

CARMEN SÍLVIA GABETTA

*TRIAGEM NEONATAL PARA DOENÇA
FALCIFORME E OUTRAS HEMOGLOBINOPATIAS*

CAMPINAS

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G112t Gabetta, Carmen Sílvia
Triagem neonatal para Doença Falciforme e outras
Hemoglobinopatias. / Carmen Sílvia Gabetta. Campinas, SP : [s.n.],
2006.

Orientador : Carmen Sílvia Bertuzzo
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Triagem neonatal. 2. Hemoglobinopatia. 3. Recém-nascidos. 4. Eletroforese. I. Bertuzzo, Carmen Sílvia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Neonatal screening for sickle cell disease and others Hemoglobinopathies

Keywords: • Neonatal screening

- Newborn
- Electrophoresis
- Hemoglobinopathy

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

Profa. Dra. Ligia Niéro-Melo

Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

Data da defesa: 28-07-2006

CARMEN SÍLVIA GABETTA

*TRIAGEM NEONATAL PARA DOENÇA
FALCIFORME E OUTRAS HEMOGLOBINOPATIAS*

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para
Obtenção do título de Mestre em Farmacologia.*

ORIENTADORA : CARMEN SÍLVIA BERTUZZO

CAMPINAS

2006



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

Membros:

Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

Prof. Dra. Ligia Niero-Melo

Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 28/07/2006

DEDICATÓRIA

Para a minha família, em especial para a minha Mãe,
que sempre me incentivou.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, pela orientação, amizade, confiança e pelas palavras de incentivo que me conduziram ao término deste estudo.

À Profa. Dra. Sílvia Regina Brandalise pela oportunidade, à Dra. Vitória Régia Pereira Pinheiro, pela confiança e amizade, e ao Dr. Alexandre Eduardo Nowill, pela tolerância na flexibilidade de meus horários durante a rotina de trabalho.

A todos meus colegas de trabalho do Laboratório de Triagem Neonatal : Nayla Vicentim, Josie Teodoro, Thaís Duarte, Luzinete Góes, Renan Dias, Diogo Torres, Sandra Sula, Marcela Oliveira, e demais profissionais da triagem; em especial, Ana Paula Milan Geraldo, pela colaboração e compreensão nos meus momentos de ausência.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia Celular do CIPOI : Maria Carolina Spago, Vanair Ferreira Barbosa e em especial, a amiga Márcia Cristina Fornazim pela amizade, apoio e colaboração em todos os momentos da realização deste trabalho.

À equipe de Informática do Programa de Triagem Neonatal do CIPOI : Sandra Cristina Bibries e Alessandra Cardoso, pelo pronto levantamento de dados contidos neste trabalho.

A Daniela Artoni Tomesani pelo auxílio nas traduções de textos.

Ao Ângelo Albertoni pelo auxílio nos cálculos estatísticos.

À minha família : Ovídio, Fernanda, Simone, em especial a minha mãe Neide, pelo incentivo e apoio em todos os momentos difíceis.

Ao Altemir pela compreensão e apoio em todos os momentos da realização deste trabalho.

A todos a quem não me referi e que direta ou indiretamente participaram deste trabalho, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

	PÁG.
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE GRÁFICOS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE QUADROS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	
1 - Hemoglobina Normal	15
2 – Hemoglobinas Anormais	19
3 – Anemia Falciforme	21
4 – Doença SC ou Hemoglobinopatia SC	25
5- Triagem Neonatal	28
OBJETIVOS	33
MATERIAIS E MÉTODOS	
1 – Amostras	34
2 – Eletroforese de Hemoglobina	35
3 – Focalização Isolelétrica	36
4 – Dosagem de Hb A2	37
5 – Análise Estatística	38
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO	57
ANEXO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CIPOI	- Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas da Infância
Hb	- Hemoglobina (s)
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
mA	- mili-âmpere
mm	- milímetro
PNTN	- Programa Nacional de Triagem Neonatal
Portaria MS	- Portaria do Ministério da Saúde
SRTN	- Serviço de Referência em Triagem Neonatal
O ₂	- Oxigênio
uL	- microlitro
VCM	- Volume corpuscular médio

LISTA DE FIGURAS

1	Representação esquemática da molécula de Hemoglobina.....	16
---	---	----

LISTA DE GRÁFICOS

1	Cobertura (%) anual da Triagem Neonatal no período de 28 de agosto de 1992 a 31 de dezembro de 2004.....	40
2	Distribuição dos portadores de traço de hemoglobinopatias conforme a cor de pele.....	45
3	Distribuição dos portadores de doenças falciformes conforme a cor da pele	46
4	Variação da frequência genotípica dos heterozigotos S e C no período de 28 de agosto de 1992 a 31 de dezembro de 2004.....	47

LISTA DE TABELAS

5	Abrangência (%) da Triagem Neonatal ano a ano de cada município participante.....	41
6	Freqüência das hemoglobinopatias S e C por município de nascimento do recém nascido.....	43
7	Freqüência das hemoglobinopatias entre as 433.306 amostras analisadas dos municípios cadastrados no Programa de Triagem Neonatal, no período de 28 de agosto de 1992 a 31 de dezembro de 2004.....	44
8	Identificação de amostras falso positivas.....	48
9	Identificação de amostras falso positivas, por contaminação com sangue materno.....	49
10	Identificação de amostras positivas e genitores normais	49

LISTA DE QUADROS

11 Amostras colhidas em papel filtro (S&S 903) comparadas com sangue de cordão.....	52
12 Trabalhos publicados no Brasil, sobre triagem neonatal para hemoglobinopatias.....	54

RESUMO

Introdução: As hemoglobinopatias constituem o distúrbio genético de maior prevalência na raça humana, sendo a Doença Falciforme a mais freqüente dentre as hemoglobinopatias chegando a atingir 1 a cada 500 indivíduos da raça negra. No Brasil estima-se a presença de 6.000.000 de portadores para esta doença.

Justificativa: Com a triagem neonatal podemos avaliar a freqüência real dessas alterações hemoglobínicas. **Objetivos:** Verificar a freqüência gênica das

hemoglobinopatias na região metropolitana de Campinas diagnosticada pela triagem neonatal. **Casuística:** Os resultados de 12 anos de trabalho foram obtidos

da triagem neonatal para hemoglobinopatias, no período entre 28 de agosto de 1992 a 31 de dezembro de 2004. **Materiais e Métodos:** A triagem para

hemoglobinopatias foi realizada inicialmente pela técnica de eletroforese em acetato de celulose em amostras de sangue obtidas do cordão umbilical no momento do nascimento. Posteriormente, esta técnica foi substituída pela técnica de focalização isoelétrica em gel de agarose, e as amostras de sangue passaram a ser coletadas em papel filtro da punção plantar da criança após 48 horas de vida.

Resultados: Foram analisadas 433.306 amostras de recém nascidos no período de 28 de agosto de 1992 a 31 de dezembro de 2004, 128 (0,029%) doentes falciformes foram detectados e inseridos no Programa de Atenção ao Doente Falcêmico do Centro Infantil Boldrini. Em 7.494 neonatos foi identificado o traço falciforme, o que corresponde à freqüência de 1,73% na população estudada. Já o portador de traço C foi encontrado a freqüência de 0,53%.

ABSTRACT

The hemoglobinopathies are the genetic pathology of higher prevalence in the human race, and among them the most frequent is the Sickle Cell Disease, reaching frequency of at least 1 in 500 individuals of the black race. In Brazil there are the presence of 6.000.000 carriers for this disease. With the neonatal screening, we can evaluate the real frequency of hemoglobin alterations. We obtain the results of 12 years of work, from the neonatal screening for hemoglobinopathies, in the period between August 28, 1992 and December 31, 2004. Initially, the screening for hemoglobinopathies was carried by the electrophoresis in cellulose acetate in blood samples from the umbilical cord at birth. More recently, this technique was replaced by isoelectric focusing on agarose gel, in blood samples collected in filter paper by heel pick in children after 48 hours of life. We screened the 433,306 newborn samples in the study period and 128 patients with sickle cell disease were identified and referred to Sickle Cell Disease Attention Program. In 7.494 newborn the sickle trait was identified, corresponding to 1,73% incidence. In addition, the C trait carrier was found, corresponding to 0,53% incidences.

INTRODUÇÃO

1 - Hemoglobina Normal

No Homem, como em todos os vertebrados, o transporte de O₂, para os tecidos é realizado por pigmentos respiratórios localizados no interior dos glóbulos vermelhos. Estes pigmentos, denominados hemoglobinas (Hbs), transportam o oxigênio de forma muito mais eficiente do que as proteínas plasmáticas encarregadas dessa função em alguns animais inferiores (RAMALHO & PAIVA SILVA, 2000). A hemoglobina (Hb) é composta pela conjugação de um pigmento, o *heme*, e de uma proteína, a *globina*. O heme é um complexo formado por um átomo de ferro, situado no interior de uma estrutura porfirínica que mantém o estado ferroso e dá a cor vermelha característica da hemoglobina. A globina consiste de dois pares de cadeias polipeptídicas – o tetrâmero – com um total de 574 aminoácidos formando uma molécula tetramerizada que apresenta dimensões de 50 x 55 x 64 nm e peso molecular de 64.458 daltons. (NAOUM, 1987). O tetrâmero é constituído por duas cadeias globínicas do tipo alfa (α) que possuem 141 aminoácidos, e cujos genes estão localizados no cromossomo 16; e por duas cadeias globínicas do tipo beta (β) com 146 aminoácidos localizados no

cromossomo 11 (HIGGINS & CLARKE, 2000). A figura 1 mostra a representação esquemática da molécula de hemoglobina.

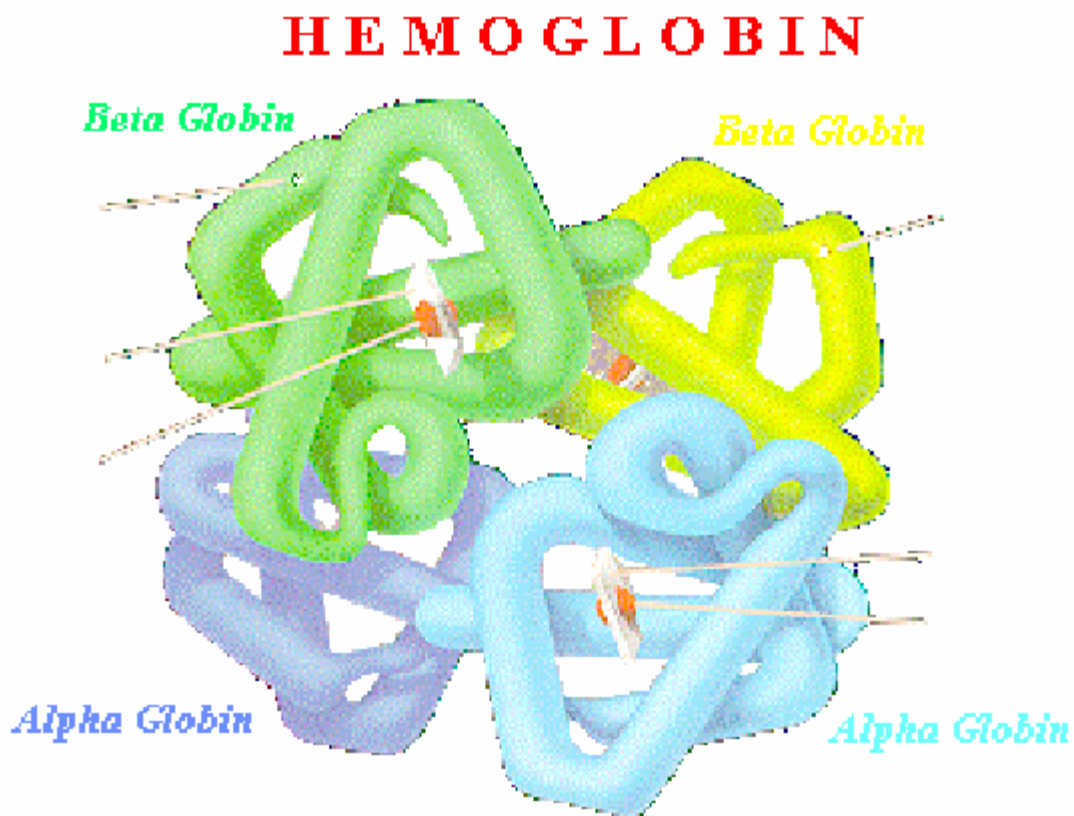


Figura 1: Representação esquemática da molécula de hemoglobina. (Ribeiro, D.M.; 2002)

Fase embrionária

Nos primeiros dias de vida intra-uterina, antes mesmo da formação do sistema placentário, as células embrionárias obtêm O_2 dos tecidos adjacentes, por meio de Hbs que possuem alta afinidade pelo O_2 : as Hbs embrionárias. As Hbs embrionárias são formadas por pares de dímeros de cadeias zeta e épsilon ($\zeta_2 \epsilon_2$), que formam a Hb Gower-1, por pares de cadeia zeta e gama ($\zeta_2 \gamma_2$) que formam a Hb Gower-2 e por pares de cadeias alfa e épsilon ($\alpha_2 \epsilon_2$) que formam a Hb Portland (NAOUM, 1987). A síntese de cadeias épsilon (ϵ) e zeta (ζ) são praticamente suprimidas após os três primeiros meses de gestação, embora possam continuar a serem sintetizadas em crianças com determinadas aberrações cromossômicas, sobretudo a trissomia do grupo D (RAMALHO & PAIVA SILVA, 2000).

Fase placentária ou fetal

Após a organização do sistema placentário, o feto passa a obter O_2 por meio do sangue da mãe, através da placenta. Tal função é exercida pela Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$), cuja interação com outros elementos da hemácia fetal confere maior afinidade pelo O_2 do que a apresentada pela hemácia materna. A Hb fetal inicia sua produção na quarta semana de gestação com aumento do seu nível quantitativo progressivo ao desenvolvimento fetal. A Hb A composta por dímeros de cadeias alfa e beta ($\alpha_2\beta_2$), é sintetizada a partir da décima semana, e se mantém em concentrações próximas a 10% até o nascimento (NAOUM, 1987).

Já a Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) começa a ser produzida na 25ª semana de gestação em concentrações reduzidas que permanecem até o nascimento, aumentando lentamente até estabilizar-se no sexto mês de vida (2,5 a 3,7% da concentração da Hb). A partir deste ponto, a molécula de Hb predominante será a Hb A₁ ($\alpha_2\beta_2$), constituindo 96% da concentração de Hb do adulto (NAOUM, 1987). Vários trabalhos demonstraram que após os seis meses de idade, os loci γ entram praticamente em repouso, mantendo uma atividade muito pequena. Em uma hemoglobinopatia denominada Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF), tal inativação não ocorre e a Hb F continua sendo produzida por toda a sua vida. Também em outras hemoglobinopatias, como a Anemia Falciforme e a

Talassemia Maior, níveis elevados de Hb F podem ser encontrados na vida adulta. (RAMALHO & PAIVA SILVA, 2000).

2 - Hemoglobinas Anormais

Os distúrbios hereditários da Hb humana são denominados Hemoglobinopatias, e são doenças geneticamente determinadas que apresentam morbidade significativa em todo o mundo (THOMPSON, McINNEN & WILLARD, 1993).

As alterações hereditárias das Hbs afetam as cadeias polipeptídicas e podem ser divididas em 2 grandes grupos: as hemoglobinopatias estruturais e as hemoglobinopatias por deficiência de síntese.

Nas hemoglobinas estruturais ocorre a alteração na estrutura de um ou mais tipos de cadeias polipeptídicas que entram na composição da Hb. Na grande maioria dos casos tais alterações são causadas por mutações de ponto, que determinam a troca de um aminoácido por outro em um dos tipos de cadeias polipeptídicas (NAOUM, 1987). Além da substituição de aminoácidos, outras alterações estruturais são possíveis; como a perda de um ou mais aminoácidos no caso da Hb Freiburg ($\alpha_2\beta_2^{23 \text{ val} \rightarrow 0}$), a adição de um ou mais aminoácidos como na

Hb Constant Spring ($\alpha_2^{+31 \text{ aa}}\beta_2$), a tetramerização de cadeias β , na Hidrópsia Fetal (Hb H = β_4), os polipeptídios de fusão no caso de Hb Lepore ($\alpha_{28}\beta_2$), entre outros (MOO-PENN, 1980 & STAMATOYANNOPOULUS, 1987).

As Hbs anormais mais freqüentes encontradas na população são a Hb S e a Hb C. Em sua forma de heterozigose a Hb S é denominada de Traço Falciforme (AS) e em homozigose (SS), Anemia Falciforme (NAOUM, 1999; BONINI-DOMINGOS, 1993 & EDELSTEIN, 1996).

Muitas hemoglobinas têm sido identificadas em nível protéico pela mobilidade eletroforética em acetato de celulose e ágar citrato, sendo descritas mais de 800 variantes anormais de hemoglobina, e muitos defeitos moleculares ainda não foram determinados em muitas hemoglobinopatias (SCHNEE, *et al*, 1999 & WEATHERALL & CLEGG, 1993). Já nas hemoglobinopatias por deficiência de síntese ou Talassemias, ocorre uma depressão parcial ou total da síntese de um ou mais tipos de cadeias polipeptídicas da globina. As Talassemias podem ser do tipo α e do tipo β e determinam alterações quantitativas na eletroforese de Hbs (NAOUM, 1987).

3 - Anemia Falciforme

A Anemia Falciforme foi descrita pela primeira vez em 1904, por James Herrick durante uma investigação de um paciente negro que apresentava um quadro hematológico intrigante, com anemia grave, dor articular e dor abdominal. Em 1910, ele publicou o caso com a seguinte descrição: observaram-se microscopicamente em esfregaço corpúsculos sanguíneos vermelhos peculiares alongados e em forma de foice em um caso de anemia grave (HERRICK, 1910 & OLIVEIRA, et al, 1996). Um pouco mais tarde em 1949, a descoberta de que a Hb S ($\alpha_2\beta^S_2$) apresentava mobilidade eletroforética anormal, concedeu a Linus Pauling e colaboradores o mérito de nomear a Anemia Falciforme como sendo uma “Doença Molecular” (PAULING, 1949).

A Doença Falciforme originou-se na África, estendeu-se para a península Arábica, sul da Itália e Índia, chegando às Américas pela imigração forçada de cerca de 3 a 4 milhões de africanos trazidos ao país como escravos a partir do século XVI. Além da África e Américas, é hoje encontrada na Europa, em virtude da migração voluntária da África e do Caribe, principalmente para a Inglaterra, França, Bélgica, Holanda e Alemanha, e em grandes regiões da Ásia. No Brasil, distribui-se heterogeneamente. Na região sudeste, a prevalência média de portadores da Hb S é de 2%, valor que chega a atingir cifras de cerca de 6 a 10%

entre negros e pardos, no nordeste do país (ZAGO, 1985, 1999 & SALZANO, 1982).

O conhecimento da Hb S teve um longo percurso dentro da história da Medicina: seus primeiros casos foram relatados na América do Norte, em escravos que, durante sua vida, apresentavam doença crônica e à necropsia apresentavam ausência de baço. (RUIZ, 1985). Hoje se sabe que a Hb S é a mais comum das alterações hematológicas hereditárias conhecidas no homem. Sua etiologia é gênica, com padrão autossômico recessivo devido a uma mutação no gene de beta globina, produzindo alteração estrutural na molécula, onde há troca de um nucleotídeo do códon GAG para GTG, resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina na posição de número 6. O ácido glutâmico é carregado negativamente enquanto a valina é um aminoácido neutro, ou seja, há uma perda de duas cargas negativas por molécula de Hb, esta troca resulta em uma mobilidade mais lenta da Hb S quando comparada com a Hb A em eletroforese de pH alcalino e ácido (NAOUM, 1987, BONINI, 1993 & EDELSTEIN, 1996).

A mutação que deu origem à Anemia Falciforme surgiu na África e atingiu elevada prevalência em algumas populações. Acredita-se que em virtude da vantagem seletiva dos heterozigotos frente à malária provocada pelo Plasmodium falciparum (HONIG, 1986; KAM, 1990 & LIVINGSTONE, 1976)

Acreditava-se que a mutação teria ocorrido uma única vez na história da humanidade, tendo-se espalhado através da migração e da miscigenação. O gene β^s , presente hoje em milhões de portadores, seria derivado daquele único mutante

surgido há alguns milhares de anos. Hoje existem evidências a favor de uma origem independente da mutação $G \rightarrow T$, que originou o gene β^S em regiões geograficamente distintas da África e Ásia (KULOZIK, *et al*, 1987,1986 & PAGINER, *et al*, 1984). Essas evidências surgiram do estudo de polimorfismos neutros dos grupamentos gênicos das cadeias globínicas. O conjunto desses polimorfismos determinou vários haplótipos. A descoberta dos haplótipos do gene β^S apresentou-se como importante elemento de análise antropológica para estudo das composições populacionais, bem como objeto de estudo clínico, os quais podem fornecer dados preditivos acerca da evolução da doença e de seu nível de gravidade (POWARS, 1991).

Esta mutação faz com que a Hb S sofra polimerização em baixas concentrações de O_2 , acarretando a deformação da hemácia e aumentando a viscosidade sanguínea com formação de cristais tactóides (RUIZ, 1985 & EATON, 1996). As células falcizadas passam então a apresentar a forma de foice com conseqüências variáveis em seu portador, dependentes da quantidade de Hb S produzida (NAOUM, 1987, BONINI, 1193 & EDELSTEIN, 1996). Como conseqüência, ocorrem fenômenos de oclusão de pequenos vasos, causando enfartes com lesões de órgãos diversos e episódios de dor.

As hemácias deformadas e enrijecidas sobrevivem menos em circulação. Sua destruição precoce é a principal causa de anemia nestas doenças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Essas alterações são à base da fisiopatologia das síndromes falciformes (RUIZ, 1985 & EATON, 1996).

As hemoglobinopatias nas quais pelo menos uma das Hbs anormais é a Hb S é denominada Doença Falciforme. A denominação de “Anemia Falciforme” é reservada para a forma da doença que ocorre nos homozigotos SS. Entretanto, o gene da Hb S pode combinar-se com outras anormalidades hereditárias das Hbs, como a Hb C e a Hb D, resultando em heterozigotos compostos Hb SC e Hb SD respectivamente; e na combinação com a Beta Talassemia resultando em S β Talassemia, também conhecida como Microdepranocitose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Os portadores heterozigotos da Hb S, ou seja, o traço falciforme são os portadores assintomáticos, representados laboratorialmente por Hb AS. Os portadores não apresentam a doença, nem possuem anormalidades no número e forma das hemácias, geralmente evidenciadas por análise de rotina (NAOUM, 1987, BONINI, 1993). Embora o Traço Falciforme comumente seja assintomático, há relatos de morte súbita e complicações clínicas, tais como: hematúria, hipostenúria, embolismo pulmonar e infarto esplênico especialmente quando os portadores são expostos a condições extremas de baixa tensão de O₂ como ocorre em esforços físicos extenuantes, despressurização da cabine de vôo e em grandes altitudes (HARKNESS, 1989).

4 - Doença SC ou Hemoglobinopatia SC

A Hb C foi descrita pela primeira vez por Itano e Neel, em 1950. Hunt e Ingram, em 1958, revelaram que esta Hb é uma variante originada pela substituição do ácido glutâmico por lisina na posição 6 da cadeia beta globina. A troca de um aminoácido de carga negativa (Glu) por outro de carga positiva (Lis) altera completamente a mobilidade da Hb mutante, conferindo características estruturais e funcionais próprias à molécula, facilitando a sua identificação por métodos de rotina diagnóstica. (NAOUM, 1987). A Hb C é um tipo de Hb que desencadeia a formação de cristais no interior da hemácia, tornando-as mais rígidas, e como consequência uma destruição mais rápida pelo sistema retículo-endotelial. (NAOUM, 1987 & RAMALHO, 2000).

Acredita-se que a Hb C se originou na costa Oeste da África, onde a prevalência da heterozigose (Hb AC) alcança valores de 15 a 30% da população (NAOUM, 1987 & LUKENS, 1998). Nos Estados Unidos, 2 a 3% dos negros americanos são portadores do Traço da Hb C (LUKENS, 1998). Por outro lado, no Brasil estima-se que aproximadamente 1 a 3% dos negros sejam portadores deste traço (RAMALHO, 2000). A distribuição da Hb C é muito mais limitada quando comparada à Hb S e restrita a área do norte de Ghana e Upper Volta, onde a prevalência de traço C atinge proporções em torno de 20%. Na região do Caribe e América do Norte acredita-se que 3,5 a 2% da população negra seja portadora do

traço C, respectivamente (EDINGTON, 1956 & SANSARRICQ, 1974). Foi demonstrada alta prevalência de Hb C em material genético coletado da tribo Bedouin localizada ao norte de Israel (RACHMILEWITZ, 1974), e acredita-se que este achado pode representar uma nova mutação baseando-se na possibilidade da presença, nessa região, de ancestrais africanos.

Vários trabalhos revelam que a doença SC ou hemoglobinopatia SC é comum no oeste da África e geralmente é confinada á pessoas desta origem. A prevalência desta doença pode ser determinada pela freqüência relativa dos 2 genes. No oeste da África onde ambas Hbs S e C ocorrem em 20% da população, a prevalência da doença SC ao nascimento pode ter índice de até 2% na população. Por outro lado em relação à população negra da América do norte, com freqüências das Hbs S e C em torno de 8 e 2% respectivamente, a prevalência esperada é de 1 criança a cada 1.000 nascimentos. Já na Jamaica, estudos revelam que na população com o respectivo genótipo apresenta freqüências de 10 e 3,5%, ou seja, 1 a cada 500 crianças terá a doença SC. (SERJEANT, 1992).

A doença SC é geralmente uma patologia moderada que apresenta níveis de Hb aproximadamente normais e uma discreta diminuição na média de sobrevida destes pacientes. Alguns pacientes são quase assintomáticos e o seu diagnóstico é freqüentemente realizado acidentalmente. Portanto os aspectos clínicos da doença SC em geral são refletidos mais tardiamente quando comparados aos observados na anemia falciforme. Estudos realizados por

WILLIANS et al, em 1986, em um grupo constituído de 166 crianças portadoras de doença SC, diagnosticadas ao nascimento, demonstraram que o primeiro sintoma específico foi a crise de dor refletida em 81% das crianças, dactilite em 14%, infecção por pneumococo em 3% e sequestração esplênica aguda em 3%.

Os heterozigotos da Hb C não são portadores de anemia e não apresentam evidências clínicas de destruição aumentada das hemácias. Observa-se no esfregaço sanguíneo destes portadores, numerosas células em alvo (NAOUM, 1987). Desta forma, um hemograma rico em células em alvo indica a investigação dessa Hb anômala. Na eletroforese em acetato de celulose alcalina, a hemoglobina C tem migração eletroforética lenta, sobrepondo-se à Hb A₂. A confirmação da Hb C é realizada por eletroforese em gel de ágar com pH 6,2, na qual ela permanece próxima ao ponto de aplicação do hemolisado.

Mesmo sendo assintomático, seu conhecimento é de extrema importância para fins de aconselhamento genético. A Hb C pode combinar-se com outras anormalidades hereditárias das hemoglobinas, como a hemoglobina S, resultando na dupla heterozigose SC. Estudos de Ramalho e colaboradores (2000), demonstraram que esta hemoglobinopatia é a segunda síndrome falciforme mais freqüente no Brasil, afetando cerca de 0,03% da população negróide.

5 - Triagem Neonatal

As hemoglobinopatias hereditárias estão incluídas entre as doenças genéticas freqüentemente encontradas na população humana. Este fato contribuiu para que tais doenças tenham sido as primeiras para as quais foram implantados programas comunitários de investigação e controle, sobretudo nos países mais desenvolvidos do hemisfério norte. A alta prevalência das hemoglobinopatias, associada à gravidade das manifestações clínicas dos homozigotos, faz destas um grave problema de saúde pública (RAMALHO, 2000).

A criação de programas desta natureza nos países de terceiro mundo vêm sendo estimulada por vários órgãos internacionais, como a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1983), a Academia de Ciências do Terceiro Mundo (TWAS, 1986) e a Organização Pan-americana de Saúde (OPS, 1987) (RAMALHO, 1996).

O primeiro programa de triagem foi iniciado amplamente em 1975 no estado de Nova Iorque, e foi implementado totalmente em 1978. Quase que ao mesmo momento outros estados como: Colorado, Geórgia e Texas, também iniciaram precocemente os seus programas de triagem (GROVER, 1978 & SCHEDBAUER, 1989). Estes programas trouxeram informações pioneiras e de extrema importância para a realização da triagem neonatal. Além disso, forneceram informações básicas e críticas sobre as complicações nos primeiros anos de vida

das crianças por meio da coleta de dados, sugerindo que a detecção precoce das hemoglobinopatias, pode reduzir significativamente a mortalidade e a morbidade nestes doentes (EMBURY, 1994). Na última década um dos mais importantes desenvolvimentos foi a demonstração satisfatória de que a triagem para hemoglobinopatias pode ser realizada com hemolisado preparado de sangue seco coletado em papel filtro, utilizado para a triagem de doenças metabólicas.

Baseando-se nestes relatos, vários grupos exploraram a possibilidade da identificação precoce das crianças portadoras da Anemia Falciforme e a implantação de um acompanhamento médico sistemático. Inicialmente, foi descritos por Vichinsky e colaboradores, em 1988, o desenvolvimento da triagem neonatal, e determinação do índice de redução significativa da morbidade e da mortalidade destas crianças portadoras de hemoglobinopatias. Estes pesquisadores também concluíram com este estudo que a identificação precoce de crianças com doenças falciformes, seguidas de cuidados médicos e acompanhamento clínico, reduziram significativamente a morbidade e a mortalidade das crianças com esta doença, estabelecendo a identificação precoce como um fator crucial para o aumento da sobrevida destas crianças (VICHINSKY, 1988).

Em 1986, Gaston e colaboradores demonstraram que a administração de penicilina oral em crianças com até 3 anos de idade, reduz o risco da infecção pelo *Streptococcus pneumoniae* em até 84% em crianças tratadas com penicilina profilática quando comparado com o grupo placebo. Estas medidas preventivas já

foram instituídas em países do primeiro mundo à cerca de 20 anos e reduziram significativamente a taxa de mortalidade em crianças com até cinco anos de idade, para índices inferiores a 2% (GASTON, 1986).

As primeiras investigações sobre hemoglobinopatias, principalmente Anemia Falciforme, que foram realizadas no Brasil, referente à sua importância populacional, foram descritas a partir da década de 30. Na década de 60, com a implementação das técnicas de eletroforese, passaram a ser estudadas os outros tipos de hemoglobinopatias, assim como as hemoglobinas anômalas. Programas pioneiros utilizavam amostras de sangue de cordão umbilical coletadas no momento do nascimento e utilizavam como metodologia diagnóstica a técnica de eletroforese em acetato de celulose e eletroforese em ágar amido (GARRICK, 1973; PEARSON, 1974; SERJEANT, 1974 & SEXAUER, 1976).

Com o objetivo do diagnóstico precoce da Doença Falciforme no período neonatal e, mais importante ainda, a implantação de medidas específicas de puericultura e vacinação nestes doentes, foi iniciado em 29 de agosto de 1992, na cidade de Valinhos, o programa piloto de Triagem Neonatal no CIPOI - UNICAMP. A implantação da técnica de coleta através do sangue de cordão umbilical garantiu 100% de cobertura dos partos ocorridos no município e o diagnóstico precoce através da técnica de eletroforese em acetato de celulose, possibilitou a realização dos exames diariamente.

Após cinco anos, mais precisamente em 13 de janeiro de 1997, foi criada em Campinas – SP, a lei municipal *n.º 9216*. Esta lei garante, sobretudo a

obrigatoriedade de realização de exames diagnósticos para hemoglobinopatias no período neonatal nas maternidades e estabelecimentos hospitalares congêneres do município de Campinas. A partir desta data o programa iniciou a sua expansão para as cidades pertencentes à região metropolitana de Campinas, perfazendo um total de 35 municípios da Diretoria Regional de Saúde de Campinas (DIR XII), totalizando 78 hospitais cadastrados. O programa então instituído compreende até hoje, além dos cuidados de puericultura e vacinações específicas, o aconselhamento genético, treinamento das mães e familiares no manuseio destas crianças, interação com a escola dos pacientes, suporte social, psicológico e médico.

Em cumprimento à Portaria 822 / MS, de 06 de junho de 2001, que institui o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), o qual estabelece a criação de Serviços de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) capacitados a realizar exames diagnósticos para fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito e doença falciforme, o CIPOI - UNICAMP foi cadastrado em setembro de 2002 junto ao Ministério da Saúde como um SRTN, e toda a sua rotina técnica, laboratorial e assistencial necessitou ser modificada e implementada para atender às exigências da referida portaria. Em colaboração com a DIR XII, a partir de 19 de novembro de 2001, todas as amostras coletadas em sangue de cordão tiveram que ser substituídas pela coleta de punção plantar em papel de filtro, após 48 horas de vida.

Dentre os benefícios desta portaria, deve-se mencionar a restauração de um dos princípios fundamentais da ética médica, que é o da igualdade; garantindo acesso gratuito aos testes de triagem a todos os recém-nascidos brasileiros, independentemente da sua origem geográfica, etnia e classe sócio-econômica (RAMALHO, 2003).

Tendo em vista o pequeno número de trabalhos que analisaram quantitativamente os resultados oferecidos pela triagem neonatal para Doença Falciforme e outras hemoglobinopatias no Brasil, foi nosso objetivo estudar a frequência gênica destas hemoglobinopatias na região metropolitana de Campinas. Sendo os resultados obtidos, um subproduto da Triagem Neonatal, pudemos estabelecer a frequência real dos alelos S e C em uma determinada população de genes avaliados.

OBJETIVOS

- ✓ Verificar a frequência gênica de hemoglobinopatias diagnosticadas pela Triagem Neonatal na região metropolitana de Campinas pertencente a Regional de Saúde de Campinas, DIR XII.

- ✓ Verificar a frequência dessas alterações por cidade.

- ✓ Verificar se essas alterações encontram-se em equilíbrio de Hardy e Weinberg.

- ✓ Comparar os resultados obtidos pelas técnicas de eletroforese e por focalização isoeletrica.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 – Amostras

Neste estudo foram analisados os dados referentes à triagem neonatal para Doença Falciforme e outras hemoglobinopatias no período entre 28 de agosto de 1992 a 31 de dezembro de 2004. O sigilo quanto à identidade dos portadores foi garantido e solicitamos a dispensa do uso de termo de consentimento livre e esclarecido uma vez que utilizamos dados numéricos, e devido à dificuldade de localização de um contingente tão grande de pessoas. As crianças que nasceram nos municípios pertencentes à Divisão Regional de Saúde de Campinas (DIR-XII), que compreende 35 municípios (descrição dos municípios em Anexo 1), tiveram suas amostras de sangue de cordão umbilical coletadas, e encaminhadas diariamente ao Laboratório de Hematologia do CIPOI / UNICAMP para análise. Com o cadastramento da UNICAMP como SRTN em setembro de 2002, conforme Portaria MS 822/01, as amostras passaram a ser encaminhadas juntamente com Teste do Pezinho, já colhido rotineiramente pelos hospitais e postos de saúde municipais, para triagem da fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito, após as 48 horas de vida da criança e em papel filtro Schleicher & Schuell 903.

2 - Eletroforese de Hemoglobina

A técnica de eletroforese em acetato de celulose pH alcalino (Helena Laboratories Co.), utilizou um hemolisado contendo uma parte de sangue e duas partes de um reagente de lise de células vermelhas (Saponina 1% - Sigma Co.) (MARENGO-ROWE, 1965). As placas de acetato de celulose foram embebidas em uma solução tampão TEB (Tris-EDTA-Borato 0,025 M) pH alcalino 8,5 por 15 minutos (NAOUM, 1987). Após este período a placa foi transferida para uma cuba de eletroforese e submetida a uma voltagem de 350 volts por 20 minutos para separação das frações protéicas. Em cada placa de acetato de celulose foi possível a aplicação de 14 amostras, sendo 2 amostras controles preparados com Hbs normais (A) e anormais (F, S e C). A identificação do perfil eletroforético de cada amostra em um primeiro momento foi realizado pela observação visual das bandas protéicas separadas no acetato, utilizando-se os controles de Hbs anormais como referência. Os controles foram obtidos de um “pool” de Hbs anormais do sangue de crianças com hemoglobinopatias. Todas as amostras com Hbs anormais visualizadas na triagem inicial foram repetidas em uma nova eletroforese em acetato de celulose para confirmação da Hb alterada. Após esta confirmação, uma nova amostra de sangue da criança foi solicitada.

3 – Focalização Isoelétrica.

A análise por focalização isoelétrica foi realizada utilizando-se RESOLVE™ Systems, Neonatal Hemoglobin Test Kit (Perkin Elmer-Wallac, Akron, OH, USA) conforme recomendações do fabricante, seguida de algumas implementações. Foram utilizados 2 picotes de 3,4mm de diâmetro das amostras de sangue seco coletadas em papel de filtro e colocados em uma de placa micro-titulação com 96 furos, previamente mapeadas e adicionados 30 µl de solução de eluição. Em seguida a placa foi submetido à agitação por um período mínimo de 30 minutos para o desprendimento da hemoglobina do papel filtro. Após esta etapa, o gel de agarose foi ligeiramente seco com papel absorvente e uma tira plástica (template) foi utilizada como molde para aplicação de 5µl da solução de Hb formada. Foram utilizados controles contendo Hbs A,F,S,C e N. Em seguida, o gel foi colocado na cuba de focalização e a sua fonte geradora de voltagem ajustada para 1200 volts, 300 mA e 40 watts, o banho de circulação de água foi ajustado com temperatura de 12°C. Estes ajustes foram realizados após a realização de um estudo piloto com 500 amostras, e passou a ser utilizado como método padrão no laboratório do CIPOI - UNICAMP. A separação completa das frações de Hbs ocorreu durante o período de 1 hora e 45 minutos. Após este período, o gel foi fixado com ácido tricloro-acético 10% por 8 minutos, seguido de 3 lavagens consecutivas com água destilada de 15 minutos cada. O gel permaneceu cerca de 2 horas e 30 minutos na estufa a 56° graus para secagem completa e posterior análise. A identificação das frações de Hbs anormais inicialmente foi visual, comparando-as com o

controle do teste. Todas as amostras que apresentaram Hbs anormais foram submetidas a uma nova focalização isoelétrica para confirmação da Hb alterada. Os géis foram analisados e scaneados utilizando-se o sistema de IsoScanTM Imaging System (Perkin Elmer-Wallac) para identificação precisa do ponto isoelétrico de cada fração. Os controles de Hbs AD-Punjab e AE foram aplicados quando necessário. Foram solicitadas novas coletas para repetição do exame laboratorial nos seguintes casos: as amostras de sangue que não separaram as frações no gel de agarose e que foram identificadas como amostras inadequadas; crianças que receberam transfusão de sangue foram solicitadas nova coleta após 120 dias da data da última transfusão; amostras com Hbs anormais e perfil eletroforético de frações entre as Hbs S e C.

4 - Dosagem da fração de HbA₂

Todos os recém nascidos portadores de Hbs anormais tiveram os seus genitores convocados para a realização da investigação familiar. Amostras de sangue de punção venosa foram obtidas inicialmente dos genitores e submetidas à separação de suas frações em acetato de celulose e a realização do hemograma. A amostra do genitor cujo perfil eletroforético apresentou hemoglobinas normais, ou seja, Hb A e Hb A₂ e o VCM abaixo de 80 fl (Homem: 80-96 fl e Mulher: 81-99 fl), foram submetidas à dosagem quantitativa de Hb A₂ (LAFFERTY, JD; 1996). Os exames cujos resultados de Hb A₂ foram superiores a

3,5%, foram considerados sugestivos para traço talassêmico e uma nova coleta de sangue de criança foi agendada para 6 meses de vida.

5 – Análise Estatística

Os dados deste estudo foram submetidos à análise estatística pelo programa computacional SAS System for Windows (Statistical Analysis System), e para a análise da frequência gênica e do equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizou-se o programa Epi Info 2000.

RESULTADOS

Em nosso trabalho, foi importante analisar a abrangência da Triagem Neonatal. Por este motivo, foram levantados os dados referentes ao número de amostras analisadas durante o período de 28 de agosto de 1992 a 31 de dezembro de 2004. A pareceria junto às Secretarias e Vigilâncias Epidemiológicas Municipais favoreceram o levantamento dos dados referente à ocorrência de nascidos vivos em todos os hospitais e maternidades municipais.

Desta forma, a média da cobertura anual (%) da Triagem Neonatal pode ser observada no gráfico 1. Entretanto, há um aumento gradativo do número de amostras analisadas e se deve ao fato de que a partir de 1994 houve a inclusão de novos hospitais e maternidades ao programa, e no ano de 1997 a inclusão de novos municípios.

Cobertura da Triagem Neonatal

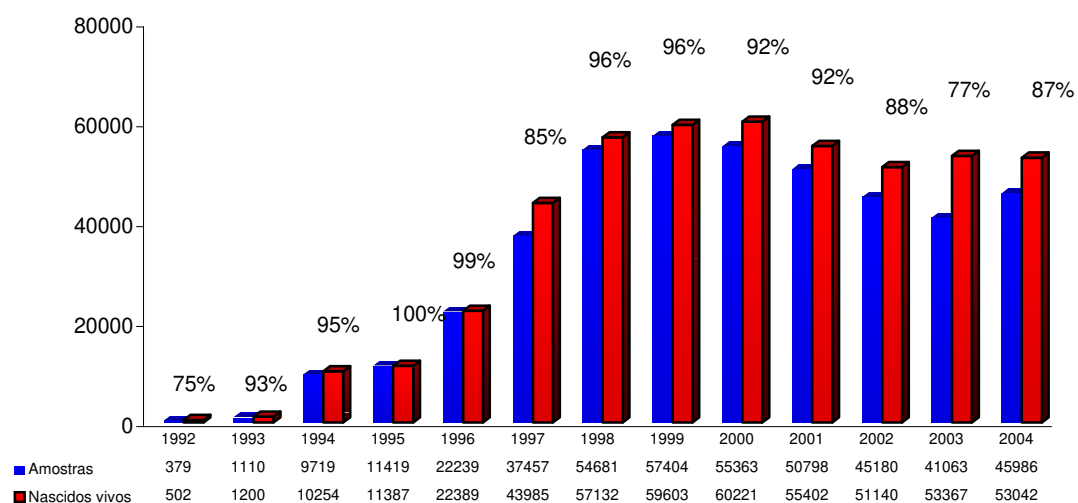


Gráfico 1 : Cobertura (%) anual da Triagem Neonatal no período de 28 de agosto de 1992 a 31 de dezembro de 2004.

Com a abrangência da Triagem Neonatal observada anteriormente, ressaltamos na tabela 1, a cobertura (%) ano a ano em cada município participante do nosso estudo, sendo coincidente com a data de início no Programa de Triagem Neonatal. Entretanto, verificamos que 17 (57%) dos municípios apresentaram cobertura superior a 90%; 8 (26,6%) foram superiores a 80%; 2 (6,7%) foram superiores a 70%; e 3 (10%) apresentaram cobertura (%) inferior a 70%.

Município / Ano	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	Média de Cobertura (%)
<i>Águas de Lindóia</i>	-	-	-	-	-	93	98	100	97	10	29	52	69	68
<i>Americana</i>	-	-	-	-	-	100	100	100	95	100	98	98	99	99
<i>Amparo</i>	-	-	-	-	-	100	99	99	99	99	99	97	97	99
<i>Atibaia</i>	-	-	-	-	-	75	84	99	93	63	91	78	81	83
<i>Bragança Paulista</i>	-	-	-	-	-	49	48	77	71	89	63	65	91	69
<i>Cabreúva</i>	-	-	-	-	-	98	100	99	99	100	94	86	87	95
<i>Campinas</i>	-	-	90	100	99	86	100	100	99	97	89	56	78	90
<i>Campo Limpo Paulista</i>	-	-	-	-	-	34	63	72	84	83	90	92	93	76
<i>Cosmópolis</i>	-	-	-	-	-	100	87	77	100	100	97	96	98	94
<i>Indaiatuba</i>	-	-	-	-	-	100	97	99	87	78	100	98	97	95
<i>Itatiba</i>	-	-	-	-	-	83	80	81	90	99	100	100	100	92
<i>Itupeva</i>	-	-	-	-	-			0	0	88	92	98	96	93
<i>Jaguariúna</i>						-	-	-	81	76	70	97	99	85
<i>Joanópolis</i>	-	-	-	-	-	91	66	80	77	71	85	97	100	83
<i>Jundiaí</i>	-	-	-	-	-	68	100	100	94	94	83	76	75	86
<i>Louveira</i>	-	-	-	-	-	88	94	100	100	98	99	100	99	97
<i>Monte Mor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95	95	91	95	94
<i>Morungaba</i>	-	-	-	-	-	58	73	73	99	100	93	100	100	87
<i>Nazaré Paulista</i>	-	-	-	-	-	19	33	46	66	78	94	99	97	67
<i>Nova Odessa</i>	-	-	-	-	-	68	100	100	99	100	100	100	100	96
<i>Paulínia</i>	-	-	-	-	-	80	100	86	100	76	67	100	100	89
<i>Pedreira</i>	-	-	-	-	-	72	80	72	91	98	98	97	99	88
<i>Piracaia</i>	-	-	-	-	-	100	99	98	97	89	66	81	99	91
<i>Santa Bárbara D'Oeste</i>	-	-	-	-	-	92	98	96	85	79	99	99	99	93
<i>Serra Negra</i>	-	-	-	-	-	90	93	95	100	100	100	99	97	97
<i>Socorro</i>	-	-	-	-	-	91	100	98	96	78	96	93	94	93
<i>Sumaré</i>	-	-	-	-	-	72	73	73	69	86	100	97	100	84
<i>Valinhos</i>	75	93	100	98	100	98	96	100	100	100	100	98	99	97
<i>Várzea Paulista</i>	-	-	-	-	-	80	84	84	51	100	86	65	44	74
<i>Vinhedo</i>	-	-	-	-	-	79	99	99	100	95	96	97	100	96

Tabela 1 : Abrangência (%) da Triagem Neonatal ano a ano de cada município participante.

No período do nosso estudo, 433.306 recém nascidos foram analisados, sendo que 9.942 amostras (2,29%) apresentaram algum tipo de hemoglobina variante. A tabela 2 mostra a distribuição dos recém nascidos portadores de hemoglobinopatias S e C por município da Secretaria Regional de Saúde de Campinas (DIR XII). Verificamos a incidência de portadores do traço falciforme (AS), que variou de 1,03% no município de Águas de Lindóia, até índices de 2,62% no município de Sumaré. Os portadores do traço C (AC), apresentaram incidência que variou de 0,10% em Nazaré Paulista a 0,77% em Sumaré.

Cidade	Amostras analisadas	AS	%	AC	%	SS	%	SC	%	CC	%
Águas Lindóia	1837	19	1,03	15	0,82	-	-	-	-	-	-
Americana	28156	359	1,28	135	0,48	3	0,01	2	0,01	-	-
Amparo	7359	83	1,13	39	0,53	-	-	-	-	-	-
Atibaia	12449	217	1,74	52	0,42	2	0,02	1	0,01	-	-
Bragança Paulista	14722	192	1,30	58	0,39	2	0,01	1	0,01	-	-
Cabreúva	3184	54	1,70	17	0,53	-	-	3	0,09	-	-
Campinas	186871	3198	1,71	1037	0,55	33	0,02	11	0,01	4	0,002
Campo Limpo Paulista	4900	116	2,37	37	0,76	-	-	1	0,02	-	-
Cosmópolis	5734	117	2,04	39	0,68	1	0,02	-	-	-	-
Indaiatuba	16809	340	2,02	79	0,47	2	0,01	2	0,01	-	-
Itatiba	8361	183	2,19	40	0,48	4	0,05	1	0,01	-	-
Itupeva	412	10	2,43	1	0,24	-	-	-	-	-	-
Jaguariúna	2987	46	1,54	15	0,50	-	-	-	-	-	-
Joanópolis	942	8	0,85	2	0,21	-	-	-	-	-	-
Jundiaí	59545	822	1,38	265	0,45	9	0,02	5	0,01	-	-
Louveira	1547	23	1,49	11	0,71	-	-	-	-	-	-
Monte Mor	1542	26	1,69	14	0,91	2	0,13	-	-	-	-
Morungaba	1325	20	1,51	9	0,68	1	0,08	-	-	-	-
Nazaré Paulista	1032	13	1,26	1	0,10	-	-	-	-	-	-
Nova Odessa	3241	49	1,51	18	0,56	-	-	-	-	-	-
Paulínia	5955	127	2,13	29	0,49	-	-	-	-	-	-
Pedreira	3195	46	1,44	12	0,38	-	-	-	-	1	0,031
Piracaia	2716	33	1,22	11	0,41	-	-	-	-	-	-
Santa Bárbara D'Oeste	11274	201	1,78	66	0,59	1	0,01	1	0,01	-	-
Serra Negra	2472	34	1,38	15	0,61	1	0,04	2	0,08	-	-
Socorro	3137	13	0,41	15	0,48	1	0,03	-	-	-	-
Sumaré	20588	539	2,62	159	0,77	4	0,02	4	0,02	2	0,010
Várzea Paulista	1043	14	1,34	9	0,86	-	-	1	0,10	-	-
Valinhos	13074	149	1,14	58	0,44	-	-	1	0,01	-	-
Vinhedo	6283	100	1,59	36	0,57	1	0,02	-	-	-	-

Tabela 2 : Freqüência das hemoglobinopatias S e C por município de nascimento do recém nascido.

Na tabela 3, verificamos a incidência destas hemoglobinas em amostras coletadas em sangue de cordão e analisadas pela técnica de eletroforese de Hb em acetato de celulose alcalina; e amostras coletadas de punção plantar do recém nascidos, analisadas pela técnica de eletroforese por focalização isoelétrica.

<i>Alteração</i>	<i>Tipo</i>	<i>Amostras de sangue de cordão</i>	<i>Amostras de sangue de punção plantar</i>	<i>Total</i>	<i>Incidência</i>
Normal	AF	191.524	231.840	423.364	
Hemoglobinopatias		3.284 (1,68%)	6.658 (2,79%)	9.942 (2,29%)	1:43
Traço Falciforme	AFS	2.394 (1,22%)	5.100 (2,13%)	7.494 (1,73%)	1:58
Traço C	AFC	843 (0,43%)	1.477 (0,62%)	2.320 (0,53%)	1:186
Anemia Falciforme	SS	26	37	63	1:6.877
Dupla Heterozigose	SC	18	21	39	1:11.100
S β^0 Talassemia	S β^0 Tal.	1	9	10	1:433.306
S β^+ Talassemia	S β^+ Tal.	-	5	5	1:86.661
Hb S + PHHF	Hb S/PHHF	-	1	1	1:433.306
Doença da Hb C	CC	1	6	7	1:61.900
Hb C- β^0 Talassemia	C- β^0 Tal.	1	1	2	1:216.653
Hb C- β^+ Talassemia	C- β^+ Tal.	-	1	1	1:433.306
Total de amostras analisadas		194.808	238.498	433.306	

Tabela 3 : Frequência das hemoglobinopatias entre as 433.306 amostras analisadas dos municípios cadastrados no Programa de Triagem Neonatal, no período de 28 de agosto de 1992 a 31 de dezembro de 2004.

As frequências gênicas verificadas na amostra total foram 0,98690 para o gene β^A ; 0,01005 para o gene β^S e 0,00303 para o gene β^C . A população estudada está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $\chi^2_{(5)}=6,57$ e $P=0,25$.

Do total de 9.942 amostras positivas para hemoglobinopatias, 67,76% são crianças de cor branca, 11,09% são crianças de cor negra e 20,24% são crianças de cor parda, apresentadas no gráfico 2.

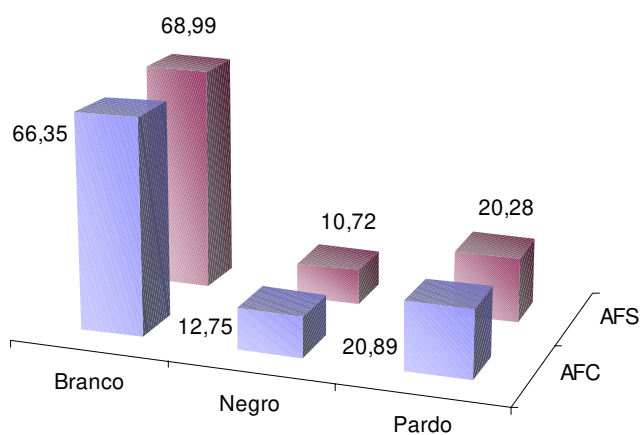


Gráfico 2 : Distribuição dos portadores de traço de hemoglobinopatias conforme cor de pele.

Atualmente de acordo com os resultados obtidos na Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio (IBGE), a região Sudeste mostra que 71,1% da população são brancos, 4,8% são negros e 22,8% são pardos.

O gráfico 3 apresenta os tipos de grupos étnicos encontrados nos portadores de doença falciforme. Do total dos pacientes identificados, 54,3% são brancos, 21,20% são pardos, 18,9% são negros e 5,5% não foram informados. Não foram identificados grupos étnicos de origem indígena.

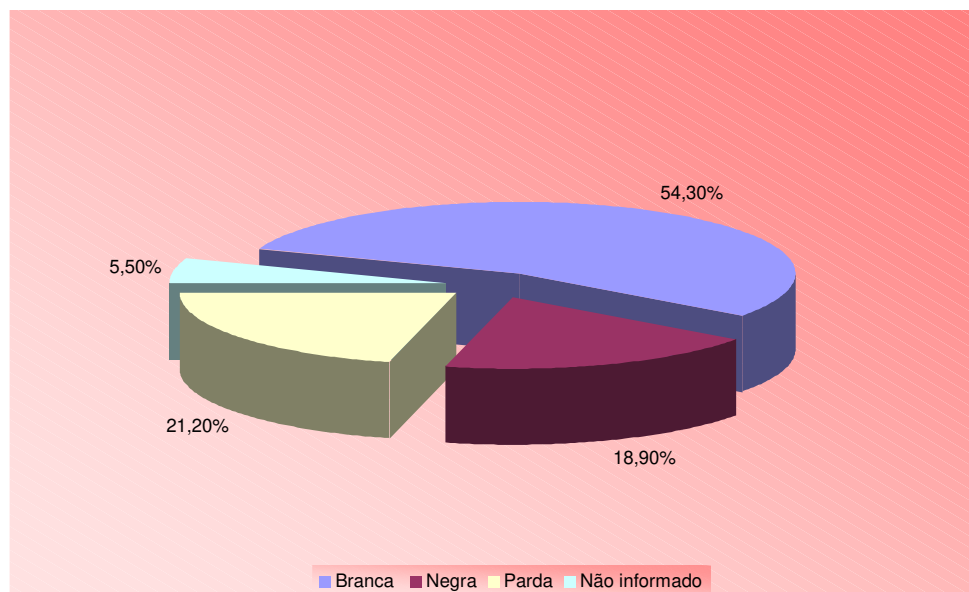


Gráfico 3 : Distribuição dos portadores de doenças falciformes conforme cor da pele.

Com relação à detecção das Hbs S e C, no gráfico 4 verificamos a variação da incidência por ano para cada uma das alterações. No período entre 1992 a 1999, as amostras de sangue de cordão inicias e re-teste, foram analisadas pela técnica de eletroforese em acetato de celulose alcalina. No período entre 2000 e 2004, as amostras analisadas foram obtidas de punção plantar do recém nascido e a técnica utilizada foi a eletroforese por focalização isoeletrica.

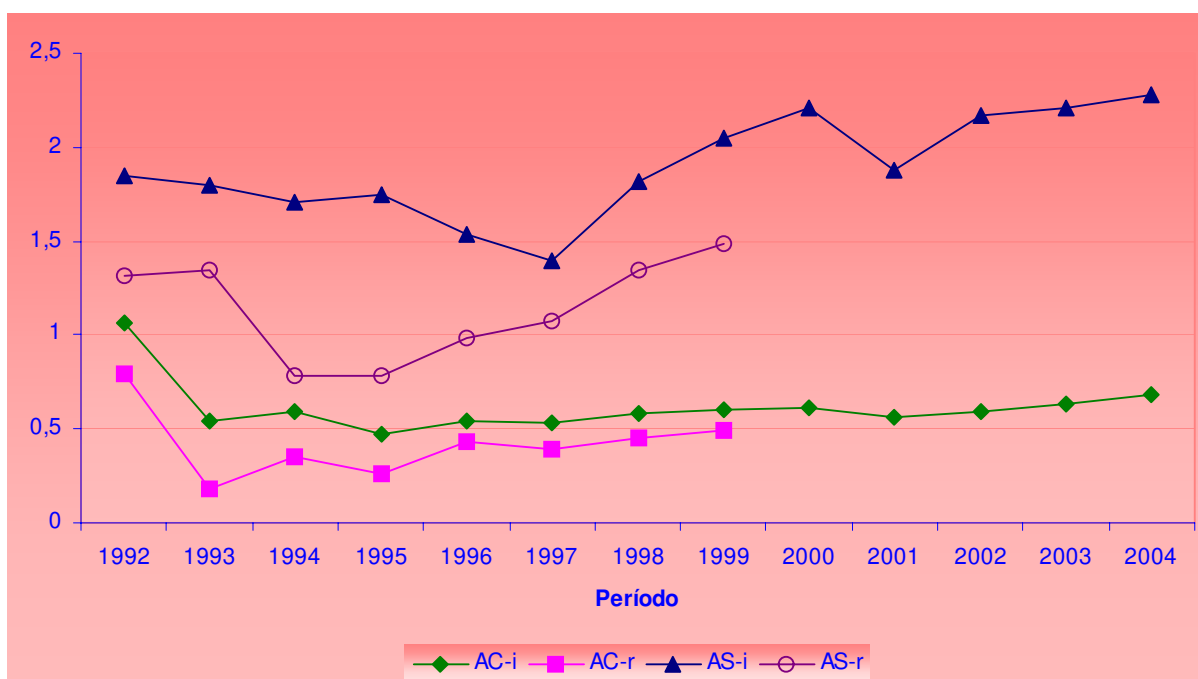


Gráfico 4-Variação da frequência genotípica dos heterozigotos S e C no período de 28 de agosto de 1992 a 31 de dezembro de 2004.

No período de 1992 a 1999, foram analisadas 194.808 amostras de sangue de cordão, e foram verificadas que 196 amostras apresentaram resultados falso-positivos, ou seja, a Hb alterada identificada inicialmente, não foi constatada no reteste, quando utilizada a técnica de eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose alcalino. As amostras de sangue dos genitores foram coletadas e não foi observada a presença de Hb alterada. Entretanto, no período entre 2001 e 2004, com a análise de 238.498 amostras, foram verificadas 8 amostras apresentando este mesmo perfil. As amostras foram coletadas neste período por punção plantar do recém nascido e analisadas pela técnica de eletroforese por focalização isoelétrica, verificados na tabela 4.

Período	Amostras	Técnica	Falso positivo observado	Genitores
1992 – 1999	194.808	Acetato de celulose alcalino	196 (0,10%)	Normais
2000 – 2004	238.498	Focalização isoelétrica	8 (0,003%)	Normais

Tabela 4 : Identificação de amostras falso positivas.

Também foi verificado no período de 1992 a 1999, onde as amostras foram obtidas pelo sangue de cordão, a presença de 31 resultados falso-positivos, por contaminação com o sangue materno, verificados na tabela 5.

Período	Amostras	Técnica	Falso positivo observado	Genitores	
1992 – 1999	194.808	Acetato de celulose alcalino	31 (0,015%)	Mãe	Pai
			22 – AS	22 – AS	22 - AA
			09 - AC	09 – AC	09 - AA

Tabela 5 : Identificação de amostras falso positivas, por contaminação com sangue materno.

No período do estudo, foram constados recém nascidos os quais seus exames resultaram alterados no inicial e no re-teste e seus genitores constados normais, observados na tabela 6.

Período	Amostras	Observado	Genitores
1992 - 2004	433.306	96 (0,022%)	Normais

Tabela 6 : Identificação de amostras positivas e genitores normais.

DISCUSSÃO

Cerca de 3 a 4% da população mundial é portadora de pelo menos um gene anormal da molécula da Hb. No Brasil, estima-se a presença de 6.000.000 de portadores heterozigotos para esta doença (ZAGO, 1980 e 1983).

Estudos epidemiológicos mostram que as formas graves de hemoglobinopatias chegam a atingir uma criança a cada 700 nascimentos (WHO-Update, 1984), o que evidencia sua alta incidência quando comparada a outras patologias congênitas como o hipotireoidismo (1:3.500 nascimentos) ou a fenilcetonúria (1:12.000 nascimentos) (Vichinsky, 1988).

A doença falciforme é a mais freqüente dentre as hemoglobinopatias chegando a atingir 1 a cada 500 indivíduos da raça negra (WHO, 1985). Esta doença está associada a manifestações clínicas de gravidade variável e alta incidência de morbidade e mortalidade. Sem medidas preventivas contra infecções, 25% das crianças acometidas pela Doença Falciforme morrem antes de atingirem 5 anos de idade; em virtude das complicações secundárias da doença de base, principalmente as infecciosas (Leiken, 1989 e Gaston, 1986).

A proposta de diagnóstico neonatal das síndromes falciformes já é bastante conhecida e teve seu impulso na década de 70 nos E.U.A e na Jamaica, entre outros locais. Alguns trabalhos demonstraram com clareza a importância desse procedimento na redução de septicemia por germes encapsulados em crianças menores de 5 anos de idade. (Vichinsky, 1991 e Gutiérrez, 1992).

Foi exatamente com o objetivo do diagnóstico precoce da doença falciforme no período neonatal e, mais importantemente, a implantação de medidas específicas de puericultura e vacinação nestes doentes que foi iniciado em agosto de 1992, no CIPOI - UNICAMP, o Programa de Triagem Neonatal para Doença Falciforme. Este trabalho foi pioneiro na realização de exames diagnósticos para hemoglobinopatias, e propiciou o diagnóstico precoce, a orientação genética e acompanhamento médico sistemático aos doentes detectados.

A implantação da técnica de coleta através do sangue de cordão umbilical inicialmente, garantiu a média de 92% de cobertura dos partos ocorridos nos municípios e o diagnóstico precoce através da técnica de eletroforese de Hb, possibilitou a realização dos exames rotineiramente. No ano de 2000, o laboratório de triagem substituiu a técnica de coleta de amostras através do sangue de cordão umbilical do recém nascido, para a coleta de punção plantar em papel filtro, juntamente com o teste do pezinho. Muitas vantagens foram constatadas, como mostra o quadro 1.

Quadro 1 : amostras colhidas em papel filtro (S&S 903) comparadas com sangue de cordão.

Parâmetro	Papel filtro	Sangue de cordão
Coleta de exames	Única coleta	2 coletas, se alterado necessita re-teste
Transporte	Barato, fácil, amostra pode ser arquivada	Alto custo, frágil, manuseio cauteloso
Estabilidade da amostra	Variável	Relativamente estável
Qualidade da amostra	não exceder 30 dias Pode ocorrer degradação múltipla das frações da Hb.	Resolução clara , poucos artefatos
Infecção	Baixo potencial	Alto potencial
Contaminação	Transfusões	Sangue materno
Hemoglobina Bart's	Perdida	Preservada

Neste período também a técnica de eletroforese de Hb em acetato de celulose foi substituída pela técnica de focalização isoeletrica, em virtude das amostras estarem sendo coletadas em papel filtro.

No ano de 2001 , em cumprimento à Portaria 822 do Ministério da Saúde, de 06 de Junho de 2001, que institui o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), e estabelece a criação de Serviços de Referência em Triagem Neonatal, a pesquisa para hemoglobinopatias passou a ser instituída como Fase II do Programa.

A prevalência de 1,73% do traço falciforme encontrada em nosso estudo, apresentou-se próxima ao valor relatado por Naoum,1997, que em levantamento específico realizado no país, relatou a prevalência de traço falciforme por unidade de federação, apontou a região Sudeste, mais precisamente em São Paulo, valores de 1,64% em uma amostragem de 47.053 amostras analisadas, seguido

do Rio de Janeiro com 3,36% de portadores em 4.645 amostras. Já em Minas Gerais 3,97% portadores foram identificados em 1.936 amostras analisadas.

Outros trabalhos estudaram a incidência do traço falciforme no estado de São Paulo, mas não em triagem neonatal, revelaram a frequência de 1,13% em estudo realizado em doadores de sangue na cidade Bragança Paulista no estado de São Paulo, realizado por Acedo et al em 2002. Ramalho e colaboradores em 1999, mostraram uma incidência de 2,7% em uma população mista de doadores de sangue, estudantes e gestantes no estado de São Paulo. Já em um estudo de revisão realizado por Zago, em 1986 no estado de São Paulo, revelou uma incidência de 1,9% de portadores de traço na população miscigenada e 5,8% entre negros da mesma população estudada. Essas diferenças encontradas refletem o perfil da amostra avaliada.

Os poucos trabalhos que estudaram a triagem neonatal para detecção de hemoglobinopatias no Brasil, mais especificamente na região sudeste, apresentaram incidências do traço falciforme de 3,96% no Rio de Janeiro, constado por Lobo e colaboradores em 2003; e 3,29% em Minas Gerais, através dos estudos de Viana e colaboradores em 2001. Outros trabalhos também avaliaram a triagem neonatal em outros estados. No sul do país, com dados de Neto *et al.* Em 2002, demonstrando que em Porto Alegre a frequência dos portadores de traço é menor, 1,20%. Já no Paraná, Sant'ana em 2001, avaliou 1,26% de portadores para traço S. No nordeste do país, em Pernambuco, Marques em 1999, em amostras de sangue de cordão verificou a incidência de 5,1% de traço S, índices próximos aos relatados na Bahia. Na Paraíba, Vieira em

1993 constatou 2,72% de portadores. Estes dados podem ser verificados no quadro 2.

Quadro 2 : Trabalhos publicados no Brasil, sobre triagem neonatal para hemoglobinopatias.

				Frequência observada			
Estado	Cidade	Métodos	Material	N	AS	AC	Referências
observado							
Bahia	Salvador	HPLC	Sangue de cordão	590	9,8%	0,2%	Adorno; VA, et al, 2005
Santa Catarina	Estado - SC	IEF	Papel filtro	40.028	0,88%	0,07%	Santos-Silva; MC, et al, 2005
Rio Grande do Norte	Natal	AC/ÁGAR	Sangue cordão	1.940	1,5%	0,31%	Araújo; MCPE, et al, 2004
Rio de Janeiro	Estado - RJ	HPLC	Papel filtro	99.260	3,96%	0,59%	Lobo; CLC, et al, 2003
São Paulo	São J. do Rio Preto	AC/ÁGAR/IEF	Sangue de cordão / papel filtro	1.478	3,32%	0,61%	Siqueira; FAM, et al, 2002
Rio Grande do Sul	Porto Alegre	IEF	Papel filtro	1.615	1,2%	0,4%	Neto; EC, et al, 2002
Minas Gerais	Estado – MG	IEF	Papel filtro	128.326	3,29%	1,21%	Viana; MB, et al, 2001
São Paulo	São J. do Rio Preto	AC/ÁGAR	Sangue de cordão	913	2,52%	0,22%	Feet-Conte, AC, et al, 2001
Paraná	Estado - PR	IEF	Papel filtro	7.956	1,26%	0,36%	Sant’anna; AL, 2001 (TESE)
Pernambuco	Estado - PE	AC	Sangue de cordão	1.988	5,1%	0,6%	Bandeira; FMGC, et al, 1999
Paraíba	João Pessoa	AC/ÁGAR	Sangue de cordão	1.006	2,72%	0,26%	Vieira; J, et al, 1993

Essas variações regionais refletem a distribuição étnica do nosso país. Segundo os dados do PNADs - Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio de referentes ao Estado de São Paulo pode-se dizer que a distribuição por cor ou raça da população é de : branca 71,1%; negra 4,8%; parda 22,8% e amarela e indígena 1,3%.

Dos dados levantados em nosso trabalho dos recém nascidos que possuíam a informação de cor ou raça, 67,76% são brancos; 11,09% são negros e 20,24% são pardos. No entanto, a comparação desses dados fica prejudicada uma vez que a qualificação da cor é extremamente subjetiva.

Com relação ao método empregado na triagem neonatal, a implantação da técnica de coleta através do sangue de cordão umbilical garantiu a media de cobertura de 92% dos partos hospitalares. Nas amostras cujos exames foram positivos para hemoglobinopatias, uma segunda coleta do recém nascido foi necessária para confirmação da Hb alterada. No período de 1992 a 1999, onde a técnica de eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose foi utilizada, 196 recém nascidos (0,10%) tiveram seus exames re-testados e não foi confirmada a presença da Hb alterada em 194.808 amostras analisadas. As amostras dos genitores foram utilizadas para controle. Estes casos foram classificados como falsos positivos. Acredita-se que esses erros de interpretação ocorreram devido ao fato de que as amostras de sangue de cordão são altamente protéicas e viscosas, e com isso acabam por interferir na corrida eletroforética apresentando um perfil similar à hemoglobina S.

No período de 2001 a 2004, onde foi utilizada a técnica de focalização isoeletrica, esta mesma verificação foi feita e encontramos a presença de 8 falsos positivos, compreendendo 0,003% do total de 238.498 amostras analisadas.

Uma dificuldade enfrentada no diagnóstico das amostras de sangue de cordão umbilical é a contaminação com sangue materno no momento da coleta. Em nosso estudo foram identificados 31 casos de contaminação, o que compreende 0,015% do total de 194.808 amostras analisadas. Foram relatados por Papadea e colaboradores em 1994, índices de contaminação com sangue materno de 1,3%. Entretanto, Kleman e colaboradores em 1980, apresentaram valores entre 1 e 3%.

Em relação às amostras dos recém nascidos, em que o resultado inicial e o re-teste confirmaram presença de Hb alterada e seus genitores normais, compreenderam 96 amostras (0,022%) em 433.306 recém nascidos avaliados.

O Programa de Triagem Neonatal compreende além dos cuidados de puericultura e vacinações específicas, o treinamento das mães e familiares no manuseio destas crianças, interação com a escola dos pacientes, suporte social, psicológico e médico.

CONCLUSÕES

- A incidência do traço falciforme e do traço C na amostra geral foi de 1,73% e 0,53% respectivamente, que é semelhante a valores encontrados em nosso estado pelos estudos anteriormente realizados.
- A distribuição das freqüências genótípicas está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.
- Houve uma variação na freqüência dos portadores de traço falciforme encontrados entre os vários municípios analisados, com menor incidência no município de Socorro (0,41%) e maior em Sumaré (2,62%). Com relação ao traço C, a menor incidência foi identificado no município de Nazaré Paulista (0,10%) e maior em Monte Mor (0,91%).
- A técnica de focalização isoeletrica se mostrou mais sensível que a de acetato de celulose, com menos falso positivos. A utilização da amostra plantar de sangue foi vantajosa, uma vez que a amostra pelo sangue de cordão apresentava (0,022%) contaminação materna.

ANEXO

Descrição dos municípios pertencentes à Divisão Regional de Saúde de Campinas

– DIR XII

Município
Águas de Lindóia
Americana
Amparo
Atibaia
Bragança Paulista
Cabreúva
Campinas
Campo Limpo Paulista
Cosmópolis
Indaiatuba
Itatiba
Itupeva
Jaguariúna
Joanópolis
Jundiaí
Louveira
Monte Mor
Morungaba
Nazaré Paulista
Nova Odessa
Paulínia
Pedreira
Piracaia
Santa Bárbara D'Oeste
Serra Negra
Socorro
Sumaré
Valinhos
Várzea Paulista
Vinhedo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEKILE, A.D. Anthropology of the beta S gene flow from West Africa to North Africa, the Mediterranean, and Southern Europe. **Hemoglobin** 1992; 16 (1-2): 105-121.

ALVAREZ FILHO, F.; NAOUM, P.C.; MOREIRA, H.W.; CRUZ, R.; MANZATO, A J.; DOMINGOS, C.R.B. Distribución geográfica, etária y racial de las hemoglobinas S en Brasil. **Sangre** 1995; 40: 97-102.

ANTONARASKIS, S.E., KAZAZIAN, Jr., H.H. & ORKIN, S.H. DNA polymorphism and molecular of the human globins gene clusters. **Hum. Genet.** 1985; 69: 1-14

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

BONINI-DOMINGOS, C.R. **Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil: diversidade genética e metodologia laboratorial.** [Tese de Doutorado] São José do Rio Preto (SP) Universidade Estadual Paulista; 1993.

Eaton W; Hofrichter J. **Sickle Hemoglobin Polymerization.** In : Embury S.; Hebbel R., Mohandas N.; Steiberg S. **Sickle cell disease : basic principles and clinical practice.** Philadelphia : Lippicott-Raven; 1996. p. 53-87.

EDELSTEIN, S.J. **The sickled cell: from myths to molecules.** Cambridge: Harvard University Press; 1996.

EDINGTON, G.M.; LEHMANN, H. The distribution of hemoglobin C in West Africa. **Man** 1956; 36: 1-3.

EMBURY, S.H. **Sickle Cell disease: Basics and clinical practice.** Neonatal Screening. New York. Raven Press, 1994; 509-13.

GASTON, M.H.; VERTER, J.I.; WOODS, G. Prophylaxis with oral penicillium in children with sickle cell disease. **New England J Med** 1986; 314: 1593-1599.

GARRICK, M.D.; DEMBURE, P.; GUTHRIE, R. Sickle cell anemia and other hemoglobinopathies. Procedures and strategy for screening employing spots of blood on filter paper as specimens. **New England J Med** 1973; 288: 1265-1268.

GROVER, R.; WETHERS, D.; SHAHID, S.; GROSSI, M.; GOLDBERG, D.; DAVIDOW, B. Evaluation of the expanded newborn screening program in New York city. **Pediatrics** 1978; 61: 740-749.

HARKNESS, D.R. Sick cell trait revisited. **Am. J. Medicine** 1989; 87: 30-34.

HERRICK, J.B. Peculiar elongated and sickle shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Arch Intern Med** 1910; 6: 517-521.

HIGGINS, N.T.; CLARKE, G.M. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. **Clin Chem** 2000; 46: 8 (B) 1284-1290.

HONIG, G.R. & ADAMS III, J.C. Human hemoglobin genetics. Viena, Springer-Verlag Publ., 1986.

ITANO, H.A.; NEEL, J.V. A new inherited abnormality of human hemoglobin. **Proc. Natl. Acad. Sci** 1950; 36: 613-617.

KAN, Y.W.; DOZY, A.M. Evolution of the hemoglobin S and C genes in world populations. **Science** 1990; 209: 388-390.

KULOZIK, A.E.; KAR, B.C.; SATAPATHY, R.K.; SERJEANT, B.E.; SERJEANT, G.R.; WEATHERALL, D.J. Fetal hemoglobin levels and β^s globins haplotypes in an Indian population with sickle cell disease. **Blood** 1987; 69 (6): 1742-1746.

KULOZIK, A.E.; WAINSCOT, J.S.; SERJEANT, G.R.; KAR, B.C.; AL-AWAMY, B.; ESSAN, G.J., et al. Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for the independent Asian origin of the sickle cell mutation. **Am. J. Hum Genet** 1986; 39 (2) : 239-244.

LAFFERTY, J.D.; CROWTHER, M.A.; ALI, M.A.; LEVINE, M.L. The evaluation of various mathematical RBC indices and their efficacy in discriminating between thalassemic and non-thalassemic microcytosis. **Am J Clin Pathol** 1996, 106: 201-205.

LIVINGSTONE, F.B. **Frequencies of hemoglobin variants**. Oxford University Press; 1985.

LIVINGSTONE, F.B. Hemoglobin History in West Africa. **Hum. Biol.** 1976; 48: 487-500.

MARENGO-ROWE, A.J. Rapid electrophoresis and quantification of hemoglobin on cellulose acetate. **J Clin Path** 1965, 18: 790-792.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ASSISTENCIA À SAÚDE. COORDENAÇÃO DE SANGUE E HEMODERIVADOS. **Programa de Anemia Falciforme**. Portaria 951/MS – 13p. Brasília, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE POLÍTICAS PÚBLICAS. **Manual de Doenças Mais Importantes por Razões Étnicas, na População Brasileira Afro-Descendente**. Brasília, 2001.

MOO-PENN, W.F.; JUE, D.L., JOHNSON, M.H., BECHTEL, K.C., PATCHEN, L.C. Hemoglobin variants and methods used for their characterization during 7 years of screening at the Center of Disease Control. **Hemoglobin** 1980; 4: 347-351.

NAOUM, P.C. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. Rev. **Bras Pathol Clin** 1987; 23: 68-79.

NAOUM, P.C. **Eletroforese Técnicas e Diagnósticos**. Ed. Santos, 1999.

OLIVEIRA, F.V.P.; AIHARA T.; CANÇADO, R.D. Alterações fundoscópicas nas hemoglobinopatias SS e SC. **Arq Bras Oftal** 1996; 59 (3) : 234-238.

PAGINER, J.; MEARS, J.G.; DUNDA-BELKHODJA, O.; SCHAEFER-REGO, K.E.; BELDJOR, C.; NAGEL, R.L. et al. Evidence for the multicentric origin of sickle cell disease hemoglobin gene in Africa. **Proc Natl Acad Sci USA** 1984; 81 (6) : 1771-1773.

PAULING, L.; ITANO, H.A.; SIGER, S.J.; WELLS, I.C. Sick cell anemia, a molecular disease. **Science** 1949; 110: 543-546.

PEARSON, H.A.; O' BRIEN, R.T.; McINTOSH, S.; ASPNES, G.T.; YANG, M.M. Routine screening of umbilical cord blood for sick cell disease. **JAMA** 1974; 227: 420-421.

POWARS, R.D. β^S -gene-cluster haplotypes in sick cell anemia. In: Nagel, R.L. (ed.) **Hematology/Oncology Clinics of North America - Hemoglobinopathies** 1991; 5(3): 475-493.

RACHMILEWITZ, E.A.; LEVI, S.; HUISMAN, T. H. J. High frequency of hemoglobin C in an Israel Brodouin tribe. **Israel J. Med. Sci** 1974; 10: 219-224.

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

RAMALHO, A.S.; COMPRI, M.B.; POLIMENO, N.C.; STELLA, M.B. Programa Comunitário de hemoglobinopatias hereditárias em população estudantil brasileira. **Rev Saúde Pública** 1996; 30 (2): 187-195.

RAMALHO, A.S.; PAIVA e SILVA, R.B. Community Genetics: a new discipline and its application in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública** 2000; 16: 261-263.

RAMALHO, A.S.; MAGNA, L.A.; PAIVA e SILVA, R.B. A Portaria 822/01 do Ministério da Saúde e as suas peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Cad Saúde Pública** 2003; 19(4): 1954-1959.

RAMSAY, M.; JENKINS, T. Globin gene-associated restriction-fragment-length polymorphisms in Southern African peoples. **Am J Hum Genet** 1987; 41(6) : 1132-1144.

RUIZ, M.A . Síndromes Falcêmicas. **Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemot.** 1985; 7: 47-51.

SALZANO, F.M.; TONDO, C.V. Hemoglobin types in Brazilian populations. **Hemoglobin** 1982; 6: 85-97.

SANSSARICQ, H.; MARRILL, G.; PORTIER, A.; CABANNES, R. Les hemoglobinopathies en Haute-Volta. **Sangre** 1959; 30: 503-511.

SERJEANT, B.E.; FORBES, M.; WILLIAMS, L.L.; SERJEANT, G.R. Screening cord bloods for detection of sickle cell disease in Jamaica. **Clin Chem** 1974; 20: 666-669.

SERJEANT, G.R. **Sickle Cell Disease**. Second Edition. Oxford, Oxford Medical Publications, 1992. p.379. V.1

SEXAUER, C.L.; GRAHAM, H.L.; STARLING, K.A.; FERNBACH, D.J. A test for abnormal hemoglobins in umbilical cord blood. **Am J Dis Child** 1976; 130: 805-806.

SCHEDBAUER, L.M.; Pass, K.A. Cellulose acetate/ citrate agar electrophoresis of filter paper hemolysates from hell stick. **Pediatrics** 1989; 83 (5): 839-842.

SCHNEE, J.; AULEHLA-SCHOLS, C.; EIGEL, A.; HORST, J. Hb D Los Angeles (D-Punjab) and Hb Presbyterian - analysis the defect at the DNA level. **Human Genetics** 1999; 84: 365-367.

STAMATOYANNOPOULUS, G.; NIENHUIS, A.W.; LEDER, P.; MAJERUS, P.W. **The molecular basis of blood diseases**. Philadelphia, Saunders, 1987.

TOMPSON, M.W.; McINNIS, R.R.; WILLARD, H.F. **GENÉTICA MÉDICA**. Ed. Guanabara Koogan, 1993. V.1 p.158-176.

VICHINSKY, E; HURST, D.; EARLES, A.; KLEMAN, K.; LUBIN, B. Newborn screening for sickle cell disease: effect and mortality. **Pediatrics** 1988; 81(6): 749-755.

ZAGO, M.A.; SILVA JR, W.A.; FRANCO, R.F. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the Brazilian population. **Ciência e Cultura** 1999; 51: 226-234.

ZAGO, M.A.; COSTA, F.F. Hereditary hemoglobin disorders in Brazil. **Trans R S Trop Med Hyg** 1985; 79: 385-388.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. The Hemoglobinopathies. **Bailliers Clinical Hematology**. W.B. Saunders Company, London. 1993.

WILLIAMS, S.; MAUDE, G.H.; SERJEANT, G.R. Clinical presentation of sickle cell disease cell-hemoglobin C (SC) disease. **J. Pediatr** 1986; 109: 586-589.