



**FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DE FERNANDÓPOLIS
FACULDADES INTEGRADAS DE FERNANDÓPOLIS**

**BRUNA VIEIRA DE OLIVEIRA
LUANA DE MELO BELIZÁRIO
RAFAELA CAMACHO DE SOUZA**

**PESQUISA DE TALASSEMIA PELO MÉTODO DE
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM
ACADÊMICOS DA FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DE
FERNANDÓPOLIS**

**FERNANDÓPOLIS
2018**

**BRUNA VIEIRA DE OLIVEIRA
LUANA DE MELO BELIZÁRIO
RAFAELA CAMACHO DE SOUZA**

**PESQUISA DE TALASSEMIA PELO MÉTODO DE
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM
ACADÊMICOS DA FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DE
FERNANDÓPOLIS.**

Artigo científico apresentado à Banca Examinadora do Curso de Graduação em Farmácia da Fundação Educacional de Fernandópolis como exigência parcial para obtenção do título de bacharel em farmácia.

Orientadora: Prof. MSc. Vania Luiza Ferreira Lucatti Sato

**FERNANDÓPOLIS – SP
2018**

PESQUISA DE TALASSEMIA PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM ACADÊMICOS DA FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DE FERNANDÓPOLIS

RESEARCH OF THALASSEMIA BY THE HIGH EFFICIENCY LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD IN ACADEMICS OF THE EDUCATIONAL FOUNDATION OF FERNANDÓPOLIS

¹OLIVEIRA, Bruna Vieira; ²BELIZÁRIO, Luana de Melo; ³SOUZA, Rafaela Camacho; ⁴SATO, Vania Luiza Ferreira Lucatti.

ABSTRACT: Thalassemias are a heterogeneous group of hereditary hematological diseases within the most common and widespread hemoglobinopathies in the world and involve the production of hemoglobin. The aim of the study was to evaluate the prevalence of thalassemic genes by high performance liquid chromatography (HPLC), to discuss hematological disorders in hemoglobinopathies and to describe the diagnostic and treatment modalities for this disease. We analyzed 121 random samples from the scholars of the Fernandópolis Educational Foundation. Of the total analyzed, 94.21% of the samples presented normal hemoglobin profile homozygotes (HbAA), and 5.79% of the samples had some type of abnormal hemoglobin: 0.83% presented increased HbA2 values and could be characterized as β Thalassemia; 0.83% presented HbS in heterozygosity (HbAS); 1.65% presented Hb C in heterozygosis (HbAC) and 2.48% presented the Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (RHBF). The results obtained allow us to conclude that the prevalence of individuals with thalamic phenotype had a low incidence.

KEYWORDS: Talassemias; Hemoglobinopathies; Genetic diseases; CLAE.

¹ Acadêmico do curso de Farmácia das Faculdades Integradas de Fernandópolis - FIFE, Fernandópolis-SP.

² Acadêmico do curso de Farmácia das Faculdades Integradas de Fernandópolis - FIFE, Fernandópolis-SP.

³ Acadêmico do curso de Farmácia das Faculdades Integradas de Fernandópolis - FIFE, Fernandópolis-SP.

⁴ Mestre em Ciências da Saúde, orientador e professor do curso de Farmácia das Faculdades Integradas de Fernandópolis - FIFE, Fernandópolis-SP.

RESUMO: As talassemias são um grupo heterogêneo de doenças hematológicas hereditárias dentro das hemoglobinopatias mais comuns e difundidas no mundo e envolvem a produção de hemoglobina. O estudo teve como objetivo avaliar a prevalência de genes talassêmicos pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, discorrer sobre os distúrbios hematológicos nas hemoglobinopatias e descrever as formas de diagnóstico e tratamento para esta doença. Foram analisadas 121 amostras aleatórias provenientes dos acadêmicos da Fundação Educacional de Fernandópolis. Do total analisado 94,21% das amostras apresentou homozigose de perfil hemoglobínico normal (HbAA), e 5,79 % das amostras apresentou algum tipo de hemoglobina anormal, sendo : 0,83 % apresentaram valores de HbA2 aumentados, podendo ser caracterizados como β Talassemia ; 0,83 % apresentaram a HbS em heterozigose (HbAS) ; 1,65 % apresentou a HbC em heterozigose (HbAC) e 2,48 % apresentaram a Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF). Os resultados obtidos permitem concluir que a prevalência de indivíduos com fenótipo talassêmico , teve uma baixa incidência.

PALAVRAS-CHAVE: Talassemias; Hemoglobinopatias; Doenças genéticas; CLAE.

INTRODUÇÃO

Anemia é definida como a diminuição dos níveis de hemoglobina abaixo dos considerados normais para o sexo, idade do indivíduo e altitude do local, os padrões da OMS são utilizados como critério para avaliar a anemia, assim, os níveis de hemoglobina indicativos de anemia são de <13 g/dL para homens adultos e <12 g/dL para mulheres adultas. Os baixos níveis de hemoglobina são acompanhados pela diminuição da massa eritróide com inadequada oxigenação dos tecidos, elas podem ser classificadas conforme a sua fisiopatologia ou conforme a morfologia dos eritrócitos (NEKEL, 2013).

As hemoglobinopatias são distúrbios sanguíneos herdados recessivamente em que existe alteração da parte globínica da hemoglobina. As hemoglobinas humanas normais são hemoglobina A1 (HbA1) constituída pelos pares $\alpha_2\beta_2$ que se encontram em maior quantidade no organismo, cerca de 97%; hemoglobina A2 (HbA2) constituída pelos pares $\alpha_2\delta_2$ que compõem o restante da hemoglobina do adulto, cerca de 3%. A hemoglobina fetal constituída pelos pares $\alpha_2\gamma_2$ está

presente durante a vida intra-uterina e nos primeiros meses de vida, porém, existem hemoglobinas variantes que causam diferentes doenças, dentre elas: Hemoglobina S (HbS), hemoglobina D (HbD), hemoglobina A Lepore (HbA Lepore) hemoglobina AG (Hb AG) e a associação entre elas que podem confundir o diagnóstico com talassemia (NAOUM et al., 1984; ROBBINS et al., 2000; VALLADA, 2002).

As talassemias são um grupo heterogêneo de doenças hematológicas hereditárias dentro das hemoglobinopatias mais comuns e difundidas no mundo e envolvem a produção de hemoglobina. Tem ampla distribuição mundial que podem ser encontradas principalmente em indivíduos cujos ancestrais se originaram das praias do nordeste do Mediterrâneo, daí o nome “Talassemia” onde talassa significa mar em grego, aima quer dizer anaima que sugere pessoas com falta de sangue (anêmicas) (BONINI-DOMINGOS, 1993). Existem vários genes responsáveis pela codificação das globinas, que estão localizados nos cromossomos 11 (cluster das globinas β) e 16 (cluster das globinas α). As hemoglobinopatias podem ser classificadas primariamente em talassemias (distúrbios quantitativos) e variantes de hemoglobinas (distúrbios qualitativos). As talassemias podem, posteriormente, ser classificadas com base no gene envolvido (α e β talassemias) (ROBBINS, 1975; FAILACE, 2000; NAOUM, 2004). Desta forma o objetivo foi avaliar a prevalência de genes talassêmicos pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, discorrer sobre os distúrbios hematológicos nas hemoglobinopatias e descrever as formas de diagnóstico e tratamento para esta doença.

DESENVOLVIMENTO TEÓRICO

A α - talassemia é caracterizada pela ausência de um ou mais genes que controlam a síntese da cadeia α - globínica, resultando em formas diferentes da doença. O traço de talassemia α -2, com deleção de um gene corresponde aos portadores silenciosos ou assintomáticos o traço da talassemia α -1, com deleção de

dois genes, assemelha-se à β -talassemia menor. Quanto maior a queda de síntese de globina alfa, maior será também a concentração de HbH, já que a globina beta continua sendo sintetizada normalmente e por isso, o “excesso” de globina beta “livre” se junta para formar tetrâmeros de globinas β_4 , resultando a HbH (DOTTO, 2005). Nos recém-nascidos, esta diminuição da síntese de globina alfa afeta sua relação com a globina gama normalmente sintetizada formando assim tetrâmeros de globinas γ_4 , resultando na Hb Bart's. A ausência destes quatro genes, com formação da Hb de Bart, é incompatível com a vida ocasionando a morte intrauterina (NAOUM,1997).

As síndromes β -talassêmicas são uma doença autossômica recessiva, caracterizada pela ausência de produção (β_0) ou produção parcial (β^+), muito frequente nas regiões sul e sudeste pela intensa vinda de pessoas da Europa para estas regiões. Ocorre por disfunção genética, onde não serão produzidas de forma correta as cadeias betas da hemoglobina no cromossomo 11. Indivíduos beta talassêmicos podem ser homocigotos ($\beta_0 \beta_0$) ou ($\beta^+ \beta^+$), recebendo a denominação de talassemia beta maior com a ausência de produção das cadeias, e heterocigotos (β/β^+) ou (β/β_0), também chamado de talassemia beta menor, onde ocorre diminuição na síntese. Diferente da alfa talassemia, na beta não ocorre à manifestação no período fetal, onde somente após a troca da hemoglobina gama pela beta ocorre erro, permanecendo a produção de cadeias gama e formação da Hemoglobina Fetal (HbF) (MARTINS; SILVA; REZENDE, 2016; NAOUM, 2000).

Os exames laboratoriais podem ser divididos em testes de triagem e testes de confirmação. Os testes de triagem incluem: análise morfológica das hemácias, índices hematimétricos, investigação das hemoglobinas do paciente por meio de eletroforese de hemoglobina em pH alcalino e resistência osmótica em solução de cloreto de sódio a 0,36% (específico para triagem de talassemia). Dentre os testes de confirmação estão: eletroforese em pH ácido (com a conseguinte dosagem de hemoglobina A1 e A2), isoeletroforese, cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE, estudo molecular (DNA – ácido desoxido ribonucléico), além da avaliação de

ferro sérico e ferritina (BONINI-DOMINGOS e MENDES-SIQUEIRA, 2000; LEONELI et al., 2000; ZAMARO et al., 2002; LISOT; SILLA, 2004; ONDEI et al., 2005).

O tratamento conservador da talassemia fundamenta-se em transfusões de sangue, terapêutica quelante, esplenectomia e apoio psicológico. Com o emprego dessas medidas, a talassemia deixou de ser uma doença letal na infância com sobrevida mediana inferior a cinco anos, transformando-se em uma doença crônica, com desenvolvimento próximo ao normal e vida mediana superior a 25 anos. Alternativamente, o transplante de medula óssea pode erradicar a doença, substituindo a medula anormal pelo tecido hemopoético de doador saudável ou heterozigoto (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário de Rio Preto - UNIRP, com o número do parecer: 2.894.553, obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Neste estudo foi realizada a coleta de 121 acadêmicos da Fundação Educacional de Fernandópolis, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), no período de agosto e setembro de 2018, tendo como critério de inclusão ambos os sexos acima de 18 anos, que apresente condições físicas para a coleta e que tenham o TCLE (Termo de consentimento livre e esclarecido) devidamente assinado. Com isso foi realizado os procedimentos da coleta através da punção venosa e acondicionadas em tubos com anticoagulante (EDTA), sendo identificadas e analisadas com o hemograma como forma de triagem e enviadas ao laboratório de apoio para realização do método de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), como teste confirmatório.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As hemoglobinas anormais apresentam distribuição variada nas diferentes populações analisadas no mundo todo, que resultam em aproximadamente 700 variantes de hemoglobinas descritas e mais de uma centena de tipos de talassemias, fornecendo dados importantes sobre o papel da seleção natural e das migrações humanas. O Brasil caracteriza-se por significativa mistura racial, com grande influência na dispersão de genes anormais, notadamente de talassemias e falcemias. A distribuição das hemoglobinas anormais está relacionada com os grupos raciais que participaram na formação da população de cada região (Leoneli et al.,2000).

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram à alta frequência de perfil hemoglobínico normal (HbAA). Foi identificado portador de β – Talassemia, com alterações significativas no hemograma e doseamento da HbA2 elevado. Foram ainda detectados portadores de outras variantes da hemoglobina que migram na região S, o que resultou na identificação de portador de HbAS conhecida como traço falcêmico. Neste heterozigoto a concentração de HbS é sempre inferior a concentração de HbA, o que faz com que este portador não apresente sintomatologia nem alteração hematológica. Obteve outras variantes da hemoglobina, que foi identificado portadores com aumento significativo de HbF. O devido aumento leva a Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) que é caracterizada pela contínua produção de HbF na vida adulta, decorrente da não mudança perinatal da síntese de globina gama para beta, que pode ocorrer por deleções ou mutações pontuais. A Talassemia é caracterizada pela expressão persistente dos genes gama durante a vida adulta em associação com diminuição ou ausência de expressão dos genes delta e beta no mesmo cromossomo. Estima-se que indivíduos com HbF aumentada e sem clínica apresentam PHHF, que pode estar relacionada a diferentes etnias. A amostra do portador de hemoglobina C é

resultante na substituição da cadeia beta da hemoglobina humana, do ácido glutâmico pelo aminoácido lisina, como mostra o gráfico 1.

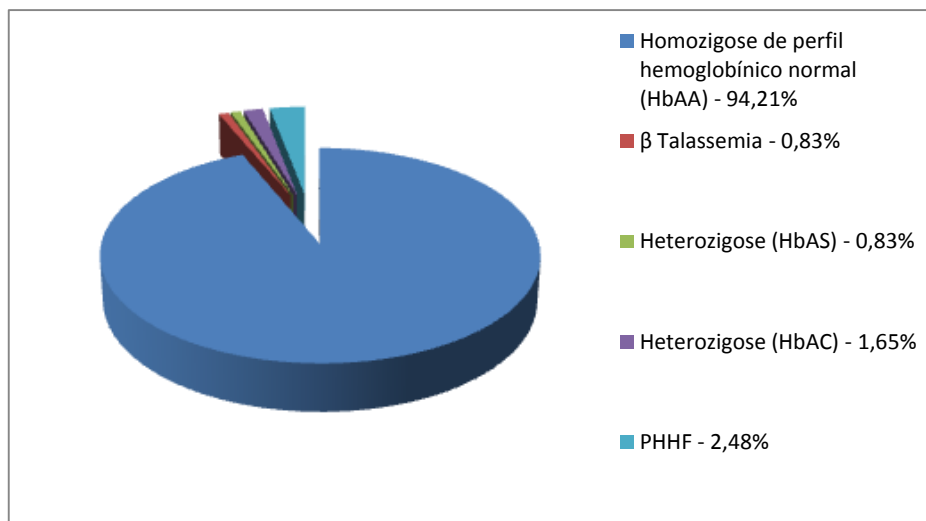


Gráfico 1 - Tipos de Hemoglobinopatias encontradas nas amostras analisadas nos acadêmicos da Fundação Educacional de Fernandópolis – FEF.

Estudo realizado por Leoneli et al., (2000) em São José do Rio Preto, mostra que em 74 amostras analisadas 5,53% apresentaram alterações que caracterizavam como pacientes talassêmicos. Em outro estudo realizado por Melo et al, (2008) na região Noroeste do estado de São Paulo, 10,13% num total de 3.048 amostras apresentaram alterações no perfil eletroforético, caracterizando anemias hereditárias. E no estudo de Sandrini et al, (2005) em Porto Alegre, 32,8% num total de 293 amostras, apresentaram alterações sendo com maior frequência de talassemias seguidas de outras hemoglobinopatias, que incluem as variantes raras. Já no presente estudo, 5,79% dos 121 pacientes apresentaram alterações no exame de eletroforese, verificando que esse valor é inferior ao encontrado nas pesquisas acima. Dessa forma, 0,83% dos pacientes apresentaram β talassemia, 0,83% traço falcêmico, 1,65% heterozigose para Hemoglobinopatia C e 2,48% persistência hereditária de hemoglobina fetal. Todos os pacientes do atual estudo foram

submetidos ao hemograma completo como um teste de triagem para avaliar a diminuição de hemoglobina que se caracteriza anemia. Do total de pacientes analisados somente 9,92% apresentaram diminuição de hemoglobina, porém, dentro desta porcentagem apenas 1 acadêmico apresentou alteração na eletroforese caracterizado como uma anemia de origem hereditária. Os outros pacientes que apresentaram anemia não são de origem hereditária, podendo ser uma deficiência de ferro, vitamina B12, ácido fólico, perda crônica de sangue ou outros fatores. Os demais pacientes que apresentaram alterações na eletroforese não tinham deficiência de hemoglobina, como por exemplo, os pacientes que tinham traço falcêmico, heterozigose para hemoglobinopatia C e mesmo os com persistência hereditária fetal, na qual eles não apresentavam anemia.

Outro parâmetro utilizado como método de triagem foram os questionários aplicados a todos os participantes do estudo, onde obtivemos informações sobre suas etnias, casos de anemia na família e na infância, entre outros, como mostra o gráfico 2, 3 e 4.

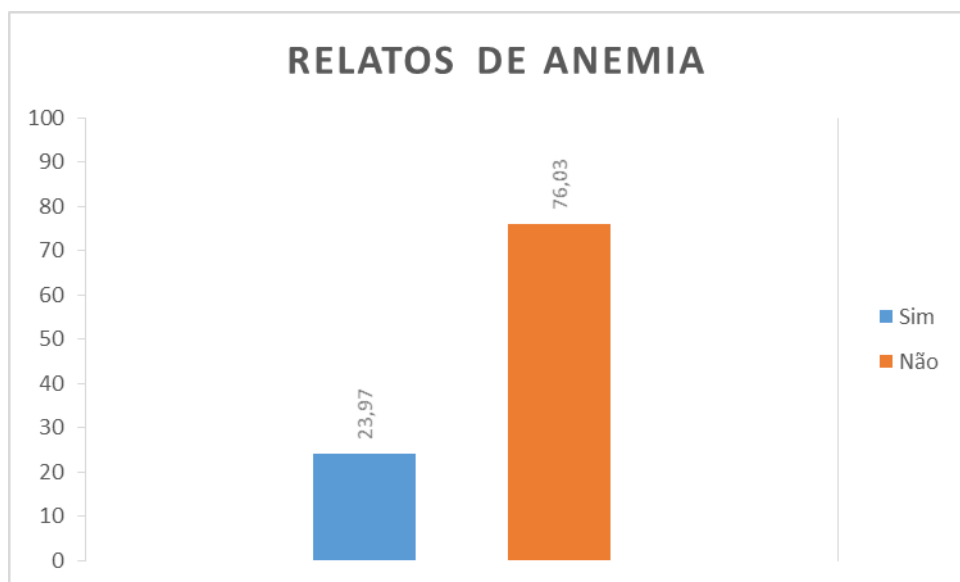


Gráfico 2 - Quantidade de acadêmicos que relataram ter anemia.

Como mostra o gráfico 2 a porcentagem de acadêmicos que já tiveram anemia foi de 23,97%. Quando comparado com os resultados obtidos nos testes de triagem observou-se que apenas 9,92% apresentaram alguma alteração.

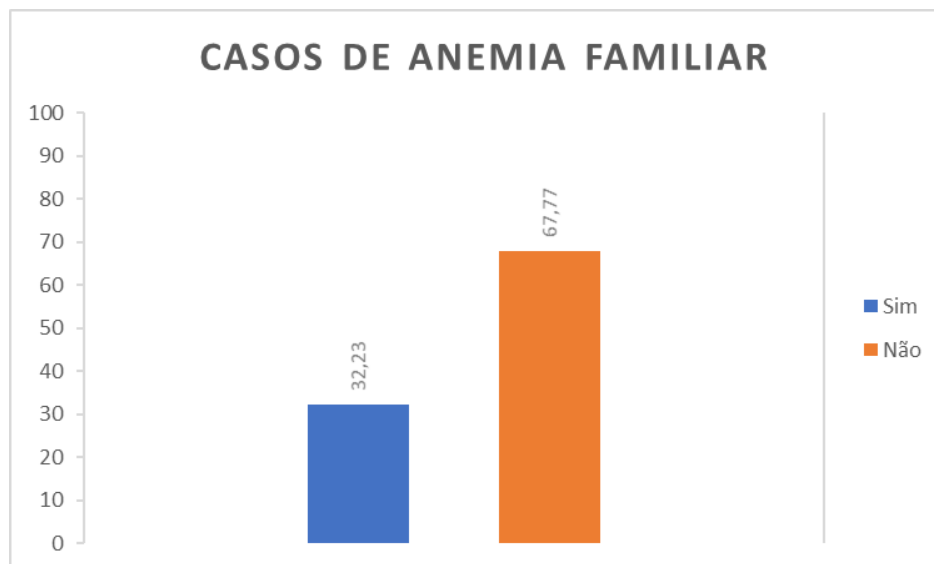


Gráfico 3 - Número de acadêmicos com histórico familiar.

De acordo com a figura 3, o porcentual de 32,23% declarou que já houve casos de anemia na família, porém não sabem dizer qual a origem da anemia.

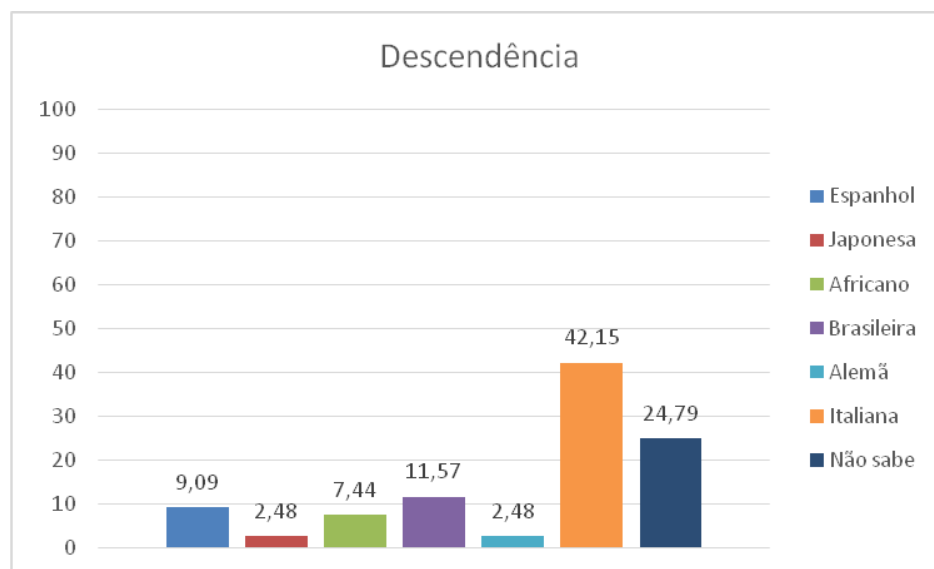


Gráfico 4 - Frequência da origem racial entre os acadêmicos.

Como mostra a figura 4 houve uma maior frequência de acadêmicos com descendência italiana, sendo que 5,79% apresentou algum tipo de alteração. Dentro desse percentual de alterados, os acadêmicos com β -Talassemia, hemoglobina S e Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal são de origem italiana, já os acadêmicos com Hemoglobina C possuem descendência africana, podendo caracterizar uma heterogeneidade genética, mostrando assim que a distribuição das hemoglobinopatias e talassemias se relacionam com os diversos grupos raciais que participaram na formação da população brasileira.

Estes dados são de relevância clínica, uma vez que estas alterações hematológicas são interpretadas como características de anemia hereditária, estabelecendo assim como um meio de tratamento paliativo o uso de ácido fólico .

CONCLUSÃO

As talassemias heterozigotas constituíram a principal fonte de dificuldade diagnóstica em laboratório de rotina devido o portador de talassemia ser quase sempre assintomático e fisiologicamente adaptado a essa situação. Portanto, faz-se necessário o estudo familiar do paciente bem como a história clínica juntamente com os exames laboratoriais de triagem como: o hemograma e o específico como: o CLAE, para agilizar o diagnóstico diferenciando-se assim de outras anemias.

Conclui-se, que é necessário esclarecimentos à população sobre as anemias hereditárias, com a possibilidade de diagnóstico precoce com exames de baixo custo e tratamento acessíveis. A realização da investigação é importante devido à maioria desta doença ser de natureza hereditária, podendo resultar de associações complexas de genótipos, em muitos casos somente esse estudo familiar permite o diagnóstico correto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bonini-Domingos CR. Hemoglobinopatias no Brasil: variabilidade genética e metodologia laboratorial [Teste de Doutorado]. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista; 1993.

Bonini-Domingos CR, Mendes- Siqueira FA. Diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. Newslab. 2000;42:70-6.

DOTTO, Fátima Rosane Colpo. Talassemias alfa e beta. Disponível em: <http://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/1564/Dotto_Fatima_Rosane_Colpo.pdf?sequence=1>. Acesso em: 12 de março de 2018.

FAILACE, R. Hemograma: Manual de Interpretação. 3 . ed. Porto Alegre: Artmed, 4:54-56,2000.

LEONELI, G. G. et al. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., v. 22, p. 396-403, 2000.

LISOT, C. L. A.; SILLA, L. M. R. Triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil: prevalência em áreas de colonização italiana. Caderno Saúde Pública, v. 20, n. 6, nov./dez. 2004.

MARTINS, Antonio José Dias; SILVA, Rasan Dyego Romão; REZENDE, Bruna. Talassemias : UMA ANÁLISE AMPLA E CORRELAÇÕES CLÍNICAS. Disponível em: <http://www.faculdadealfredonasser.edu.br/files/Pesquisar_4/05-12-2016-21.08.56.pdf>. Acesso em: 12 de março de 2018.

MELO, Luciane M. S. et al. Rastreamento de hemoglobinas variantes e talassemias com associação de métodos de diagnóstico. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., São Jose do Rio Preto, v.30, n.1, p. 12-17, Feb. 2008. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v30n1/a06v30n1.pdf>>. Acesso em: 22 de outubro de 2018.

NAOUM, P. C. Anemias imigrantes, origem das anemias hereditárias no Brasil. *Ciência Hoje*, v. 3, set./out. 1984.

NAOUM, P.C: Hemoglobinopatias e Talassemias, 1ª ed. Reimpressão, Ed. Sarvier 96-142, 1997.

Naoum PC. Prevalência e controle da Hb S. *Rev Bras Hematol Hemoter* . 2000;1.2:142-8.

NEKEL, Jocieli Carine. ANEMIA CARENCIAL EM IDOSOS POR DEFICIÊNCIA DE FERRO ÁCIDO FÓLICO E VITAMINA B12. 2013. 23f. Monografia de especialização em Hematologia- Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - UNIJUÍ, 2013.

ONDEI, L. S. et al. A importância do diagnóstico clássico na identificação de variantes de hemoglobina. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 27, p. 72-74, 2005.

ROBBINS, S. L. et al. Doença dos eritrócitos e distúrbios hemorrágicos. In: *PATOLOGIA estrutural e funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.552-557.

ROBBINS,S.L. *Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: Interamericana, 17:640-641 1975.

SANDRINI, Wagner C. et al. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes com anemia não ferropênica. 2005. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbhh/v27n1/v27n1a10.pdf>>. Acesso em: 22 de outubro de 2018.

VALLADA, E. P. Manual de técnicas hematológicas. São Paulo: Atheneu, 2002.

ZAGO, Marco Antônio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo. **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013.

ZAMARO, P. J. A. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à Hb S. J. Bras. Patol., v. 38, p. 261-266, 2002.

QUESTIONÁRIO

1. Já teve ou tem anemia?

Sim Não

2. Já fez ou faz tratamento com o medicamento ácido fólico? Se sim, por quanto tempo?

Sim, _____ Não

3. Já fez ou faz tratamento com o medicamento sulfato ferroso? Se sim, por quanto tempo?

Sim, _____ Não

4. Existem casos de anemia na família?

Sim Não

5. Já fez transfusão de sangue?

Sim Não

6. Qual a sua descendência familiar?

R: _____

TERMO DE COMPROMISSO

Bruna Vieira de Oliveira, residente na R.: José Camargo de Arruda, Fernandópolis - SP, RG: 45.599.575-8, CPF: 430.634.738-98, Luana de Melo Belizário, residente na R.: José Camargo de Arruda, Fernandópolis - SP, RG: 57.546.511-6, CPF: 040.754.261-22, Rafaela Camacho de Souza, residente na R.: José Camargo de Arruda, Fernandópolis - SP, RG:49.941.739-2 , CPF:432.391.058-45 , discentes do curso de graduação de Farmácia da Fundação Educacional de Fernandópolis, responsáveis pelo Projeto de Pesquisa intitulado: “Pesquisa de talassemia pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência em acadêmicos da Fundação Educacional de Fernandópolis na Cidade de Fernandópolis / SP – Brasil”, comprometendo-se a desenvolver a pesquisa supracitada envolvendo seres humanos da Resolução nº 196 de 10/10/1996, do Conselho de Nacional de Saúde.

Fernandópolis, ____ de _____ 2018.

Bruna Vieira de Oliveira

Luana de Melo Belizário

Rafaela Camacho de Souza