

TATIANA MARY SAKAMOTO

**Hemoglobinopatias e anemias em gestantes no Hospital  
Universitário de Campo Grande - MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Doenças emergentes, reemergentes e negligenciadas na Região Centro-Oeste: aspectos sócio-culturais, ecoambientais, epidemiológicos e clínicos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Ivo

Campo Grande  
2008

Tatiana Mary Sakamoto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Doenças emergentes, reemergentes e negligenciadas na Região Centro-Oeste: aspectos sócio-culturais, ecoambientais, epidemiológicos e clínicos.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Presidente e Orientadora \_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Lúcia Ivo/UFMS

1<sup>o</sup> examinador \_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Claudia Regina Bonini Domingos/UNESP

2<sup>o</sup> examinador \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ernesto Antônio Figueiró Filho/UFMS

Suplente \_\_\_\_\_  
Prof. Dr.<sup>a</sup>. Sandra Lúcia Arantes/UFMS

**DEDICO**

Aos meus amados pais Paulo e Mariko pelo incentivo e confiança que nortearam a construção de minha vida pessoal e profissional.  
Ao meu irmão Luciano pelo seu carinho e apoio mesmo que distante.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a capacidade de realizar este trabalho e sempre iluminar o meu caminho.

A todas as gestantes pela participação neste estudo.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Lúcia Ivo, pelo incentivo, ensinamentos e pela generosa paciência.

À Prof<sup>ª</sup>. Mestre Maria Aparecida Rogado Brum, “Mariazinha”, por ter dividido seus conhecimentos sobre as hemoglobinopatias, pelas suas valiosas sugestões e pela disponibilidade de reagentes e das cubas de eletroforese.

À Sandra Maura Aguenta, pelos conselhos e por ter cedido a área experimental na SEAC do HU/UFMS para a realização dos exames laboratoriais.

À coordenação e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Ricardo Aydos.

Às minhas colegas de trabalho Giselle Mocellin Peruzzo, Marli Marques de Oliveira e Liliane de Souza Martins, pela ajuda laboratorial e, além disso, pela amizade e constante apoio.

Aos funcionários do ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do HU/UFMS, pela gentileza e receptividade no setor.

A todos os funcionários da SEAC do HU/UFMS que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Ao Dr. Osnei Okumoto e Dr<sup>ª</sup>. Nádia Shiyo Maya, pela doação de material para a coleta.

À Alcione e à gráfica da editora UFMS, pela impressão dos *folders*.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenir Pontes, pela contribuição na análise estatística.

À Marlene Silveira Maciel, pelo carinho e revisão da língua portuguesa.

A todos os amigos, em especial, Carolina, Anastácia, Maína, Marly e Luciana que, em momento algum, me deixaram desanimar ou desistir dos meus objetivos.

“Bom mesmo é ir  
à luta com determinação,  
abraçar a vida  
e viver com paixão,  
perder com classe  
e vencer com ousadia,  
pois o triunfo pertence a  
quem mais se atreve...  
... e a vida é muito  
para ser insignificante”

Charles Chaplin

## RESUMO

As hemoglobinopatias são um grupo de afecções hereditárias que têm alta variabilidade nas manifestações clínicas, desde formas incompatíveis com a vida até portadores heterozigotos assintomáticos que, sob estresse tal como a gestação, podem manifestar a doença. A detecção dos portadores heterozigotos é de grande importância para a saúde pública, por constituírem fonte de novos heterozigotos e possíveis homozigotos. Atualmente, o controle das hemoglobinopatias tem sido possível por meio do aconselhamento genético e diagnóstico precoce. Objetivo: detectar a frequência de hemoglobinopatias e de anemias, traçar o perfil sociodemográfico, em gestantes atendidas no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, durante o período de janeiro a agosto de 2007. Material e métodos: estudo descritivo observacional e transversal. Foram excluídas as gestantes indígenas, doentes mentais e presidiárias. As variáveis dependentes foram as gestantes; independentes quantitativas: idade, renda, grau de escolaridade, tempo de gestação; independentes qualitativas: portadoras ou não de hemoglobinopatias, etnia, presença ou ausência de anemias. O projeto foi aprovado pelo protocolo nº. 873 de 11 de dezembro de 2006, conforme Portaria 196/96 CNS. Na análise estatística, utilizaram-se os programas Excel, Epi Info versão 3.4.1 e Bio Estat 4.0 e realizou-se também a estatística descritiva. Para possíveis associações entre as variáveis utilizou-se o Teste Qui-quadrado, corrigido por Yates. Foram colhidas amostras de sangue total, armazenadas em frascos com EDTA para a realização de testes seletivos (eritograma; análise da morfologia eritrocitária; resistência osmótica em NaCl 0,36%; eletroforese qualitativa de Hb em acetato de celulose, pH alcalino; pesquisa citológica de HbH intra-eritrocitária) e testes específicos para hemoglobinas anormais (eletroforese quantitativa de Hb em acetato de celulose, pH alcalino; eletroforese de Hb em gel de ágar, pH ácido; prova de falcização de hemácias). Um formulário foi aplicado às gestantes, e os casos positivos receberam orientações quanto à hemoglobina anormal detectada. Resultados: do total de 233 gestantes analisadas, 12% apresentaram hemoglobinopatias com as seguintes frequências: HbAS 3%; HbAC 0,8% e 0,4% de talassemia  $\beta$  intermediária. Houve 7,8% de casos em que não foi possível chegar ao diagnóstico conclusivo, por necessitar de exames complementares, mas que sugerem HbH que está relacionada à talassemia  $\alpha$ . A idade média do total de gestantes participantes foi de 26 anos, sendo que 19,3% tinham entre 14 e 19 anos; 48,5% eram caucasóides e 51,5% não-caucasóides; 64,4% possuíam acima do ensino fundamental completo ou incompleto; a renda familiar era de até cinco salários mínimos para 84,5%. Quanto à ascendência, 22,3% de gestantes eram sul-americanas, 22,3% européias, 7,7% africanas; 43,8% nasceram no município de Campo Grande e 27,4% em outros estados brasileiros. Na avaliação das anemias, 18% das gestantes apresentaram algum tipo de anemia. Conclusão: as frequências de hemoglobinopatias e de anemias, encontradas na população de gestantes estudadas, e o perfil sócio-demográfico traçado, evidencia a importância do diagnóstico precoce e correto que aponta indicadores que podem embasar

ações preventivas e assistenciais, visando à redução da morbimortalidade materna e neonatal em saúde pública.

Palavras-chave: gestantes; hemoglobinopatias; triagem; anemia.



## ABSTRACT

The hemoglobinopathies are a group of inherited diseases that are highly variable in clinic diagnosis, from forms that are incompatible with life to asymptomatic heterozygotes carriers, who under stress like pregnancy, may have the disease. The detection of heterozygote carriers is of great importance for public health as they constitute potential sources of new heterozygotes and possible homozygotes. Nowadays the control of the hemoglobinopathies has been possible through genetic counseling and early diagnosis. Objective: to detect the frequency of hemoglobinopathies and anemia, make the social-demographic profile in pregnant women at the Gynecology and Obstetrics clinic of the University Hospital Maria Aparecida Pedrossian, from the Federal University of Mato Grosso do Sul, from January to August, 2007. Materials and methods: transversal observing descriptive study. Indian pregnant women were excluded, so were mentally sick women and convicted ones. The dependant variables were the pregnant women; quantitative independent: age, income, schooling, length of pregnancy; qualitative independent: hemoglobinopathies carriers or not, ethnic group, having anemia or not. The project was approved in protocol no. 873 from December 11, 2006 according to Portaria 196/96 CNS. In statistical analysis, the programs Excel, Epi Info version 3.4.1 and Bio Estat 4.0 were used and the descriptive statistics was also carried out. For possible interactions among the variables the Q-square Test was used, corrected by Yates. Blood samples were taken and stored in vials with EDTA for selective tests (eritrogram; erythrocyte morphological analysis; osmotic resistance to NaCl 0.36%; qualitative electrophoresis of Hb in cellulose acetate, alkaline pH; cytological research of HbH intra-erythrocyte) and specific tests for defective hemoglobin (quantitative electrophoresis of Hb in cellulose acetate, alkaline pH; electrophoresis of Hb in agar gel, acid pH; falciform erythrocyte test ). A questionnaire was given to the pregnant women and positive cases received orientation concerning the detected abnormal hemoglobin. Results: from the 233 pregnant women who were analyzed, 12% presented hemoglobinopathies with the following frequencies: HbAS 3%; HbAC 0.8% and 0.4% of intermediate  $\beta$ -thalassemia. In 7.8% of the cases a conclusive diagnosis was not possible to be achieved as complementary exams were needed, but they suggest that the HbH is related to  $\alpha$ -thalassemia. In anemia evaluation, 18% of the pregnant women presented some sort of anemia. The average age of the participants was 26 years, 19.3% were between 14 and 19; 48.5% were white and 51.5% were not white; 64.4% had finished or almost finished the eighth grade; the family income was more than five minimum salaries for 84.5%. As for the ancestry, 22.3% of the pregnant women were South American, 22.3% were European, 7.7% were African; 43.8% were born in Campo Grande and 27.4% were born in other brazilian states. Conclusion: the frequency of hemoglobinopathies and anemia found in the studied pregnant women, and the social-demographic profile delineated, shows the importance of correct and early diagnosis that point out indicators that can lead to preventive and helpful actions, in order to reduce mothers' and children's death in public health.

Key words: pregnant women; hemoglobinopathies; screening; anemia.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tridimensional e tetramérica da molécula de hemoglobina.....	17
Figura 2 - Representação esquemática do grupo heme.....	18
Figura 3 - Representação esquemática dos <i>clusters</i> alfa e beta das globinas humana e as regiões de regulação (LCR e HS-40).....	19
Figura 4 - Perfil de produção das cadeias de globina durante as diferentes fases do desenvolvimento humano.....	21
Figura 5 - Eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose, pH alcalino, coloração com negro de amido.....	24
Figura 6 – Mapa da origem dos haplótipos da hemoglobina S.....	26
Figura 7 - Fenômeno da vaso-oclusão..	27
Figura 8 – Microscopia óptica (1.000x) de esfregaço de sangue periférico corado com May Grünwald Giemsa (hemácias falciformes).....	28
Figura 9 - Microscopia óptica (1.000x) de esfregaço de sangue periférico corado com May Grünwald Giemsa (hemácias em alvo).....	30
Figura 10 - Microscopia óptica (1.000x) de esfregaço de sangue periférico corado com azul de cresil brilhante.....	34
Figura 11 – Microscopia óptica (1.000x) de sangue periférico. Anisopoiquilocitose na talassemia beta maior.....	36
Figura 12 - Traçado eletroforético em pH alcalino e ácido das principais hemoglobinopatias (Fonte: Bonini-Domingos, 2006).....	54
Figura 13 - Traçado eletroforético em pH alcalino e ácido das principais hemoglobinopatias (Fonte: Bonini-Domingos, 2006).....	55
Figura 14 – Estatística descritiva da idade de gestantes analisadas, Hospital Universitário/UFMS – 2007.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número e porcentagem de gestantes analisadas, segundo presença ou ausência de hemoglobinas anormais, Hospital Universitário/UFMS – 2007.....	60
Tabela 2 - Número e porcentagem de gestantes analisadas, segundo presença ou ausência de anemias, Hospital Universitário/UFMS – 2007.....	61
Tabela 3 - Número e porcentagem de gestantes analisadas, segundo tipos de hemoglobinas encontradas, Hospital Universitário/UFMS – 2007.....	61
Tabela 4 – Número e porcentagem de gestantes, segundo classificação das anemias, de acordo com índices hematimétricos, Hospital Universitário/UFMS – 2007.....	61
Tabela 5 – Número e porcentagem de gestantes analisadas, segundo variáveis de estudo, Hospital Universitário/UFMS – 2007 (n = 233).....	63
Tabela 6 - Número e porcentagem das gestantes, segundo presença ou ausência de hemoglobinopatias e variáveis de estudo, Hospital Universitário/UFMS – 2007 (n = 233).....	64
Tabela 7 – Número de gestantes portadoras de hemoglobinas anormais, segundo naturalidade e ascendência, Hospital Universitário/UFMS – 2007 (n = 28).....	65
Tabela 8 – Número e porcentagem de gestantes analisadas segundo tipos de hemoglobina e presença de anemia, Hospital Universitário/UFMS - 2007 (n = 233).....	66
Tabela 9 – Número e porcentagem de gestantes analisadas segundo ascendência e naturalidade, Hospital Universitário/UFMS – 2007 (n = 233).....	100

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
HS	Sítio Hipersensível
HU	Hospital Universitário
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
LCR	Região Controladora de Locus
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dissódico dibásico
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Fosfato de sódio monobásico monohidratado
O <sub>2</sub>	Gás oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Qsp	Quantidade suficiente para
TEB	Tris-EDTA-Borato
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VCM	Volume Corpuscular Médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	17
2.1 HEMOGLOBINAS NORMAIS	17
2.2 HEMOGLOBINOPATIAS	21
<b>2.2.1 Hemoglobinas variantes</b>	22
2.2.1.1 Hemoglobina S	22
2.2.1.2 Hemoglobina C	28
<b>2.2.2 Talassemias</b>	30
2.2.2.1 Talassemia $\alpha$	32
2.2.2.2 Talassemia $\beta$	35
2.3 ANEMIA	37
<b>2.3.1 Anemia em gestantes</b>	38
<b>2.3.3 A importância da triagem de hemoglobinopatias em gestantes</b>	39
<b>3 OBJETIVOS</b>	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	42
4.1 TIPO DE ESTUDO	42
4.2 VARIÁVEIS PESQUISADAS	42
4.3 CASUÍSTICA	42
4.4 ASPECTOS ÉTICOS	43
4.5 COMUNICADO AOS PROFISSIONAIS DE SAÚDE	43
4.6 ABORDAGEM DAS GESTANTES	43
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4.8 ENTREGA DE RESULTADOS ÀS GESTANTES	44
4.9 PROCEDIMENTO DE COLETA DE DADOS	45
<b>4.9.1 Eritrograma</b>	46
<b>4.9.2 Resistência osmótica em cloreto de sódio (NaCl) a 0,36%</b>	46
<b>4.9.3 Análise da morfologia eritrocitária</b>	47
<b>4.9.4 Pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H</b>	49
<b>4.9.5 Preparação dos hemolisados</b>	50
<b>4.9.6 Eletroforese qualitativa em acetato de celulose em pH alcalino</b>	52

<b>4.9.7 Eletroforese quantitativa em acetato de celulose em pH alcalino (Dosagem de HbA2)</b>	<b>56</b>
<b>4.9.8 Eletroforese em gel de ágar fosfato em pH ácido</b>	<b>57</b>
<b>4.9.9 Prova de falcização das hemácias</b>	<b>58</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>60</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>67</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias, também conhecidas como afecções hereditárias da hemoglobina, estão incluídas entre as doenças genéticas mais frequentes na população humana e apresentam morbidade significativa em todo o mundo. Esse fato contribuiu para que tais doenças tenham sido as primeiras para as quais foram implantados programas comunitários de investigação e controle, sobretudo nos países mais desenvolvidos do Hemisfério Norte (COMPRI et al., 1996; ORLANDO et al., 2000).

À medida que as doenças infecciosas e a desnutrição vão sendo controladas, as hemoglobinopatias vêm emergindo como um dos mais importantes problemas de saúde pública dos países em desenvolvimento, tanto por sua prevalência como pela gravidade de suas complicações (COMPRI et al., 1996).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mundialmente, 7% da população mundial (400 milhões de pessoas) carregam genes que determinam a presença de hemoglobinas anormais e estudos epidemiológicos mostram que, a cada ano, 300 a 400 mil crianças nascem com alguma forma grave de hemoglobinopatia (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

No passado, as hemoglobinopatias se distribuíam geograficamente nas áreas tropicais e subtropicais do mundo. Graças ao aumento dos movimentos migratórios, ocorridos em diversas regiões com conseqüente miscigenação, essas variantes acabaram-se difundindo em áreas antes tidas como não-endêmicas, como no continente Americano e no Norte da Europa (WAGNER et al, 2005).

O Brasil possui diferentes origens étnicas e com diversificados graus de miscigenação em suas regiões e, em decorrência disso, a população brasileira caracteriza-se por apresentar grande heterogeneidade genética, que se reflete nos polimorfismos de hemoglobinas (VIANA, 1999; CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2005).

Apesar da existência de centenas de hemoglobinopatias, apenas três delas exigem a implantação de programas de saúde pública no Brasil: a hemoglobina S (HbS), a hemoglobina C (HbC) e a talassemia  $\beta$ . Enquanto as

duas primeiras apresentam relevância nacional pela sua freqüência entre afro-descendentes, a talassemia  $\beta$  possui uma importância regional, em virtude da sua freqüência entre os descendentes italianos. Segundo dados da OMS, essas três hemoglobinopatias são suficientes para causar um alto grau de morbidade e mortalidade (RAMALHO; MAGNA; SILVA, 2003).

Estudos realizados na população brasileira revelam que, no país, há aproximadamente 10 milhões de indivíduos heterozigotos para os genes da HbS, da HbC e da talassemia  $\beta$ . Em geral, esses indivíduos desconhecem o fato por serem portadores assintomáticos e assim, facilitam a propagação e a interação desses genes anômalos com outras hemoglobinas variantes, talassemias, enzimopatias e esferocitoses (RAMALHO; MAGNA; SILVA, 2003).

A cidade de Campo Grande, capital do Estado de Mato Grosso do Sul, com uma população estimada em 724.524 habitantes (IBGE, 2007), recebeu influxos de diversas regiões do Brasil. Assim, a triagem nesta população é uma análise importante para a prevenção das hemoglobinopatias.

Em estudos anteriores, em Campo Grande, Brum et al. (1997) detectaram 7,5% portadores de hemoglobinopatias na população. Holsbach (2007) obteve, em uma triagem de cinco anos com recém-nascidos, 1,67% de alterações falciformes.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 HEMOGLOBINAS NORMAIS

A hemoglobina é uma proteína presente no interior dos glóbulos vermelhos. Possui peso molecular de 67.000 dáltons e sua principal função é promover a absorção e o transporte do oxigênio ( $O_2$ ) dos pulmões para os tecidos e de parte do gás carbônico no sentido inverso ( $CO_2$ ) (LORENZI et al., 2003; WAJCMAN, 2007).

A estrutura da hemoglobina é globular, tetramérica, e composta por uma porção protéica, constituída por quatro cadeias de globina e por uma fração não- protéica, o grupo heme (NAOUM; NAOUM, 2004; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

A porção protéica é formada por dois pares de cadeias polipeptídicas; um par com uma seqüência de 141 aminoácidos cada e denominadas do tipo alfa (alfa e zeta). O outro par, contendo uma seqüência de 146 aminoácidos cada e conhecidas por tipo beta – beta, delta, gama-glicina, gama-alanina e épsilon (Figura 1) (NAOUM, 1997).

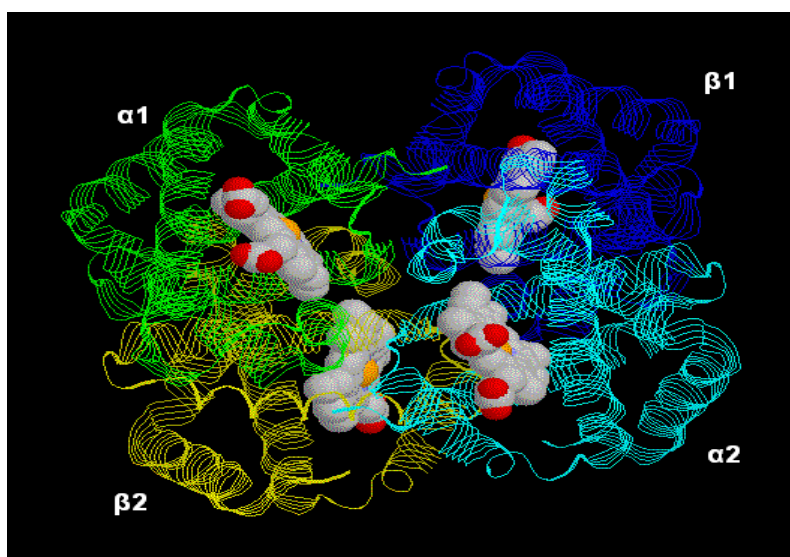


Figura 1 - Estrutura tridimensional e tetramérica da molécula de hemoglobina. Disponível em: <<http://glogin.cse.psu.edu/>>. Acesso em 07 de dezembro de 2007.

O grupo heme é formado por quatro núcleos pirrólicos, contendo em seu centro um átomo de ferro. Cada cadeia globínica se fixa a um grupo heme. O local de fixação é delimitado por aminoácidos hidrófobos que impedem a entrada de água, protegendo o ferro contra a oxidação. O heme forma várias ligações não-covalentes com estes aminoácidos e o átomo de ferro fixa-se, por uma ligação covalente, com uma histidina. A sexta ligação de coordenação do átomo de ferro de cada heme está livre para se ligar à molécula de  $O_2$  durante a oxigenação. Essa estrutura mantém o ferro em estado ferroso ( $Fe^{++}$ ) e confere a cor vermelha da hemoglobina (Figura 2) (NAOUM, 1997; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

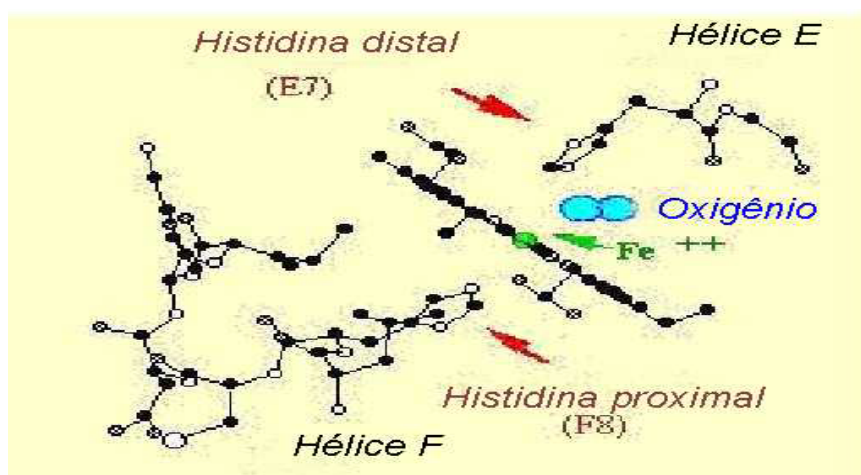


Figura 2 - Representação esquemática do grupo heme. Disponível em: <<http://glogin.cse.psu.edu/>> (com modificações). Acesso em 07 de dezembro de 2007.

Essa conformação molecular da hemoglobina tem duas características importantes, segundo Zago, Falcão e Pasquini (2004): deixa os aminoácidos polares, hidrófilos na superfície externa da molécula, facilitando a sua solubilidade e, cria uma cavidade forrada por aminoácidos hidrófobos na superfície interna, onde fica a molécula de heme com o átomo de ferro no seu centro.

A síntese das cadeias globínicas humanas é regulada por duas famílias (*clusters*) de genes que são dos tipos alfa e beta. Os genes que codificam as cadeias do tipo alfa estão localizados no braço curto do cromossomo 16, incluindo três genes funcionais denominados zeta 2, alfa 2 e alfa 1 ( $\zeta 2$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 1$ ) e três pseudogenes ( $\psi\zeta$ ,  $\psi\alpha 2$ ,  $\psi\alpha 1$ ). Os pseudogenes são genes que possuem

seqüências homólogas aos genes estruturais ativos, mas contêm mutações que inibem sua expressão. Este *cluster* inclui ainda um gene teta ( $\theta$ ) com função não bem definida (Figura 3) (WEATHERALL; CLEGG, 2001; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

Os genes para as cadeias do tipo beta estão localizados no braço curto do cromossomo 11 que compreende cinco genes funcionais: épsilon ( $\epsilon$ ), gama ( $\gamma$ A,  $\gamma$ G), delta ( $\delta$ ) e beta ( $\beta$ ); e um pseudogene ( $\psi\beta$ ) (Figura 3) (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

Os genes dos *clusters* alfa e beta estão sujeitos a vários níveis de regulação. Eles se expressam exclusivamente nos eritrócitos em perfeita harmonia e por períodos bem definidos no desenvolvimento humano, assegurando o balanço correto de cadeias globínicas do tipo alfa e do tipo beta, para a formação dos diferentes tipos de hemoglobina (Figura 4) (CHINELATO – FERNANDES, 2003).

A regulação dos genes alfa se faz por meio de uma região controladora que se denomina HS – 40. A família gênica da globina beta possui uma importante região de regulação do DNA, conhecida como Região Controladora de Locus (LCR) (Figura 3) (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

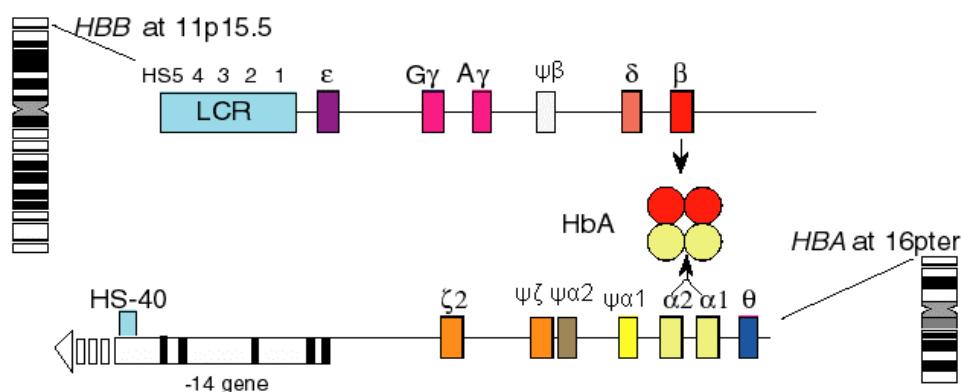


Figura 3 - Representação esquemática dos *clusters* alfa e beta das globinas humanas, das regiões de regulação (LCR e HS-40) e dos pseudogenes. Disponível em: <<http://glogin.cse.psu.edu/>> (com modificações). Acesso em 09 de dezembro de 2007.

As hemoglobinas diferenciam-se entre si por possuir características físico-químicas e mobilidades eletroforéticas distintas. As funções das

hemoglobinas são marcantes desde os primeiros dias de gestação, adaptando-se ao constante desenvolvimento do embrião e feto, estabilizando-se por volta dos seis meses após o nascimento (BONINI-DOMINGOS, 1993).

A primeira hemoglobina embrionária sintetizada é a Hb Gower 1, composta por pares de dímeros de cadeia zeta e épsilon ( $\zeta_2\epsilon_2$ ) que predomina nas quatro semanas iniciais da gestação. Até a 12<sup>a</sup>. semana estão presentes outras duas hemoglobinas embrionárias, compostas por pares de cadeia zeta e gama ( $\zeta_2\gamma_2$ ) e alfa e épsilon ( $\alpha_2\epsilon_2$ ), que constituem as Hb Portland e Hb Gower 2, respectivamente. Ao término desse período, não ocorre mais a síntese das cadeias épsilon e zeta. A partir da quarta semana, inicia-se a síntese da Hb fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ), substituindo gradativamente as hemoglobinas embrionárias e atingindo sua plenitude por volta do terceiro mês de gestação. A hemoglobina A ( $\alpha_2\beta_2$ ) é sintetizada a partir da décima semana, mantendo-se em níveis próximos a 10% até o nascimento. Logo após o nascimento, as hemoglobinas fetal e A apresentam concentrações próximas a 80% e 20%, respectivamente, cujas sínteses se invertem rapidamente até se estabilizarem, em média, no sexto mês de vida pós-natal. A HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) tem sua síntese iniciada na 25<sup>a</sup>. semana, em concentrações reduzidas, e também se estabiliza no sexto mês após o nascimento. Assim, nos adultos, a molécula de hemoglobina predominante é designada por HbA (96% a 98%), além de HbA<sub>2</sub> (2,0% a 3,5%) e HbF (0% a 1,0%) (NAOUM, 1997).

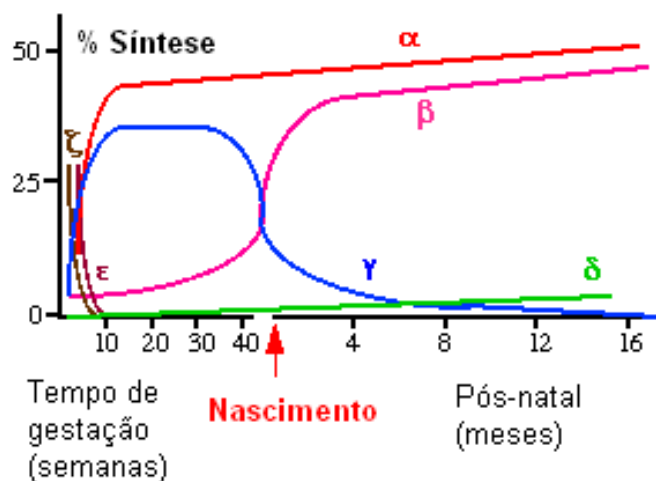


Figura 4 - Perfil de produção das cadeias de globina durante as diferentes fases do desenvolvimento humano. Disponível em: <<http://glogin.cse.psu.edu/>> (com modificações). Acesso em 09 de dezembro de 2007.

## 2.2 HEMOGLOBINOPATIAS

As hemoglobinopatias compreendem um grupo de afecções hereditárias que afetam os genes responsáveis pela síntese de globinas. Como consequência, há formação de hemoglobinas anormais, perturbando a função desempenhada pela hemoglobina dos eritrócitos (NAOUM, 1997).

As hemoglobinopatias podem ser divididas em dois principais grupos de acordo com os defeitos hereditários da hemoglobina: as hemoglobinas variantes e as talassemias (LORENZI et al., 2003; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

## 2.2.1 Hemoglobinas variantes

Mais de 900 variantes de hemoglobina já foram descritas até o momento (HUISMAN, 2005). A maioria delas é originada por simples substituições de aminoácidos, promovendo a formação de molécula de hemoglobina com características bioquímicas diferentes das hemoglobinas normais (NAOUM, 1997, WEATHERALL; CLEGG, 2001).

As substituições de aminoácidos, que ocorrem na porção externa da molécula de hemoglobina, não produzem alterações significativas no comportamento funcional da molécula, com exceção da hemoglobina S (HbS). No entanto, as mutações nas porções internas, que envolvem a região em torno do grupo heme, causam instabilidade da molécula, geralmente iniciada pela oxidação do grupo heme. Outras substituições em resíduos, que participam dos contatos  $\alpha 1\beta 1$  das ligações químicas com o 2,3-bifosfoglicerato e do resíduo histidina c-terminal da cadeia beta, provocam a formação de hemoglobina com alteração na afinidade pelo  $O_2$  (NAOUM; NAOUM, 2004).

Dentre as hemoglobinas variantes mais freqüentes na população brasileira encontram-se as HbS e HbC, que são capazes de produzir doenças em homozigose (NAOUM, 1997).

### 2.2.1.1 Hemoglobina S

A HbS é uma variante de hemoglobina bem caracterizada. A distribuição geográfica do gene da HbS, na África, é expressivamente semelhante àquela do *Plasmodium falciparum*. Indivíduos com HbS em heterozigose, quando infectados por *Plasmodium falciparum*, apresentam uma taxa inferior de parasitização do sangue, em relação a indivíduos que não carregam este gene anômalo. Foi introduzida no Brasil pelo tráfico de escravos e apresenta prevalência variável nas diferentes regiões do país, dependente

dos grupos étnicos formadores de cada região (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

Desde o início do século XIX, há casos descritos na literatura sobre uma doença hereditária que afeta as articulações e ossos e que leva a crises de dores em jovens e crianças da África. Herrick, em 1910 foi o primeiro a relatar que essa doença seria uma anormalidade dos eritrócitos e que estes pacientes tinham uma forma de hemácia parecida com foice. Em 1930, foi comprovado que as hemácias falcizavam em situações de estase, em baixa tensão de oxigênio. Em 1949, Linus Pauling demonstrou que a hemoglobina de paciente falciforme apresentava mobilidade eletroforética, diferente da hemoglobina de uma pessoa sadia. Apenas em 1956, Ingram determinou que a anormalidade química da HbS se devia à mutação no sexto aminoácido da globina beta - o ácido glutâmico pela valina (NAOUM; NAOUM, 2004; WAJCMAN, 2007).

A valina é um aminoácido neutro, enquanto o ácido glutâmico é carregado negativamente e esta alteração resulta em mobilidade mais lenta da HbS quando comparada com a HbA, em eletroforese, pH alcalino. A carga negativa do ácido glutâmico auxilia no afastamento das moléculas de hemoglobina, e a valina, por ser neutra, favorece a polimerização sob condições de baixo teor de O<sub>2</sub> (NAOUM, 1997).

Quando desoxigenadas, moléculas de HbS organizam-se em longos polímeros de filamentos duplos que, por sua vez, se associam em feixes com um duplo filamento central, rodeado de seis filamentos duplos de polímeros, dando às hemácias uma forma alongada, conhecida por hemácias em foice (ZAGO; PINTO, 2007).

O traço falciforme é a forma heterozigota para o gene da HbS. Constitui uma condição relativamente comum e clinicamente benigna em que o indivíduo herda de um dos pais o gene para HbA e do outro o gene para a HbS (MURAO; FERRAZ, 2007). No Brasil, a frequência do traço falciforme varia de 2% a 10%, conforme a intensidade da população negra em cada região (CANÇADO; JESUS, 2007).

O portador é assintomático, não padece de doença e não apresenta alterações hematológicas e anormalidade física. Sua expectativa de vida é semelhante ao da população geral. Os processos vaso-oclusivos, sob

condições fisiológicas normais inexistem; a sobrevivência dos eritrócitos é normal; portanto, não há hemólise (NAOUM, 1997, ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

O traço falciforme pode estar associado ocasionalmente a condições clínicas graves, que incluem: hipotermia, hematúria, aumento do risco às infecções do trato urinário durante a gravidez e retardo constitucional da puberdade. Existem relatos de morte súbita e complicações clínicas em portadores de HbAS, expostos a condições de baixa tensão de O<sub>2</sub>, como anestésias prolongadas e esforços físicos extenuantes (NAOUM, 1997, VIANA, 1999).

O diagnóstico laboratorial é estabelecido pela detecção da HbS em heterozigose com a HbA, por meio de eletroforese em acetato de celulose e pH alcalino (8 a 9) (Figura 5). Seguido do teste de falcização e confirmação pela eletroforese em gel de ágar e pH ácido (5 a 6,5). (MURAO; FERRAZ, 2007; NAOUM, 1997). Atualmente, o procedimento de eletroforese por focalização isoelétrica ou a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) vêm substituindo os métodos anteriores (MURAO; FERRAZ, 2007).

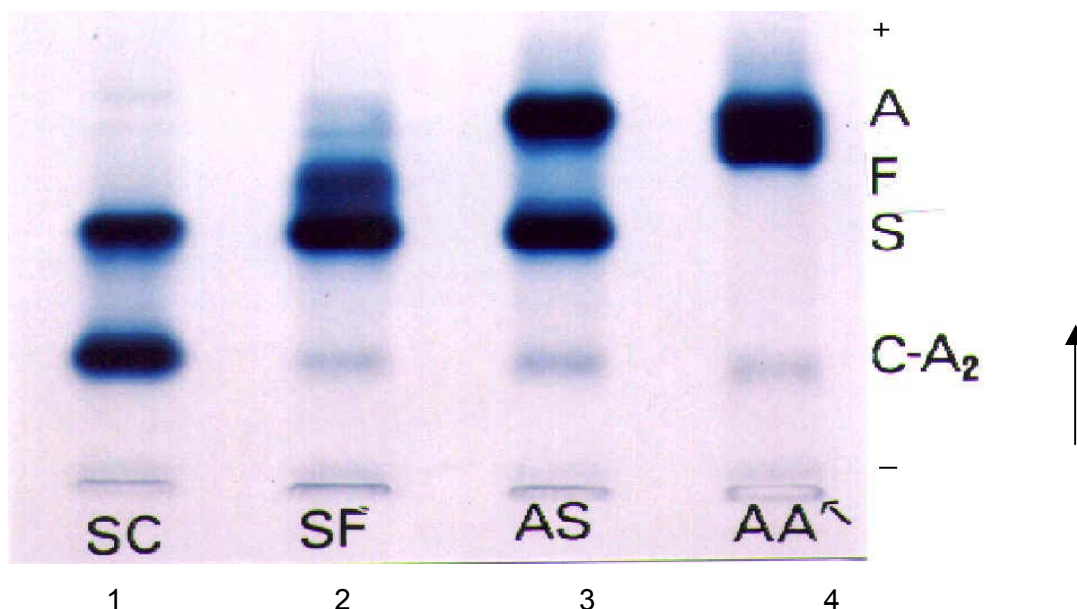


Figura 5 - Eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose, pH alcalino, coloração com negro de amido. Padrões eletroforéticos: (1) Hb SC; (2) Hb SF; (3) Hb AS; (4) Hb AA. Fonte: Naoum, 2003 (com modificações).



A doença falciforme é um termo genérico que se aplica a um grupo de afecções genéticas, caracterizado pela presença da HbS em homozigose, a anemia falciforme (HbSS), em heterozigose com outras hemoglobinas variantes (HbSC, HbSD) ou, ainda, em interação com as talassemias (NAOUM; NAOUM, 2004).

A anemia falciforme prevalece na etnia negra, e sua maior incidência ocorre na África, embora seja também encontrada em países Mediterrâneos, principalmente Grécia, Itália e Israel, assim como na Arábia Saudita, Índia e nos negros americanos (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

As características clínicas da anemia falciforme são marcadas pela diversidade de manifestações entre seus portadores, em virtude de fatores como: concentração de HbF aumentada, associação entre HbS e talassemia  $\alpha$ , fatores ecológicos como o clima, condições sócio-econômicas e atenção médica. Entretanto, a maioria das diferenças clínicas e hematológicas deve-se a fatores genéticos, relacionados ao haplótipo herdado. Até o presente, foram identificados cinco haplótipos diferentes para o gene da globina beta S, recebendo as denominações de acordo com os locais de sua origem. São eles: Árabe-Indiano (Asiático), Senegal, Benin, Bantu ou República Centro Africana e Camarões (Figura 6) (VIANA, 1999; WAJCMAN, 2007; ZAGO; PINTO, 2007).

Os haplótipos Benin e Bantu estão associados ao aumento da gravidade clínica da doença e são os mais freqüentes na população mundial. Os portadores dos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano apresentam níveis de HbF significativamente elevados, diminuindo assim as conseqüências dos processos fisio-patológicos da falcização (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003). No Brasil, estudos realizados em diferentes regiões (SP, PA, BA, RS) mostraram que a maior freqüência do gene da HbS é proveniente do haplótipo Bantu, seguido de Benin (NAOUM, 1997; VIANA 1999). Um trabalho realizado no Ceará por Galiza Neto et al. (2005) detectaram o inverso, maior concentração de haplótipo Benin, seguido de Bantu.

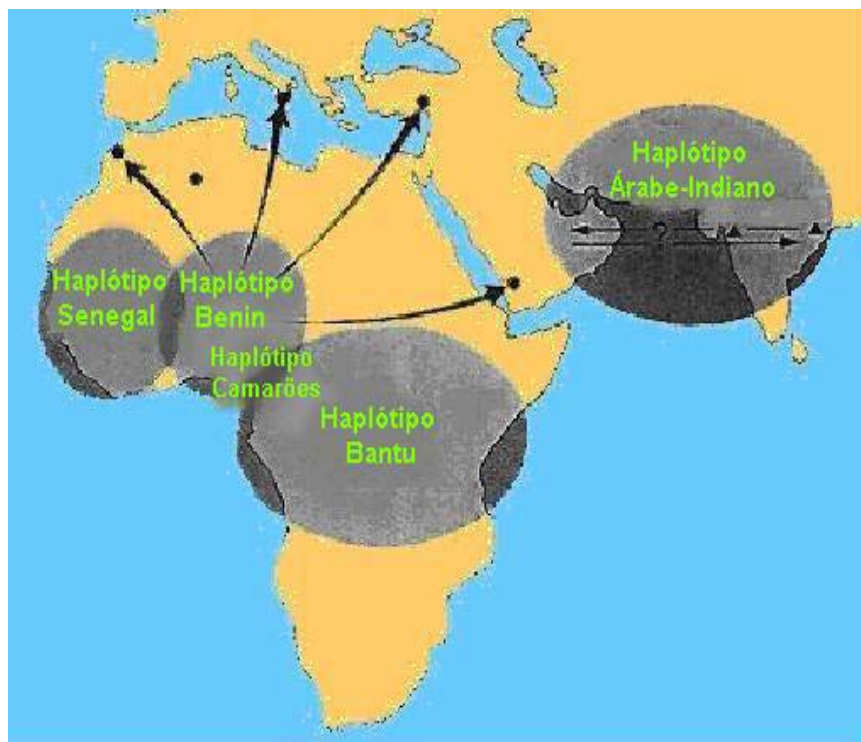


Figura 6 – Mapa da origem dos haplótipos da hemoglobina S. Disponível em: <<http://glogin.cse.psu.edu/>> (com modificações). Acesso em 09 de dezembro de 2007.

A gênese de grande parte das doenças falciformes está relacionada à membrana eritrocitária que reflete alterações moleculares que estão ocorrendo no interior da célula. Essas modificações levam às manifestações clínicas: a) aumento da expressão de moléculas de adesão que favorecem a interação de eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas ao endotélio vascular, desencadeando fenômenos inflamatórios crônicos que culminam com a vaso-oclusão (Figura 7); b) enrijecem a membrana e toda a hemácia, encurtando sua sobrevivência em circulação, contribuindo para uma anemia hemolítica; c) provocam lesões microvasculares; d) produção de intermediários inflamatórios, como citocinas e depleção de óxido nítrico (NO) que contribui para vasoconstrição e ativação da inflamação; e) ativam a coagulação (ZAGO; PINTO, 2007).

Os sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme incluem: crises algicas; úlceras de membros inferiores; síndrome torácica aguda; seqüestro esplênico; priapismo; necrose asséptica

de fêmur; retinopatia; insuficiência renal crônica; acidente vascular cerebral; hipertensão pulmonar, entre outros (KAUL; FABRY; NAGEL, 1996).

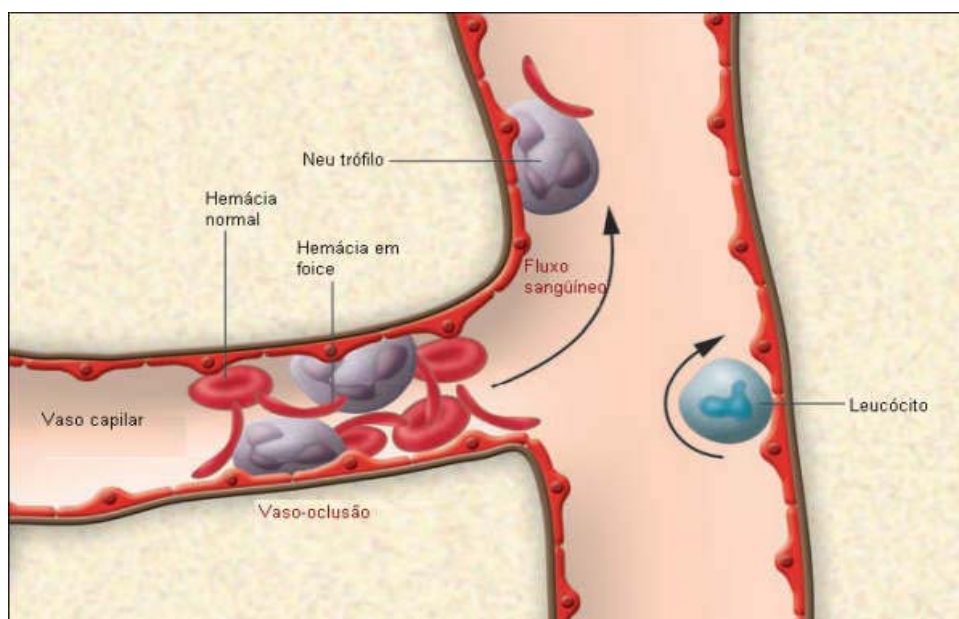


FIGURA 7: Fenômeno da vaso-oclusão. Hemácias em foice expressam mediadores inflamatórios e de coagulação que levam à adesão de células no endotélio vascular. Fonte: Frenette; Atweh, 2007 (com modificações).

Os exames laboratoriais indicam anemia grave, com hemoglobina variável entre 5 e 9 g/dl. A análise da morfologia eritrocitária demonstra células em foice (Figura 8). O diagnóstico depende da comprovação da existência da HbS pela eletroforese de hemoglobinas, em acetato de celulose e pH alcalino com concentrações de HbS variáveis entre 90% e 100%, HbF: 2% e 10%, e HbA2: 2% e 4%. A HbA está sempre ausente em pacientes com anemia falciforme não transfundidos. É necessário a confirmação de HbS em gel de ágar, pH ácido. Pode também ser feito com base na HPLC ou eletroforese com focalização isoeletrica. Em algumas situações, a detecção da alteração molecular deve ser identificada, o que é feito pela reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de seqüenciamento do DNA (Ácido desoxirribonucléico) ou digestão com uma enzima de restrição apropriada (NAOUM; NAOUM, 2004; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

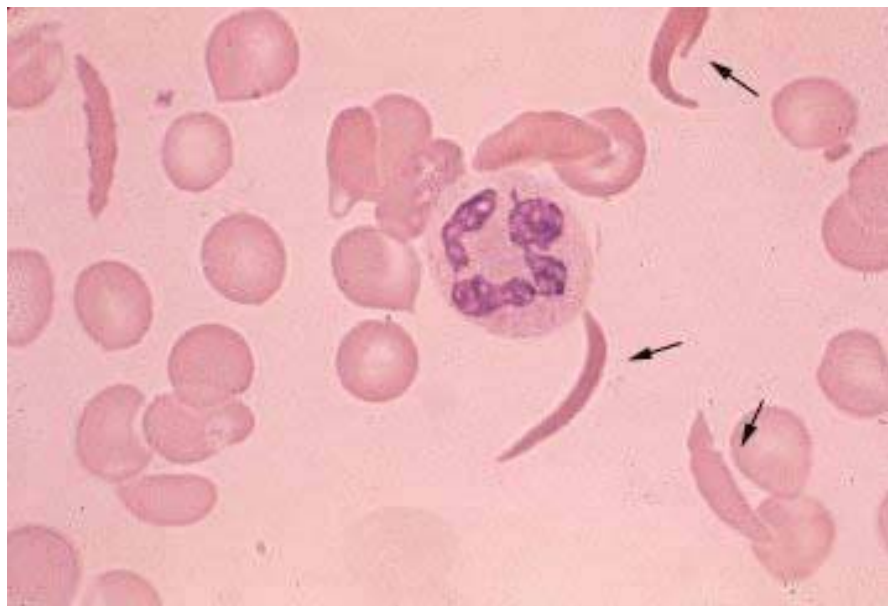


Figura 8 – Microscopia óptica (1.000x) de esfregaço de sangue periférico corado com May Grünwald Giemsa. As setas indicam hemácias falciformes. Fonte: Naoum, 2003.

Várias outras Hb variantes foram relatadas na população brasileira. Dentre elas, há uma variedade de mutantes “S-like” que apresentam padrão de migração eletroforética semelhante ao da HbS em pH alcalino, como as Hb D-Los Angeles, Hb D-Iran, Hb Koler-Bu, Hb Hasharon, Hb Queens, Hb Montgomery, Hb Q-Índia e Hb Lepore. Essas Hb variantes podem ser erroneamente diagnosticadas com o uso de metodologias de diagnóstico pouco eficientes e, conseqüentemente, ter suas freqüências subestimadas (ONDEI; ZAMARO; BONINI-DOMINGOS, 2005). A combinação de várias técnicas clássicas e moleculares parece ser necessária para a identificação acurada das hemoglobinas variantes (ONDEI; BONINI-DOMINGOS, 2006).

#### 2.2.1.2 Hemoglobina C

A HbC é uma variante de hemoglobina, originada por uma alteração na primeira base nitrogenada da trinca GAG para AAG, que leva à substituição do ácido glutâmico na hemoglobina normal, por uma lisina na posição 6 da cadeia beta e resulta numa molécula com carga positiva, alterando sensivelmente a

mobilidade eletroforética da hemoglobina, sendo facilmente diferenciável da HbA em pH alcalino e ácido (LEWIS; BAIN; BATES, 2006; NAOUM, 1997).

É freqüente entre povos da África, especialmente nos países da região ocidental deste continente, onde a prevalência da heterozigose para HbC (HbAC), alcança 30% da população (NAOUM, 1997). Na população brasileira, varia entre 0,3% a 1% em diversas regiões, sendo as formas interativas mais raras (NAOUM; NAOUM, 2004). Em Campo Grande, BRUM et al (1997) encontraram 0,63%.

Os portadores heterozigotos não apresentam anemia ou evidências de diminuição no número de eritrócitos. A análise da morfologia eritrocitária pode demonstrar células em alvo. A identificação desses portadores é feita por eletroforese em pH alcalino e, como outras hemoglobinas anormais migram na mesma posição neste pH pela semelhança entre seu pontos isoelétricos, a diferenciação deve ser realizada por eletroforese em pH ácido, focalização isoelétrica ou HPLC. A análise eletroforética revela 30% a 40% de HbC e 50% a 60% de HbA (Figura 5) (BRUM, 2001; NAOUM, 1997).

O diagnóstico dos portadores é fundamental para a realização do aconselhamento genético, já que a associação dessas variantes com HbS, talassemias ou em homozigose (HbCC) apresentam alterações clínicas detectáveis (NAOUM, 1997).

A homozigose da HbC é rara e caracterizada por anemia hemolítica de intensidade variável, com evidências clínicas de cansaço, fraqueza e, eventualmente, esplenomegalia (NAOUM; NAOUM, 2004). A anemia hemolítica é conseqüência da desidratação das hemácias, que aumenta a viscosidade interna, reduzindo sua deformabilidade e, por fim, o seqüestro esplênico. A formação de cristais e agregados também afeta a maleabilidade das células com HbCC (WAJCMAN, 2007). A morfologia dos eritrócitos é notavelmente anormal, com predominância de células em alvo (90% ou mais), esferócitos e células distorcidas, que parecem ser cristais de HbC (Figura 9) (NAGEL; FABRY; STEINBERG, 2003).

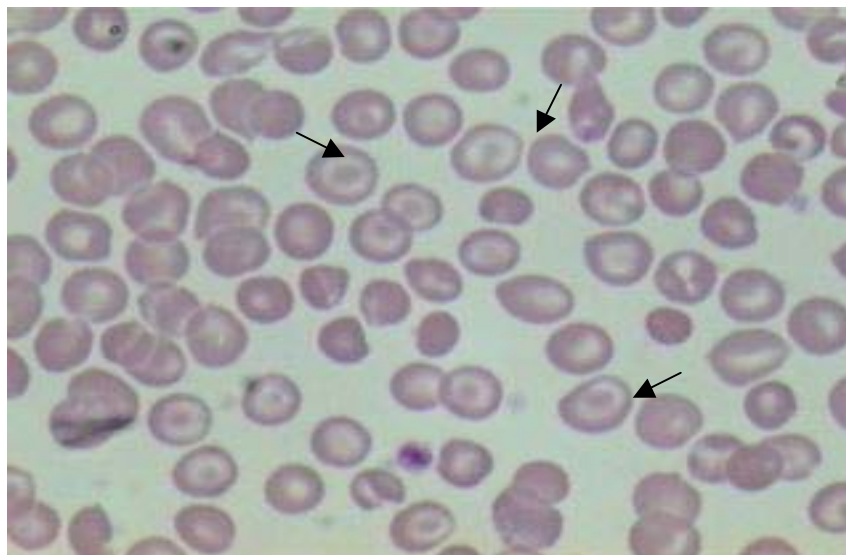


Figura 9 – Microscopia óptica (1.000x) de esfregaço de sangue periférico corado com May Grünwald Giemsa. As setas indicam hemácias em alvo.

### 2.2.2 Talassemias

O termo talassemia foi usado pela primeira vez em 1936 por Whipple para designar uma anemia altamente incidente na região do Mar Mediterrâneo, e que havia sido descrita por Cooley e Lee em 1925, em crianças descendentes de italianos, gregos e sírios. Continuou sendo chamada também de anemia de Cooley em homenagem a este autor que primeiro a descreveu e caracterizou como uma entidade clínica (WEATHERALL, 2004).

As talassemias são caracterizadas por uma redução na produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas que geralmente resultam no desenvolvimento de uma anemia microcítica e hipocrômica. A redução da síntese pode ser total ou parcial e, dessa maneira, as talassemias são classificadas segundo a cadeia globínica afetada em: alfa, beta, delta, delta-beta e gama-delta-beta talassemias (BONINI-DOMINGOS, 1993).

Nas talassemias, mutações em ponto, deleções ou inserções nos nucleotídeos provocam a redução ou supressão da síntese de uma ou mais cadeias globínicas, acarretando um desequilíbrio nas quantidades relativas das cadeias. Todas as manifestações clínicas e hematológicas da enfermidade

derivam deste desequilíbrio (WEATHERALL; CLEGG, 2001; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

Até 2001, estimava-se em torno de 200 diferentes pontos de mutação que causavam talassemia  $\beta$ , sem contar inserções e deleções; e próximo de 100 diferentes deleções ou pontos de mutação foram identificados para talassemia  $\alpha$  (WEATHERALL, 2004).

Quando considerada do ponto de vista clínico, a doença pode ser classificada em talassemia maior (talassemia *major*), talassemia intermediária (talassemia *intermedia*) e talassemia menor (talassemia *minor*). A primeira forma é a mais grave, sintomática e dependente de transfusão, enquanto a talassemia menor identifica os heterozigotos que são assintomáticos e somente podem ser detectados por testes laboratoriais. Finalmente, a talassemia intermediária é uma apresentação mais rara, em que há manifestações clínicas como anemia e esplenomegalia, menos intensas e não dependentes de transfusão (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

Os heterozigotos são habitualmente assintomáticos, embora o defeito possa ser detectado por exames laboratoriais. Os portadores de mais de um gene anormal (os homozigotos e os heterozigotos compostos, ou seja, aqueles que carregam uma associação de defeitos) têm manifestações clínicas que podem variar desde anemia grave, incompatível com a vida, até formas benignas, praticamente assintomáticas (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

As formas sintomáticas mais graves caracterizam-se por uma associação de graus variáveis de anemia hemolítica, hiperplasia eritróide, retardo do desenvolvimento somático e sexual e deformidades do esqueleto, evidentes nos ossos do rosto e do crânio (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

Na conclusão dos achados laboratoriais das talassemias, é importante a utilização de técnicas seletivas e de confirmação aplicadas a cada caso, aliados a histórico clínico e dados hematológicos (LEONELI et al., 2000).

### 2.2.2.1 Talassemia $\alpha$

A talassemia  $\alpha$  é a mais freqüente no mundo, inclusive na população brasileira, está amplamente distribuída nos países banhados pelo mar Mediterrâneo, Oeste da África, Oriente Médio, Índia, Sudeste da Ásia, China, Tailândia, Malásia e Indonésia (BONINI-DOMINGOS, 2004; NAOUM; NAOUM, 2004).

No Brasil, a freqüência da talassemia  $\alpha$  foi por muitos anos, subestimada pela dificuldade de diagnóstico dessa alteração (BONINI-DOMINGOS, 2004).

A principal causa das talassemias  $\alpha$  são as deleções que podem remover um gene ou grandes seqüências da família da globina alfa, levando a uma diminuição parcial ou total na síntese da cadeia alfa. As deleções alfa talassêmicas mais comuns são:

$-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $--_{SEA}$ ,  $--_{FIL}$ ,  $--_{THAI}$ ,  $--_{MED}$  e  $-\alpha^{20.5}$  (CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003).

Em um estudo realizado por Wenning et al. (2000), na região sudeste do Brasil, verificou-se que a deleção  $\alpha^{3.7}$  foi a mais encontrada nos indivíduos analisados.

A gravidade dos fenótipos talassêmicos depende da extensão da deleção e o quanto o gene afetado contribui para a síntese da cadeia alfa. Como o gene  $\alpha 2$  produz 2,5 vezes mais RNAm que o gene  $\alpha 1$ , alterações no gene  $\alpha 2$  terão efeitos fenotípicos mais graves (CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003).

As talassemias  $\alpha$  se devem principalmente por defeitos herdados na expressão dos genes que codificam as globinas alfa, atingindo de um a quatro genes. Por essa razão, é possível classificar as talassemias  $\alpha$  em quatro categorias (MARENGO-ROWE, 2007; WAGNER et al, 2005):

- a) uma forma assintomática ou portador silencioso, com perda de um único gene ( $-, \alpha / \alpha, \alpha$ );
- b) o traço  $\alpha$  talassêmico, no qual há perda de dois genes alfa ( $-, - / \alpha, \alpha$ ) ou ( $-, \alpha / -, \alpha$ ) e pode apresentar discreta anemia microcítica e hipocrômica;
- c) a doença da hemoglobina H, na qual apenas um gene alfa é funcional ( $-, - / -, \alpha$ );
- d) a hidropsia fetal, por Hb Bart's, caracterizada pela ausência dos quatro genes alfa ( $-, - / -, -$ ), essa forma é incompatível com a vida.



É importante destacar que as talassemias do tipo  $\alpha$  podem ter duas causas: hereditária e adquirida. As formas adquiridas são geralmente secundárias a um processo patológico primário como doenças linfó e mieloproliferativas, anemia sideroblástica, entre outras (NAOUM, 1997).

As cadeias globínicas alfa são necessárias para a síntese de hemoglobinas presentes na fase fetal e na fase adulta, exercendo papel importante na manutenção da estabilidade das moléculas de hemoglobina. Assim, os defeitos que interferem na sua síntese têm repercussão clínica em ambas as fases (WAGNER et al, 2005).

Na doença da HbH a deficiência na síntese de globina alfa resulta basicamente em dois grupos de efeitos patológicos com conseqüências fisiopatológicas e eritrocitárias. Durante o desenvolvimento fetal, o excesso de cadeia  $\gamma$  forma Hb Bart's (tetrâmero  $\gamma_4$ ), no adulto o excesso de cadeia  $\beta$  forma HbH (tetrâmero  $\beta_4$ ), essas hemoglobinas são más transportadoras de oxigênio, pois têm afinidade dez vezes maior que a HbA e, por serem estáveis, precipitam no eritrócito e liberam o ferro, causando oxidações com geração de radicais livres que atacam a camada lipoprotéica da membrana. Esse processo deforma os eritrócitos, alterando-lhes também a sua morfologia, fatos que, somados à oxidação da proteína banda 3 da membrana, permitem o reconhecimento imunológico dos macrófagos do sistema reticuloendotelial, causando a precoce destruição dos eritrócitos e, por fim, a anemia. Esse processo é contínuo e dependente da extensão da lesão do gene alfa, resultando em anemia e eritropoiese acelerada que, ao longo do tempo, causa a expansão da medula e deformidades ósseas e esplenomegalia (CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003; NAOUM; NOAUM, 2004).

As talassemias  $\alpha$  podem estar associadas a outras hemoglobinopatias. Quando em associações com mutantes de cadeia beta, como as HbS, C e E, a talassemia  $\alpha$  afeta significativamente o nível dessas Hb, influenciando as manifestações clínicas do gene anormal (NAOUM, 1997).

Os métodos utilizados para o diagnóstico das talassemias  $\alpha$  apresentam suas limitações e, muitas vezes, o estudo familiar e análise de DNA são necessários para a determinação do tipo de alteração correto e adequado aconselhamento genético. A microcitose é característica das talassemias, mas, no caso das talassemias  $\alpha$ , muitas vezes a morfologia dos eritrócitos

apresenta-se normal. A concentração de HbA<sub>2</sub> está geralmente normal ou discretamente diminuída. Os valores de ferro sérico são de grande valia para o diagnóstico, pois esclarece a situação por ferropenia. Pode haver presença de HbH na eletroforese. A observação de corpos de inclusão de HbH requer a prática do analista e tempo disponível, além do fato de que formas diferentes de talassemias  $\alpha$  podem apresentar padrões de precipitação semelhantes e a ausência desses corpos não exclui a talassemia  $\alpha$  (Figura 10) (NAOUM, 1997; VIANA, 1999).

Métodos de DNA diferenciam os tipos de alterações que causam a talassemia  $\alpha$ , mas são difíceis de serem utilizados como rotina, principalmente em países de terceiro mundo (VIANA, 1999).

O diagnóstico pré-natal não se faz tão urgente quanto para talassemia  $\beta$ , pois na talassemia  $\alpha$  os homozigotos não sobrevivem após a vida intra-uterina e a doença da HbH é compatível com a sobrevivência normal. Casais de risco para hidropsia fetal devem ser identificados e aconselhados em populações que possuem alterações genéticas em frequência aumentada (NAOUM, 1997).

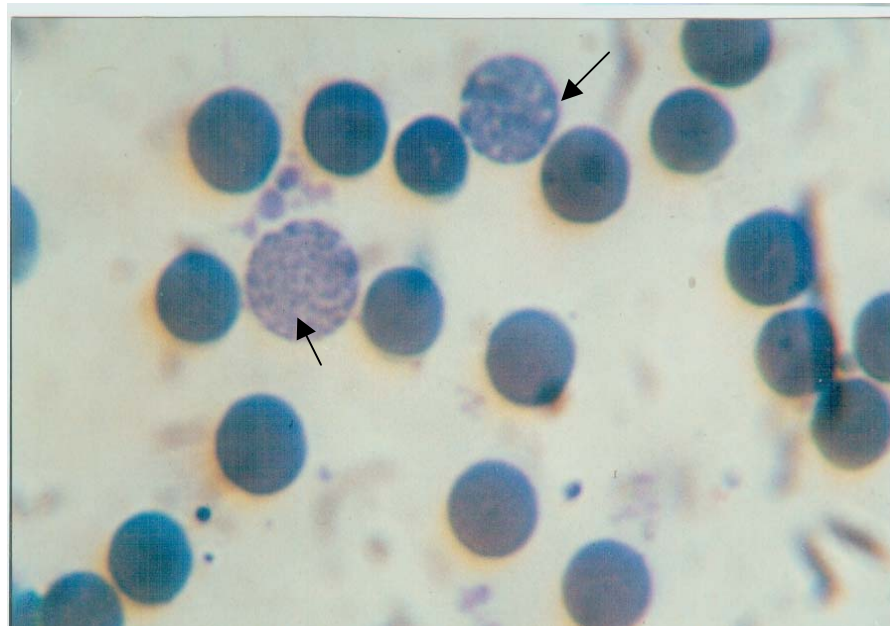


Figura 10 – Microscopia óptica (1.000x) de esfregaço de sangue periférico corado com azul de cresil brilhante. As setas indicam precipitados intra-eritrocitários de HbH.

### 2.2.2.2 Talassemia $\beta$

A talassemia  $\beta$  é a forma considerada clinicamente a mais importante de talassemias por causa dos graus de morbidade e mortalidade causados pelas conseqüências da intensidade da anemia hemolítica. Está amplamente distribuída em todos os continentes, com significativa prevalência na Itália, Chipre, Grécia e países do Oriente Médio, locais em que a prevalência do gene beta talassêmico varia entre 2% e 30%. No Brasil, a talassemia  $\beta$  menor oscila entre 0,5% e 1,5% (NAOUM; NAOUM, 2004).

A talassemia  $\beta$  apresenta heterogeneidade molecular e expressão fenotípica variável. Caracteriza-se por uma alteração quantitativa da síntese de globinas beta e é classificada como talassemia beta zero ( $\beta^0$ ), quando há lesão integral do gene de globina beta, com redução total de síntese; e talassemias beta mais ( $\beta^+$ ), quando há lesão que afeta parte do gene da globina beta, com redução parcial de sua síntese (MARENGO-ROWE, 2007; WEATHERALL, 2001).

Nas talassemias  $\beta$ , as mutações são as principais causas de redução ou ausência na síntese da cadeia beta. Algumas mutações são específicas de determinados grupos étnicos. As mutações predominantes na população da região Mediterrânea, incluindo italianos, espanhóis e portugueses, são comumente encontradas na população brasileira. A mutação CD39 apresenta alta freqüência na região sudeste, enquanto na região nordeste a mutação IVSI-6 é a mais encontrada (BONINI-DOMINGOS, 2004).

A talassemia  $\beta$  maior é o resultado do estado homocigoto, tanto do tipo  $\beta^+$  quanto do tipo  $\beta^0$ , ou em casos mais raros, de duplo heterocigoto  $\beta^+/\beta^0$ . A ausência ou deficiência acentuada na produção de cadeias beta causa anemia grave. A anemia é notada alguns meses após o nascimento e muitos dos portadores morrem na infância ou até a terceira década, por não terem sido diagnosticados precocemente e por não terem recebido tratamento adequado. Para garantir a sobrevivência desses pacientes, é necessário um tratamento contínuo que consiste em transfusões sanguíneas regulares e no uso de quelantes do ferro, que auxiliam a eliminação do excesso deste metal no organismo. Laboratorialmente, o padrão de hemoglobinas é variável,

caracterizando-se pelo aumento de HbF (20% a 90%). A concentração de HbA2 pode estar normal ou elevada. É característico no hemograma a anisocitose e poiquilocitose (Figura 11) (NAOUM, 1997).

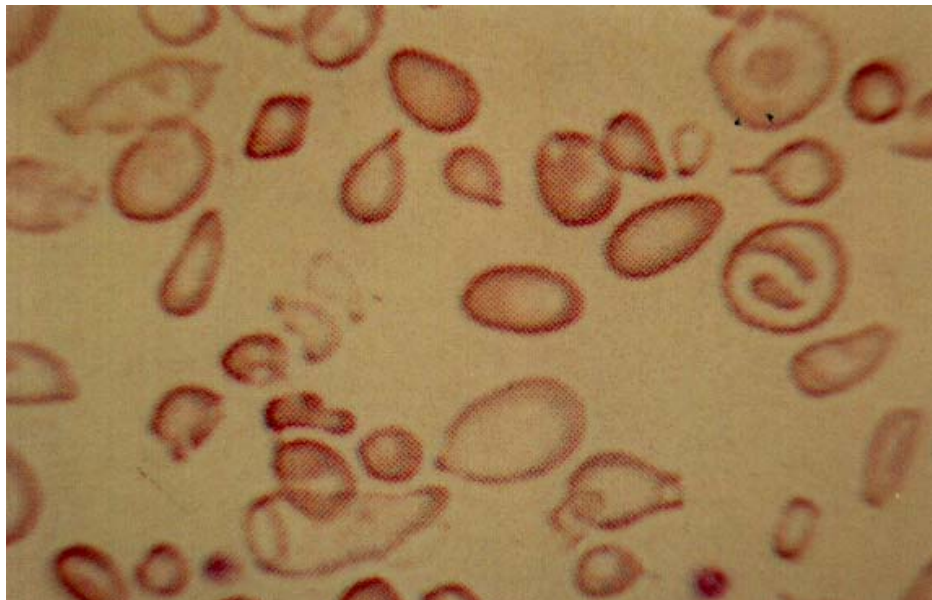


Figura 11 – Microscopia óptica (1.000x) de sangue periférico. Aniso-poiquilocitose na talassemia beta maior. Fonte: Naoum, 2003.

A talassemia  $\beta$  heterozigota é caracterizada geneticamente pela herança de um único componente alterado  $\beta^+$  ou  $\beta^0$ . Através de técnicas de biologia molecular, é possível diferenciar esses heterozigotos. A redução da síntese de globina é menor, mas o suficiente para causar discreto grau de anemia microcítica e hipocrômica e o aumento da resistência osmótica dos eritrócitos. Também pode ser verificado o aumento dos valores de HbA2 e em alguns casos, aumento da HbF (LEWIS; BAIN; BATES, 2006; NAOUM, 1997).

As formas clínicas da talassemia  $\beta$  intermediária são aquelas resultantes de diferentes interações genéticas, cujos portadores apresentam um quadro clínico mais ameno do que o da talassemia  $\beta$  maior e não são dependentes constantes de transfusão sangüínea e o nível de hemoglobina fica em torno de 7 – 11 g/dl (NAOUM, 1997; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

O processo fisiopatológico da talassemia  $\beta$  está relacionado com o excesso de globinas alfa livre que acumula-se nos eritroblastos durante a eritropoiese, causando agregação e precipitação e conseqüente eritropoiese

ineficaz na medula óssea. Os eritrócitos com os corpos de inclusões de cadeia alfa que atingem o sangue periférico, sua rigidez, associada às lesões na membrana eritrocitária, contribuem para o seqüestro dessas células durante a circulação no baço, resultando em anemia hemolítica e esplenomegalia (NAOUM; NAOUM, 2004).

### 2.3 ANEMIA

A anemia é uma constatação clínica e laboratorial, resultante de uma situação patológica. Define-se a anemia pela diminuição da hemoglobina circulante em comparação com os valores esperados em pessoas saudáveis do mesmo sexo e da mesma faixa etária, sob as mesmas condições ambientais (NAOUM, 2005; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

As anemias podem ser classificadas de acordo com o diagnóstico laboratorial que incluem os indicadores hematológicos (hemoglobina, hematócrito e hemácias) e os índices hematimétricos (volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média) (LEWIS; BAIN; BATES, 2006; NAOUM, 2005):

- Anemia Normocítica Normocrômica: eritrócitos, hemoglobina e hematócrito estão diminuídos; Volume Corpuscular Médio (VCM) e Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) são normais. Estão incluídas neste grupo as anemias hemolíticas e hemorrágicas e as aplasias medulares.
- Anemia Microcítica e Hipocrômica: o número de eritrócitos pode estar normal, diminuído ou aumentado; hemoglobina e hematócrito, diminuídos; VCM e HCM, diminuídos. Incluem-se aqui as anemias ferroprivas, talassemias e anemias sideroblásticas.
- Anemia Macroscítica e Normocrômica: eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, diminuídos; VCM, aumentado e HCM normal. Esse tipo de anemia pode ser a megaloblástica.

Os índices hematimétricos são valores obtidos por cálculos a partir dos resultados de contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina e hematócrito (LORENZI et al., 2003; NAOUM, 2005):

- Volume Corpuscular Médio (VCM): estima o tamanho das hemácias, é calculado, dividindo-se o hematócrito pelo número de eritrócitos presentes nesse volume.
- Hemoglobina Corpuscular Média (HCM): expressa a quantidade média de hemoglobina que existe dentro de uma hemácia.
- Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM): é a relação entre o valor da hemoglobina contida num determinado volume de sangue e o hematócrito.

### **2.3.1 Anemia em gestantes**

A gestação normal está associada a ajustes fisiológico e anatômico que acarretam acentuadas mudanças no organismo materno, incluindo a composição dos elementos figurados e humorais do sangue circulante (SOUZA, FILHO; FERREIRA, 2002).

Os problemas mais freqüentes do sistema hematológico no ciclo gestatório-puerperal são: anemia no pré-natal, hemorragia durante o parto e pós-parto imediato e tromboembolismo no puerpério, sendo a anemia o problema hegemônico nesse período (SOUZA, FILHO; FERREIRA, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as causas mais comuns da anemia são: a má nutrição, a deficiência em ferro e folatos, a malária e outras doenças parasitárias. A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e as hemoglobinopatias também são importantes enquanto causas adicionais da anemia (WHO, 2005).

A gestação normal produz expansão do volume plasmático de 40% a 60% e da massa eritrocitária de 20% a 40%, máximas do sexto ao sétimo mês. Graças a esse processo de hemodiluição gravídica, a taxa de hemoglobina diminui até um nível considerado normal na gravidez pela OMS que estabelece o limite de 11 g/dl para hemoglobina, abaixo do qual se define anemia, independente da idade gestacional (WHO, 2005; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

Pelo aumento das necessidades de ferro e folatos, a grávida é vulnerável às anemias ferroprivas e megaloblásticas, de modo que deve receber atenção nutricional e suplementação medicamentosa daqueles elementos (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

### **2.3.2 A importância da triagem de hemoglobinopatias em gestantes**

As hemoglobinopatias têm alta variabilidade nas manifestações clínicas, desde formas incompatíveis com a vida até portadores heterozigotos assintomáticos que, sob estresse tal como a gestação, podem manifestar a doença (ACOG, 2005). Essas gestantes portadoras necessitam de consultas regulares durante o pré-natal com obstetras que atendem pacientes de alto-risco ou ainda, serem acompanhadas por uma equipe multidisciplinar que envolve obstetras, hematologistas e anestesiólogos (ACOG, 2005).

Enquanto não houver tratamento para as doenças genéticas, a prevenção de novos casos pela identificação de portadores de genes patológicos é de importância fundamental (GUSHIKEN et al., 1995). Estudos preventivos de hemoglobinopatias têm sido realizados nos países onde sua incidência alcança frequências marcantes para a saúde pública, como são os casos da Itália, Grécia, Chipre e Tailândia, cada um enfocando da melhor forma a sua população e tipo de hemoglobinopatia que acomete (DINIZ; GUEDES, 2003).

A viabilidade e a eficiência de programas de prevenção dependem basicamente da receptividade da população que, por sua vez, está diretamente relacionada a fatores econômicos, psicológicos e socioculturais extremamente complexos, no entanto, não há uma definição quanto a melhor idade e a população ideal para efetivar tais programas (COMPRI et al, 1996).

Os programas de prevenção para doenças hereditárias destinados a gestantes podem ter boa aceitação, pois, de um modo geral, estas são submetidas ao acompanhamento gestacional, avaliações clínicas e laboratoriais. Assim, uma doença em especial as de origem hereditária, quando

monitorada no período pré-natal, resulta em gravidez normal, com melhor sobrevida dos recém-nascidos (ROWLEY et al, 1991; VIANA, 1999).

O Brasil possui registros de programas de aconselhamento genético desde a década de 50. Infelizmente, são raras as análises bioéticas sobre essas experiências, sendo possível afirmar que o aconselhamento genético no país é ainda um universo desconhecido (DINIZ; GUEDES, 2003).

O aconselhamento genético nas hemoglobinopatias tem o objetivo primordialmente assistencial e educativo, ou seja, o de permitir a indivíduos ou famílias a tomada de decisões consistentes e psicologicamente equilibradas a respeito da procriação (RAMALHO; MAGNA, 2007).

Secundariamente, o aconselhamento genético também pode exercer uma função preventiva que depende de opções livres e conscientes dos casais que apresentam a possibilidade de gerar filhos doentes. Os indivíduos são conscientizados da situação, sem serem privados do seu direito de decisão reprodutiva (RAMALHO; MAGNA, 2007).

O aconselhamento genético não pode estar baseado em hipóteses diagnósticas. O estabelecimento do diagnóstico preciso é responsabilidade de um médico, habilitado em hemoglobinopatias, por curso de especialização, pós-graduação ou residência médica. Estabelecido o diagnóstico, o aconselhamento genético poderá ser fornecido por profissional da saúde capacitado em hemoglobinopatias, desde que sob supervisão médica (RAMALHO; MAGNA, 2007).

O aconselhamento genético também apresenta importantes implicações médicas, psicológicas, sociais, éticas e jurídicas, acarretando um alto grau de responsabilidade às instituições que o oferecem (Universidade, Hospitais, Hemocentros, Clínicas Médicas, Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde) (RAMALHO; MAGNA, 2007).

Considerando que as hemoglobinopatias podem levar à morbidade e à mortalidade do feto e até mesmo da mãe, e à necessidade de implantação de programas para detecção precoce de casos surgiu o interesse em investigar, a frequência desta afecção hereditária, em um grupo populacional como o de gestantes. Estas tendem a cuidar mais de sua saúde e da de seus filhos, e uma vez detectadas passam receber acompanhamento e orientação médica adequada.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a frequência de hemoglobinopatias e demais anemias em gestantes atendidas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU/UFMS).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar a frequência dos tipos de hemoglobinopatias nas gestantes;
2. Classificar as anemias detectadas nas gestantes conforme os índices hematimétricos;
3. Traçar o perfil sociodemográfico das gestantes;
4. Avaliar a associação entre a presença de hemoglobinopatias e etnia nas gestantes;
5. Avaliar a associação entre a presença de hemoglobinopatias e abortamento nas gestantes;
6. Avaliar a associação entre a presença de hemoglobinopatias e período de gestação nas gestantes;
7. Avaliar a associação entre os tipos de hemoglobinas e a presença de anemias nas gestantes.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado o estudo descritivo observacional do tipo transversal.

### 4.2 VARIÁVEIS PESQUISADAS

Variáveis dependentes: gestantes.

Variáveis independentes quantitativas: idade (data de nascimento), renda, grau de escolaridade, tempo de gestação.

Variáveis independentes qualitativas: portadoras ou não de hemoglobinopatias, etnia\*, presença ou ausência de anemias.

\*etnia: foram consideradas caucasóides as gestantes que se declararam brancas e não-caucasóides as que se manifestaram não brancas.

### 4.3 CASUÍSTICA

Analisou-se um total de 233 amostras de sangue periférico de gestantes atendidas no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, da UFMS, durante o período de janeiro a agosto de 2007. Em virtude dos critérios estabelecidos nesta pesquisa de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde, foram excluídas as gestantes indígenas, doentes mentais e presidiárias.

#### 4.4 ASPECTOS ÉTICOS

Foi solicitada a aprovação do projeto ao Comitê de Ética e Pesquisa da UFMS, de acordo com a Resolução 196/96 (Conselho Nacional de Saúde), que foi obtida com o protocolo nº. 873 de 11 de dezembro de 2006 (Anexo A). A declaração de uso de material biológico foi adequadamente preenchida (Anexo B).

#### 4.5 COMUNICADO AOS PROFISSIONAIS DE SAÚDE

Um comunicado sobre o projeto, com os devidos documentos de aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa, foi enviado aos profissionais dos ambulatórios de Ginecologia e Obstetrícia e de Hematologia do HU/UFMS para ciência deste. (Apêndice A).

#### 4.6 ABORDAGEM DAS GESTANTES

Antes da consulta médica, as gestantes foram abordadas individualmente para a exposição de informações sobre o projeto e procedeu-se o convite de participação. Para aquelas que aceitaram participar, foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B). Posteriormente responderam junto à pesquisadora um formulário (Apêndice C).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram processados pelos programas Excel, Epi Info versão 3.4.1 (CDC, 2007) e Bio Estat 4.0 (AYRES et al., 2005) e realizou-se também a estatística descritiva, sendo algumas variáveis apresentadas em forma de tabelas.

Para verificar possíveis associações entre as variáveis estudadas foi utilizado o Teste Qui-quadrado corrigido por Yates. O nível de significância utilizado foi  $p \leq 0,05$ .

#### 4.8 ENTREGA DE RESULTADOS ÀS GESTANTES

A comunicação dos resultados foi feita pela pesquisadora diretamente às gestantes antes da consulta médica. Nos casos positivos, as portadoras receberam do ginecologista-obstetra esclarecimentos sobre a hemoglobina anormal, detectada laboratorialmente e, quando necessário, a paciente foi encaminhada ao hematologista para receber tratamento adequado.

Após o esclarecimento médico, a pesquisadora forneceu uns folhetos, explicou-os e entregou a carteirinha de identificação (Apêndice D). O conteúdo do folheto e da carteirinha contemplavam a hemoglobinopatia detectada e apresentavam as medidas a serem evitadas em cada caso. Ao final, as portadoras foram aconselhadas a guardar o resultado de seu exame como um documento importante, informando sua condição ao médico todas as vezes em que precisarem de sua assistência.

#### 4.9 PROCEDIMENTO DE COLETA DE DADOS

Alguns critérios foram adotados nesta pesquisa para atender aos objetivos:

- a frequência de uma variável em porcentagem foi detectada pela soma dos casos identificados, multiplicado por 100 e dividido pelo número total da amostra;
- os tipos de hemoglobinopatias foram diferenciados em: HbAS, HbAC, HbH (talassemia  $\alpha$ ), talassemia  $\beta$ , por meio de testes laboratoriais, especialmente pelas migrações específicas das hemoglobinas normais e anormais na eletroforese;
- o perfil sociodemográfico foi traçado pelas seguintes variáveis: idade, renda, grau de escolaridade, etnia, ascendência e naturalidade;
- considerou-se a presença de anemia em gestantes quando o resultado da concentração de hemoglobina era inferior a 11g/dl (WHO, 2005);
- os tipos de anemias foram classificados de acordo com os seguintes valores de índices hematimétricos (LEWIS; BAIN; BATES, 2006): anemia normocítica e normocrômica para VCM de 80fl a 100fl e HCM de 26 pg a 32 pg ; anemia microcítica e hipocrômica para VCM inferior a 80 fl e HCM inferior a 26 pg ; anemia macrocítica e normocrômica para VCM superior a 100 fl e HCM de 26 pg a 32 pg .

Após o consentimento informado, 5 ml de sangue total foi coletado por punção venosa através de método a vácuo e armazenado em frascos estéreis, contendo anticoagulante EDTA K3 (Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico) a 5%.

Num período máximo de 48 horas após a coleta, as amostras foram submetidas a testes seletivos e específicos para hemoglobinas anormais, segundo NAOUM (1997), no setor de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFMS:

- testes seletivos: eritrograma; análise da morfologia eritrocitária; resistência osmótica em NaCl 0,36%; eletroforese de Hb em acetato de celulose, pH 8,6 (qualitativo); pesquisa de HbH intra-eritrocitária.

- testes específicos (utilizados somente para aquelas amostras que apresentaram alguma alteração nos testes seletivos): eletroforese de diferenciação em gel de ágar, pH 6,2; eletroforese em acetato de celulose em pH 8,6 (quantitativo); prova de falcização de hemácias.

#### **4.9.1 Eritrograma**

Utilizou-se o método automatizado, o aparelho da ABX Horiba - modelo Pentra 120, para determinar os valores de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos. Esses índices, quando anormais, podem sugerir condições patológicas das anemias.

#### **4.9.2 Resistência osmótica em cloreto de sódio (NaCl) a 0,36%**

Princípio:

Técnica utilizada para a triagem de talassemia  $\beta$ , principalmente na forma heterozigota, pois, nesses casos, os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise nesta solução. A resistência globular não é específica para talassemia  $\beta$  heterozigota, já que resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e outras hemoglobinopatias, como a heterozigose para hemoglobina C (NAOUM, 1997).

Equipamentos:

- Tubos de ensaio 12 x 75mm
- Micropipetas de 10  $\mu$ l
- Folha branca com linhas negras
- Pipeta de 5 ml

**Reagentes:**

Solução estoque – NaCl a 10% - pH 7,4

- Cloreto de sódio	9,0 g
- Fosfato dibásico	1,36 g
- Fosfato monobásico hidratado	0,28 g
- Água destilada q.s.p.	100 ml

Solução NaCl a 0,36%

- NaCl a 10%	36 ml
- Água desstilada q.s.p.	1000 ml

**Procedimento:**

Em tubo de ensaio, pipetou-se 1,5 ml de solução de NaCl a 0,36% e 10µl de sangue total. Homogeinizou-se por inversão suavemente. A leitura foi feita após cinco minutos, colocando o tubo com a amostra na solução de NaCl a 0,36% a 2,0 cm de uma folha branca com linhas negras .

**4.9.3 Análise da morfologia eritrocitária**

Em esfregaço sangüíneo, corado pelo método de May-Grünwald-Giemsa, analisou-se o tamanho, a forma, a cor e as inclusões dos eritrócitos por microscopia óptica.

**Corantes:****Corante May-Grünwald**

- May-Grünwald em pó	2,0 g
- Álcool metílico puro	1000 ml

O corante foi incubado em banho-maria, a 56<sup>0</sup>C por 48 horas, com homogeneização periódica e, posteriormente, foi filtrado e ficou pronto para o uso.

## Corante Giemsa

### Solução estoque

- Giemsa em pó	7,5 g
- Glicerina	405 ml
- Álcool metílico puro	630 ml

O corante foi incubado em banho-maria, a 56<sup>0</sup>C por 72 horas, com homogeneização periódica e, posteriormente, foi filtrado.

### Solução diluída de Giemsa (preparada no momento do uso):

Uma gota da solução estoque de Giemsa, para 1ml de água destilada, ou seja, 10 ml de Giemsa + 200ml de água.

Os corantes foram conservados em frascos âmbar.

### Procedimento:

- As lâminas com esfregaço sangüíneo foram colocadas sobre um suporte apropriado e cobertas com 20 gotas de corante May-Grünwald durante três minutos.
- Acrescentaram-se algumas gotas de água destilada (4 a 6) tamponada em pH = 6,8 sobre as lâminas, homogeneizou-se ligeiramente com o corante, e deixou-se essa mistura por um minuto.
- O corante das lâminas foi escorrido (assoprando, sem lavar), e colocou-se a solução de Giemsa diluída, preparada no momento da coloração, para atuar por 15 minutos.
- As lâminas foram lavadas em água corrente e limpou-se a parte inferior destas com gaze.
- Após secagem ao ar, as lâminas foram analisadas ao microscópio óptico em objetiva de imersão.



#### 4.9.4 Pesquisa intra-eritrocitária de hemoglobina H

##### Princípio:

Os corpos de inclusão de HbH são formados por cadeias beta livres. Após coloração, esses corpúsculos apresentam-se dispostos homogeneamente no interior dos eritrócitos como pequenos pontos azulados (NAOUM; 1997).

##### Equipamentos:

- Microscópio óptico
- Tubos de ensaio
- Lâminas para microscópio
- Banho-maria a 37<sup>o</sup>C
- Micropipetas

##### Reagentes:

###### Solução salina

- Cloreto de sódio 0,9 g
- Água destilada q.s.p. 100 ml

###### Solução citrato

- Citrato de sódio 2,2 g
- Água destilada q.s.p. 100 ml

###### Solução de azul de cresil brilhante

- Azul de cresil brilhante 1,0 g
- Solução salina 100 ml
- Solução citrato 25 ml

##### Procedimento:

- Em tubo de ensaio pequeno colocaram-se 50 µl de sangue total e 50 µl da solução de azul de cresil brilhante.

- Após homogeneização suave do tubo, o material foi incubado a 37°C em banho-maria por 120 minutos.

- Foram feitos esfregaços finos para observação dos agregados de hemoglobina H ao microscópio, em objetiva de imersão (Figura 10).

#### 4.9.5 Preparação dos hemolisados

Para que as amostras fossem submetidas a procedimentos eletroforéticos e testes bioquímicos, as células foram lisadas para a obtenção da solução de hemoglobina, utilizando-se duas metodologias:

- Hemolisado rápido – com saponina.
- Solução de hemoglobinas – com clorofórmio

Hemolisado rápido: com saponina

Equipamentos:

- Placa de Kline
- Micropipetas
- Ponteiras
- Bastão plástico.

Reativo hemolisante

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| - Saponina para análise | 1,0 g  |
| - Água destilada        | 100 ml |

Procedimento:

- Em placa de Kline, colocaram-se 50 µl de sangue com 50 µl de reativo hemolisante, com posterior homogeneização até a hemólise completa da mistura;

- O hemolisado foi usado após cinco minutos, sendo possível sua utilização por, no máximo, quatro horas depois da sua preparação.

## Solução de Hemoglobina: com clorofórmio

### Equipamentos:

- Tubos de ensaio
- Micropipetas
- Pipetas Pasteur
- Centrífuga

### Reagentes:

- Solução salina 0,85%
- Clorofórmio
- Água destilada

### Procedimento:

- Para lavar os eritrócitos, centrifugou-se um ml de sangue, colhido com anticoagulante EDTA, com solução salina a 0,85% a 1.500 rpm, durante cinco minutos, descartando o sobrenadante (plasma). Esse processo foi realizado cinco vezes.

- Ao volume de eritrócitos lavados, adicionou-se outro de água destilada, homogeneizando-se a solução. A seguir, acrescentou-se um volume de clorofórmio idêntico ao do hemolisado formado. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 2.000 rpm, por 15 minutos.

- A solução de Hb sobrenadante, ou hemolisado, foi retirada por meio de pipeta Pasteur e transferida para um tubo limpo, com identificação da amostra. A concentração do hemolisado em Hb, preparado conforme a metodologia apresentada, variou entre 10 a 15 g/dl.

#### 4.9.6 Eletroforese qualitativo em acetato de celulose em pH alcalino

##### Princípio:

Técnica utilizada para qualificação e quantificação de hemoglobinas normais e anormais com mobilidades eletroforéticas diferentes das hemoglobinas normais (NAOUM, 1997).

##### Equipamentos:

- Cuba de eletroforese *Tecnow* e fonte geradora de voltagem (Figura 17)
- Tiras de acetato de celulose *cellogel*
- Tecido absorvente *Perfex*
- Papel absorvente e aplicador de amostras

##### Reagentes:

##### Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB), pH 8,5

- |                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| - Tris hidroximetil aminometano   | 10,2 g  |
| - Ácido etilenodiaminotetracético | 0,6 g   |
| - Ácido bórico                    | 3,2 g   |
| - Água destilada q.s.p.           | 1000 ml |

##### Solução corante Ponceau

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| - Ponceau S             | 0,5 g  |
| - Ácido tricloroacético | 5,0 g  |
| - Água destilada q.s.p. | 100 ml |

##### Solução descorante

- |                         |         |
|-------------------------|---------|
| - Ácido acético glacial | 100 ml  |
| - Metanol               | 50 ml   |
| - Água destilada q.s.p. | 1000 ml |

##### Procedimento:

- Colocou-se igual quantidade de solução tampão em cada compartimento da cuba de eletroforese;

- As fitas de acetato de celulose foram embebidas por 15 minutos no mínimo, em tampão TEB pH 8,5;

- Após serem secas entre duas folhas de papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese, conectando-se aos compartimentos eletroforéticos através de tecido absorvente (*perfex*);

- A solução de Hb (hemolisado rápido) foi aplicada a 1,0 cm da extremidade da fita que fica em contato com o pólo negativo (Figura 18);

- As amostras foram submetidas a 300 volts por 20 minutos;

- As frações foram analisadas, primeiramente sem coloração e, posteriormente, coradas com Ponceau, embebendo as fitas no corante por cinco minutos (Figura 19).

- As tiras foram transferidas para um recipiente que continha solução descorante, agitando-se cuidadosamente entre três a cinco minutos, a solução descorante usada, foi trocada por outra nova, deixando as tiras embebidas nesta solução o tempo necessário para clareá-las (Figura 20).

- Para possibilitar a conservação das fitas de acetato de celulose para registros, essas fitas foram transparentizadas:

- a) as fitas descorantes foram mergulhadas em metanol puro por um minuto;

- b) em seguida, as tiras foram removidas para uma vasilha contendo ácido acético/metanol/glicerina, na proporção 14:85:1 (3,5ml:21,5ml:200µl), por um minuto;

- c) por fim colocaram-se as tiras bem esticadas em superfície de vidro expondo-as em estufa, a 65<sup>0</sup>C para secarem, por cinco minutos.

Para o resultado final, consultou-se o mapa de perfil eletroforético com o traçado de migrações específicas de hemoglobinas normais e anormais (Figuras 12 e 13).



Figura 12 - Traçado eletroforético em pH alcalino e ácido das principais hemoglobinopatias (Fonte: Bonini-Domingos, 2006).

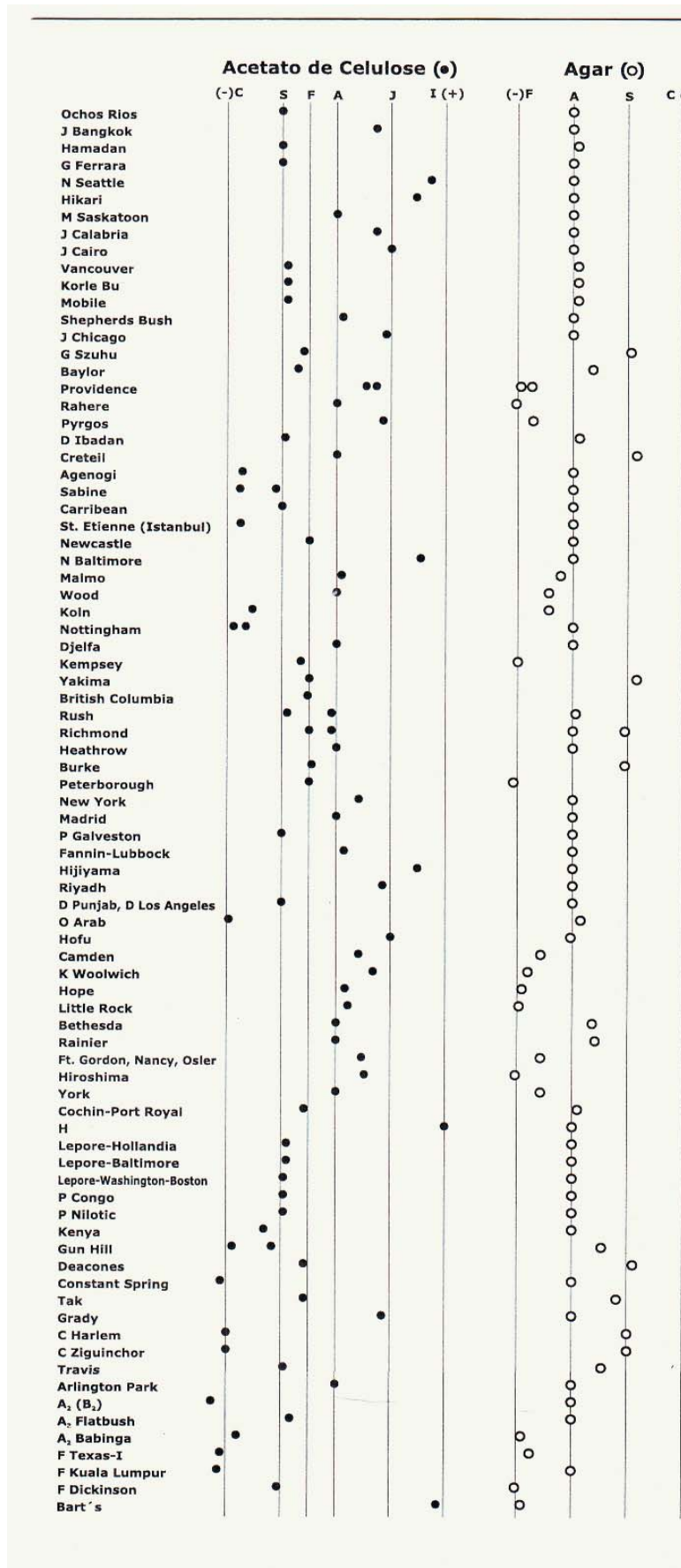


Figura 13 - Traçado eletroforético em pH alcalino e ácido das principais hemoglobinopatias (Fonte: Bonini-Domingos, 2006).

#### 4.9.7 Eletroforese quantitativa em acetato de celulose em pH alcalino (Dosagem de HbA2)

Princípio:

O aumento de HbA2 está na grande maioria dos casos associados às talassemias  $\beta$  heterozigota (NAOUM, 1997).

Utilizaram-se os mesmos equipamentos, reagentes da técnica de eletroforese em acetato de celulose, pH 8,5, para análise qualitativa de hemoglobinas.

Procedimento:

- Colocou-se igual quantidade de solução tampão TEB em cada compartimento da cuba de eletroforese;

- As fitas de acetato de celulose com 5,7 cm de largura foram embebidas por 15 minutos, no mínimo, em tampão TEB pH 8,5;

- Após serem secas entre duas folhas de papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese, conectando-se aos compartimentos eletroforéticos por meio de tecido absorvente (*perfex*);

- Aplicaram-se 20 microlitros de solução de hemoglobina (hemolisado com clorofórmio), em fitas de acetato de celulose com 5,7 cm de largura;

- As amostras foram submetidas a 300 volts por 40 minutos;

- Após a separação das frações de hemoglobina A2 e A, essas frações foram recortadas com tesoura e eluídas em tubos de ensaio, contendo 3 ml de água destilada para Hb A2, e 15 ml de água destilada para HbA, por duas horas com agitação periódica (Figura 23).

- Realizou-se por fim a leitura das densidades ópticas (D.O.) no espectrofotômetro, em 415 nm das frações eluídas, usando água destilada como branco.

Cálculo:

$$\% \text{ HbA2} = \frac{\text{D.O. HbA2} \times 100}{\text{D.O. HbA2} + (\text{D.O. HbA} \times 5)}$$

Valores normais: 2,0% a 3,5%



#### 4.9.8 Eletroforese em gel de ágar fosfato em pH ácido

##### Princípio:

A eletroforese em gel de ágar-fosfato em pH 6,2 é utilizada para diferenciar alguns tipos de Hb que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino (NAOUM, 1997).

##### Equipamentos:

- Cuba de eletroforese e fonte geradora de voltagem da Técnica *Permatron*, mod. F520
- Tecido absorvente
- Aplicador de amostras
- Lâminas de microscópio
- Erlenmeyer de 200 a 250 ml
- Pipetas

##### Reagentes:

Tampão Fosfato pH 6,2

Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel:

- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,02 g
- NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	7,66 g
- Água destilada q.s.p.	1000 ml

Gel de ágar-fosfato

- Ágar ( <i>Difco</i> )	200 mg
- Tampão fosfato pH 6,2	20 ml

Solução corante e descorante – as mesmas usadas para eletroforese alcalina.

##### Procedimento:

- Em um erlenmeyer de 250 ml, aqueceram-se os componentes do gel ágar-fosfato até completa dissolução e pipetaram-se 3,5 ml do gel em lâminas

de microscópio. Esperou-se o gel gelificar à temperatura ambiente e aplicaram-se as amostras, próximo à porção média da lâmina.

- Para conexão do gel aos compartimentos eletrolíticos, contendo tampão fosfato pH 6,2, foi utilizado tecido absorvente (*perfex*).

- As amostras foram submetidas a 100 volts, por 30 minutos.

- As frações foram analisadas inicialmente sem corar e, para melhor interpretação das frações, foram coradas com corante Ponceau.

A interpretação da migração eletroforética dos diferentes tipos de hemoglobina foi realizada por meio de comparações com mapas específicos (Figuras 12 3 13).

#### **4.9.9 Prova de falcização das hemácias**

Princípio:

O teste de falcização é positivo em portadores de HbS (heterozigotos ou homozigotos). Sob baixa tensão de oxigênio, os eritrócitos, contendo hemoglobina S, tomam a forma característica de foice ou de meia-lua (NAOUM, 1997).

Equipamentos:

- Microscópio óptico
- Tubos de ensaio
- Lâminas para microscópio e lamínulas
- Micropipetas
- Placas de Petri
- Esmalte para colorir unhas.

Reagentes:

A solução de metabissulfito de sódio a 2% foi preparada no momento de uso.

- |                           |        |
|---------------------------|--------|
| - Metabissulfito de sódio | 0,05 g |
| - Água destilada          | 2,5 ml |

Procedimento:

- Em tubo de ensaio pequeno, colocaram-se 50  $\mu$ l de sangue total e 50 $\mu$ l da solução de metabissulfito de sódio a 2% .
- Colocou-se uma gota dessa mistura sobre a lâmina, que foi coberta com lamínula, evitando a formação de bolhas.
- As bordas da lamínula foram vedadas com esmalte.
- A lâmina foi deixada em repouso durante 60 minutos, em câmara úmida (placa de Petri com algodão ou gaze embebida em água) (Figura 24).
- Examinou-se a lâmina ao microscópio ótico com aumento de 40X.
- Em caso de resultado negativo aos 60 minutos, realizou-se nova leitura após 24 horas, mantendo a lâmina em câmara úmida.

## 5 RESULTADOS

No período de janeiro a agosto de 2007, foram analisadas amostras de sangue de 233 gestantes, atendidas no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do HU/UFMS, para estudo de alterações de hemoglobina.

Dentre as 233 gestantes analisadas, foram detectadas 28 prováveis portadoras de hemoglobinas anormais, o que corresponde a uma frequência de 12% (Tabela 1).

Na avaliação de anemias em geral, verificou-se que das 233 gestantes, 42 (18%) apresentaram algum tipo de anemia (Tabela 2).

Os genótipos observados – HbAA, HbAS, HbAC, talassemia  $\beta$  e provável HbH - bem como suas frequências, estão indicados na Tabela 3. Do total de 233 gestantes, foram identificadas sete (3%) traços falciforme ou HbAS, duas (0,8%) portadoras para HbAC e um (0,4%) caso de talassemia  $\beta$  intermediária. Houve 18 (7,8%) casos em que não foi possível chegar ao diagnóstico conclusivo, por necessitar exames complementares, mas que sugerem a presença de HbH que está relacionada à talassemia  $\alpha$ .

A Tabela 4 classifica as anemias encontradas, de acordo com critérios laboratoriais (concentração de hemoglobina e índices hematimétricos).

Tabela 1 - Número e porcentagem de gestantes analisadas, segundo presença ou ausência de hemoglobinas anormais, Hospital Universitário/UFMS – 2007

<b>Hemoglobinas anormais</b>	<b>Nº.</b>	<b>%</b>
Ausente	205	88,0
Presente	28	12,0
<b>Total</b>	<b>233</b>	<b>100,0</b>

Tabela 2 - Número e porcentagem de gestantes analisadas, segundo presença ou ausência de anemias, Hospital Universitário/UFMS – 2007

<b>Anemias</b>	<b>Nº.</b>	<b>%</b>
Ausente	191	82,0
Presente	42	18,0
<b>Total</b>	<b>233</b>	<b>100,0</b>

Tabela 3 - Número e porcentagem de gestantes analisadas, segundo tipos de hemoglobinas encontradas, Hospital Universitário/UFMS – 2007

<b>Tipos de hemoglobinas</b>	<b>Nº.</b>	<b>%</b>
HbAA	205	88,0
Sem diagnóstico conclusivo (possivelmente HbH)	18	7,8
HbAS	7	3,0
HbAC	2	0,8
Talassemia $\beta$ intermediária	1	0,4
<b>Total</b>	<b>233</b>	<b>100,0</b>

Tabela 4 – Número e porcentagem de gestantes, segundo classificação das anemias, de acordo com índices hematimétricos, Hospital Universitário/UFMS – 2007

<b>Tipos de anemias</b>	<b>Nº.</b>	<b>%</b>
Sem anemia	191	82,0
Anemia Normocítica e Normocrômica	29	12,4
Anemia Macroscítica e Normocrômica	8	3,5
Anemia Microscítica e Hipocrômica	5	2,1
<b>Total</b>	<b>233</b>	<b>100,0</b>

Com base no formulário aplicado, obtiveram-se respostas relacionadas à idade, etnia, escolaridade, renda, ascendência e naturalidade, para traçar o perfil sociodemográfico das gestantes (Tabela 5). Das 233 gestantes, 45 (19,3%) tinham entre 14 e 19 anos de idade; e 188 (80,7%), 20 anos ou mais (Tabela 5). A idade média do total de gestantes participantes foi de 26 anos e a faixa etária variou de 14 a 42 anos. Nas portadoras de hemoglobinopatias (n = 28), 27 anos foi a idade média e a faixa etária ficou entre 15 e 42 anos (Figura 14).

<b>Idade</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Geral	26	6,7	25	14	42
Portadoras	27	8,0	24,5	15	42
Normais	26	6,5	25	14	42

Figura 14 - Estatística descritiva da idade de gestantes analisadas, Hospital Universitário/UFMS – 2007

Quanto à etnia, 113 (48,5%) declararam-se caucasóides e 120 (51,5%) não-caucasóides (Tabela 5). No que diz respeito ao grau de escolaridade, 150 (64,4%) gestantes possuíam acima do ensino fundamental completo (Tabela 5). Para 197 (84,5%) gestantes a renda familiar era de até cinco salários mínimos (Tabela 5). Em relação à ascendência, 119 (51,1%) não souberam informar; 52 (22,3%) gestantes eram sul-americanas; 52 (22,3%), européias; 18 (7,7%), africanas; e 2 (0,9%), asiáticas (Tabela 5 e Tabela 9 em Apêndice E). No tocante a naturalidade, 102 (43,8%) gestantes nasceram no município de Campo Grande; 67 (28,8%), no interior do estado de Mato Grosso do Sul; e 64 (27,4%), em outros estados (Tabela 5 e Tabela 9 em Apêndice E).

Tabela 5 – Número e porcentagem de gestantes analisadas, segundo variáveis de estudo, Hospital Universitário/UFMS – 2007 (n = 233)

<b>Variáveis</b>	<b>Nº.</b>	<b>%</b>
Idade		
De 14 a 19 anos	45	19,3
A partir de 20 anos	188	80,7
Etnia		
Não Caucasóide	120	51,5
Caucasóide	113	48,5
Escolaridade		
Ensino fundamental completo ou incompleto ou sem estudo	83	35,6
Ensino médio completo ou incompleto	120	51,5
Ensino superior completo ou incompleto	30	12,9
Renda familiar		
Sem informação	16	6,9
até 5 salários mínimos	197	84,5
6 ou mais salários mínimos	20	8,6
Ascendência <sup>(1)</sup>		
Sem informação	119	51,1
Sul-americana	52	22,3
Européia	52	22,3
Africana	18	7,7
Asiática	2	0,9
Naturalidade		
Campo Grande – MS	102	43,8
Interior de MS	67	28,8
Outros estados	64	27,4

(1) Cada gestante podia indicar uma ou mais ascendências.

A Tabela 6 demonstra que neste estudo não houve diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de gestantes caucasóides portadoras de hemoglobinopatias (11,5% = 13) e não-caucasóides (12,5% = 15).

Quanto ao aborto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as gestantes portadoras que tiveram (9,4% = 6) e as que não tiveram aborto (13,0% = 22) (Tabela 6). Com relação ao tempo de gestação, não houve associação com a presença ou não de hemoglobinopatias (Tabela 6).

Tabela 6 - Número e porcentagem das gestantes, segundo presença ou ausência de hemoglobinopatias e variáveis de estudo, Hospital Universitário/UFMS – 2007 (n = 233)

Variáveis	n	Hemoglobinopatias				p	Odds Ratio (IC 95%)
		Sim		Não			
		Nº.	%	Nº.	%		
<b>Etnia</b>							
Caucasóide	113	13	11,5	100	88,5	0,9745 <sup>(1)</sup>	0,91 (0,46 – 1,85)
Não-caucasóide	120	15	12,5	105	87,5		
<b>Aborto</b>							
Sim	64	6	9,4	58	90,6	0,5908 <sup>(1)</sup>	0,69 (0,22 – 1,88)
Não	169	22	13,0	147	87,0		
<b>Tempo gestação</b>							
1º trimestre	40	3	7,5	37	92,5	0,1220	-
2º trimestre	92	16	17,4	76	82,6		
3º trimestre	101	9	8,9	92	91,1		

Nota: se  $p < 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-quadrado.

<sup>(1)</sup> Teste de Qui-quadrado corrigido por Yates.



Em relação à naturalidade e a ascendência das gestantes portadoras, a Tabela 7 apresenta os diversos locais onde nasceram e a sua ascendência.

Tabela 7 – Número de gestantes portadoras de hemoglobinas anormais, segundo naturalidade e ascendência, Hospital Universitário/UFMS – 2007 (n = 28)

Variáveis	Hemoglobinas anormais							
	HbAS		HbAC		Tal beta		Provável HbH	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Naturalidade								
Campo Grande	3	10,7	1	3,6	-	-	9	32,1
Estado de SP	2	7,1	-	-	-	-	3	10,7
Bela Vista	-	-	-	-	-	-	1	3,6
Dourados	-	-	-	-	-	-	1	3,6
Aquidauana	-	-	-	-	-	-	1	3,6
Rio Brilhante	-	-	-	-	-	-	1	3,6
Bonito	-	-	-	-	-	-	1	3,6
Sidrolândia	-	-	-	-	1	3,6	-	-
Coxim	-	-	-	-	-	-	-	-
Estado de MT	-	-	1	3,6	-	-	1	3,6
Estado do CE	1	3,6	-	-	-	-	-	-
Estado do PR	1	3,6	-	-	-	-	-	-
Ascendência								
Não sabem	4	14,3	2	7,1	-	-	5	17,8
Paraguaia	-	-	-	-	-	-	6	21,4
Italiana	2	7,1	-	-	1	3,6	1	3,6
Portuguesa	1	3,6	-	-	-	-	1	3,6
Alemã	-	-	-	-	-	-	1	3,6
Espanhola	-	-	-	-	-	-	2	7,1
Africana	-	-	-	-	-	-	1	3,6
Argentina	-	-	-	-	-	-	1	3,6

Nota: a porcentagem é relativa a 28 gestantes portadoras de hemoglobinopatias.

A Tabela 8 demonstra que das 28 portadoras para hemoglobinopatias, cinco delas (17,9%) também foram detectadas anemia e que não houve diferença estatisticamente significativa entre portadoras de hemoglobinopatias e gestantes normais, em relação à presença de anemia.

Tabela 8 – Número e porcentagem de gestantes analisadas segundo tipos de hemoglobina e presença de anemia, Hospital Universitário/UFMS - 2007 (n = 233)

Tipos de hemoglobina	Presença de anemia						<i>p</i> <sup>(1)</sup>
	Sim		Não		Total		
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Hb normal	37	15,9	168	72,1	205	88,0	0,8124
Hb anormal	5	2,1	23	9,9	28	2,1	
Total	42	18,0	191	82,0	233	100,0	

Nota: se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa.

<sup>(1)</sup> Teste de Qui-quadrado corrigido por Yates.

## 6 DISCUSSÃO

A presente pesquisa sobre a freqüência de anemias e em especial das hemoglobinopatias em gestantes vem complementar outras já realizadas por Brum (2001, 1997) e Holsbach (2007), os quais mostram a relevância das hemoglobinas anormais para a saúde pública no Estado de Mato Grosso do Sul.

Neste estudo, 233 gestantes atendidas no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do HU/UFMS foram investigadas para hemoglobinopatias por meio de técnicas laboratoriais clássicas que incluem procedimentos eletroforéticos. A freqüência de heterozigotos para hemoglobinas anormais, observada foi de 28 (12%) entre as gestantes participantes. Dados da literatura informam que a prevalência de hemoglobinopatias, no Brasil, varia de 2% a 10%, dependendo da região analisada (RAMALHO; MAGNA; SILVA, 2003).

Trabalhos realizados para detecção de hemoglobinopatias em gestantes revelaram a prevalência de 3,6% por Teixeira e Ramalho (1994) na cidade de Araras e de 10,77% por Viana (1999) na região de São José do Rio Preto. A concordância com o trabalho de Viana (1999) deve-se ao fato de a identificação da presença de HbH ter sido feita pela pesquisa citológica de precipitados intra-eritrocitários, a qual não foi realizada por Teixeira e Ramalho (1994).

As gestantes constituem um grupo pouco estudado, no Brasil, para procedimentos preventivos de hemoglobinopatias. É de fundamental importância destinar atividade relativa à prevenção de afecções hereditárias, por meio da orientação a respeito das alterações e do aconselhamento genético. Programas de prevenção fornecem dados para que se possa decidir de maneira responsável sobre seus descendentes, favorecendo o direcionamento clínico para os casos brandos e o acompanhamento adequado aos portadores de formas graves (ROWLEY et al., 1991; VIANA, 1999).

Programas para hemoglobinopatias em gestantes, realizados em países como Estados Unidos da América (ROWLEY et al., 1991), Cuba (GRANDA et al, 1991), Grécia (LOUKOPOULOS, 1985), Canadá (SCRIVER et al., 1984), Inglaterra (ANIONWU et al, 1988) e no Brasil (TEIXEIRA; RAMALHO, 1994; VIANA, 1999) mostraram-se satisfatórios.

Nessa pesquisa, 18% das gestantes apresentaram algum tipo de anemia. O resultado é inferior ao índice considerado de importância alarmante pela OMS, que é igual ou superior a 40%. Prevalências entre 20% e 39% são consideradas de significância moderada no âmbito de saúde pública, sendo aceitos como valores ideais abaixo de 5% (WHO, 2001). Dessa forma o resultado encontrado está distante do desejado, sendo necessárias medidas para o combate da anemia durante o pré-natal realizado no HU/UFMS. No Brasil ainda não há informações consistentes que permitam definir com a necessária segurança a prevalência de anemia durante a gestação. Os dados disponíveis mostram que a prevalência varia de 12,4% a 54,7% dependendo da idade gestacional, estrato socioeconômico e região (VITOLLO; BOSCAINI; BORTOLINI, 2006).

As análises efetuadas possibilitaram caracterizar um total de quatro genótipos, na forma heterozigota: HbAS, HbAC, HbH (talassemias  $\alpha$ ) e talassemia  $\beta$ . A presença de 3% do traço falciforme neste trabalho foi semelhante ao encontrado por Brum et al. (1997) na população geral de Campo Grande, que detectaram 3,15% de HbAS. Viana (1999), em seu estudo com gestantes, identificou 2,01% de traço falciforme; e Teixeira e Ramalho (1994), 2,4%.

A detecção dos portadores heterozigotos, que são assintomáticos, é necessária para a saúde pública, por constituírem fonte potencial de novos heterozigotos e possíveis homozigotos. Programas preventivos para hemoglobinopatias são interessantes para a conscientização dos heterozigotos, fornecendo subsídios para que estes indivíduos possam decidir de maneira responsável por seus descendentes, favorecendo o direcionamento clínico dos homozigotos e seu acompanhamento adequado (ORLANDO et al., 2000).

Ao discutir gravidez em pacientes homozigotos (anemia falciforme) os riscos, não são grandes a ponto de contra-indicar uma gravidez desejada (CHARACHE, 1995). Alguns autores acreditam que o significativo decréscimo da morbidade e mortalidade verificada nos últimos anos, nessas gestantes, seja graças ao melhor entendimento da fisiopatologia da doença e das alterações que ocorrem durante a gravidez do que às transfusões de sangue como profilaxia (ACOG, 2005; ZANETTE, 2007).

Não é habitual associar a presença de abortos, natimortos e partos prematuros em mulheres portadoras de HbS (HbAS), mas achados de Duchonovi-Silva e Ramalho (1996) e de Nascimento (2000) referem que nas gestações de heterozigotas HbAS, cujos parceiros foram HbAA, existiu maior número de gestações a termo de fetos HbAS, do que de fetos HbAA, sugerindo um abortamento preferencial dos embriões HbAA.

Neste estudo foram encontradas 0,8% de gestantes portadoras para HbAC, enquanto Viana (1999), 0,28% e Teixeira e Ramalho (1994), 0,4%. Cerca de 1% da população mista do Sudeste brasileiro é portadora da HbAC (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI; 2004).

A diferença dos resultados quanto à freqüência dos genótipos HbAS e HbAC deste trabalho com os de Viana (1999) e Teixeira e Ramalho (1994) podem ser creditadas ao local onde as pesquisas foram realizadas, isto é, nas regiões (interior do estado de São Paulo) que tiveram a colonização diferente da cidade de Campo Grande.

Nesta investigação, detectou-se um caso (0,4%) de talassemia  $\beta$  intermediária por meio de testes laboratoriais e manifestações clínicas da paciente. Graças à moderada gravidade, essa gestante recebeu tratamento adequado, incluindo transfusões sanguíneas, quando necessário. Viana (1999) identificou 1,29% de talassemia  $\beta$  menor dentre suas gestantes e Teixeira e Ramalho (1994) 0,8%. Os estudos para detectar a talassemia  $\beta$ , no Brasil, são escassos e específicos para certos grupos, não há real prevalência para cada estado (BONINI-DOMINGOS, 2004).

Até recentemente, gestantes com talassemia  $\beta$  maior eram raras, devido ao retardo no desenvolvimento sexual e morte precoce antes mesmo da idade de reprodução. Depois da introdução da transfusão sanguínea e da terapia com quelante de ferro, casos de gestantes com talassemia  $\beta$  maior têm sido descritos. A gestação é possível para aquelas com função cardíaca normal, com hemoglobina em torno de 10 g/dl e em uso de quelante de ferro. O crescimento fetal deve ser acompanhado através de ultrassonografia. Grávidas com talassemia  $\beta$  menor são assintomáticas ou apresentam uma discreta anemia (ACOG, 2005).

Segundo Wagner (2005), diversos estudos têm demonstrado a grande variação na proporção de indivíduos com talassemia  $\alpha$ . Esta variação pode ser

pela real diferença nas populações e uso de técnicas diferentes. As técnicas utilizadas, neste trabalho, para identificar a talassemia  $\alpha$  foram a eletroforese em acetato de celulose, em pH alcalino, para detecção da fração da HbH e a pesquisa citológica intra-eritrocitária.

Em nenhuma gestante desta pesquisa foi detectada a fração de HbH através da eletroforese. A forma silenciosa da talassemia  $\alpha$  apresenta maior dificuldade de ser esclarecida clínica e laboratorialmente. Esta dificuldade se deve principalmente ao fato de os portadores heterozigotos de talassemia  $\alpha$  não apresentarem mudanças características nos padrões de hemoglobina, notadamente no fracionamento eletroforético (CASTILHO et al., 1987).

Pela pesquisa citológica intra-eritrocitária de HbH, obtiveram-se 7,7% de casos positivos das amostras analisadas. Viana (1999), que também utilizou da mesma técnica, encontrou 6,75% de gestantes portadoras. Este teste de inclusão intra-eritrocitária de HbH pode dar muitos resultados falsos positivos impossibilitando assim o diagnóstico de talassemia  $\alpha$  (CHAN; SO; CHAN, 1996). Além disso, as pessoas portadoras de HbH podem ter a sua forma adquirida (NAOUM, 1997). Portanto, a talassemia  $\alpha$ , muitas vezes, é diagnosticada por uso de técnicas que envolvem biologia molecular que ainda não estão disponíveis na rotina laboratorial em muitos serviços (WAGNER, 2005).

A gestação de uma mulher com traço da talassemia  $\alpha$  não é significativamente diferente de uma mulher com hemoglobina normal (ACGO, 2005). Gestantes com doença da hemoglobina H possuem anemia crônica e grave com necessidade de transfusão sanguínea, mas há poucos estudos para definir conseqüências da doença nas grávidas (CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003).

Quanto aos tipos de anemia classificadas de acordo com critérios laboratoriais, das 233 gestantes, 15,9% apresentou anemia a esclarecer por deficiência nutricional, alguma patologia de base ou mesmo fisiológica da gravidez e 2,1% portadoras de hemoglobinopatias, com anemia associada ou não à deficiência nutricional, alguma patologia de base ou fisiológica da gravidez. Os índices hematimétricos não concluem o diagnóstico, apenas direcionam a causa da anemia. Portadoras heterozigotas de hemoglobinas

anormais são assintomáticas, nesses casos faz-se necessário a investigação da origem da anemia.

A anemia é uma das causas de incapacidade mais importantes no mundo, constituindo um dos mais graves problemas de saúde pública. Afeta praticamente metade das mulheres grávidas do mundo: 52% nos países não industrializados, em comparação com os 23% nos países industrializados (WHO, 2005). Assim, a anemia durante a gravidez e o seu tratamento continua sendo um importante assunto na medicina perinatal. O correto diagnóstico e o tratamento adequado da anemia levam à diminuição dos riscos maternos e fetais (BREYMAN, 2002).

As gestantes anêmicas têm sérias conseqüências clínicas. Há maior risco de morte materna, sobretudo por hemorragia. As grávidas que sofrem de anemia grave estão menos aptas a suportar a perda de sangue e podem necessitar de uma transfusão. A anemia na gestação também está associada a um aumento de nati-mortos, de mortes perinatais, de nascimento de bebês com baixo peso e de prematuridade (WHO, 2005).

Por meio de formulário respondido pelas gestantes, foi possível traçar alguns aspectos do perfil sociodemográfico dessa população. A idade média das gestantes, no presente estudo, foi 26 anos e destacou-se o fato de 19,3% delas estarem entre a faixa etária de 10 a 19 anos, consideradas gestantes adolescentes segundo critérios da Rede Interagencial de Informações para Saúde (RIPSA, 2002). A gestação na adolescência não é só um problema clínico que torna mais difícil o acompanhamento médico; é um problema social, porque interfere na vida da mulher, alterando suas perspectivas e também as de sua família. Grávidas adolescentes iniciam mais tardiamente o pré-natal e realizam um menor número de consultas, quando comparadas às mulheres adultas (CARVALHO; ARAÚJO, 2007; PINTO et al., 2005).

Este trabalho revelou que 64,4% das gestantes apresentavam um grau de escolaridade acima do ensino fundamental completo, portanto estão aptas a entender sobre a pesquisa e a receber orientação da anormalidade, quando identificada. No entanto, 35,6% possuíam ensino fundamental completo ou incompleto ou sem estudos e dentre estas estão incluídas as gestantes consideradas analfabetas funcionais. Esta denominação foi atribuída às pessoas com estudos inferiores a quatro anos que, mesmo tendo aprendido a

decodificar minimamente a escrita, geralmente frases curtas, não desenvolve a habilidade de interpretação de textos (PINTO et al., 2005). Há a necessidade de orientação dessas gestantes analfabetas funcionais de modo formal, para melhor compreensão quanto à hemoglobinopatia detectada.

A mistura étnica foi detectada na população estudada. Das 233 gestantes, 113 (48,5%) declararam-se caucasóides e 120 (51,5%) não caucasóides esses resultados refletem a colonização de Mato Grosso do Sul que recebeu imigrantes alemães, portugueses, espanhóis, paraguaios, italianos, japoneses e sírio-libaneses; e migrantes mineiros, paulistas, nordestinos e gaúchos entre outros (WIKPÉDIA, 2008).

Considerando o perfil sociodemográfico encontrado nesse estudo, e que as hemoglobinopatias e as anemias em geral têm alta variabilidade nas manifestações clínicas, ressalta-se a importância do diagnóstico precoce e correto de uma anemia para adequado tratamento e acompanhamento das gestantes durante o pré-natal.



## 7 CONCLUSÕES

A freqüência de hemoglobinopatias nas gestantes analisadas foi 12% e das anemias em geral foi 18%, ressalta-se a importância do correto diagnóstico da anemia para tratamento adequado levando à diminuição dos riscos maternos e fetais.

As freqüências dos tipos de hemoglobinopatias detectadas foram: provável HbH: 7,8%; Hb AS: 3%; Hb AC: 0,8%; talassemia  $\beta$  intermediária: 0,4%. Ressalta-se a necessidade da confirmação de HbH por técnicas de biologia molecular.

As freqüências dos tipos de anemias identificadas de acordo com os índices hematimétricos foram:

- anemia normocítica e normocrômica: 12,4%;
- anemia macrocítica: 3,5%;
- anemia microcítica e hipocrômica: 2,1%.

O perfil sócio demográfico apresentado pelas gestantes pesquisadas foi:

- 26 anos foi a idade média e 80,7% tinham 20 anos ou mais;
- a renda de 84,5% das gestantes era de até 5 salários mínimos;
- 51,5% possuíam ensino médio completo ou incompleto;
- 43,8% nasceram no município de Campo Grande;
- 22,3% das gestantes eram sul-americanas e 22,3% européias.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de hemoglobinopatias e etnia.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de hemoglobinopatias e abortamento.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de hemoglobinopatias e período gestacional.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre gestantes portadoras ou não de hemoglobinopatias e a presença de anemia.

Conclui-se que por meio das freqüências de hemoglobinopatias e de anemia encontradas, e o perfil sociodemográfico traçado da população de gestantes estudadas, evidencia a importância do diagnóstico precoce e correto das anemias que aponta indicadores que podem embasar ações preventivas e

assistenciais, visando à redução da morbimortalidade materna e neonatal no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do HU/UFMS de Campo Grande – MS. Portanto, diante dos resultados obtidos, sugere-se:

- inclusão do diagnóstico laboratorial das anemias hereditárias nos exames pré-natais.
- formação de uma equipe multidisciplinar especializada em hemoglobinopatias para participar de programas de educação, orientação e acompanhamento das gestantes adolescentes e adultas, e realizar aconselhamento genético aos casais de risco.
- introdução da disciplina Hematologia Aplicada em todos os currículos dos cursos de graduação da área da saúde.
- avaliação dos grupos de gestantes com anemia e sem anemia com as variáveis obstétricas e perinatais.

## REFERÊNCIAS

Anionwu EN, Patel N, Kanji G, Renges H, Brozovics M. Counselling for prenatal diagnosis of sickle cell disease and  $\beta$  thalassaemia major: a four year experience. *J Med Genetics*. 1988; 35: 769-772.

Ayres M. et al. Bio Estat, versão 4.0, 2005. Disponível em <<http://www.mamiraua.org.br/noticias.php?cod=3>>. Acesso em: 9 jul. 2007.

Bonini-Domingos CR. Hemoglobinopatias no Brasil: Variabilidade Genética e Metodologia Laboratorial [Tese]. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista; 1993.

Bonini-Domingos CR. Thalassaemia screening in Brazil – Results for 20 years. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2004; 26 (4): 288-289.

Bonini-Domingos CR. Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias. São José do Rio Preto: Editora HN, 2006.

Breymann C. Iron deficiency and anaemia in pregnancy: modern aspects of diagnosis and therapy. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2002; 29 (3): 506-516.

Brum MAR. Hemoglobinopatias em Comunidades Afro-Brasileiras em Mato Grosso do Sul [Dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2001.

Brum MAR, Ávalos AH, Matos MFC, Azato N, Moreira LHM, Tsutsumi MT, et al. Hemoglobinas anormais em Campo Grande – MS. *Rev. LAES & HAES*. 1997; 107: 86-92.

Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2007; 29 (3): 203-06.

Carvalho VCP, Araújo TVB. Adequação da assistência pré-natal em gestantes atendidas em dois hospitais de referência para gravidez de alto risco do Recife, Estado de Pernambuco. Rev. Bras. Saúde Matern. Infant. 2007; 7 (3): 309-317.

Castilho EM, Naoum PC, Graciano RAS, Silva RA. Prevalência de talassemia alfa em pacientes com anemia e em pessoas sem anemia. Rev. Bras. Pat. Clín. 1987; 23 (5): 131-34.

CDC. Division of public Health Surveillance and informatics. Epi Info, versão 3.4.1, 3 julho 2007. Disponível em <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 9 jul. 2007.

Chan AYY, So CKC, Chan LC. Comparison of the HbH inclusion test and a PCR test in routine screening for  $\alpha$  thalassaemia in Hong Kong. J clin Pathol. 1996; 49: 411-13.

Charache S. Management and therapy of sickle cell disease. Maryland: National Institutes of Health, 1995.

Chinelato-Fernandes AR, Bonini-Domingos C R. The contribution of molecular studies of S-like hemoglobins to knowledge of the genetic diversity of the Brazilian population. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2005; 27(3): 208-210.

Chinelato-Fernandes AR. Diferenciação Molecular de Mutantes de Hemoglobinas Humanas na População Brasileira [Tese]. São José do Rio: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista; 2003.

Chui DHK.; Fucharoen S, Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. Blood. 2003; 101 (3): 701-800.

Compri MB, Polimeno NC, Stella MB, Ármalo AS. Programa comunitário de heoglobinopatias hereditárias em população estudantil brasileira. Rev Saúde Pública. 1996; 30 (2): 187-95.

Diniz D, Guedes C. Anemia falciforme: um problema nosso. Uma abordagem bioética sobre a nova genética. Cad. Saúde Pública. 2003; 19 (6):1761-1770.

Duchovni-Silva I, Ramalho AS. Maternal segregation distortion in sickle-cell and b-thalassemia traits? Lancet. 1996; 347 (9002): 691-2.

Frenette OS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. The Journal of Clinical Investigation. 2007; 117 (4): 850-58.

Galiza NetoGC , Pitomebeira MS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. J Bras Patol Med Lab. 2003; 39: 51-6.

Galiza Neto GC, Pitombeira MS, Vieira HF, Vieira MLC, Faria DAB. Análise dos haplótipos do gene  $\beta^S$ -globina no Ceará. J Bras Patol Med Lab. 2005; 41 (5): 315-21.

Granda H, Gispert S, Dorticos A, Martin M, Cuadras Y, Calvo M, et al. Cuban programme for prevention of sickle cell disease. The Lancet. 1991; 337 (8734): 152-53.

Gushiken EY, Kitamura C, Miyamuro-Yokomizo R, Zanfirov VMC, Arruda IC, Munhoz MAG, et al. Freqüência de hemoglobinopatias S detectada no Instituto Adolfo Lutz-Central e sua importância em saúde pública. Rev. Bras. Análises Clínicas. 1995; 27: 130-32.

Holsbach DR. Epidemiologia da Anemia Falciforme no Estado de Mato Grosso do Sul, 2000-2005 [Dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2007.

Huisman HJ, et al. Hb var: A Database of Human Hemoglobin Variants and Talassemias. Summaries of mutation categories. Pennsylvania University USA and McMaster University in Canada, 2005. Disponível em: <<http://glogin.cse.psu.edu/>>. Acesso em 07 de dezembro de 2007.

IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>> . Acesso em: 12 de dezembro de 2007.

Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL. The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes. Blood Reviews. 1996; 10: 29-44.

Leoneli GG, Imperial RE, Marchi-Salvador DP, Naoum PC, Bonini-Domingos CR. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2000; 22 (3): 396-403.

Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Hematologia Prática de Dacie e Lewis. 9 ed. São Paulo: Artmed; 2006.

Lorenzi TF, D'Amico, Daniel MM, Silveira PAA, Buccheri V. Manual de Hematologia. 3 ed. São Paulo: Medsi; 2003.

Loukopulos D. Prenatal Diagnosis of Thalassemia and of the Hemoglobinopathies: a Review. Hemoglobin. 1985; 9 (5) 435-459.

Marengo-Rowe AJ. The thalassemias and related disorders. Bayl Univ Med Cent 20. 2007; 20: 27-31.

Murao M, Ferraz MHC. Traço falciforme – heterozigose para hemoglobina S. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2007; 29 (3): 223-25.

Nagel RL, Fabry ME, Steimberg MH. The paradox of hemoglobin SC disease. Blood Reviews, 2003; 17: 167-178.

Naoum PC. Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Sarvier; 1997.

Naoum PC. CD Hemoglobinopatias. São José do Rio Preto: Academia de Ciência e Tecnologia; 2003.

Naoum PC, Naoum FA. Doença das Células Falciforme. São Paulo: Sarvier; 2004.

Naoum PC. Hematologia Laboratorial Eritrócitos. São José do Rio Preto: Academia de Ciência e Tecnologia; 2005.

Nascimento MLP. Abortos em mulheres portadoras de hemoglobina S (AS). Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2000; 22 (3): 424.

Ondei LS, Bonini-Domingos CR. Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinas variantes. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2006; 28 (1): 65-70.

Ondei LS, Zamaro PJA, Bonini-Domingos CR. A importância do diagnóstico laboratorial clássico na identificação de variantes de hemoglobinas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2005; 27 (1): 72-4.

Orlando GM, Naoum PC, Siquiera FAM, Bonini-Domingos CR. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2000; 22 (2): 111-21.

Pinto LF, Malafaia MF, Borges JA, Baccaro A, Soranz DR. Perfil social das gestantes em unidades de saúde da família do município de Teresópolis. Ciênc. saúde coletiva. 2005; 10 (1): 205-13.

Ramalho AS, Magna LA. Aconselhamento genético do paciente com doença falciforme. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2007; 29 (3): 229-32.

Ramalho AS, Magna LA, Silva RB. A portaria no. 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. Cad. Saúde Pública. 2003; 19 (4): 1195-1199.

Rede Interagencial de Informações para a Saúde (RIPSA). Indicadores básicos de saúde no Brasil: conceitos e aplicações. Organização Pan-Americana de Saúde, Brasília, 2002

Rowley PT, Loader S, Sutera CJ, Walden M, Kozyra A. A prenatal screening for hemoglobinopathies I – A prospective regional trial. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 48 (3): 439-46.

Scriver CR, Bardans M, Cartier L, Clow CL, Lancaster GA, Ostrowsky AJT. Beta thalassemia disease prevention: genetic medicine applied. *Am. J. Hum. Genet.* 1984; 36: 1024-1038.

Souza AI, Filho MB, Ferreira LOC. Alterações hematológicas e gravidez. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2002; 24 (1): 29-36.

Teixeira RS, Ramalho AS. Genetics and public health: response of a Brazilian population to a optional hemoglobinopathy program. *Rev. Bras. Genet.* 1994; 17 (4): 435-38.

The American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). Practice Bulletin: Hemoglobinopathies in pregnancy. *Obstet. & Gynecol.* 2005; 106 (1): 203-210.

Wagner SC, Silvestri MC, Bittar CM, Friedrisch JR, Silla ML. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes com anemia não ferropênica. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2005; 27 (1): 37-42.

Wajcman H. Hemoglobin and Hemoglobin Disorders. Hôpital Henri Mondor, Creteil, France Disponível em: <<http://glogin.cse.psu.edu/>>. Acesso em 09 de dezembro de 2007.

Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited Haemoglobin Disorders: an Increasing Global Health. *Bulletin of the World Health Organization.* 2001; 79: 704-12.



Weatheraall DJ. Phenotype-Genotype Relationships in Monogenic Disease: Lessons from the Thassaemias. *Nature Reviews*. 2001; 2: 245-55.

Weatherall DJ. Thalassaemia: the long road from bedside to genome. *Nature Reviews*. 2004; 5: 1-7.

World Health Organization (WHO). Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. A guide for programme managers. 2001. Disponível em: <[www.who.int/nutrition/publications/nut\\_emergencies/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/nut_emergencies/en/)>. Acesso em 08 de março de 2008.

World Health Organization (WHO). The world health report 2005 – make every mother and a child count. 2005. Disponível em: <[www.who.int/whr/2005/en/](http://www.who.int/whr/2005/en/)>. Acesso em 10 de dezembro de 2007.

Wenning MRSC, Kimura EM, Costa FF, Saad STO, Gervásio S, Jorge SB, et al.  $\alpha$  – Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2000; 33 (9): 1041-1045.

Wikipédia 2008. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Campo\\_Grande\\_\(Mato\\_Grosso\\_do\\_Sul\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Campo_Grande_(Mato_Grosso_do_Sul))>. Acesso em 12 de março de 2008.

Viana LMS. Contribuição à prevenção de hemoglobinopatias, a partir do estudo em gestantes [Dissertação]. São José do Rio Preto Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista; 1999.

Vitolo MR, Boscaini C, Bortolini GA. Baixa escolaridade como fator limitante para o combate à anemia entre gestantes. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*. 2006; 28 (6): 331-39, 2006.

Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu; 2004.

Zago MA, Pinto ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2007; 29 (3): 207-14.

Zanette AMD. Gravidez e contracepção na doença falciforme. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2007; 29 (3): 309-12

**ANEXOS**

## ANEXO A



**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS**

*Carta de Aprovação*

*A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 873 da Pesquisadora Tatiana Mary Sakamoto intitulado "Detecção da frequência de hemoglobinopatias em gestantes atendidas no Hospital Universitário da UFMS" e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião Ordinária no dia 11 de dezembro de 2006, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.*

*Prof. Odair Pimentel Martins*

*Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS*

*Campo Grande, 11 de dezembro de 2006.*

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>  
[bioetica@propp.ufms.br](mailto:bioetica@propp.ufms.br)  
fone 0XX67 345-7187

## ANEXO A



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
**Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS**



## *Carta de Aprovação*

*A minha assinatura neste documento atesta que o protocolo nº 873 da Pesquisadora Tatiana Mary Sakamoto intitulado “Detecção da frequência de hemoglobinopatias em gestantes atendidas no Hospital Universitário da UFMS, Campo Grande-MS” e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião Ordinária no dia 11 de dezembro de 2006, e seu título emendado para “Hemoglobinopatias e anemias em gestantes no Hospital Universitário de Campo Grande-MS” em 13 de março de 2008, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.*


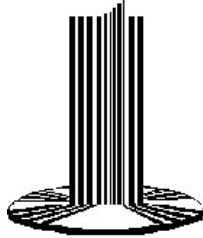
*Prof. Odair Pimentel Martins*

*Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS*

*Campo Grande, 17 de março de 2008.*

<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>  
[bioetica@propp.ufms.br](mailto:bioetica@propp.ufms.br)  
fone 0XX67 345-7187

## ANEXO B

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS/CEP</p>	
---	--	---

### DECLARAÇÃO DE USO DE MATERIAL BIOLÓGICO E DADOS COLETADOS

Declaramos, para os devidos fins, que os dados e as informações coletadas serão usados exclusivamente para os fins previstos no protocolo intitulado: "

Campo Grande, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2006.

---

Investigadora Principal

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

Campo Grande, \_\_ de \_\_\_\_\_ de 2006.

Aos profissionais do setor do Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia:

Temos a satisfação de comunicá-los a realização da pesquisa intitulada por “Detecção e prevenção de hemoglobinopatias em gestantes atendidas no Hospital Universitário da UFMS, Campo Grande – MS” a ser desenvolvida neste setor. Este estudo ocorrerá a partir de novembro de 2006 em dias previamente agendados.

Informamos ainda que o projeto está regulamentado pelo Comitê de Ética e do Conselho Diretivo do Hospital Universitário, conforme documentos (ANEXO A e B)

Solicitamos a colaboração e colocamo-nos à disposição para os esclarecimentos necessários.

---

Tatiana Mary Sakamoto  
Mestranda  
Farmacêutica-Bioquímica

---

Profa Dra Maria Lucia Ivo  
Orientadora do projeto  
Enfermeira



## APÊNDICE B

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por este instrumento particular declaro para os devidos fins éticos e legais que

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG, \_\_\_\_\_, concordo voluntariamente em participar da pesquisa: **“Detecção e prevenção de hemoglobinopatias em gestantes no Hospital Univeresitário da UFMS, Campo Grande – MS”**, sob responsabilidade da farmacêutica-bioquímica Tatiana Mary Sakamoto, CRF 2042/MS. Declaro que tomei consciência e fui esclarecida de maneira a não restarem dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

- 1- Fui esclarecida que para a minha participação será realizada a coleta de sangue para a pesquisa de hemoglobinopatias anormais e que esse procedimento não implica em riscos para a minha pessoa.
- 2- Concordei em participar desta pesquisa por livre e espontânea vontade, sem qualquer despesa de minha parte, mas sem qualquer tipo de pagamento por esta colaboração.
- 3- A saída da pesquisa pode ser feita a qualquer momento, sem nenhuma consequência ou prejuízo para sua pessoa ou sua família.
- 4- Fui esclarecida que tenho garantia de receber resposta a qualquer pergunta, dúvida ou esclarecimento que julgue necessário acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa. Assim poderei entrar em contato pelo telefone (67) 3345-3173 (farmacêutica-bioquímica Tatiana Mary Sakamoto).
- 5- Os resultados da pesquisa serão publicados em revistas científicas, no entanto, sua identidade será mantida em sigilo, não sendo revelada em momento algum.

Objetivo e informações gerais da pesquisa:

A população brasileira apresenta genes para as hemoglobinas anormais com frequências variáveis e influenciadas por seus grupos raciais formadores. Portanto, detecção dos portadores destas alterações genéticas é de importância para a saúde pública, pois representam fonte de novos heterozigotos (não doentes) e de possíveis homozigotos (doentes). O controle das hemoglobinopatias tem sido possível por meio do aconselhamento genético e diagnóstico precoce. O acompanhamento clínico dos homozigotos, o esclarecimento dos heterozigotos e em especial dos casais de risco, pode contribuir para evitar o nascimento de crianças portadoras de uma patologia genética, muitas vezes letal. Por essas razões o presente trabalho tem como objetivos: detectar hemoglobinopatias em gestantes visando efetuar a prevenção, e a conscientização das portadoras.

Participantes da pesquisa:

Participarão da pesquisa gestantes voluntárias de qualquer idade atendidas pelo ambulatório da ginecologia e obstetrícia do Hospital

Universitário da UFMS (critério de inclusão). Serão excluídas da pesquisa a gestante indígena ou doente mental (critério de exclusão).

Como será sua participação:

Será realizada a coleta de sangue para a pesquisa de hemoglobinas anormais

Inconvenientes:

A coleta de sangue, às vezes, pode ser seguida de dor e/ou hematoma (rouxidão) no local da punção, que pode durar de 3 a 5 dias. Até o momento não foram identificados outros riscos para a sua saúde, com este procedimento.

Acompanhamento e assistência:

- 1- A Sra poderá obter benefício pessoal de ser informada e esclarecida sobre a presença de algum tipo de hemoglobina anormal.
- 2- As portadoras detectadas receberão folhetos que serão devidamente explicados, carteirinha de identificação sobre o tipo de anemia hereditária encontrada.
- 3- O médico ginecologista Dr. Ernesto Antônio Figueiró Filho, CRM 3485/MS, do Departamento de Ginecologia-Obstetrícia do Hospital Universitário da UFMS, juntamente com a pesquisadora serão responsáveis pelos esclarecimentos da hemoglobina anormal detectada e será feito o encaminhamento ao médico hematologista quando necessário.

Desta forma, uma vez lidos e entendidos tais esclarecimentos, dato e assino este Termo de Consentimento em duas vias, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo, ficando uma em minha posse.

Campo Grande, MS, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007

---

Participante (maior de idade), pais ou responsável (se a gestante for menor de idade)

---

Farmacêutica-bioquímica Tatiana Sakamoto  
Pós-graduanda  
LAC-HU-UFMS

## APÊNDICE C

### DETECÇÃO DE HEMOGLOBINOPATIAS EM GESTANTES

FORMULÁRIO: \_\_\_\_\_ DATA DA COLETA: \_\_\_\_\_

#### I- VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS:

DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

PROCEDÊNCIA: \_\_\_\_\_ NACIONALIDADE: \_\_\_\_\_

DESCENDÊNCIA: ( ) CAUCASÓIDE ( ) NÃO CAUCASÓIDE

Renda familiar em salários mínimos: 1 a 5 ( ); 6 a 10 ( ); acima de 10 ( )

Escolaridade: Primeiro grau ( ); Segundo grau; ( ); Superior ( )

#### II- INFORMAÇÕES GERAIS:

É a primeira gravidez? Sim ( ); Não ( ) Quantos filhos? \_\_\_\_\_

Teve algum aborto? \_\_\_\_\_ Está com quantos meses de gravidez? \_\_\_\_\_

Tem anemia? Sim ( ); Não ( ); Não sei ( ). Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

#### III- DADOS LABORATORIAIS

GV: \_\_\_\_\_ Hb: \_\_\_\_\_ Ht: \_\_\_\_\_ VCM: \_\_\_\_\_ HCM: \_\_\_\_\_ CHCM: \_\_\_\_\_

#### PESQUISA DE HEMOGLOBINAS:

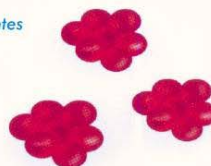
TESTES	RESULTADOS	REFERÊNCIA NORMAL
Eletroforese alcalina		AA
Eletroforese ácida		AA
Morfologia eritrocitária		Normocitose
Resistência globular (0,36%)		Negativo
Dosagem de Hb Fetal		0 a 1%
Dosagem de Hb A2		2,5 a 3,7%
Pesquisa de Hb H		Ausente
Teste de Falcização		Negativo
Conclusão		

## APÊNDICE D



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
NÚCLEO DE HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
Seção de Análises Clínicas

Projeto de Pesquisa:  
Detecção de Hemoglobinopatias em Gestantes



### VOCÊ TEM ANEMIA HEREDITÁRIA?

A anemia hereditária é um tipo de anemia que é transmitida de pais para filhos. Esse tipo de anemia pode passar por muitas gerações. A anemia hereditária se manifesta de duas formas básicas: a imperceptível e a perceptível.

A forma imperceptível é caracterizada por anemia de grau muito leve, e somente é identificada por exames laboratoriais específicos.

A forma perceptível tem anemia grave e é percebida devido à palidez acentuada, muita fraqueza, mal estar geral, e icterícia em alguns casos. A sua identificação tem de ser confirmada através de exames de sangue.

Existe a possibilidade de transmissão de anemia hereditária pela mãe com anemia imperceptível. Se o casal, pai e mãe, têm as formas imperceptíveis, há a chance de gerar filhos com a forma grave.

Os riscos de uma anemia hereditária não são grandes a ponto de contra-indicar uma gravidez, mas será necessário o acompanhamento médico para uma gravidez tranqüila e sem riscos para mãe e o bebê.

FONTE: NAOUM, 1987.





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
NÚCLEO DE HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
Seção de Análises Clínicas

Projeto de Pesquisa:  
Detecção de Hemoglobinopatias em Gestantes

### TALASSEMIA HETEROZIGOTA (TALASSEMIA MENOR)

A talassemia heterozigota ou talassemia menor é o nome dado a um tipo de anemia hereditária presente numa pessoa aparentemente sadia. A essa pessoa é, portanto, um portador assintomático (não doente) de uma alteração da hemoglobina, que é uma proteína que se encontra no interior dos glóbulos vermelhos.

Nessa alteração o portador de talassemia heterozigota tem seus glóbulos vermelhos com o tamanho diminuído, em relação a outra pessoa sem talassemia. A diminuição do tamanho dos glóbulos vermelhos reduz a quantidade de hemoglobina dentro dessas células no sangue.

Como se sabe, todo oxigênio que respiramos é transportado pela hemoglobina e distribuído por todo organismo. O oxigênio é nossa principal fonte de energia. Assim, quando ocorrer diminuição da quantidade de hemoglobina - e na talassemia heterozigota esse fato acontece de forma discreta - o oxigênio transportado também diminui. Sendo o oxigênio a principal fonte de energia, sua diminuição embora pequena nesse caso, pode causar periodicamente: cansaço, dores musculares nas pernas e palidez discreta.



glóbulos vermelhos  
normais



glóbulos vermelhos  
"pequenos"

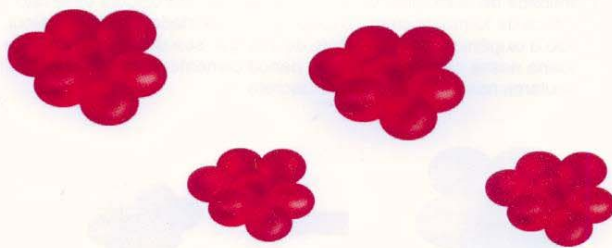
A talassemia heterozigota pode provocar discreto grau de anemia, entretanto, sua identificação somente é feita por exames laboratoriais específicos.

A pessoa que é portadora de talassemia heterozigota tem um desenvolvimento físico, sexual e intelectual normal.

Se você gestante é portadora desta anemia hereditária é importante que seu companheiro e filhos façam também este exame para saber se também são portadores de anemia hereditária imperceptível, pois existe a possibilidade de nascer uma criança que poderá receber as partes anêmicas do pai e da mãe e assim aparecerá uma anemia muito grave.

Para maiores informações procure seu médico e o Laboratório de Análises Clínicas, setor de Hematologia, do Hospital Universitário da UFMS.

FONTE: NAOUM, 1987.





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
NÚCLEO DE HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
Seção de Análises Clínicas

Projeto de Pesquisa:  
Detecção de Hemoglobinopatias em Gestantes

### TRAÇO FALCIFORME (FALCEMIA HETEROZIGOTA)

O traço falciforme é o nome dado a um tipo de anemia hereditária que a pessoa tem, mas não percebe.

Essa pessoa é, portanto, um portador assintomático (não doente) de uma alteração da hemoglobina (Hemoglobina S), que é uma proteína que se encontra no interior dos glóbulos vermelhos.

O portador de traço falciforme não deve, entretanto, fazer uso de drogas ou medicamentos que "queimam oxigênio", por exemplo: inalação de éter, lança -perfume e anestesia geral sem oxigenação suplementar. Também os exercícios físicos muito intensos devem ser evitados, pois "queimam oxigênio" com extrema rapidez. Da mesma forma, devem ser evitado o mergulho prolongado e a prática de natação em águas muito frias.

Todos esses cuidados estão relacionados com a diminuição de oxigênio, pois quando falta quantidade suficiente deste gás em pessoa que tem traço falciforme, os glóbulos vermelhos se deformam, mudando sua forma globular para a de "foice" ou "meia - lua", daí o nome falciforme.



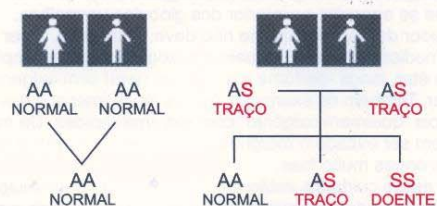
glóbulos vermelhos normais



glóbulos vermelhos em "foice"

Com a forma alterada, os glóbulos vermelhos além de não desempenhar com eficiência a sua função que é o transporte de oxigênio, provocam, também, alteração na circulação do sangue, é necessário dizer que esses efeitos são muito discretos no traço falciforme, mas podem se tornar perigosos se a "queima de oxigênio" ocorrer por longo período (anestesia geral sem suplementação de oxigênio) ou se ocorrer de forma aguda (cheiro de éter ou lança - perfume).

Se você gestante é portadora desta anemia hereditária é importante que seu companheiro e filhos façam também este exame para saber se também são portadores de anemia hereditária imperceptível pois existe a possibilidade de nascer uma criança que poderá receber as partes anêmicas do pai e da mãe e assim aparecerá uma anemia muito grave.



A identificação de traço falciforme é realizada por meio de exames laboratoriais específicos.

Para maiores informações procure seu médico e o Laboratório de Análises Clínicas, setor de Hematologia, do Hospital Universitário da UFMS.

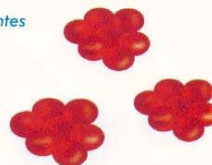
FONTE: NAOUM, 1987.





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
NÚCLEO DE HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
Seção de Análises Clínicas

Projeto de Pesquisa:  
Detecção de Hemoglobinopatias em Gestantes



## DOENÇA DA HEMOGLOBINA C

A doença da Hemoglobina C é o nome dado a um tipo de anemia hereditária que a pessoa tem, mas não percebe.

Essa pessoa é, portanto, um portador assintomático (não doente) de uma alteração da hemoglobina (Hemoglobina C), que é uma proteína que se encontra no interior dos glóbulos vermelhos.

Essa anemia não é observada em exame de sangue (hemograma). Somente com exames especiais é possível identificá-la.

A pessoa que tem essa anemia é normal. Não afeta o desenvolvimento físico, nem o mental ou sexual. Não há nenhuma proibição à prática de esportes, alimentação ou medicamentos.

Se você gestante é portadora desta anemia hereditária é importante que seu companheiro e filhos façam também este exame para saber se existe a possibilidade de nascer uma criança que poderá receber as partes anêmicas do pai e da mãe e assim aparecerá uma anemia muito grave.

Para maiores informações procure seu médico e o Laboratório de Análises Clínicas, setor de Hematologia, do Hospital Universitário da UFMS.



FONTE: NAOUM, 1987.

## IDENTIDADE DE ANEMIA HEREDITÁRIA

Nome \_\_\_\_\_

Data do nascimento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data do diagnóstico \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Tipo de Anemia \_\_\_\_\_

UFMS - SEAC/NHU  
Campo Grande - MS

O portador de talassemia heterozigota não deve tomar remédios e nem vitaminas que contenham ferro ou sais ferrosos, pois o sangue de quem tem talassemia sempre apresenta quantidade suficiente de ferro. Assim, ao ser tomado, o ferro do medicamento vai para o sangue, aumentando a sua quantidade. O ferro em excesso no sangue é muito perigoso, pois se deposita em determinados órgãos (ex: fígado, baço, coração), nas veias e nos tecidos, alterando-lhes as funções e, com o passar do tempo pode provocar outras doenças. Recomendamos que você informe os médicos por ocasião das consultas, sobre esse tipo de anemia hereditária que você tem.

FONTE: NAOUM, 1987.

### IDENTIDADE DE ANEMIA HEREDITÁRIA

Nome \_\_\_\_\_

Data do nascimento \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Data do diagnóstico \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Tipo de Anemia \_\_\_\_\_

UFMS - SEAC/NHU  
Campo Grande - MS

O portador de anemia falciforme heterozigota não deve fazer uso de medicamentos que "queimam o oxigênio", por exemplo, inalação de éter clorofórmio, cheiro de lança-perfume, anestesia geral sem oxigenação durante e após cirurgia. Os exercícios físicos muito intensos também devem ser evitados, pois "queimam oxigênio" rapidamente. Um esporte que deve ser evitado é o mergulho prolongado em rios, piscinas, lagos ou mar.

FONTE: NAOUM, 1987.

## APÊNDICE E

Tabela 9 – Número e porcentagem de gestantes analisadas segundo ascendência e naturalidade, Hospital Universitário/UFMS – 2007 (n = 233)

Variáveis	Nº.	%
<b>Ascendência <sup>(1)</sup></b>		
Não sabem	119	51,1
Paraguaia	46	19,7
Italiana	29	12,4
Africana	18	7,7
Espanhola	13	5,6
Alemã	10	4,3
Portuguesa	9	3,9
Francesa	2	0,8
Grega	1	0,4
Húngara	1	0,4
Argentina	1	0,4
Árabe	1	0,4
Japonesa	1	0,4
<b>Naturalidade</b>		
Campo Grande – MS	102	43,8
Interior de MS	67	28,8
Estado de SP	25	10,7
Estado do PR	14	6,0
Estado de MT	4	1,7
Estado de SC	4	1,7
Estado do CE	3	1,3
Estado do RS	3	1,3
Estado da BA	2	0,9
Estado de MG	2	0,9
Distrito Federal	2	0,9
Estado de TO	1	0,4
Estado de RO	1	0,4
Estado de GO	1	0,4
Estado de AL	1	0,4
Paraguai	1	0,4

(1) Cada gestante podia indicar uma ou mais ascendências.