

AS ALTERAÇÕES HEMOGLOBÍNICAS NA PRÁTICA MÉDICA.

DR. ANTONIO SÉRGIO RAMALHO

1979



AS ALTERAÇÕES HEMOGLOBÍNICAS NA PRÁTICA MÉDICA

Antonio Sérgio Ramalho

Professor Livre Docente do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

- 1980 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

HEMOGLOBINAS NORMAIS

Hemoglobinas embrionárias

Hemoglobinas fetais

Hemoglobinas do adulto

CLASSIFICAÇÃO DAS HEMOGLOBINOPATIAS HEREDITÁRIAS

Hemoglobinopatias estruturais

Hemoglobinopatias por deficiência de síntese

SIGNIFICADO CLÍNICO DAS HEMOGLOBINOPATIAS ESTRUTURAIS

Hemólise: as hemoglobinas instáveis

Cianose: as hemoglobinas M

Policitemia: as hemoglobinas com aumento da afinidade pelo o
xigênio.

"Falcização": a hemoglobina S

Distribuição geográfica da hemoglobina S

Anemia falciforme

Traço siclêmico

Reconhecimento laboratorial da hemoglobina S

OUTRAS ALTERAÇÕES HEMOGLOBÍNICAS FREQUENTES EM NOSSO MEIO:AS

HEMOGLOBINAS C e D Punjab

SÍNDROMES TALASSÊMICAS

Evolução do conceito de talassemia

Bases moleculares das talassemias

Talassemias alfa

Síndrome de hidropsia fetal por hemoglobina de Bart

Doença da hemoglobina H

Traços talassêmicos alfa 1 e 2

Hemoglobina Constant Spring

Talassemias beta

Anemia de Cooley

Traço talassêmico beta

Reconhecimento laboratorial dos portadores das talas
semias beta

Talassemia delta-beta

Distribuição geográfica das talassemias

Mecanismos homeostáticos que mantêm o polimorfismo das talassemias

ESTADOS SIMILARES ÀS TALASSEMIAS

Síndrome da hemoglobina Lepore

Persistência hereditária da hemoglobina fetal

MICRODREPANOCITOSSES

O LABORATÓRIO DE HEMOGLOBINOPATIAS

O estudo das hemoglobinas e de suas alterações hereditárias constitui um campo de investigação extremamente importante e de múltiplas aplicações.

Assim, por exemplo, as hemoglobinas são exaustivamente estudadas por aqueles que se dedicam à Genética Molecular e à Bioquímica, pois constituem um material de pesquisa de grande valor na investigação dos mecanismos genéticos envolvidos na regulação normal e anormal da síntese de proteínas na espécie humana. Na opinião de COMINGS (1970), por exemplo, os conhecimentos atuais a respeito dos mecanismos genéticos moleculares básicos resultaram, fundamentalmente, do estudo das hemoglobinas humanas, ao lado, evidentemente, daqueles estudos feitos em bactérias e vírus.

Dentro desse campo, são particularmente úteis as hemoglobinopatias por deficiência de síntese ou *talassemias*, que são doenças genéticas resultantes da depressão parcial ou total da síntese de determinados tipos de cadeias hemoglobínicas, em decorrência da produção defeituosa do ARN mensageiro. Por esse motivo, a incubação de reticulócitos de talassêmicos com isótopos radioativos é bastante usada para o estudo da síntese de proteínas humanas *in vitro*.

O próprio processo normal de maturação das hemoglobinas, com a substituição das hemoglobinas embrionárias pelas fetais e delas pelas adultas já fornece um modelo bastante adequado para o estudo dos mecanismos de diferenciação na espécie humana. Isso porque tal processo implica na supressão da síntese de determinados tipos de cadeias hemoglobínicas e na ativação de outras.

Pelo fato de algumas hemoglobinopatias hereditárias constituírem polimorfismos genéticos humanos, o seu estudo também é de grande valia em Genética de Populações.

As aplicações das hemoglobinas na investigação dos mecanismos homeostáticos que mantêm os polimorfismos são bastante conhecidas, sendo clássicas aquelas que permitiram constatar as inter-relações existentes entre a malária, a talassemia e a hemoglobina S. Assim, é bastante plausível a hipótese de que os heterozigotos dos genes da talassemia e da hemoglobina S (portadores dos traços talassêmico e siclêmico, respectivamente) tenham sofrido um processo de seleção favorável nas regiões de malária endêmica, pelo fato de serem mais resistentes à infestação pelo *Plasmodium falciparum* do que os homozigotos normais.

Essa hipótese explicaria, pelo menos em parte, as altas frequências desses traços hemoglobínicos encontradas em algumas populações humanas, como é o caso do traço talassêmico beta, encontrado em cerca de 25% dos indivíduos de algumas populações italianas do Vale do Pô (SILVESTRONI e BIANCO, 1959), e do traço ciclêmico, cuja prevalência chega a atingir valores em torno de 40% em algumas populações africanas, gregas e indus (SERJEANT, 1974).

Ainda dentro do campo dos polimorfismos genéticos humanos, também desperta o interesse o estudo das inter-relações existentes entre algumas hemoglobinopatias e outras doenças infecciosas e parasitárias diferentes da malária, como é o caso, por exemplo, da hemoglobina S e a tuberculose pulmonar (RAMALHO e BEIGUELMAN, 1977; PINTO JUNIOR, 1978).

As alterações hemoglobínicas atingem, no entanto, crucial importância no terreno da Genética Clínica, uma vez que muitas delas constituem doenças de extrema gravidade. No caso específico das populações brasileiras, a hemoglobina S e a talassemia beta são as duas hemoglobinopatias hereditárias que devem merecer as melhores atenções do ponto de vista médico.

Enquanto que a hemoglobinopatia S constitui um problema nacional, já que afeta primordialmente a fração negra das populações brasileiras, a talassemia beta representa um problema de importância apenas regional, sendo frequente no Estado de São Paulo e, provavelmente, em outras regiões que também receberam grande afluxo de imigrantes italianos, como é o caso do Rio Grande do Sul, do Paraná e de Santa Cata

rina.

Essas duas hemoglobinopatias causam, na sua forma homozigótica, anemia hemolítica extremamente grave, muitas vezes fatal ainda na infância. Já os heterozigotos, embora frequentemente assintomáticos, também podem manifestar alterações clínicas dignas de nota ou complicações graves, até mesmo fatais. O reconhecimento desses indivíduos é de fundamental importância para a sua orientação em termos de cuidados individuais e, sobretudo, de aconselhamento genético.

A interação entre os genes da hemoglobinopatia S e da talassemia beta também se manifesta por quadro clínico exuberante, definindo a chamada *doença microdrepanocítica de Silvestroni e Bianco* ou, simplesmente, *microdrepanocitose*. A miscigenação de negróides e de caucasóides de origem italiana, que é observada em escala apreciável no Estado de São Paulo, favorece o aparecimento dessa doença, considerada uma raridade na maioria das populações humanas.

HEMOGLOBINAS NORMAIS

As hemoglobinas humanas são proteínas conjugadas que apresentam como grupos prostéticos ²quatro moléculas de heme.

A fração proteica das hemoglobinas, ou seja, a globina, é constituída por quatro cadeias polipeptídicas, cada uma das quais ligada a um grupo heme. Essa ligação deve ocorrer logo após a síntese da cadeia, estando ela ainda a nível ribossômico (WINSLOW e INGRAM, 1966).

Na maioria das hemoglobinas normais, a fração globínica é representada por duas cadeias alfa e duas cadeias não-alfa, que designaremos por X, apresentando a fórmula geral $\alpha_2 X_2$. O tipo de cadeia X varia de uma hemoglobina para outra, possuindo cada hemoglobina normal, seja embrionária, fetal ou adulta, o seu tipo de cadeia característico. Assim, na hemoglobina embrionária Gower 2 a cadeia X está representada pela cadeia épsilon (ϵ), nas hemoglobinas fetais pela cadeia gama (γ), na hemoglobina adulta A₁ ou A pela cadeia

beta (β) e na hemoglobina adulta A_2 pela cadeia delta (δ) .

Apenas três hemoglobinas embrionárias fogem a essa regra geral. São elas a hemoglobina Gower 1 e as hemoglobinas Portland 1 e 2. Enquanto que na hemoglobina Gower 1 a fração globínica é constituída por quatro cadeias épsilon, na hemoglobina Portland 1 essa fração é constituída por duas cadeias gama e duas cadeias zeta (ζ) e na hemoglobina Portland 2 por quatro cadeias zeta (WINSLOW e ANDERSON, 1978).

Para fins didáticos, é usual representar as hemoglobinas normais pela composição da sua globina, ou seja:

Hemoglobina Gower 1	: ϵ_4
Hemoglobina Gower 2	: $\alpha_2\epsilon_2$
Hemoglobina Portland 1:	$\gamma_2\zeta_2$
Hemoglobina Portland 2:	ζ_4
Hemoglobinas fetais	: $\alpha_2\gamma_2$
Hemoglobina A_1	: $\alpha_2\beta_2$
Hemoglobina A_2	: $\alpha_2\delta_2$

Do exposto fica claro, portanto, que seis tipos de cadeias peptídicas entram na constituição das hemoglobinas normais, ou seja, cadeias $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ e ζ , cada uma das quais com suas composições primária, secundária e terciária características. Sendo a molécula de hemoglobina tetramérica deve-se considerar, ainda, a sua estrutura quaternária, ou seja, a relação espacial entre as cadeias polipeptídicas.

As cadeias hemoglobínicas isoladas são menos estáveis do que os tetrâmeros. Isso indica, evidentemente, que as regiões de contato entre as cadeias peptídicas são importantes na manutenção da solubilidade normal da hemoglobina. Por essa razão, algumas alterações nas regiões de contato entre as cadeias peptídicas podem levar ao aparecimento de hemoglobinas anormais instáveis.

A molécula de hemoglobina é globular, com uma cavidade central. Essa cavidade é preenchida com água e permite a entrada de moléculas carregadas, como as de sais. Os quatro grupos heme, contendo ferro na forma ferrosa, estão escondidos no meio das cadeias globínicas, protegidos contra a oxidação.

A composição das cadeias α , β , γ e δ é perfeitamente conhecida. Assim, sabe-se que as cadeias α são constituídas por 141 aminoácidos, enquanto que as cadeias β , γ e δ são compostas por 146 aminoácidos, sendo a sequência deles, em todos os casos, conhecida. Ainda existem dúvidas, no entanto, quanto à composição das cadeias ϵ e ζ .

O *locus* genético correspondente à cadeia alfa permanece em atividade durante toda a vida do indivíduo e o seu ritmo normal de síntese é bastante elevado, uma vez que ela entra na composição de quase todas as hemoglobinas. As perturbações graves desse ritmo de síntese, observadas em algumas formas de talassemia alfa, podem ser incompatíveis com a sobrevivência.

A cadeia alfa parece exigir a ligação com outro tipo de cadeia polipeptídica para poder se desligar dos ribossomos (COLOMBO e BAGLIONI, 1964). Assim sendo, são formadas unidades $\alpha\epsilon$, $\alpha\gamma$, $\alpha\beta$ e $\alpha\delta$ que formam, posteriormente, as moléculas das hemoglobinas Gower₂ ($\alpha_2\epsilon_2$), fetais ($\alpha_2\gamma_2$) e adultas ($\alpha_2\beta_2$ e $\alpha_2\delta_2$).

Existem evidências de haver, em algumas pessoas, dois *loci* genéticos para as cadeias alfa. Estudos feitos em húngaros com as hemoglobinas G (Pest) e J (Buda) comprovaram a existência de pelo menos dois *loci* para a cadeia alfa nas pessoas examinadas. Já a hemoglobina J (Tongarikí) indica que na maior parte dos melanésios deve existir apenas um *locus* para essa cadeia (McKUSICK, 1975). A duplicidade do *locus* alfa também deve ser freqüente em chineses (KAN, 1974), enquanto que, entre negróides norte-americanos, a freqüência de *loci* simples e duplos deve ser aproximadamente igual (HUISMAN, 1974).

Cumpra assinalar, por outro lado, a existência de provas evidentes de estreita união entre os *loci* das cadeias β e δ (SMITH e TORBERT, 1958; CEPPELLINI, 1959; HORTON *et al.*, 1961; BOYER *et al.*, 1963; HORTON e HUISMAN, 1963; RANNEY *et al.*, 1963), bem como de existir mais de um *locus* genético comandando a síntese de cadeias gama (SCHROEDER, *et al.*, 1968).

Na figura 1 é apresentado, de forma esquemática, o processo geral de síntese das hemoglobinas normais.

Hemoglobinas embrionárias

As hemoglobinas embrionárias são representadas pelas variantes Gower 1 , Gower 2 , Portland 1 e Portland 2 .

Durante o início da vida embrionária deve haver uma deficiência relativa de síntese de cadeias alfa, uma vez que existem três hemoglobinas embrionárias desprovidas dessa cadeia, ou seja, as hemoglobinas Gower 1 (ϵ_4), Portland 1 ($\gamma_2\zeta_2$) e Portland 2 (ζ_4).

A síntese de cadeias ϵ e ζ é praticamente suprimida após os três primeiros meses de gestação, embora essas cadeias possam continuar a ser sintetizadas em pequenas quantidades em alguns recém-nascidos normais e em grandes quantidades em crianças com determinadas aberrações cromossômicas.

HUEHNS *et al.*, (1964) relataram a persistência de hemoglobinas embrionárias em recém-nascidos com trissomia D, enquanto que HECHT *et al.*, (1967), por seu lado, encontraram níveis aumentados de hemoglobina Portland 1 em crianças com esse tipo de trissomia, bem como em pacientes com outros tipos de aberrações cromossômicas.

A talassemia alfa, por determinar uma deficiência total ou relativa de cadeias alfa, e, conseqüentemente, das hemoglobinas Gower 2, fetais e adultas, pode provocar um aumento compensatório da síntese das hemoglobinas Gower 1, Portland 1 e Portland 2. Esse aumento geralmente é mais acentuado no que diz respeito à hemoglobina Portland 1, que pode ser observada em quantidades apreciáveis no sangue do recém-nascido talessêmico alfa (WEATHERALL *et al.*, 1970). Como veremos oportunamente no capítulo das talassemias, essas alterações hemoglobínicas são bastante nítidas em uma forma grave de talassemia alfa, que determina a *hidropsia fetal por hemoglobina de Bart*, incompatível com a sobrevivência. Além do aumento da síntese da hemoglobina Portland 1, a falta de cadeias alfa observada nessa talassemia determina a formação de uma hemoglobina anômala, a hemoglobina de Bart, cuja fração globínica é constituída por um tetrâmero de cadeias gama (γ_4).

As hemoglobinas Gower apresentam migração eletro-

forética bastante lenta, permanecendo próximas ao ponto de aplicação do hemolisado. Já a hemoglobina Portland 1 apresenta migração eletroforética mais rápida, semelhante à da hemoglobina A₁, havendo a possibilidade de confusão entre essas duas hemoglobinas (COMINGS, 1970). Para o clínico, no entanto, as hemoglobinas Gower e Portland apresentam pequeno valor prático, uma vez que ele raramente terá a oportunidade de observá-las na eletroforese de hemoglobinas de seus pacientes.

Terminando o estudo das hemoglobinas do período embrionário, cumpre ressaltar que as cadeias peptídicas gama começaram a ser sintetizadas antes do segundo mês de gestação (WINSLOW e ANDERSON, 1978). Assim sendo, as hemoglobinas fetais, apesar do seu nome, já podem ser observadas ainda na fase embrionária. Após o terceiro mês de gestação, no entanto, elas praticamente substituirão as hemoglobinas embrionárias.

Hemoglobinas fetais

Como já foi mencionado anteriormente, as hemoglobinas fetais apresentam em sua fração globínica duas cadeias alfa e duas cadeias gama. Visto que existem dois tipos de cadeias gama, que diferem entre si pelo aminoácido da posição 136 (glicina ou alanina), existem, conseqüentemente, dois tipos de hemoglobinas fetais, a hemoglobina fetal 136 glicina e a hemoglobina fetal 136 alanina. Essas duas variantes não são separáveis, contudo, nem por eletroforese nem por cromatografia, razão pela qual são designadas freqüentemente sob o nome único de *hemoglobina fetal* ou Hb F.

As cadeias gama que contêm glicina na posição 136 são chamadas cadeias Gy e aquelas que contêm alanina nessa posição são chamadas cadeias Ay (SCHROEDER *et al.*, 1968). Ao nascimento, a proporção de moléculas de hemoglobina fetal contendo cadeias Gy em relação às que contêm cadeias Ay é de cerca de 3:1. Essa proporção atinge valores em torno de 2:3 nas pequenas quantidades de hemoglobina fetal existentes

em alguns adultos normais.

Vale a pena comentar, no entanto, que a cromatografia de coluna da hemoglobina fetal revela a presença de uma fração hemoglobínica menor (fração F_1), que constitui cerca de 10% da hemoglobina total (ALLEN *et al.*, 1958). Essa fração apresenta o grupo NH_2 terminal de uma das cadeias gama substituído por um grupo acetila (SCHROEDER *et al.*, 1962).

A hemoglobina fetal representa o principal componente hemoglobínico da vida intra-uterina. Por ocasião do nascimento ela ainda constitui cerca de 80% da hemoglobina total, mas nos meses seguintes esse percentual diminui rapidamente, havendo substituição progressiva da hemoglobina fetal pelas hemoglobinas adultas. Com cerca de seis meses de idade o indivíduo já apresenta o padrão hemoglobínico adulto, ou seja, menos do que 1% de hemoglobina fetal, 1% a 3% de hemoglobina A_2 e o restante de hemoglobina A_1 (COMINGS, 1970; WINSLOW e ANDERSON, 1978).

Na figura 2 é apresentado o resultado do exame eletroforético de um recém-nascido normal. Como é possível notar, a hemoglobina A_2 não está representada nessa figura, uma vez que os seus percentuais ainda são muito pequenos no sangue do recém-nascido.

Fig. 2

A hemoglobina fetal caracteriza-se por ser mais resistente ao tratamento pelo hidróxido de sódio do que as outras hemoglobinas normais. Essa propriedade é extremamente importante e pode ser aproveitada para a dosagem da hemoglobina fetal no sangue (SINGER *et al.*, 1951; BETKE *et al.*, 1959) ou para o reconhecimento de hemácias fetais em esfregaços sanguíneos (KLEIHAUER *et al.*, 1957). Esse último exame tem largo emprego em clínica, podendo ser usado, por exemplo, para diagnóstico de transfusões sanguíneas feto-maternas, para a diferenciação laboratorial entre talassemia e persistência hereditária da hemoglobina fetal, para reconhecimento de sangue da criança em punções de líquido amniótico, etc.

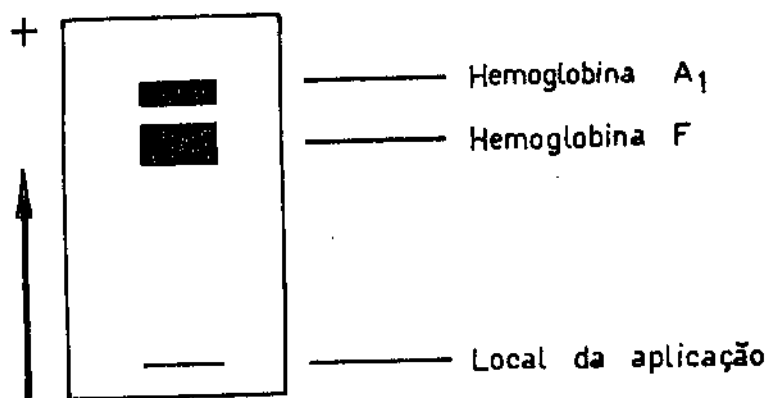


FIG. 2 - Exame eletroforético de um recém-nascido normal (tampão tris-glicina pH 9.1).

A hemoglobina fetal forma com outros componentes da hemácia do feto um complexo adaptado às condições de anóxia relativa da vida intra-uterina. A sua curva de dissociação não difere muito, no entanto, daquela apresentada pela hemoglobina A₁ e, caso ela persista na idade adulta, cumprirá bem a sua função de transportar o oxigênio (SMITH, 1959). Assim, por exemplo, a persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF) é uma condição genética que se caracteriza pela presença de níveis elevados de Hb F na vida adulta, na ausência de anemia. Da mesma forma, a anemia observada na talassemia *major* não é devida à presença de níveis elevados de Hb F na vida adulta, mas sim à formação de precipitados de cadeias alfa, que predispõem à hemólise. Tanto a PHHF quanto a talassemia serão discutidas adiante com maiores detalhes.

Aumentos percentuais moderados de hemoglobina fetal são encontrados também durante a gravidez e em alguns casos de leucemia, de anemia aplástica e de outras anemias hemolíticas diferentes das talaassemias (JOSEPHSON *et al.*, 1958). Esses aumentos adquiridos dos níveis de Hb F devem representar uma reativação compensatória do *locus* gama, normalmente em repouso na vida adulta.

As aberrações cromossômicas podem retardar ou acelerar o processo de substituição da hemoglobina fetal pelas adultas. Assim a persistência de níveis elevados de Hb F por tempo superior ao normal já foi descrita em crianças com as síndromes de Down e de Patau (HUEHNS *et al.*, 1964; WEINSTEIN *et al.*, 1965). Por outro lado, em um caso de translocação C/D descrito por WELLER e colaboradores (1966), a criança apresentava, aos 24 dias de vida, apenas 9% de hemoglobina fetal.

HEMOGLOBINA DO ADULTO

O exame eletroforético de pessoas normais e hemoglobínicamente adultas acusa a presença de três frações distintas, correspondentes às hemoglobinas A₁, A₂ e A₃, além de uma fração não hemoglobínica, constituída, sobretudo,

pela anidrase carbônica tipo I (Fig.3).

Fig. 3

A hemoglobina A_1 , também conhecida pelo nome de *componente hemoglobínico adulto normal maior*, apresenta migração eletroforética rápida e perfaz, normalmente, 97% a 99% da hemoglobina total. Como já foi visto anteriormente, a sua fração globínica é constituída por duas cadeias alfa e duas cadeias beta.

A hemoglobina A_2 , ou *componente hemoglobínico adulto normal menor*, apresenta migração eletroforética lenta e o seu nível normal oscila entre 1% e 3% da hemoglobina total. Sua fração globínica está representada por duas cadeias alfa e duas cadeias delta.

Níveis elevados de hemoglobina A_2 são encontrados principalmente no traço talassêmico beta, podendo, também, estar associados à anemia perniciosa (JOSEPHSON *et al.* 1958), à hemoglobina Zurich (RIEDER *et al.*, 1965) e à hemoglobina Tacoma (BAUR e MOTULSKY, 1965). ARENDS (1967) encontrou níveis aumentados da hemoglobina A_2 em pacientes portadores de malária aguda e crônica, infestados pelo *Plasmodium vivax*. WEATHERALL e colaboradores (1971), por outro lado, não constatarem percentuais aumentados dessa hemoglobina em pacientes infestados pelo *Plasmodium falciparum*. Níveis diminuídos de hemoglobina A_2 são observados, sobretudo, nos casos de anemia ferropriva (WASI *et al.*, 1968), STEINER *et al.*, 1971) e de talassemia delta (FESSAS e STAMATOYANNOPOULOS, 1962; CHOREMIS *et al.*, 1964).

A hemoglobina A_3 , que apresenta migração eletroforética um pouco mais rápida do que a da hemoglobina A_1 , não constitui propriamente um tipo diferente de hemoglobina. Ela nada mais é do que o produto do envelhecimento da hemoglobina A_1 , resultando da combinação dessa hemoglobina com o glutatíon (MULLER, 1961).

Nunca seria demais insistir no fato de que quando falamos em hemoglobinas do adulto, estamos nos referindo às hemoglobinas do indivíduo adulto do ponto de vista hemoglobínico, ou seja, com mais de seis meses de idade. Por

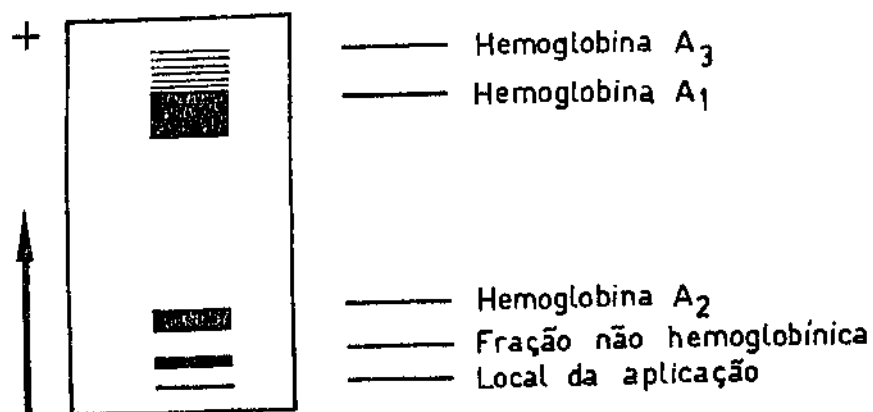


FIG. 3 - Exame eletroforético de um adulto normal (tampão tris-glicol na pH 8.1).

outro lado, as hemoglobinas A_1 e A_2 já existem antes que o padrão hemoglobínico adulto seja atingido. Assim, a hemoglobina A_1 começa a ser sintetizada já no segundo trimestre da vida intra-uterina, uma vez que as cadeias beta começam a ser produzidas no início do quarto mês de gestação. Já a hemoglobina A_2 começa a aparecer bem mais tarde durante a vida intra-uterina, em torno do nono mês de gestação (LODISH, 1976; HECHT *et al.*, 1967 e KAZAZIAN, 1974, *apud* WINSLOW e ANDERSON, 1978).

CLASSIFICAÇÃO DAS HEMOGLOBINOPATIAS HEREDITÁRIAS

ITANO, em 1957, publicou um importante trabalho a respeito das hemoglobinas humanas, no qual sumariou os conhecimentos da época com relação ao assunto e, pela primeira vez, agrupou as hemoglobinopatias hereditárias em duas grandes classes gerais. Em uma das classes incluiu as hemoglobinopatias / decorrentes da inibição da síntese da molécula de hemoglobina, sem alteração de sua estrutura. Na outra, reuniu as hemoglobinopatias conseqüentes da síntese de moléculas de hemoglobinas diferentes das normais no concernente às suas propriedades físicas. Essas propriedades diferentes, reveladas sobretudo pelo comportamento eletroforético anômalo, estariam relacionadas a alterações estruturais da fração globínica da hemoglobina.

Desse modo, as *hemoglobinopatias estruturais* caracterizavam-se por alterações detectáveis na estrutura da hemoglobina, como as observadas, por exemplo, na hemoglobina S. Já nas *hemoglobinopatias por deficiência de síntese*, cujo exemplo típico seria a talassemia, ocorreria uma diminuição da síntese da fração globínica da hemoglobina, na ausência de alteração estrutural evidenciável.

Apesar de os conhecimentos a respeito da natureza das diferentes hemoglobinopatias hereditárias terem evoluído / de maneira notável nos anos que se seguiram, a divisão original de Itano continuou sendo respeitada, com as devidas adaptações.

Assim, por exemplo, na época em que esse autor publicou o trabalho citado, considerava-se a existência de um único *locus* genético para controle da síntese da globina. Atualmente

mente, todo raciocínio a respeito das hemoglobinopatias fundamenta-se, basicamente nas cadeias peptídicas que entram na constituição da fração globínica.

Nenhuma classificação das hemoglobinopatias hereditárias pode ser considerada perfeita ou definitiva. A cada dia que passa, novas hemoglobinas anômalas são descritas, ampliando algumas classes de hemoglobinopatias ou, até mesmo criando novas classes. Assim sendo, a classificação que será apresentada a seguir tem por único objetivo fornecer uma visão geral das diferentes alterações hemoglobínicas hereditárias descritas até o momento.

Hemoglobinopatias estruturais

Como o próprio nome está dizendo, as hemoglobinopatias estruturais caracterizam-se por apresentar uma fração globínica estruturalmente alterada. Esse defeito de estrutura pode estar localizado em um ou mais tipos de cadeias peptídicas que entram na composição da globina ou, senão, dizer respeito à maneira com que as cadeias se agrupam para formar essa fração.

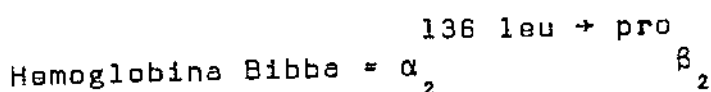
A hemoglobina S, por exemplo, apresenta um defeito estrutural nas cadeias beta da sua globina. Já a hemoglobina de Bart, por seu lado, tem a sua fração globínica representada por um tetrâmero de cadeias gama normais. Em outras palavras, enquanto que o defeito estrutural da hemoglobina S está localizado em um tipo de cadeia polipeptídica, na hemoglobina de Bart esse defeito diz respeito ao tipo de agrupamento das cadeias.

As hemoglobinopatias estruturais comportam, por hora, a seguinte sub-classificação etiológica:

Substituição de um aminoácido na cadeia alfa.

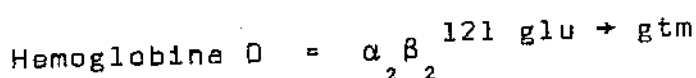
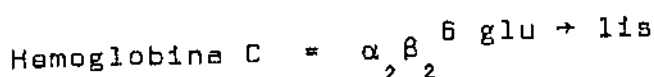
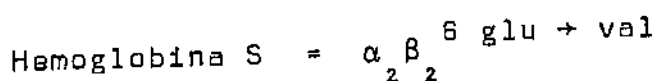
Dentro dessa classe de hemoglobinopatias hereditárias já foram descritas mais de 100 hemoglobinas anômalas diferentes. Assim, por exemplo, na hemoglobina Bibba, a leuci-

na da posição 136 está substituída pela prolina, ou seja :



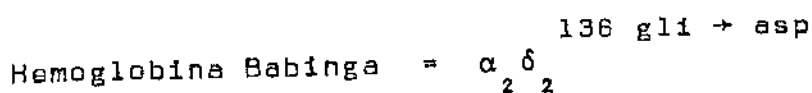
Substituição de um aminoácido na cadeia beta.

Essa é a mais extensa de todas as classes de hemoglobinasopatias, com mais de 166 hemoglobinas anômalas descritas. Os exemplos mais importantes são fornecidos pelas hemoglobinas S, C e D:



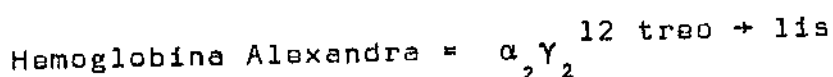
Substituição de um aminoácido na cadeia delta.

Essa classe de hemoglobinasopatias está representada por cerca de 7 hemoglobinas anômalas, dentre as quais, a hemoglobina Babinga:



Substituição de um aminoácido na cadeia gama.

Dentre cerca de uma dezena de hemoglobinas anômalas dessa classe, pode ser citada, como exemplo, a hemoglobina Alexandra:



Substituição de dois aminoácidos na cadeia beta.

Essa classe conta, por hora, com apenas duas representantes, ou seja, as hemoglobinas C (Harlem) e C (Georgetown).

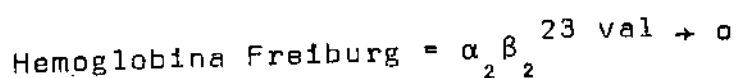
Substituição de um aminoácido na cadeia alfa e de um aminoá-

cido na cadeia beta.

A hemoglobina X é a única, no momento, a se enquadrar dentro dessa classe de hemoglobinopatias.

Deleção de um ou mais aminoácidos em uma das cadeias peptídicas.

Além de outras 9 hemoglobinas anômalas desse grupo, pode ser citada, como exemplo, a hemoglobina Freiburg.

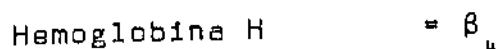
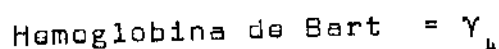


Adição de um ou mais aminoácidos em uma das cadeias peptídicas.

As hemoglobinas Wayne, Constant Spring e Grady constituem os exemplos mais representativos dessa classe de hemoglobinopatias estruturais.

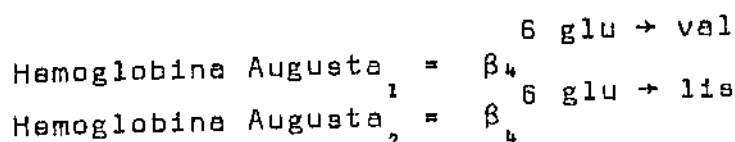
Tetramerização de cadeias normais.

A tetramerização de cadeias normais observada nas hemoglobinas de Bart e H resulta da falta de cadeias alfa em quantidades suficientes para a formação das hemoglobinas fetais e adultas. Assim, sendo, essas hemoglobinas anômalas são encontradas sempre em associação com as formas graves de talassemia alfa.



Tetramerização de cadeias anômalas.

Essas formas raras de hemoglobinas anômalas resultam da interação entre a talassemia alfa e hemoglobinopatias estruturais por substituição de um aminoácido na cadeia beta. Os exemplos mais importantes são os das hemoglobinas Augusta:

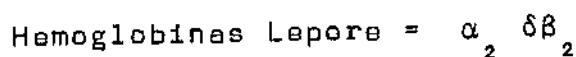


Polimerização da hemoglobina.

O exemplo característico dessa classe é fornecido pela hemoglobina Porto Alegre que, além de formar um provável octômero, também apresenta substituição de um aminoácido na cadeia beta.

Polipeptídeos de fusão delta-beta.

Esses polipeptídeos de fusão delta-beta, que serão discutidos com maiores detalhes junto com as talassemias, entram na composição das hemoglobinas Lepore, cuja fórmula geral pode ser representada da seguinte maneira:



Polipeptídeos de fusão beta-delta.

As hemoglobinas Anti-Lepore, de fórmula geral são representadas, no momento, pelas variantes Miyada e P (Congo)

Hemoglobinopatias por deficiência de síntese

As hemoglobinopatias por deficiência de síntese, ou síndromes talassêmicas, são condições genéticas nas quais ocorre depressão parcial ou total da síntese de um ou mais tipos de cadeias peptídicas da hemoglobina, na ausência de defeito estrutural demonstrável nas mesmas.

A classificação das síndromes talassêmicas ainda é um assunto difícil e controvertido. De fato, além de elas incluírem diferentes entidades genéticas, ainda se deve considerar o amplo espectro de variação da manifestação homo- e heterozigótica de diferentes sistemas alélicos, a associação desses sistemas com os produtores de outras hemoglobinopatias, bem como a ocorrência de estados similares à talassemia, como, por exemplo, a persistência hereditária da hemoglobina

fetal. Ao analisar essas dificuldades, COMINGS (1970) comentou com uma ponta de ironia que "infelizmente, quando a Natureza produziu a talassemia, ela não tinha em mente o irrepremissível desejo do homem de fazer classificações".

A sistematização apresentada em seguida parece cumprir, no entanto, a finalidade didática de fornecer àqueles poucos familiarizados com as talassemias uma visão panorâmica dessa vasta classe de hemoglobinopatias.

Depressão da síntese de cadeias alfa.

Dentro dessa classe estão incluídas as diferentes manifestações das talassemias alfa, incluindo a doença da hemoglobina H e a síndrome da hidropsia fetal por hemoglobina / de Bart.

Depressão de cadeias beta.

As talassemias beta podem ser causadas por diferentes alelos, que condicionam a depressão parcial (alelos βt^+) ou total (alelos βto) da síntese de cadeias beta da hemoglobina.

Depressão da síntese de cadeias delta.

Existem descrições de vários casos de talassemia delta, sobretudo na Grécia (FESSAS e STAMATOYANNOPOULOS, 1962; CHOREMIS *et al.*, 1964), estando, nesses casos, afetada apenas a produção do componente hemoglobínico normal menor, ou seja, da hemoglobina A₂.

Depressão da síntese de cadeias gama.

A existência da talassemia gama foi sugerida por HAMILTON e colaboradores (1961), tendo sido demonstrada, posteriormente, através de estudos radiocromatográficos do sangue de recém-nascidos (KAN *et al.*, 1972).

As talassemias gama são condições genéticas *sui generis*, pois as suas formas mais graves devem causar morte /

intra-uterina precoce, deixando de ser diagnosticadas, enquanto que as suas formas moderadas e leves são passíveis de detecção apenas no período neonatal, desaparecendo posteriormente com a substituição normal da síntese de cadeias gama por cadeias beta.

Depressão da síntese de cadeias beta e delta.

A talassemia delta-beta é mais conhecida pelo nome de talassemia F, sendo considerada por muitos autores como um sub-tipo de talassemia beta.

Interação de duas formas diferentes de talassemia no mesmo indivíduo.

Já foram descritos casos de talassemia alfa-beta (FESSAS, 1961; BERNINI *et al.*, 1962; WEATHERALL, 1963; WASI *et al.*, 1969; KAN e NATHAN, 1970), gama-beta, (KAN *et al.*, 1972) e beta-delta-beta (ZUELZER *et al.*, 1961; FESSAS, 1961; WOLF e IGNATOV, 1963).

Essas talassemias resultam da interação de alelos talassêmicos de classes diferentes, representando, pois, estados heterozigóticos. Tais interações causam desequilíbrios peculiares da síntese de cadeias hemoglobínicas, condicionando manifestações clínicas próprias.

Muitos autores, adotando uma nomenclatura pouco usual, referem-se a essas talassemias como "estados duplamente heterozigóticos" (HARRIS, 1973).

Interação entre talassemias e hemoglobinopatias estruturais.

Dentro dessa classe, o exemplo mais importante é fornecido, sem dúvida, pela interação entre a talassemia beta e a hemoglobinopatia S, condicionando a doença microdrepanocítica de Silvestroni e Bianco ou microdrepanocitose (SILVESTRONI e BIANCO, 1944). Já foram descritos, no entanto, vários casos de talassemia beta de hemoglobina C (SINGER *et al.*, 1954), talassemia beta de hemoglobina E (MINNICH *et al.*, 1954), talassemia alfa de hemoglobina C (ZUELZER e KAPLAN, 1954).

talassemia alfa de hemoglobina E (WASI *et al.*, 1969), talassemia alfa de hemoglobina Q (VELLA *et al.* 1958) e talassemia alfa de hemoglobina I (ATWATER *et al.*, 1960).

Estados similares à talassemia

As síndromes da hemoglobina Lepore e a persistência hereditária da hemoglobina fetal, apesar de condicionarem a depressão da síntese de cadeias beta e delta, não se enquadraram bem na definição clássica de talassemia e, por isso, constituem um grupo à parte. Pode-se dizer, no entanto, que essas entidades genéticas são parentes próximas da talassemia F.

SIGNIFICADO CLÍNICO DAS HEMOGLOBINOPATIAS ESTRUTURAIS

Algumas hemoglobinas anômalas não determinam alterações clínicas e, conseqüentemente, não são causadoras de *hemoglobinopatias*, na verdadeira acepção da palavra. Não obstante esse fato, já está consagrado pelo uso o hábito de usar o termo *hemoglobinopatia* como sinônimo de *alteração hemoglobínica*. No presente estudo, que se destina primordialmente aos interesses em ciências médicas e biológicas, será dada maior ênfase às alterações hemoglobínicas que apresentam algum significado clínico, sobretudo àquelas mais frequentes em nossas populações.

As alterações clínicas observadas nas hemoglobinopatias estão diretamente relacionadas com as propriedades dos mutantes hemoglobínicos. Muitas vezes, a mutação afeta simultaneamente várias propriedades da molécula de hemoglobina, o que dificulta sobremaneira a classificação clínica das hemoglobinopatias. Uma forma de contornar esse problema seria classificar as hemoglobinopatias de acordo com a sua *principal manifestação clínica*, ou seja, hemólise, cianose, policitemia ou "falcização".

Hemólise: as hemoglobinas instáveis

Embora um grande número de hemoglobinas instáveis tenham sido descritas, elas ainda são consideradas como sendo raras e a maioria dos casos relatados parecem ser esporádicos, representando mutações *de novo*.

A hemoglobina Köln ($\alpha_2\beta_2$ 98 val+met) é a mais frequente de todas as hemoglobinas instáveis, conhecendo-se pelo menos 43 casos em 11 famílias diferentes (WINTROBE, 1974).

A patogenicidade das hemoglobinas instáveis está diretamente relacionada com a formação dos corpos de Heinz. A hipótese mais aceita no momento para explicar a formação dos

corpos de Heinz é aquela segundo a qual as hemoglobinas instáveis são oxidadas para metemoglobina, que é transformada em compostos conhecidos por hemicromos que se precipitam para formar os corpos de Heinz. Esses corpos se ligam à membrana das hemácias por meio de pontes hidrofóbicas, causando aumento da permeabilidade e lise. (WINTERBOURN e CARREL, 1973).

Poderíamos resumir a fisiopatogenia das hemoglobinas instáveis na seguinte sequência: precipitação da hemoglobina instável, formação de corpos de Heinz, que são removidos pelo baço, e hemólise. Assim sendo, as alterações clínicas mais importantes são aquelas relacionadas com a anemia hemolítica, ou seja, fraqueza, palidez, icterícia e esplenomegalia.

Das 64 hemoglobinas instáveis descritas até o momento, 9 causam hemólise grave, que não melhora com a esplenectomia, como é o caso da hemoglobina Bibba ($\alpha_2^{136 \text{ leu} \rightarrow \text{pro}} \beta_2$), 13 causam hemólise grave, que melhora com a esplenectomia, como é o caso da hemoglobina Köln ($\alpha_2 \beta_2^{98 \text{ val} \rightarrow \text{met}}$), 22 causam hemólise moderada, com exacerbações intermitentes, como é o caso da hemoglobina Zurich ($\alpha_2 \beta^{63 \text{ his} \rightarrow \text{arg}}$), e 13 não causam anemia hemolítica, como é o caso da hemoglobina Tacoma ($\alpha_2 \beta_2^{30 \text{ arg} \rightarrow \text{ser}}$). No que diz respeito às 7 hemoglobinas restantes, ainda não se dispõe no momento de dados suficientes para classificação clínica.

Os seguintes exames são extremamente úteis no reconhecimento de uma hemoglobina instável:

Deteção de hemoglobina instável

Reagentes:

1 - Tampão Tris-HCl 0.1 M, pH 7,4 com Isopropanol 17%

1.1 - Tris..... 12,114 g
Água destilada 100 ml

1.2 - Tris-HCl 0.1 M, pH 7,4

Solução 1.1 10,0 ml
HCl 1 N 8,4 ml
Água destilada q.s.p. 100,0 ml

1.3 - Tris-HCl 0.1 M , pH 7,4 com Isopropanol 17%

Isopropanol	17,0 ml
Solução 1.2 q.s.p.	100,0 ml

Método:

Colocar 2 ml do tampão tris-HCl 0.1 M, pH 7,4 com isopropanol 17% em um tubo de ensaio e equilibrar a 37 graus , no banho-maria, durante 15 minutos. Adicionar 0,2 ml do hemolizado fresco a 10% . Misturar por inversão e retornar ao banho-maria.

Resultado:

O hemolizado normal permanece claro durante 40 minutos. Já o hemolizado com hemoglobina instável dá um precipitado floculento dentro de 5 minutos.

Coloração de corpos de inclusão

Reagentes:

1 - Solução de azul cresil brilhante a 1%

Azul cresil brilhante	1 g
Solução de NaCl 0,85%	100,0 ml

Método:

Misturar, em um tubo de ensaio, 1 a 2 gotas de sangue total com 1 gota da solução de azul cresil brilhante. Deixar em banho-maria a 37 graus durante 20 minutos. Fazer o esfregaço e examinar ao microscópio, sob objetiva de imersão.

Comentário:

Os corpos de inclusão formam granulações redondas e grandes, facilmente distinguidas dos reticulócitos. Eles indicam a presença de hemoglobina H ou de outra hemoglobina instável dentro das hemácias.

Desnaturação pelo calor

Reagentes:

Solução tampão de fosfato 0,1 M , pH 7,4

Solução A

Fosfato de sódio dibásico 14,2 g
 Água destilada 1000 ml

Solução B

Fosfato de sódio monobásico 12,4 g
 Água destilada 1000 ml

Solução de trabalho :

Solução A 80,8 ml
 Solução B 19,2 ml

Método:

Colocar 1 ml de sangue (colhido com heparina) em um tubo de centrifugação. Lavar os glóbulos vermelhos 3 a 4 vezes com 5 ml de solução de cloreto de sódio a 0,85%. Hemolisar as hemácias com 5 ml de água destilada. Juntar ao hemolisado 5 ml de tampão fosfato. Agitar e centrifugar a 3000 rpm por 30 minutos. Retirar 2 ml do sobrenadante e transferi-los para um tubo de ensaio que deverá ser deixado em banho-maria a 50 graus durante, pelo menos, 1 hora.

Comentário:

A hemoglobina A₁ é estável nessas condições. Já uma hemoglobina instável, mesmo não separada por eletroforese, dá origem a um precipitado floculoso no tubo.

Cianose: as hemoglobinas M

Existem cinco hemoglobinas anômalas, denominadas hemoglobinas M (Boston, Iwate, Saskatoon, Hyde Park e Milwaukee)

cuja principal manifestação clínica é o aparecimento de cianose por metemoglobinemia. Algumas hemoglobinas instáveis também estão relacionadas com a formação de metemoglobina, mas continuam apresentando como principal consequência clínica a hemólise.

Todas as hemoglobinas M apresentam substituições aminoácidas próximas à região do heme, afetando a ligação entre esse grupo prostético e a globina. Como consequência desse fato, há a oxidação do ferro das cadeias anômalas, com formação de metemoglobina. Apenas uma hemoglobina diferente das M apresenta como principal consequência clínica a metemoglobinemia. Trata-se de hemoglobina Wood, que é um mau substrato para a redução enzimática. Nesse caso, evidentemente, a metemoglobinemia só aparece após a ingestão de drogas oxidantes.

Os heterozigotos dos genes das hemoglobinas M apresentam cianose, razão pela qual se costuma dizer que as hemoglobinopatias M apresentam transmissão hereditária autossômica dominante. Esse fato facilita o diagnóstico diferencial com a metemoglobinemia por deficiência de NADH - redutase de metemoglobina, transmitida de forma autossômica recessiva.

As hemoglobinas M que apresentam substituição aminoácida nas cadeias alfa (Boston e Iwate) determinam o aparecimento de cianose intensa já ao nascimento, mas os seus portadores não costumam ser anêmicos. Já as hemoglobinas M cuja substituição aminoácida está localizada nas cadeias beta (Saskatoon, Hyde Park e Milwaukee-1) costumam determinar o aparecimento de cianose somente após os seis meses de idade, mas os seus portadores geralmente apresentam manifestações de hemólise leve ou moderada, ou seja, anemia, esplenomegalia, reticulocitose e hiperbilirrubinemia.

A cianose causada pelas hemoglobinas M não apresenta maiores consequências clínicas. Da mesma forma, a hemólise observada nas variantes Saskatoon, Hyde Park e Milwaukee-1 também não costuma causar problemas sérios. Assim sendo, as hemoglobinopatias M são consideradas como sendo benignas do ponto de vista clínico, não necessitando, geralmente, de tratamento. Aliás, a administração de azul de metileno e de ácido ascórbico mostrou-se inefetiva para combater a cianose das hemoglobinopatias M.

Apesar de as hemoglobinas M não determinarem alterações clínicas importantes, o seu diagnóstico reveste-se de grande interesse, frente à gravidade das outras causas de cianose (cardiopaties congênitas, deficiência enzimática e abuso de drogas, sobretudo fenacetina).

O sangue dos portadores das hemoglobinas M apresenta cor de chocolate, mesmo após a sua mistura com o ar, e a sua pressão de oxigênio arterial (pO_2) mostra-se normal.

Seria interessante, por outro lado, chamar a atenção para o fato de a dosagem de metemoglobina pelo método clássico/ de EVELYN e MALLOY (1938) apresentar resultados distorcidos nos portadores das hemoglobinas M, acusando resultados normais ou baixos. Isso porque os espectros da metemoglobina e da cianometemoglobina se apresentam alterados nesses indivíduos. Por outro lado, se esse método for usado nos casos de metemoglobina - mia por deficiência enzimática, os resultados obtidos serão sempre altos.

Policitemia: as hemoglobinas com aumento da afinidade pelo oxigênio.

As hemoglobinas anômalas que apresentam um aumento da afinidade pelo oxigênio determinam, compensatoriamente, um aumento do número de hemácias por mm^3 de sangue, com o intuito de garantir o fornecimento adequado de oxigênio para os tecidos.

Os rins dos portadores dessas hemoglobinas respondem à isquemia produzindo mais eritropoietina, que estimula a medula óssea. Como resultado do aumento do número de hemácias, há um aumento da quantidade de oxigênio fornecida aos tecidos por volume de sangue e, conseqüentemente, redução do grau de hipóxia.

Até o momento, foram descritas 21 hemoglobinas anômalas que determinam policitemia. Dentre essas, 2 apresentam substituição aminoácida nas cadeias alfa e 19 apresentam substituição nas cadeias beta. Todas essas hemoglobinas são raras, inclusive a hemoglobina Chesapeake ($\alpha^{92 \text{ arg} \rightarrow \text{leu}} \beta_2$), que é bastante conhecida por ter sido a primeira a ser descrita dentro desse grupo.

O diagnóstico diferencial dessas hemoglobinopatias deve ser feito com as outras causas de policitemia, ou seja, tumores, doenças renais ou cardiovasculares e policitemia vera. A pesquisa de recorrência familiar de policitemia geralmente é útil no diagnóstico dessas alterações hemoglobínicas, com exceção da hemoglobina Bethesda ($\alpha_2\beta_2$ 145 tir→his), que costuma aparecer como mutação.

"Falcização" : a hemoglobina S

A hemoglobina S representa um verdadeiro marco histórico no campo das hemoglobinopatias hereditárias, tendo sido a primeira alteração hemoglobínica descoberta (HERRICK, 1910), a primeira hemoglobina a revelar comportamento eletroforético/anômalo (PAULING *et al*, 1949), a primeira a ter o seu tipo de alteração estrutural esclarecido (INGRAM, 1957) e a primeira a ser descrita em interação com a talassemia (SILVESTRONI e BIANCO, 1944).

Como já foi mencionado anteriormente, a hemoglobina S apresenta o ácido glutâmico da posição número 6 das suas cadeias beta substituído pela valina. Essa única substituição aminoácida é a base de toda a fisiopatogenia da hemoglobinopatia S, uma vez que ela é diretamente responsável pela formação das hemácias falciformes.

De acordo com a hipótese de Murayama (1966) a substituição de um aminoácido hidrófilo (ácido glutâmico) por outro hidrófobo (valina) na posição número 6 das cadeias beta leva à formação de uma estrutura cíclica na extremidade NH_2 -terminal dessas cadeias. Essa estrutura cíclica resulta da formação de uma ponte hidrófoba entre as valinas das posições 1 e 6 e de uma ponte de hidrogênio entre a valina da posição 1 e a leucina da posição 3, formando uma projeção em forma de chave em uma das extremidades das cadeias beta.

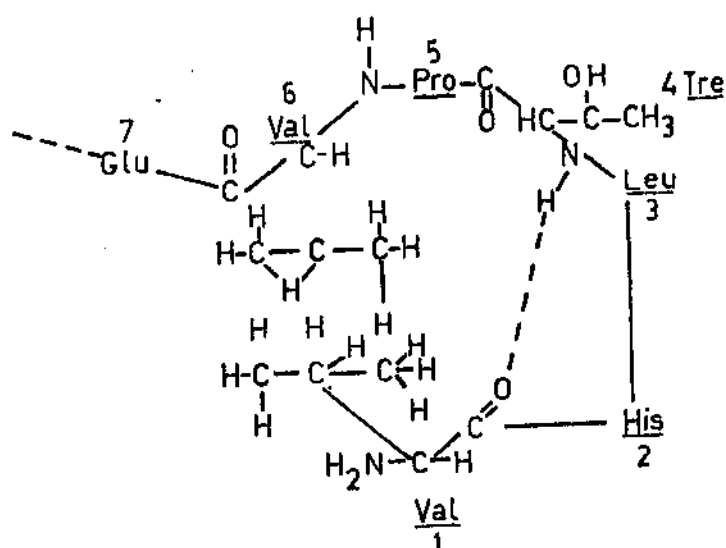


Figura 4 - Ciclização da extremidade NH_2 -terminal das cadeias beta da hemoglobina S, de acordo com a hipótese de Murayama (1966).

Quando a hemoglobina S é desoxigenada, essas projeções das suas cadeias beta se encaixam nas cadeias alfa de outra molécula, a qual, por sua vez, também se liga da mesma forma a outra molécula, e assim sucessivamente, desencadeando a formação de cristalóides que deformam a hemácia. Esse fenômeno é designado em inglês por *sickling* (*sickle* = foice), havendo entre nós a tendência de designá-lo pelos neologismos, "falciformação" ou "falcização".

As investigações feitas posteriormente trouxeram, no entanto, novas informações a respeito do mecanismo de "falcização". Assim, sabe-se hoje que as *fibras de hemoglobina S* que causam a deformação da hemácia, ou seja, a "falcização", são longas estruturas tubulares compostas por seis filamentos que se dispõem de forma ligeiramente retorcida em torno de uma cavidade central. Essa fibra pode também ser considerada / como sendo constituída por uma série de discos empilhados, cada um dos quais formado por seis moléculas de hemoglobina S dispostas em círculo. Cada disco se mostra ligeiramente rodado em relação ao seu vizinho, o que determina a rotação dos filamentos em torno da cavidade central (FINCH, 1973).

A forma exata com que a substituição do ácido glutâmico de posição número 6 das cadeias beta pela valina determina a formação das fibras de hemoglobina S ainda é desconhecida. Uma vez que a formação de fibras não ocorre com a oxihemoglobina S, é evidente que as alterações espaciais associadas à desoxigenação permitem interações específicas entre as

moléculas de hemoglobina S. Segundo FINCH (1973), as ligações mais fortes entre as moléculas de hemoglobina constituintes / das fibras se processam ao longo do maior eixo dos filamentos uma vez que, quando as fibras se desintegram, elas se fragmentam em monofilamentos.

Existem várias possibilidades de orientação das valinas da posição número seis das cadeias beta (HOFRICHTER *et al.*, 1973), devendo existir, também, várias outras interações estabilizadoras entre as moléculas de hemoglobina S que constituem a fibra (BERTLES, 1974).

O processo de "falciformação" não é instantâneo. Quando as hemácias contendo hemoglobina S são desoxigenadas subitamente, ocorre um breve intervalo de tempo antes que as células assumam a típica forma de foice. Esse intervalo de tempo deve corresponder ao período de condensação das moléculas de hemoglobina S, antes da formação da fibra. A duração desse intervalo é altamente dependente da concentração de hemoglobina S, dependendo, também, da saturação de oxigênio e da temperatura.

Embora exista uma grande variabilidade no tempo de perfusão capilar nos diferentes órgãos, devendo existir, também, uma grande variabilidade individual no que diz respeito a essa característica, que, evidentemente, também varia no mesmo indivíduo de acordo com as diferentes condições, esse intervalo de tempo que antecede à formação da fibra pode ter duração suficiente para ser fisiologicamente importante.

O processo de "falcização" pode ser reversível, mas depois de várias deformações, a hemácia pode apresentar lesões de membrana (LESSIN e JENSEN, 1974). Essas lesões determinam a perda de água por parte da hemácia, com aumento da concentração intracelular de hemoglobina e, conseqüentemente, aumento da tendência à "falciformação". Com o tempo, há a formação de hemácias "falcizadas" irreversivelmente.

A hipoxemia, a acidose, a desidratação e a vasoconstricção são os principais fatores predisponentes da formação / de hemácias falciformes, cujas conseqüências clínicas podem ser reunidas em três grupos:

A - Manifestação clínicas decorrentes da hemólise

As hemácias em forma de foice são mais sujeitas à destruição, sobretudo no baço, determinando um processo hemolítico.

Tais manifestações da hemoglobina S são comuns às outras doenças hemolíticas congênitas, incluindo anemia, reticulocitose, icterícia do tipo hemolítico, eliminação de pigmentos biliares pela urina, hepatomegalia, esplenomegalia, hiperplasia e hipertrofia da medula óssea, etc.

B - Manifestações clínicas decorrentes da obstrução de vasos sanguíneos.

A obstrução de vasos sanguíneos por aglomerados de hemácias falciformes, provocando estase sanguínea e trombose, pode determinar lesões isquêmicas em qualquer região do corpo, com crises dolorosas e infartamento de órgãos.

C - Manifestações clínicas decorrentes do acúmulo de hemácias falciformes em órgãos.

O acúmulo de hemácias falciformes ocorre principalmente no baço e no fígado, contribuindo para o seu aumento de volume.

A chamada crise de sequestramento é um fenômeno hemodinâmico que pode levar o portador da hemoglobinopatia S à morte em poucas horas. Durante a crise, o paciente apresenta anemia aguda e choque, sem as manifestações características de uma crise hemolítica. A necrópsia revela vasos periféricos vazios e isquemia generalizada, em contraste com a grande quantidade de hemácias falciformes sequestradas nos sinusóides esplênicos. Além desse sequestramento, fatores neurológicos reflexos também contribuem para a distribuição desfavorável do sangue, com grande acúmulo no baço.

Esses três tipos de manifestações clínicas são encontrados primordialmente nos homozigotos do gene da hemoglobinopatia S, definindo, como veremos adiante, o quadro da anemia falciforme. Tais manifestações também podem aparecer em pacientes com microdrepanocitose e, em situações especiais, como complicações clínicas nos heterozigotos com o traço sickle-

mico.

Distribuição geográfica da hemoglobina S.

Os primeiros estudos a respeito do índice falcêmico das populações, isto é, da proporção de indivíduos cujas hemácias se tornam falciformes em condições de baixa tensão de oxigênio, já revelaram que essa alteração hematológica ocorria preferencialmente entre negróides. Essas observações pioneiras, feitas em populações norte-americanas, foram confirmadas por estudos posteriores realizados em populações negróides de diferentes partes do mundo.

Assim, índices falcêmicos de até 40% foram observadas em tribos da África Oriental (ALLISON, 1954), no Quênia, no Sul do Sudão (FOY *et al.*, 1954), e em Moçambique (Melo, 1966). Na Libéria, na Guiné e em Angola, foram encontrados índices falcêmicos em torno de 20% a 30% (LIVINGSTONE, 1958, 1962; MELO, 1966).

Nas populações negróides do continente americano, também foram encontrados índices falcêmicos relativamente altos, embora geralmente inferiores aos observados nas populações africanas. Entre negróides brasileiros, por exemplo, foram registrados valores entre cerca de 6% até mais de 10%, valores esses que não diferem muito dos encontrados na população negróide norte-americana, da Colômbia e de outros países/americanos (vide referências em CEZAR *et al.*, 1974 e em SERJEANT, 1974).

Dentre os pacientes negróides que passam pela Seção de Triagem do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, SP foram encontrados cerca de 8% de síclêmicos (CEZAR *et al.*, 1974), enquanto que entre doadores de sangue e entre recém-nascidos negróides desse mesmo hospital foram encontrados cerca de 10% desses heterozigotos (RAMALHO, 1978¹⁻²).

As maiores frequências do traço síclêmico já descritas até o momento em adultos sul-brasileiros foram as encontradas por Ramalho e Beiguelman (1977) entre negróides com tuberculose pulmonar internados em Sanatórios de Campos do Jordão, SP (17% entre negros e 10,3% entre mulatos).

Cumprе ressaltar, por outro lado, que não seria surpreendente o encontro de frequências apreciáveis dessa hemoglobinopatia em algumas populações caucasóides brasileiras que receberam, através da miscigenação, fluxo gênico negróide importante.

Apesar de a hemoglobina S ser mais frequente entre negróides, ela não é exclusiva desse grupo racial, sendo encontrada também com altas frequências em populações não negróides da África do Norte, da Grécia, da Índia e da Ásia Menor. Na Turquia, por exemplo, a frequência de traço siclêmico foi estimada em 13%, enquanto que em algumas regiões da Grécia e da Índia essa frequência chega a atingir, da mesma forma que entre negróides africanos, o valor de 40% (ROY e ROY-CHAUD HURY, 1967; COMINGS, 1970). Aliás, de acordo com Lehmann (1959), a hemoglobina S deve ter se originado na Ásia Menor, daí se espalhando para a Índia, para a Grécia e para a África.

Os interessados em detalhes a respeito da distribuição geográfica da hemoglobina S poderão encontrar uma excelente revisão do assunto no livro de SERJEANT (1974).

Anemia falciforme

Os homozigotos do gene da hemoglobinopatia S produzem apenas cadeias beta estruturalmente alteradas (cadeias β^S) e, por isso, são incapazes de sintetizar a hemoglobina normal A_1 , substituindo-a totalmente pela hemoglobina S.

Assim, os hemolisados preparados a partir das hemácias dos pacientes com a anemia falciforme mostram, de maneira constante, dois tipos de hemoglobinas, ou seja, as hemoglobinas S e A_2 , podendo, também, revelar níveis aumentados de hemoglobina fetal.

O fenômeno da falciformação das hemácias, além de ser responsável por todo o quadro clínico da anemia falciforme, também é a causa da grande sinonímia criada para designar, em português, essa condição patológica. Desse modo, além do nome anemia falciforme (do latim, *falx* = foice), ela também é conhecida por anemia drepanocítica (do grego, *drepanē* = foice), anemia meniscoítica (do grego, *meniscos* = crescente), anemia seleno-cítica (do grego, *selene* = lua), doença das células falciformes, eritrofalcemia ativa e anemia siclêmica.

Evolução clínica

As primeiras manifestações da anemia falciforme costumam aparecer ainda na infância, embora, geralmente, após os seis meses de idade.

A doença tem evolução crônica, alternando períodos de exacerbação ou crises com períodos de remissão relativa. Essas crises podem ser de quatro tipos, ou seja, crises hemolíticas, aplásticas, trombóticas e de sequestramento.

A - Crises hemolíticas

As crises hemolíticas caracterizam-se por manifestações decorrentes do aumento da destruição sanguínea, com desenvolvimento rápido de anemia, queda do número de hemácias para níveis em torno de 1 a 2 milhões por mm^3 , icterícia do tipo hemolítico, febre e vômitos biliosos. Frequentemente elas são acompanhadas de fortes dores abdominais, causadas pela trombose dos vasos mesentéricos.

Essas crises, que costumam durar 2 a 3 semanas, são mais frequentes na infância, tornando-se, geralmente, mais espaçadas e menos intensas com o ocorrer dos anos.

B - Crises aplásticas.

As crises aplásticas são decorrentes da exaustão temporária da medula óssea. Juntamente com as manifestações de anemia aguda, aparecem no sangue periférico e nos aspirados medulares sinais de deficiência parcial aguda da medula óssea, com eritroblastopenia e reticulocitopenia.

C - Crises trombóticas

As crises trombóticas podem afetar qualquer região do organismo, mas são mais frequentes nas áreas de maior eritrotesia, como é o caso, por exemplo, dos vasos abdominais (crises abdominais) e das articulações (crises "reumáticas").

As crises dolorosas são as manifestações mais comuns e características da anemia falciforme, distinguindo-se das ou-

tras anemias hemolíticas congênitas.

A eritrostasia observada em pequenos vasos venosos e em capilares fornece condições propícias ao desencadeamento de crises trombóticas, uma vez que causa aumento da viscosidade sanguínea, hipoxemia e acidose. Tais alterações favorecem a falciformação das hemácias, com agravamento da hipoxemia, já que as hemácias deformadas têm menor capacidade de transportar o oxigênio. O círculo vicioso formado leva à aglutinação intravascular de hemácias falciformes e normais, com liberação de substâncias tromboelásticas e, conseqüentemente, trombose.

D - Crises de sequestramento.

Como já foi visto anteriormente, as crises de sequestramento caracterizam-se pela má distribuição do sangue no organismo, com grande acúmulo sanguíneo no baço, manifestações de anemia aguda e choque.

Apesar de ser possível distinguir na anemia falciforme esses quatro tipos diferentes de crises, as manifestações observadas nos períodos de exacerbação da doença costumam ser, frequentemente, do tipo misto. Assim, por exemplo, não é rara a observação de manifestações trombóticas somando-se a manifestações típicas da hemólise.

A frequência das crises varia muito de um doente para outro. Enquanto que em certos pacientes as manifestações clínicas de anemia falciforme se limitam praticamente a algumas poucas crises durante toda a vida, em outros, são observadas várias dezenas de crises no período de um só ano.

As crises podem ser provocadas por infecções intercorrentes, gestações, partos, traumatismos, cirurgias, anestésias, mudanças bruscas da temperatura ambiente, da pressão atmosférica ou da umidade relativa do ar. Por outro lado, a desnutrição e as hipovitaminoses são fatores que também favorecem o aparecimento de crises.

Quadro clínico.

Muitas manifestações da anemia falciforme são comuns às outras doenças hemolíticas congênitas, como é o caso do retardo do crescimento e do desenvolvimento, da anemia, da icterícia

cia, da esplenomegalia, da hepatomegalia e das deformidades ósseas consequentes à hiperplasia e à hipertrofia da medula óssea. Dentre essas deformidades ósseas, chamam particularmente a atenção aquelas observadas no crânio, onde o alargamento da diploe e o afastamento da tábua externa determinam o aspecto radiológico em "pelo erizado", e as concernentes às vértebras, que podem se mostrar achatadas ou com perfil acentuadamente biconcavo (vértebras de peixe). Mais do que a anemia hemolítica, no entanto, têm crucial importância clínico-patológica na anemia falciforme os processos vaso-oclusivos, que determinam crises quase sempre febris e que estão associados a maior suscetibilidade a infecções bacterianas e virais, por vezes fulminantes.

As manifestações osteo-articulares consequentes a esses fenômenos vaso-oclusivos ocupam lugar de especial destaque dentro do quadro clínico da anemia falciforme. Dentre essas manifestações, são particularmente frequentes os infartos recorrentes da medula óssea e das regiões justa-articulares, provocando crises extremamente dolorosas, a necrose assética uni ou bilateral da cabeça do fêmur, as áreas de rarefação óssea e, posteriormente, de osteosclerose nos ossos longos, a dactilite infantil e a osteoporose vertebral.

As úlceras de membros inferiores, frequentes na região do maléolo tibial, também aparecem em alta porcentagem dos doentes com a anemia falciforme. Essas úlceras são usualmente bilaterais e numerosas, deixando cicatrizes atróficas ou, ocasionalmente, quelóides.

Quanto ao sistema cardiovascular, merecem destaque pela frequência, a cardiomegalia e a insuficiência cardíaca por sobrecarga ventricular direita, causada pela trombose dos ramos pequenos e médios da artéria pulmonar. A eritrostasia e a trombose em vasos da pequena circulação predispõe à ocorrência de pneumonias, que sempre agravam o curso da doença.

A insuficiência cardíaca total e o infarto coronária no são relativamente raros na anemia falciforme. No entanto, a trombose de pequenos vasos coronarianos determina lesões isquêmicas do miocárdio, que podem ser acusadas pelo estudo eletrocardiográfico. Assim, o eletrocardiograma dos doentes costuma revelar prolongamento do espaço PR, depressão ou inversão da onda T e sobrecarga ventricular direita ou esquerda.

A trombose dos vasos renais é responsável por uma série de manifestações comuns em doentes com a anemia siclêmica, dentre as quais, os infartos corticais, a hematúria, a pielonefrite, a síndrome nefrótica e a hipostenúria. Essa última alteração, que se inicia geralmente na infância, com agravamento progressivo, é atribuída à lesão dos *vasa recta* que participam do mecanismo de contra-corrente.

O baço, que é extremamente suscetível a infartamentos em virtude das suas próprias características de circulação sanguínea, apresenta-se aumentado em cerca de 15 a 40% dos pacientes. A esplenomegalia ocorre, geralmente, em pacientes jovens e, com o tempo, o baço dos indivíduos com anemia falciforme se torna atrofico, podendo mostrar calcificações finas e siderofribose. As áreas esplênicas infartadas podem se infectar, transformando-se em abscessos, que exigem intervenção urgente.

Já o fígado, por seu lado, mostra-se aumentado de volume em 25 a 30% dos casos. Durante as crises hemolíticas, é comum a observação do aumento agudo do fígado, com franca icterícia. Ao contrário do que ocorre classicamente nas outras doenças hemolíticas, a icterícia é devida mais à obstrução e à lesão hepatocelular do que à hemólise propriamente dita, uma vez que a trombose dos vasos intra-hepáticos determina necrose de áreas extensas do fígado. Ao lado das lesões hepáticas agudas, existe também um comprometimento crônico e progressivo do fígado, que acaba levando à cirrose. A hemossiderose hepática também é uma complicação frequente na anemia falciforme.

A formação de cálculos nos dutos biliares e na vesícula determina o aparecimento de colelitíase em uma boa proporção de doentes com anemia siclêmica. Por outro lado, a trombose dos vasos da mucosa gastro-intestinal leva à formação de úlceras que ao contrário das úlceras pépticas, não são acompanhadas por aumento da acidez do suco gástrico. Já a trombose de vasos mesentéricos provoca geralmente crises abdominais extremamente dolorosas, exigindo internação hospitalar urgente.

O exame oftalmoscópico dos doentes costuma revelar vasos tortuosos e de diâmetro irregular no fundo do olho, em consequência da eritrostasia capilar. A trombose determina o aparecimento de infartos retinianos e de hemorragias no humor vítreo.

O priapismo, apesar de ser uma manifestação típica da

anemia falciforme, é relativamente pouco frequente, ocorrendo em cerca de 5% dos doentes. Essa alteração é devida à estase venosa, com falciformação de hemácias e trombose, nos seios dos corpos cavernosos do pênis.

As lesões do sistema nervoso central apresentam a mesma fisiopatogenia observada em outras regiões do organismo, ou seja, falciformação de hemácias, estase, trombose, infartos e hemorragias. O sistema da artéria cerebral média é o mais seriamente comprometido na anemia falciforme, sendo frequentes também as lesões na substância cinzenta, nos espaços subaracnóides e nos seios venosos. Já as lesões na substância branca são relativamente raras.

As manifestações neurológicas na anemia falciforme, que geralmente se iniciam na adolescência, incluem hemiplegia, convulsões, afasia, rigidez da nuca e paralisia facial, dentre os sinais mais frequentes, sendo a anestesia, a analgesia, a parestesia das extremidades, as perturbações da visão e as crises dolorosas os sintomas mais comumente assinalados. Tais manifestações podem decorrer da oclusão de arteríolas por hemácias falciformes ou de hemorragia intracraniana difusa ou maciça e, no caso de hipoestésias e síndromes radiculares, podem ser, também, consequências de colapso vertebral secundário e infarto ósseo.

Tratamento

O tratamento da anemia falciforme ainda é meramente paliativo, limitando-se praticamente à prevenção e à atenuação das crises,

Os agentes inibidores da falciformação de hemácias descritos até o momento são excessivamente tóxicos para serem usados com sucesso *in vivo*. Dentre esses agentes, merecem destaque certas sulfonas, sobretudo a dapsona ou DDS, que em altas doses inibe relativamente bem a falciformação. Essa droga só pode ser prescrita, no entanto, com extrema cuidado, uma vez que as doses capazes de inibir a falciformação podem também determinar manifestações tóxicas, extremamente graves, incluindo anemia hemolítica, psicose, dermatoses e neurite. A observação do efeito inibidor da falciformação de hemácias apresentado por determinados aminoácidos *in vitro* trouxe novas esperanças de se conseguir

em um futuro próximo, um tratamento mais efetivo para a anemia falciforme (RUMEN, 1975).

LEWIS e KAY (1965) observaram que determinados anti-histamínicos do grupo da fenotiazina, da promazina e da desmetil-clorpromazina, podem ser úteis no tratamento das crises da anemia falciforme, uma vez que dificultam a falciformação de hemácias. Esses autores trataram 25 doentes em crise com doses diárias de 300 mg de promazina para adultos, e de 100 a 200 mg para crianças entre 8 e 12 anos, obtendo resultados bastante favoráveis, ou seja, diminuição da febre e das dores abdominais, atenuação da hemólise e melhora do hematócrito.

Ainda segundo esses autores, doses de 50 a 100 mg de promazina por via intra-muscular são capazes de reduzir a duração média das crises dolorosas, além de exercer um efeito analgésico bastante benéfico. Infelizmente, no entanto, essa droga também pode determinar reações indesejadas, incluindo sonolência, hepatite e, mais raramente, agranulocitose e anemia hemolítica.

As medidas contra o choque e a acidose são de extrema importância durante as crises hemolíticas. Elas incluem a administração de substâncias alcalinas, ingestão abundante de líquidos e administração de plasma ou de seus substitutos.

Nas crises trombóticas muito severas, é recomendada a administração de drogas capazes de provocar vaso-dilatação e diminuir a viscosidade sanguínea, como é o caso do sulfato de magnésio, da papaverina e da nicotinamida. A heparina é recomendada para prevenir a trombose, sobretudo dos vasos cerebrais.

A transfusão sanguínea é imprescindível nas crises muito severas, nas infecções graves e antes das cirurgias, mas deve ser evitada ao máximo nos períodos de remissão relativa da doença. Um cuidado que, apesar de evidente, raramente é tomado nos hospitais brasileiros, é investigar a presença da hemoglobina S nos sangue transfundidos a doentes com a anemia sickle-cell. Com relação a esse particular, cumpre salientar que cerca de 10% dos doadores negróides que examinamos no Banco de Sangue da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas apresentavam o traço sickle-cell (RAMALHO, 1978).

A administração de oxigênio é um recurso frequentemente adotado durante as crises, embora presente pequena ou

nenhuma valia. Já os corticóides podem ser prescritos em tratamentos de curta duração durante as crises "reumáticas", enquanto que os narcóticos devem ser usados apenas em situações de dores insuportáveis dos ossos e das articulações, devendo ser evitados durante as crises abdominais.

A esplenectomia, apesar de constituir um recurso simplesmente paliativo, apresenta resultados favoráveis em cerca de 60% dos casos. Essa cirurgia deve ser indicada quando as crises hemolíticas forem muito frequentes, quando a esplenomegalia for acompanhada de manifestações do hipersplenismo, quando houver púrpura trombocitopênica ou quando os infartos esplênicos e as crises de sequestramento ocuparem lugar de destaque no quadro clínico apresentado pelo paciente.

A hemossiderose deve ser combatida e prevenida pelo uso de agentes quelantes do ferro, como é o caso da desferrioxamina.

Prognóstico

Apesar de a anemia falciforme ser de difícil tratamento, algumas de suas complicações, potencialmente letais, não o são. Em consequência disso, verifica-se que a taxa de sobrevivência dos indivíduos com essa hemoglobinopatia está diretamente associada ao grau de atendimento médico recebido pelas populações às quais pertencem. Assim, enquanto em Zâmbia cerca de metade dos pacientes com anemia falciforme morrem antes dos três anos de vida (BARCLAY *et al.*, 1970), na Rodésia, 10% desses doentes têm mais de 10 anos de idade (BELL e GELFAND, 1971) e em Gana, 50% deles começam a segunda década de vida (KONOTEY-AHULU 1971). Já nos Estados Unidos da América do Norte e na Europa, a esperança média de vida dos homozigotos SS é atualmente, de quarenta anos, existindo casos bem documentados de grande longevidade (CHARACHE e RICHARDSON, 1964; AACH e KISSANE, 1970). Mesmo na Jamaica, Serjeant (1970) observou em irmandades de casos tratados, uma proporção de 28% de homozigotos com mais de 30 anos de idade.

Traço siclêmico

Os heterozigotos da hemoglobina S, também conhecidos como portadores do traço ou estigma siclêmico, apresentam um percentual de hemoglobina anômala que varia de 22% a 45% da hemoglobina total (NEEL *et al.*, 1951; WELLS e ITANO, 1951). As suas hemácias apresentam a capacidade de se tornar falciformes, embora, para tanto, devam ser submetidas a menores tensões de oxigênio do que as hemácias de pacientes homozigotos, que manifestam a anemia siclêmica.

Apesar de os indivíduos heterozigotos não apresentarem, geralmente, perturbações clínicas evidentes, eles podem manifestar complicações sérias, até mesmo fatais, principalmente em consequência de fatores precipitantes da produção de células falciformes.

Assim, por exemplo, na extensa revisão bibliográfica do assunto feita por CÉZAR e col. (1974), são citados, entre portadores do traço siclêmico, casos de infarto esplênico em consequência do vôo em avião não pressurizado, infarto pulmonar e esplênico em um atleta que havia ido competir em lugar de grande altitude, trombose fatal do seio longitudinal superior, morte súbita após anestesia, ruptura do baço associada a endocardite bacteriana, e hipopituitarismo anterior e posterior manifestado após viagem de avião, além de casos com manifestações neurológicas diversas, osteonecrose assética de cabeça do fêmur, infarto renal, hemorragia retiniana, úlceras de membros inferiores, etc.

No Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, temos observado, com relativa frequência, pacientes que manifestam alterações clínicas atribuíveis ao traço siclêmico. Dentre elas, chamam particularmente a atenção, as alterações renais, ósteo-articulares, neurológicas e eletrocardiográficas.

Dentre as várias situações que ofereçam sérios riscos aos siclêmicos, merece especial atenção a anestesia geral, uma vez que a depressão respiratória que a acompanha pode desencadear uma crise hemolítica ou produzir infartamentos em diversos órgãos, em consequência do bloqueio de vasos sanguíneos por aglomerados de células falciformes (MOTULSKY e STAMATOYANNOPOULOS, 1968; SCURR e FELDMAN, 1972).

Casos de morte por anestesia geral em portadores do traço siclêmico foram descritos por KONOTEY-AHULU (1969) e por McGARRY e DUNCAN (1973), sendo esses acidentes, segundo Leachmann

e col., (1967) e PATE e col., (1970), mais frequentes nas cirurgias cardíacas e pulmonares, que comprometem mais seriamente a função respiratória.

LEACHMANN e col. (1967), descreveram um caso fatal, com múltiplas lesões infartadas, em um síclêmico submetido à troca da válvula aórtica, enquanto que SCHENK (1964), por seu lado, relatou um caso de trombose do seio longitudinal superior após anestesia em outro paciente com o traço síclêmico.

Embora esses acidentes fatais não pareçam ser muito comuns (GILBERTSON, 1965; HOLZMANN, 1969), ainda é bastante difícil avaliar, em nosso meio, a frequência real com que eles ocorrem, o que também é verdadeiro para os outros acidentes de menor gravidade clínica ou de manifestações tardias.

Tendo em vista as considerações acima, parecem ser de crucial importância certas precauções na anestesia de síclêmicos, dentre as quais é possível destacar as seguintes medidas preventivas sugeridas por SERJEANT (1974):

1. Evitar, sempre que possível, a anestesia geral em portadores do traço síclêmico, dando-lhe preferência à anestesia local ou regional.
2. Nos casos em que a anestesia geral for imprescindível, fornecer ao síclêmico uma ótima oxigenação durante a cirurgia e, especialmente, no período pós-operatório imediato.
3. Nas grandes cirurgias, sobretudo nas cardíacas e nas pulmonares, reduzir o percentual de hemoglobina S por meio de exsanguinotransfusões parciais.
4. Investigar a presença da hemoglobina S em todos os sangues transfundidos aos síclêmicos antes, durante e após a cirurgia.
5. Evitar ao máximo o uso de torniquetes e, nas situações em que o seu uso for indispensável, tomar o cuidado de esvaziar antes as veias por compressão manual, reduzindo, assim, o risco de acidentes trombo-embólicos.

A essas medidas pode-se acrescentar, ainda, o controle bastante rigoroso do equilíbrio ácido-básico e do estado de hidratação do paciente, tanto durante a cirurgia quanto no per

ríodo pós-operatório. A acidose e a desidratação devem ser rigorosamente prevenidas e, caso ocorram, imediatamente corrigidas. Especial atenção também deve ser dada à prevenção e ao tratamento das infecções, visto que as mesmas podem fornecer condições favoráveis à formação de células falciformes.

As características eritrocitárias do portador do traço siclêmico não lhe permitem, evidentemente, doar sangue. De fato, a transfusão de hemácias siclêmicas sempre implica em um risco para o receptor, situação agravada pelo fato de tal indivíduo apresentar, frequentemente, condições favoráveis à deformação das células transfundidas.

A transfusão de sangue com hemoglobina S está formalmente contra-indicada em exsanguinotransfusões e em pacientes com anemia falciforme, com síndrome de insuficiência respiratória ou com acidose metabólica.

Do exposto, fica claro que a investigação sistemática dos portadores do traço siclêmico é de fundamental importância, não apenas para o aconselhamento genético desses indivíduos, mas também para a prevenção das complicações clínicas que lhes podem advir em determinadas situações. No que diz respeito a essa última finalidade, é evidente a vantagem da detecção precoce dos siclêmicos, razão pela qual é de crucial importância a pesquisa rotineira da hemoglobina S em recém-nascidos, examinando eletroforeticamente amostras de sangue do cordão umbilical (RAMALHO, 1976_b).

Reconhecimento laboratorial da hemoglobina S

A partir dos seis meses de idade, a presença da hemoglobina S pode ser demonstrada no sangue dos seus portadores por meio dos chamados "testes de solubilidade", que são exames laboratoriais rápidos, simples, eficientes e que não exigem qualquer aparelhagem especializada. Esses testes, que se baseiam em características de solubilidade da hemoglobina S, utilizam reagentes que podem ser comprados já prontos ou serão preparados no próprio laboratório de análises. A nossa experiência é favorável com todos os produtos disponíveis no comércio, bem como o teste "Sickle-ID", aperfeiçoado por LOUDERBACK e col.

(1974). Nunca é demais salientar, no entanto, que até os seis meses de idade, a única técnica segura para a detecção de portadores da hemoglobina S continua sendo a eletroforese de hemoglobinas em gel de ágar, em gel de amido ou, ainda, em acetato de celulose (HUNTSMAN *et al.*, RAMALHO, 1976_b).

Nos casos em que o teste de solubilidade se mostrar positivo, a presença da hemoglobina S deve ser confirmada pela pesquisa de células falciformes em lâminas de microscopia ou, de preferência, pela eletroforese de hemoglobinas.

A pesquisa de hemácias falciformes é feita pela técnica clássica de DALAND e CASTLE (1948), empregando-se como agente redutor uma solução de metabissulfito de sódio a 2%. Assim, após misturar em lâminas de microscopia uma gota de sangue oxalatado com outra da solução redutora, as suspensões de hemácias resultantes são cobertas com lamínulas e seus bordos lutados. A presença de hemácias falciformes é pesquisada sob microscopia, após manter as lâminas em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos.

Esse exame, que ainda é muito usado nos laboratórios brasileiros, é muito sujeito a erros técnicos que podem conduzir a resultados falsamente negativos ou positivos. Além disso, as lâminas, aparentemente negativas devem ser reexaminadas após 24 horas, o que retarda excessivamente o resultado do exame.

Já a eletroforese de hemoglobinas, apesar de ser mais cara e mais trabalhosa, apresenta a vantagem de ser mais segura, além de permitir a quantificação da hemoglobina S. Temos nos valido com êxito das seguintes técnicas de preparo da solução de hemoglobinas e de eletroforese em fitas de acetato de celulose:

Preparo da solução de hemoglobinas para eletroforese:

Coloca-se em um tubo de ensaio 2 ml de sangue total colhido com EDTA na proporção de 1 mg/ml. Completa-se o tubo com solução de NaCl a 0,85% e centrifuga-se a 3000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante e a camada de glóbulos brancos são removidos por aspiração com uma pipeta Pasteur. A seguir, as hemácias são lavadas 3 a 4 vezes com solução de NaCl a 0,85%. Se o líquido da última lavagem for claro, as células deverão ser hemolizadas com um volume igual de água destilada e outro de clorofórmio. Agita-se vigorosamente o tubo e centrifuga-se a 3000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, o clorofórmio fica

rã no fundo do tubo, o estroma na porção intermediária e a solução de hemoglobinas na porção superior, devendo ser retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

Eletroforese de hemoglobinas em fitas de acetato de celulose.

Reagentes:

1 - Tampão tris-glicina, pH 9,1

Tris (hidroximetil) aminometano	14,1	g
Glicina	22,6	g
Água bidestilada	1500,0	ml

2 - Solução corante

Amido negro 10 B	0,5	g
Metanol	45,0	ml
Ácido acético glacial	10,0	ml
Água bidestilada q.s.p.	100,0	ml

3 - Solução descorante

Metanol	45,0	ml
Ácido acético glacial	10,0	ml
Água bidestilada q.s.p.	100,0	ml

Técnica:

As fitas de acetato de celulose são colocadas na solução tampão por 10 minutos. Retira-se o excesso de tampão entre duas folhas de papel de filtro e coloca-se as fitas em uma cuba de eletroforese previamente cheia com o mesmo tampão. Depósito-se, a seguir, a solução de hemoglobina sobre a fita, mediante o uso de aplicador apropriado, realizando-se a corrida eletroforética sob a diferença de potencial de 250 volts durante 1 hora. Retiram-se as fitas da cuba, colocando-as na solução corante por 10 minutos. Descora-se o fundo, posteriormente, através de lavagens sucessivas com a solução descorante.

Na figura 5 são apresentados esquematicamente os resultados dos exames eletroforéticos de pacientes com diferentes formas de hemoglobinopatia S.

Como veremos a seguir, a hemoglobina S ocupa, na técnica eletroforética descrita, a mesma posição que a hemoglobina D Punjab, mas a diferenciação entre as duas pode ser feita facilmente por intermédio da pesquisa de hemácias falciformes em lâminas de microscopia ou do teste Sickle-ID.

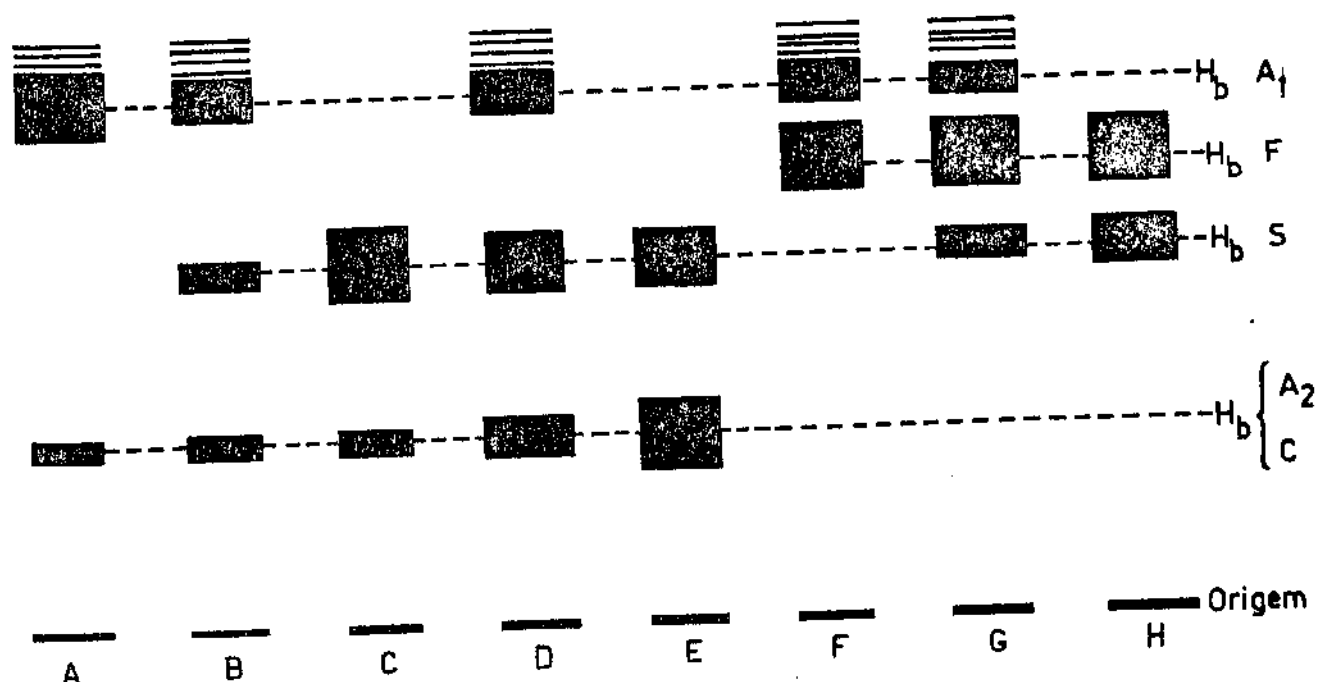


Fig. 5 - Eletroforese de hemoglobinas de indivíduos normais e de pacientes com diferentes formas de hemoglobinopatia S: a) adulto normal, b) adulto com o traço siclêmico, c) adulto com anemia falciforme, d) adulto com microdrepanocitose (tipo $\beta^S\beta^{T+}$), e) adulto com hemoglobinopatia SC, f) recém-nascido normal, g) recém-nascido com o traço siclêmico, h) recém-nascido homozigoto SS.

OUTRAS ALTERAÇÕES HEMOGLOBÍNICAS FREQUENTES EM NOSSO MEIO: AS HEMOGLOBINAS C e D Punjab

Dentre as hemoglobinopatias estruturais, ainda merecem destaque em nosso meio as hemoglobinas C e D Punjab, apesar de elas serem bem menos importantes do que a hemoglobina S, tanto pela frequência quanto pelos problemas clínicos que apresentam.

A hemoglobina C, frequente em populações da África Ocidental, é encontrada em cerca de 1% dos negróides brasileiros (TONDO e SALZANO, 1962; ARAÚJO, 1965; RAMALHO e BEIGUELMAN, 1977).

Os heterozigotos AC não apresentam alterações clínicas dignas de nota e, por isso, a sua detecção reveste-se de importância apenas para fins de aconselhamento genético, uma vez que os homozigotos CC e os heterozigotos SC podem manifestar anemia.

Essa hemoglobina ocupa, em pH alcalino, a mesma posição eletroforética que a hemoglobina A₂, dela se diferenciando no entanto, pelo seu percentual sempre mais elevado.

Já a hemoglobina D Punjab, originária da Índia, foi introduzida em nosso País pelos portugueses, sendo aqui descrita com frequência geralmente inferiores a 1% (ARAÚJO, 1965; RAMALHO, 1975).

A hemoglobina D Punjab não determina alterações clínicas e, pelas técnicas eletroforéticas usuais, ocupa a mesma posição que a hemoglobina S. Por esse motivo, os exames eletroforéticos dos heterozigotos AD e SD podem ser confundidos com os dos heterozigotos AS e com os dos homozigotos SS, respectivamente. A diferenciação entre as duas hemoglobinas é feita facilmente, no entanto, pelo teste "Sickle-ID" (LOUDERBACK *et al.* 1974).

As hemoglobinas D Punjab e C podem copolimerizar com a hemoglobina S nos heterozigotos SC e SD.

A hemoglobinopatia SC determina alterações clínicas semelhantes às da anemia falciforme, se bem que mais brandas.

Como a hemólise é menor na hemoglobinopatia SC, o hematócrito dos seus portadores e, conseqüentemente, a sua viscosidade sangüínea, tendem a apresentar valores superiores aos descritos na anemia falciforme. Isso leva à predominância, na hemoglobinopatia SC, das alterações clínicas relacionadas com a viscosidade sangüínea, como a necrose assética da cabeça de fêmur, a hemorragia retiniana e a hematúria. Em nosso meio, também temos observado, frequentemente, úlceras de membros inferiores em heterozigotos SC.

AS SÍNDROMES TALASSEMICAS

As talassemias sempre despertaram grande interesse como objeto de investigação científica pelo fato de constituírem entidades genético-clínicas com características extremamente peculiares.

A contínua ampliação do conceito de talassemia, a constatação de sua distribuição geográfica, praticamente universal, bem como as descobertas recentes a respeito da sua fisiopatogenia, estão conferindo às síndromes talassêmicas novo interesse como terreno de pesquisa, o qual promete continuar muito fértil. Ao lado dessas fatos, é inegável a grande importância clínica de tais hemoglobinopatias.

Realmente, como comenta WEATHERALL (1967), as síndromes talassêmicas se converteram em um tema extremamente interessante para os investigadores de várias disciplinas e em um campo bastante amplo de comunicação entre o clínico, que tem a responsabilidade de diagnosticar e tratar os referidos transtornos, e o pesquisador, cujos estudos a respeito do controle molecular da síntese proteica têm tanta aplicação nesses problemas clínicos.

Do ponto de vista do geneticista, por seu lado, além de os estudos das alterações talassêmicas prometerem respostas a algumas questões fundamentais sobre os mecanismos genéticos implicados na síntese defeituosa de proteína, chama a atenção o fato de as talassemias constituírem entidades passíveis de detecção no seu estado heterozigótico.

O traço talassêmico beta é frequente no Estado de São Paulo, tendo sido encontrado em 6,4% dos descendentes / não miscigenados de italianos e em 1% dos miscigenados (RAMALHO, 1975^{a,b}). Além disso, esse traço hemoglobínico deve constituir um problema igualmente importante em outras regiões do Brasil que também receberam grandes contingentes de imigrantes italianos, como é o caso do Rio Grande do Sul, do Paraná e de Santa Catarina.

Os portadores desse traço talassêmico apresentam alterações hematológicas que podem ser confundidas com as da anemia ferropriva. Assim sendo, a microcitose e a hipocromia apresentadas pelos talassêmicos podem levar o clínico desavisado a prescrever-lhes erroneamente compostos ferrosos, situação, aliás, observada com grande frequência em nosso meio (RAMALHO, 1975^a). Tal conduta terapêutica, além de ineficaz, pode ser prejudicial ao paciente, já que envolve o risco de causar hemossiderose (CROSBY e CONRAD, 1964; CROSBY, 1972; HEINRICH *et al.*, 1973).

Além do aspecto clínico da possibilidade de confusão diagnóstica entre a forma heterozigótica da talassemia beta e a anemia ferropriva, outro aspecto a ser lembrado é o da importância da detecção do portador do traço talassêmico beta em termos de cuidados individuais e, sobretudo, de aconselhamento genético.

Embora os portadores desse traço talassêmico não necessitem, usualmente, de cuidados especiais, em situações de sobrecarga para o organismo, como a representada, por exemplo, pela gravidez, é-lhes indispensável o recebimento de uma suplementação adequada de ácido fólico (WEATHERALL, 1972).

Quanto ao aconselhamento genético, a pesquisa do traço talassêmico beta é obrigatória no futuro cônjuge de um talassêmico heterozigoto, bem como na prole de casais constituídos por um heterozigoto dessa talassemia e um homozigoto normal.

A pesquisa da talassemia beta poderia ser incluída rotineiramente, por exemplo, no exame pré-nupcial de indivíduos de ascendência italiana, podendo submetê-los, inicialmente, a testes simplificados de triagem e, dependendo dos resultados, proceder-se-iam ou não as dosagens bioquímicas. Dessa forma, usando testes simples, econômico e já padronizados em praticamente todos os laboratórios de análise clínicas, estaria sendo prevenido o nascimento de homozigotos da talassemia beta. Cumpre ressaltar que tais homozigotos, portadores de anemia hemolítica grave (talassemia *major* ou anemia de Cooley)

embora não constituam um problema de Saúde Pública entre nós, representam um problema gravíssimo ao nível familiar e individual.

Evolução do conceito de talassemia

O termo *talassemia* foi empregado pela primeira vez por WHIPPLE e BRADFORD (1936) que pretenderam, com esse nome chamar a atenção para a incidência em populações de origem mediterrânea (*talassa*, em grego, mar) de um tipo de anemia infantil, que havia sido descrito anteriormente por COOLEY e LEE (1925) em crianças de ascendência italiana, grega e síria.

Paralelamente a essa designação, entretanto, tal tipo de anemia continuou recebendo a denominação de *anemia de Cooley*, já que coube a esse autor (COOLEY, 1927) demonstrar ser a mesma uma entidade clínica com características próprias, que lhe conferiam individualização dentro do quadro geral das anemias infantis, na época designadas, genericamente, por *anemia de Von Jaksch*.

Segundo COOLEY (1927), tais características compunham um quadro de anemia hemolítica grave, acompanhada de hepatomegalia, esplenomegalia, alterações dos ossos longos e dos ossos do crânio, aumento da resistência osmótica das hemácias e leucocitose.

No mesmo ano da publicação do trabalho de seus colegas norte-americanos, RIETTI (1925) descreveu, na Itália, a ocorrência de uma anemia hemolítica associada a aumento da resistência osmótica das hemácias, que foi por ele designada como *ittero emolítico primitivo*.

Aos casos estudados por RIETTI se juntaram outros, com características similares (GREPPI, 1928; MICHELI, PENATI e MOMIGLIANI, 1935), que levaram ao reconhecimento da existência de uma condição mórbida lembrando a anemia de Cooley. Tais casos, porém, não apresentavam as graves manifestações dessa última, permitindo aos indivíduos afetados sobreviver até a idade adulta. Essa anemia passou a ser conhecida por *síndrome de Rietti, Greppi e Micheli*.

Duas décadas, entretanto, tiveram que decorrer para que se avançasse um pouco mais na compreensão das relações existentes entre a anemia de Cooley e a síndrome de Rietti, Greppi e Micheli. Isto porque, apesar das evidências de parentesco entre as duas entidades clínicas, só depois do trabalho de VALENTINE e NEEL (1944) é que se passou a aceitar a hipótese de que a primeira representava o estado homozigótico / de um gene autossômico parcialmente dominante, enquanto a segunda era a expressão clínica do estado heterozigótico da mesma entidade genética.

Em decorrência disso, passou-se também a considerar a talassemia como uma doença hereditária que no estado homozigótico (*talassemia major*) determinava um quadro de anemia grave, geralmente fatal na infância, enquanto em heterozigose (*talassemia minor* e *talassemia mínima*) podia ocasionar transtornos mais leves, compatíveis com a sobrevivência até a idade adulta.

O impacto causado pelo trabalho de PAULING e colaboradores (1949), demonstrando o comportamento eletroforético anormal da hemoglobina síclêmica teve, como seria de se esperar, repercussão profunda no estudo das hemoglobinas. Isso / provocou, conseqüentemente, a investigação das alterações hemoglobínicas que poderiam estar, eventualmente, vinculadas à talassemia e que permitiriam enquadrá-las dentro das hemoglobinopatias hereditárias.

Os estudos realizados nesse sentido, entretanto, foram aos poucos, definindo a talassemia como um tipo especial de hemoglobinopatia, diferente, por exemplo, da anemia de células falciformes e de outras alterações congêneses.

ITANO, em 1957, após classificar as hemoglobinopatias hereditárias em *estruturais* e por *deficiência de síntese* lançou a hipótese da substituição aminoácida "silenciosa" da fração globínica da hemoglobina talassêmica. Tal substituição seria incapaz de alterar a carga elétrica total da molécula dessa hemoglobina, que apresentaria, então, comportamento eletroforético normal. Esse defeito estrutural inaparente poderia ser o responsável pela inibição seletiva da síntese da he

moglobina A.

INGRAM e STRETTON (1959) também defenderam a hipótese da substituição aminoácida "silenciosa" mas, devido aos progressos ocorridos naqueles dois últimos anos com relação ao conhecimento de composição das hemoglobinas, já puderam suspeitar da localização do eventual defeito estrutural ao nível das cadeias polipeptídicas da fração globínica da hemoglobina.

Uma vez que dois tipos de cadeias peptídicas entravam na composição da fração globínica da hemoglobina A_1 ($Hb A_1 = \alpha_2\beta_2$), o defeito estrutural inaparente e a consequência depressão da síntese poderiam dizer respeito a um tipo ou a outro de cadeia, o que falaria a favor da existência de duas variedades de talassemia. Assim, a talassemia que, inicialmente, era considerada como uma única doença, passaria a designar duas, ou seja, as talassemias alfa e beta, identificando-se o quadro clássico com o dessa última variedade. Aqueles casos de talassemia acompanhados pela produção de hemoglobina H (β_4) poderiam ser, segundo aqueles autores, representantes da variedade α .

Embora, na realidade, nunca tivessem sido demonstradas alterações estruturais na talassemia no que diz respeito a simples substituição aminoácida, o trabalho de INGRAM e STRETTON (1959), teve a grande qualidade de chamar a atenção para a depressão seletiva da síntese de determinado tipo de cadeia polipeptídica da fração globínica da hemoglobina, que ocorre nesse tipo de anemia.

Dessa maneira, o novo conceito de talassemia já estava delineado, sendo o mesmo expresso na posterior definição de FESSAS (1966): "talassemia é o *conjunto de condições* nas quais a síntese de um tipo particular de cadeia polipeptídica da molécula de hemoglobina está diminuída, na ausência de um defeito estrutural demonstrável na mesma". O mecanismo íntimo de tal depressão seletiva, contudo, é desconhecido até hoje, sendo ainda motivo de especulação.

Considerando que na composição das hemoglobinas normais entram seis diferentes tipos de cadeias polipeptídicas de ver-se-iam esperar seis tipos diferentes de talassemia, ou se-

ja, talassemias $\alpha, \beta, \delta, \gamma, \epsilon$ e ξ . Evidentemente, com exceção das duas últimas, todas as outras deveriam ser passíveis de averiguação clínica.

De fato, além das talassemias alfa e beta, mais frequentemente observadas, foram descritos casos de talassemia delta, sobretudo na Grécia (FESSAS e STAMATOYANNOPOULOS, 1962; CHOREMIS *et al.*, 1964), e sugerida a ocorrência de ta-lassemia gama (HAMILTON *et al.*, 1961), a qual veio a ser posteriormente confirmada (KAN *et al.*, 1972).

Outra dedução lógica dizia respeito à possibilidade da existência de variedades de talassemia nas quais mais/ de um tipo de cadeia polipeptídica estaria com sua síntese deprimida.

Realmente, existem vários casos descritos de talassemia delta-beta ou *talassemia F* (ZUELZER *et al.*, 1961 ; FESSAS, 1961; GABUZDA *et al.*, 1964 e WEATHERALL, 1964), bem como de condições relacionadas a esse tipo de talassemia, como é o caso, por exemplo, das *síndromes da hemoglobina Lepore*. Essas últimas representam estados similares à talassemia, já que associadas a defeitos estruturais de hemoglobina, ou seja , a um grupo de transtornos nos quais há a produção de pequenas quantidades de uma hemoglobina anômala, onde a cadeia peptídica alterada nada mais é do que uma fusão das cadeias beta e delta (BAGLIONI, 1962).

Considerando-se esse fato , parece preferível a definição de COMINGS (1970), segundo a qual "talassemia é a depressão hereditária da síntese de uma ou mais cadeias poli-peptídicas da hemoglobina, excluindo-se a diminuição do ritmo de sínteses de cadeias peptídicas anormais, que é observada em algumas hemoglobinopatias caracterizadas por uma simples substituição aminoácida".

Essa definição , embora mais ampla que a de FESSAS (1966), não conceitua, contudo, com precisão, o que é talassemia. De fato, existe uma condição conhecida por *persistência hereditária da hemoglobina fetal* que se caracteriza por ní-

veis elevados de hemoglobina fetal na idade adulta, sem apresentar as alterações eritrocitárias características da talassemia. Por outro lado, apesar da síntese de cadeias β e δ estar deprimida em diferentes graus nas diversas variantes dessa condição, ela não é considerada talassemia, justamente pelo fato de não apresentar as características hematológicas peculiares à mesma, características estas que serão discutidas, oportunamente, ainda neste capítulo.

Um outro exemplo no mesmo sentido pode ser dado valendo-se das *síndromes da hemoglobina Lepore*, as quais são classificadas por uns, como tipos especiais de talassemia e por outros como estados similares à talassemia. Tais síndromes apresentam as características hematológicas da talassemia embora estejam associadas à produção de cadeias polipeptídicas estruturalmente alteradas.

Do exposto, parece plausível considerar a existência de dois efeitos distintos na talassemia:

- a) Efeito primário - depressão parcial ou total da síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina, sem alteração estrutural evidente.
- b) Efeito secundário-produção de alterações talassêmicas nos eritrócitos.

Assim, nas *síndromes da hemoglobina Lepore* não se observa, a rigor o efeito primário, enquanto que na *persistência hereditária da hemoglobina fetal* o que não se observa é o efeito secundário.

Por outro lado, exigir a presença simultânea dos dois efeitos para considerar uma condição hereditária como talassemia, complica bastante o problema, uma vez que as alterações hematológicas são poucas nítidas na talassemia delta, enquanto que a talassemia alfa condiciona o aparecimento de hemoglobinas francamente anômalas (hemoglobina H e hemoglobina/de Bart).

NATHAN e GUNN (1966), apontando um aspecto interessante do problema das talassemias, propuseram uma modificação muito sutil do conceito de talassemia a qual, segundo eles, seria apenas o resultado de um desequilíbrio da síntese de hemoglobinas. Assim, havendo diminuição da síntese de um tipo / de cadeia peptídica da hemoglobina, é lógico que as cadeias não afetadas, que deveriam se combinar com o referido tipo para formar a fração globínica normal, iriam se acumular, o que levaria à formação de maiores quantidades de hemoglobinas diferentes da hemoglobina A_1 , bem como à formação de corpos de inclusão. Estes, que nada mais seriam do que o resultado da precipitação dessas hemoglobinas diferentes, poderiam ser responsáveis pela maior destruição dos eritrócitos, ou seja pela hemólise observada. Segundo NATHAN e GUNN (1966), portanto, as manifestações talassêmicas seriam devidas não apenas à sub-produção da hemoglobina A_1 , mas sobretudo à super-produção de determinados tipos de hemoglobina. Assim, por exemplo, no caso da inibição da síntese de cadeias alfa, haveria na vida fetal um excesso de cadeias gama em relação a cadeias alfa, com formação de tetrâmeros γ_4 , ou seja, da hemoglobina de Bart. Já no adulto, o excesso de cadeias beta levaria à formação de hemoglobina H (β_4), que é instável e se precipita, formando corpos de inclusão. Aqui cumpre assinalar que já se provou que tais corpos de inclusão formados por precipitados de cadeias beta aumentam a permeabilidade da membrana dos eritrócitos aos cátions (NATHAN *et al.*, 1969) tornando também estas células mais sujeitas à captação pelo sistema retículo-endotelial do baço e outros órgãos (NATHAN e GUNN, 1966; RIFKIND, 1966; WENNBERG e WEISS, 1968). No mesmo sentido, as inclusões formadas por outros tipos de precipitados hemoglobínicos apresentam efeitos similares (JACOB *et al.*, 1968).

Apesar disso é conveniente lembrar que a inibição da síntese de cadeias beta não provoca grande excesso de cadeia alfa e conseqüente formação de tetrâmeros α_4 na mesma proporção em que são formados, na situação anterior, os tetrâmeros γ_4 e β_4 .

Para explicar esse último fato, BAGLIONI e COLOMBO

(1964) sugeriram, com base em algumas evidências experimentais, que as cadeias beta deveriam ser importantes na remoção das cadeias alfa dos ribossomos e, por isso, nunca ocorreria grande acúmulo dessas últimas, na vigência de depressão da síntese das primeiras. FESSAS (1963), no entanto, sugeriu que os corpos de inclusão por ele demonstrados nos eritroblastos e eritrócitos de talassêmicos beta poderiam ser precipitados insolúveis de cadeias alfa, o que foi, de fato, confirmado posteriormente (FESSAS *et al.*, 1968).

Em resumo, as definições clássicas expressam, apenas, o que talvez seja o defeito fundamental das talassemias, isto é, diminuição da síntese de um ou mais tipos de cadeias peptídicas da hemoglobina, na ausência de alteração estrutural demonstrável nas mesmas. Por outro lado, fica patente que o conceito de talassemia sofreu uma evolução, passando de simples nome de uma entidade mórbida para a denominação de um conjunto de entidades genético-clínicas distintas, que mereceram de WEATHERALL (1967) a designação mais genérica de *síndromes talassêmicas*.

De qualquer modo, esse processo evolutivo continua visto que ainda não se dispõe, no momento, de uma conceituação precisa de tão complexas entidades, que continuam revelando novas e inesperadas facetas com o prosseguir das investigações.

Bases moleculares das talassemias

De acordo com HARRIS (1973), dois tipos de hipóteses podem ser feitas a respeito da natureza das mutações que levam à síntese defeituosa das cadeias globínicas nas talassemias. Uma, é que as mutações ocorrem no próprio *locus* estrutural que determina a sequência aminoácida da cadeia afetada no seu ritmo de síntese. Nesse caso, os genes da talassemia seriam alelos dos que determinam as variantes estruturalmente / alteradas da mesma cadeia. A outra hipótese é que a mutação afeta um *locus* diferente, o qual está, no entanto, diretamente envolvido na regulação do ritmo de síntese da referida ca-

deia.

Importantes informações a respeito dessa questão podem ser obtidas por intermédio do estudo de filhos de indivíduos heterozigotos da talassemia e de uma hemoglobinopatia estrutural afetando a mesma cadeia, ou seja, de portadores de uma *talassemia interativa*. Considerável número de famílias nessa situação foi estudado e está claro que os filhos desses indivíduos "duplamente" heterozigotos ou recebem o gene da talassemia ou o gene da variante estrutural, mas nunca os dois, ou nenhum. Isso sugere que os genes da talassemia e da hemoglobinopatia estrutural ocupam o mesmo *locus*, isto é, são alelos, ou, se ocuparem *locis* separados, estes devem estar completamente ligados.

Se o gene da talassemia beta, por exemplo, ocupa, de fato, um *locus* diferente do estrutural da cadeia beta, mas completamente ligado a ele, as manifestações do indivíduo "duplamente" heterozigoto, como, por exemplo, do portador da talassemia de células falciformes, indicam, claramente, que o gene da talassemia pode, apenas, reprimir a atividade do *locus* estrutural localizado no mesmo cromossomo, já que o ritmo de síntese da cadeia beta estruturalmente alterada (β^S) não está afetado no mesmo grau.

Segundo essa hipótese, o *locus* da talassemia deve corresponder, de acordo com o modelo de Jacob e Monod, a um *operador*, que estaria especificamente relacionado ao controle da atividade do gene estrutural adjacente. Deve ser notado que, se a síntese de cadeias delta não está reprimida na talassemia A_2 , mas, pelo contrário, estimulada, seria necessário supor que os *loci* estruturais beta e delta, completamente ligados, não estão sob o controle do mesmo operador, não constituindo, assim, um *operon*.

Se, por outro lado, os genes da talassemias representam mutações que ocupam o mesmo *locus* que determina a estrutura da cadeia afetada em sua síntese, resta saber, exatamente, como tais mutantes condicionam tal depressão de síntese.

O desenvolvimento de um método de separação cromatográfica das cadeias peptídicas da fração globínica da hemoglobi

na por CLEGG, NAUGHTON e WEATHERALL (1965) permitiu o estudo da incorporação de aminoácidos marcados em cadeias isoladas, mediante incubação celular *in vitro* (WEATHERALL, CLEGG e NAUGHTON, 1965). Os métodos radiocromatográficos passaram, desde então, a ser usados para o diagnóstico das talassemias alfa (CLEGG e WEATHERALL, 1967; KAN *et al.*, 1968), beta (WEATHERALL, CLEGG e NAUGHTON, 1966; BANK e MARKS, 1966; KAN e NATHAN, 1968) e gama (KAN *et al.*, 1972). Diga-se, de passagem, que tais métodos tornaram possível o diagnóstico da talassemia beta heterozigótica/ao nascimento, mediante estudo do sangue do cordão umbilical (KAN e NATHAN, 1968).

De qualquer modo, essas técnicas de incubação, embora realizadas *in vitro* e relacionadas apenas a vestígios da síntese proteica dos reticulócitos, permitiram uma evidência mais direta da redução da síntese de cadeias alfa e beta nas talassemias alfa e beta. Tal fato, como seria de se esperar, incentivou, ainda mais, as investigações a respeito das bases moleculares de tal depressão de síntese. Com relação a esse assunto, pensou-se, inicialmente, numa deficiência numérica de ribossomos nos reticulócitos talassêmicos. Entretanto, como tal deficiência só poderia explicar a diminuição da síntese da hemoglobina total e não da de determinados tipos de cadeias peptídicas em particular, as pesquisas de BURKA e MARKS (1963) nesse sentido tiveram o resultado que seria de se esperar, ou seja, a constatação de um número normal de ribossomos nos reticulócitos talassêmicos.

Alem disso, BANK e MARKS (1966) demonstraram que os ribossomos dos eritroblastos talassêmicos também funcionavam normalmente, pelo menos no que diz respeito à sua resposta a um ARN mensageiro artificial, do tipo ácido poliuridílico. Trabalhos posteriores vieram a confirmar a inexistência de alterações da função ribossômica na talassemia (GILBERT *et al.*, 1970; NIENHUIS *et al.*, 1971).

INGRAM (1964) havia proposto a hipótese de que o defeito fundamental nessa hemoglobinopatia poderia ser a produção de ARNs mensageiros defeituosos comandando a síntese de cadeias alfa ou beta. De fato, as pesquisas dirigidas ao esclarecimento

dessa hipótese reconheceram a existência de alterações no ARN mensageiro dos reticulócitos talassêmicos (BENZ e FORGET, 1971; NIENHUIS e ANDERSON, 1971; NATTA *et al.*, 1973), embora não pudessem distinguir entre a produção de pequena quantidade de ARN mensageiro normal e a produção quantitativamente normal / ou aumentada de um ARN mensageiro instável. Segundo NATHAN (1972), embora não se possa, no momento, optar por nenhuma / dessas duas alternativas, existem mais indicações de que o de feito primário na talassemia seja, realmente, a produção dimi nuida de ARN mensageiro normal. Trabalhos recentes estão tra zendo maiores evidências a favor de tal deficiência quan titativa do ARN mensageiro na síntese das cadeias peptídicas da hemoglobina do talassêmico, o que está promovendo, aos poucos a transferência das pesquisas bioquímicas a respeito das ta - lassemias, do citoplasma para o núcleo da célula.

Os interessados em maiores detalhes a respeito das bases moleculares das talassemias alfa e beta poderão encon - trar um boa revisão do assunto no trabalho de WEATHERALL (1978)

Talassemias alfa

As talassemias alfa têm sido objeto de intensas in vestigações que estão reformulando sua sub-classificação. Ini cialmente, considerava-se a existência de apenas um *locus* ge - nético para a cadeia alfa, com apenas um alelo para a talasse mi a alfa, o qual poderia se manifestar em heterozigose ou em homozigose, sendo esta última condição incompatível com a vi - da fetal. A *doença da hemoglobina H* era considerada como per tencente ao quadro geral das talassemias alfa, pelo fato de incluir na sua fisiopatogenia, entre outros fatores, a presen ça do gene da talassemia alfa.

WASI e colaboradores (1964) propuseram a existên - cia de dois alelos para a talassemia alfa, que poderiam ser representados por α^T1 e α^T2 , causando o primeiro inibição / completa da síntese de cadeias alfa e o segundo inibição ape - nas parcial da mesma. O gene α^T1 em homozigose seria causa de hidropsia fetal, com morte intra-uterina e a presença dos ge -

nes α^T_1 e α^T_2 , simultaneamente, causaria a *doença da hemoglobina H*.

LEHMANN e CARREL (1968), por outro lado, propuseram a hipótese de que a variação de gravidade observada nas talassemias alfa poderia ser devida à existência de dois *loci* genéticos ligados, os quais determinaram a produção de cadeias alfa. Com base nessa hipótese, LEHMANN (1970) previu a possibilidade teórica de nove genótipos condicionadores de *talassemia alfa*. Na figura 6 foram representadas as combinações entre os *loci* gênicos propostos por LEHMANN e CARREL (1968) para a determinação desses genótipos.

Como já vimos ao estudar as hemoglobinas normais, existem evidências de haver, em algumas pessoas, dois *loci* genéticos para as cadeias alfa. De qualquer forma, adotaremos/ no presente trabalho a nomenclatura usada por WEATHERALL (1978), falando em alelos talassêmicos alfa 1 e alfa 2. Falaremos também, no gene da hemoglobina Constant Spring, que é uma variante estrutural de cadeia alfa que apresenta baixo / ritmo de síntese e que determina, conseqüentemente, alterações clínicas de talassemia alfa.

Síndrome de hidropsia fetal por hemoglobina de Bart

O defeito grave na síntese de cadeias alfa que é observado nessa forma de talassemia a torna incompatível com a sobrevivência, levando à morte fetal ou neonatal, apresentando a criança hidropsia generalizada, hepatomegalia, esplenomegalia e altos níveis de hemoglobina de Bart (LIE-INJO *et al.*, 1962; BANWELL e STRICKLAND, 1964; DIAMOND *et al.*, 1965; PEARSON *et al.*, 1965; KAN *et al.*, 1967; POOTRAKUL *et al.*, 1967; TODD *et al.*, 1967; BOON, 1973). A morte parece ser decorrente de hipóxia, visto que a hemoglobina de Bart é um pigmento respiratório ineficiente para fornecer oxigênio aos tecidos em condições fisiológicas (HORTON *et al.*, 1962).

O principal componente hemoglobínico das crianças com essa patologia é a hemoglobina de Bart, observando-se, ain

da, pequenas quantidades de hemoglobinas H e Portland. As hemoglobinas A₁ e F não são sintetizadas, uma vez que as cadeias alfa não são produzidas.

Segundo WASI e colaboradores (1969), a hepatomegalia dos portadores de hidropsia fetal por hemoglobina de Bart é muito mais acentuada do que a esplenomegalia, ao contrário do que ocorre nos portadores de hidropsia fetal por isoimunização por incompatibilidade sangüínea. Os mesmos autores assinalam que cerca da metade das mães de tais indivíduos desenvolvem toxemia gravídica durante a gestação desses casos.

A placenta do talassêmico alfa, por sua vez, apresenta características francamente patológicas, sendo maior e mais grossa do que o normal, além de ser bastante friável (BANWELL e STRICKLAND, 1964; DIAMOND *et al.*, 1965; WASI *et al.*, 1969).

O estudo dos genitores dessas crianças indica que ambos são portadores do gene da talassemia alfa-1.

Doença da hemoglobina H

A chamada doença da hemoglobina H, estudada dentro do panorama geral das talassemias alfa, se apresenta em quadros clínicos bastante variáveis. As manifestações mais freqüentes são aquelas decorrentes de uma anemia prolongada, sobretudo astenia intensa, podendo ocorrer esplenomegalia (RIGAS *et al.*, 1955; MINNICH *et al.*, 1958; VELLA *et al.*, 1958; FESSAS, 1959; WOODROW *et al.*, 1964; WEATHERAL, 1978). Os dados laboratoriais mais característicos dessa hemoglobinopatia são a presença da hemoglobina H em níveis de 5% a 30% da hemoglobina total e os corpos de inclusão nas hemácias, identificáveis após incubação dessas células com azul cresil brilhante (GOUTTAS *et al.*, 1955).

Os portadores da doença da hemoglobina H podem apresentar a combinação dos genes da talassemia alfa 1 e 2

ou, senão, a interação entre os genes da talassemia alfa 1 e da hemoglobina Constant Spring (WEATHERALL, 1978).

Traços talassêmicos alfa 1 e 2

Embora algumas crianças normais possam apresentar ao nascimento pequenas quantidades de hemoglobina de Bart (FESSAS e MASTROKALOS, 1959; VELLA, 1959; DANCE e HUHENS, 1962 WEATHERALL, 1963), a presença da mesma em níveis mais elevados constitui a melhor indicação para o diagnóstico do traço talassêmico alfa. É por isso que o período neonatal é o mais propício para o diagnóstico dessa forma de talassemia (MALAMOS *et al.*, 1962), que é dificilmente diagnosticável em indivíduos hemoglobicamente adultos, após o desaparecimento da hemoglobina de Bart.

Segundo WEATHERALL (1978), os portadores do traço talassêmico alfa 1 são reconhecidos, ao nascimento, por apresentarem níveis elevados de hemoglobina de Bart (5% a 15% da hemoglobina total). Com a maturação das hemoglobinas, a hemoglobina de Bart desaparece e não é substituída por quantidades similares de hemoglobina H, embora essa hemoglobina possa ser encontrada, sob a forma de corpos de inclusão, em algumas hemácias dos portadores do traço talassêmico alfa 1 .

Na vida adulta esses indivíduos apresentam valores baixos do volume corpuscular médio das hemácias (V.C.M.) e da hemoglobina corpuscular média (Hb. C. M.), associados ao exame eletroforético normal. Os estudos radiocromatográficos revelam uma deficiência de síntese das cadeias alfa, apresentando a razão α/β valores em torno de 0,7.

SCHMAIER e colaboradores (1973) demonstraram a eficiência da determinação eletrônica do V.C.M. e da Hb.C.M. como testes de triagem do traço talassêmico alfa no período neonatal. Segundo esses autores, um V.C.M. menor ou igual a $94 \mu^3$ e uma Hb.C.M. menor ou igual a 29 pg, no recém-nascido, devem ser considerados anormais, merecendo a criança um estudo eletroforético das suas hemoglobinas. A presença da hemo-

globina de Bart em quantidades apreciáveis (5% a 15%) estabelece o diagnóstico de traço talassêmico alfa 1 .

Os portadores do traço talassêmico alfa 2 apresentam níveis mais baixos de hemoglobina de Bart ao nascimento, em torno de 1% a 3% da hemoglobina total (WEATHERALL 1978). Na idade adulta, manifestam alterações hematológicas mínimas, sendo possível evidenciar, pelos exames radiocromatográficos, uma pequena deficiência na síntese das cadeias alfa, mostrando a razão α/β valores em torno de 0,8.

Hemoglobina Constant Spring

A hemoglobina Constant Spring apresenta uma alteração estrutural nas cadeias alfa, representada pela adição de 31 aminoácidos. A sua síntese é bastante ineficiente, do que resulta um quadro clínico semelhante ao da talassemia α .

Os homozigotos do gene dessa hemoglobina apresentam o quadro típico de uma talassemia leve, revelando, ao exame eletroforético, cerca de 5% de hemoglobina Constant Spring.

Já os heterozigotos são clinicamente normais, apresentando um baixíssimo percentual de hemoglobina anômala em torno de 0,5% da hemoglobina total.

Quando se utiliza a eletroforese em gel de amido, a hemoglobina Constant Spring aparece, em pH alcalino, como uma banda de migração lenta, localizada entre o ponto de aplicação e a hemoglobina A₂.

A interação entre os genes da hemoglobina Constant Spring e da talassemia alfa 1 é responsável por cerca de 40% dos casos de doença da hemoglobina H observados na Tailândia e, possivelmente, na Malásia. Essa interação também só foi descrita na Grécia e em nenhuma outra parte do mundo (WEATHERALL, 1978).

A hemoglobina Constant Spring é freqüente nas populações da Península Malaia e, sobretudo, da Tailândia, on

de chega a atingir a prevalência de aproximadamente 4% (WASI *et al.*, 1974).

Talassemias beta

Como já vimos anteriormente, os genes das talassemias beta determinam uma depressão parcial ou total da síntese das cadeias beta da hemoglobina. Os genes que deprimem apenas parcialmente a síntese das cadeias beta são designados por alelos β^{T+} ou , segundo a nomenclatura adotada pelos autores de língua inglesa, alelos β^+ - Thal. Já aqueles que suprimem a síntese dessas cadeias , são designados por alelos β^{To} ou β^0 - Thal. Esses últimos alelos são tipicamente encontrados nas populações de algumas regiões do globo, como do Norte da Itália e do Sudeste Asiático.

Clinicamente , as talassemias beta podem aparecer sob as formas *major*, *intermédia*, *minor* e *mínima*.

Os doentes com talassemia *major* ou *anemia de Cooley* apresentam anemia hemolítica grave e são sempre portadores de dois alelos talassêmicos beta (genótipos $\beta^{To}\beta^{To}$, $\beta^{T+}\beta^{T+}$ ou $\beta^{To}\beta^{T+}$). Já os pacientes com talassemia *intermédia* apresentam anemia hemolítica moderada ou leve e podem ser homozigotos de determinados tipos de genes β^{T+} , como, por exemplo, do gene β^{T+} (Negro), ou, senão, podem ser heterozigotos $\beta^{To}\beta$. Os indivíduos com talassemia *mínima*, que são clinicamente assintomáticos, e os com talassemia *minor*, que apresentam anemia hipocrômica e microcítica, são sempre heterozigotos de genes das talassemias beta (genótipos $\beta^{T+}\beta$ e $\beta^{To}\beta$). O que diferencia, portanto, as formas *minor* e *mínima* de talassemia beta é a presença ou não de anemia. Assim, por exemplo, uma paciente com talassemia *mínima* pode desenvolver anemia durante a gravidez, passando a apresentar talassemia *minor*.

Anemia de Cooley

Os pacientes com a anemia de Cooley apresentam alterações clínicas decorrentes de anemia hemolítica crônica grave, com repercussão acentuada sobre o crescimento e o desenvolvimento, hepatomegalia, esplenomegalia e alterações ósseas típicas.

Pelo fato de a síntese da hemoglobina A_1 nessa condição mórbida estar deprimida, a talassemia *major* pode ser classificada como uma anemia hipocrônica. Realmente, é possível observar uma hipocromia notável nos esfregaços sanguíneos, com numerosas hemácias apresentando quantidade muito pequena de hemoglobina.

Como já vimos, vários tipos de genes mutantes (alelos talassêmicos) podem causar a talassemia *major* e, embora todos eles provoquem depressão da síntese de cadeias beta da fração globínica da hemoglobina, o grau em que isso ocorre parece variar consideravelmente de um gene mutante para outro (HARRIS, 1973). Já foi citado o fato de que as variantes brandas da talassemia beta são mais frequentes em negróides (SCHWARTZ, 1969; HAMILTON e SCHWARTZ, 1970; BRAVERMAN *et al.*, 1971) e, mesmo entre os caucasóides, também é possível observar nítida variação da sua gravidade, embora ela seja, geralmente, maior do que a observada entre os negróides. Estudos bioquímicos realizados em pacientes talassêmicos italianos de Ferrara e da Sicília, por exemplo, demonstraram que a sua anormalidade básica consistia, respectivamente, na ausência (depressão completa) e na simples diminuição (depressão parcial) da síntese das cadeias beta da fração globínica da hemoglobina (CONCONI *et al.*, 1970).

Embora a talassemia *major* seja considerada uma anemia hipocrônica, ela também tem que ser classificada dentre as anemia hemolíticas, pelas suas manifestações e, principalmente, pelo fato de os casos que a apresentam mostrarem, a despeito da hiperplasia eritróide da medula óssea, baixa taxa de hemácias nos hemogramas (1 a 2 milhões por mm^3 de sangue). Realmente, na talassemia *major*, a anemia hipocrônica é acompanhada por um aumento ineficiente da eritropoiese (STURCEON e FINCH, 1957) e rápida destruição dos eritrócitos re-

cêm-formados (GABUZDA *et al.*, 1963), o que limita acentuadamente a capacidade compensatória da medula óssea, mesmo estando seus depósitos de ferro aumentados.

A fisiopatogenia dessa anemia hemolítica só pôde ser vislumbrada depois que se descobriu que os corpos de inclusão, visíveis com microscópio de fase e coráveis com violeta de metila, presentes nos eritroblastos e eritrócitos de pacientes com talassemia *major*, são precipitados insolúveis de cadeias alfa (FESSAS, 1973; FESSAS *et al.*, 1966).

CONCONI e colaboradores (1970), usando técnica radiocromatográfica, também comprovaram a ocorrência de um excesso de cadeias alfa em lisados de reticulócitos de talassêmicos beta homozigotos. Observaram, entretanto, que o excesso de cadeias alfa só dizia respeito aquelas cadeias marcadas radioativamente, ou seja, às recém-sintetizadas. Concluíram, portanto, que o excesso de cadeias alfa não se acumula totalmente no citoplasma da célula talassêmica, sendo removido de alguma maneira. De fato, se tais cadeias não fossem removidas, deveria ser encontrado, também, um grande excesso de cadeias alfa não radioativas e, portanto, previamente sintetizadas. Pesquisando o destino das cadeias alfa excedentes, esses autores encontraram duas vias distintas de trocas:

- a) através de um processo rápido, ocorre troca entre as cadeias alfa recém-sintetizadas e as previamente existentes e constituintes das hemoglobinas;
- b) através de um processo mais lento, ocorre troca entre as cadeias alfa recém-sintetizadas e aquelas previamente existentes e constituintes de um "pool" localizado, provavelmente, no retículo endoplasmático dos reticulócitos talassêmicos. Tal retículo se veria sobrecarregado pelo excesso de cadeias alfa retiradas do citoplasma, o que causaria alteração progressiva de suas propriedades físico-químicas. Com o tempo, o retículo endoplasmático desapareceria da célula e, juntamente com ele, as cadeias alfa a ele ligadas.

BANK e colaboradores (1969), entretanto, encontra

evidências de haver digestão proteolítica do excesso de cadeias alfa na talassemia beta.

Aqui é interessante, ainda, mencionar o fato de se ter encontrado uma correlação linear negativa entre o excesso de cadeias alfa e a sobrevivência das hemácias talassêmicas (VIGI *et al.*, 1969). Assim sendo, quanto maior o excesso de cadeias alfa, menor a sobrevivência das hemácias, indicando que o excesso de cadeias alfa é, realmente, um fator importante na patogenia das manifestações hemolíticas presentes na talassemia beta.

Nos pacientes não esplenectomizados é possível observar grande quantidade de eritrócitos gutiformes, com corpos de inclusão acumulados na sua parte mais delgada (NATHAN e GUNN, 1966).

Após esplenectomia, não são observadas mais as células gutiformes e os eritrócitos apresentam numerosos vacúolos que contêm inclusões de cadeias alfa parcialmente digeridas (KENT *et al.*, 1966). Esses achados indicam que o baço tem atuação sobre as hemácias que possuem corpos de inclusão, deformando-as e tornando-as gutiformes, tendo-se sugerido que a deformação das hemácias seria decorrente de uma forte atração exercida pelo baço sobre as inclusões nelas contidas (SLATER *et al.*, 1968; WENNBERG e WEISS, 1968).

Além de estarem associados com a deformação dos eritrócitos, os corpos de inclusão causam alteração na permeabilidade de membrana dessas células, permeabilidade essa acentuadamente aumentada a favor do sódio (CIVIDALLI e RUSSELL, 1970) e do potássio (NATHAN e GUNN, 1966). NATHAN *et al.* (1969) observaram que a alteração da membrana celular está associada ao número de inclusões.

De acordo com o esperado, os esfregaços sanguíneos dos casos com essa anemia revelam notável anisopoiquilócitose, com muitos micrócitos e, ocasionalmente, macrócitos, além de alvócitos em número variável, reticulócitos, em torno de 5% , e grande quantidade de eritroblastos.

O quadro hemoglobínico, por seu lado, caracteri-

za-se por aumento da hemoglobina fetal, cujo nível oscila entre 30% e 60% da hemoglobina total, embora já tenham sido descritos casos com níveis inferiores a 10% e superiores a 90% (VECCHIO, 1948; SINGER *et al.*, 1951; RICH, 1952; ROCHE *et al.*, 1953; WHITE e BEAVEN, 1959; WEATHERALL e VELLA, 1960), bem como por porcentagem variável de hemoglobina A₂, que pode se apresentar normal ou aumentada (CARCASSI *et al.*, 1957; KUNKEL *et al.*, 1957; MARINONE e BERNASCONI, 1957; WEATHERALL e VELLA 1960; WENT e MacIVER, 1961).

Uma alteração hematológica importante nessa anemia é o notável aumento da resistência osmótica das hemácias, podendo-se observar em alguns casos, segundo WEATHERALL (1967), hemólise incompleta em solução salina a 0,1%.

As alterações ósseas observadas na anemia de Cooley são devidas, fundamentalmente, à hiperatividade e hiper-crescimento da medula óssea. O aumento da pressão intra-medular causa uma atrofia das camadas esponjosas e cortical dos ossos. MOSELEY (1962) salienta que na talassemia *major* as alterações ósseas são, geralmente, mais acentuadas do que as usualmente observadas em outras anemias hemolíticas crônicas, tais como a anemia de células falciformes e a anemia esferocítica.

Embora as alterações ósseas não sejam muito acentuadas no primeiro ano de vida, elas podem ser evidenciadas / em idades tão precoces como, por exemplo, 18 semanas, aparecendo os primeiros sinais radiológicos em ossos pequenos, particularmente, metacarpianos e metatarsianos. No crânio, a hiperplasia medular provoca um alargamento do espaço diploe, sendo a tábua externa atrofiada e deslocada externamente. Ocasionalmente, as trabéculas do diploe assumem posição perpendicular à tábua interna, adquirindo um aspecto radindo, referido como "em pelo erizado". Outros sinais de grande valor diagnóstico na anemia de Cooley são o retardo da pneumatização dos seios aéreos e o crescimento exagerado do maxilar superior. Nos pacientes que sobrevivem mais tempo, aparece pronunciada/ regressão das alterações do esqueleto periférico, mas as alterações cranianas persistem e podem até se acentuar (MOSELEY,

1962; ROY *et al.*, 1971).

O prognóstico dessa forma de talassemia é mau , vindo o paciente a falecer, geralmente, ainda na infância . Com o emprego de transfusão sangüínea repetidas e tratamento com antibióticos, muitos pacientes chegam à puberdade , mas irão apresentar complicações sideróticas viscerais graves, tais como lesões cardíacas , endócrinas e hepáticas.

Traço talassêmico beta

A expressão clínica do traço talassêmico beta é, como já tivemos a oportunidade de comentar, bastante variável, podendo uma porcentagem pequena dos seus casos revelar anemia relativamente grave, esplenomegalia, hepatomegalia e alterações ósseas (*talassemia intermédia*), enquanto que outros casos, pelo contrário, se apresentam oligossintomáticos (*talassemia minor*) ou totalmente assintomáticos (*talassemia mínima*). Cumpre ressaltar, no entanto, que independentemente do quadro clínico, os heterozigotos do genes das talassemias beta são passíveis de fácil reconhecimento laboratorial. Constituem exceção a essa regra, evidentemente, os raros portadores de genes "silenciosos" das talassemia beta (BERNINI *et al.*, 1962; BEAVEN *et al.*, 1964; WEATHERALL, 1964; SCHWARTZ, 1969; WEATHERALL, 1978).

De qualquer modo, quando se analisa apenas a forma mais comum dessas talassemias, verifica-se que o quadro clínico é pobre em alterações. Algumas pessoas afetadas apresentam manifestações clínicas decorrentes de anemia leve sendo um achado relativamente freqüente as crises dolorosas no abdome superior, que podem estar associadas a uma peri-esplenite ou a uma litíase biliar. A esplenomegalia moderada constitui, também, um achado relativamente freqüente .

A maioria dos casos de traço talassêmico beta evoluem sem complicações, embora em alguns exista a tendência à litíase biliar e à formação de úlceras crônicas nas pernas, podendo ocorrer, ainda, anemia intensa durante a

gravidez.

Com relação a esse último aspecto, RATTEN e BEISCHER (1972), trabalhando na Austrália, encontraram 28% de talassêmicos beta entre 568 mulheres grávidas cuja hemoglobina total era inferior a 9,2 g/100 ml.

Segundo WEATHERALL (1978), a maioria dos portadores do traço talassêmico beta não apresenta anemia ao exame hematológico, sendo o achado mais característico uma elevação moderada da taxa de hemácias, com diminuição da hemoglobina corpuscular média e redução, em nível variável, do volume corpuscular médio das hemácias. O esfregaço sanguíneo, por seu lado, revela, na maioria dos casos, microcitose moderada e poiquilocitose, com leve hipocromia. Os alvéolos estão, geralmente, presentes, mas a sua ausência não tem valor diagnóstico. A resistência osmótica das hemácias está sempre aumentada, mesmo quando as demais alterações hematológicas são mínimas.

Quanto ao quadro hemoglobínico, o sinal mais importante ainda é aquele verificado por KUNKEL *et al* (1957), isto é, de que nessa forma de talassemia há um aumento constante do percentual da hemoglobina A₂. Segundo WEATHERALL (1978), a maioria dos talassêmicos beta heterozigotos apresentam níveis de hemoglobina A₂ variando entre 3,5% e 7% da hemoglobina total. No concernente à hemoglobina fetal, observa-se que o seu nível é variável nessa forma de talassemia, verificando-se, geralmente, percentuais normais ou ligeiramente aumentados, raramente ultrapassando o valor de 5% da hemoglobina total (BEAVEN *et al.*, 1961; WEATHERALL, 1964, 1967, 1974, 1978). Os casos de talassemia beta heterozigótica que, ao lado da hemoglobina A₂ aumentada, revelam aumentos constantes e significativos da hemoglobina fetal, da ordem de 5% a 15% da hemoglobina total, definem a chamada variante A₂F de talassemia beta (SCHOKKER *et al.*, 1966).

Em termos de tratamento, o único cuidado indispensável aos portadores do traço talassêmico beta é a administração de ácido fólico em situações de sobrecarga para o or-

ganismo, como as representadas, por exemplo, pela gravidez e pela lactação. Seria desnecessário existir, por outro lado, na conveniência de se evitar a confusão diagnóstica entre o traço talassêmico beta e a anemia ferropriva.

Reconhecimento laboratorial dos portadores das talassemias beta.

Os doentes com a anemia de Cooley apresentam um quadro clínico bastante típico, de forma que os exames laboratoriais são feitos apenas para confirmação diagnóstica. Dentre esses exames, são particularmente úteis, além do hemograma, a prova de resistência globular osmótica, que se apresenta sempre aumentada, e a determinação da hemoglobina fetal, que aparece sempre em percentuais elevados na vida adulta.

A determinação da hemoglobina fetal pode ser feita por intermédio da eletroforese de hemoglobinas ou de sua dosagem bioquímica.

A eletroforese de hemoglobinas pode ser feita com excelentes resultados em fitas de acetato de celulose, usando-se o tampão tris-glicina, pH 9,1, de acordo com a técnica descrita no capítulo da hemoglobina S. Pode-se usar como padrão, no caso, o hemolisado preparado a partir do sangue de um recém-nascido.

Se o paciente com anemia de Cooley possuir pelo menos um alelo β^{T+} (genótipos $\beta^{T+}\beta^{T+}$ ou $\beta^{T+}\beta^{To}$), a sua ele-troforese de hemoglobinas revelará a presença das frações A_1 F e A_2 . Já se o seu genótipo for $\beta^{To}\beta^{To}$, a sua eletroforese de hemoglobinas revelará a presença, apenas, das fra-ções F e A_2 .

A dosagem bioquímica da hemoglobina fetal é feita por intermédio de métodos que se valem da sua propriedade de maior resistência ao hidróxido de sódio, como é o caso dos métodos de SINGER *et al* (1951) e de BETKE *et al* (1959), que passaremos a descrever.

Dosagem da hemoglobina fetal

Reagentes: Solução de hidróxido de sódio 1,2 N
 Solução aquosa saturada de sulfato de amônia
 Solução de Drabkins

Técnica:

Adiciona-se 0,3 ml da solução de hemoglobinas a 10% a 5,7 ml da solução de Drabkins. A solução de cianometemoglobina assim obtida é usada para o teste e para o padrão. Para um tubo teste, pipetam-se 2,8 ml da solução de cianometemoglobina e adiciona-se 0,2 ml de solução de hidróxido de sódio 1,2 N. A solução é agitada delicadamente durante 2 minutos cronometrados. Exatamente após esse tempo, faz-se a dissolução completa de 2,0 ml de solução aquosa saturada de sulfato de amônia. Deixa-se em repouso durante, pelo menos, 5 minutos e depois filtra-se através de papel Whatmann 42.

Prepara-se o padrão diluindo 1,4 ml da solução de cianometemoglobina em 8,6 ml de água bidestilada.

As absorbâncias do padrão e do teste são lidas em um espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 540 nm, usando-se como *branco* o reagente de Drabkins.

$$\text{Cálculo: Porcentagem de Hb F} = \frac{\text{Absorbância do teste} \times 100}{\text{Absorbância do padrão} \times 4}$$

O diagnóstico de traço talassêmico beta é dado pelo conjunto das seguintes alterações:

- A- Diminuição da hemoglobina corpuscular média (Hb.C.M.)
- B- Diminuição do volume corpuscular médio das hemácias (V.C.M.)
- C- Alterações da morfologia da série vermelha
- D- Aumento da resistência globular osmótica
- E- Aumento do percentual da hemoglobina A₂, acompanhado ou

não de aumento percentual da Hb. F .

A diminuição da Hb.C.M. é uma alteração hematológica bastante característica do portador do traço talassêmico beta, representando o resultado da combinação de efeitos de duas alterações opostas: aumento da produção de hemácias, por um lado, e diminuição da síntese de hemoglobina, por outro (WEATHERALL, 1967).

MALAMOS e colaboradores (1962) recomendam a determinação da Hb.C.M. como teste de triagem das talassemias heterozigóticas, tendo-a encontrado diminuída (Hb.C.M. < 27 pg) em cerca de 97% dos 109 talassêmicos heterozigotos por eles estudados.

Segundo WEATHERALL (1978), os valores da Hb. C.M. costumam variar entre 20 e 22 pg no traço talassêmico beta . Em nossa experiência, no entanto, temos encontrado um intervalo maior de variação, apresentando a quase totalidade dos talassêmicos por nós examinados valores de Hb.C.M. entre 18 e 26 pg. Cumpre ressaltar, por outro lado, a necessidade da contagem eletrônica das hemácias para o cálculo do valor correto da Hb.C.M. . Para essa contagem, pode-se valer de um sistema "Coulter Counter", ou semelhante.

McPHERDAN e colaboradores (1972), procedendo à determinação eletrônica do V.C.M. em pacientes hospitalizados, encontraram em 100 pacientes com microcitose acentuada (V.C.M. < $70\mu^3$) 50 casos de anemia ferropriva e 25 casos de talassemia. Baseando-se nesse resultado, PEARSON e colaboradores (1973) resolveram testar a validade da determinação/eletrônica do V.C.M. das hemácias como teste de triagem das talassemias beta, obtendo reposte bastante satisfatória. O valor do V.C.M. igual a $79\mu^3$ mostrou-se, no estudo dos autores acima referidos, como sendo um bom índice discriminante/entre talassêmicos e não talassêmicos.

De acordo com WEATHERALL (1978), a maioria dos portadores do traço talassêmico beta apresentam valores de V.C.M. entre 50 e $70\mu^3$. A maioria dos talassêmicos por nós examinados, no entanto, apresentavam valores de V.C.M. entre

60 e 80 μ^3 , chegando alguns a apresentar, excepcionalmente, valores dentro dos limites da normalidade. Esses nossos dados concordam com o de PEARSON e colaboradores (1973), que encontraram valores de V.C.M. entre 63 e 78 μ^3 em 45 talassêmicos/beta heterozigotos examinados.

As alterações da morfologia da série vermelha representam um dado diagnóstico de grande valor no traço talassêmico beta. GOUTTAS (1961), por exemplo, estudando 395 indivíduos certamente heterozigotos das talassemias beta, encontrou alterações do esfregaço sangüíneo em 98,4% dos casos. Essas alterações compreendem diversos graus de microcitose, hipocromia, poiquilocitose, alvocitose, anisocitose e policromasia, podendo-se observar, também, hemácias com ponteados basófilos.

O aumento da resistência osmótica das hemácias sempre foi considerado como uma das características mais marcantes das talassemias. Assim, nos primeiros casos descritos de anemia de Cooley (COOLEY e LEE, 1925) já se fazia referência a tal alteração hematológica, atribuindo-se a CAMINOPETROS (1937) a descoberta de que a resistência globular osmótica se encontra também aumentada nos genitores de crianças com anemia de Cooley. Passou-se, então, a usar tal característica para a detecção de portadores do traço talassêmico beta, critério esse exaustivamente usado na Itália, sobretudo por SILVESTRONI e BIANCO (1959).

Como já se mencionou anteriormente, desde a observação inicial de KUNKEL e colaboradores (1957), considera-se o aumento percentual da hemoglobina A₂ como o principal dado diagnóstico do traço talassêmico beta.

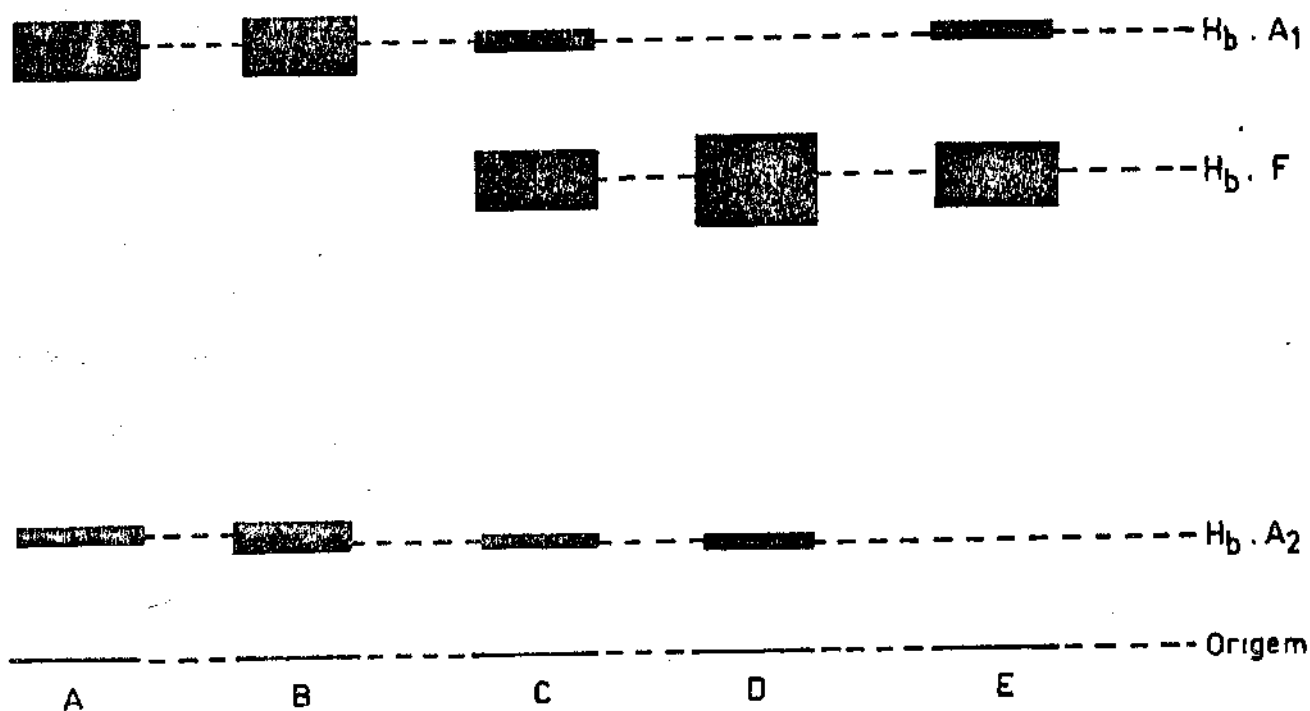
A determinação da hemoglobina A₂ também pode ser feita com excelentes resultados por intermédio da eletroforese de hemoglobinas em fitas de acetato de celulose, usando-se o tampão tris-glicina, pH 9,1. A quantificação da hemoglobina A₂ pode ser feita por densitometria, tomando-se o cuidado de diafanizar previamente a fita de acetato de celulose com uma mistura de dioxana (7 partes) e isobutanol (3 partes).

A grande desproporção observada entre os percentuais das hemoglobinas A_1 e A_2 , tanto em indivíduos normais quanto em talassêmicos, torna a quantificação da Hb. A_2 exageradamente sujeita a erros quando são usados densitômetros integradores. Apesar de esse problema poder ser contornado pelo uso de outros tipos de densitômetros, é bem mais prático verificar o aumento percentual da Hb A_2 dos talassêmicos heterozigotos comparando visualmente a intensidade da banda eletroforética correspondente a essa hemoglobina com a de padrões normais cujo hemolisado apresenta a mesma concentração. Esse procedimento, que exige aplicações exatamente iguais em quantidade e forma dos hemolisados do paciente e do padrão normal, é assessorado pela triagem hematológica que sempre se faz em casos suspeitos de traço talassêmico beta. Assim, se um paciente com microcitose, hipocromia, diminuição da Hb.C.M., diminuição do V.C.M. e aumento da resistência globular osmótica revelar, ao exame eletroforético, uma banda de hemoglobina A_2 mais intensa do que a do padrão normal, pode-se fazer o diagnóstico de talassemia. Se a banda eletroforética correspondente à hemoglobina A_2 se mostrar menos concentrada do que a do padrão normal, trata-se, evidentemente, de um caso de anemia ferropriva.

Duas ressalvas, no entanto, devem ser feitas quanto à determinação da hemoglobina A_2 . Uma quanto ao estudo de crianças com menos de seis meses de idade, já que a hemoglobina A_2 não alcança o seu nível adulto antes dessa idade (WEATHERALL, 1967), e outra quanto ao estudo de pacientes grávidas, pois existem comunicações assinalando que o nível da hemoglobina A_2 pode se elevar nos últimos meses de gravidez (OKUGLU *et al.*, 1963 ; *apud* WEATHERALL, 1967).

Na figura 7 estão representados esquematicamente, os resultados dos exames eletroforéticos de portadores de diferentes formas de talassemia beta.

Figura 7



7 - Eletroforese de hemoglobinas de indivíduos normais e talassêmicos: A) adulto normal; b) adulto com o traço talassêmico beta ; C) adulto com a anemia de Cooley (genótipo $\beta^{T+}\beta^{T+}$) ; D) adulto com a anemia de Cooley (genótipo $\beta^{T0}\beta^{T0}$); E) recém-nascido normal.

Talassemia delta-beta

A talassemia delta-beta, ou talassemia F, caracteriza-se, no estado heterozigótico, por manifestações clínicas e laboratoriais similares às do traço talassêmico beta. Dele difere apenas no seu quadro hemoglobínico, já que está associada a níveis normais ou baixos de hemoglobina A₂ e elevados de hemoglobina F, da ordem de 5% a 30% da hemoglobina total (FESSAS, 1961; ZUELZER *et al.*, 1961; GABUZDA *et al.*, 1964; WEATHERALL, 1964). Já foi descrita na forma homozigótica revelando-se nesse caso, ao lado de alterações talassêmicas típicas dos eritrócitos, a ocorrência de 100% de hemoglobina fetal (BRANCATI e BAGLIONI, 1966; RAMOT *et al.*, 1970).

A talassemia delta-beta pode interagir com a talassemia beta, determinando um quadro clínico similar ao da anemia de Cooley. Nesse caso, os níveis de hemoglobina F são muito altos e em torno de 90% da hemoglobina total. (FESSAS, 1961; ZUELZER *et al.*, 1961; GABUZDA *et al.*, 1964).

Em nossa investigação sobre a freqüência dos traços talassêmicos beta e delta-beta em uma amostra da população estudantil de Campinas, não tivemos a oportunidade de diagnosticar nenhum caso de talassemia F (RAMALHO, 1975a). Da mesma forma, nunca detectamos nenhum portador dessa forma de talassemia em nosso Serviço na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Distribuição geográfica das talassemias

Três hipóteses podem ser aventadas para explicar a origem das talassemias beta e a sua disseminação nas populações humanas:

- 1) sendo originárias das populações da região mediterrânea, espalharam-se nas do Oriente através do fluxo gênico das primeiras nas segundas, chegando até a China (CHERNOFF, 1959);
- 2) tendo origem no Oriente, provavelmente na Indochina, dis-

seminaram - se no Oriente [BRUMPT, 1955];

- 3) surgindo na Armênia, fluíram igualmente para o Oriente e para o Ocidente [SHEBA, 1959, *apud* CHERNOFF, 1959];

CHERNOFF (1959), analisando quase duas centenas de publicações, reviu os estudos da distribuição geográfica/da talassemia. Segundo esse autor, numa primeira fase, compreendendo o período entre 1925 e 1950, a talassemia foi diagnosticada em três principais áreas do mundo:

- 1) nos Estados Unidos da América do Norte, em descendentes de italianos, gregos, sírios e armênios e, em menor proporção, em descendentes de chineses, sobretudo daqueles originários de Cantão e de Hong-Kong;
- 2) na região mediterrânea, principalmente Itália, Grécia, Chipre, Síria e Turquia, com publicações de casos isoladas em Portugal, Espanha, Egito e outros países do Oriente Médio;
- 3) em três focos asiáticos principais, ou seja, Índia, China e Filipinas.

Dessa primeira fase, existem apenas comunicações esparsas de casos na Argentina, Brasil, México, Inglaterra, França, Alemanha e Bulgária.

A partir de 1950, porém, a talassemia passou a ser descrita, com intensidade variável em, praticamente, todo o mundo, mas cumpre assinalar que as dificuldades inerentes ao diagnóstico da talassemia na sua forma heterozigótica tornam difícil estabelecer a sua prevalência real em qualquer população. Assim, por exemplo, SILVESTRONI e BIANCO (1959), organizaram um mapa da distribuição das talassemias/beta na Itália, usando como único critério de seleção o aumento da resistência osmótica das hemácias, o que se sabe, atualmente, não ser um método seguro. Verificaram, nesse seu estudo que, enquanto a frequência de heterozigotos era de 1% a 2% nas cidades do norte e do centro da Itália, no Vale do Pô e na Sicília eram encontrados níveis de 7% a 15%, sendo que aproximadamente 25% desses indivíduos apresentavam /sintomatologia, constituindo, pois, um problema de Saúde Pública.

Os dados apresentados na tabela I permitem uma visão geral das frequências das talassemias alfa e beta assinaladas em diferentes populações humanas.

A frequência do traço talassêmico beta foi estimada no Estado de São Paulo em 6,41% entre os descendentes não miscigenados de italianos e em 1% entre os miscigenados (RAMALHO, 1975_a).

Mecanismos homeostáticos que mantem o polimorfismo das talassemias beta.

A alta prevalência de portadores do gene das talassemias beta em determinadas populações, a despeito do seu alto coeficiente seletivo, evidencia a existência de mecanismos homeostáticos mantendo o polimorfismo dessas hemoglobinopatias. Realmente, se os homozigotos dos genes das talassemias beta são selecionados antes da idade reprodutiva, é claro que a frequência desses genes deveria corresponder apenas à taxa de mutação, ou seja, a eliminação do gene detrimental deveria ser feita de início muito rapidamente, pois não é possível aos homozigotos transmitir os genes causadores da anomalia eritrocitária em questão:

Frequências apreciáveis de talassemias beta tem sido encontradas em quase todas populações de países tropicais e sub-tropicais (Tab. I), com descrição apenas ocasional de / casos isolados em países de clima frio ou temperado. Tais casos possuem, geralmente, ascendência de origem mediterrânea, representando os raros casos comprovadamente autóctones, possíveis mutações. HALDANE (1949), verificando a semelhança das distribuições geográficas da talassemia beta e da malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, sugeriu a hipótese de que os heterozigotos da talassemia beta teriam vantagens seletivas / em relação aos normais no que diz respeito a esse tipo de malária. Assim sendo, os indivíduos com talassemia beta homozigótica morreriam em virtude da própria doença enquanto que os normais homozigotos seriam mais selecionados pela malária do que os heterozigotos.

TABELA I - Frequências dos traços talassêmicos alfa e beta assinala -
das por diversos autores em populações humanas.

LOCAL	α %	β %	REFERÊNCIA
ITÁLIA			
Continente	0,2	até 20	RUCKNAGEL, 1966
Sicília	-	3-13	RUCKNAGEL, 1966
Sardenha	-	9,4	TERRENATO, 1973
GRÉCIA			
Continente	0,4-0,7	6-14	RUCKNAGEL, 1966
Rodes	-	16	KATTAMIS <i>et al.</i> , 1969
CHIPRE	10	15-17	KATTAMIS <i>et al.</i> , 1972; ASHIOTIS <i>et al.</i> , 1973
PORTUGAL	-	0,6	RUCKNAGEL, 1966
ESPAÑA	-	1-3	PELLIGER e CASADO, 1970
MALTA	-	3,5	CAUCHI, 1970
TURQUIA	-	1,7	CAVDAR e ARCASOY, 1971
INGLATERRA	-	14	MODELL <i>et al.</i> , 1972
(Origem cipriota)			
ALEMANHA	-	0,1	NOWICK <i>et al.</i> , 1972
ARGÉLIA	-	1-15	RUCKNAGEL, 1966
EGITO	-	0,3	RUCKNAGEL, 1966
SUDÃO	-	2,5	WEATHERALL <i>et al.</i> , 1971; FOLAYAN ESAN, 1970
NIGÉRIA	-	0,2-0,8	WEATHERALL <i>et al.</i> , 1971
GANÁ	-	1,3-1,7	WEATHERALL <i>et al.</i> , 1971
LÍBIA	-	0	WEATHERALL <i>et al.</i> , 1971
ÁFRICA OCIDENTAL	2-10	2	RUCKNAGEL, 1966
ISRAEL		14	RUCKNAGEL, 1966
(Samaritanos)			
LÍBANO e SÍRIA	-	5	RUCKNAGEL, 1966
ÍNDIA (Madras)	-	15	RUCKNAGEL, 1966
TAILÂNDIA	3-5	1-10	RUCKNAGEL, 1966
VIETNÃ DO SUL	-	2	RUCKNAGEL, 1966
MALÁSIA			
Cheneses	7	-	LOPEZ e LIE-INJO, 1971
Malaíes	4,9	-	LOPEZ e LIE-INJO, 1971
Indus	1,8	-	LOPEZ e LIE-INJO, 1971
BIRMANIA	10	-	AUNG-THAN-BATU <i>et al.</i> , 1971
CHINA	3	3-5	RUCKNAGEL, 1966; McFADZEAN e TODD, 1971
FILIPINAS	-	1	RUCKNAGEL, 1966
INDONÉSIA	0,5	-	RUCKNAGEL, 1966
NOVA GUINÉ	-	0,8	RUCKNAGEL, 1966
AUSTRÁLIA			
Geral	-	2,8	SMITH <i>et al.</i> , 1971
Origem Mediter- rânea	-	4-20	RAVEN, 1972; FLEMING, 1972
CANADÁ			
(Origem chinesa)	6,7	3,8	GRAY e MARION, 1971
EE.UU			
Origem grega	2,4	5	PEARSON <i>et al.</i> , 1973; PEARSON, 1969;
Negróides	2-7	0,5-2	MOTULSKY, 1973; SCHMAIER <i>et al.</i> 1973;
BRASIL			SCHMIDT, 1973
(Origem Italiana)	-	1-6,41	RAMALHO, 1975 _a .

O mesmo raciocínio de HALDANE em relação a malária e à talassemia beta foi empregado para explicar o polimorfismo da hemoglobina S na África (ALLISON, 1954a,b), sendo a existência de associação entre malária e deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6PD) sugerida por MOTULSKY (1960a,b). De fato, observa-se, de modo geral, correlação/geográfica evidente entre a distribuição da malária causada / pelo *Plasmodium falciparum* e a distribuição desses três caracteres genéticos, ou seja, da talassemia beta, da siclemia e da deficiência de G-6PD.

Na Grécia, no entanto, observou-se correlação negativa entre os traços siclêmicos e talassêmico (BARNICOT *et al.*, 1963), ou seja, nos locais em que a talassemia beta era mais frequente, a prevalência da siclemia era menor. Merece menção o fato de ter sido observada correlação negativa similar na Tailândia entre a talassemia beta e o estado de portador da hemoglobina E (FLATZ *et al.*, 1965), *apud* LIE - INJO, 1969).

Já em relação à talassemia beta e à deficiência de G-6PD, foi observada uma correlação positiva entre as duas entidades na Sardenha (SINISCALCO *et al.*, 1961) e, do mesmo modo, observou-se correlação positiva entre a deficiência de G-6PD e a siclemia, em várias populações (MOTULSKY, 1964b).

A correlação negativa entre as talassemias e as hemoglobinopatias estruturais de cadeia beta, tais como as hemoglobinopatias S e E, é interpretada como decorrente de um efeito deletério condicionado pela interação dos dois genes de trimentais no mesmo indivíduo, ao passo que a interação de cada um desses genes com o da deficiência de G-6PD em um mesmo indivíduo, não causa danos maiores.

CARCASSI, CEPPELLINI e PITZUS (1957), investigando a hipótese de HALDANE na Sardenha, constataram maior prevalência de talassemia beta nas zonas pantanosas baixas do que nas regiões montanhosas, onde, obviamente, havia menor incidência de malária. A mesma distribuição foi observada nas ilhas da Oceânia por CURTAIN e colaboradores (1962).

Já na Grécia (CHOREMIS *et al.*, 1963; RASER *et al.*, 1964; STAMATOYANNOPOULOS e FESSAS, 1964), em Chipre (PLATO *et al.*, 1964) e na Tailândia (FLATZ *et al.*, 1965 *apud* LIE-INJO, 1969), as relações observadas entre a malária e a talassemia beta não se mostraram muito evidentes. Na ilha de Chipre, por exemplo, PLATO e colaboradores (1964), embora tenham encontrado uma frequência bem maior de deficiência de G-6PD nas zonas com malária endêmica do litoral do que nas zonas montanhosas do interior, não observaram, em relação à talassemia, diferença significativa entre as suas frequências no litoral e nas regiões altas. Para explicar esse fato, os autores sugeriram a hipótese de que o gene da talassemia beta, presente há mais tempo na ilha, deveria ser, inicialmente, muito frequente nas populações do litoral. Com a invasão da ilha por conquistadores, que trouxeram o gene da deficiência de G-6PD, essas populações litorâneas primitivas refugiaram-se, em grande parte, nas regiões montanhosas do centro da ilha, levando consigo o gene da talassemia. Os genes talassêmicos que permaneceram nas populações do litoral, bem como os genes da deficiência de G-6PD, sofreram seleção positiva pela malária nessa região de Chipre.

Por outro lado, a presença da siclemia na maioria das áreas com malária endêmica da Grécia, do mesmo modo que a presença hemoglobinopatia E na Tailândia, poderiam ser responsáveis, pelo menos em parte, pela correlação menos evidente entre a malária e a talassemia nesses países. Realmente, na ilha grega de Rodas, onde a prevalência da siclêmia é baixa, são observadas altas frequências tanto de deficiência de G-6PD quanto de talassemia beta (22% e 16% respectivamente), havendo evidências de que essa ilha constituiu no passado uma zona hiperendêmica de malária (KATTAMIS *et al.*, 1969).

Sendo a distribuição geográfica das talassemias β correspondentes àquela da malária causada pelo *Plasmodium falciparum* e sendo as regiões de maior prevalência de talassemia, geralmente zonas hiperendêmicas de malária no passado, parece plausível aceitar que o traço talassêmico confira, realmente, certa proteção contra a malária. Reforça essa idé

ia o fato de não poder ser afastada a possibilidade de interferência de outros fatores (siclemia, hemoglobinopatia E, diferenças raciais) nas áreas onde as relações entre a malária e a talassemia não se mostram muito evidentes.

A opinião de MOTULSKI (1964a) é de que tanto a siclémia quanto a deficiência de G-6PD e as talassemias beta devem exercer ação protetora contra a malária causada pelo *Plasmodium falciparum*. Segundo esse autor, o traço siclêmico possui maior ação protetora contra a malária do que da deficiência de G-6PD e bem maior, ainda, do que a talassemia. Em relação ao traço talassêmico beta, supõem-se que o mecanismo protetor decorra da presença de microcitose, hipocromia, anisocitose e do fato de ser encontrado, com relativa frequên - cia, decréscimo do tempo de vida das hemácias (BEIGUELMAN , 1968). Se o *Plasmodim falciparum* requer hemácias perfeitamente normais para o seu crescimento, pelo menos uma boa proporção de indivíduos com o traço talassêmico estaria protegida.

Como a seleção contra as talassemias beta é muito grande, é bastante provável que existam outros mecanismos homeostáticos muito potentes, além da malária, mantendo o seu polimorfismo em muitas populações.

HALDANE (1949) sugeriu que os portadores do traço talassêmico poderiam estar protegidos contra os períodos de diminuição intensa dos depósitos de ferro corporal, hipótese essa afastada atualmente (BANNERMAN, 1961). Sugeriu-se, também, que a fertilidade das talassêmicas heterozigotas poderia estar aumentada por razões desconhecidas (RASER *et al.*, 1964). No mesmo sentido, os níveis relativamente baixos de colesterol sérico e da lipoproteína beta dos talassêmicos heterozigotos (FESSAS, STAMATOYANNOPOULOS e KEYS, 1963, *apud* WEATHERALL, 1967) poderiam constituir uma vantagem seletiva importante, ainda que após a idade reprodutiva. De qualquer forma, fica patente que as vantagens conferidas aos heterozigotos das talassemias beta devem ser, sem dúvida, muito complexas.

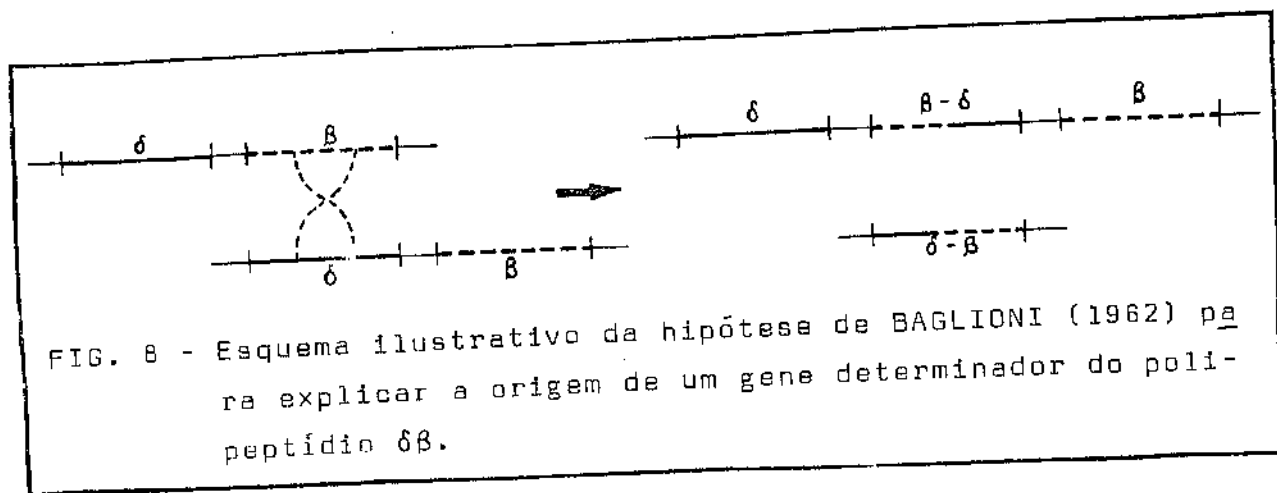
ESTADOS SIMILARES À TALASSEMIA

Como já tivemos a oportunidade de comentar, as síndromes da hemoglobina Lepore e a persistência hereditária da hemoglobina fetal, apesar de condicionarem a depressão da síntese das cadeias beta e delta, não se enquadram bem na definição clássica de talassemia e, por isso, constituem um grupo à parte. Pode-se dizer, no entanto, que essas entidades genéticas são parentes próximas da talassemia delta-beta.

Síndromes da hemoglobina Lepore

As síndromes da hemoglobina Lepore compreendem um grupo de transtornos associados à produção de uma hemoglobina anômala, onde a cadeia peptídica alterada nada mais é do que a fusão das cadeias beta e delta (BAGLIONI, 1962). A origem desse polipeptídeo de fusão delta-beta pode ser explicada através do mecanismo genético de permutação desigual, produzindo um gene de fusão delta-beta (BAGLIONI, 1962; NANCE, 1963; GERALD, 1964).

O esquema da figura 8 dá uma idéia visual dessa hipótese.



O produto recíproco dessa permutação desigual, ou seja, o polipeptídeo de fusão beta-delta também já foi descrito na hemoglobina Miyada, mais conhecida pela denominação de hemoglobina anti-Lepore (OHTA et al., 1971).

Merece referência especial o fato de essas cadeias delta-beta e beta-delta, do mesmo modo que as cadeias δ , serem sintetizadas apenas nos estágios iniciais de maturação das células eritróides, antes de ser atingida a fase reticulocitária (ROBERTS *et al.*, 1973).

Os homozigotos dos genes das hemoglobinas Lepore apresentam o quadro clínico típico das formas graves de anemia de Cooley. A sua eletroforese de hemoglobinas revela a presença, apenas, das hemoglobinas fetal e Lepore.

Os heterozigotos dos genes das hemoglobinas Lepore apresentam o mesmo quadro clínico dos portadores do traço talassêmico beta. A sua eletroforese de hemoglobinas revela níveis diminuídos de hemoglobina A_2 e aumentados de hemoglobina fetal, além da presença da hemoglobina Lepore, em percentuais em torno de 8% da hemoglobina total.

De acordo com WEATHERALL (1978), as principais hemoglobinas Lepore descritas até o momento são a Washington, a Hollandia e a Baltimore. As variantes Pylos e Nicosia, além de outra variante descrita em negros da Jamaica, parecem ser idênticas à hemoglobina Lepore (Washington).

Persistência hereditária da hemoglobina fetal

A persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF) sempre foi definida como sendo uma condição genética/ caracterizada por níveis elevados de hemoglobina fetal na idade adulta, desacompanhada de outras alterações hematológicas. Assim, apesar de a síntese das cadeias beta e delta estar deprimida nessa condição, ela não era considerada como talassemia, justamente pelo fato de não apresentar as características hematológicas peculiares à mesma.

Estudos mais recentes, no entanto, demonstraram / que a PHHF é, na verdade, uma condição bastante heterogênea e que pelo menos algumas de suas variantes determinam alterações talassêmicas nos eritrócitos.

Os heterozigotos da principal variante de PHHF, ou

seja, da variante Negro, apresentam cerca de 20% a 30% de hemoglobina fetal na vida adulta, hemoglobina essa distribuída de forma relativamente homogênea nas suas hemácias. Já os homozigotos, que são clinicamente assintomáticos, apresentam 100% de hemoglobina fetal (WEATHERALL, 1978). Apesar da ausência de manifestações clínicas significativas, esses homozigotos a apresentam hemácias pequenas e com pequeno conteúdo hemoglobínico.

MICRODREPANOCIToses

Dá-se o nome de microdrepanocitoses às condições mórbidas resultantes da interação dos genes da hemoglobina S e das talassemias beta em um mesmo indivíduo. Assim sendo, um paciente com a anemia microdrepanocítica apresenta, obrigatoriamente, um dos genitores com a hemoglobina S e outro com a talassemia beta.

Pelo fato de tanto a hemoglobina S quanto as talassemias beta serem alterações genéticas freqüentes na população do Estado de São Paulo e de outras regiões brasileiras, o aparecimento de pacientes com microdrepanocitose não constitui uma raridade em nosso meio, ao contrário do que ocorre na maioria das outras populações humanas.

Como a fisiopatogenia da anemia microdrepanocítica depende, em grande parte, da hemoglobina S, é muito comum a confusão diagnóstica, a nível clínico e laboratorial, entre essa entidade mórbida e a anemia falciforme.

Uma vez que existem dois tipos de genes para as talassemias beta (genes β^{T+} e β^{To}), existem, conseqüentemente, dois tipos de microdrepanocitose, dependendo do tipo de a alelo talassêmico que se apresenta em interação com o gene da hemoglobina S.

A interação entre o gene beta To e o gene da hemoglobina S determina uma forma grave de microdrepanocitose, mais conhecida por anemia microdrepanocítica, que é a mais freqüentemente confundida com a anemia falciforme. De fato,

os pacientes com essa forma de microdrepanocitose apresentam, em geral, as mesmas manifestações clínicas da forma homozigótica da hemoglobinopatia S, com anemia hemolítica, retardo / do crescimento e do desenvolvimento, dores ósseas, articula - res e abdominais recorrentes, crises de "falcização" e outros sintomas.

O exame hematológico desses pacientes revela as mesmas alterações descritas na anemia falciforme, chamando a atenção, no entanto, a maior quantidade de células em alvo no esfregaço sangüíneo e, sobretudo, o grande aumento da resis - tência osmótica das hemácias. A pesquisa de eritrócitos fal - ciformes em lâmina de microscopia (prova de "falcização" ou teste do metabissulfito) e a prova de solubilidade para a he - moglobina S se apresentam , evidentemente, positivas. A in - terpretação da eletroforese de hemoglobinas também é passível de confusão com a de pacientes com a anemia falciforme, reve - lando a ausência de hemoglobina A₁ e a presença das hemoglo - binas S e A₂. Chama a atenção na eletroforese, no entanto, a presença constante da hemoglobina fetal, em percentuais geral - mente superiores aos descritos na anemia falciforme, na qual ela pode, inclusive, faltar. Outro dado importante da eletro - forese é o aumento do percentual da hemoglobina A₂, que é u - ma alteração bastante característica da forma heterozigótica / das talassemias beta.

O diagnóstico de certeza de microdrepanocitose é dado pelo exame laboratorial dos genitores do paciente, uma vez que um deles será heterozigoto do gene da hemoglobina S e o outro será heterozigoto de um alelo talassêmico beta.

A interação entre o gene beta T+ e o gene da hemo - globina S determina uma forma branda de microdrepanocitose , raramente confundida com a anemia falciforme, mas, por outro lado, freqüentemente confundida com o traço siclêmico.

Os portadores dessa forma de microdrepanocitose ge - ralmente são assintomáticos, mas podem apresentar complica - ções clínicas graves, até mesmo fatais, em situações que fa - voreçam a produção de hemácias falciformes, com a hipóxia, a

desidratação, a acidose e a vasoconstrição. A anestesia geral, por exemplo, é uma das situações que podem oferecer sérios riscos a esses indivíduos.

Os pacientes com a forma branda de microdrepanocitose apresentam a pesquisa de hemácias falciformes e a prova de solubilidade para a hemoglobina S positivas, além de revelarem alterações sugestivas de talassemia na morfologia da série vermelha e grande aumento da resistência osmótica das hemácias. A diferenciação entre essa forma de microdrepanocitose e o traço siclêmico é feita facilmente pela eletroforese de hemoglobinas, uma vez que esses pacientes microdrepanocíticos apresentam, ao contrário dos siclêmicos, percentuais de hemoglobina S superiores aos de hemoglobina A₁, além de revelarem aumento nítido do percentual da hemoglobina A₂. A confirmação do diagnóstico de microdrepanocitose também pode ser feita, nesse caso, pelo exame laboratorial dos genitores do paciente.

Para fins de aconselhamento genético, nunca é demais lembrar que se um(a) paciente com microdrepanocitose se casar com uma pessoa hemoglobinicamente normal, o casal poderá ter filhos com o traço siclêmico (50%) ou com o traço talassêmico beta (50%). Se ele(a) se casar com uma pessoa portadora do traço siclêmico, o casal poderá ter filhos com o traço siclêmico (25%), com o traço talassêmico beta (25%), com microdrepanocitose (25%) ou com anemia falciforme (25%). Se ele(a) se casar com uma pessoa portadora do traço talassêmico/beta, o casal poderá ter filhos com o traço siclêmico (25%), com o traço talassêmico beta (25%), com microdrepanocitose (25%) ou com anemia de Cooley.

O LABORATÓRIO DE HEMOGLOBINOPATIAS

A técnica laboratorial básica para o estudo das hemoglobino^upatias hereditárias é a eletroforese de hemoglobinas, devendo um laboratório ideal estar devidamente equipado para realizar eletroforese em diversos meios (acetato de celulose, gel de amido, gel de ágar, etc.), utilizando diferentes tam-pões.

Em termos práticos, no entanto, um laboratório que se proponha a reconhecer as formas de hemoglobinopatias mais comuns poderá utilizar apenas uma técnica eletroforética fundamental, que sirva para a identificação do maior número possível de alterações hemoglobínicas. Para esse fim, a eletroforese de hemoglobinas em fitas de acetato de celulose representa o que há de mais prático, permitindo obter, com rapidez e simplicidade, exames de ótima qualidade.

Como já comentamos, temos nos valido com êxito da eletroforese em fitas secas de acetato de celulose (Mikrophor Boskamp, Alemanha), utilizando um sistema "Boskamp" (Boskamp Gerätebau KG, Alemanha) de eletroforese e o tampão tris-glicina pH 9,1. Com essa técnica é possível a identificação e a quantificação das hemoglobinas A₁, A₂, F, S, C, D, H, etc., o que permite estudar as hemoglobinopatias estruturais mais freqüentes em nosso meio, bem como a talassemia beta. Por outro lado, a mesma aparelhagem pode ser usada para eletroforese de proteínas séricas, de heptaglobinas de cadeias hemoglobínicas, para lipidograma, etc..

Além da eletroforese de hemoglobinas, outros exames podem ser considerados como rotineiros em um laboratório de hemoglobinopatias. Dentre eles, merecem destaque o teste de solubilidade para o reconhecimento da hemoglobina S, a dosagem de hemoglobina fetal, o estudo da morfologia da série vermelha em esfregaços sanguíneos e o teste simplificado de resistência globular osmótica. Evidentemente, é obrigatório o emprego das técnicas hematológicas mais comuns, como a dosagem de hemoglobina, a determinação do hematócrito, a contagem de hemácias e de reticulócitos, etc.

Para a realização desses exames, o laboratório de hemoglobinopatias deve contar, no mínimo, com:

- 1 - Sistema de eletroforese em fitas de acetato de celulose, composto por fonte de energia e cuba de eletroforese.
- 2 - Densitômetro integrador.
- 3 - Espectrofotômetro.
- 4 - Microscópio.

- 5 - Centrífuga.
- 6 - Centrífuga para micro-hematócrito.
- 7 - Refrigerador.
- 8 - Banho-maria.

Outros exames, que não podem ser considerados como rotineiros, são usados ocasionalmente no laboratório de hemoglobinopatias, como é o caso, por exemplo, da separação eletroforética de cadeias peptídicas, da pesquisa de corpos de inclusão nas hemácias, da detecção de hemoglobina instável, do teste de desnaturação pelo calor, da dosagem de metemoglobina, da eletroforese em gel de amido pH 8,6, da eletroforese em gel de amido, pH 7,7, da eletroforese em gel ágar, pH 8,5 etc. .

Apesar disso, é importante lembrar aos interessados em reconhecer os portadores homo- e heterozigoto da hemoglobinopatia S, mas que não dispõem de nenhuma aparelhagem especializada, que esse reconhecimento pode ser feito com grande facilidade e precisão pelo teste "Sickle-ID". Tal teste não exige qualquer outro aparelho, além de uma centrífuga comum. Esse teste, que serve exclusivamente para hemoglobina S, usa apenas 0,1 ml de sangue, demora 5 minutos e, quando bem feito, dispensa a eletroforese de hemoglobinas.

BIBLIOGRAFIA

- AACH, R. & KISSANE, J. (1970) - A patient with sickle cell anemia surviving forty-eight years - *Am. J. Med.* 48: 226.
- ALLEN, D. E. ; SCROEDER, W. A. & BALOG, J. (1958) - Observations on the chromatographic heterogeneity of normal and fetal hemoglobin - *J. Amer. Chem. Soc.*, 80: 1628.
- ALLISON, A.C. (1954a) - Protection afforded by sickle cell trait against subtertian malarial infection - *Br. Med. J.* 1:290 .
- ALLISON, A.C. (1954b) - The distribution of the sickle cell trait in East Africa and elsewhere and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. *B Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 48: 312
- ARENDS, T. (1967) - High concentrations of hemoglobin A₂ in malaria patients - *Nature (Lond.)*, 215: 1516.
- ASHIOTIS, T.; ZACHARIADIS, Z.; SOFRONIADOU, K.; LOUKOPOULOS, D. & STAMATOYANNOPOULOS, G. (1973) - Thalassemia in Cyprus *Br. Med. J.*, 2: 38.
- ATWATER, J.; SCHWARTZ, I. R.; ERSLEV, A.J.; MONTGOMERY, T. D. & TOCANTINS, L.M. (1960) - Sickling of erythrocytes in a patient with thalassemia-hemoglobin I disease - *N. Engl. J. Med.*, 263: 1215.
- AUNG-THAN-BATU; UHLA-PE; KHIN-KYI-NYUNT & TIN-U (1971) - Haemoglobinopathies in Burma - *Trop. Geogr. Me.*, 23: 25.

- BAGLIONI, C. (1962) - The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion - *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48: 1880.
- BANK, A. & MARKS, P. (1966) - Excess alpha chain synthesis relative to beta chain synthesis in thalassaemia major and minor - *Nature (Lond.)*, 212: 1198.
- BANK, A.; BRAVERMAN, A.S. & MARKS, P. (1969) - Globin chain synthesis in thalassemia. - *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 165: 231.
- BANNERMAN, R.M. (1961) - "Thalassemia. A survey of some aspects", N. York, Grune & Stratton.
- BANWELL, G.S. & STRICKLAND, M. (1964) - Haemoglobinopathy associated with recurrent stillbirth - *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.*, 71: 788.
- BARCLAY, G.P.T.; HUNTSMAN, R.G. & ROBB, A. (1970) - Population screening of young children for sickle cell anaemia in AZambia - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 64: 733.
- BARNICOT, N. A.; ALLISON, A. C.; BLUMBERG, B. S.; DELIYANNIS, G.; KRIMBAS, C. & BALLAS, A. (1963) - Haemoglobins types in Greek populations - *Ann. Hum. Genet.* 26: 229.
- BAUR, E. W. & MOTULSKY, A.G. (1965) - Hemoglobin Tacoma - a beta chain variant associated with increased Hb A₂ - *Human genetik*, 1: 621.
- BEAVEN, G.H.; ELLIS, M.J. & WHITE, J.C. (1961) - Studies on human foetal haemoglobin. - *Br. J. Haemat.*, 7: 169.
- BEAVEN, G.H. ; STEVENS, B.L.; ELLIS, J.J.; WHITE, J.C.; BERNSTOCK, L. MASTER, P. & STAPLETON, T. (1964) - Thalassaemia-like conditions in British families - *Br. J. Haemat.*, 10: 1.
- BEEL, R.M.S. & GILFAND, M. (1971) - Sickle cell diseases in Rhodesia *J. Trop. Med. Hyg.*, 74: 148.
- BEIGUELMAN, B. (1968) - "Dinâmica dos genes nas populações e nas famílias", São Paulo, EDART, Coleção Genética Médica , V.3.
- BENZ, E.J. & FORGET, B.G. (1971) - Defect in messenger RNA for human hemoglobin synthesis in beta thalassemia - *J. Clin. Invest.*, 50: 2755.

- BERNINI, L.; COLUCCI, C.F.; MICHELE, D.; PIOMELLI, S. & SINISCALCO, M. (1962) - A possible case of alpha-beta thalassaemia - *Acta Genet.*, 12: 202.
- BERTLES, J.F. (1974) - "Hemoglobin interaction and molecular basis of sickling" - *Arch. Intern. Med.*, 133: 538.
- BETKE, K.; MARTI, H.R. & SCHLICHT, I. (1959) - Estimation of small percentages of foetal haemoglobin - *Nature (Lond.)*, 184: 1877.
- BOON, W. H. (1973) - Alpha thalassaemia in Singapore - *Aust. Paediat. J.*, 9: 5.
- BOYER, S. H.; RUCKNAGEL, D.L.; WEATHERALL, D.J. & WATSON-WILLIAMS, E.J. - Further evidence for linkage between the beta and delta loci governing human hemoglobin and the population dynamics of linked genes - *Am. J. Human. Genet.*, 15: 438.
- BRAVERMAN, A.; McCURDY, P.R. & MANOS, D. (1971) - Mild homozygous beta thalassaemia in Negroes - *Clin. Res.*, 19: 407
- BRUMPT, L.C. (1955) - A propos de l'anémie de Cooley; Thalassémie or sinémie ? - *Bull. Acad. Natl. Med. (Paris)*, 139: 333.
- BURKA, E.R. & MARKS, P.A. (1963) - Ribosomes active in protein synthesis in human reticulocytes; defect in thalassaemia major - *Nature (Lond.)*, 199: 706.
- CAMINOPETROS, J. (1937) L'anémie erythroblastique des peuples de la Méditerranée orientale. *Monogr. Acad. Athènes*, 6: 3.
- CARCASSI, V.; CEPPELLINI, R. & PITZUS, F. (1957) - Frequenza della thalassaemia in quattro popolazioni sarde e suoi rapporti con la distribuzione dei gruppi sanguigni e della malaria - *Boll. Inst. Suroter.*, 36: 206.
- CARCASSI, V.; CEPPELLINI, R. & SINISCALCO, M. (1957) - Il tracciato elettroforetico dell'emoglobina per una migliore discriminazione della talesssemia - *Haematol.*, 42: 1635.
- CAUCHI, M.N. (1970) - The incidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and thalassaemia in Malta - *Br. J. Haemat.*, 18: 101.

- ÇAVDAR, A. . & ARCASOY, A. (1971) - The incidence of beta thalassaemia and abnormal hemoglobins in Turkey - *Acta Haemat.*, 45: 312.
- CEPPELLINI, R. (1959) - L'emoglobina normale lenta A₂ - *Acta Genet. Med.*, 2: 47.
- CEZAR, P.C.; MIZUSAKI, K.; PINTO JR., W. ; OPROMOLLA, D.V.A. & BEIGUELMAN, B. - (1974) - Hemoglobina S e lepra - *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 7: 151.
- CHARACHE, S. & RICHARDSON, S.N. (1964) - Prolonged survival of a patient with sickle cell anemia - *Arch. Intern. Med.* 113: 844.
- CHERNOFF, A.I. (1959) - The distribution of thalassemia gene : a historical review. *Blood*, 14: 899.
- CHOREMIS, C.; DEFARANAS, B.; FESSAS, P.; FRASER, G.R.; KATTAMIS, C.; LOUKOPOULOS, G. & ZANNOS-MARIOLEA, L. (1964) - General aspects of complete village surveys in the Arta area of Greece for thalassemia and its interaction with Hb S and G6-PD deficiency - problems in Cooley anemia. - *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 119: 415.
- CHOREMIS, C.; FESSAS, P.; KATTAMIS, C.; STAMATOYANNOPOULOS, G.; ZANNOS-MARIOLEA, L.; KARAKLIS, A. & BELIOS, G. (1963) - Three inherited red cell abnormalities in a district of Greece - *Lancet* 1: 907.
- CIVIDALLI, G.; LOCKER, H. & RUSSEL, A. (1971) - Increased permeability of erythrocytes membrane in thalassaemia - *Blood*, 37: 716.
- CIVIDALLI, G. & RUSSEL, A. (1970) - The erythrocyte membrane and its permeability to cations - *Harefuah*, 78: 372.
- CLEGG, J.B.; NAUGHTON, M.A. & WEATHERALL, D.J. (1965) - An improved method for the characterization of human haemoglobin mutants; identification of haemoglobin N (Baltimore) - *Nature (Lond.)*, 207: 945.
- COLOMBO, B. & BAGLIONI, C. (1964) - Control of hemoglobin synthesis - *Cold. Spring. Harbor. Symp. Quan. Biol.*, 29: 347.

- COMINGS, D.E. (1970) - "The hemoglobinopathies and thalassemia"
In: GOODMAN, R.M. , ed. *"Genetic disorder of man"*, Boston ,
Little & Brown, p. 143.
- CONCONI, F.; BARGELLES, A.; DEL SENNO, L. ; GABURRO, D.; MELLONI
E.; MENINI, E.; PONTREMOLI, S.; VIGI, V. & VOLPATO, S. (1970) -
Globin chain synthesis in Ferrara and Sicilian beta thalasse
mia subjects - *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 52: 1147.
- COOLEY, T.B. (1927) - Von Jaksch's anemia - *Amer. J. Dis. Child.*
33: 786.
- COOLEY, T.B. & LEE, P. (1925) - A serie of cases of splenome -
galy in children with anemia and peculiar bone changes - *Trans.*
Amer. Pediat. Soc., 37: 29.
- CROSBY, W.H. & CONRAD, M.E. (1964) - Iron balance in thalasse -
mia minor - *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 119: 616.
- CROSBY, W.H. (1972) - Letter to the editor - *Blood*, 39: 298.
- CURTAIN, C.C.; KIDSON, C.; GAJDUSEK, D.C.; GORMAN, J.G. (1962) -
Distribution pattern, population genetics and anthropologi -
cal significance of thalassemia and abnormal hemoglobins in
Melanesia - *Am. J. Phys. Anthropol.*, 20: 475.
- DALAND, G.A. & CASTLE, W.B. (1948) - A simple and rapid methdd
for demonstrating sickling of the red blood cells; the use
of reducing agents - *J. Lab. Clin. Med.*, 33: 1082.
- DANCE, N. & HUHENS, E.R. (1962) - Investigation of a haemoglobin
consisting of gamma-F chains prepared from normal cord
blood - *Biochem. J.*, 83: 40.
- DIAMOND, M. P.; COTGROVE, I.; PARKER, A. (1965) - Case of in -
trauterine death due to alpha-thalassaemia. *Br. Med. J.*, 2 :
278.
- FESSAS, P. (1959) - Thalassaemia and alterations in the haemo -
globin pattern In: JONXIS, J.H.P. & DALAFRESNAYE, J.F., eds.
"Abnormal Haemoglobins: a symposium" , Oxford, Blackwell ,
p. 134.
- FESSAS, P. (1961) - The beta chains thalassaemias, In: LEHMANN,
H. & BETKE, K., eds. *"Haemoglobins Colloquium, Vienna, 1960"*
Stuttgart, Verlag., p. 90.

- FESSAS, P. (1963) - Inclusions of hemoglobin in erythrocytes and erythroblasts of thalassemia - *Blood*, 21: 21.
- FESSAS, P. (1965) - Abnormal haemoglobins, In: JONXIS, J. H. P., ed. "*Abnormal haemoglobins in Africa*", Oxford, Blackwell, p. 71.
- FESSAS, P. (1966) - The disturbance of hemoglobin synthesis in thalassemia - *Int. Symp. Comp. Hem. Strut.*, Thessaloniki, p. 51.
- FESSAS, P.; LOUKOPOULOS, D. & KALTSOYA, A. (1966) - Peptide analysis of the inclusions of erythroid cells in beta-thalassemia, *Biochim. Biophys. Acta*, 124: 430.
- FESSAS, P. & MASTROKALOS, N. (1959) - Demonstration of small components in red cell haemolysates by starch gel electrophoresis - *Nature*, 183: 30.
- FESSAS, P. & STAMATOYANNOPOULOS, G. (1962) - Absence of haemoglobin A₂ in an adult - *Nature*, 195: 1215.
- FINCH, J. T. (1973) - "Structure of sickled erythrocytes and sickle cell hemoglobin fibers" - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70: 718.
- FLEMING, A.F. (1972) - The incidence of heterozygous beta thalassaemia - *Med. J. Aust.* 2: 910.
- FOLAYAN ESAN, G.J. (1970) - The thalassaemia syndromes in Nigeria - *Br. J. Haemat.* 19: 47.
- FOY, H. ; KONDI, A.; TIMMS, G.L.; BRASS, W. & BUSHRA, F. (1954) - The variability of sickle cell rates in the tribes of Kenya and Southern Sudan, *Br. Med. J.*, 1: 294.
- FRASER, F.R.; STAMATOYANNOPOULOS, F. ; KATTAMIS, C.; LOUKOPOULOS, D.; DEFARANAS, B.; KITSOS, C.; ZANNOS-MARIOLEA, ; CHOREMIS, C. & MOTULSKY, A.G. (1964) - Thalassemias, abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Arta area of Greece - *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 119: 415.
- GABUZDA, T.G. ; NATHAN, D.G. & GARDNER, F.H. (1963) - The turnover of hemoglobins A and A₂ in the peripheral blood of three patients with thalassemia - *J. Clin. Invest.*, 42: 1678.

- GABUZDA, T.G.; NATHAN, D.G. & GARDNER, F.H. (1964) - Thalassaemia trait Genetic combinations of increased fetal and A₂ hemoglobins - *N. Engl. J. Med.*, 270: 1212.
- GERALD, P.S. (1964) Genetic determination of hemoglobin structure. *Medicine*, 43: 747-757.
- GILBERT, J.M.; THORNTON, A.G.; NIENHUIS, A.W. & ANDERSON, W. F. (1970) - Cell free hemoglobins synthesis in beta thalassaemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 67: 1854.
- GILBERTSON, A.A. (1965) - Anaesthesia in West African patients/ with sickle cell anaemia, haemoglobin SC disease and sickle cell trait - *Br. J. Anaesth.*, 37: 614.
- GOUTTAS, A. (1961) "Les expressions du gene thalassaemique in Greece" In: LEHMANN, H. & BETKE, K., eds., "*Haemoglobin Colloquium, Vienna, 1960*", Stuttgart, Verlag, p. 89.
- GOUTTAS, A.; FESSAS, P.; TSEVRENIS, H. & XEFTERI, E. (1965) - Description d'une nouvelle variété d'anémie hémolytique congénitale. *Sangue*: 26: 911.
- GRAY, G.R. & MARION, R.B. (1971) - Thalassaemia and G-6-PD in Chinese Canadians. - *Can. Med. Ass. J.*, 105: 283.
- GREPPI, E. (1928) - Ittero emolitico familiare con aumento della resistenza dei globuli - *Min. Med.*, 8: 1.
- HALDANE, J.B.S. (1949) - Disease and evolution. - *Ric. Sic.*, 19: 68.
- HAMILTON, R. & SCHAWARTZ, E. (1970) - Equal synthesis of alpha and beta chains in a Negro family with beta thalassemia-Am. *J. Hum. Genet.*, 22: 12.
- HAMILTON, H.E.; SHEEFS, R.F. & BROSSEAU, G. (1961) - Gamma thalassaemia - *J. Lab. Clin. Med.*, 60: 880.
- HARRIS, H. (1973) - "*The principles of human biochemical genetics*" 3a. ed., Amsterdam, North Holland.
- HECHT, F.; JONES, R.T. & KOLER, R. D. (1967) - Newborns infants with Hb Portland 1 - an indicator of alpha chain deficiency *Ann. Hum. Genet.*, 31: 215.

- HEINRICH, H.C. (1973) - Absorption of inorganic and food iron in children with heterozygous and homozygous beta thalassaemia *Z. Kinderheilkd*, 115: 1 .
- HERRICK, J.B. (1910) - Peculiar elongated and sickle and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia - *Arch. Intern. Med.*, 6: 517.
- HOFRICHTER, J. ; HENDRICKS, D.G. & EATON, W. E. (1973) "Structure of hemoglobin S fibers: optical detection of the molecular orientation in sickled erythrocytes" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70: 3604
- HOLZMANN, L. ; FINN, H.; LECHTAMAN, H. C. & HARMEL, M. H. (1969) - Anesthesia in patients with sickle cell disease; a review of 112 cases - *Anesth. Analg.*, 48: 566.
- HORTON, B. & HUISMAN, T.J.H. (1963) - Linkage of beta chain and delta chain structural genes of human hemoglobins - *Am. J. Hum. Genet.*, 15: 394.
- HORTON, B.; PAYNE, R.A.; BRIDGES, M.T. & HUISMAN, T. H. J. (1961) - Studies on an abnormal minor hemoglobin component - *Clin. Chem. Acta*, 6: 246.
- HORTON, B. F.; THOMPSON, R. B.; DOZY, A. M.; BENNET, F.; NECHTAMAN C. M.; NICHOLS, E. & HUISMAN, T. H. J. (1962) - Inhomogeneity of hemoglobin; the minor components of cord blood - *Blood*, 20: 302.
- HUEHNS, E. R.; HECHT, F.; KEIL, J. V. & MOTULSKY, A.G. (1964) Developmental hemoglobin anomalies in a chromosomal triplication; D₁ trisomy syndrome - *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 51 : 89.
- HUISMAN, T.H.J. (1974) - Personal communication, *apud* McKUSICK V.A. "Mendelian inheritance in man", 4a. ed., Baltimore , Johns Hopkins, 1975.
- HUNTSMAN, R.G.; METTERS, J. S. & YAWSON, G. I. (1972) - Diagnosis of sickle cell disease in the newborn infant - *J. Pediatrics*, 80: 279.
- INGRAM, V. M. (1957) - Gene mutations in human hemoglobin; The chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin *Nature*, 180: 326.

- INGRAM, V. M. (1964) - A molecular model for thalassemia - *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 119: 485.
- INGRAM, V. M. & STRETTON, A. D. W. (1959) - The genetic basis of the thalassemia diseases. - *Nature*, 184: 1903.
- ITANO, H. A. (1957) - The human hemoglobins. Their properties and genetic control - *Adv. Prot. Chem.*, 12: 215.
- JABLONSKY, S. (1969) - "*Illustrated dictionary of eponymic syndromes and diseases and their synonyms*", Philadelphia, Saunders.
- JACOB, H. S. ; BRAIN, M. C. & DACIE, J. V. (1968) - Altered sulphydryl reactivity of hemoglobins and red blood cell membranes in congenital Heinz body hemolytic anemia - *J. Clin. Invest.*, 47: 2664.
- JOSEPHSON, A. M. ; MASRI, M. S. ; SINGER, L. ; DWORKIN, M. & SINGER, K. (1958) - Starch block electrophoresis studies of human hemoglobins solutions. Results in cord blood, thalassemia and other haematological disorders - *Blood*, 13: 543.
- KAN, Y. W. (1974) - Personal communication, apud McKUSICK, V.A. "*Mendelian inheritance in man*", 4a. ed., Baltimore, Johns Hopkins, 1975.
- KAN, Y.W. ; ALLEN, A. & LOWENSTEIN, L. (1967) - Hydrops fetalis with alpha thalassaemia - *N. Engl. J. Med.*, 276: 18.
- KAN, Y. W. ; FORGET, B. G. & NATHAN, D. G. (1972) - Gamma-beta thalassemia: a cause of hemolytic disease of the newborns - *N. Engl. J. Med.*, 286: 129.
- KAN, Y. W. & NATHAN, D.G. (1968) - Beta thalassemia trait: detection at birth - *Science*, 161: 589.
- KAN, Y.W. & NATHAN, D.G. (1970) - Mild thalassemia: the result of interactions of alpha and beta thalassemia genes - *J. Clin. Invest.*, 49: 635.
- KAN, Y. W. ; SCHATZ, F. & NATHAN, D. G. (1968) - Globin chain synthesis in the alpha thalassemia syndromes - *J. Clin. Invest.*, 47: 2515.
- KATTAMIS, C. A. ; ATHANASIOS, C. & CHAIDAS, S. (1969) - G-6-PD

- deficiency and favism in the island of Rhodes. (Greece) - *J. Med. Genet.*, 6: 286.
- KATTAMIS, C. A.; HAIDAS, S.; METAXOTOU, M. & MATSANIOTIS, N. (1972) - Beta thalassemia, G-6-PD deficiency and atypical cholinesterase in Cyprus - *Br. Med. J.*, 3: 470.
- KENT, G.; MINNICH, D. T.; VOLINI, F. I. & ORFEI, E. (1966) - Autophagic vacuoles in human red cells - *Am. J. Pathol.*, 48: 831.
- KLEIHauer, E.; BRAUN, H. & BETKE, K. (1957) - Demonstration / von fetalem Hämoglobin in den erythrocyten eines blutausschritchs - *Klin. Wochr.*, 35: 637.
- KONOTEY-AHULU, F. I. D. (1969) - Anesthetic deaths and the sickle cell trait - *Lancet*, 1: 267.
- KONOTEY-AHULU, F. I. D. (1971) - Computers assisted analysis of data on 1,697 patients attending the sickle cell haemoglobinopathy clinic of Korle-Bu-Teaching Hospital, Accra, Ghana - *Ghana Med. J.*, 10: 241.
- KUNKEL, H. G.; CEPPELLINI, R.; MULLER-EBERHARD, U. & WOLF, (1957) - Observations on the minor basic hemoglobin components in blood of normal individuals and patients with the lassemia - *J. Clin. Invest.*, 36: 1615.
- LEACHMANN, R. D.; MILLER, W. T. & ATIAS, F. M. (1967) - Sickle cell trait complicated by sickle thrombi after open heart surgery - *Am. Heart. J.*, 74: 268.
- LEHMAN, H. (1959) - Distribution of variations in human haemoglobin synthesis, In: "Abnormal haemoglobins" Oxford, Blackwell.
- LESSIN, L.S. & JENSEN, W. N. - "Sickle cell anemia 1910-1973, an overview" - *Arch. Intern. Med.*, 133: 529.
- LEWIS, R. A. & KAY, R. W. (1965) apud KASSIRSKY, I. & ALEXEEV G. "Clinical haematology" Moscow, Mir Publishers, 1972.
- LIE-INJO, L. E. (1969) - Distribution of genetic red cell defects in South-East Asia - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 63: 664.

- LIE-INJO, L.E.; LIE, H. G. ; AGER, J. & LEHMANN, H. (1962) - Alpha thalassaemia as a cause of hydrops foetalis - *Br.J. Haemat.*, 8: 1.
- LOPEZ, C.G. & LIE-INJO (1971) - Alpha thalassaemia in new - borns in West Malaysia - *Hum. Hered.*, 21: 185.
- LOUDERBACK, A. L. ; YOUNE, Y.; FONTANA, A. & NATLAND, M. (1974) Clinical evaluation of a rapid screening test for sickle cell trait (S-) and sickle cell anemia (SS) - *Clin.Chem.* 20: 761.
- MALAMOS, B. ; FESSAS, P. & STAMATOYANNOPOULOS, G. (1962)-Types of thalassaemia trait carriers as revealed by a study of their incidence in Greece - *Br. J. Haemat.*, 8: 5.
- MARINONE, G. & BERNASCONI, C. (1957) - Studio elettroforético quantitativo su blocco d'amido dell'emoglobina normale e del talassemici - *Haematologica*, 42: 1.
- McFADZEAN, A. J. S. & TODD, D. (1971) - Cooley's anaemia among the Tanka of South China - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 59.
- McGARRY, P. & DUNCAN, C. (1973) - Anesthetic risks in sickle cell trait - *Pediatrics*, 51: 507.
- McKUSICK, V. A. (1975) - "Mendelian inheritance in man", 4a. ed. , Baltimore, Johns Hopkins.
- McPHERDAN, P.; BARNES, M.G. & WEINSTEIN, J. (1972) Differential diagnosis of the abnormal mean corpuscular volume (MCV). *Ann. Intern. Med.*, 76: 869 - 870.
- MELO, J. M. (1966) - Comentarios acerca de la difusión de la hemoglobina S en Portugal y probablemente en la Península - *Sangre*, 11: 383.
- MICHELI, F. ; PENATI, F. & MOMIGLIANO, L. G. (1935) - Ulteriori ricerche sulla anemia ipocromica splenomegalica con poichilocitosi - *Atti Soc. Ital. Emat. Haematol.*, 16: (Suppl.).
- MINNICH, V.; NA-NAKORN, S.; CHONGCHAREONSUK, S. & KOCHAASENI S. (1954) - Mediterranean anemia. A study of thirty - two cases in Thailand - *Blood*, 9: 1.

- MINNICH, V.; NA-NAKORN, S.; TUCHINDA, S.; PRAVITT, W. & MOORE C.V. - (1958) - Inclusions body anemia in Thailand - *Proc. Sixth Congress of the International Society of Hematology, Boston, 1957*, N. York, Grune & Stratton, p. 743.
- MODELL, C.B.; BENSON, A. & PAYLING-WRIGHT, C.R. (1957) - Incidence of beta thalassaemia trait among Cypriots in London - *Br. Med. J.*, 3: 737.
- MOSELEY, J.E. (1962) - The thalassemias: variants and roent - gen bone changes - *J. Mt. Sinai Hosp.*, 29: 199.
- MOTULSKY, A. G. (1960a) - Population genetics of G-6-PD deficiency of the red cell - *Proc. Conf. Genet. Polym. Geog. Variations Disease, U.S.A.*, Health, Educ. Welf, 258-292.
- MOTULSKY, A. G. (1960b) - Metabolic polymorphisms and the role of infectious diseases in human evolution - *Hum. Biol.*, 32: 28.
- MOTULSKY, A. G. (1964a) - Current concepts of the genetics of the thalassaemias - *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 29: 399.
- MOTULSKY, A.G. (1964b) - Pharmacogenetics - *Prog. Med. Genet*- 3: 49.
- MOTULSKY, A.G. (1973) - Frequency of sickling disorder in U. S. blacks - *N. Engl. J. Med.*, 288: 31.
- MOTULSKY, A.G. & STAMATOYANNOPOULOS, G. (1968) - Drugs, anesthesia and abnormal hemoglobins - *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 151: 807.
- MULLER, C. J. (1961) - *A comparative study of the structure of mammalian and avian haemoglobins* Doctoral thesis - Groningen, Holland.
- MURAYAMA, M. (1966) - Molecular mechanisms of the red cell sickling - *Science*, 153: 145.
- NANCE, W.E. (1963) Genetic control of hemoglobin synthesis - *Science*, 141: 123-130.
- NATHAN, D. G. (1972) - Thalassemia - *N. Engl. J. Med.*, 286 : 586.

- NATHAN, D.G. (1973) - Thalassemia: a progress report applied molecular biology - *N. Engl. J. Med.*, 288: 1122.
- NATHAN, D. G. & GUNN, R. B. (1966) - Thalassemia: the consequence of unbalanced hemoglobin synthesis - *Am. J. Med.*, 41: 815.
- NATHAN, D. G. ; STOSSEL, T. B. ; GUNN, R. B. ; ZARKOWSKY, H. S. & LAFORET, M. T. (1969) - Influence of hemoglobin precipitation on erythrocyte metabolism in alpha and beta thalassemia - *J. Clin. Invest.*, 48: 33.
- NATTA, C.; BANK, J. ; NIAZI, G.; MARKS, P.A. & BANK, A. (1963) Decreased beta globin mRNA activity in bone marrow cells in homozygous and heterozygous beta thalassaemia - *Nat. New. Biol.*, 244: 280.
- NEEL, J. V.; WELLS, I. C. & ITANO, H. A. (1951) - Familial differences in the proportion of abnormal hemoglobin present in the sickle cell trait - *J. Clin. Invest.*, 30:1120.
- NIENHUIS, A. W. & ANDERSON, W. F. (1971) - Isolation and translation of hemoglobin messenger RNA from thalassemia, sickle-cell anemia and normal human reticulocytes- *J. Clin. Invest.*, 50: 2458.
- NIENHUIS, A. W. ; LAYCOCK, D. G. & ANDERSON , W. F. (1971) - Translation of rabbit haemoglobin messenger RNA by thalassaemic and non-thalassaemic ribosomes - *Nat. New.Biol.* 231: 205.
- NOWICKI, L.; BECKER, H.; BEHNKEN, L.; MARTIN, H. & SPRENGER, A. - (1972) - Diagnosis of thalassemia minor with a report on another human thalassaemic family - *Deuch. Med. Wochenschr.*, 97: 273.
- OHTA, Y.; YAMADKA, K.; SUMIDA, I. & YANASE, T. (1971) - Haemoglobin Miyada, a β - δ fusion peptide (anti-Lepore) type discovered in a Japanese family. *Nat. New Biol.*, 234:
- PALE, J.W.; COLE, F. H. ; RICHARDSON, R. L.; GERAMI, S. & BOOTH, A. - (1970) - Thoracic surgery in the patient with sickle-cell hemoglobin - *Ann. Thorac. Surg.* 10: 54.
- PAULING, L., ITANO, H.A.; SINGER, S. J. & WELLS, I.C. (1949)

- Sickle-cell anemia - a molecular disease - *Science*, 110: 543.
- PEARSON, H. A. (1969) - Hemoglobin S - Thalassemia syndrome in Negro children - *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 165: 83.
- PEARSON, H. A.; D'BRIEN, R. T. & McINTOSH, S. (1973) - Screening for thalassemia trait by electronic measurement of mean corpuscular volume - *N. Engl. J. Med.*, 288: 351 .
- PEARSON, H. A. ; SHANKLIN, D. R. & BRODINE, C. R. (1965) - Alpha-thalassemia as a cause of nonimmunological hydrops - *Am. J. Dis. Child.*, 109: 168.
- PELLICER, A. & CASADO, A. (1970) - Frequency of thalassemia and G-6-PD deficiency on five provinces of Spain - *Am. J. Hum. Genet.*, 22: 298.
- PLATO, C. C.; RUCKNAGEL, D. L. & GERSHOWITZ, H. (1964) - Studies on the distribution of G-6-PD deficiency, thalassemia and other genetic traits in the coastal and mountains villages of Cyprus - *Am. J. Hum. Genet.* 16: 267.
- POOTRAKUL, S. ; WASI, P. & NANAKORN, S. (1967) - Haemoglobin Bart's hydrops foetalis in Thailand - *Ann. Hum. Genet.*, 30: 293.
- RAMALHO, A. S. (1975a) - Investigação dos traços talassêmicos beta e delta-beta em uma amostra da população estudantil de Campinas, SP - Tese de Doutorado, UNICAMP.
- RAMALHO, A. S. (1975b) - A talassemia como causa de an anemia hipocrômica e microcítica em nosso meio - *Rev. Bras. Patol Clin.*, 11: 261.
- RAMALHO, A.S. (1976a) - Hemoglobina S em doadores de sangue brasileiros - *Rev. Ass. Med. Bras.* 22: 467.
- RAMALHO, A. S. ; NASSIM JORGE, R. ; OLIVEIRA, J. A. & PEREIRA D. A. - (1976b) - Hemoglobina S em recém-nascidos brasileiros - *J. Pediatria*, 41: 22.
- RAMALHO, A. S. & BEIGUELMAN, B. - (1977) - Sickle cell trait and tuberculosis - *Ciência e Cultura* 20: 1149.
- RAMOT, B. ; BEN-BASSAT, I. ; FAFNI, D. & ZAANOON, R. (1970) - A family with three beta-delta thalassemia homozygotes - *Blood*. 35:158.

- RANNEY, H. M. ; JACOBS, A. S. ; BRADLEY, T. B. & CORDOVA, F. A. [1963] - A new variant of haemoglobin A₂ and its segregation in a family with haemoglobin S - *Nature*, 197:164.
- RATTEN, G. J. & BEISCHER, N. A. (1972) - The significance of anaemia in obstetric population in Australia - *J. Obst. Gynaecol. Br. Commonw.*, 79: 228.
- RAVEN, J. L. (1972) - Haemoglobinopathies in Australia - *Med. J. Aust.*, 2: 726.
- RICH, A. (1952) - Studies on the hemoglobin of Cooley's anemia and Cooley's trait - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 38: 187.
- RIEDER, R. F.; ZINKHAM, W. H. & HOTZMAN, N. A. (1965) - Hemoglobin Zurich - *Am. J. Med.*, 39: 20.
- RIETTI, F. (1925) - Ittero emolitico primitivo - *Atti Accad. Scient. Med. Nat. Ferrara*, 2: 14.
- RIFKIND, R. A. (1966) - Destruction of injured red cells " in vivo" - *Am J. Med.*, 41: 711.
- RIGAS, D. A.; KOLER, R. D. & OSGOOD, E. E. (1955) - New haemoglobin possessing a higher electrophoretic mobility than normal adult haemoglobin - *Science*, 121: 372.
- ROBERTS, A. V.; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J. & OHTA, Y. (1973) Synthesis *in vitro* of anti-Lepore haemoglobin. *Nat. New Biol.*, 245: 23-24.
- ROCHE, J. ; DERRIEN, Y.; DIACONO, G. & ROQUES, M. (1953)- Sur les hémoglobines des thalassémiques - *Rev. Hémat.*, 8: 282.
- ROY, R.N. ; BANERJEE, D. ; CHAKRABORTY, K. N. & BASU, S. P. - (1971) - Observations on radiological changes of bones in thalassaemia syndrome *J. Indian Med. Assoc.* , 57: 90.
- ROY, R. N. & ROY-CHAUDHURY, S. K. (1967) - Sickle cell trait in the tribal population in Madhya Pradesh and Orissa (India) - *J. Indian Med. Assoc.*, 49: 107.
- RUCNAGEL, D. L. (1966) - On the geographical distribution and ethnic origin of thalassaemia - *N. Z. Med. J.*, 65: 626.

- RUMEN, N. M. (1975) - Inhibition of sickling in erythrocytes by amino acids - *Blood*, 45: 45.
- SCHENK, E. A. (1964) - Sick cell trait and superior longitudinal sinus thrombosis - *Ann. Int. Med.*, 60: 465.
- SCHMAIER, A.H. ; MAURER, H. M. ; JOHNSTON, C. L. SCOTT, R. S. (1973) - Alpha thalassemia screening in neonates by mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin determination - *J. Pediatrics*, 83: 794.
- SCHMIDT, R. M. (1973) - Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies - *JAMA*, 224: 1276.
- SCHOKKER, R. C.; WENT, L. N. & BOK, J. (1966) - A new genetic variant of beta thalassaemia - *Nature*, 209: 44.
- SCHROEDER, W. A.; CUA, J. T. ; MATSUDA, G. & FENNINGER, W. D. (1962) Hemoglobin F₁ : an acetyl-containing hemoglobin - *Biochem. Biophys.*, 63: 532.
- SCHROEDER, W. A.; HUISMAN, T.H.J.; SHELTON, J. R. ; SHELTON, J. B. ; KLEIHAUER, E. F. ; DOZY, A. M. & ROBERTSON, B. (1968) Evidence for multiple structural genes for the gamma-chain of human fetal hemoglobin - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 60: 537.
- SCHWARTZ, E. (1969) - The silent carrier of beta thalassemia - *N. Engl. J. Med.* , 281: 1327.
- SCURR, C. & FELDMAN, S. (1972) - *Fundamentos científicos de la anestesia* - Barcelona, Ed. Científico-medica.
- SERJEANT, G. R. (1970) - The clinical features in adults with sickle cell anemia - *West Indian Med. J.*, 19: 1.
- SERJEANT, G. R. - (1974) - The clinical features of sickle cell disease - Amsterdam, North-Holland.
- SILVESTRONI, E. & BIANCO, I. - (1944) - Microdrepanocitemia in un soggetto di razza bianca - *Boll. Acad. Med. Roma*, 70: 347.
- SILVESTRONI, E. & BIANCO, I. (1959) - The distribution of the microcythaemias (or thalassaemias) in Italy - In JONXIS J. H. P. & DELAFRESNAYE, J. F., eds. Abnormal haemoglobins - A symposium - Oxford, Blackwell, p. 242.

- SINGER, K.; CHERNOFF, A. I. & SINGER, L. (1951) 'Studies on abnormal hemoglobins I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation - *Blood*, 6: 413.
- SINGER, K. ; KRAUS, A. P. ; SINGER, L.; RUBINSTEIN, H. M. & GOLDBERG, S. R. (1954) - Studies on abnormal hemoglobins - X. A new syndrome: hemoglobin C - thalassemia disease *Blood* 9: 1032.
- SINISCALCO, M. ; BERNINI, L. & MOTULSKY, A. G. (1961) - Favism and thalassaemia in Sardinia and their relationship - to malaria - *Nature*, 190: 1170.
- SLATER, L.M. ; MUIR, W. A. & WEED, R. I. (1968) - Influence of splenectomy on insoluble hemoglobin inclusion bodies in beta-thalassemic erythrocytes - *Blood*, 31: 766.
- SMITH, C. A. (1959) - *The physiology of the newborn infant* - Illinois, Charles Thomas Publisher, 3a. ed.
- SMITH, E. W. & TORBERT, J. V. (1958) - Two abnormal hemoglobins with evidence for a new genetic locus for hemoglobin formation - *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 102: 38.
- SMITH, M. B.; WHITESIDE, M. G. & CAMPBELL, D. G. (1971) - The occurrence of heterozygous beta-thalassaemia as screened by quantitative haemoglobin electrophoresis in pregnancy - *Med. J. Aust.*, 1: 1273.
- STEINER, J. ; MARTI, H.R. & DEAN, D. (1971) - Decreased hemoglobin A₂ concentration in iron deficiency anemia - *Acta Haematol.*, 45: 77.
- STURGEON, P. & FINCH, C. A. (1957) - Erythrokinetics in Cooley's anemia - *Blood*, 12: 64.
- TERRENATO, L. (1973) - Beta - and non-beta thalassaemia in Sardinia and their frequencies - *Ann. Hum. Genet.*, 36:285.
- TODD, D. ; LAI, M. & BRAGA, C. A. (1967) - Thalassaemia and hydrops foetalis - family studies - *Br. Med. J.* ,3: 347.
- TONDO, C. C. & SALZANO, F. M. (1962) - Abnormal hemoglobin in a Brazilian Negro population - *Amer. J. Hum. Genet.* 14: 401.

- VALENTINE, W. N. & NEEL, J. V. (1944) - Hematologic and genetic study of the transmission of thalassemia - *Arch. Int. Med.*, 74: 185.
- VECCHIO, F. (1948) - Sulla resistenza dell'emoglobina alla desnaturalizzazione alcalina negli ammalati di anemia di Cooley e nei loro familiari - *Prog. Med. (Napoli)*, 4: 201.
- VELLA, F. (1958) - Heterogeneity of human foetal haemoglobin. The incidence of foetal variants in Singapore - *Nature*, 184: 272.
- VELLA, F. ; WELLS, R. H. C. ; AGER, J. A. M. & LEHMANN, H. (1958) - A haemoglobinopathy involving haemoglobin H and a new haemoglobin - *Br. Med. J.*, 1: 752.
- VIGI, V. ; VOLPATO, S. ; GABURRO, D. ; CONCONI, F. ; BARGELLESII, A. & PONTREMOLI, S. (1969) - The correlation between red cell survival and excess of alpha-globin synthesis in beta-thalassaemia - *Br. J. Haematol.*, 16: 25.
- WASI, P. ; DISTHASONGCHAM, P. & NANAKORN, S. (1968) - The effects of iron deficiency on the levels of hemoglobin A₂ and F - *Lab. Clin. Med.*, 71: 85.
- WASI, P. ; NANAKORN, S. ; SOOKANCK, M. ; DISTHASONGCHAM, P. ; PORNPATKUL, M. & PANICH, V. (1969) - Alpha- and beta. thalassaemia in Thailand, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 165: 60.
- WASI, P. ; NANAKORN, S. & POOTRAKUL, S. - (1974) - "The α thalassaemias" - *Clin. Haematol.*, 3: 383.
- WEATHERALL, D. J. (1963) - Abnormal haemoglobins in the neonatal period and their relationship to thalassaemia - *Br. J. Haematol.*, 9: 265.
- WEATHERALL, D. J. (1964) - Biochemical phenotypes of thalassaemia in the American Negro population. Problems in Cooley's anemia - *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 119: 450.
- WEATHERALL, D. J. (1967) - *Los síndromes talasémicos*, Barcelona, Toray.
- WEATHERALL, D. J. (1972) - The thalassaemias, In : STANBURY, J. B. ; WYNGAARDEN, J. B. & FRIEDRICKSON, D. S., eds. *The metabolic basis of inherited disease* - N. York, McGraw - Hill, 3a. ed., p. 1432.

- WEATHERALL, D. J. (1978) - "The thalassemias" In: STANBURY , J. B. ; WYNGAARDEN, J. B. e FRIEDRICKSON, D. S. eds. *The metabolic basis of inherited disease*. N. York, McGraw-Hill p. 1508.
- WEATHERALL, D. J. ; CLEGG, J. B. & NAUGHTON, M. A. (1965) - Globin synthesis in thalassaemia. an in vitro study *Nature*, 208: 1061.
- WEATHERALL, D. J. ; CLEGG, J. B. & WONG HOCK BOON, (1970) - The haemoglobin constitution of infants with the haemoglobin Bart's hydrops foetalis syndrome - *Br. J. Haematol.* 18: 357.
- WEATHERALL, D. J. ; GILES, H. M. ; CLEGG, J. B.; BLANDSON, J. A. ; MUSTAFA, D. ; BOI-DOKU, F. S. & CHAUDHURY, D. S. (1971) Preliminary surveys for the prevalence of the thalassaemia genes in some African populations - *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 65: 253.
- WEATHERALL, D. J. & VELLA, F. (1960) - Thalassaemia in a Gurskha family - *Br. Med. J.*, 1: 1711.
- WELLS, I. C. & ITANO, H. A. (1951) - Ratio of sickle cell anemia hemoglobin to normal hemoglobin in sicklemics - *J. Biol. Chem.*, 188: 65.
- WEINSTEIN, E. D.; RUCNAGEL, D. L. & SHAW, M. W. (1965) - Quantitative studies on A₂ , sickle cell and fetal hemoglobins in Negroes with mongolism - *Amer. J. Hum. Genet.*, 17: 443.
- WELLER, S. D. V.; APLEY, J. & RAPER, A. B. (1966) - Malformations associated with precocious synthesis of adult hemoglobin - *Lancet*, 1: 777.
- WENNBERG, E. & WEISS, L. (1968) - Splenic erythroclasia: an electron microscopic study of hemoglobin H disease - *Blood*, 31: 778.
- WENT, L. N. & MacIVER, J. E. (1961) - Thalassaemia in the West Indies *Blood*, 17: 166.
- WHIPPLE, G. H. & BRADFORD, W. L. (1936) - Mediterranean disease - thalassemia (erythroblastic anemia of Cooley) - *J. Pediatrics*, 9: 279.

- WHITE, J. C. & BEAVEN, G. H. (1959) - Foetal haemoglobin-*Br. Med. Bull.*, 15: 33.
- WINSLOW, R. M. & INGRAM, V. M. (1966) - Peptide chain synthesis of human hemoglobins A and A₂ - *J. Biol. Chem.*, 241: 1144.
- WINSLOW, R. M. & ANDERSON, W. F. (1978) - "The hemoglobinopathies" In: STANBURY, J. B.; WYNGAARDEN, J. B. & FRIEDRICKSON, D. S., eds. *The metabolic basis of inherited disease* N. York, McGraw-Hill, p. 1465.
- WINTERBOURN, C. C. & CARREL, R. W. (1973) - "The attachment of Heinz bodies to the red cell membrane" - *Br. J. Haematol.*, 25: 585.
- WOLF, J. A. & IGNATOV, V. G. (1963) - Heterogeneity of the α -thalassemia major - *Am. J. Dis. Child.*, 105: 234.
- WOODROW, J. C. ; NOBLE, R. L. & MARTINDALE, J. H. (1964) - Haemoglobin H disease in an English family - *Br. Med. J.*, 1: 36.
- ZUELZER, W. W. & KAPLAN, E. (1954) - Thalassemia hemoglobin/C disease - a new syndrome presumably due to combination of the genes for thalassemia and hemoglobin C. - *Blood*, 9: 1054.
- ZUELZER, W. W. ; NEEL, J. V. & ROBINSON, A. R. (1956) - Abnormal hemoglobins, In: TOCANTINS, L. M. ed. *Progress in Hematology*, N. York, Grune & Stratton, p. 91.
- ZUELZER, W. W. ; ROBINSON, A. R. & BROOKER, C. R. (1961) - Reciprocal relationship of hemoglobin A₂ and F in β -thalassemia - a key to the genetic control of the hemoglobin F - *Blood*, 17: 393.