

BC/80283

IB/7779

MARIA DE FATIMA SONATI

"TALASSEMIA ALFA EM UMA POPULAÇÃO NEGRÓIDE BRASILEIRA"

Tese de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Genética
do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Orientador de Tese:

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Orientador de Programa de Pós-Gra-
duação:

Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho

Depto. de Genética Médica - FCM

UNICAMP.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

CAMPINAS

1987

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A COTAÇÃO FINAL DA Tese
DEPENDIDA PELA COMISSÃO MARIA DE FATIMA SONATI, E
APROVADA PELA COMISSÃO JULCADOA.

Julc.
12/01/82

Classif.	T
Autor	S057K
V.	Ex.
Tombo BC	7779-JB
18/	711

CM 000579937

18/ 80283

BC/ 7779

A parte experimental desse trabalho foi realizada no Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, e contou com a colaboração da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior do Ministério da Educação e Cultura (CAPES), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Fernando Ferreira Costa, orientador
desse trabalho.

Ao Prof.Dr. Antonio Sérgio Ramalho, orientador do
programa de Pós-Graduação.

Ao Prof.Dr. Bernardo Beiguelman, pela orientação
da análise estatística.

Aos demais Professores do Curso de Pós-Graduação.

A todos os colegas e funcionários dos Deptos. de
Genética Médica e de Patologia Clínica - FCM -
UNICAMP.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	14
CASUÍSTICA.....	16
MÉTODOS.....	18
1. Hematimetria.....	19
2. Análise das Hemoglobinas.....	19
3. Quantificação das Hemoglobinas.....	23
4. Teste de Solubilidade das Hemoglobinas.....	24
5. Pesquisa de Corpos de Inclusão de HbH.....	24
Análise Estatística.....	25
RESULTADOS.....	27
Frequência e Quantificação da Hb Bart's Encontrada em 320 Nascimento - Estima- tiva das Frequências Gênicas e Genotípicas.....	28
Concentração de Hemoglobina, Volume Cor- puscular Médio e Hemoglobina Corpuscular Média nos Diferentes Grupos de RN.....	35
Características Hematológicas das Mães.....	42

DISCUSSÃO.....	53
RESUMO E CONCLUSÕES.....	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

INTRODUÇÃO

As doenças conseqüentes às alterações hereditárias das hemoglobinas compreendem um grupo heterogêneo de condições clínicas onde estão representadas algumas das mais freqüentes doenças hereditárias humanas (87). Essas alterações comprometem o heme ou as cadeias de globinas. As anomalias genéticas envolvendo o heme, além de extremamente raras, são ainda pouco conhecidas. O termo hemoglobinopatias está, pois, praticamente restrito aos distúrbios hereditários da estrutura ou do ritmo de síntese das cadeias de globinas. As hemoglobinopatias podem ser classificadas, de uma forma geral, em quatro grandes grupos, cujos limites não estão ainda rigorosamente definidos: o primeiro compreende as alterações estruturais das cadeias globínicas; as síndromes talassêmicas, caracterizadas pela supressão parcial ou total da síntese de um ou mais tipos de cadeias globínicas, correspondem ao segundo grupo; um terceiro contingente apresenta alterações tanto na estrutura como no ritmo de síntese das cadeias de globinas; e, finalmente, existe um grupo heterogêneo de alterações clinicamente assintomáticas, denominadas "Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal", caracterizadas pela produção de quantidades apreciáveis de Hemoglobina Fetal (Hb Fetal) após o período neonatal (87).

As síndromes talassêmicas são representadas por um grupo heterogêneo de doenças cujo mecanismo fisiopatológico básico é decorrente da síntese deficiente de um dos tipos de cadeias da

hemoglobina, estando o outro preservado. Mais raramente, pode estar afetada a síntese de mais de um tipo de cadeia simultaneamente (4,26,86). A classificação das talassemias depende da cadeia cuja síntese está reduzida (talassemia alfa, talassemia beta, talassemia delta, delta-beta, etc) (92). A menor produção de cadeias de globinas conduz à formação deficiente de hemoglobina e, conseqüentemente, microcitose e hipocromia, características dessas síndromes (71). Como a síntese de cadeias não afetadas permanece inalterada, o seu excesso relativo provoca a formação de agregados instáveis de cadeias que não se combinaram com a cadeia complementar. A precipitação desses agregados determinam lesões na membrana celular e distúrbios metabólicos vários, que seriam responsáveis pela destruição prematura dos eritroblastos na medula óssea, e pela reduzida sobrevivência dos eritrócitos na circulação (84).

Na talassemia alfa (α -), a disponibilidade reduzida de cadeias alfa no feto resulta em acúmulo de cadeias gama (γ), que se agregam em tetrâmeros, dando origem a uma hemoglobina anômala, denominada Hemoglobina Bart's (Hb Bart's) (γ_4) (46,82,86). Essa hemoglobina foi identificada e caracterizada pela primeira vez no Hospital São Bartolomeu de Londres (conhecido por Bart's), por Ager e Lehmann, em 1958, em uma criança com 4 semanas de vida, portadora de alterações hematólogicas compatíveis com talassemia. A Hb Bart's exibe afinidade aumentada pelo oxigênio e é mais resistente ao tratamento alcalino que a Hemoglobina A (HbA), embora menos resistente que a Hb Fetal. Posteriormente, foi observado que nesses pacientes,

acompanhando a redução na produção de cadeias gama, havia, com o decorrer do tempo, diminuição da concentração de Hb Bart's (85). Em alguns indivíduos adultos com talassemia alfa havia excesso de cadeias beta (β), dando origem à formação de Hemoglobina H (HbH) (β_4). A HbH é instável e tende a formar precipitados nas hemácias, que podem ser visualizados à microscopia óptica após incubação com azul brilhante de cresil (corpos de inclusão de HbH). A afinidade pelo oxigênio é elevada, com valores cerca de dez vezes maiores que a da HbA. A HbH foi descrita em 1955, por Rigas, Kohler e Osgood, nos Estados Unidos, e, independentemente, por Gouttas e colaboradores, na Grécia (10,85).

A elevada prevalência da talassemia alfa nas populações asiáticas facilitou seu estudo extensivo nessa região, principalmente na Tailândia (53). Nessas populações foram descritas duas formas principais da doença, uma com manifestações laboratoriais discretas, denominada talassemia alfa-2, e outra com manifestações mais acentuadas, a talassemia alfa-1. Cada uma dessas formas, ou a interação delas, pode dar origem a quatro síndromes clínicas: a primeira delas, a heterozigose da talassemia alfa-1, é caracterizada hematologicamente por discretas microcitose e hipocromia, com pequeno grau de anisocitose e poiquilocitose, diminuição da fragilidade osmótica, nível de hemoglobina ligeiramente diminuído ou normal, contagem de hemácias geralmente maior que 5 milhões, e presença de 5-10% de Hb Bart's ao nascimento, sem alterações hemoglobínicas no adulto. A segunda, a heterozigose da talassemia alfa-2, cujos portadores não apre-

sentam qualquer alteração hematológica, nem das frações hemoglobínicas do adulto, é caracterizada pela presença de 1 - 3% de Hb Bart's ao nascimento. A terceira síndrome é a Doença da HbH, resultante da interação entre a talassemia alfa-1 e a talassemia alfa-2, caracterizada por anemia hemolítica crônica de intensidade moderada. Os portadores apresentam hepatoesplenomegalia, moderada reticulocitose, redução na fragilidade osmótica, presença de 25-50% de Hb Bart's ao nascimento e 5 - 30% de HbH na vida adulta. A anemia pode tornar-se mais grave durante a gravidez, infecções, ou após a ingestão de drogas oxidantes, que aceleram a oxidação e precipitação da HbH. O sangue periférico mostra microcitose, hipocromia, poiquilocitose, policromatofilia, células em alvo, e as hemácias apresentam corpos de inclusão após incubação do sangue com azul brilhante de cresil. A quarta síndrome é a Hidropisia Fetal por Hb Bart's (homozigose da talassemia alfa-1). Essa alteração clínica tem como consequência a morte intra-uterina, ou algumas horas após o nascimento, de seus portadores. É caracterizada por anemia acentuada, hepatoesplenomegalia, edema, ascite e hidropisia grave. O sangue periférico apresenta intensa anisocitose, poiquilocitose, hipocromia, reticulocitose, presença de numerosos eritroblastos, e contém essencialmente Hb Bart's, podendo aparecer pequenas quantidades de HbH e Hb Portland I (embrionária). A afinidade elevada pelo oxigênio da Hb Bart's impede a efetiva oxigenação dos tecidos, causando hipóxia grave, que é, em última análise, a causa da morte fetal (10,48,54,84).

Em relação às síndromes descritas, duas hipóteses alternativas

foram propostas para explicar o mecanismo genético da talassemia alfa (10). De acordo com a primeira hipótese, somente um "locus" em cada cromossomo controlaria a síntese de cadeias alfa, com dois tipos de genes alelos de diferente gravidade: um associado à ausência completa (α^{t^0}) e o outro à redução parcial da síntese de cadeias alfa (α^{t^+}). Assim, o heterozigoto da talassemia alfa-1 seria portador do gene α^{t^0} em um dos cromossomos (α^{t^0} / α) e o heterozigoto da talassemia alfa-2 seria portador do gene α^{t^+} (α^{t^+} / α); a Doença da HbH seria causada pela interação dos genes α^{t^0} e α^{t^+} ($\alpha^{t^0} / \alpha^{t^+}$), e a Hidropisia Fetal por Hb Bart's pela homozigose do gene α^{t^0} ($\alpha^{t^0} / \alpha^{t^0}$). A segunda hipótese propunha que o "locus" da cadeia alfa estaria duplicado, e os indivíduos normais possuiriam um total de quatro genes, dois por genoma haplóide ($\alpha\alpha / \alpha\alpha$). Dessa forma, as manifestações da doença estariam associadas ao número de genes não funcionantes. Assim, o heterozigoto da talassemia alfa-1 teria dois genes não funcionantes no mesmo cromossomo ($\alpha^{t^0}\alpha^{t^0} / \alpha\alpha$); o heterozigoto da talassemia alfa-2 apenas um gene não funcionante ($\alpha^{t^0}\alpha / \alpha\alpha$); a Doença da HbH seria ocasionada pela ausência de atividade em três genes ($\alpha^{t^0}\alpha^{t^0} / \alpha^{t^0}\alpha$), e a Hidropisia Fetal por Hb Bart's seria causada pela ausência total de atividade gênica ($\alpha^{t^0}\alpha^{t^0} / \alpha^{t^0}\alpha^{t^0}$).

Apesar da demonstração de que o "locus" alfa era duplicado em muitas espécies animais, a ocorrência dessa duplicação na espécie humana permaneceu obscura durante muito tempo, e somente

foi esclarecida com o emprego de métodos de análise do ácido desoxirribonucleico (DNA) (43,58,77).

A organização e estrutura dos genes humanos das cadeias de globinas foram melhor definidas nos últimos anos com o emprego de nova metodologia de análise do DNA. Entre esses métodos destacam-se a análise dos fragmentos do DNA após digestão com endonucleases de ação restrita, e a formação de clones celulares utilizando genes humanos e tecnologia de recombinação do DNA (40). Os genes para as cadeias alfa são duplicados na espécie humana, ambos localizados no cromossomo 16, e separados por cerca de 3.700 bases nitrogenadas (9,20,85).

Os estudos de Genética Molecular, associados às análises de síntese "in vitro" de cadeias de globinas e quantificação das proporções de ácido ribonucleico (RNA) mensageiro de cadeias alfa e beta, facultaram o esclarecimento das anormalidades moleculares envolvidas nas talassemias alfa (20,39,57,58,64,90).

A talassemia alfa-1 está associada à completa ausência de produção de cadeias alfa, oriunda de deficiências envolvendo ambos os genes do mesmo cromossomo (— — / $\alpha \alpha$) ou, alternativamente, totalmente um dos genes e parcialmente o outro, que, no entanto, permanece inativo, denominado "gene disfuncional" (— (α) / $\alpha \alpha$). Na talassemia alfa-2 ocorre uma redução parcial da síntese, resultante de deficiência em um dos genes (— α / $\alpha \alpha$), ou de alterações onde ambos os genes estão presentes, mas o gene talassêmico apresenta atividade reduzida ($\alpha^T \alpha$ / $\alpha \alpha$) (85,87). Em algumas populações ocorrem ain-

da variantes estruturais da cadeia alfa, resultantes de mutações no código de terminação da cadeia, com conseqüente formação de cadeias alfa alongadas. Essas cadeias são sintetizadas em ritmo lento e assim produzem, em seus portadores, fenótipo de talassemia alfa. Dessas variantes estruturais, as mais frequentes são a Hemoglobina Constant Spring, no sudeste da Ásia, e a Hemoglobina Koya Dora, em certas regiões da Índia (10,85,87).

Os estudos de mapeamento gênico, que possibilitaram uma maior compreensão da talassemia alfa, resultaram em propostas de novas nomenclaturas, com o intuito de proporcionarem melhor correspondência entre fenótipos e genótipos (47). A tendência atual é denominar os diferentes tipos de talassemia alfa com nomenclatura semelhante à adotada para as talassemias beta. Assim, a deficiência completa dos genes no genoma haplóide corresponderia à talassemia alfa⁰ (α^0), com a conseqüente supressão total da síntese de cadeias alfa. Por outro lado, a deficiência de um único gene seria denominada talassemia alfa⁺ (α^+) com redução parcial da síntese de cadeias alfa. Essas duas formas poderiam se apresentar nos estados de heterozigose, homozigose, ou em interação (Tabela 1) (13,85,87).

Conley e colaboradores, no Johns Hopkins Hospital (USA), em 1960, mostraram que proporções variáveis de recém-nascidos (RN) negros apresentavam quantidades detectáveis de Hb Bart's em sangue proveniente de cordão umbilical. Análises hematológicas cuidadosas e estudos familiares destes RN sugeriram que eles

Tabela 1 - Diferentes formas de talassemia alfa (87)

DENOMINAÇÃO	GENÓTIPO	ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS
talassemia α^+ heterozigótica	$-\alpha/\alpha\alpha$	0-3% de Hb <u>Bart's</u> ao nascimento; alterações hematológicas mínimas ou ausentes
talassemia α^+ homozigótica	$-\alpha/-\alpha$	5-10% de Hb <u>Bart's</u> ao nascimento; microcitose e hipocromia discretas
talassemia α^0 heterozigótica	$-\alpha/\alpha\alpha$	similares ao da talassemia α^+ homozigótica
talassemia α^0 homozigótica	$-\alpha/-\alpha$	próximo de 100% de Hb <u>Bart's</u> ; Hidropisia Fetal por Hb <u>Bart's</u>
Interação α^0/α^+	$-\alpha/-\alpha$	25-50% de Hb <u>Bart's</u> ao nascimento; 5-30% de HbH na vida adulta. Doença da HbH.

seriam portadores de talassemia alfa (35). Nas populações de origem africana, a incidência de indivíduos com características fenotípicas de talassemia alfa, como microcitose e hipocromia, atinge valores de até 4% (35). No entanto, não existem, nas populações negras estudadas, descrições de Hidropisia Fetal por Hb Bart's. Além disso, a Doença da HbH é extremamente rara, e em geral não tão grave como aquela observada em indivíduos asiáticos e mediterrâneos. Esses dados conflitantes dificultaram sobremaneira a interpretação a respeito do significado da presença da Hb Bart's nas populações negras (11,35,83).

O estudo da estrutura dos genes humanos com mapeamento gênico elucidou os aspectos contraditórios da talassemia alfa em negros. Foi demonstrado que a forma de talassemia alfa prevalente nessas populações é a alfa+, isto é, há deficiência de um único gene no genoma haplóide, e que a forma alfa° (deficiência de dois genes em posição "cis") é praticamente inexistente. Assim, aqueles indivíduos que apresentavam fenótipo idêntico ao da talassemia alfa, possuíam na realidade o genótipo de homozigose da talassemia alfa+ (— α / — α), ou deficiência de dois genes alfa em posição "trans". Esses dados explicam a inexistência de Hidropisia Fetal por Hb Bart's, e os raros casos de Doença da HbH provavelmente tenham se originado de eventuais recombinações gênicas (15,17,20,34,35,36,70).

O diagnóstico da talassemia alfa pode apresentar grandes dificuldades, pois apenas dois estados expressam alterações clínicas significativas: a homozigose da talassemia alfa°

(Hidropisia Fetal por Hb Bart's), e a interação das formas alfa^o e alfa+ (Doença da HbH). Os demais estados não apresentam manifestações clínicas, e as alterações laboratoriais são pouco perceptíveis no adulto (10,35,85,87). No entanto, a presença de Hb Bart's em sangue de cordão umbilical permite identificar a doença no período neonatal, e, além disso, é possível correlacionar a proporção de hemoglobina anômala encontrada com a provável constituição genotípica (2,35,36,46,49,56,63,66,80,82).

Desse modo, um RN na população negróide que apresenta níveis de Hb Bart's superiores a 4% será quase certamente homozigoto da talassemia alfa+, ao passo que valores iguais ou inferiores a esse indicarão os heterozigotos da talassemia alfa+ (35,36).

Essa correlação foi inicialmente formulada a partir dos estudos conduzidos na Tailândia, e posteriormente confirmada por estudos de síntese "in vitro" de cadeias de globinas, e de mapeamento gênico com endonucleases de ação restrita

(2,27,34,35,36,44,49,53,85,87). O período neonatal apresenta-se então propício ao reconhecimento dessas formas de talassemia alfa, pois no adulto a HbH não é detectada quando em pequenas quantidades. É importante ressaltar, entretanto, que a detecção da Hb Bart's e sua quantificação apresenta certas limitações no reconhecimento da talassemia alfa, pois em muitos casos de heterozigotos da talassemia alfa+, as quantidades de Hb Bart's são indetectáveis, e, além disso, foram descritos alguns casos de indivíduos com genótipo normal e com Hb Bart's (56). Apesar dessas limitações, existe consenso na literatura que na ausência de métodos de análise do DNA, a quantificação da Hb Bart's ao nascimento é um indicador seguro da presença da talassemia

alfa, embora o número de heterozigotos seja, por essa técnica, subestimado (33,34,35,36,46,49,56,67,80,82).

A talassemia alfa pode estar associada a alterações estruturais da hemoglobina (22,36,37,38,73,74,75) ou às talassemias beta (5,45,52). A interação da talassemia beta homozigótica com as várias formas de talassemia alfa, sobretudo com a homozigose da talassemia alfa+, resulta em melhora nas manifestações clínicas, pois há redução no desequilíbrio entre a síntese de cadeias alfa e não-alfa, com conseqüente diminuição de cadeias alfa livres (5).

A interação entre a homozigose da hemoglobinopatia S e a homozigose da talassemia alfa+ resulta em modificações na apresentação laboratorial e clínica dos pacientes com anemia falciforme. Nesses casos estão elevados a contagem de hemácias, os níveis de hemoglobina e o nível de Hb A₂, ao passo que estão reduzidos o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), a contagem de reticulócitos e de células irreversivelmente falcizadas (CIF). Além disso, as hemácias apresentam maior deformabilidade, e sua sobrevivência em circulação é significativamente prolongada. Essas modificações parecem estar fundamentalmente relacionadas à diminuição da concentração intracelular de HbS, oriunda da talassemia alfa. A heterozigose da talassemia alfa+, por sua vez, parece não alterar significativamente a expressão clínica e laboratorial das doenças falciformes, embora os dados a esse respeito sejam ainda contraditórios

(1,12,16,19,21,23,32,36,51,72,76,89).

Como já referido, a talassemia alfa tem uma incidência elevada entre os povos asiáticos, e sua ocorrência foi assinalada na Indonésia, Malásia, Ceilão, Filipinas, Índia, China, Tailândia e Camboja (49,53,60,64,85). É também encontrada no Oriente Médio (Iêmen, Iraque, Líbano, Turquia e Arábia Saudita) (59,62,85) e na região do Mediterrâneo, principalmente na Grécia e na Itália (28,29,44,45,52,80,81,85). No continente africano, a talassemia alfa tem distribuição praticamente universal, com prevalência elevada de talassemia alfa+ (24,25,30,31,36,55,63,66,67,79,85,88). Na América Latina, a talassemia alfa foi detectada no México, Cuba, Jamaica, Colômbia, Peru e Costa Rica (3,13,18,41,50,68,69). No Brasil, os dados a respeito da talassemia alfa são escassos. São conhecidos poucos casos de Doença da HbH, e nos levantamentos populacionais existentes não foram utilizadas metodologias adequadas para detecção de talassemia alfa, ou a população estudada não era uma população selecionada (13,90,91,94).

OBJETIVOS

Considerando o expressivo contingente negróide que compõe a população brasileira e a escassez de dados a respeito da prevalência da talassemia alfa no Brasil, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar a incidência da Hb **Bart's** e estimar a frequência do haplótipo ("gene") talassêmico alfa em uma população negróide brasileira. Além disso, verificar sua possível interação com outras hemoglobinopatias, como a hemoglobinopatia S, e, por intermédio do estudo das mães, avaliar a incidência de talassemia beta nessa população.

CASUISTICA

Neste trabalho foram coletadas, para análise, amostras de sangue de cordão umbilical provenientes de 320 RN de mães negróides, e 317 amostras de sangue das respectivas mães. Estas foram escolhidas ao acaso na Maternidade de Campinas e na Maternidade da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). No conjunto, entre as mães analisadas, 42% eram mulatas e 58% negras.

As amostras de sangue de cordão umbilical foram coletadas em frascos contendo heparina como anticoagulante, na concentração de 15-20 UI/ml de sangue, e as de mães em frascos contendo EDTA (sal di-sódico do ácido etileno-dinitrilotetracético), na concentração de 1,5mg/ml de sangue (14).

Todo o material foi obtido após amplo esclarecimento sobre os procedimentos adotados e a finalidade do trabalho.

MÉTODOS

1. HEMATIMETRIA

A determinação do número de hemácias, da concentração de hemoglobina, do hematócrito, e dos índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) foi feita em contador eletrônico (Coulter Counter Modelo Ssr), em período nunca superior a 24 horas após a coleta das amostras de sangue.

2. ANALISE DAS HEMOGLOBINAS

2.1 Preparo dos hemolisados

O sangue colhido com anticoagulante foi lavado 3 vezes com solução salina fisiológica (NaCl 0,9%), e hemolisado pela adição de 1 volume de água destilada e 0,5 volume de tetracloreto de carbono para cada volume de células. Após vigorosa agitação e centrifugação (3000 rpm, por 20 minutos), a camada superior foi

recolhida em um tubo de ensaio, onde recebeu uma gota de KCN 1% (para conservação). Esta camada constitui o hemolisado livre de estroma. Dessa forma foram preparados os hemolisados de todos os RN e das mães que apresentaram valores de VCM menores que 82 fl, ou de HCM menores que 27 pg (limites inferiores da normalidade).

As amostras de mães com índices hematimétricos normais sofreram inicialmente hemólise com solução de saponina 0,5% (*) (uma gota de hemácias para 3 gotas de solução de saponina). Nos casos em que a eletroforese revelou hemoglobina com migração anômala, e em mães de RN portadores de Hb Bart's, foram preparados hemolisados de maneira habitual.

(*) Solução de Saponina 0,5%

Saponina	0,5g
Azida sódica	1,0g
KCN	0,2g
Água destilada	100 ml

2.2 Determinação do Padrão Eletroforético

Todos os hemolisados (de mães e RN) foram analisados através de eletroforese em fitas de acetato de celulose, em tampão Tris-EDTA-borato, pH 8,6(*), por 30 minutos, a 220 volts (86).

Os hemolisados dos RN e de algumas mães de RN portadores de Hb Bart's foram também analisados por eletroforese em fitas de acetato de celulose, em tampão fosfato, pH 6,5(**), por 30 minutos, a 190 volts (86), com o objetivo de comprovar a presença de Hb Bart's, uma vez que essa análise é específica para detecção dessa hemoglobina.

(*) Tampão Tris-EDTA-borato

Tri (hidroximetil) - amino metano	10,2g
EDTA	0,6g
Ácido bórico	3,2g
Água destilada	1000 ml

(**) Tampão Fosfato

Fosfato monobásico de potássio	3,11g
Fosfato bibásico de sódio	1,66g
Água destilada	1000 ml

Nos hemolisados provenientes dos RN e de todas as mães que apresentaram alterações hemoglobínicas na eletroforese em pH alcalino, foram realizadas eletroforeses em gel de ágar 1%, em placas de 9 x 12 cm, em tampão citrato, pH 5,8(*), a 45 mA, 40C (86), para confirmação do resultado.

A coloração das fitas e do gel foi feita com solução de benzidina(**).

(*) Tampão Citrato

Citrato de tri-sódio di-hidratado	15,0g
Água destilada	1000 ml

(**) Solução de Benzidina

Benzidina	1,0g
Nitroprussiato de sódio	1,0g
Ácido acético glacial	100 ml
Água destilada	300 ml

3. QUANTIFICAÇÃO DAS HEMOGLOBINAS

3.1 Hb A₂

Após eletroforese de 10 µl de hemolisado em acetato de celulose, em tampão Tris-EDTA-borato, pH 8,6, a faixa correspondente à Hb A foi recortada, e a hemoglobina eluída em 3 ml de tampão, sendo as demais hemoglobinas presentes eluídas juntamente, em 15 ml do tampão. Em seguida à eluição foram medidas as absorvâncias das duas frações a 415 nm e calculada a percentagem de Hb A₂ (86).

3.2 Hb Fetal

A quantificação foi realizada pelo método da desnaturação alcalina (61). Consistiu da adição de 0,2 ml de hemolisado a 3,2 ml de solução de hidróxido de sódio 0,083N. Após 1 minuto, foram acrescentados 6,8 ml de solução de sulfato de amônio saturada a 50%. Após filtração, foi determinada a absorvância do filtrado a 415 nm.

3.3 Hb Bart's

A quantificação foi realizada em todos os hemolisados em que essa hemoglobina foi detectada pela eletroforese inicial. A quantificação foi conduzida pela eluição da faixa correspondente após eletroforese de 5 μ l de hemolisado em acetato de celulose, em tampão fosfato, pH 6,5 (86).

4. TESTE DE SOLUBILIDADE DAS HEMOGLOBINAS

Foi realizado nos hemolisados provenientes das mães portadoras de alterações hemoglobínicas. Consistiu da adição de 0,1 ml do hemolisado a 5 ml de tampão fosfato 2,35 M, na presença de ditionito de sódio a 1%. Após filtração, foi determinada a absorvância do filtrado a 540 nm (93).

5. PESQUISA DE CORPOS DE INCLUSÃO DE HbH

Foi levada a efeito em sangue total proveniente de mães de RN portadores de Hb Bart's. Consistiu na incubação de 2 gotas de sangue com 1 gota de azul brilhante de cresil a 1% em sali-

na-citrato, por 1 hora ou mais, a 37°C (14), após o que foram preparados esfregaços, que foram então examinados ao microscópio.

Em todos esses casos, também foi realizada a contagem de reticulócitos no sangue periférico, e exame morfológico do esfregaço sanguíneo (14).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, a análise estatística foi voltada para o cálculo das frequências gênicas e genotípicas da talassemia alfa+ na população estudada. Como já relatado, nas populações negras é considerada a existência de praticamente dois haplótipos ("genes") alfa: o normal ($\alpha\alpha$) e o talassêmico alfa+ ($-\alpha$). Assim, de acordo com a equação de equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram calculadas as frequências gênicas e estimadas as frequências genotípicas esperadas para esta população (6).

Posteriormente, foi realizada a comparação das variáveis hematológicas Hb, VCM e HCM entre os homozigotos da talassemia alfa+, os heterozigotos, e aqueles que não apresentaram a Hb Bart's. Essa comparação se deu através da aplicação aos dados amostrais de testes de homogeneidade das variâncias (de

Bartlett,1937), de análise da variância (de Fisher,1924) e de comparação das médias amostrais (Teste "t" de Student, 1908) (6).

RESULTADOS

Frequência e Quantificação da Hb Bart's Encontrada em 320 Nascimentos - Estimativa das Frequências Gênicas e Genotípicas

As figuras 1 e 2 mostram os resultados de eletroforeses de hemolisados de RN portadores de Hb Bart's, enquanto a figura 3 mostra os de eletroforese de hemolisados de RN e de adultos normais e portadores de alterações hemoglobínicas.

As alterações hemoglobínicas detectadas em 320 RN e 317 mães estão relacionadas na Tabela 2. A tabela mostra que, entre 320 RN analisados, 38 apresentaram Hb Bart's, ou seja, 11,9% dos casos. Destes, 4 (1,3%) apresentaram associação com HbS, e 1 (0,3%) com HbC.

A distribuição de frequência dos RN conforme as dosagens de Hb Bart's obtidas está representada na figura 4. A maioria dos casos está concentrada entre os valores de 1,5 e 4,0% de Hb Bart's, e existe nítida antimoda entre esse grupo e os poucos casos com dosagens superiores a 5,5%. Na Tabela 3 os RN foram classificados em 2 grupos, de acordo com a quantificação da Hb Bart's. O primeiro compreende RN com valores entre 1,5 e 3,8%,

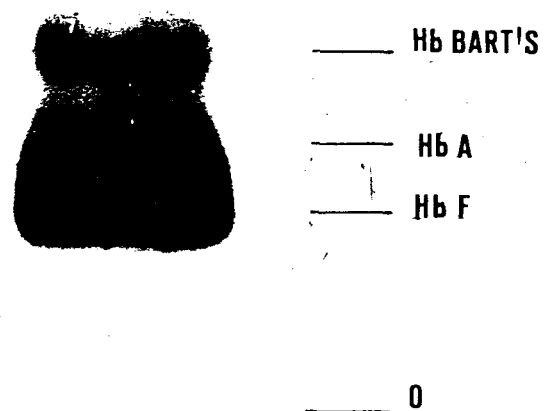


Figura 1 - Eletroforese de hemolisado de RN portador de Hb Bart's.

Acetato de celulose, tampão Tris-EDTA-borato, pH 8,6.

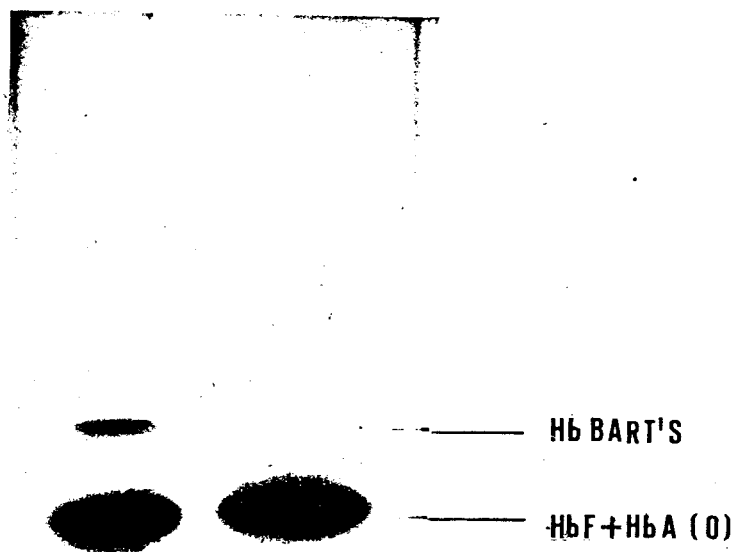


Figura 2 - Eletroforese de hemolisado de RN portador de Hb Bart's x hemolisado de RN normal. Acetato de celulose, tampão Fosfato, pH 6,5.

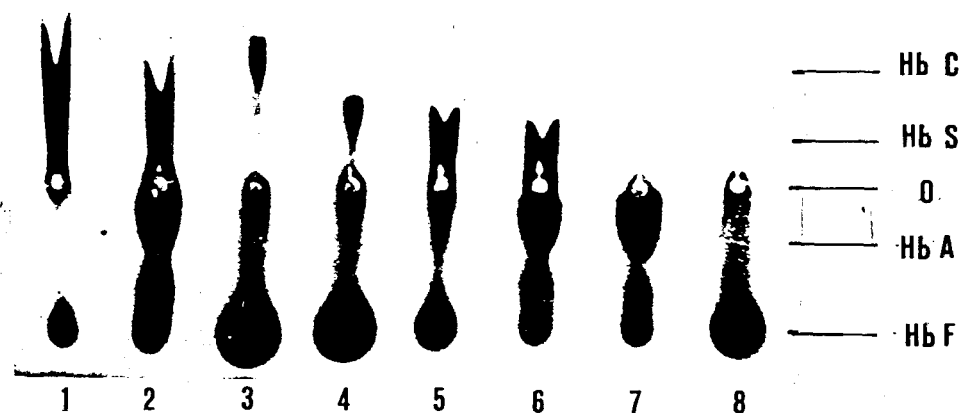


Figura 3 - Eletroforese de hemolisados de RN e de Adultos normais e portadores de hemoglobinopatias (S e C).

Gel de ágar, tampão Citrato, pH 5,8.

1. Adulto homozigoto da HbC (CC)
2. Adulto heterozigoto da HbC (AC)
3. RN portador de HbC
4. RN portador de HbS
5. Adulto homozigoto da HbS (SS)
6. Adulto heterozigoto da HbS (AS)
7. Adulto normal (AA)
8. RN normal (FA)

Tabela 2 - Alterações hereditárias das hemoglobinas em amostras de sangue provenientes de RN e suas mães.

Fenótipo	Mães	RN
AS	29 (9,1%)	23 (7,2%)
AC	3 (0,9%)	2 (0,6%)
SC	1 (0,3%)	—
A-Stanleyville II	1 (0,3%)	1 (0,3%)
Talassemia - β heterozigótica	1 (0,3%)	—
Hb <u>Bart's</u>	—	33 (10,3%)
HbS + Hb <u>Bart's</u>	—	4 (1,3%)
HbC + Hb <u>Bart's</u>	—	1 (0,3%)
SUB-TOTAL	36 (11,3%)	65 (20,3%)
NORMAIS	281 (88,7%)	255 (79,7%)
TOTAL	317	320

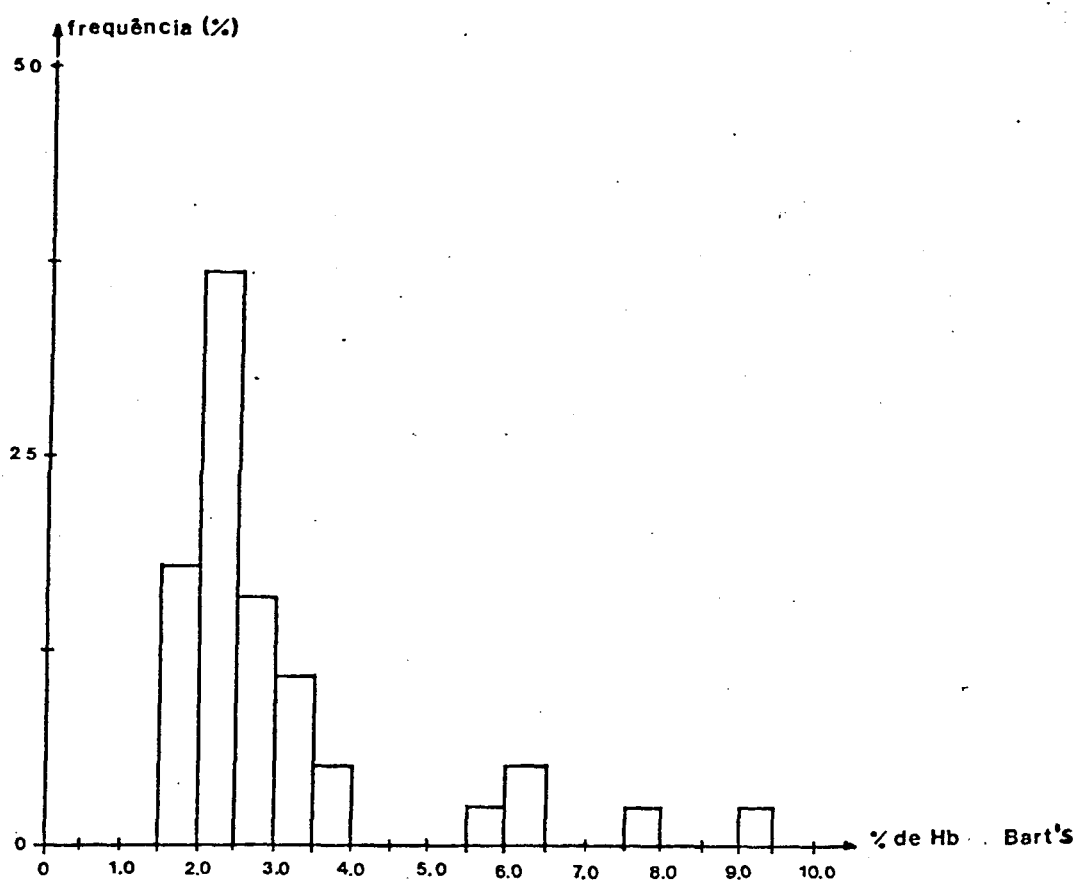


Figura 4 - Distribuição de Frequência de RN x Dosagem de Hb Bart's.

Tabela 3 - Quantificação da Hb Bart's encontrada em 320 nascimentos.

Quantidade de Hb <u>Bart's</u>	Frequência de RN
1,5 - 3,8 %	10,3 %
5,9 - 9,0 %	1,6 %
TOTAL com Hb <u>Bart's</u>	11,9 %

e o segundo com valores de 5,9 até 9,0%, quantidade máxima detectada. Com base nesses dados e levando em consideração os resultados disponíveis na literatura, foi atribuído a cada grupo o seu provável genótipo. Os RN em que não foi encontrada a Hb Bart's correspondem, evidentemente, aos homozigotos normais e aos heterozigotos não detectados pela metodologia empregada. A Tabela 4 mostra as frequências genotípicas encontradas e esperadas na população estudada. Como os homozigotos apresentam os níveis mais elevados de Hb Bart's, com probabilidade muito reduzida de não serem detectados, a frequência do "gene" alfa+ foi calculada a partir da frequência genotípica observada dos homozigotos. O valor obtido foi de 0,125. Desse modo, a frequência de heterozigotos esperada nessa população foi estimada em 21,87%, e de indivíduos normais em 76,57%.

Esses dados revelam que aproximadamente metade dos heterozigotos presentes na população não foram detectados pela eletroforese em acetato de celulose.

Concentração de Hemoglobina, Volume Corpuscular Médio e Hemoglobina Corpuscular Média nos Diferentes Grupos de RN

Na Tabela 5 estão representadas as características hematológicas dos RN portadores de Hb Bart's.

Tabela 4 - Frequências genotípicas observadas e esperadas a partir da dosagem de Hb Bart's.

Dosagem de Hb Bart's	Genótipo	Proporção de RN encontrada	Frequência genotípica encontrada	Frequência genotípica esperada
não encontrada	$\alpha\alpha/\alpha\alpha(+\alpha-)$ $\alpha\alpha$ (não detectados)	282/320 (88,1250%)	$p^2 + x = 0,881250$	$p^2 = 0,7657$
1,5 - 3,8%	$\alpha-/\alpha\alpha$	33/320 (10,3125%)	$2pq - x = 0,103125$	$2pq = 0,2187$
5,9 - 9,0%	$\alpha-/\alpha-$	5/320 (1,5625%)	$q^2 = 0,015625$	$q^2 = 0,0156$

p = frequência do haplótipo normal $\alpha\alpha = 0,875$

q = frequência do haplótipo talassêmico $\alpha- = 0,125$

x = proporção de heterozigotos $\alpha-$ não detectados pela metodologia empregada = 0,116

Caso	GV (x10 ¹² /l)	Hb (g/dl)	Ht	VCM (fl)	HCM (pg)	Hb Bart's (%)	Padrão Eletrorotético
RN de M.A.B	4,27	13,6	0,396	92	31,8	7,7	HbF, HbA, Hb Bart's
" " S.F.A.	4,28	14,9	0,441	103	35,0	2,3	HbF, HbA, Hb Bart's
" " J.B.V.C.	4,42	13,4	0,435	98	30,2	9,0	HbF, HbA, Hb Bart's
" " A.R.C.	5,15	16,8	0,526	102	32,7	2,8	HbF, HbA, HbS, Hb Bart's
" " E.A.F.	5,07	15,2	0,520	103	30,1	5,9	HbF, HbA, Hb Bart's
" " M.J.J.	4,97	15,0	0,474	96	30,4	2,2	HbF, HbA, Hb Bart's
" " D.C.	4,79	14,3	0,463	97	30,0	2,5	HbF, HbA, Hb Bart's
" " C.A.T.	4,60	14,5	0,471	103	31,7	2,0	HbF, HbA, Hb Bart's
" " N.S.F.	4,37	12,3	0,409	94	28,4	2,7	HbF, HbA, Hb Bart's
" " M.A.P.	4,64	13,8	0,457	99	29,9	3,1	HbF, HbA, Hb Bart's
" " L.T.X.M.	3,90	12,7	0,400	102	32,5	1,8	HbF, HbA, Hb Bart's
" " M.A.J.R.	5,31	16,3	0,512	96	30,5	1,5	HbF, HbA, HbS, Hb Bart's
" " N.M.S.	4,41	14,2	0,454	103	32,0	1,8	HbF, HbA, Hb Bart's
" " M.A.C.	-	-	-	-	-	2,5	HbF, HbA, HbS, Hb Bart's
" " C.M.M.M.	5,44	17,2	0,533	102	31,6	1,5	HbF, HbA, Hb Bart's
" " M.J.S.B.	3,78	13,1	0,410	109	34,7	1,7	HbF, HbA, Hb Bart's
" " S.A.L.	5,22	18,0	0,594	114	34,2	2,0	HbF, HbA, Hb Bart's
" " G.C.S.	4,02	14,3	0,463	114	35,3	2,1	HbF, HbA, Hb Bart's
" " J.A.C.	3,84	13,6	0,434	113	35,3	2,5	HbF, HbA, Hb Bart's
" " Z.R.L.	5,26	15,8	0,484	92	30,6	3,8	HbF, HbS, HbA, Hb Bart's
" " A.M.R.G.	4,72	15,9	0,526	112	34,5	3,2	HbF, HbA, Hb Bart's
" " V.C.O.	4,63	15,0	0,464	100	33,2	2,2	HbF, HbA, Hb Bart's
" " S.H.S.C.	5,13	16,5	0,543	105	31,3	2,2	HbF, HbA, Hb Bart's
" " M.P.I.	3,62	11,8	0,383	106	31,8	2,4	HbF, HbA, Hb Bart's
" " M.G.S.R.	5,32	16,4	0,517	98	30,9	2,2	HbF, HbA, Hb Bart's
" " L.F.M.S.	4,72	13,8	0,449	95	29,2	2,1	HbF, HbA, Hb Bart's
" " M.F.T.	5,03	15,3	0,486	97	30,3	-	HbF, HbA, Hb Bart's
" " F.S.	5,35	13,7	0,447	84	25,6	6,0	HbF, HbA, Hb Bart's
" " M.F.R.	-	-	-	-	-	3,6	HbF, HbA, Hb Bart's
" " I.A.Z.	4,99	14,7	0,473	95	29,5	3,2	HbF, HbA, Hb Bart's
" " I.C.F.	4,58	13,9	0,431	94	30,4	2,0	HbF, HbA, Hb Bart's
" " R.F.	4,27	12,9	0,408	96	30,3	2,3	HbF, HbA, Hb Bart's
" " M.C.S.	4,06	11,7	0,363	89	28,8	1,7	HbC, HbF, HbA, Hb Bart's
" " I.F.P.	5,15	13,1	0,442	86	25,5	6,2	HbF, HbA, Hb Bart's
" " E.G.F.S.	4,81	14,5	0,474	99	30,3	1,5	HbF, HbA, Hb Bart's
" " M.C.R.	5,49	17,3	0,542	99	31,9	2,5	HbF, HbA, Hb Bart's
" " N.I.S.	4,62	15,0	0,466	101	32,9	2,4	HbF, HbA, Hb Bart's
" " L.R.A.	3,93	12,9	0,397	102	33,4	2,0	HbF, HbA, Hb Bart's

Com o objetivo de verificar se a concentração de Hb, o VCM ou a HCM apresentavam diferenças significativas entre os RN com ou sem Hb Bart's, foram analisados 3 grupos de RN: aqueles onde não foi detectada HB Bart's (Grupo A), RN em que a concentração de Hb Bart's era de 1,5 a 3,8% (Grupo B), e RN com Hb Bart's cuja concentração variou entre 5,9 e 9,0% (Grupo C). Assim, os dados amostrais para comparação entre os 3 grupos que compõem a população analisada referiram-se a essas 3 variáveis hematológicas, e estão relacionados na Tabela 6.

O teste de homogeneidade das variâncias, aplicado aos dados amostrais da Tabela 6, revelou que as variâncias dessas amostras são homogêneas. A análise de variância (Tabela 7) mostrou que, com relação à concentração de Hb, as médias amostrais não diferem significativamente, ao passo que o contrário ocorre com relação ao VCM e HCM, onde a análise mostrou existir diferença significativa entre as médias amostrais. Desse modo, foi realizado o teste "t" para comparação das médias entre os diferentes grupos em relação ao VCM e à HCM (Tabela 8). Os dados dessa tabela mostram diferença significativa existente entre as médias amostrais, de grupo para grupo, em ambas as variáveis analisadas. Assim, tanto com relação ao VCM, quanto à HCM, a média dos valores obtidos dos homozigotos é significativamente menor que a dos heterozigotos, que por sua vez é menor que a daqueles em que a Hb Bart's não foi observada.

A distribuição individual das concentrações de Hb, VCM e HCM

Tabela 6 - Parâmetros Estatísticos Calculados para a Concentração de Hemoglobina (Hb), Volume Corpuscular Médio (VCM), e Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) nos 3 Grupos de RN.

	Grupo A (n = 252)			Grupo B (n = 31)			Grupo C (n = 5)		
	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (pg)	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (pg)	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (pg)
$\bar{X}$	15,09	106,86	34,18	14,66	100,87	31,73	13,80	92,60	28,64
S(X)	1,78	7,01	2,55	1,64	6,45	1,98	0,82	7,99	2,90
S($\bar{X}$)	0,11	0,44	0,16	0,29	1,16	0,36	0,36	3,57	1,30

Grupo A = não detectada Hb Bart's

Grupo B = Hb Bart's entre 1,5 e 3,8%

Grupo C = Hb Bart's entre 5,9 e 9,0%

Tabela 7 - Análise da variância levada a efeito a partir dos dados amostrais da tabela 6.

Variável Hematológica	Variação	G.L.	SQ	$S^2(X)$	F
Hb	Entre	2	12,81	6,41	2,09 $P > 0,05$
	Dentro	285	875,38	3,07	
	Total		888,19		
VCM	Entre	2	1.899,90	949,95	19,59 $P < 0,05$
	Dentro	285	13.822,80	48,50	
	Total		15.722,70		
HCM	Entre	2	303,60	151,80	24,21 $P < 0,05$
	Dentro	285	1.787,74	6,27	
	Total		2.091,34		

F crítico (ao nível de significância de 5%) = 3,00

Tabela 8 - Teste t para comparação das médias amostrais

Variável Hematológica	Grupos Comparados	G.L.	tc	t
VCM	A e B	564	1,960	4,83; P<0,001
	B e C	70	1,980a2,000	2,20; P<0,05
	A e C	512	1,960	3,96; P<0,001
HCM	A e B	564	1,960	6,28; P<0,001
	B e C	70	1,980a2,000	2,31; P<0,05
	A e C	512	1,960	4,23; P<0,001

($\alpha = 0,05$)

nos 3 grupos estudados encontram-se nas figuras 5, 6 e 7.

Características Hematológicas das Mães

As características hematológicas e eletroforéticas das mães de RN portadores da Hb **Bart's** encontram-se na Tabela 9. Em 7 dessas mães foi possível o estudo posterior das características do sangue periférico e levada a efeito a pesquisa de HbH, cujos resultados estão na Tabela 10. Os dados hematológicos e eletroforéticos daquelas mães que apresentaram variantes estruturais da hemoglobina ou talassemia beta heterozigótica estão representados na Tabela 11. A Tabela 12 mostra as médias da concentração de Hb, do VCM e da HCM das mães em que não foram encontradas alterações da hemoglobina e cujos RN não apresentaram Hb **Bart's**.

Os dados hematológicos e eletroforéticos da mãe C.F.M., cujo hemolisado apresentou hemoglobina anômala não usual, estão reunidos nas tabelas 13 e 14. A caracterização consistiu, além do procedimento normalmente realizado para todas as amostras de mães, de testes de instabilidade da hemoglobina (instabilidade térmica e em isopropanol), síntese "in vitro" da hemoglobina, eletroforese de cadeias de globina, "fingerprinting", e análise de aminoácidos (as análises estruturais foram realizadas na

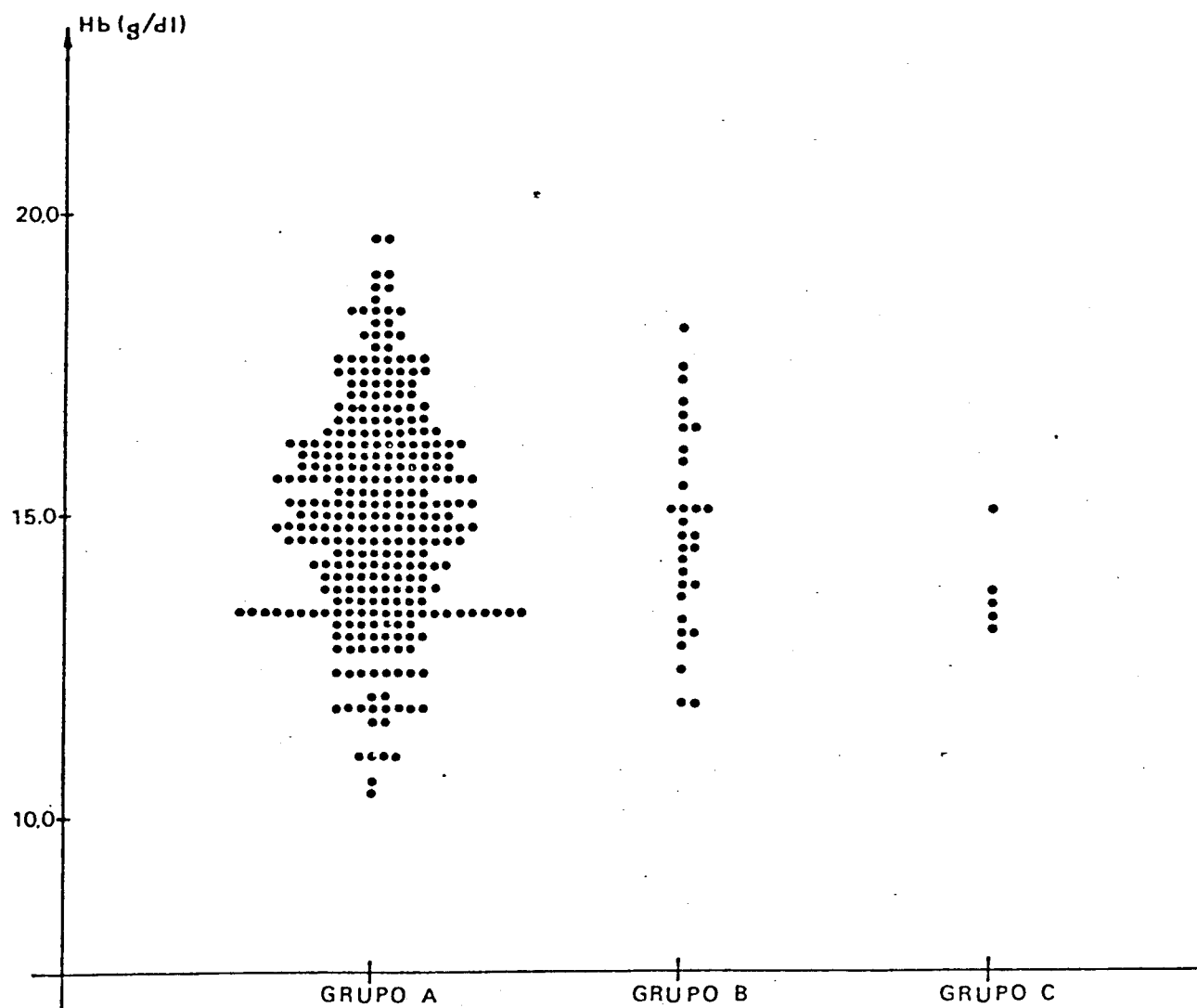


Figura 5 - Concentração de Hb em Amostras de Sangue Obtidas dos RN dos Grupos A, B e C.

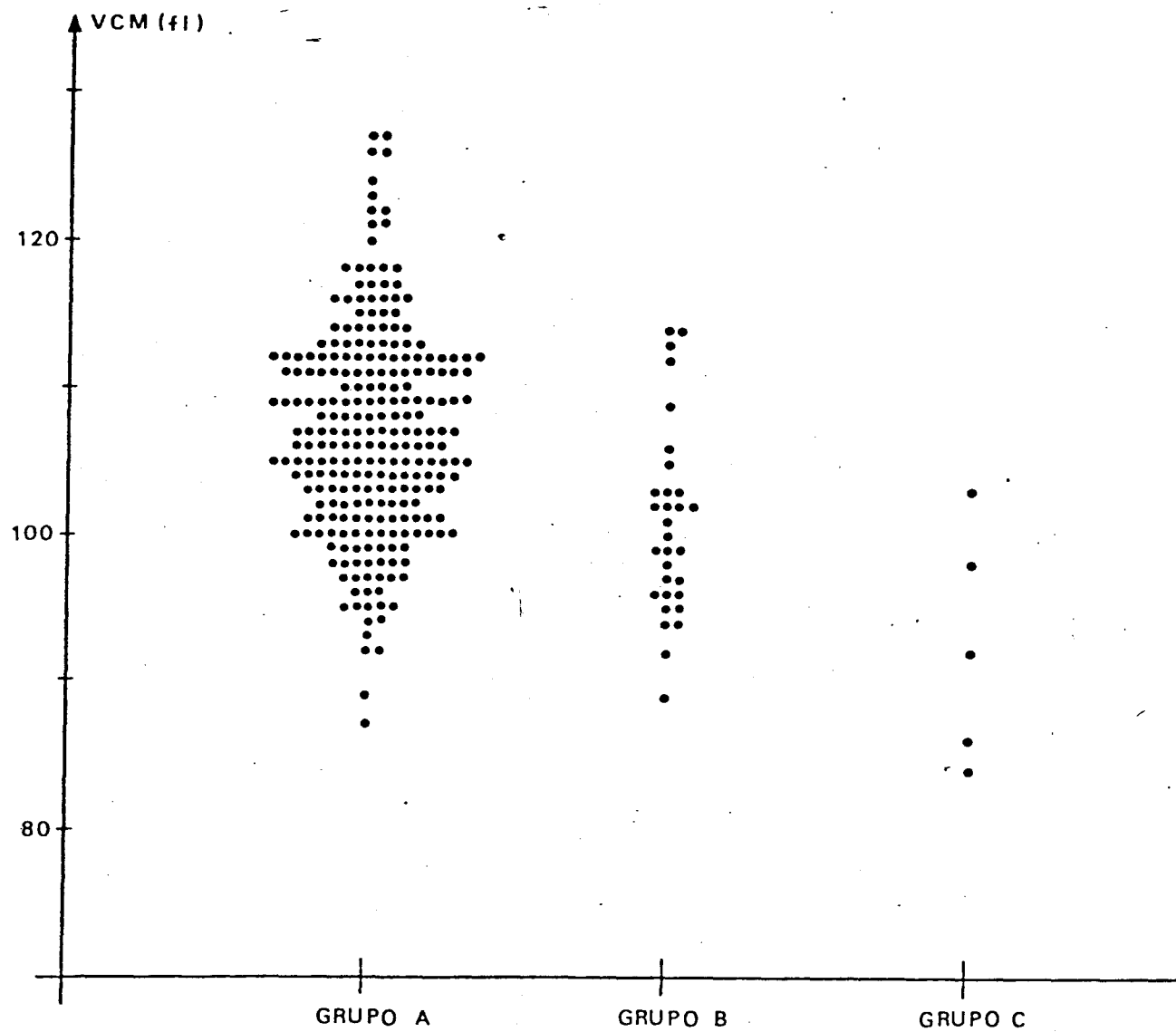


Figura 6 - Volume Corpuscular Médio das Amostras de Sangue Obtidas dos RN dos Grupos A, B e C.

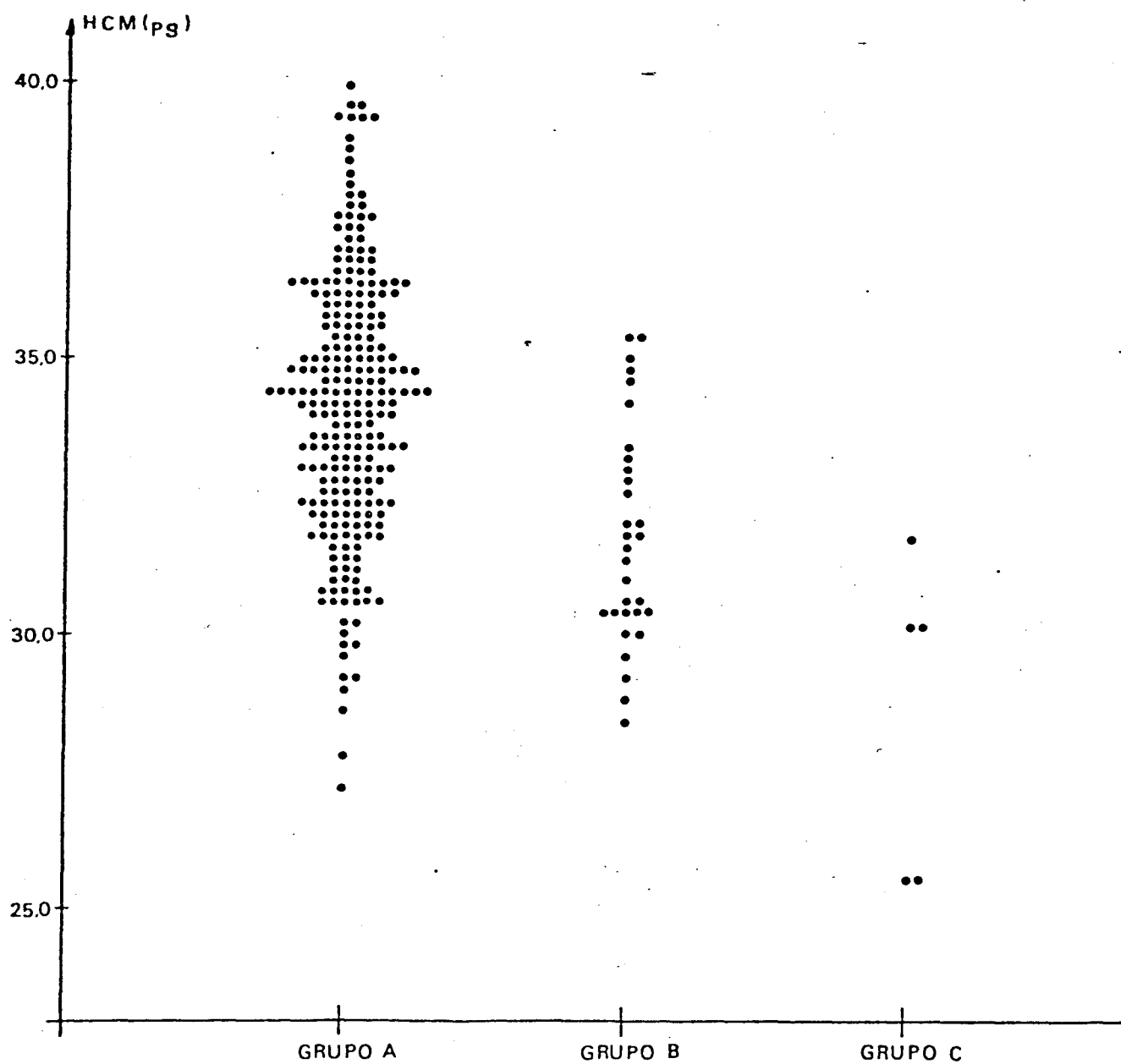


Figura 7 - Hemoglobina Corpuscular Média das Amostras de Sangue Obtidas dos RN dos Grupos A, B e C.

Caso	GV (x10 ¹² /l)	Hb (g/dl)	Ht	VCM (fl)	HCM (pg)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	Padrão Eletroforético
M.A.B.	3,39	10,5	0,300	88	31,1	2,5	0,6	HbA ₂ , HbA
S.F.A.	4,54	15,6	0,444	98	34,4	2,3	2,3	HbA ₂ , HbA
J.B.V.C.	3,95	11,5	0,349	88	29,2	2,4	1,6	HbA ₂ , HbA
A.R.C.	4,79	12,6	0,376	79	26,3	3,1	0,8	HbA ₂ , HbS, HbA
E.A.F.	3,99	10,6	0,341	86	26,8	3,2	1,5	HbA ₂ , HbA
M.J.J.	3,69	9,0	0,289	78	24,6	2,7	0,5	HbA ₂ , HbA
D.C.	3,95	10,9	0,347	88	27,8	-	-	HbA ₂ , HbA
C.A.T.	4,34	11,5	0,357	83	26,7	-	-	HbA ₂ , HbA
N.S.F.	4,49	9,1	0,308	69	20,4	3,2	0,7	HbA ₂ , HbA
M.A.P.	3,17	7,6	0,254	80	24,1	-	-	HbA ₂ , HbA
L.T.X.M.	3,82	12,2	0,375	98	32,0	-	-	HbA ₂ , HbA
M.A.J.R.	4,26	13,4	0,386	90	31,2	2,5	0,3	HbA ₂ , HbS, HbA
N.M.S.	3,36	9,3	0,288	85	27,7	-	-	HbA ₂ , HbA
M.A.C.	4,23	12,3	0,386	91	29,0	-	-	HbA ₂ , HbA
C.N.M.M.	3,31	9,4	0,266	80	25,3	-	-	HbA ₂ , HbA
M.J.S.B.	3,70	9,8	0,294	79	26,4	-	-	HbA ₂ , HbA
S.A.L.	3,36	11,2	0,346	102	33,1	-	-	HbA ₂ , HbA
C.G.S.	3,56	11,3	0,343	96	31,7	2,6	0,3	HbA ₂ , HbA
J.A.C.	4,02	11,2	0,350	87	27,8	3,1	1,8	HbA ₂ , HbA
Z.R.L.	3,96	8,8	0,272	69	22,6	3,6	1,2	HbA ₂ , HbS, HbA
A.M.R.G.	4,04	11,8	0,364	90	29,8	2,9	0,4	HbA ₂ , HbA
V.C.O.	2,98	8,3	0,249	83	28,5	-	-	HbA ₂ , HbA
S.H.S.C.	4,27	12,0	0,394	92	27,4	-	-	HbA ₂ , HbA
M.P.I.	5,39	15,2	0,492	91	27,4	2,6	0,1	HbA ₂ , HbA
M.G.S.R.	3,20	9,2	0,285	89	28,9	2,5	0,1	HbA ₂ , HbS, HbA
L.F.M.S.	4,69	11,5	0,356	76	22,3	-	-	HbA ₂ , HbA
M.F.T.	3,82	10,9	0,338	88	28,7	-	-	HbA ₂ , HbA
F.S.	4,10	9,8	0,302	74	23,8	1,6	0,3	HbA ₂ , HbA
M.F.R.	3,96	12,2	0,378	96	30,9	-	-	HbA ₂ , HbA
I.A.Z.	5,15	10,2	0,332	65	19,8	2,0	0,4	HbA ₂ , HbS, HbA
I.C.F.	4,49	14,2	0,409	91	31,7	-	-	HbA ₂ , HbA
R.F.	3,39	7,3	0,221	65	21,6	2,3	1,8	HbA ₂ , HbA
M.C.S.	4,20	12,1	0,374	89	29,0	-	-	HbA ₂ , HbA
I.F.P.	4,12	11,0	0,353	85	27,0	2,9	0,5	HbA ₂ , HbA
E.G.F.S.	2,41	7,2	0,237	97	30,2	-	-	HbA ₂ , HbA
M.C.R.	4,69	14,0	0,436	93	30,1	-	-	HbA ₂ , HbA
N.I.S.	4,99	12,9	0,368	74	26,2	2,0	0,5	HbA ₂ , HbA
L.R.A.	3,40	11,2	0,325	96	33,4	2,6	0,5	HbA ₂ , HbA

Tabela 10 - Características morfológicas e eletroforéticas de sangue periférico das mães de RN com Hb Bart's

Caso	Exame do Esfregaço de Sangue Periférico	Reticulócitos (x 10 ¹² /ℓ)	Pesquisa de Corpos de Inclusão	Eletroforese em tampão fosfato (pH 6,5)	Padrão Eletroforético
J.B.V.C.	discreta microcitose	0,02	negativa	Hb A	HbA ₂ + HbA
M.J.J.	presença de algumas hemácias microcíticas	0,03	negativa	Hb A	HbA ₂ + HbA
G.C.S.	sem alterações morfológicas	0,07	negativa	Hb A	HbA ₂ + HbA
J.A.C.	sem alterações morfológicas	0,06	negativa	Hb A	HbA ₂ + HbA
Z.R.L.	moderadas anisocitose e poiquilocitose	0,08	negativa	Hb A	HbA ₂ +HbS+HbA
A.M.R.G.	sem alterações morfológicas	0,04	negativa	Hb A	HbA ₂ + HbA
M.P.I.	sem alterações morfológicas	0,06	negativa	Hb A	HbA ₂ + HbA

* O caso nº 1 é uma mãe de RN portador de 9,0% de Hb Bart's (provavelmente homozigoto da talassemia α^+); os demais são casos de mães de RN cuja % de Hb Bart's foi menor que 3,8% (heterozigotos).

Tabela 11 - Características hematológicas das mães com alterações hemoglobínicas

Caso	GV (x10 ¹² /l)	Hb (g/dl)	Ht	VCM (fl)	HCM (pg)	HbA ₂ (%) ²	HbF (%)	Solubilidade (%)	Padrão Eletroforético
M.L.S.	3,11	7,7	0,261	83	25,0	2,3	0,8	37,3	HbA ₂ , HbS, HbA
N.A.J.B.	3,59	11,7	0,355	99	32,7	2,1	1,6	25,2	HbA ₂ , HbS, HbA
A.R.C.	4,79	12,6	0,376	79	26,3	3,1	0,8	50,8	HbA ₂ , HbS, HbA
R.C.E.T.	2,08	6,9	0,205	98	33,4	-	-	28,7	HbA ₂ , HbS, HbA
V.S.D.	3,71	10,5	0,328	89	28,5	-	-	32,2	HbA ₂ , HbS, HbA
N.P.M.A.	3,78	9,5	0,308	81	25,3	2,4	0,6	41,3	HbA ₂ , HbS, HbA
A.M.J.C.	3,85	9,8	0,307	80	25,6	2,8	0,6	31,1	HbA ₂ , HbS, HbA
R.C.M.	4,50	10,5	0,375	84	23,6	2,6	0,7	30,0	HbA ₂ , HbS, HbA
M.L.L.	4,73	12,5	0,397	84	26,5	2,6	0,4	22,2	HbA ₂ , HbS, HbA
S.L.C.V.	3,86	9,0	0,294	76	23,4	2,8	0,8	40,0	HbA ₂ , HbS, HbA
I.M.S.M.	3,65	8,9	0,265	72	24,3	2,0	0,7	25,9	HbA ₂ , HbS, HbA
D.A.A.	4,20	13,0	0,390	93	31,0	2,0	0,2	18,2	HbA ₂ , HbS, HbA
M.A.J.R.	4,26	13,4	0,386	90	31,2	2,5	0,3	28,0	HbA ₂ , HbS, HbA
R.A.S.	3,51	9,5	0,292	83	26,9	2,0	-	35,6	HbA ₂ , HbS, HbA
V.L.F.S.	4,43	11,2	0,353	80	25,2	2,8	0,5	25,0	HbA ₂ , HbS, HbA
M.F.S.	4,40	13,1	0,380	86	30,2	3,5	0,4	32,7	HbA ₂ , HbS, HbA
Z.R.L.	3,96	8,8	0,272	69	22,6	3,6	1,2	51,7	HbA ₂ , HbS, HbA
M.G.S.R.	3,20	9,2	0,285	89	28,9	2,5	0,1	51,8	HbA ₂ , HbS, HbA
T.J.G.S.	6,26	16,5	0,454	73	26,4	2,4	0,6	42,3	HbA ₂ , HbS, HbA
I.A.Z.	5,15	10,2	0,332	65	19,8	2,0	0,4	56,6	HbA ₂ , HbS, HbA
M.J.F.O.R.	4,62	13,5	0,400	87	29,2	2,6	0,5	44,3	HbA ₂ , HbS, HbA
M.C.S.	-	-	-	-	-	2,1	4,5	-	HbA ₂ , HbS, HbA
A.M.S.	4,82	10,6	0,316	65	22,0	3,2	0,4	46,0	HbA ₂ , HbS, HbA
N.A.S.	4,64	13,3	0,385	84	29,3	2,0	0,6	33,5	HbA ₂ , HbS, HbA
R.M.	2,65	8,3	0,236	89	31,7	2,2	0,6	38,7	HbA ₂ , HbS, HbA
L.R.A.	3,40	11,2	0,325	96	33,4	2,6	0,5	45,8	HbA ₂ , HbS, HbA
M.A.S.	-	-	-	-	-	2,7	0,6	54,6	HbA ₂ , HbS, HbA
L.A.F.S.	4,17	12,4	0,363	86	29,8	2,8	0,5	13,7	HbA ₂ , HbS, HbA
M.C.S.	4,13	11,1	0,321	77	26,9	3,1	0,5	18,5	HbA ₂ , HbS, HbA
I.P.S.A.	3,51	10,6	0,306	87	30,4	-	1,3	83,3	HbC, HbA
H.M.P.	3,47	9,5	0,295	85	27,6	-	1,0	94,4	HbC, HbA
C.S.A.	4,30	10,7	0,345	81	25,2	-	0,9	77,3	HbC, HbA
M.G.A.	2,81	8,5	0,254	90	30,4	-	1,1	20,5	HbC, HbS
C.F.M.	3,84	11,2	0,326	84	29,2	2,5	0,6	72,3	HbA ₂ , HbA Hb Stanleyville II
A.M.S.	4,83	9,7	0,306	64	20,2	5,5	1,7	-	HbA ₂ , HbA

Tabela 12 - Parâmetros estatísticos calculados para os valores de Hb, VCM e HCM obtidos das mães em que não foram detectadas alterações hemoglobínicas e cujos RN não apresentaram Hb Bart's (n= 240)

Variáveis Hematológicas	$\bar{x}$	S(x)
Hb	11,05	1,82
VCM	87,01	8,72
HCM	28,27	3,29

Tabela 13 - Dados Hematológicos de C.F.M.

GV (x10 ¹² /l)	Hb (g/dl)	Ht	VCM (fl)	HCM (pg)	Reticulócitos (%)	Pesquisa de corpos de Heinz	Pesquisa de corpos inclu- são de Hb H ⁺	exame do esfregaço sanguíneo
3,84	11,2	0,326	84	29,2	1,0	negativa	negativa	sem altera- ções morfo- lógicas

Tabela 14 - Dados Eletroforéticos de C.F.M.

Padrão Eletroforético	Hb A ₂ (%)	Hb F (%)	Hb Anômala (%)	Solubilidade (%)
Hb A ₂ , Hb A ₂ anômala, Hb A, Hb Anômala	2,5	0,6	25,4	72,3

FMRP-USP). Os testes de instabilidade apresentaram resultados negativos, não tendo a hemoglobina anômala características de hemoglobina instável, o que foi confirmado pelas pesquisas de corpos de Heinz e de corpos de inclusão. A análise de aminoácidos revelou substituição na posição 78 da cadeia alfa, de um resíduo de asparagina por um de lisina, e a hemoglobina foi identificada como Hb Stanleyville-II. A figura 8 mostra o resultado da eletroforese do hemolisado de C.F.M. comparado a um hemolisado de adulto normal.

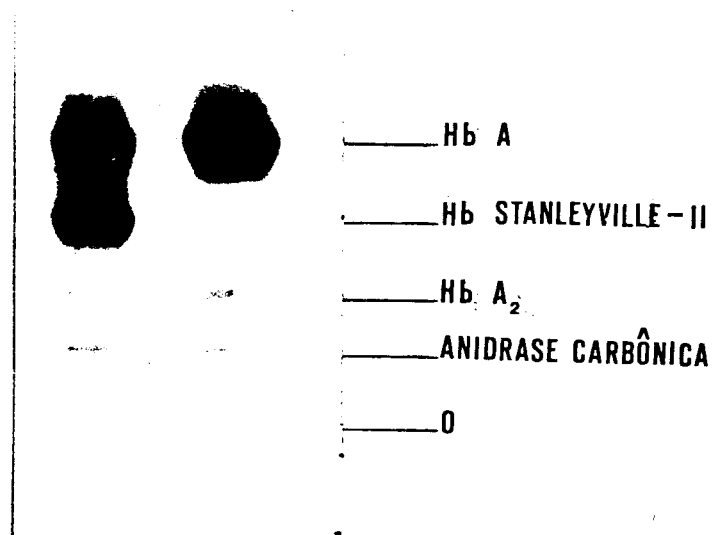


Figura 8 - Eletroforese do hemolisado de C.F.M. x hemolisado de adulto normal.
Acetato de celulose, tampão Tris-EDTA-borato, pH 8,6.

DISCUSSÃO

O grande avanço no estudo dos genes e seus produtos na última década possibilitou um melhor entendimento das anormalidades moleculares envolvidas nas síndromes talassêmicas (9,40,43,58,77). Assim, foi demonstrado que os múltiplos quadros clínicos e laboratoriais associados às talassemias alfa resultam basicamente da heterozigose, da homozigose e da interação de dois genes alfa talassêmicos (α^+ e α^0) e de variantes estruturais da cadeia alfa produzidas em ritmo reduzido, como a Hb Constant Spring (85,87). Foi demonstrado também que a forma prevalente da talassemia alfa em negros é a α^+ , nos estados de heterozigose e homozigose (17,20,85,87).

Embora alguns autores como Esan na África do Sul (24,25) e Nhonoli e colaboradores na Tanzânia (55) houvessem lançado algumas dúvidas a respeito da correspondência entre Hb Bart's ao nascimento e talassemia alfa, investigações posteriores demonstraram claramente essa associação, importante para o reconhecimento daqueles estados que não condicionam manifestações clínicas ou laboratoriais significativas no indivíduo adulto (2,36,49,56,63,66,67). Em populações negróides, vários estudos empregando análise gênica, síntese "in vitro" de globinas e quantificação de Hb Bart's em sangue de cordão umbilical, como aqueles de Higgs e colaboradores (36), Ohene-Frempong e colaboradores (56) e de Rousseau e colaboradores (67), permitiram es-

tabelecer uma correlação precisa entre quantificação da Hb Bart's ao nascimento e genótipo na talassemia alfa. Em seu conjunto, essas investigações demonstraram que a determinação da Hb Bart's ao nascimento é um bom indicador da homozigose da talassemia alfa+, podendo, no entanto, subestimar a frequência de heterozigotos em análises populacionais, pois estes indivíduos nem sempre apresentam níveis detectáveis dessa hemoglobina (33).

Ao discutir os resultados obtidos no presente trabalho, é importante ressaltar, inicialmente, que foram encontrados 38 recém-nascidos (11,9%) com Hb Bart's, dos quais 33 (10,3%) apresentaram percentagens dessa hemoglobina entre 1,5 e 3,8% da hemoglobina total, e 5 (1,6%) apresentaram valores superiores a 5%. Esses resultados foram semelhantes aos verificados em outras populações negróides, como na Nigéria (10,7%) (30), Estados Unidos (7,1%, 15%, 12,1%) (35), Libéria (10,0%) (88) e Tanzânia (11,08%) (55). Esses e outros trabalhos similares estão relacionados na Tabela 15 (35). No Brasil, apenas dois estudos foram realizados visando obter a frequência de Hb Bart's em RN. Zago (90), utilizando metodologia similar, detectou 0,66% de portadores de Hb Bart's em uma população não selecionada e Araújo e colaboradores (13) não detectaram Hb Bart's ao analisarem 300 RN.

A distribuição de frequência das quantificações da Hb Bart's foi bimodal, com antimoda entre 3,8 e 5,9%, sugerindo, com base na correlação existente entre percentagem de Hb Bart's em san-

Tabela 15 - Níveis de Hb Bart's em Recém-Nascidos Negros (35)

Autor	Origem	Ano	Nº Estudado	Moderada quantidade de Hb Bart's	Pequena quantidade de Hb Bart's	Total c/ Hb Bart's
Hendrickse e col.	Nigéria	1960	140	-	-	10,7%
Horton e col.	U.S.A.	1962	300	-	-	30,0%
Minnich e col.	U.S.A.	1962	449	-	-	7,1%
Weatherall	U.S.A.	1963 e 64	1080	2,0%	-	2,0%
Oudart e col.	Senegal	1968	345	-	-	1,75%
Van Baelen e col.	Congo	1969	636	-	-	17,9%
Folayan-Esan	Nigéria	1970	1151	-	-	4,5%
Folayan-Esan	Nigéria	1972	1866	-	-	5,1%
Schmaier e col.	U.S.A.	1973	200	3,0%	-	3,0%
Friedman e col.	U.S.A.	1974	693	3,0%	12,0%	15,0%
Wilcox	Libéria	1975	350	-	-	10,0%
Martinez e Colombo	Cuba	1976	650	1,23%	3,23%	4,46%
Huisman e Jonxis	U.S.A.	1977	14058	2,65%	9,45%	12,1%
Ringelmann e col.	África (oeste)	1977	1534	3,34%	-	3,34%
Piliszek	África (sul)	1979	430	1,6%	-	1,6%
Nhonoli e col.	Tanzânia	1979	325	-	-	11,08%
Higgs e col.	Jamaica	1980	2191	3,8%	3,2%	7,0%

que de cordão umbilical e número de genes alfa "funcionantes", a presença de dois grupos distintos na população, os heterozigotos e os homozigotos da talassemia alfa+ (34,36,44,49,56,67).

Uma vez que o método utilizado subestima a frequência de heterozigotos (33,56), a frequência do "gene" alfa+ foi então calculada a partir da frequência de homozigotos encontrados, correspondendo a 0,125. Assim, a frequência de heterozigotos esperada para essa população foi estimada em 21,87%. Portanto, com o emprego dessa metodologia, apenas cerca de 50% desses indivíduos foram detectados. Esses resultados corroboram a noção de que o método eletroforético não dispõe de sensibilidade suficiente para detecção de níveis muito reduzidos de Hb Bart's (como aqueles abaixo de 1%). Não se pode excluir também a possibilidade de que parte desses heterozigotos não possuam essa hemoglobina. Por outro lado, a frequência do "gene" alfa+ calculada a partir dos homozigotos é compatível com relatos recentes da literatura, em que foi empregada a análise de DNA na determinação das frequências genotípicas (17,20,36,67). Assim, nas populações negras americanas e africanas estudadas, a frequência do "gene" alfa+ variou entre 0,12 e 0,16 (51).

Para complementação do estudo, com o objetivo de verificar se a concentração de Hb e os índices hematimétricos VCM e HCM poderiam auxiliar na detecção da talassemia alfa+, foram feitos testes estatísticos para comparação entre os diferentes grupos de RN encontrados (homozigotos da talassemia alfa+, heterozigotos, e RN nos quais não foi detectada Hb Bart's). De acordo com esses testes, os valores analisados apresentaram a mesma varia-

ção ao redor da média nos três grupos de RN e para as três variáveis hematológicas, e as médias da concentração de Hb não diferiram significativamente entre os grupos, demonstrando que os níveis de Hb ao nascimento não se correlacionam com a presença de talassemia alfa+ nos indivíduos estudados. O mesmo não ocorreu com os índices VCM e HCM, onde se verificou diferença significativa das médias, de grupo para grupo, embora a área de intersecção entre os valores individuais obtidos dos diferentes grupos fosse bastante grande. Desse modo, embora tanto o VCM como a HCM permitam diferenciar o grupo de RN sem Hb Bart's do de heterozigotos, e este do de homozigotos, em casos individuais essa distinção não pode ser realizada. Além disso, a observação dos índices hematimétricos das mães de RN homozigotos, que certamente são portadoras da talassemia alfa+, mostra que elas são, sob esse aspecto, indistinguíveis das mães restantes.

Relativamente às associações da talassemia alfa+ com outras hemoglobinopatias, foram detectados 4 RN que apresentavam associação da talassemia alfa+ à HbS e 1 caso à HbC. No entanto, como a frequência da talassemia alfa+ nessa população negróide é de aproximadamente 23,5%, podemos estimar que ela esteja associada a pelo menos 23,5% dos indivíduos portadores das hemoglobinopatias que ocorrem nesse grupo racial, pois em alguns estudos, como o de Mears e colaboradores (51), foi demonstrado que em populações negras africanas e americanas a frequência do "gene" da talassemia alfa+ poderia estar elevada em heterozigotos e em homozigotos da HbS, quando comparada ao restante da

população.

A frequência de mães heterozigotas AS aqui obtida é semelhante àquela observada por Zago (90) em 212 amostras coletadas na Maternidade de Ribeirão Preto, provenientes de mães negras e pardas. A frequência global aqui obtida (incluindo mães e RN) é próxima daquela estimada em populações negróides do Sul e Sudeste brasileiros, que é de 6,6% (65,78,95). A percentagem de heterozigotos da HbC, 1%, também é compatível com os dados de literatura em relação às populações negróides da mesma região (65,78). Foi detectado um único caso de heterozigose da HbS e HbC.

Os dados relativos à incidência da talassemia beta em populações negróides do Brasil são praticamente inexistentes. Zago (90) não detectou nenhum caso entre 212 mães negróides investigadas. A frequência de talassemia beta encontrada em uma população negróide norte-americana estudada por Johnson e colaboradores (42) foi de aproximadamente 3,5%. No presente trabalho, esta frequência foi de 0,3%, representada pela detecção de um único caso. Desse modo, para interpretação segura do resultado, é necessário o estudo de um número maior de indivíduos negróides. No entanto, fica comprovada a presença de talassemia beta na população negróide brasileira, o que seria esperado tendo em vista a origem comum das populações negróides brasileira e norte americana, e o grau de miscigenação que ocorre no Brasil.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam que a análise e-

letroforética de sangue de cordão umbilical pode ser utilizada na detecção de talassemia alfa, apesar de apresentar limitações na identificação individual dos heterozigotos. É um método simples, rápido, e permite a identificação segura dos homozigotos, facultando assim a estimativa da frequência de heterozigotos em estudos populacionais. É evidente, no entanto, que métodos de maior confiabilidade seriam a síntese de globinas "in vitro", ou ainda, a análise de DNA com o emprego de enzimas de ação restrita (36,56,67).

De acordo com a frequência gênica aqui encontrada, a frequência da talassemia alfa+ nessa população negróide brasileira é de aproximadamente 23,5% (22% heterozigotos e 1,5% homozigotos). Assim, a cada 1.000 nascimentos nessa população, cerca de 235 deles devem ser de portadores da talassemia alfa+ (15 homozigotos). A frequência elevada dessa forma de talassemia encontrada nas populações negras até agora estudadas parece estar relacionada à alta prevalência de malária nas regiões de onde essas populações são originárias. Aparentemente, os heterozigotos da talassemia alfa, assim como os heterozigotos da talassemia beta e hemoglobinopatia S, apresentam proteção contra a infecção pelo "Plasmodium", o que conferiria vantagem seletiva para os portadores desses polimorfismos genéticos (7,8).

Em seu conjunto, os resultados desse trabalho demonstram a previsível, mas pela primeira vez comprovada, frequência elevada da talassemia alfa+ na população negróide brasileira do nordeste do Estado de São Paulo. Além disso, comprovam a existência

de talassemia beta nessa população, e a associação entre hemoglobinopatia S e talassemia alfa+, o que poderia contribuir para a heterogeneidade da apresentação clínica dos pacientes com anemia falciforme.

RESUMO E
CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo principal estimar a frequência da talassemia alfa+ em uma população negróide brasileira e, além disso, verificar sua possível interação com outras hemoglobinopatias, como a hemoglobinopatia S. Assim, 320 amostras de sangue de cordão umbilical de RN de mães negróides, e 317 amostras de sangue das respectivas mães, foram analisadas através de métodos eletroforéticos, para detecção de Hb Bart's. Os resultados obtidos permitiram calcular a frequência do "gene" talassêmico alfa+ nesta população (0,125), e estimar que cerca de 23,5% dela é de portadores da talassemia alfa+ (22% heterozigotos e 1,5% homozigotos). Foram considerados homozigotos da talassemia alfa+ os RN que apresentaram níveis superiores a 5% de Hb Bart's, e heterozigotos aqueles com Hb Bart's entre 1,5 e 3,8%. A concentração de Hb não se mostrou útil na identificação da presença de talassemia alfa+. Os índices VCM e HCM permitiram a diferenciação dos três grupos de RN (os homozigotos, os heterozigotos, e aqueles em que não foi detectada Hb Bart's); no entanto, essas variáveis não são capazes de identificar casos individuais.

Com relação à associação com outras hemoglobinopatias, 4 dos 27 RN que apresentaram HbS, e 1 dos 3 com HbC, apresentaram concomitantemente Hb Bart's. Foi detectado, também, 1 caso de talas-

semia beta entre as mães, o que comprova sua existência nessa população negróide brasileira.

Esses resultados demonstram que a talassemia alfa+ ocorre com frequência elevada na população negróide estudada, e também em associação a outras alterações da hemoglobina. Confirmam que a análise eletroforética de sangue de cordão umbilical, apesar de oferecer limitações na identificação individual dos heterozigotos, pode ser utilizada na detecção da talassemia alfa, pois permite a identificação segura dos homozigotos, possibilitando assim a estimativa da frequência de heterozigotos em estudos populacionais.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTAY, C., GRAVELY, M.E., JOSEPH, B.R. and WILLIAMS, D.F. Alpha-Thalassemia-2 and the Variability of Hematological Values in Children with Sickle Cell Anemia. Pediatr Res 15 : 1093 - 1096, 1981.
2. ALTAY, C., RINGELHANN, B., YAWSON, G.I., BRUCE-TAGOE, A.A., KONOTEY-AHULU, F.I.D., JAMES, L., GRAVELY, M. and HUISMAN, T.H.J. Hemoglobin Alpha Chain Deficiency in Black Children with Variable Quantities of Hemoglobin Bart's at Birth. Pediatr Res, 11 (2) : 147 - 152, 1977.
3. ANGLES CANO, E., ROBLES ARREDONDO, I., FERRER, V., GONZÁLES CONSTANDSE, R. and ORTIZ TREJO, J.F. Talasemia Alfa (Hemoglobinopatia H) en una Familia Mestiza Mexicana. Sangre (Barc), 22 (3) : 366 - 376, 1977.
4. BANK, A. The Thalassemia Syndromes. Blood, 51 (3) : 369 - 384, 1978.
5. BATE, C.M. and HUMPHRIES, G. Alpha - Beta Thalassaemia. Lancet, 1 (8020) : 1031 - 1034, 1977.
6. BEIGUELMAN, B. Genética Médica. Dinâmica dos Genes nas Famílias e nas Populações. 20 edição, São Paulo, EDART, 1981.
7. BOWDEN, D.K., HIGGS, D.R., HILL, A.V.S., WEATHERALL, D.J. and CLEGG, J.B. Relative Roles of Genetic Factors, Dietary Deficiency, and Infection in Anaemia in Vanuatu, South-West Pacific. Lancet (8463) : 1025 - 1028, 1985.
8. BOWDEN, D.K., PRESSLEY, L., HIGGS, D.R., CLEGG, J.B. and WEATHERALL, D.J. Alpha-Globin Gene Deletions Associated with HbJ Tongariki. Br J Haematol, 51 : 243 - 249, 1982.
9. BRITTENHAM, G., LOZOFF, B., HARRIS, J.W., KAN, Y.W., DOZY, A.M. and NAYUDU, N.V.S. Alpha Globin Gene Number : Population and Restriction Endonuclease Studies. Blood, 55 (4) : 706-708, 1980.
10. BUNN, H.F., FORGET, B.G. and RANNEY, H.M. Human Hemoglobins. Philadelphia, London, Toronto, W.B. Saunders Company, 1977.

- 11.CHARACHE, S., CONLEY, C.L., DOEBLIN, T.D. and BARTALOS, M.
Thalassemia in Black Americans. Ann NY Acad Sci, 232
(0) : 125 - 134, 1974.
- 12.COLMAN, N. Interaction of Alpha-Thalassemia and Homozy-
gous Sickle-Cell Disease. New England J Med, 307 (21) :
1349, 1982.
- 13.COLOMBO, B. and MARTINEZ, G. Haemoglobinopathies Including
Thalassaemia. Part 2 : Tropical America. Clinics in Hae-
matology, 10 (3) : 730 - 756, 1981.
- 14.DACIE, J.V., LEWIS, S.M. and WHITE, J.M. Laboratory Me-
thods Used in the Investigation of the Haemolytic Anaem-
ias. III. Haemoglobinopathies. In : DACIE, J. V., LEWIS,
S.M. (Eds). Practical Haematology. 5th edn. Churchill
Livingstone, Edinburgh, London, New-York, 1975. pp 236 -
254.
- 15.DAVIS Jr., J.R., DOZY, A.M., LUBIN, B., KOENIG, H.M., PIER-
CE, H.I., STAMATOYANNOPOULOS, G. and KAN, Y.W. Alpha -
Thalassemia in Black is Due to Gene Deletion. Am J Hum
Genet, 31 : 569 - 573, 1979.
- 16.DE CELAUER, K., HIGGS, D.R., HAYES, R.J., SERJEANT, B.E.
and SERJEANT, G.R. Alpha-Thalassemia Reduces the Hemo-
lytic Rate in Homozygous Sickle-Cell Disease. New
England J Med, 309 (3) : 189 - 190, 1983.
- 17.DOZY, A.M., KAN, Y.W., EMBURY, S.H., MENTZER, W.C., WANG,
W.C., LUBIN, B., DAVIS Jr., J.R. and KOENIG, H.M. Alpha
Globin Gene Organization in Blacks Precludes the Severe
form of Alpha Thalassemia. Nature, 280 : 605-607, 1979.
- 18.ECHAVARRIA, R.A., MOLINA, V.C. and ANGEL, B.M. Enfermedad
por Hemoglobina H. Tercera Forma de Alfa - Talasemia En-
contrada en Colombia. Sangre (Barc), 21 (1) : 43 - 53,
1976.
- 19.EMBURY, S.H., CLARK, M.R., MONROY, G. and MOHANDAS, N.
Concurrent Sickle-Cell Anemia and Alpha-Thalassemia
Effect on Pathological of Sickle Erythrocytes. J Clin
Invest, 73 (1) : 116 - 123, 1984.
- 20.EMBURY, S.H., DOZY, A.M. and KAN, Y.W. Molecular Mecha-
nisms in Alpha-Thalassemia : Racial Differences in Alpha

- Globin Gene Organization. Ann NY Acad Sci, 344 : 31-40, 1980.
21. EMBURY, S.H., DOZY, A.M., MILLER, J., DAVIS Jr, J.R., KLEMAN, K.M., PRESSLEY, H., VICHINSKY, E., LANDE, W.N., LUBIN, B.H., KAN, Y.W. and MENTZER, W.C. Concurrent Sickle-Cell Anemia and Thalassemia Effect on Severity of Anemia. New England J Med, 306 : 270 - 274, 1982.
 22. FELICE, A.E., ALTAY, C.A., MILNER, P.F. and HUISMAN, T.H.J. The Occurrence and Identification of Alpha-Thalassemia-2 among Hemoglobin S Heterozygotes. Am J Clin Pathol, 76 (1) : 70 - 73, 1981.
 23. FELICE, A.E., WEBBER, B., MILLER, A., MAYSON, S.M., HARRIS, H.F., HENSON, J.B., GRAVELY, M.E. and HUISMAN, T.H.J. The Association of Sickle-Cell Anemia with Heterozygous and Homozygous Alpha-Thalassemia-2 : In Vitro Hb Chain Synthesis. Am J Hematol, 6 : 91 - 106, 1979.
 24. FOLAYAN ESAN, G.J. The Thalassaemia Syndromes in Nigeria. Br J Haematol, 19 : 47 - 56, 1970.
 25. FOLAYAN ESAN, G.J. Haemoglobin Bart's in Newborn Nigerians Br J Haematol, 22 : 73 -86, 1972.
 26. FORGET, B.G. Molecular Genetics of Human Hemoglobin Synthesis. Ann Intern Med, 91 (4) : 605 - 616, 1979.
 27. FRIEDMAN, S., ATWATER, J., GILL, F.M. and SCHWARTZ, E. Alpha-Thalassemia in Negro Infants. Pediatr Res, 8 : 955-959, 1974.
 28. GALANELLO, R., MACCIONI, L., RUGGERI, R., PERSEU, L. and CAO, A. Alpha-Thalassaemia in Sardinian Newborns. Br J Haematol, 58 : 361 - 368, 1984.
 29. GUANT, G., LONOCE, A., PIETRAPERIOSA, A., POLIMENO, G. and TANNIOIA, N. Alpha-Thalassaemia in Apulia : Biosynthetic Studies. J Med Genet, 20 : 206 - 209, 1983.
 30. HENDRICKSE, R.G., BOYO, A.E., FITZGERALD, P.A. and KUTI, S. R. Studies on the Haemoglobin of Newborn Nigerians. Br J Med, I : 611 - 614, 1960.

31. HENNI, T., BACHIR, D., TABONE, P., JURDIC, P., GODET, J. and COLONNA, P. Hemoglobin Bart's in Northern Algeria. Acta haemat, 65 : 240 - 246, 1981.
32. HIGGS, D.R., ALDRIDGE, B.E., LAMB, J., CLEGG, J.B., LOWRIE, Y., MASON, K.P., SERJEANT, B.E. and SERJEANT, G.R. The Interaction of Alpha-Thalassemia and Homozygous Sickle-Cell Disease. New England J Med, 306 (24) : 1441-1446, 1982.
33. HIGGS, D.R., LAMB, J., ALDRIDGE, B.E., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., SERJEANT, B.E. and SERJEANT, G.R. Inadequacy of Hb Bart's as an indicator of Alpha-Thalassaemia. Br J Haematol, 51 : 177 - 178, 1982.
34. HIGGS, D.R., PRESSLEY, L., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J., HIGGS, S., CAREY, P. and SERJEANT, G.R. Detection of Alpha-Thalassaemia in Negro Infants. Br J Haematol, 46 : 39 - 46, 1980.
35. HIGGS, D.R., PRESSLEY, L., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J. and SERJEANT, G.R. Alpha-Thalassemia in Black Populations. Johns Hopkins Med J, 146 (6) : 300 - 310, 1980.
36. HIGGS, D.R., PRESSLEY, L., SERJEANT, G.R., CLEGG, J.B. and WEATHERALL, D.J. The Genetics and Molecular Basis of Alpha-Thalassaemia in Association with HbS in Jamaican Negroes. Br J Haematol, 47 : 43 - 56, 1981.
37. HONIG, G.R., GUNAY, U., MASON, R.G., VIDA, L.N. and FERENC, C. Sickle Cell Syndromes. I. Hemoglobin SC - Alpha-Thalassemia. Pediatr Res, 10 : 613 - 620, 1976.
38. HONIG, G.R., MASON, G., TREMAINE, L.M. and VIDA, L.N. Sickle Cell Syndromes. III. Silent-Carrier Alpha-Thalassemia in Combination with Hemoglobin S and Hemoglobin C. Pediatr Res, 13 (10) : 1109 - 1111, 1979.
39. HUNT, D.M., HIGGS, D.R., OLD, J.M., CLEGG, J.B., WEATHERALL, D.J. and MARSH, G.W. Determination of Alpha Thalassaemia Phenotypes by Messenger RNA Analysis. Br J Haematol 45 : 53 - 64, 1980.
40. JACKSON, I.J. and WILLIAMSON, R. Annotation-Mapping of the Human Globin Genes. Br J Haematol, 46 : 341 - 349, 1980.

41. JERI, C.A., ROJAS, D.M. and CASTILLO, A.J. Enfermedad por Hemoglobina H. Estudio de Dos Familias Peruanas. Sangre (Barc), 21 (1) : 67 - 76, 1976.
42. JOHNSON, C.S., CONSTANTINI, T. and BEUTLER, E. Alpha-Thalassemia - Prevalence and Hematologic Findings in American Blacks. Arch Intern Med, 142 : 1280 - 1283, 1982.
43. KAN, I.W., DOZY, A.M., VARMUS, H.E., TAYLOR, J.M., HOLLAND J.P. and LIE-INJO, L.E. Deletion of Alpha-Globin Genes in Haemoglobin H Disease Demonstrates Multiple Alpha-Globin Structural Loci. Nature, 255 : 255 - 256, 1975.
44. KANAVAKIS, E., TZOTZOS, S., LIAPAKI, A., METAXOTOU-MAVROMATI A. and KATTAMIS, C. Frequency of Alpha-Thalassemia in Greece. Am J Hematol, 22 : 225 - 232, 1986.
45. KANAVAKIS, E., WAINSCOT, J.S., WOOD, W.G., WEATHERALL, D. J., CAO, A., FURBETTA, M., GALANELLO, R., GEORGIU, D. and SOPHOCLEOUS, T. The Interaction of Alpha-Thalassaemia with Heterozygous Beta-Thalassaemia. Br J Haematol, 52 : 465 - 473, 1982.
46. LEHMANN, H. Different Types of Alpha-Thalassaemia and Significance of Haemoglobin Bart's in Neonates. Lancet, July, 1970.
47. LEHMANN, H. and CARREL, R.W. Nomenclature of the Alpha-Thalassaemias. Lancet, 1 (8376) : 552-553, 1984.
48. LEHMANN, H. and HUNTSMAN, R.G. Man's Haemoglobins. Amsterdam, North-Holland Publishing Co., 1974.
49. LIE-INJO, L.E., SOLAI, A. HERRERA, A.R., NICOLAISEN, L., KAN, Y.W., WAN, W.P. and HASAN, K. Hb Bart's Level in Cord Blood and Deletions of Alpha-Globin Genes. Blood, 59 (2) : 370 - 376, 1982.
50. MARTINEZ, G. and COLOMBO, B. Alpha-Thalassaemia in Cuba. Acta haemat, 55 : 36 - 39, 1976.
51. MEARS, J.G., LACHMAN, H.M., LABIE, D. and NAGEL, R.L. Alpha-Thalassemia is Related to Prolonged Survival in Sickle Cell Anemia. Blood, 62 (2) : 286 - 290, 1983.

52. MELIS, M.A., PIRASTU, M., GALANELLO, R., FURBETTA, M., TERESA, T. and CAO, A. Phenotypic Effect of Heterozygous Alpha and Beta⁰-Thalassemia Interaction. Blood, 62 (1) : 226 - 229, 1983.
53. NA-NAKORN, S. and WASI, P. Alpha-Thalassemia in Northern Thailand. Am J Hum Genet, 22 : 645 - 651, 1970.
54. NATHAN, D.G. and OSKI, F.A. Hematology of Infancy and Childhood. 2nd ed. Philadelphia, London, Toronto, W.B. Saunders Company, 1981. Vol I.
55. NHONOLI, A.M., KOJWALILE, J.M., MMARI, P.W. and SHEMAGHODA, Y. Haemoglobin Bart's in Newborn Tanzanians. Acta haemat, 61 : 114 - 119, 1979.
56. OHENE-FREMPONG, K., RAPPAPORT, E., ATWATER, J., SCHWARTZ, E. and SURREY, S. Alpha-Gene Deletions in Black Newborn Infants with Hb Bart's. Blood, 56 (5) : 931-933, 1980.
57. ORKIN, S.H. and GOFF, S.C. The Duplicated Human Alpha-Globin Genes : Their Relative Expression as Measured by RNA Analysis. Cell, 24 (2) : 345 - 351, 1981.
58. OTTOLENGHI, S., LANYON, W.G., PAUL, J., WILLIAMSON, R., WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B., PRITCHARD, J., POOTRAKUL, S. and BOON, W.H. Gene Deletion as the Cause of Alpha-Thalassaemia. Nature, 251 : 389 - 392, 1974.
59. OZSOYLU, S. and MALIK, S.A. Incidence of Alpha-Thalassemia in Turkey. Turk J Pediatr, 24 (4) : 235 - 244, 1982.
60. PAGNIER, J., ELION, J., LAPOUMÉROULIE, C., VIGNERON, C. and LABIE, D. Homozygous Deletional Alpha⁺ Thalassaemia Associated with Unequal Expression of the Two Remaining Alpha-1 Genes (α_1^A and α_1^B). Br J Haematol, 52:115-125, 1982.
61. PEMBREY, M.E., MACWADE, P. and WEATHERALL, D.J. Reliable Routine Estimation of Small Amounts of Foetal Haemoglobin by Alkali Denaturation. J Clin Pathol, 25 : 738 - 740, 1972.
62. PEMBREY, M.E., WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B., BUNCH, C. and PERRINE, R.P. Haemoglobin Bart's in Saudi Arabia. Br J Haematol, 29 : 221 - 225, 1975.

63. PILISZEK, T.S. Hb Bart's and its Significance in the South African Negro. Acta haemat, 61 : 33 - 38, 1979.
64. POOTRAKUL, S., SAPPRAPA, S., WASI, P., NA-NAKORN, S. and SUWANIK, R. Haemoglobin Synthesis in 28 Obligatory Cases for Alpha-Thalassemia Traits. Humangenetik, 29 (2): 121 - 126, 1975.
65. RAMALHO, A.S. As Hemoglobinopatias Hereditárias. Um problema de Saúde Pública no Brasil. Ribeirão Preto, Revista Brasileira de Genética, 1986.
66. RINGELHANN, B. Haemoglobin Bart's and Alpha - Thalassaemia in African Children. Acta haemat, 65 : 142 - 143, 1981.
67. ROUSSEAU, J., MATHEW, C.G.P., REES, J.S., du TOIT, E., BOTHERA, M.C. and HARLEY, E.H. Incidence of Hb Bart's and Alpha-Thalassaemia Genotypes in a South African Population. Acta haemat, 73 : 159 - 162, 1985.
68. SÁENZ, G.F., ELIZONDO, J., ARROYO, G., JIMÉNEZ, J. and MONTERO, G. Síndromes Drepanocíticas en Costa Rica. VI. Síndrome de Heterocigosis Doble S/Alpha - Talasemia. Sangre (Barc), 24 (2) : 205 - 210, 1979.
69. SÁENZ, G.F., JIMÉNEZ, E. and MORA, L. Enfermedad por Hemoglobina H en Costa Rica. Sangre (Barc), 24 (3) : 333 - 339, 1979.
70. SANCAR, G.B., CEDENO, M.M. and RIEDER, R.F. The Varied Arrangement of the Alpha-Globin Genes in Alpha-Thalassemia and HbH Disease in American Blacks. Johns Hopkins Med J 146 (6) : 264 - 269, 1980.
71. SCHMAIER, A.H., MAURER, H.M., JOHNSTON, C.L. and SCOTT, R. B. Alpha-Thalassemia Screening in Neonates by Mean Corpuscular Volume and Mean Corpuscular Hemoglobin Determination. J Pediatr, 83 (5) : 794 - 797, 1973.
72. SERJEANT, B.E., MASON, K.P., KENNY, M.W., STUART, J., HIGGS, D.R., WEATHERALL, D.J., HAYES, R.J. and SERJEANT, G.R. Effect of Alpha-Thalassaemia on the Rheology of Homozy-

- gous Sickle Cell Disease. Br J Haematol, 55 (3) : 479 - 486, 1983.
73. STEINBERG, M.H. Haemoglobin C/Alpha-Thalassaemia : Haematological and Biosynthetic Studies. Br J Haematol, 30 (3) : 337 - 342, 1975.
74. STEINBERG, M.H., ADAMS, J.G. and DREILING, B.J. Alpha Thalassaemia in Adults with Sickle-Cell Trait. Br J Haematol, 30 (1) : 31 - 37, 1975.
75. STEINBERG, M.H., COLEMAN, M.B., ADAMS, J.G., PLATICA, O., GILLETTE, P. and RIEDER, R.F. The Effects of Alpha-Thalassaemia in Hb SC Disease. Br J Haematol, 55 : 487 - 492, 1983.
76. STEINBERG, M.H. and HEBBEL, R.P. Clinical Diversity of Sickle Cell Anemia : Genetic and Cellular Modulation of Disease Severity. Am J Hematol, 14 : 405 - 416, 1983.
77. TAYLOR, J.M., DOZY, A.M., KAN, Y.W., VARMUS, H.E., LIE-INJO, L.E., GANESAN, J. and TODD, D. Genetic Lesion in Homozygous Alpha-Thalassaemia (Hydrops Fetalis). Nature, 251 : 392 - 393, 1974.
78. TONDO, C.V. and SALZANO, F.M. Abnormal Hemoglobins in a Brazilian Negro Population. Am J Hum Genet, 14 : 401 - 409, 1962.
79. VAN BAELEN, H., VANDEPITTE, J., CORNU, G. and EECKLES, R. Routine Detection of Sickle-Cell Anaemia and Haemoglobin Bart's in Congolese Neonates. Trop geogr Med, 21 : 412-426, 1969.
80. VELATI, C., SAMPIETRO, M., SCIARIADA, L., ALLIEVI, E., MOSCONI, L., CAPPELLINI, M.D. and FIORELLI, G. Neonatal Screening for Hb Bart's in Italian Subjects of Heterogeneous Regional Origin Born in Lombardy. Haematologica (Pavia), 68 (1) : 20 - 29, 1983.
81. VILLEGAS, A., GUTIERREZ, A.P., MEDIAVILLA, J.D. and ESPINOS D. Observaciones de Alfa-Talasemia y de Hemoglobina H en Espanoles. Sangre (Barc), 24 (6) : 1088 - 1102, 1979.
82. WEATHERALL, D.J. Abnormal Haemoglobins in the Neonatal Period and their Relationship to Thalassaemia. Br J

Haematol, 9 : 265 - 277, 1963.

83.WEATHERALL, D.J. Biochemical Phenotypes of Thalassemia in the American Negro Population. Ann NY Acad Sci, 119 : 450 - 462, 1964.

84.WEATHERALL, D.J. The Molecular Basis of Thalassemia. Johns Hopkins Med J, 139 : 205 - 210, 1976.

85.WEATHERALL, D.J. The Thalassemias. In : WILLIAMS, W.J., BEUTLER, E., ERSLEU, A.J. and LICHTMAN, M.A. Hematology. 3rd edn. McGraw-Hill Book Company, 1983. Part IV, cap. 50, 493 - 521.

86.WEATHERALL, D.J. and CLEGG, J.G. The Thalassaemias Syndromes. 3rd edn. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1981.

87.WHO WORKING GROUP. Hereditary Anaemias : Genetics Basis, Clinical Features, Diagnosis, and Treatment. Bull WHO, 60 (5) : 643 - 660, 1982.

88.WILLCOX, M.C. Thalassaemia in Northern Liberia. A Survey in the Mount Nimba Area. J Med Genet, 12 : 55 - 63, 1975.

89.WONG, S.C., ALI, M.A.M. and BOYADJIAN, S.E. Sick Cell Traits in Canada. Trimodal Distribution of HbS as a Result of Interaction with Alpha-Thalassaemia Gene. Acta haemat, 65 (3) : 157 - 163, 1981.

90.ZAGO, M.A. Síntese de Globinas nas Talassemias e Aspectos da Função Esplênica na Anemia Falciforme e na Heterozigose Dupla para Beta Talassemia e Hemoglobinopatia S. Ribeirão Preto, 1981. Tese de Livre-Docência, USP.

91.ZAGO, M.A. and COSTA, F.F. Hereditary Haemoglobin Disorders in Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 79 : 385 - 388, 1985.

92.ZAGO, M.A., COSTA, F.F. e BOTTURA, C. Natureza do Distúrbio da Síntese de Hemoglobina nas Talassemias. Rev Ass Med Brasil, 27 : 250 - 252, 1981.

93.ZAGO, M.A., COSTA, F.F. e BOTTURA, C. Teste de Solubilida-

de Quantitativo Modificado em Hemolisados Normais e em Variantes da Hemoglobina. Rev. Paul Med, 100 (3) : 15 - 17, 1982.

94.ZAGO, M.A., COSTA F.F. and BOTTURA, C. Hemoglobin H Disease in Three Brazilian Families. Rev Brasil Genet, VII (1) : 137 - 147, 1984.

95.ZAGO, M.A., COSTA, F.F., FREITAS, T.C. and BOTTURA, C. Clinical, Hematological and Genetic Features of Sickle Cell Anemia and Sickle Cell-Beta Thalassemia in a Brazilian Population. Clinical Genetics, 18 : 58 - 64, 1980.