indeterminada

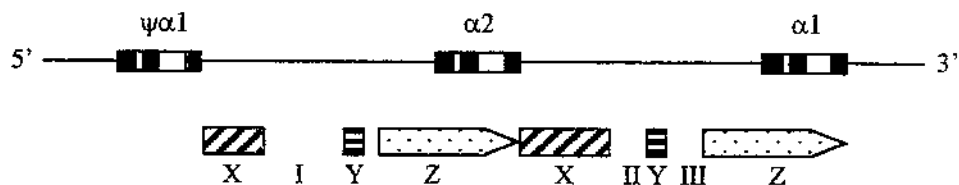
Os genes que codificam as cadeias  $\alpha$  são então duplicados ( $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ ); há uma grande similaridade entre eles, com apenas 17% de divergência, limitada ao intron 2 (IVS 2) e exon 3, na região 3' não codificante (fig.2). Como resultado, os dois genes produzem cadeias polipeptídicas idênticas. Apesar disso, o ritmo de transcrição não é equivalente: o nível de RNA mensageiro (mRNA) do gene  $\alpha_2$  predomina sobre o do gene  $\alpha_1$  numa proporção aproximada de 2,6:1, mas o dois genes funcionais são necessários para o balanço final das cadeias  $\alpha$  (Higgs e col., 1989).



**Figura 2 - GENES DA GLOBINA  $\alpha$  - ESTRUTURA**



Análises de DNA têm demonstrado que os genes das cadeias  $\alpha$  estão contidos em duas unidades duplicadas de aproximadamente 4 Kb de DNA, cuja seqüência idêntica tem sido mantida durante a evolução. Estas regiões estão divididas em três segmentos homólogos (X, Y e Z), intermeados por elementos não homólogos (I, II e III) (fig.3). O elevado grau de homologia entre estas duas unidades facilita o evento de *crossing over* desigual durante a meiose, resultando em deleções no complexo gênico (Zimmer e col., 1980; Higgs e col., 1989; Dodé e col., 1990; Dodé e col., 1993; Foglietta e col., 1996).



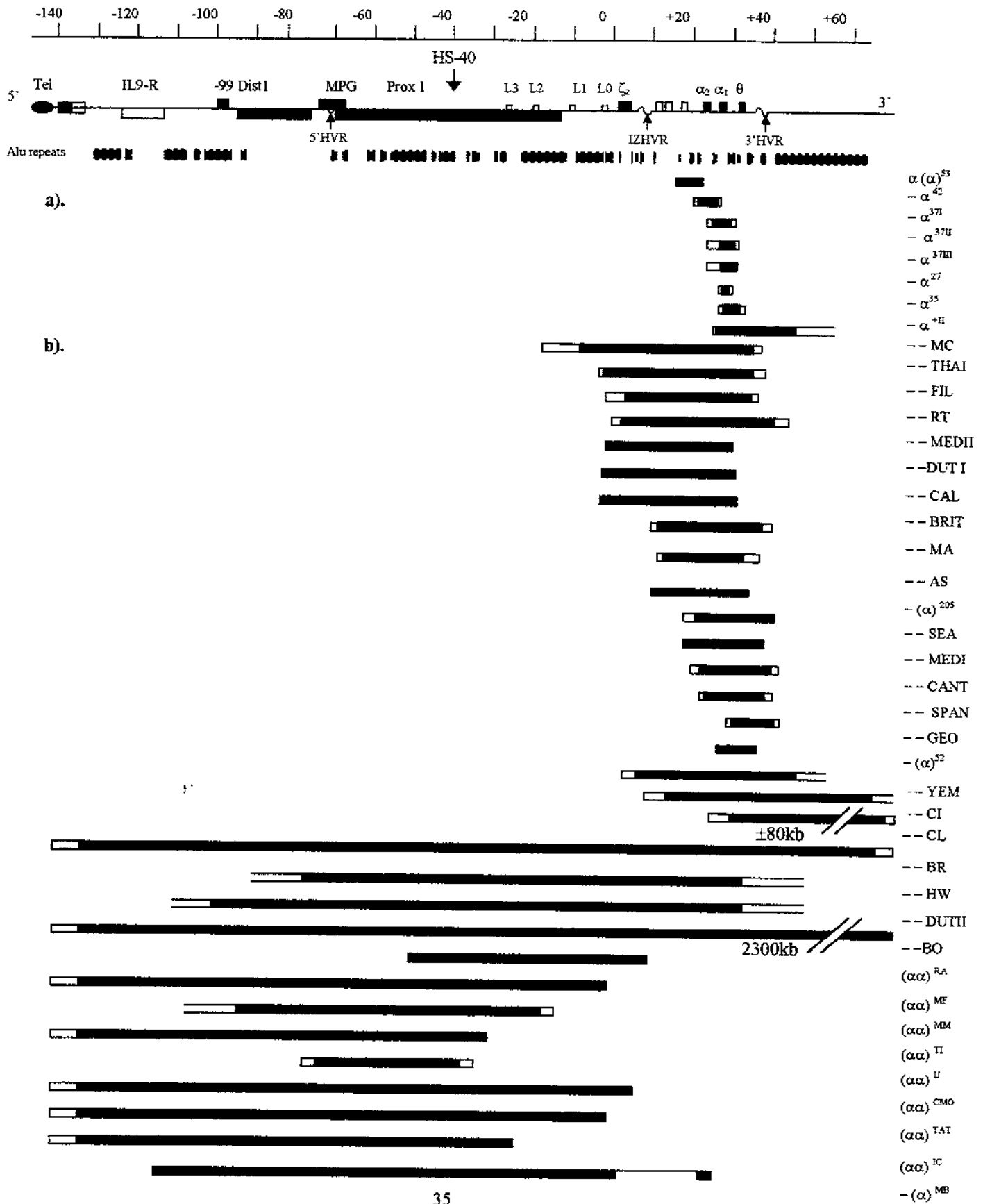
**Figura 3 - OS SUBSEGMENTOS HOMÓLOGOS X, Y, Z, CONTENDO OS GENES  $\alpha$**

As síndromes talassêmicas  $\alpha$  representam uma alteração genética freqüente, de distribuição mundial, ocasionada pela deficiência de síntese das cadeias  $\alpha$  da Hb. A redução de cadeias promove menor formação de Hb nos eritrócitos, causando microcitose e hipocromia, e levando ao acúmulo das outras cadeias cuja síntese está normal. Estas, em excesso, agrupam-se e formam tetrâmeros. Assim, no feto, as cadeias  $\gamma$  que se tetramerizam formam a Hb Bart's ( $\gamma_4$ ), que apresenta elevada afinidade pelo oxigênio, ocasionando hipóxia tecidual (Forget, 1979; Weatherall & Clegg, 1981). Com a substituição da produção das cadeias  $\gamma$  pelas cadeias  $\beta$ , no adulto, a concentração de Hb Bart's sofre redução progressiva, e as cadeias  $\beta$  em excesso dão

origem à Hb H ( $\beta_4$ ), que também possui elevada afinidade pelo oxigênio e é altamente instável, tendendo a precipitar nas hemácias com o seu envelhecimento, formando corpos de inclusão. Estes precipitados lesam a membrana celular e destroem prematuramente as hemácias, originando um quadro de anemia hemolítica crônica de intensidade moderada, clinicamente variável (Weatherall & Clegg, 1981; Bunn & Forget, 1986; Hoffbrand & Pettit, 1993; Foglietta e col., 1996).

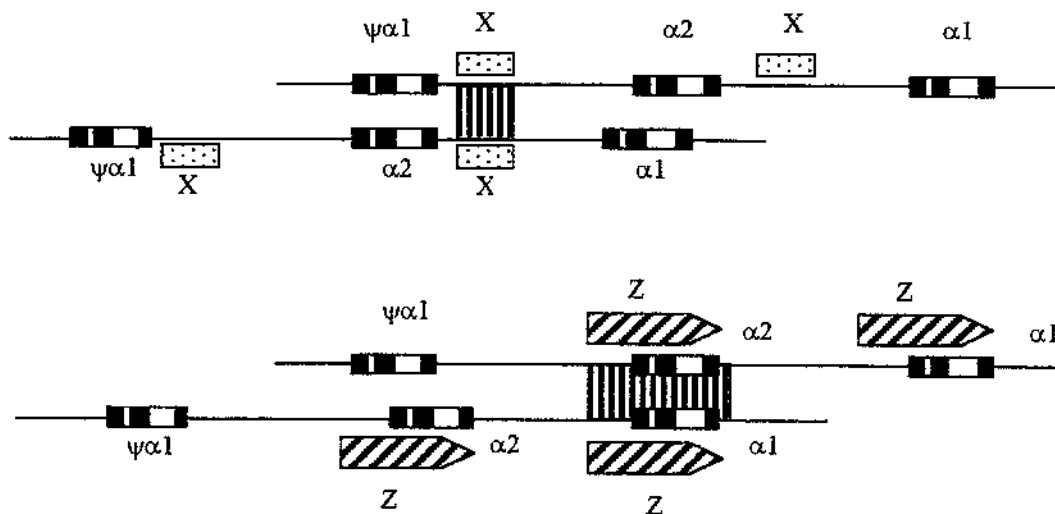
Embora uma grande variedade de mutações nos genes  $\alpha$  possam resultar em deficiência ou ausência de síntese de cadeias, a talassemia  $\alpha$  é frequentemente causada pela deleção de um ( $-\alpha$ ) ou dos dois ( $--$ ) genes  $\alpha$  no cromossomo. A supressão total da síntese de cadeias  $\alpha$  corresponde à talassemia  $\alpha^0$ , oriunda de deficiências envolvendo ambos os genes do mesmo cromossomo (haplótipo  $--$ ) ou, alternativamente, totalmente um dos genes e parcialmente o outro que, no entanto, permanece inativo, denominado gene disfuncional [haplótipo  $-(\alpha)$ ]. Mais raramente, ambos os genes  $\alpha$  encontram-se intactos [haplótipo  $(\alpha\alpha)$ ], mas sem expressão, pela deleção da região controladora do locus (LCR). A caracterização dessas deleções mostrou que várias delas removem o *cluster* inteiro, inclusive os genes  $\zeta_2$  e  $\theta_1$ ; outras deixam o gene  $\zeta_2$  intacto, que pode ou não se expressar na vida adulta, produzindo pequenas quantidades de cadeias  $\zeta$ , e outras, como já mencionado, removem a região controladora do locus (fig. 4). As deleções responsáveis pela talassemia  $\alpha^0$  resultam de eventos de recombinação não homóloga, cujos mecanismos não estão claramente definidos. As mais frequentes são as deleções  $--^{MED}$  e  $-(\alpha)^{20.5}$ , prevalentes nas regiões mediterrâneas, e a deleção  $--^{SEA}$ , no Sudeste Asiático. A primeira remove uma região de aproximadamente 18 Kb, da região 5' do  $\psi\zeta_1$  até o gene  $\theta_1$ ; a segunda

Figura 4 – Principais deleções que causam talassemia  $\alpha$ : a) deleções que removem um dos genes  $\alpha$  do genoma haploide, causando talassemia  $\alpha^+$ ; b) remoção ou inativação dos dois genes  $\alpha$ , causando talassemia  $\alpha^0$ .



remove uma região de 20.5 Kb, da região 5' do  $\psi\zeta_1$  até o gene  $\alpha_1$  (parcialmente envolvido), e a deleção  $-\alpha^{SEA}$  envolve a remoção de cerca de 20 Kb, incluindo os genes  $\psi\alpha_2$ ,  $\psi\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$  e  $\theta_1$  (Higgs e col., 1989; Traeger-Synodinos e col., Traeger-Synodinos e col., 1993; Foglietta e col., 1996; Kattamis e col., 1996; Chan e col., 1997).

A talassemia  $\alpha^+$  é, mais freqüentemente, resultante da deficiência de um dos dois genes  $\alpha$  no genoma haplóide (haplótipo  $-\alpha$ ), com conseqüente redução da síntese de cadeias  $\alpha$ . Este tipo de deleção é produzido por *crossing over* desigual, através do mecanismo demonstrado na figura 5. Das duas deleções esquematizadas, a primeira é causada pela perda de 4.2 kb de DNA por pareamento entre os segmentos  $X_2$  e  $X_1$ , sendo assim formados um cromossomo contendo a deleção ( $-\alpha^{4.2}$ , *leftward deletion*) e outro com o gene  $\alpha$  triplicado ( $\alpha\alpha\alpha^{anti\ 4.2}$ ) (Higgs e col., 1989; Bowden e col., 1992; Foglietta e col., 1996; Kattamis e col., 1996). A segunda deleção resulta da perda de 3.7 kb de DNA ( $-\alpha^{3.7}$ , *rightward deletion*), ocasionada por um *crossing over* desigual envolvendo os segmentos homólogos Z ( $Z_2$  e  $Z_1$ ); além do cromossomo contendo a deleção, é também produzido o correspondente cromossomo com genes  $\alpha$  triplicados ( $\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3.7}$ ) (Higgs e col., 1989; Dodé e col., 1993; Baysal & Huisman, 1994; Weatherall e col., 1990; Foglietta e col., 1996, Kattamis e col., 1996). A deleção  $-\alpha^{3.7}$  constitui a causa mais comum de talassemia  $\alpha$ , chegando, em algumas populações, a prevalências tão elevadas quanto 80% (Rees e col., 1998). É encontrada em negros e mediterrâneos (Embury e col., 1980) e, com menor freqüência, em asiáticos, enquanto a deleção  $-\alpha^{4.2}$  tem sido mais prevalente em asiáticos, embora também encontrada na Região Mediterrânea (Kattamis e col., 1996).



**Figura 5 - CROSSING OVER ENTRE CROMOSSOMOS DESALINHADOS, ORIGINANDO OS HAPLÓTIPOS  $-\alpha^{4,2}$  E  $\alpha\alpha^{\text{anti-4,2}}$  E  $-\alpha^{3,7}$  E  $\alpha\alpha^{\text{anti-3,7}}$**

Mutações de ponto e pequenas deleções ou inserções nos genes  $\alpha$  ou nas seqüências reguladoras *upstream* e *downstream* são causas menos comuns de talassemia  $\alpha$ , denominada não deletional ( $\alpha^T\alpha$  ou  $\alpha\alpha^T$ ). Estas mutações afetam o nível de transcrição do DNA, o processamento do mRNA, ou, ainda, a estabilidade da proteína (Harteveld e col., 1994). As mutações não deletionais mais freqüentemente encontradas nos genes  $\alpha$  são: (1) a deleção de um pentanucleotídeo (TGAGG), localizado na região 5' do primeiro intron do gene  $\alpha_2$  (IVS-I) e que envolve a seqüência de consenso necessária ao correto *splicing* do mRNA precursor, sendo denominada  $\alpha^{\text{HphI}}\alpha$  por remover um sítio de restrição para a enzima Hph I; (2) a substituição de um nucleotídeo no codon de iniciação do gene  $\alpha_2$  (ATG→ACG) ou do gene  $\alpha_1$  (ATG→GTG), denominada  $\alpha^{\text{NcoI}}\alpha$  ou  $\alpha\alpha^{\text{NcoI}}$ , respectivamente, porque remove um sítio de restrição para a

enzima Nco I (Hall e col., 1993; Kattamis e col., 1996); (3) a substituição de base na sequência de poliadenilação (AAATAA→AATAAG) do gene  $\alpha_2$  ( $\alpha^{\text{Tsaudi}}\alpha$ ), primeiramente descrita em populações da Arábia Saudita), que afeta a transcrição e a terminação do mRNA (Hall e col., 1993; Traeger-Synodinos e col., 1993); e (4) substituições no codon de terminação (TAA) produzindo cadeias  $\alpha$  alongadas e com ritmo de síntese diminuído (Hb Constant Spring e Hb Icaria, as mais comuns, a primeira em populações do Sudeste Asiático e a segunda em populações mediterrâneas) (Bunn & Forget, 1986; Makonkawkeyoon e col., 1993, Kattamis e col., 1996). Entre as Hbs instáveis que causam fenótipo  $\alpha$  talassêmico, estão as Hbs Quong Sze ( $\alpha_{125}$  Leu→Pro) e Suan Dok ( $\alpha_{109}$  Leu→Arg), encontradas no Sudeste Asiático, e a Hb Evanston ( $\alpha_{14}$  Trp→Arg), encontrada em famílias afro-americanas (Higgs e col., 1989; Kattamis e col., 1996; Harteveld e col., 1997). As formas não deletoriais são mais difíceis de serem detectadas e, por isso, bem menos estudadas que as formas deletoriais. O efeito fenotípico da interação entre elas, bem como da interação com as deleções, parece ser bastante heterogêneo e é ainda pouco compreendido (Stamatoyannopoulos e col., 1994).

Quanto ao quadro clínico e laboratorial das talassemias  $\alpha$ , os heterozigotos da talassemia  $\alpha^+$  (genótipo  $-\alpha/\alpha\alpha$ ) são clinicamente assintomáticos, apresentando níveis de Hb Bart's ao nascimento de 1-3%, e sem alterações laboratoriais na vida adulta. Os homozigotos ( $-\alpha/-\alpha$ ), também sem manifestações clínicas, apresentam discretas microcitose, hipocromia, anisocitose e poiquilocitose no sangue periférico; os recém nascidos possuem de 5-10% de Hb Bart's no sangue de cordão umbilical, enquanto os adultos apresentam padrão eletroforético de Hb normal, pois a Hb H, em pouca quantidade, é rapidamente proteolisada nas células. Os heterozigotos da talassemia  $\alpha^0$  ( $--/\alpha\alpha$ ), também com dois genes  $\alpha$  funcionais, exibem um quadro hematológico

semelhante ao dos homozigotos da talassemia  $\alpha^+$ . Dois estados apresentam manifestações clínicas: a homozigose da talassemia  $\alpha^0$  ( $--/--$ ), incompatível com a vida, levando à morte fetal ou neonatal por anemia acentuada e hidropisia grave, denominada Síndrome da Hidropisia Fetal por Hb Bart's (100%), e a interação  $\alpha^0/\alpha^+$  ( $--/-\alpha$ ), que resulta em anemia hemolítica crônica de intensidade moderada (Doença da Hb H), com microcitose e hipocromia, níveis de Hb Bart's entre 25 e 50% ao nascimento e de Hb H entre 5 e 30% na vida adulta (Pembrey e col., 1975; Weatherall & Clegg, 1981; Bunn & Forget, 1986; Hoffbrand e col., 1993; Foglietta e col., 1996; Chan e col., 1997). Os quadros clínicos e laboratoriais das diferentes formas de talassemia  $\alpha$  estão resumidos na Tabela I.

Tabela I – Diferentes Formas de Talassemia  $\alpha$

| DENOMINAÇÃO                             | GENÓTIPO          | ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS   |
|---|-------------------|---|
| Talassemia $\alpha^+$<br>Heterozigótica | $-\alpha/\alpha$  | 1-3% de Hb Bart's ao nascimento; alterações hematológicas mínimas ou ausentes   |
| Talassemia $\alpha^+$<br>homozigótica   | $-\alpha/-\alpha$ | 5-10% de Hb Bart's ao nascimento; discretas microcitose e hipocromia            |
| Talassemia $\alpha^0$<br>heterozigótica | $--/\alpha$       | Similares aos da talassemia $\alpha^+$ homozigótica                             |
| Talassemia $\alpha^0$<br>homozigótica   | $--/--$           | Aproximadamente 100% de Hb Bart's; Hidropisia Fetal por Hb Bart's               |
| Interação<br>$\alpha^0 / \alpha^+$      | $--/-\alpha$      | 25-50% de Hb Bart's ao nascimento; 5-30% de Hb H na vida adulta. Doença da Hb H |

Em relação à distribuição da talassemia  $\alpha$ , a forma  $\alpha^+$  ocorre amplamente por toda a África, na Região do Mediterrâneo, Oriente Médio e Sudeste da Ásia. A forma  $\alpha^0$  é mais restrita às populações do Mediterrâneo e Sudeste Asiático, sendo extremamente rara na África e no Oriente Médio. Ainda não se sabe como as formas não deletoriais encontram-se distribuídas, mas, em algumas populações particulares, elas são bem definidas, como em alguns habitantes das

ilhas mediterrâneas, em parte do Oriente Médio e no Sudeste da Ásia (Honig e col., 1984; Piratsu e col., 1984; Bunn & Forget, 1986; Henni e col., 1987; Oliveri e col., 1987; Makonkawkeyoon e col., 1993).

Um estudo realizado na Sardenha por Galanello e col. (1998), envolvendo 526 indivíduos com microcitose (VCM<79fl) e hipocromia (HCM<27pg), níveis normais ou diminuídos das Hbs A<sub>2</sub> e Fetal (<3,0% e <1,0%, respectivamente), e sem deficiência de ferro, indicou a presença de talassemia  $\alpha$  com 13 genótipos diferentes: 48% dos casos eram heterozigotos da deleção  $-\alpha^{3.7}$  ( $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ ), enquanto 25,5% eram homozigotos ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ); 13,6% apresentaram a forma não delecional  $\alpha^{\text{NcoI}}\alpha$ , enquanto a mutação  $\alpha^{\text{HphI}}\alpha$  foi detectada em 3,8% dos indivíduos analisados. Os demais genótipos, globalmente menos comuns, representaram cerca de 8% dos genótipos  $\alpha$ -talassêmicos naquela região. Uma heterogeneidade similar tem sido observada em outras populações mediterrâneas (Kattamis e col., 1996).

No Brasil, como esperado, a forma mais comum de talassemia  $\alpha$  é a  $\alpha^+$ , deleção  $-\alpha^{3.7}$ , introduzida principalmente pelos escravos africanos trazidos pelos colonizadores portugueses a partir do século XVI. Cerca de 23,5% da população negra de nossa região, Sudeste, é portadora desta alteração [Costa e col., 1989; Sonati e col., 1990; Sonati e col., 1991; Sonati e col., 1992 (a); Sonati e col., 1992 (b)]; a talassemia  $\alpha^0$ , pouco investigada, parece ser bem mais rara, havendo poucos casos descritos de Doença da Hb H [Zago e col., 1984; Zago e col., 1989; Sonati e col., 1992 (a); Sonati e col., 1996, Wenning e col., 2000]. Em relação às formas não delecionais, não existem estudos sistemáticos realizados, havendo casos esporádicos descritos (Wenning e col., 2000).



O diagnóstico da talassemia  $\alpha$  apresenta dificuldades. Os heterozigotos das talassemias  $\alpha^0$  e  $\alpha^+$  e os homozigotos da talassemia  $\alpha^+$  só podem ser diagnosticados na vida adulta por análise de DNA, pois a Hb Bart's desaparece após o período neonatal; além disso, a pouca quantidade produzida nos heterozigotos da talassemia  $\alpha^+$  (1-3%) pode muitas vezes não ser detectada pelos métodos rotineiramente empregados. A microcitose e a hipocromia são alterações hematológicas que não podem ser consideradas como exclusivas da talassemia  $\alpha$ , uma vez que são características das demais talassemias, como as talassemias  $\beta$ , da anemia ferropriva e, eventualmente, ocorrem nas anemias das doenças crônicas (Weatherall & Clegg, 1981; Higgs e col., 1989).

A metodologia inicialmente empregada na detecção da talassemia  $\alpha$  foi o Southern Blot e a hibridização com sondas moleculares correspondentes aos genes  $\alpha$  e  $\zeta$ , um método laborioso, demorado, e que requer a utilização de isótopos radiativos (Dacie & Lewis, 1995). Mais recentemente, novas estratégias têm sido propostas, empregando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida ou não da análise com enzimas de restrição, para detecção das mutações mais comuns (Bowden e col., 1992; Dodé e col., 1993; Baysal & Huisman, 1994; Kattamis e col., 1996; Galanello e col., 1998; Oron-Karni e col., 1998; Chong e col., 2000).

O Laboratório de Hematologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP realiza a rotina diária dos hemogramas provenientes de todos os ambulatórios do complexo hospitalar da UNICAMP. Não raramente, são observados dados hematimétricos alterados, com o volume corpuscular médio

(VCM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM) reduzidos, em indivíduos nos quais a taxa global de hemoglobina se encontra dentro da faixa de normalidade (sem anemia) e a HbA<sub>2</sub> em níveis normais ou diminuídos. A proposta do presente estudo foi avaliar a contribuição da talassemia  $\alpha$  como causa de microcitose e hipocromia nesta população, através da investigação molecular das formas mais comuns de talassemia  $\alpha$ , excluindo-se os pacientes atendidos nos ambulatórios de Hematologia Clínica, em função da elevada frequência de anemias carenciais e para se evitar o direcionamento das amostras.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

## ***Capítulo 1***

## *Capítulo 1*

HIGH PREVALENCE OF  $\alpha$ -THALASSEMIA AMONG INDIVIDUALS WITH  
MICROCYTOSIS AND HYPOCHROMIA WITHOUT ANEMIA

(Submetido para publicação no periódico *Brazilian Journal of Medical and Biological  
Research*)


Profa.Dra. Maria de Fátima Sonati  
Departamento de Patologia Clínica  
Faculdade de Ciências Médicas(FCM)  
Universidade Estadual de Campinas  
UNICAMP  
Caixa Postal 6111  
13083-970 Campinas, SP

**Ref.: MS3976** High prevalence of alfa-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. Eliane Borges, Márcia Regina Souza Cossa Wenning, Elza Myiuki Kimura, Sirley aparecida Gervásio, Fernando Ferreira Costa, Maria de Fátima Sonati

Prezada Dra. Maria de Fátima:

Temos a satisfação de comunicar a V.Sa. o recebimento do artigo acima mencionado, o qual se encontra em processo de análise de acordo com as normas da Revista. Favor utilizar o número da referência em futuras correspondências.

Atenciosamente,

  
Dalva Pizeta  
Editora Executiva

**HIGH PREVALENCE OF  $\alpha$ -THALASSEMIA AMONG INDIVIDUALS WITH  
MICROCYTOSIS AND HYPOCHROMIA WITHOUT ANEMIA**

E. Borges<sup>1</sup>, M.R.S.C. Wenning<sup>1</sup>, E.M. Kimura<sup>1</sup>, S.A. Gervásio<sup>1</sup>, F.F. Costa<sup>2</sup>, M.F. Sonati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinical Pathology Department, <sup>2</sup>Clinical Medicine Department, School of Medical Sciences, State University of Campinas-UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil.

Research supported by FAPESP (grants n° 97/11725-1 and 98/14532-2) and CNPq (grant n° 520059/95-6).

Correspondence to: M.F. Sonati, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6111, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil. Phone: (55)(19) 788-7064, Fax: (55)(19) 289-3273, e-mail: sonati@fcm.unicamp.br

**Running title:**  $\alpha$ -thalassemia as cause of microcytosis and hypochromia

**Key Words:**  $\alpha$ -thalassemia, microcytosis, hypochromia, hemoglobinopathies, Brazilian population.

## ABSTRACT

Microcytosis and hypochromia result from deficient hemoglobin synthesis in the red blood cells. Concomitant to normal or decreased levels of Hb A<sub>2</sub>, they may be caused by  $\alpha$ -thalassemia, sideropenia or chronic disease anemia. It is not rare that individuals with microcytosis and hypochromia without anemia are detected on routine hematological examination. In order to investigate the contribution of the  $\alpha$ -thalassemia in such cases, 339 adult individuals, attended as outpatients at Unicamp University Hospital (with the exception of the Clinical Hematology ambulatories), who showed normal hemoglobin (Hb) levels and reduced mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin (MCH), were analyzed. Ninety eight of them were Black (28.9%) and 241 were Caucasian (71.1%). In all cases, Hb A<sub>2</sub> and F levels were either normal or low. The most common deletional and nondeletional forms of  $\alpha$ -thalassemia [ $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $--^{MED}$ ,  $-(\alpha)^{20.5}$ ,  $\alpha^{HphI}$ ,  $\alpha^{NcoI}$ ,  $\alpha\alpha^{NcoI}$  and  $\alpha^{TSAUDI}$ ] were investigated using polymerase chain reaction (PCR) and restriction enzyme analyses. One hundred sixty nine individuals (49.9%) presented  $\alpha$ -thalassemia: 145 (42.8%) were heterozygous for the  $-\alpha^{3.7}$  deletion ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ), 18 (5.3%) homozygous ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ), 5 (1.5%) were heterozygous for the nondeletional form  $\alpha^{HphI}$  ( $\alpha^{HphI}/\alpha\alpha$ ) and 1 (0.3%) was  $--^{MED}$  carrier ( $--^{MED}/\alpha\alpha$ ). Among the Blacks, 56 (57.1%) showed the  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  genotype, whereas 12 (12.2%) were  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  and 1 (1.0%) was  $\alpha^{HphI}$  carrier; among the Caucasians, 89 (36.9%) were  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ , 6 (2.5%) had the  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  genotype, 4 (1.7%) presented the nondeletional form ( $\alpha^{HphI}/\alpha\alpha$ ) and 1 (0.4%) was  $--^{MED}$  carrier. The results demonstrate that  $\alpha$ -thalassemia, mainly through the  $-\alpha^{3.7}$  deletion, is an important cause of microcytosis and hypochromia in the analyzed population. These data are of clinical relevance, once these hematological alterations are often interpreted as indicators of iron deficiency.

## INTRODUCTION

Microcytosis and hypochromia are resultant from deficient hemoglobin (Hb) synthesis in erythroid cells, causing the reduction of the mean corpuscular volume (MCV) and the mean corpuscular hemoglobin (MCH) of the red blood cells, respectively. Without the increase of Hb A<sub>2</sub> levels, these hematological alterations may be due to  $\alpha$ -thalassemia, iron deficiency or, occasionally, chronic disease anemia (1,2).

Alpha-thalassemia is the most common genetic disorder of Hb synthesis in the world, with gene frequencies varying between 1% and 98% throughout the tropics and subtropics, where *Malaria falciparum* is or has been endemic, or in populations which received people from these areas through immigration (3-5). It results from an imbalance in the  $\alpha$ -globin chain production, which can be reduced ( $\alpha^+$ -thalassemia) or completely abolished ( $\alpha^0$ -thalassemia). Most commonly  $\alpha$ -thalassemia results from deletion of one ( $-\alpha$ ) or both ( $--$ ) of the duplicated  $\alpha$  genes ( $\alpha\alpha$ ) on chromosome 16p 13.3. Less frequently, it is caused by small deletions or point mutations (so-called nondeletional  $\alpha$ -thalassemia) involving the predominantly expressed  $\alpha_2$  gene ( $\alpha^T\alpha$ ) or rarely the  $\alpha_1$  gene ( $\alpha\alpha^T$ ), or yet by deletions outside the  $\alpha$ -cluster which leave the structural genes intact but without expression (3,6).

The  $\alpha$ -thalassemia phenotypes range from mild microcytic hypochromic anemia to a hemolytic anemia of variable severity characterized by the presence of Hb H in the case of loss of three functional  $\alpha$ -genes, or to the hydrops fetalis syndrome, characterized by severe intra-uterine anemia and fetal death at or around the time of birth, due to the loss of all four  $\alpha$ -globin genes (1-3). The most common cause of  $\alpha$ -thalassemia is a deletion of 3.7 Kb of DNA, originated by homologous recombination between misaligned chromosomes, which affects both  $\alpha$ -genes *in cis*



and results in a unique hybrid gene ( $\alpha_2\alpha_1$ ) ( $-\alpha^{3.7}$  deletion). The hematological alterations caused by this deletion, also known as rightward  $\alpha^+$ -thalassemia, can be very mild, if not silent (7-9). It is most prevalent in the African and Mediterranean regions. Other relatively frequent causes of  $\alpha$ -thalassemia are the  $-\alpha^{4.2}$  deletion (leftward  $\alpha^+$ -thalassemia), found in Asian and Mediterranean populations, the  $--^{MED}$  and  $-(\alpha)^{20.5}$  deletions, common causes of  $\alpha^0$ -thalassemia in the Mediterranean region and the  $--^{SEA}$  deletion, found with high frequency in Southeast Asia (7). Among the most common nondeletional forms, the  $\alpha^{Hph}\alpha$  is a pentanucleotide deletion in the splice donor site of IVS-I which abolishes a Hph I site in the  $\alpha_2$  gene; the  $\alpha^{NcoI}\alpha$  and the  $\alpha\alpha^{NcoI}$  are caused by base substitutions in the translational initiation codon ATG in the  $\alpha_2$  or in the  $\alpha_1$  gene, respectively, which presumably completely abolish translation and can be recognized by the loss of the Nco I site present in the initiation codon, and a third mutation,  $\alpha^{TSAUDI}\alpha$ , caused by a base substitution in the highly conserved polyadenylation signal sequence AATAAA, which must prevent endonucleolytic cleavage and poly A addition to the 3' end of mRNAs (7). They are all encountered in Mediterranean populations. In Brazil, the  $-\alpha^{3.7}$  deletion has been frequently found in the Black population (10,11), and the deletions  $--^{MED}$  and  $-(\alpha)^{20.5}$  have sporadically been described (12,13). One family with the nondeletional form  $\alpha^{Hph}\alpha$  has been recently reported (13).

It is not rare, in the clinical laboratory, to detect individuals with microcytosis and hypochromia, without anemia. In order to investigate the contribution of the  $\alpha$ -thalassemia in such cases, we analyzed 339 adult individuals, followed as outpatients at UNICAMP University Hospital (with the exception of the Clinical Hematology ambulatories), who showed normal Hb levels concomitant to reduced MCV and MCH and normal or decreased Hb A<sub>2</sub> (and F).

## ***MATERIALS AND METHODS***

### ***Subjects***

Three hundred thirty nine adult individuals (age > 14 years old), followed as outpatients at UNICAMP University Hospital, in Campinas, State of São Paulo, Southeast Brazil, with the exception of the Clinical Hematology ambulatories, were analyzed. They were chosen by presenting normal Hb levels (Hb  $\geq$  14g/dl for men and  $\geq$  12g/dl for women) and reduced MCV ( $\leq$  80fl) and MCH ( $\leq$  27pg. Ninety eight individuals were Black (28.9%) and 241 were Caucasian (71.1%). In all cases, Hb A<sub>2</sub> and F levels were normal or decreased ( $\leq$  3.4% and  $<$  2.0%, respectively).

### ***Methods***

Red blood cell indices were electronically determined (Cell Dyn 3500, Abbott), while Hb analyses were carried out following Weatherall & Clegg, 1981 (1).

DNA samples were obtained from peripheral blood leukocytes by organic extraction. With the exception of the  $-\text{SEA}$  deletion, all the other deletional and nondeletional forms of  $\alpha$ -thalassemia above mentioned were investigated by PCR-based methods. Rightward deletion ( $-\alpha^{3.7}$ ) was detected according to Dodé et al., 1993 (14);  $-\text{MED}$  and  $-(\alpha)^{20.5}$  were investigated as described by Bowden et al., 1992 (15), and the  $-\alpha^{4.2}$  leftward deletion was screened following Oron-Karni et al., 1998 (16). Nondeletional forms were investigated according to Hall et al., 1993 (17), using the correspondent restriction enzymes (Hph I and Nco I) and a specific nested PCR for  $\alpha^{\text{TSAUDI}}$  (15).

Serum ferritin levels were determined by automated quimioluminescent immunoenzymatic method (kit Immulite - Diagnostic Products Co., USA) for all  $\alpha$ -thalassemic cases, to make sure that the microcytosis and hypochromia were not due to a concomitant iron deficiency.

## **RESULTS**

The results are summarized in Tables 1 and 2. Among the 339 individuals studied, 169 (49.9%) presented  $\alpha$ -thalassemia: 145 (42.8%) were heterozygous for the  $-\alpha^{3.7}$  deletion ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ), 18 (5.3%) were homozygous ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ), 5 (1.5%) showed the nondeletional form ( $\alpha^{\text{HphI}}\alpha/\alpha\alpha$ ) and 1 case (0.3%) was  $-\text{MED}$  carrier ( $-\text{MED}/\alpha\alpha$ ). Among Blacks, 56 (57.1%) showed the  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  genotype, while 12 (12.2%) were  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  and 1 (1.0%) was ( $\alpha^{\text{HphI}}\alpha/\alpha\alpha$ ); among Caucasians, 89 (36.9%) were  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ , 6 (2.5%) had the  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  genotype and 4 (1.7%) were ( $\alpha^{\text{HphI}}\alpha/\alpha\alpha$ ). The  $-\text{MED}$  carrier belonged to this racial group (0.3%).

The serum ferritin levels determined for the  $\alpha$ -thalassemia cases were all above the low normal range values (9 ng/ml for women and 19 ng/ml for men).

## ***DISCUSSION***

The results obtained here demonstrate that the  $\alpha$ -thalassemia, mainly through the  $-\alpha^{3,7}$  deletion, is an important cause of microcytosis and hypochromia in individuals without anemia; they mean that non-anemic Brazilian Blacks, with low MCV and MCH, have 70.4% chance of carrying  $\alpha$ -thalassemia, whereas this chance is of 41.5% among Brazilian Caucasians, i.e., still high. The  $-\alpha^{3,7}$  deletion is known to occur at significant frequencies in Black populations (7); as in Brazil there is a elevated degree of miscegenation, it is seems that even in the non-Black population its prevalence is also high.

The present data are of clinical relevance, once microcytosis and hypochromia are often interpreted as indicators of iron deficiency and patients may be mistreated with oral iron therapy (18). In around 50% of the cases analyzed here, the cause of these hematological alterations was  $\alpha$ -thalassemia. It is possible that this proportion is still a little higher, because many silent mutations causing  $\alpha$ -thalassemia and other not so common deletions could not have been detected.

***ACKNOWLEDGMENTS.*** We thank Dr. Helena Z.W. Grotto and Ms. Carmen A.C. Aguiar for helping us with the serum ferritin determinations. We also thank to the Statistics Committee/FCM/UNICAMP for the statistical and computational analyses.

## REFERENCES

1. Weatherall DJ & Clegg JG (1981). *The Thalassaemia Syndromes*. 3<sup>rd</sup> edn. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
2. Bunn HF & Forget BG (1986). *Hemoglobin: Molecular, Genetics and Clinical Aspects*, W. B. Saunders, Philadelphia.
3. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ (1989). A review of the molecular genetics of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. *Blood*, 73: 1081-1104.
4. Kazazian Jr H (1990). The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol*, 27: 209-228.
5. Hartevelde KL, Losekoot M, Heister AJGAM, van der Wielen M, Giordano PC, Bernini LF (1997). *Hum Genet*, 100: 465-471.
6. Higgs DR (1993).  $\alpha$ -Thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol*, 6: 117-150.
7. Kattamis AC, Camaschella C, Sivera P, Surrey S & Fortina P (1996). Human  $\alpha$ -thalassaemia syndromes: detection of molecular defects. *American Journal of Hematology*, 53: 81-91.
8. Bianco I, Cappabianca MP, Foglietta E, Lerone M, Deidda G, Morlupi L, Grisanti P, Ponzini D, Rinaldi S, Graziani B (1997). Silent Thalassemsias: Genotypes and Phenotypes. *Haematologica*, 82: 269-280.
9. Galanello R, Sollaino C, Paglietti E, Barella S, Perra C, Doneddu I, Pirroni MG, Maccioni L, Cao A (1998).  $\alpha$ -thalassaemia carrier identification by DNA analysis in the screening for thalassaemia. *Am J Hematol*, 59: 273-278.

10. Sonati MF, Costa FF (1990). Hemoglobin Bart's in a Brazilian Black population. *Braz J Med Biol Res*, 23:395-6.
11. Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS & Costa FF (1991). High prevalence of  $\alpha$ -thalassemia in a Black population of Brazil. *Hemoglobin*, 15: 309-311.
12. Zago MA, Costa FF & Bottura C (1984). Hemoglobin H disease in three Brazilian families. *Revista Brasileira de Genética*, 7: 137-147.
13. Wenning MRSC, Kimura EM, Costa FF, Saad STO, Gervásio SA, de Jorge SB, Borges E, Silva NM, Sonati MF (2000).  $\alpha$ -globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. *Br J Med Biol Res*.
14. Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J & Rochette J (1993). Rapid analysis of  $-\alpha^{3.7}$  thalassaemia and  $\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$  triplication by enzymatic amplification analysis. *British Journal of Haematology*, 82: 105-111.
15. Bowden DK, Vickers MA & Higgs DR (1992). A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of  $\alpha$  thalassaemia. *British Journal of Haematology*, 81: 104-108.
16. Oron-Karni V, Filon D, Oppenheim A, Rund D (1998). Rapid detection of the common Mediterranean  $\alpha$ -globin deletions/rearrangements using PCR. *Am J Hematol*, 58: 306-310.
17. Hall GW, Thein SL, Newland CA, Chisholm JTS, Kanavakis E, Kattamis C & Higgs DR (1983). A base substitution (T $\rightarrow$ C) in codon 29 of the  $\alpha_2$ -globin gene causes  $\alpha$  thalassaemia. *British Journal of Haematology*, 85: 546-552.
18. Pearson HA, Ehrenkranz RA, Rinder HM (2000). Hemosiderosis in a Normal Child Secondary to Oral Iron Medication. *Pediatrics*, 105 (2): 429-431.

**TABLE 1 - Genotypes found among 339 individuals with microcytosis and hypochromia without anemia**

|                                | <b>Caucasians</b>  | <b>Blacks</b>     | <b>TOTAL</b>      |
|--------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| $\alpha\alpha/\alpha\alpha$    | 141 (41.6%)        | 29 (8.6%)         | 170 (50.1%)       |
| $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$   | 89 (26.3%)         | 56 (16.5%)        | 145 (42.7%)       |
| $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  | 06 (1.8%)          | 12 (3.5%)         | 18 (5.3%)         |
| $\alpha^{\text{HphI}}/\alpha$  | 04 (1.2%)          | 01 (0.3%)         | 05 (1.5%)         |
| $--^{\text{MED}}/\alpha\alpha$ | 01 (0.3%)          | -                 | 01 (0.3%)         |
| <b>TOTAL</b>                   | <b>241 (71.1%)</b> | <b>98 (28.9%)</b> | <b>339 (100%)</b> |

**TABLE 2 – Genotypes x racial origins of the individuals analyzed**

|                   | $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ | $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ | $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ | $\alpha^{HphI}/\alpha$ | $-\text{MED}/\alpha\alpha$ | <b>TOTAL</b> |
|-------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------|----------------------------|--------------|
| <b>Caucasians</b> | 58.5%                       | 36.9%                        | 2.5%                          | 1.7%                   | 0.4%                       | 100%         |
| <b>Blacks</b>     | 29.7%                       | 57.1%                        | 12.2%                         | 1.0%                   | -                          | 100%         |



## ***Discussão e Conclusões Gerais***

## Discussão e Conclusões Gerais

A microcitose e a hipocromia são resultantes da hemoglobinizacão deficiente das hemácias, seja pela carência de ferro, nas anemias ferroprivas, seja pela síntese prejudicada das cadeias globínicas, nas talassemias (Hoffbrand & Pettit, 1993). Como os valores hematimétricos (VCM e HCM) destas duas patologias podem ser similares, não raramente elas são confundidas, e, as talassemias, tratadas como deficiência de ferro, já que a anemia ferropriva, nos países em desenvolvimento, é ainda a principal causa de microcitose e hipocromia. É portanto importante que um correto diagnóstico seja feito, pois os portadores de talassemia, de uma forma geral, possuem estoques de ferro normais ou, eventualmente, aumentados (Bunn & Forget, 1986). A talassemia  $\beta$ , que ocorre em cerca de 1% da população caucasóide do Sudeste brasileiro, é mais conhecida dos clínicos e se caracteriza por níveis aumentados da Hb A<sub>2</sub>, muitas vezes em concomitância com o aumento da Hb Fetal (Zago & Costa, 1985). Já a talassemia  $\alpha$ , embora bastante freqüente (cerca de 23% da população negróide do Sudeste brasileiro e também presente na população caucasóide, em freqüência ainda não determinada), é pouco conhecida e os portadores das formas heterozigóticas ou não apresentam alterações eletroforéticas, ou possuem diminuição dos níveis da Hb A<sub>2</sub>, o que também ocorre na deficiência de ferro [Sonati & Costa, 1990; Sonati e col., 1991; Sonati e col., 1992 (b); Sonati e col., 1996; Wenning e col., 2000]. Nestes casos de talassemia  $\alpha$ , a discreta redução dos índices VCM e HCM pode ser interpretada como sinal de uma anemia ferropriva em estágio inicial.

O presente trabalho teve como objetivo principal demonstrar a importância da talassemia  $\alpha$  como causa de microcitose e hipocromia em indivíduos sem anemia. Foram analisados 356 pacientes, atendidos nos ambulatórios do Hospital das Clínicas/UNICAMP. Os critérios empregados na seleção das amostras foram os seguintes: (1) pacientes com idade superior a 14 anos, excluindo-se aqueles dos Ambulatórios de Doenças Hematológicas; (2) sem anemia (níveis de Hb total  $\geq 12\text{g/dl}$  para mulheres e  $14\text{g/dl}$  para homens); (3) com microcitose (VCM  $\leq 80\text{fl}$ ) e hipocromia (HCM  $\leq 27\text{pg}$ ), (4) com níveis de Hb A<sub>2</sub> e Hb F normais ou diminuídos ( $\leq 3,4\%$  e  $2,0\%$ , respectivamente). A análise das amostras consistiu da determinação automatizada dos valores hematológicos (número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM e RDW), da determinação do padrão eletroforético e quantificação das Hbs A<sub>2</sub> e F, e da análise de DNA, que envolveu a investigação das deleções  $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $--^{MED}$  e  $(-\alpha)^{20.5}$ , triadas por PCR, e das formas não delecionais  $\alpha^{HphI}$ ,  $\alpha^{NcoI}$ ,  $\alpha\alpha^{NcoI}$  e  $\alpha^{Tsaudi}$ , as três primeiras investigadas por análise de restrição com as respectivas enzimas, e a última através de *nested PCR*.

Dentre os 356 indivíduos selecionados, de acordo com os critérios supra citados, 17 (4,8%) foram excluídos por serem portadores da talassemia  $\beta$  (Hb A<sub>2</sub> $>3,4\%$ ); assim, 339 amostras de DNA (de 98 indivíduos negróides e 241 caucasóides) foram analisadas para detecção da presença de talassemia  $\alpha$ . O apêndice 1 resume a estatística descritiva dos casos estudados. Das 339 amostras, 169 (49,9%) apresentaram alguma forma de talassemia  $\alpha$ . Este grupo foi composto por 100 caucasóides (29,5%) e 69 negróides (20,4%); entre os

caucasóides, 89 (36,9%) apresentaram a deleção  $-\alpha^{3.7}$ , em heterozigose ( $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ ), 6 (2,5%) apresentaram a deleção em homozigose ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ), 4 (1,7%) apresentaram a forma não delecional  $\alpha^{\text{HphI}}\alpha$ , em heterozigose ( $\alpha^{\text{HphI}}\alpha/\alpha\alpha$ ) e 1 (0,4%) revelou ser heterozigoto da deleção  $-\alpha^{\text{MED}}$  ( $-\alpha^{\text{MED}}/\alpha\alpha$ ). Do total de indivíduos negróides, 56 (57,1%) apresentaram o genótipo  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ , 12 (12,2%) o genótipo  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$  e 1 (1,0%) apresentou a forma não delecional  $\alpha^{\text{HphI}}\alpha$ , também em heterozigose ( $\alpha^{\text{HphI}}\alpha/\alpha\alpha$ ). As demais formas de talassemia  $\alpha$ , delecionais ( $-\alpha^{4.2}$  e  $-(\alpha)^{20.5}$ ) e não delecionais ( $\alpha^{\text{NcoI}}\alpha$  e  $\alpha\alpha^{\text{NcoI}}$  e  $\alpha^{\text{TSaudi}}$ ) não foram detectadas nos demais indivíduos que fizeram parte do estudo. Esta foi a primeira vez que as formas não delecionais de talassemia  $\alpha$  foram sistematicamente investigadas em uma população brasileira.

Os resultados aqui obtidos demonstram a elevada contribuição da talassemia  $\alpha$  como causa de microcitose e hipocromia em indivíduos sem anemia de uma população brasileira. Eles têm relevância clínica porque podem alertar os médicos quanto às similaridades entre os achados laboratoriais das talassemias  $\alpha$  e da deficiência de ferro, ambas bastante frequentes em nossa população. Estudos de cinética de ferro têm demonstrado que a eritropoiese ineficaz e a hiperplasia eritróide estão associadas a um aumento da absorção gastrointestinal de ferro. A hemossiderose secundária é a maior causa de dano tecidual, morbidade e morte dos pacientes; ela sabidamente ocorre nas formas graves de talassemia  $\beta$ , onde é intensificada pelas seguidas transfusões sanguíneas, na talassemia intermediária independente de transfusão e na Doença da Hb H (Tso e col., 1984; Chim e col., 1998).

Estudos experimentais em camundongos portadores da deficiência de 2 genes  $\alpha$  ( $--\alpha\alpha$ ), que avaliaram a distribuição tecidual de ferro por absorção atômica e a absorção intestinal por captação de  $^{59}\text{Fe}$ , demonstraram que a concentração de ferro estava significativamente aumentada no fígado, no baço, nos rins e no coração quando comparada a controles não talassêmicos, e que, em geral, quanto maior a concentração detectada no parênquima hepático, maior é também nos demais tecidos onde o depósito ocorre (van Wyck e col., 1984). Em heterozigotos da talassemia  $\alpha^+$ , a sobrecarga de ferro é raramente encontrada; no entanto, Barton e col., em 1995, descreveram 7 casos de pacientes negros com estoques de ferro elevados, cujas anormalidades clínicas incluíam fraqueza e fadiga, diminuição da libido e impotência, hepatopatia, artropatia e diabetes mellitus, entre outras. Destes, 4 eram portadores de formas silenciosas de talassemia  $\alpha$ , cuja presença foi determinada pelas proporções de síntese de cadeias  $\alpha/\beta$  (genótipos não identificados), enquanto 2 outros eram portadores de HbS e HbC. Embora os autores sugiram que o aumento da absorção de ferro em Afro-americanos possa ter uma outra causa genética, eles não descartam a possibilidade de que formas discretas de anemias hereditárias possam contribuir com um certo aumento nesta absorção. Cumpre ressaltar que, entre os negros americanos, a sobrecarga hepática de ferro, avaliada em estudos que empregaram autópsias seriadas, é de 1,5% (Wurapa e col., 1993), enquanto a prevalência de talassemia  $\alpha$  é de 29,7% (Barton e col., 1995). Assim, não há consenso sobre a possibilidade de haver, nas formas mais discretas de talassemia  $\alpha$ , aumento ou não da absorção gastrointestinal de ferro, bem como sobre a possibilidade de que um portador, inadequadamente tratado com suplementação oral de ferro, venha a sofrer, a médio e longo prazos, algum tipo de dano tecidual resultante do acúmulo e dos efeitos oxidativos do ferro. Recentemente, Pearson e

col. descreveram, nos Estados Unidos, o caso de uma menina de 10 anos de idade, de descendência norte-européia, que desenvolveu hemossiderose por tratamento, por um período de 5 anos, com elevadas doses de sulfato ferroso, por queixa inicial de fadiga e palidez que não se corrigiram com as doses habitualmente prescritas do medicamento. A taxa global de Hb e o VCM encontravam-se no limite inferior da faixa de normalidade para a idade, o que levou à decisão de administração do ferro, apesar do valor da ferritina sérica não ser compatível com a deficiência de ferro. Esse caso ilustra como a redução do VCM é comumente considerada pelos clínicos como um sinal indicativo da deficiência de ferro, podendo, inclusive, nortear a conduta clínica (Pearson e col., 2000). Os dados de determinação da ferritina sérica dos portadores de talassemia  $\alpha$  aqui detectados encontram-se no apêndice 2, porém sua interpretação é dificultada pelo fato de serem pacientes de diferentes clínicas e, portanto, com diferentes doenças de base e submetidos a diferentes tratamentos, o que poderia estar interferindo nos resultados obtidos.

O apêndice 3 contém a análise estatística comparativa dos dados obtidos no presente estudo. Empregando-se os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, e os programas computacionais “Statistical Analysis System for Windows”, versão 6.12 (SAS Institute Inc., USA) e “SPSS for Windows”, versão 10.0.5 (SPSS Inc., USA), verificou-se diferença significativa das médias dos parâmetros idade, glóbulos vermelhos (GV), VCM, HCM e RDW (*Red Cell Distribution Width*, amplitude da distribuição dos eritrócitos) quando comparados indivíduos com genótipo  $\alpha$  normal, heterozigotos e homozigotos da deleção  $-\alpha^{3.7}$  (os casos de  $\alpha^{\text{Hphl}}$  e  $-\text{MED}$  não foram incluídos nas comparações); observou-se ainda diferença significativa das médias dos GV, do hematócrito e do RDW entre

caucasóides e negróides. A Curva ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve*) (Fleiss, 1981; Everitt, 1995; Fletcher e col., 1996) permitiu estabelecer que, dentre os parâmetros que diferiram significativamente, o RDW era o de maior sensibilidade e especificidade na detecção da talassemia  $\alpha$ , como se pode verificar pela figura correspondente, diferindo, inclusive, entre negróides e caucasóides.

Finalizando, é importante ressaltar que a etiologia da microcitose e da hipocromia dos indivíduos não talassêmicos não foi investigada no presente trabalho, embora possa vir a ser objeto de estudo de uma próxima investigação.

## ***Referências Bibliográficas***



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - BARTON, J.C.; EDWARDS, C.Q.; BERTOLI, L.F.; SHROYER, T. W.; HUDSON, S.L. Iron overload in Africans Americans. *Am J Med*, 99:616-623, 1995.
- 02 - BAYSAL E.; HUTSMAN T.H.J. Detection of common deletional  $\alpha$ -thalassemia determinants by PCR. *Am J Hematol*, 46:208-213, 1994.
- 03 - BOWDEN, D.K.; HIGGS, D.R.; VICKERS, M.A. A PCR based strategy to detect the common severe determinants of  $\alpha$ -thalassemia. *Br J Haematol*, 81:104-108, 1992.
- 04 - BUNN, H.F. e FORGET, B.G. *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*. Philadelphia, London, Toronto, W.B. Saunders Company, 1986.
- 05 - CHAN, V.; CHAN, W.Y.; TANG, M.; LAU, K.; TODD, D.; CHAN, T.K. Molecular defects in Hb H hydrops fetalis. *Br J Haematol*, 96:224-228, 1997.
- 06 - CHIM, C.S.; CHAN, V.; TODD, D. Hemosiderosis with diabetes mellitus in untransfused hemoglobin H disease. *Am J Hematol*, 57:160-163, 1998.
- 07 - CHONG, S.S.; BOEHM, C.D.; HIGGS, D.R.; CUTTING, G.R. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of  $\alpha$ -thalassemia. *Blood*, 95:360-362, 2000.
- 08 - COSTA, F.F., TAVELLA, M.H., ZAGO, M.A. Deletion type  $\alpha$ -thalassemia among Beazilian patients with sickle cell anemia. *Rev Brasil Genet*, 12 (3): 605-611, 1989.
- 09 - DACIE, J.V & LEWIS, S.M. *Practical Haematology*. 8<sup>th</sup> edn. Churchill, Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York, 1995.
- 10 - DODÉ, C.; ROCHETTE, J.; KRISHNAMOORTHY, R. Locus assignment of human  $\alpha$  globin mutations by selective amplification and direct sequencing. *Br J Haematol*, 76:275-281, 1990.
- 12 - DODÉ, C.; KRISHNAMOORTHY, R.; LAMB, J.; ROCHETTE, J. Rapid analysis of  $-\alpha^{3.7}$  thalassemia and  $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$  triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol*, 83:105-111, 1993.
- 13 - EMBURY, S.H.; MILLER, J.A.; DOZY, A.M.; KAN, Y.W.; CHAN, V.; TODD, D. Two different molecular organizations account for the single  $\alpha$ -globin gene of the  $\alpha$ -thalassemia-2 genotype. *J Clin Invest*, 66:1319-1325, 1980.
- 14 - EVERITT, B.S. *The Cambridge Dictionary of Statistics in the Medical Sciences*. New York, Cambridge University Press, 1995.

- 15- FLEISS, J.L. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Wiley & Sons, 1981.
- 16- FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H. *Epidemiologia Clinica – Elementos Essenciais*. 3<sup>a</sup> ed. Porto Alegre, Artes Médicas, 1996.
- 17 – FOGLIETTA, E.; DEIDDA, G.; GRAZIANI, B.; MODIANO, G.; BIANCO, I. Detection of  $\alpha$ -globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica*, 81:387-389, 1996.
- 18 – FORGET, B.G. Molecular Genetics of Human Hemoglobin Synthesis. *Ann Intern Med*, 91 (4):605, 1979.
- 19 – GALANELLO, R.; SOLLAINO, C.; PAGLIETTI, E.; BARELLA, S.; PERRA, C.; DONEDDU, I.; PIRRONI, M.; MACCIONI, L.; CAO, A.  $\alpha$ -thalassemia carrier identification by DNA analysis in the screening for thalassemia. *Am J Hematol*, 59:273-278, 1998.
- 20 – HALL, G.W.; THEIN, S.L.; NEWLAND, A.C.; CHISHOLM, M.; TRAEGER - SYNODINOS, J.; KANAVAKIS, E.; KATTAMIS, C.; HIGGS, D.R. A base substitution (T→C) in codon 29 of the  $\alpha_2$ -globin gene causes a thalassemia. *Br J Haematol*, 85:546-552, 1993.
- 21 – HARTEVELD, K.L.; LOSEKOOT, M.; HAAK, H.; HEISTER, G.M.; GIORDANO, P.C.; BERNINI, L.R. A novel polyadenylation signal mutation in the  $\alpha_2$ -globin gene causing  $\alpha$ -thalassemia. *Br J Haematol*, 87:139-146, 1994.
- 22 - HARTEVELD, K.L.; LOSEKOOT, M.; HEISTER, A.J.G.A.M.; WIELEN, M.; GIORDANO, P.C.; BERNINI, L.F.  $\alpha$ -Thalassemia in the Netherlands: a heterogeneous spectrum of both deletions e point mutations. *Hum Genet*, 100:465-471, 1997.
- 23 – HENNI, T.; MORLÉ, F.; LOPEZ, B.; COLONNA, P.; GODET, J.  $\alpha$  thalassemia haplotypes in the Algerian population. *Hum Genet*, 75:272-276, 1987.
- 24 – HIGGS, D.R.; VICKER, M.A.; WILKIE, A.O.M.; PRETORIUS, I.M.; JARMAN, A.P.; WEATHERALL, D.J. A review of the molecular genetics of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. *Blood*, 73(5):1801-1907, 1989.
- 25 – HOFFBRAND, A.V. & PETTIT, J.E. *Essential Haematology*. 3<sup>rd</sup> ed, London, Edinburgh, Boston, Blackwell Scientific Publications, 1993.

- 26 – HONIG, G.R.; SHAMSUDIM, M.; VIDA, L.N.; MOMPOINT, M.; VALCOURT, E.; BOWIE, L.J.; JONES, E.C; POWERS, P.A; SPRITZ, R.A; GUIIS, M.; EMBURY, S.H.; CONBOY, J.; KAN, Y.W.; MENTZER, W.C.; WEIL, S.C.; HIRATA, R.K.; WALOCK, J.; O'RIORDAN, J.F.; GOLDSTICK, T.K. Hemoglobin Evanston ( $\alpha$  14 Trp→Arg), an unstable  $\alpha$ -chain variant expressed as  $\alpha$  thalassemia. *J Clin Invest* 73:1740-1749, 1984.
- 27 – KATTAMIS, A.C.; CAMASCHELLA, C.; SIVERA, P.; SURREY, S.; FORTINA, P. Human  $\alpha$ -thalassemia syndromes: detection of molecular defects. *Am J Hematol*, 53:81-91, 1996.
- 28 - MAKONKAWKEYOON, L.; SANGUANSEMSRI, T.; ASATO, T.; NAKASHIMA, Y.; TAKEI, H. Rapid detection of chain termination mutations in the  $\alpha_2$  globin gene. *Blood*, 82:3503-3504, 1993.
- 29 – OLIVIERI, N.F., CHANG, L.S., POON, AO., ICHELSON, A.M., ORKIN, S.H. An  $\alpha$  globin gene initiation codon mutation in black family with HbH disease. *Blood*, 67:469-473, 1987.
- 30 – ORON-KARNI, V.; FILON, D.; OPPENHEIM, A.; RUND, D. Rapid detection of the common Mediterranean  $\alpha$ -globin deletions/rearrangements using PCR. *Am J Hematol*, 58:306-310, 1998.
- 31 - PEARSON, H.A; EHRENKRANZ, R.A.; RINDER, H.M.. Hemosiderosis in a Normal Child Secondary to Oral Iron Medication. *Pediatrics*, 105 (2): 429-431, 2000.
- 32 – PEMBREY, M.E.; WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B.; BUNCH, C.; PERRINE, R.P. Haemoglobin Bart's in Saudi Arabia. *Br J Haematol*, 29:221-225, 1975.
- 33 – PIRASTU, M.; SAGLIO, G.; CHANG, J.C.; CAO, A; KAN, Y.W. Initiation codon mutation as a cause of  $\alpha$  thalassemia. *J Biol Chem*, 259:12315-12317, 1984.
- 34 - SONATI, M.F & COSTA, F.F. Hemoglobin Bart's in a Brazilian Black Population. *Brazilian J Med Biol Res*, 23: 395-396, 1990.
- 35 - SONATI, MF; FARAH, SB; RAMALHO, AS; COSTA, FF. High prevalence of  $\alpha$ -thalassemia in a Black Population of Brazil. *Hemoglobin*, 15(4): 309-311, 1991.
- 36 - SONATI, MF; KIMURA, EM; GROTTTO, HZW; TAVELLA, MH; COSTA, FF. Hb H Disease associated with the (--med) deletion in a Brazilian Black Woman. *Acta Haematologica*, 87: 145-147, 1992. (a)
- 37 - SONATI, MF; KIMURA, EM; COSTA, FF. Red cell indices and alpha-thalassemia. *Brazilian J Genetics*, 15: 687-693, 1992. (b)

- 38 - SONATI, MF; KIMURA, EM; GROTO, HZW; GERVASIO, SA; Costa, FF. Hereditary Hemoglobinopathies in a Population from South-East Brazil. *Hemoglobin*, 20(2): 175-179, 1996.
- 39 - STAMATOYANNOPOULOS, G.; NIENHUIS, A.W.; MAJERUS, P.W. *The Molecular Basis of Blood Disease*. 2<sup>nd</sup> ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 1994.
- 40 - TRAEGER-SYNODINOS, J.; KANAVAKIS, E.; TZETIS, M.; KATTAMIS, A.; KATTAMIS, C. Characterization of nondeletion  $\alpha$  thalassemia mutations in the Greek population. *Am J Hematol*, 44:162-167, 1993.
- 41 - TSO, S.C.; LOH, T.T.; TODD, D. Iron overload in patients with haemoglobin H disease. *Scand J Haematol*, 32:391, 1984.
- 42 - VAN WYCK, D.B.; POPP, R.A.; FOXLEY, J.; WITTE, C.L.; WITTE, C.L.; CROSBY, W.H. Spontaneous iron overload in alpha-thalassemia mice. *Blood*, 64(1):263-266, 1984.
- 43 - WEATHERALL, D.J. The Thalassemias. In: WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERLEV, A.J.; LICHTMAN, M.A. *Hematology*. 5th edn, Mc Graw Hill Book Company, New York, St Louis, Auckland, Guatemala, Hamburg, Johannesburg, Lisbon, Madrid, Mexico, Montreal, New Delhi, Panama, Paris, San Juan, São Paulo, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto, 1990. pp 510-539.
- 44 - WEATHERALL, D.J. & CLEGG, JG. *The Thalassaemia Syndromes*. 3<sup>rd</sup> edn., Blacwell Scientific Publications, Oxford, 1981.
- 45 - WENNING, M.R.S.C; KIMURA, E.M.; COSTA, F.F.; SAAD, S.T.O; GERVASIO, S.; DE JORGE, S.B.; BORGES, E.; SILVA, N.M.; SONATI, M.F. Thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. *Br J Med Biol Res*, 33:1041-1045, 2000.
- 46 - WURAPA, R.K.; GORDEUK, V.R.; BRITTENHAM, G.M. Iron overload in African Americans. *Blood*, 82 (suppl 1):95A, 1993.
- 47 - ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; BOTTURA, C. Hemoglobin H disease in three Brazilian families. *Rev Bras Genet*, 7: 137-147, 1984.
- 48 - ZAGO, M.A. & COSTA, F.F.. Hereditary Haemoglobin disorders in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79:385-388, 1985.
- 49 - ZAGO, M.A; PAÇÓ-LARSON, M.L. Hemoglobin H Disease caused by two gene deletions. *Brazilian J Med Biol Res*, 22:675-681, 1989.

50 – ZIMMER, E.A.; MARTIN, S.L.; BEVERLEY, S.M.; KAN, Y.W & WILSON, A.C.  
Rapid duplication and loss of genes coding for the  $\alpha$  chains of hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77: 2158-2162, 1980.

*Apêndices*

# Apêndice 1

Tabela 1. Frequências das variáveis categóricas.

| <p>PC1 - para o grupo <math>\alpha^{10}</math></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>PC1</th> <th>Frequency</th> <th>Percent</th> <th>Cumulative Frequency</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HETEROC</td> <td>145</td> <td>41.9</td> <td>145</td> </tr> <tr> <td>POCOS</td> <td>12</td> <td>3.2</td> <td>157</td> </tr> <tr> <td>NORMAL</td> <td>178</td> <td>51.9</td> <td>339</td> </tr> </tbody> </table> |           |         |                      | PC1      | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | HETEROC      | 145 | 41.9  | 145 | POCOS        | 12  | 3.2  | 157 | NORMAL | 178 | 51.9 | 339 |
|---|-----------|---------|----------------------|----------|-----------|---------|----------------------|--------------|-----|-------|-----|--------------|-----|------|-----|--------|-----|------|-----|
| PC1   | Frequency | Percent | Cumulative Frequency |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| HETEROC   | 145       | 41.9    | 145                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| POCOS   | 12        | 3.2     | 157                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| NORMAL  | 178       | 51.9    | 339                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| <p>PC2 - para o grupo <math>\alpha^{10}</math></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>PC2</th> <th>Frequency</th> <th>Percent</th> <th>Cumulative Frequency</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NORMAL</td> <td>176</td> <td>100.0</td> <td>176</td> </tr> </tbody> </table>  |           |         |                      | PC2      | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | NORMAL       | 176 | 100.0 | 176 |              |     |      |     |        |     |      |     |
| PC2   | Frequency | Percent | Cumulative Frequency |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| NORMAL  | 176       | 100.0   | 176                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| <p>PC3 - para o grupo <math>\alpha^{10}</math></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>PC3</th> <th>Frequency</th> <th>Percent</th> <th>Cumulative Frequency</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HETEROC</td> <td>1</td> <td>0.5</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>NORMAL</td> <td>175</td> <td>99.4</td> <td>176</td> </tr> </tbody> </table>  |           |         |                      | PC3      | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | HETEROC      | 1   | 0.5   | 1   | NORMAL       | 175 | 99.4 | 176 |        |     |      |     |
| PC3   | Frequency | Percent | Cumulative Frequency |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| HETEROC   | 1         | 0.5     | 1                    |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| NORMAL  | 175       | 99.4    | 176                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| <p>PC4 - para o grupo <math>\alpha^{10}</math></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>PC4</th> <th>Frequency</th> <th>Percent</th> <th>Cumulative Frequency</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NORMAL</td> <td>175</td> <td>100.0</td> <td>175</td> </tr> </tbody> </table>  |           |         |                      | PC4      | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | NORMAL       | 175 | 100.0 | 175 |              |     |      |     |        |     |      |     |
| PC4   | Frequency | Percent | Cumulative Frequency |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| NORMAL  | 175       | 100.0   | 175                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| <p>PC5 - para o grupo não deletional <math>\alpha^{10}</math></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>PC5</th> <th>Frequency</th> <th>Percent</th> <th>Cumulative Frequency</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HETEROC</td> <td>5</td> <td>2.9</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NORMAL</td> <td>170</td> <td>97.1</td> <td>175</td> </tr> </tbody> </table> <p>Frequency Missing = 164</p>                        |           |         |                      | PC5      | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | HETEROC      | 5   | 2.9   | 5   | NORMAL       | 170 | 97.1 | 175 |        |     |      |     |
| PC5   | Frequency | Percent | Cumulative Frequency |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| HETEROC   | 5         | 2.9     | 5                    |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| NORMAL  | 170       | 97.1    | 175                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| <p>PC6 - para os grupos não deletional <math>\alpha^{10}</math> e <math>\alpha^{11}</math></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>PC6</th> <th>Frequency</th> <th>Percent</th> <th>Cumulative Frequency</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NORMAL</td> <td>173</td> <td>100.0</td> <td>173</td> </tr> </tbody> </table>  |           |         |                      | PC6      | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | NORMAL       | 173 | 100.0 | 173 |              |     |      |     |        |     |      |     |
| PC6   | Frequency | Percent | Cumulative Frequency |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| NORMAL  | 173       | 100.0   | 173                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| <p>PC7 - para o grupo não deletional <math>\alpha^{10}</math></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>PC7</th> <th>Frequency</th> <th>Percent</th> <th>Cumulative Frequency</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NORMAL</td> <td>170</td> <td>100.0</td> <td>170</td> </tr> </tbody> </table>   |           |         |                      | PC7      | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | NORMAL       | 170 | 100.0 | 170 |              |     |      |     |        |     |      |     |
| PC7   | Frequency | Percent | Cumulative Frequency |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| NORMAL  | 170       | 100.0   | 170                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| <p>PC8 - para o grupo <math>\alpha^{10}</math></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>PC8</th> <th>Frequency</th> <th>Percent</th> <th>Cumulative Frequency</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HETEROC</td> <td>241</td> <td>71.1</td> <td>241</td> </tr> <tr> <td>NBS</td> <td>98</td> <td>28.9</td> <td>339</td> </tr> </tbody> </table>   |           |         |                      | PC8      | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | HETEROC      | 241 | 71.1  | 241 | NBS          | 98  | 28.9 | 339 |        |     |      |     |
| PC8   | Frequency | Percent | Cumulative Frequency |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| HETEROC   | 241       | 71.1    | 241                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| NBS   | 98        | 28.9    | 339                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| <p>PC9</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>PC9</th> <th>Frequency</th> <th>Percent</th> <th>Cumulative Frequency</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>F</td> <td>351</td> <td>74.0</td> <td>351</td> </tr> <tr> <td>M</td> <td>98</td> <td>26.0</td> <td>339</td> </tr> </tbody> </table>   |           |         |                      | PC9      | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | F            | 351 | 74.0  | 351 | M            | 98  | 26.0 | 339 |        |     |      |     |
| PC9   | Frequency | Percent | Cumulative Frequency |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| F   | 351       | 74.0    | 351                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| M   | 98        | 26.0    | 339                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| <p>PC10</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>PC10</th> <th>Frequency</th> <th>Percent</th> <th>Cumulative Frequency</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AS</td> <td>13</td> <td>100.0</td> <td>13</td> </tr> </tbody> </table> <p>Frequency Missing = 326</p>   |           |         |                      | PC10     | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | AS           | 13  | 100.0 | 13  |              |     |      |     |        |     |      |     |
| PC10  | Frequency | Percent | Cumulative Frequency |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| AS  | 13        | 100.0   | 13                   |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| <p>PC11 - para o grupo <math>\alpha^{10}</math></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>TALASSEM</th> <th>Frequency</th> <th>Percent</th> <th>Cumulative Frequency</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NÃO</td> <td>170</td> <td>50.1</td> <td>170</td> </tr> <tr> <td>SIM</td> <td>169</td> <td>49.9</td> <td>339</td> </tr> </tbody> </table>  |           |         |                      | TALASSEM | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | NÃO          | 170 | 50.1  | 170 | SIM          | 169 | 49.9 | 339 |        |     |      |     |
| TALASSEM  | Frequency | Percent | Cumulative Frequency |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| NÃO   | 170       | 50.1    | 170                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| SIM   | 169       | 49.9    | 339                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| <p>PC12 - para o grupo <math>\alpha^{10}</math></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>CADRADEL</th> <th>Frequency</th> <th>Percent</th> <th>Cumulative Frequency</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HB A2 + HB A</td> <td>326</td> <td>96.2</td> <td>326</td> </tr> <tr> <td>HBAC+HBS+HEA</td> <td>13</td> <td>3.8</td> <td>339</td> </tr> </tbody> </table>  |           |         |                      | CADRADEL | Frequency | Percent | Cumulative Frequency | HB A2 + HB A | 326 | 96.2  | 326 | HBAC+HBS+HEA | 13  | 3.8  | 339 |        |     |      |     |
| CADRADEL  | Frequency | Percent | Cumulative Frequency |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| HB A2 + HB A  | 326       | 96.2    | 326                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |
| HBAC+HBS+HEA  | 13        | 3.8     | 339                  |          |           |         |                      |              |     |       |     |              |     |      |     |        |     |      |     |

**Tabela 2. Estatísticas descritivas das variáveis contínuas.**

| Variável         | Estatísticas Descritivas |        |        |      |         |      |
|------------------|--------------------------|--------|--------|------|---------|------|
|                  | N                        | MEDIA  | DP     | MAX  | MEDIANA | MIN  |
| Idade (anos)     | 339                      | 38.47  | 15.69  | 79   | 38      | 14   |
| GV               | 339                      | 5.22   | 0.52   | 7.67 | 5.13    | 4.13 |
| HB               | 339                      | 13.38  | 1.21   | 19.2 | 13.1    | 12.0 |
| HT               | 339                      | 40.16  | 4.31   | 58.1 | 39.4    | 3.91 |
| VCM              | 339                      | 77.10  | 3.04   | 80.4 | 78      | 64.1 |
| HCM              | 339                      | 25.57  | 1.26   | 27.4 | 25.8    | 20.5 |
| RDW              | 339                      | 16.78  | 2.98   | 38.3 | 16.10   | 12.3 |
| HBA2             | 339                      | 2.11   | 0.41   | 3.28 | 2.10    | 1.06 |
| HBF              | 339                      | 1.02   | 0.46   | 3.00 | 1       | 0.1  |
| Ferritina Sérica | 168                      | 122.95 | 283.25 | 2730 | 57.25   | 10   |



## Apêndice 2

**Tabela 3** - Dosagem de Ferritina Sérica de 168\* indivíduos com talassemia  $\alpha$

| Ferritina<br>< 10 ng/mL | Ferritina<br>10-20 ng/mL | Ferritina<br>20-200 ng/mL | Ferritina<br>> 200 ng/mL |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| -                       | 30**                     | 118                       | 20                       |

Obs.: faixa de normalidade: para homens = 18-370ng/mL; para mulheres = 9-120ng/mL.

\*A determinação da ferritina sérica não foi possível em 1 dos casos de  $\alpha^{\text{Hphl}}\alpha/\alpha\alpha$ .

\*\*todos os casos do sexo feminino.

### Apêndice 3

Tabela 4. Comparação dos exames entre  $\alpha$ -Talasêmicos ou Não.

| Variável            | p-valor teste Kruskal-Wallis* | Estatísticas Descritivas |     |              |       |      |         |       |
|---------------------|-------------------------------|--------------------------|-----|--------------|-------|------|---------|-------|
|                     |                               | TALASSE                  | N   | MEDIA        | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
| <i>Idade (anos)</i> | <b>0.0015</b>                 | NÃO                      | 170 | <b>41.43</b> | 16.23 | 79   | 42.0    | 14    |
|                     |                               | HOMOZ                    | 18  | <b>31.00</b> | 11.19 | 54   | 27.5    | 16    |
|                     |                               | HETEROZ                  | 145 | <b>36.14</b> | 14.81 | 75   | 33.0    | 14    |
|                     |                               | TALASSE                  | N   | MEDIA        | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
| <i>GV</i>           | <b>0.0012</b>                 | NÃO                      | 170 | <b>5.17</b>  | 0.51  | 7.53 | 5.06    | 4.33  |
|                     |                               | HOMOZ                    | 18  | <b>5.62</b>  | 0.55  | 6.99 | 5.44    | 4.68  |
|                     |                               | HETEROZ                  | 145 | <b>5.23</b>  | 0.51  | 7.67 | 5.16    | 4.13  |
|                     |                               | TALASSE                  | N   | MEDIA        | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
| <i>HB</i>           | 0.0954                        | NÃO                      | 170 | 13.28        | 1.22  | 18.8 | 15.0    | 10    |
|                     |                               | HOMOZ                    | 18  | 13.48        | 1.11  | 15.7 | 13.3    | 12    |
|                     |                               | HETEROZ                  | 145 | 13.50        | 1.21  | 19.2 | 13.2    | 10    |
|                     |                               | TALASSE                  | N   | MEDIA        | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
| <i>HT</i>           | 0.0799                        | NÃO                      | 170 | 39.88        | 3.91  | 58.1 | 38.9    | 25.60 |
|                     |                               | HOMOZ                    | 18  | 41.11        | 4.09  | 51.0 | 40.3    | 34.10 |
|                     |                               | HETEROZ                  | 145 | 40.35        | 4.30  | 57.5 | 40.0    | 3.91  |
|                     |                               | TALASSE                  | N   | MEDIA        | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
| <i>VCM</i>          | <b>0.0001</b>                 | NÃO                      | 170 | <b>77.34</b> | 2.95  | 80.4 | 73.3    | 64.1  |
|                     |                               | HOMOZ                    | 18  | <b>73.06</b> | 3.14  | 80.3 | 72.5    | 67.5  |
|                     |                               | HETEROZ                  | 145 | <b>77.37</b> | 2.75  | 80.4 | 73.0    | 64.6  |
|                     |                               | TALASSE                  | N   | MEDIA        | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
| <i>HCM</i>          | <b>0.0001</b>                 | NÃO                      | 170 | <b>25.66</b> | 1.25  | 27.4 | 25.9    | 20.5  |
|                     |                               | HOMOZ                    | 18  | <b>23.97</b> | 1.25  | 25.8 | 23.7    | 22.2  |
|                     |                               | HETEROZ                  | 145 | <b>25.68</b> | 1.13  | 27.4 | 25.3    | 20.6  |
|                     |                               | TALASSE                  | N   | MEDIA        | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
| <i>RDW</i>          | <b>0.0001</b>                 | NÃO                      | 170 | <b>17.62</b> | 3.30  | 38.3 | 16.65   | 13.1  |
|                     |                               | HOMOZ                    | 18  | <b>16.10</b> | 2.00  | 21.7 | 15.90   | 13.4  |
|                     |                               | HETEROZ                  | 145 | <b>15.97</b> | 2.37  | 27.4 | 15.40   | 12.3  |
|                     |                               | TALASSE                  | N   | MEDIA        | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
| <i>HBA2</i>         | 0.2496                        | NÃO                      | 170 | 2.10         | 0.45  | 3.28 | 2.00    | 1.06  |
|                     |                               | HOMOZ                    | 18  | 2.07         | 0.30  | 2.91 | 2.00    | 1.70  |
|                     |                               | HETEROZ                  | 145 | 2.13         | 0.38  | 3.12 | 2.11    | 1.33  |
|                     |                               | TALASSE                  | N   | MEDIA        | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
| <i>HBF</i>          | 0.3169                        | NÃO                      | 170 | 1.07         | 0.49  | 3.0  | 1.00    | 0.14  |
|                     |                               | HOMOZ                    | 18  | 0.96         | 0.30  | 1.6  | 0.90    | 0.52  |
|                     |                               | HETEROZ                  | 145 | 0.99         | 0.44  | 2.0  | 0.98    | 0.10  |
|                     |                               | TALASSE                  | N   | MEDIA        | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |

\* p-valor referente ao teste de Kruskal-Wallis entre os grupos.

Tabela 5. Comparação dos exames entre Caucasóides e Negróides.

| Variável     | p-valor teste Mann-Whitney | Estatísticas Descritivas |     |       |       |      |         |       |
|--------------|----------------------------|--------------------------|-----|-------|-------|------|---------|-------|
|              |                            | COR                      | N   | MEDIA | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
| Idade (anos) | 0.1548                     | BCA                      | 236 | 39.97 | 16.97 | 79   | 39.0    | 14    |
|              |                            | NEG                      | 97  | 36.60 | 14.79 | 75   | 34.0    | 14    |
|              |                            |                          |     |       |       |      |         |       |
| GV           | 0.0458                     | COR                      | N   | MEDIA | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
|              |                            | BCA                      | 236 | 5.18  | 0.49  | 7.67 | 6.11    | 4.33  |
|              |                            | NEG                      | 97  | 5.32  | 0.59  | 7.27 | 5.28    | 4.13  |
| HB           | 0.0594                     | COR                      | N   | MEDIA | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
|              |                            | BCA                      | 236 | 13.29 | 1.16  | 19.2 | 13.00   | 10    |
|              |                            | NEG                      | 97  | 13.59 | 1.30  | 19.6 | 13.45   | 12    |
| HT           | 0.0278                     | COR                      | N   | MEDIA | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
|              |                            | BCA                      | 236 | 39.84 | 4.23  | 58.1 | 39.00   | 3.91  |
|              |                            | NEG                      | 97  | 40.92 | 4.49  | 55.9 | 40.70   | 25.60 |
| VCM          | 0.2982                     | COR                      | N   | MEDIA | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
|              |                            | BCA                      | 236 | 77.17 | 3.12  | 80.4 | 78.20   | 64.1  |
|              |                            | NEG                      | 97  | 77.02 | 2.91  | 80.4 | 77.90   | 67.3  |
| HCM          | 0.0916                     | COR                      | N   | MEDIA | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
|              |                            | BCA                      | 236 | 25.62 | 1.32  | 27.4 | 25.9    | 20.5  |
|              |                            | NEG                      | 97  | 25.47 | 1.08  | 27.3 | 25.6    | 22.2  |
| RDW          | 0.0020                     | COR                      | N   | MEDIA | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
|              |                            | BCA                      | 236 | 17.07 | 3.24  | 38.3 | 16.4    | 12.8  |
|              |                            | NEG                      | 97  | 16.06 | 2.10  | 24.5 | 15.9    | 12.3  |
| HBA2         | 0.3165                     | COR                      | N   | MEDIA | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
|              |                            | BCA                      | 236 | 2.10  | 0.41  | 3.28 | 2.01    | 1.16  |
|              |                            | NEG                      | 97  | 2.14  | 0.43  | 3.21 | 2.12    | 1.06  |
| HBF          | 0.5165                     | COR                      | N   | MEDIA | DP    | MAX  | MEDIANA | MIN   |
|              |                            | BCA                      | 236 | 1.04  | 0.47  | 3    | 1.00    | 0.10  |
|              |                            | NEG                      | 97  | 1.00  | 0.44  | 2    | 0.92    | 0.11  |

\* p-valor referente ao teste U de Mann-Whitney entre os grupos.

**Tabela 6.** Comparação dos exames entre  $\alpha$ -Talasêmicos ou Não, por Raça.

| Variável   | p-valor teste Kruskal-Wallis* |               | Estatísticas Descritivas |      |       |      |      |         |      |
|------------|-------------------------------|---------------|--------------------------|------|-------|------|------|---------|------|
|            |                               |               | TALASS1                  | N    | MEDIA | DP   | MAX  | MEDIANA | MIN  |
| <i>RDW</i> | <i>Caucas.</i>                | <i>0.0001</i> | NÃO                      | 141  | 17.71 | 3.37 | 38.3 | 16.7    | 18.1 |
|            |                               |               | HOMOZ                    | 6    | 16.93 | 2.95 | 21.7 | 15.6    | 14.1 |
|            |                               |               | HETEROZ                  | 89   | 16.08 | 2.81 | 27.4 | 15.4    | 12.8 |
|            | <i>Negroid.</i>               | <i>0.0176</i> | TALASS2                  | N    | MEDIA | DP   | MAX  | MEDIANA | MIN  |
|            |                               |               | NÃO                      | 29   | 17.21 | 2.93 | 24.5 | 16.10   | 13.7 |
|            |                               |               | HOMOZ                    | 12   | 15.73 | 1.35 | 18.9 | 15.90   | 13.4 |
| HETEROZ    | 56                            | 15.54         | 1.40                     | 19.1 | 15.55 | 12.3 |      |         |      |

\* p-valor referente ao teste de Kruskal-Wallis entre os grupos.

Tabela 7. Resultados da Análise da Curva ROC para VCM.

| Valor de Corte ( $\leq$ ) | Sensibilid. | 1-Especific. | Valor de Corte ( $\leq$ ) | Sensibilid. | 1-Especific. |
|---------------------------|-------------|--------------|---------------------------|-------------|--------------|
| 63.10                     | .000        | .000         | 76.85                     | .293        | .249         |
| 64.35                     | .000        | .006         | 76.95                     | .307        | .249         |
| 65.30                     | .006        | .006         | 76.95                     | .325        | .268         |
| 66.75                     | .012        | .006         | 76.15                     | .343        | .277         |
| 67.65                     | .018        | .006         | 76.25                     | .361        | .277         |
| 67.90                     | .024        | .006         | 76.35                     | .373        | .277         |
| 68.65                     | .024        | .012         | 76.45                     | .380        | .283         |
| 69.50                     | .030        | .012         | 76.55                     | .388        | .283         |
| 69.80                     | .030        | .017         | 76.65                     | .398        | .288         |
| 70.05                     | .030        | .029         | 76.75                     | .404        | .306         |
| 70.45                     | .036        | .029         | 76.90                     | .410        | .306         |
| 70.95                     | .036        | .036         | 77.05                     | .446        | .370         |
| 71.05                     | .048        | .046         | 77.15                     | .452        | .378         |
| 71.20                     | .054        | .046         | 77.25                     | .452        | .382         |
| 71.35                     | .054        | .052         | 77.35                     | .464        | .387         |
| 71.55                     | .060        | .052         | 77.45                     | .470        | .393         |
| 71.75                     | .066        | .052         | 77.60                     | .476        | .393         |
| 71.90                     | .072        | .052         | 77.75                     | .500        | .393         |
| 72.05                     | .078        | .069         | 77.85                     | .524        | .399         |
| 72.15                     | .084        | .069         | 77.95                     | .530        | .405         |
| 72.25                     | .090        | .081         | 78.05                     | .560        | .457         |
| 72.40                     | .096        | .087         | 78.15                     | .572        | .480         |
| 72.55                     | .102        | .087         | 78.25                     | .586        | .491         |
| 72.65                     | .108        | .087         | 78.35                     | .614        | .514         |
| 72.85                     | .114        | .087         | 78.45                     | .627        | .526         |
| 73.05                     | .139        | .098         | 78.55                     | .627        | .532         |
| 73.15                     | .145        | .104         | 78.65                     | .645        | .532         |
| 73.35                     | .151        | .116         | 78.75                     | .663        | .555         |
| 73.55                     | .157        | .121         | 78.85                     | .669        | .566         |
| 73.65                     | .157        | .127         | 78.95                     | .675        | .573         |
| 73.75                     | .163        | .127         | 79.05                     | .723        | .647         |
| 73.85                     | .163        | .139         | 79.15                     | .735        | .653         |
| 73.95                     | .169        | .139         | 79.25                     | .747        | .682         |
| 74.05                     | .181        | .162         | 79.35                     | .759        | .705         |
| 74.25                     | .187        | .168         | 79.45                     | .771        | .717         |
| 74.45                     | .199        | .179         | 79.55                     | .777        | .751         |
| 74.60                     | .199        | .191         | 79.65                     | .783        | .780         |
| 74.75                     | .211        | .197         | 79.75                     | .795        | .786         |
| 74.90                     | .229        | .197         | 79.85                     | .807        | .809         |
| 75.05                     | .259        | .220         | 79.95                     | .813        | .832         |
| 75.15                     | .265        | .220         | 80.05                     | .904        | .896         |
| 75.25                     | .265        | .225         | 80.15                     | .928        | .925         |
| 75.40                     | .271        | .225         | 80.25                     | .946        | .942         |
| 75.55                     | .283        | .231         | 80.35                     | .976        | .965         |
| 75.65                     | .283        | .237         | 81.40                     | 1.00        | 1.00         |
| 75.75                     | .283        | .243         |                           |             |              |

**Tabela 8. Resultados da Análise da Curva ROC para HCM.**

| Valor de Corte ( $\leq$ ) | Sensibilid. | 1-Especific. |
|---------------------------|-------------|--------------|
| 19.50                     | .000        | .000         |
| 20.65                     | .000        | .006         |
| 21.35                     | .006        | .006         |
| 22.00                     | .012        | .006         |
| 22.15                     | .012        | .012         |
| 22.30                     | .018        | .012         |
| 22.45                     | .024        | .012         |
| 22.55                     | .030        | .012         |
| 22.65                     | .036        | .012         |
| 22.75                     | .042        | .012         |
| 22.85                     | .042        | .017         |
| 22.95                     | .042        | .023         |
| 23.05                     | .054        | .035         |
| 23.15                     | .060        | .040         |
| 23.25                     | .072        | .046         |
| 23.35                     | .084        | .058         |
| 23.45                     | .096        | .064         |
| 23.55                     | .096        | .069         |
| 23.65                     | .102        | .075         |
| 23.75                     | .102        | .087         |
| 23.85                     | .127        | .098         |
| 23.95                     | .139        | .104         |
| 24.05                     | .151        | .116         |
| 24.15                     | .175        | .121         |
| 24.25                     | .187        | .139         |
| 24.35                     | .187        | .150         |
| 24.45                     | .199        | .156         |
| 24.55                     | .205        | .173         |
| 24.65                     | .217        | .191         |
| 24.75                     | .217        | .220         |
| 24.85                     | .259        | .237         |
| 24.95                     | .271        | .249         |
| 25.05                     | .301        | .289         |
| 25.15                     | .343        | .306         |
| 25.25                     | .361        | .347         |
| 25.35                     | .398        | .353         |
| 25.45                     | .410        | .364         |
| 25.55                     | .428        | .393         |
| 25.65                     | .494        | .434         |
| 25.75                     | .536        | .462         |
| 25.85                     | .572        | .491         |
| 25.95                     | .584        | .514         |
| 26.05                     | .633        | .561         |
| <b>26.15</b>              | <b>.669</b> | <b>.584</b>  |
| 26.25                     | .693        | .618         |
| 26.35                     | .723        | .671         |
| 26.45                     | .765        | .705         |
| 26.55                     | .783        | .728         |
| 26.65                     | .813        | .780         |
| 26.75                     | .831        | .803         |
| 26.85                     | .880        | .827         |
| 26.95                     | .898        | .855         |
| 27.05                     | .940        | .890         |
| 27.15                     | .946        | .919         |
| 27.25                     | .970        | .931         |
| 27.35                     | .982        | .954         |
| 28.40                     | 1.00        | 1.00         |

Tabela 9. Resultados da Análise da Curva ROC para RDW.

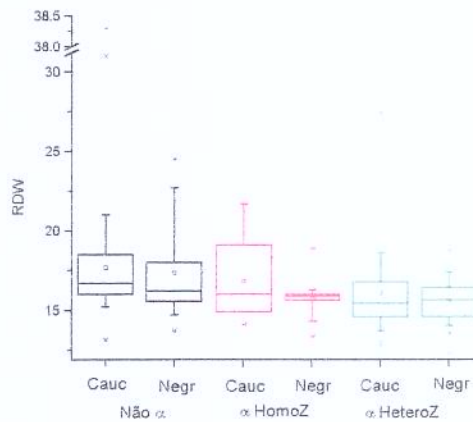
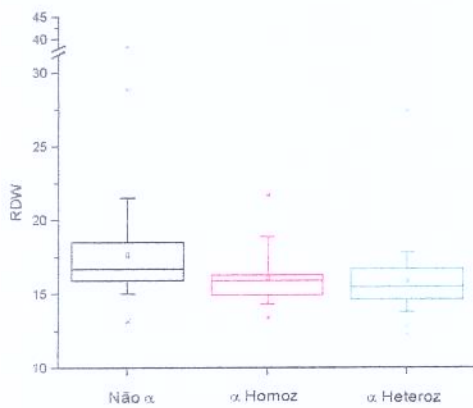
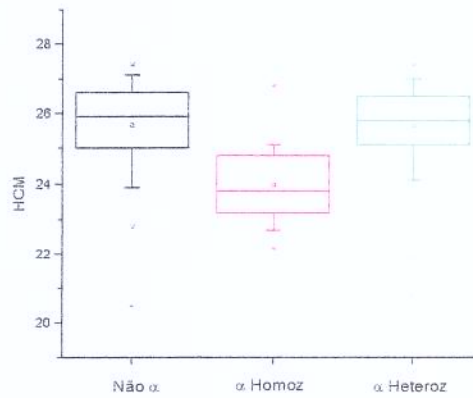
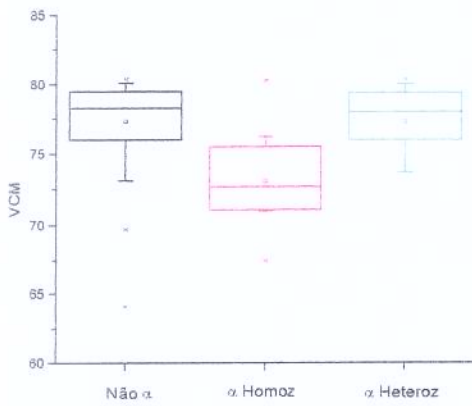
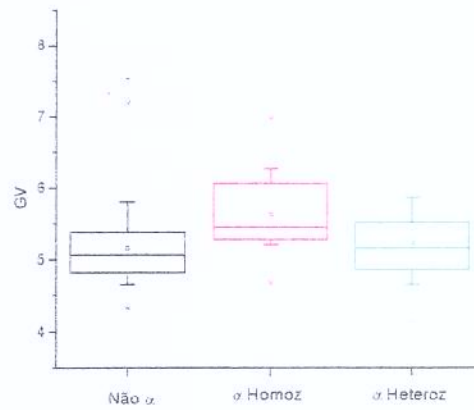
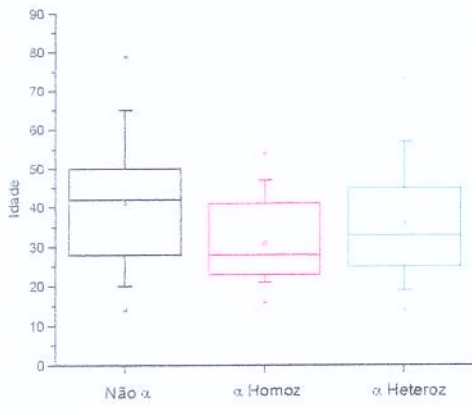
| Valor de Corte ( $\leq$ ) | Sensibilid. | 1-Especific. | Valor de Corte ( $\leq$ ) | Sensibilid. | 1-Especific. |
|---------------------------|-------------|--------------|---------------------------|-------------|--------------|
| 11.30                     | .000        | .000         | 17.65                     | .980        | .665         |
| 12.55                     | .006        | .000         | 17.75                     | .986        | .671         |
| 12.90                     | .012        | .000         | 17.85                     | .990        | .676         |
| 13.05                     | .024        | .000         | 17.95                     | .992        | .694         |
| 13.15                     | .030        | .006         | 18.05                     | .904        | .705         |
| 13.25                     | .030        | .017         | 18.15                     | .904        | .711         |
| 13.35                     | .036        | .017         | 18.25                     | .904        | .717         |
| 13.45                     | .048        | .023         | 18.35                     | .904        | .723         |
| 13.55                     | .060        | .023         | 18.45                     | .910        | .746         |
| 13.65                     | .066        | .023         | 18.55                     | .910        | .757         |
| 13.75                     | .096        | .035         | 18.65                     | .916        | .767         |
| 13.85                     | .108        | .035         | 18.75                     | .916        | .763         |
| 13.95                     | .127        | .035         | 18.85                     | .922        | .763         |
| 14.05                     | .145        | .035         | 18.95                     | .928        | .786         |
| 14.15                     | .187        | .035         | 19.05                     | .928        | .798         |
| 14.25                     | .193        | .035         | 19.15                     | .940        | .821         |
| 14.35                     | .217        | .040         | 19.25                     | .946        | .821         |
| 14.45                     | .229        | .046         | 19.35                     | .952        | .827         |
| 14.55                     | .241        | .046         | 19.45                     | .958        | .832         |
| 14.65                     | .283        | .052         | 19.55                     | .964        | .838         |
| 14.75                     | .313        | .075         | 19.65                     | .964        | .844         |
| 14.85                     | .337        | .087         | 19.75                     | .964        | .855         |
| 14.95                     | .367        | .087         | 19.85                     | .964        | .861         |
| 15.05                     | .410        | .104         | 20.15                     | .964        | .867         |
| 15.15                     | .416        | .110         | 20.35                     | .964        | .873         |
| 15.25                     | .446        | .121         | 20.65                     | .964        | .879         |
| 15.35                     | .452        | .145         | 20.90                     | .964        | .884         |
| 15.45                     | .482        | .173         | 21.25                     | .964        | .890         |
| 15.55                     | .500        | .202         | 21.60                     | .964        | .902         |
| 15.65                     | .542        | .202         | 21.85                     | .976        | .902         |
| 15.75                     | .566        | .220         | 22.05                     | .976        | .908         |
| 15.85                     | .602        | .237         | 22.20                     | .976        | .913         |
| 15.95                     | .627        | .272         | 22.50                     | .976        | .919         |
| 16.05                     | .651        | .324         | 22.80                     | .976        | .925         |
| 16.15                     | .651        | .358         | 23.05                     | .976        | .931         |
| 16.25                     | .691        | .376         | 23.30                     | .976        | .936         |
| 16.35                     | .711        | .405         | 23.50                     | .976        | .942         |
| 16.45                     | .729        | .428         | 23.65                     | .982        | .942         |
| 16.55                     | .741        | .462         | 23.95                     | .982        | .948         |
| 16.65                     | .753        | .497         | 24.25                     | .982        | .954         |
| 16.75                     | .759        | .538         | 24.40                     | .982        | .960         |
| 16.85                     | .777        | .549         | 25.05                     | .982        | .965         |
| 16.95                     | .789        | .571         | 26.05                     | .982        | .971         |
| 17.05                     | .807        | .607         | 26.60                     | .982        | .977         |
| 17.15                     | .825        | .630         | 27.05                     | .988        | .977         |
| 17.25                     | .837        | .636         | 28.10                     | 1.00        | .983         |
| 17.35                     | .855        | .647         | 29.90                     | 1.00        | .988         |
| 17.45                     | .867        | .659         | 34.65                     | 1.00        | .994         |
| 17.55                     | .880        | .659         | 39.30                     | 1.00        | 1.00         |

**Tabela 10 .** Resultados da Curva ROC, separando-se Homozigotos e Heterozigotos.

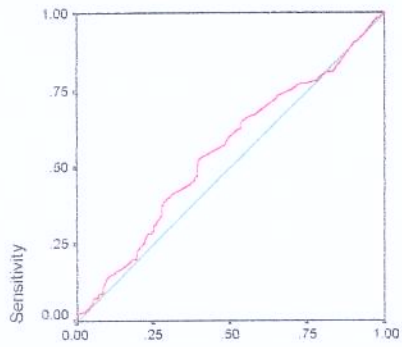
| $\alpha$ -Talassêmicos Homozigotos vs Não $\alpha$ -Talassêmicos   | Ponto de Corte | Sensibilidade | Especificidade |
|--|----------------|---------------|----------------|
| VCM  | $\leq 76.65$   | 94.4%         | 70.5%          |
| HCM  | $\leq 24.85$   | 83.3%         | 76.3%          |
| RDW  | $\leq 16.35$   | 83.3%         | 59.5%          |
| $\alpha$ -Talassêmicos Heterozigotos vs Não $\alpha$ -Talassêmicos | Ponto de Corte | Sensibilidade | Especificidade |
| VCM  | $\leq 78.65$   | 60.7%         | 47.1%          |
| HCM  | $\leq 26.15$   | 64.1%         | 41.8%          |
| RDW  | $\leq 15.85$   | 62.8%         | 76.5%          |



Os gráficos a seguir apresentam os desenhos esquemáticos (boxplots) para os exames onde houve diferença significativa entre os grupos.



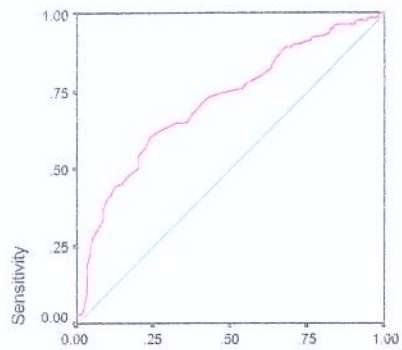
ROC Curve for VCM



1 - Specificity

Diagonal segments are produced by ties.

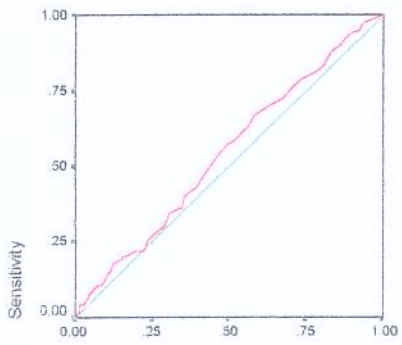
ROC Curve for RDW



1 - Specificity

Diagonal segments are produced by ties.

ROC Curve for HCM



1 - Specificity

Diagonal segments are produced by ties.