

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Dimitria da Cruz Pletsch

**MÉTODOS LABORATORIAIS PARA DETECÇÃO DE HEMOGLOBINA
S EM DOADORES DE SANGUE.**

São Paulo
2016

Dimitria da Cruz Pletsch

MÉTODOS LABORATORIAIS PARA DETECÇÃO DE HEMOGLOBINAS EM DOADORES DE SANGUE.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Prof.^a Juliana Vieira S. Bianchi, como requisito parcial para obtenção do título em Bacharel em Biomedicina

São Paulo

2016

DIMITRIA DA CRUZ PLETSCH

MÉTODOS LABORATORIAIS PARA DETECÇÃO DE HEMOGLOBINAS EM DOADORES DE SANGUE.

São Paulo, 25 de Outubro de 2016

Professor Orientador (Juliana Vieira dos Santos Bianchi)

Professor Examinador (Michelangelo Juvenale)

AGRADECIMENTOS

Agradeço pela realização deste trabalho aqueles tiveram paciência e que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para realização do mesmo. Obrigada pais, por possibilitar a concretização deste e de outros sonhos, e passar toda confiança necessária para que eu pudesse chegar até aqui, amigos por proporcionar o apoio necessário nos momentos difíceis, professora Juliana que sempre esteve disposta a auxiliar e a todos que de alguma forma contribuíram com a minha vida acadêmica.

PLETSCH, D.P. **Métodos laboratoriais para detecção de hemoglobina S em doadores de sangue.** 2016. 58f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

A anemia falciforme é uma doença monogênica causada por uma mutação no gene da beta globina, na qual, ocorre a substituição do ácido glutâmico (GAG) pela valina (GTG) resultando em uma hemoglobina anormal denominada hemoglobina S. Esta troca de aminoácidos leva a uma alteração bioquímica que favorece a polimerização da hemoglobina quando em sua forma desoxigenada, acarretando na mudança da forma bicôncava do eritrócito para forma de foice. A modificação na morfologia da célula é a base para fisiopatologia da doença juntamente com os fenômenos vaso-oclusivos. Esta mutação pode-se apresentar de duas formas: Homozigose, no qual, o indivíduo possui os dois alelos do gene da beta globina mutados e apresenta todos os sintomas característicos da doença falciforme ou em heterozigose também conhecido como traço falciforme, no qual, o indivíduo possui apenas um dos alelos mutados e, portanto, não possui alterações hematológicas. Uma vez que não possuem características clínicas os indivíduos com traço falciforme não são impedidos de doar sangue, porém como preconizado na resolução de diretoria colegiada 158 de 4 de fevereiro de 2016 da ANVISA as amostras dos doadores devem passar por testes de detecção da hemoglobina S e podem ser utilizadas para transfusão, salvo em alguns casos específicos. Os testes normalmente utilizados são eletroforese, HPLC, teste de solubilidade, teste de falcização e atualmente o teste de papel filtro. Porém, a mesma legislação não determina qual metodologia deve ser utilizada, tornando-a uma escolha dos hemocentros, além disso, não está especificado em qual momento existe a necessidade de detectar a presença da hemoglobina S nos doadores de sangue e nem se estes podem ser impedidos de realizar a doação caso o exame dê positivo, evidenciando a necessidade de estudos aprofundados sobre o ciclo do sangue e logística dos serviços de hemoterapia para aperfeiçoar o processo de doação e garantir maior qualidade dos hemocomponentes.

Palavras-chaves: Anemia falciforme, Diagnóstico, heterozigoto, doadores de sangue.

PLETSCH, D.P. **Laboratory Methods for Detection of Hemoglobin S in Blood Donors**. 2016. 58p. Work of Course Conclusion (Graduation in Biomedicine) - University Center São Camilo, São Paulo, 2016.

Sickle cell anemia is a monogenic disease caused by a mutation in the beta globin gene, which occurs in substitution of glutamic acid (GAG) for valine (GTG) resulting in an abnormal hemoglobin named hemoglobin S. The exchange of amino acids generates a biochemical alteration that favors the hemoglobin's polymerization when deoxygenated form resulting change the biconcave shape of erythrocytes to sickle shape. The alteration in the cell's morphology is the basis for the disease's pathophysiology along with vaso-occlusive phenomena. This mutation could be presented in two ways: Homozigosity, which the individual has two alleles of beta globin mutated gene and has all characteristics symptoms of sickle cell disease or heterozygous, also known as sickle cell trait, which the individual has only one of the mutated alleles and, therefore, has no hematological changes. Once they do not have clinical characteristics the individuals with sickle cell trait are not prohibited from donating blood, although as advocated in the resolution of executive board 158 of February 4, 2016 ANVISA samples donor must undergo testing for hemoglobin S and they can be used for transfusion, except in some specific cases. The tests are commonly used electrophoresis, HPLC, solubility tests, sickling test and currently the filter paper test. However, the same law does not determine which method should be used, making it a choice by hemocenters, moreover, it is not specified at which moment exist a requirement to detect a presence of hemoglobin S in the donor blood or whether they may be prevented from carrying out the donation if an exam give positive, highlighting the need for in-depth studies on the blood cycle and logistics hemotherapy services to improve the donation process and ensure higher quality of blood products.

Keywords: Sickle cell anemia, diagnosis, heterozygous, blood donors.

Lista de figuras

Figura 1 - Prevalência do traço falciforme de acordo com cada estado Brasileiro.....	15
Figura 2- Microscopia eletrônica evidenciando a morfologia do eritrócito normal com seu formato bicôncavo preservado e forma alterada para foice.....	20
Figura 3- Demonstração do processo vaso-oclusivo devido a mutação da hemoglobina S e afoiçamento das hemácias.....	21
Figura 4- Fluxograma sobre a sequencia de acontecimento na AF que levam a quadros de anemia.....	24
Figura 5- Fluxograma dos métodos de diagnóstico da anemia falciforme.....	30
Figura 6- Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino.....	32
Figura 7- Eletroforese de hemoglobina em pH ácido.....	32
Figura 8- Perfil cromatográfico das hemoglobinas.....	33
Figura 9- Eritrócitos falciformes e eritroblastos circulante em sangue periférico.....	34
Figura 10- Teste de solubilidade realizado em amostra normal e amostra com hemoglobina mutada.....	35
Figura 11- Exemplificação da metodologia utilizada na técnica do papel filtro e padrões de resultados.....	35
Figura 12- Fluxograma para doação de sangue com a sugestão de detecção de hemoglobina S durante a pré-triagem.....	42

Lista de abreviaturas e siglas

AF	Anemia falciforme
AVC	Acidente vascular cerebral
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CH	Concentrado de hemácia
Hb	Hemoglobina
HbAA	Hemoglobina A
HbAS	Hemoglobina AS
HbF	Hemoglobina F
HbS	Hemoglobina S
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
IgG	Imunoglobulina G
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
NO	Óxido Nítrico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Ponto isoelétrico
PNTN	Programa nacional de triagem neonatal
RDW	Larga distribuição de células vermelhas do sangue
SRE	Sistema reticulo endotelial
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	13
3	METODOLOGIA.....	14
4	REVISÃO DE LIERATURA.....	15
4.1	ETIOLOGIA.....	15
4.2	HEMOGLOBINA	16
4.3	FISIOPATOLOGIA	19
4.4	DIAGNÓSTICO LABORATÓRIAL	27
4.4.1	ELETROFORESE.....	31
4.4.2	HPLC	33
4.4.3	FALCIZAÇÃO	33
4.4.4	SOLUBILIDADE.....	34
4.4.5	PAPEL FILTRO.....	35
4.5	EFETIVIDADE DAS TÉCNICAS LABORATÓRIAS.....	36
4.6	PROPOSTA PARA UTILIZAÇÃO DE BOLSAS HbA/HbS	40
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
6	REFERENCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

A doença falciforme é uma anemia hemolítica congênita, classificada dentro do grupo de hemoglobinopatias, é decorrente de uma mutação nas cadeias β da hemoglobina (Hb), que acarreta na formação da hemoglobina S (NETO; PITOMBEIRA, 2003). O Brasil tem uma distribuição bastante heterogeneia, sendo a doença hereditária de maior prevalência no país, variando de acordo com a etnia, mais comumente encontrada na população negra e parda, quando comparada aos caucasianos. (CANÇADO; JESUS, 2007).

As hemoglobinopatias são consideradas uma das doenças genéticas mais comuns no mundo, sendo alterações autossômicas recessivas, e afetando aproximadamente 5% da população mundial (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 2007). Em síntese, são divididas em alterações quantitativas, abrangendo as talassemias, e em alterações qualitativas, que referem-se as hemoglobinas variantes, resultantes de alterações em um dos genes (α , β , γ ou δ) que codificam sua estrutura, sendo as hemoglobinas S, C, D e E consideradas as de maior relevância clínica (OLIVEIRA, 2008).

A anemia falciforme se apresenta com quadros hemolíticos que evoluem determinando a sua cronicidade, sendo responsável por causar danos físicos consideráveis, como obstrução de vasos sanguíneos com crise de dor, infartos, necroses em órgãos variados, ossos, articulações, etc. Refere-se a uma doença incurável, porém tratável, mas que debilita a vida do paciente por ela acometido. (SILVA; RAMALHO; CASSORLA, 1993)

A hemoglobina é uma proteína presente no interior dos eritrócitos que tem a função de transportar o oxigênio por todo o organismo, constituída por quatro cadeias globínicas ligadas ao grupo heme. A síntese de tais cadeias, é regulada por agrupamentos (*clusters*) localizados nos cromossomos 11 e 16, que quando ativados ou reprimidos em diferentes genes realizam a síntese de distintas cadeias globínicas (α , β , γ ou δ), dando origem por sua vez, a variados tipos de hemoglobinas. (NETO; PITOMBEIRA, 2003). Essas cadeias não-alfa estão sempre ligadas a cadeias Alfa, completando desse modo, o tetrâmero característico encontrado na hemoglobina. (HOFFBRAND; MOSS, 2013).

A mutação pode ser visualizada de duas diferentes formas: Homozigose (HbSS), que é caracterizado por possuir os dois alelos do gene da β globina afetado, ou em heterozigose (HbAS), chamados de portadores, caracterizado quando somente um dos alelos possui a mutação (SANTOS, 2014).

Os portadores da hemoglobina S (HbS) não apresentam características clínicas e, portanto, são aptos a doação de sangue. Conforme portaria 158 de 4 de fevereiro de 2016, ficou determinado a triagem das hemoglobinas anormais em bancos de sangue, visando identificar esses doadores e proporcionar melhor qualidade do hemocomponente a ser transfundido (GIOVALLI et al., 2011). Entretanto, os procedimentos como desleucotização não podem ser efetuados nessas bolsas e o processo de infusão dos concentrados de hemácias contendo hemoglobina S necessita de um rigoroso controle e rastreabilidade, visto que essas bolsas não podem ser utilizadas em algumas circunstâncias específicas como, por exemplo, em pacientes com hemoglobinopatias, recém-nascidos, pacientes com acidoses graves, entre outras situações, principalmente em decorrência de não possuir efeitos equivalentes a uma bolsa contendo somente HbAA (SILVA; GIOVALLI, 2010).

Moraes e Galioti (2010) realizaram um estudo utilizando 93.604 amostras de doadores de sangue do serviço de hematologia e hemoterapia de São José dos Campos durante os anos de 2004 a 2008 abrangendo uma faixa etária de 18 a 65 anos e foi observado que destes doadores, 400 eram portadores de hemoglobina S, ou seja, 0,43% do total.

Em Sergipe, Vivas e colaboradores (2006) realizaram um outro estudo a fim de verificar hemoglobinopatias em doadores de sangue, no HEMOSE durante o período de setembro de 2004 a junho de 2005. Foram analisadas 1.345 amostras de doadores de sangue, sendo que as reações positivas para alguma hemoglobinopatia foram testadas através da técnica de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para determinação das frações de hemoglobina presente nessas amostras, sendo que 76 (5,1%) deste total foram positivas, encontrando por resultado 55 amostras (4,1%) heterozigotas para hemoglobina S. Também foi possível avaliar que dentro das hemoglobinopatias, o traço falciforme é o mais prevalente nos doadores de sangue, totalizando 73% dos exames positivos.

Lidani, Barros e Bovo (2015) também elaboraram um estudo semelhante no Instituto Paranaense de hematologia e Hemoterapia dentre os anos de 2008 a 2009,

incluindo 83.213 doadores de sangue, dentre estes, 727 foram positivos para HbS, totalizando 0,87%, exibindo as taxas consideráveis de traço falciforme na população brasileira, com um grupo específico de pessoas que são doadoras.

A portaria 158 implementa a triagem de hemoglobinopatias nos centros de hemoterapia, porém a mesma não indica qual a metodologia poderia ser utilizada para esse diagnóstico, e, portanto, há falta de padronização nos bancos de sangue do Brasil (GIOVALLI et. al.,2011). Sendo assim, a busca por metodologias custo-efetiva se faz necessária para melhor qualidade dos hemocomponentes (YANG et al.,2013).

Nos serviços de hemoterapia, são comumente executados os testes de solubilidade, no qual os eritrócitos são lisados e HbS reduzidos, decorrente da insolubilidade demonstrada por eritrócitos com forma alterada e capacidade de formação de polímeros, a solução torna-se turva, quando positiva. É utilizado também para triagem de doadores, o teste de falcização, uma metodologia qualitativa que dispõe de metabissulfito de sódio para diminuir a tensão de oxigênio vista na Hb, e assim propiciar a perda da forma bicôncava característica dos eritrócitos, assumindo um formato falcizado, para aqueles que possuem HbS podendo ser visualizado em microscópio. (SANTOS, 2014). Por fim também pode ser feito o método de gel-centrifugação, um kit comercial, que apresenta por princípio falcizar "*in vitro*" os eritrócitos, semelhante ao próprio teste de falcização. Nele encontra-se um agente redutor tamponado e cartão com gel capaz de reter os eritrócitos que tiveram sua forma modificada, deixando-os suspensos no microtubo, isto ocorre porque eritrócitos HbS tornam-se altamente inflexíveis quando submetidos a centrifugação, o que diminuí sua capacidade de sedimentação, tornando a reação positiva, ao passo que eritrócitos HbAA sedimentam-se por completo, caracterizando o negativo (GIOVALLI et. al., 2011). Assim sendo, a triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue deve ser considerada para garantir a segurança do doador-receptor (JUNIOR, 1994).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Discursar sobre a anemia falciforme e as técnicas usadas para a detecção de hemoglobina S em laboratórios clínicos e centros de hemoterapia.

2.2 Objetivo específico

Avaliar a efetividade dos métodos laboratoriais utilizados para identificação de doadores de sangue com traço falciforme e discutir sobre o uso de bolsas de sangue proveniente desses doadores e seus impactos nos serviços de hemoterapia.

3 METODOLOGIA

Para o presente trabalho foi realizado um levantamento bibliográfico, na qual foram selecionados artigos científicos nas bases de dados LILACS, revistas eletrônicas, e livros da biblioteca Pe. Inocente Radrazzine através de descritores como: “Anemia falciforme”, “Traço falciforme”, “Diagnóstico de hemoglobinopatias”, “Triagem de HbS em banco de sangue”, durante os meses de janeiro a setembro de 2016 para composição do trabalho.

4 REVISÃO DE LIERATURA

4.1 Etiologia

A anemia falciforme é originária dos países do centro oeste africano, Índia e leste da Ásia, porém com a miscigenação já foi encontrada em diversos outros países do mundo. (SANTOS, 2014).

A introdução da HbS nas Américas ocorreu por volta dos séculos XVI ao XIX devido, principalmente, ao tráfico de escravos africanos (NAOUM, 2000). Atualmente no Brasil o traço falciforme possuiu uma distribuição heterogenia sendo mais frequentemente vista nos negros e pardos, mas também acometendo caucasianos, com ampla distribuição por todo país, como demonstra a figura a seguir, atingindo, porém, de modo mais acentuado a região nordeste Brasileira (ANVISA, 2002).

Figura 1 – Incidência do traço falciforme de acordo com cada estado Brasileiro



Fonte: (FERRAZ; MURAO, 2007).

A primeira descrição na literatura médica sobre anemia falciforme ocorreu em 1910, após a observação de hemácias em foices de um jovem negro vindo de

Granada - índias ocidentais, que possuía sintomas de anemia (NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Em 1917 foi observado, *in vitro*, a mudança da hemácia bicôncava para hemácia falciforme e posteriormente em 1927 Hanh e Gillepsie descobriram a correlação da falcização da hemácia com a baixa tensão de oxigênio (NETO; PITOMBEIRA, 2003).

No ano de 1947, Accioly, pesquisador Brasileiro sugere que a falcização é proveniente de uma herança autossômica recessiva (NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Grandes descobertas na área marcaram o ano de 1949, no qual Neel e Beet determinaram que a doença somente ocorre em homozigose, e Linus Pauling junto com colaboradores identificaram uma diferença do perfil de migração na eletroforese da hemoglobina falciforme quando comparada à hemoglobina normal. Anos depois em 1956, foi possível esclarecer a natureza bioquímica da doença e em 1978 técnicas de biologia molecular foram utilizadas no estudo de doença falciforme por Kan e Dozy (NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Esta doença é causada por uma mutação no sexto códon do éxon 1 do gene β globina localizado no cromossomo 11, em que a substituição de uma timina por uma adenina (GAG>GTG) acarreta na transcrição incorreta do aminoácido, levando a uma substituição do ácido glutâmico pela valina na estrutura da cadeia β da hemoglobina, e, portanto, origina uma hemoglobina anormal chamada hemoglobina S (*sickle* = foice) (SILVA; RIBEIRO NETO, 2013; NETO; PITOMBEIRA, 2003). Essa mutação é conhecida como SNP (*single nucleotide polymorphism*) e se caracteriza como missense, ou seja, é uma alteração de um único nucleotídeo, que acarreta em modificação do aminoácido (OLIVEIRA; NETO, 2004).

4.2 Hemoglobina

A hemoglobina é uma proteína respiratória situada dentro dos eritrócitos que possui como principal função realizar o transporte de oxigênio por todo o organismo humano, e para executar tal atividade, possui características em sua estrutura que asseguram a capacidade de se ligar e desligar da molécula de oxigênio (NETO; PITOMBEIRA, 2003).

A hemoglobina é considerada uma proteína globular composta por quatro cadeias globinas associadas ao grupo heme, o grupo heme por sua vez, é

constituído de um átomo de ferro ligado a uma estrutura porfirínica. As subunidades da hemoglobina são codificadas pelos genes α e β , os genes do cluster α estão inseridos no braço curto do cromossomo 16 enquanto os genes do cluster β se encontram no braço curto do cromossomo 11 (TORRES; BONINI-DOMINGOS, 2005).

Há distintas possibilidades de combinações entre as cadeias globinas que irão dar origem a distintas hemoglobinas presentes nos eritrócitos durante as diversas fases da vida, abrangendo desde o período embrionário até a fase adulta. Sendo assim, de um modo geral as quatro cadeias globinas são: Duas cadeias α e outras duas cadeias não α (NETO; PITOMBEIRA, 2003).

No período embrionário, há três tipos diferentes de hemoglobinas circulantes sendo, Gower-1, Gower-2 e Portland. Após os três primeiros meses de vida fetal existe a produção da chamada hemoglobina fetal, constituída por cadeias α (alfa) e γ (gama), que perduram como sendo a maior parte da hemoglobina circulante até os seis primeiros meses de vida do recém-nascido (NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Durante a fase adulta encontram-se dentro dos eritrócitos três tipos de hemoglobinas distintas: A hemoglobina A formada por um par de cadeias α (alfa) e um par de cadeias β (beta), sendo esta a de maior prevalência, ocupando de 96 a 98% do total de hemoglobina encontrada nos eritrócitos, seguido pela hemoglobina A_2 constituída por um par de cadeias α e um par de cadeias δ (delta), que totalizam de 2,5 a 3%, e por fim ainda existe uma pequena porcentagem, de apenas 1%, correspondente à hemoglobina fetal que perdurou para a fase adulta (NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Os indivíduos homozigotos (SS), por outro lado, possuem quase que em sua totalidade eritrócitos com hemoglobina alterada, com uma mínima quantidade de hemoglobina A_2 , entre 1 a 3%, e/ou quantidades variáveis de hemoglobina fetal, indo de 0 a 30%, assim sendo, apresentam sintomatologia, diminuindo também, o tempo de vida dos mesmos na circulação (SILVA; RAMALHO, 1997). Ao passo que, heterozigostos (HbAS) apresentam níveis de HbS que variam entre 45% a 50% dentro dos seus eritrócitos (ANVISA, 2002). A tabela a seguir faz uma comparação entre a proporção de hemoglobinas encontradas em indivíduos saudáveis, com traço falciforme e com anemia falciforme.

Tabela 1: Proporção de hemoglobinas encontrada em indivíduos saudáveis, indivíduos falciformes e indivíduos com traço falciforme.

	Ind saudáveis	Ind falciformes	Ind. Traço falciforme
HbA ($\alpha 2\beta 2$)	96 a 98%	-	Acima 50%
HbA2 ($\alpha 2\delta 2$)	2,5 a 3%	1 a 3 %	-
HbF ($\alpha 2\gamma 2$)	0 a 1%	0 a 30%	0 a 2%
HbS ($\alpha 2/\beta^S 2$)	-	Restante	45 a 50%

Fonte: Baseado em (SILVA; RAMALHO, 1997, NETO; PITOMBEIRA, 2003 ANVISA, 2002).

A designação “anemia falciforme” é atribuída aos homozigotos para HbS enquanto “traço falciforme” é a denominação utilizada para heterozigotos que herdaram de seus pais um gene da hemoglobina A e outro gene da hemoglobina S (HbAS), porém nessas condições as concentrações de HbAA são maiores que a de HbS, e as hemácias possuem meia-vida fisiológica não alterada, de modo que, a falcização *in vivo* só ocorre em condições específicas, como casos em que o paciente é submetido a anestesia geral, vôos de avião não pressurizados, exposições à altas altitudes, quadros de infecções e em casos de extremo esforço físico (ANVISA, 2002). Entretanto, o indivíduo heterozigoto para HbS com associação de outra hemoglobinopatia ou hemoglobina variante deixa de ser assintomático e passa a apresentar sintomas, sendo, inúmeras vezes necessário a hospitalização do mesmo e o uso de transfusões de concentrado de hemácias. Dentre as possíveis associações os quadros mais graves são quando se encontram além do traço falciforme, a beta talassemia ou a hemoglobina C associadas, uma vez, que estas contribuem para a queda drástica da concentração de Hb (HELMAN; CANÇADO; OLIVATO, 2011).

Devido à alta miscigenação populacional encontrada no Brasil, o traço falciforme merece atenção em alguns casos específicos, como a doação de sangue, onde segundo a portaria 158 de 4 de fevereiro de 2016 recomenda-se a detecção de HbS, justamente por sua alta prevalência, com médias de 4 á 6% de acometimento na população Brasileira, sendo as regiões Nordeste e Sudeste os locais onde tanto a doença quanto o traço são mais frequentes, facilitando consideravelmente as chances de um doador possuir tal traço e diminuir assim a qualidade do sangue transfundido, sendo prejudicial tanto para receptores com HbAA, como para

receptores com HbS, onde a presença do mesmo aumentaria em cerca de 90% a concentração de HbS neste tipo de receptor em específico, visto que doadores HbAS possuem quantidades de hemoglobina S de aproximadamente 20 à 40%, diminuindo a oxigenação e aumentando o nível de hemólise pós transfusional (PRUDÊNCIO, COVAS, DOMINGOS, 2002).

4.3 Fisiopatologia

A fisiopatologia da doença falciforme está diretamente relacionada ao polimorfismo de T>A no gene da beta globina (cromossomo 11), levando a troca do aminoácido ácido glutâmico (glutamato) pela valina, substituindo assim, um aminoácido polar negativamente carregado por um aminoácido apolar alifático. A hemoglobina mutada é denominada HbS, que apresenta alterações morfológicas decorrente da formação de pontes de hidrogênio entre a valina presente na posição um da β globina com a valina sintetizada na posição seis, no lugar ocupado pelo ácido glutâmico em uma hemoglobina não mutada. As formações das pontes de hidrogênio que ocorrem entre os aminoácidos possibilitam reações intramoleculares, envolvendo, principalmente, a fenilalanina da posição 85 e a leucina da posição 88 (MOUSINHO-RIBEIRO et. al., 2008; NETO; PITOMBEIRA, 2003).

A formação dessas pontes leva a polimerização da Hb que tem início no momento em que a oxi-hemoglobina passa a ser desoxi-hemoglobina, ou seja, no momento em que ocorre a liberação do oxigênio para os tecidos. Em consequência desta troca de aminoácidos a HbS possui solubilidade, estabilidade e características físico-químicas diferentes de uma hemoglobina normal (HbAA) devido a perda de duas cargas elétricas (MOUSINHO-RIBEIRO et. al., 2008; NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Em decorrência dessas inúmeras interações intramoleculares a estrutura globular da hemoglobina é afetada e desencadeia a formação de polímeros compostos por 14 fibras de desoxi-hemoglobinas, enoveladas entre si, em um processo denominado nucleação, que acarreta no alongamento e alinhamento de mais fibras, criando uma estrutura multipolimérica, em forma de um eixo axial no interior da célula, levando a uma mudança da forma bicôncava para a forma de drepanócito, popularmente conhecida como hemácia em foice, observada na figura

2, caracterizando assim sua alteração morfológica (MOUSINHO-RIBEIRO et. al., 2008; NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Figura 2: Microscopia eletrônica evidenciando a morfologia do eritrócito normal com seu formato bicôncavo preservado a esquerda, e forma alterada para foice ao lado direito.



Fonte: (NAOUM, 2000).

Existem fatores que influenciam na polimerização da hemoglobina por exemplo, a porcentagem de HbS intracelular, o grau de desidratação celular, a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), o tempo dos glóbulos vermelhos na microcirculação, a proporção de hemoglobinas mutadas e não mutadas dentro da célula, o pH, entre outros. Além da concomitância com alfa-talassemia e os haplótipos relacionados ao gene da HbS. No geral, quanto maior a concentração de HbS dentro da célula mais grave é o quadro clínico do paciente (ANVISA, 2002).

O período de tempo no qual a HbS permanece desoxigenada tem relevância no processo de polimerização, uma vez que esta aumenta com o aumento do tempo da passagem dos eritrócitos na microcirculação, assim sendo, há uma maior tendência a falcização onde a circulação é lenta, como por exemplo no baço (ANVISA, 2002).

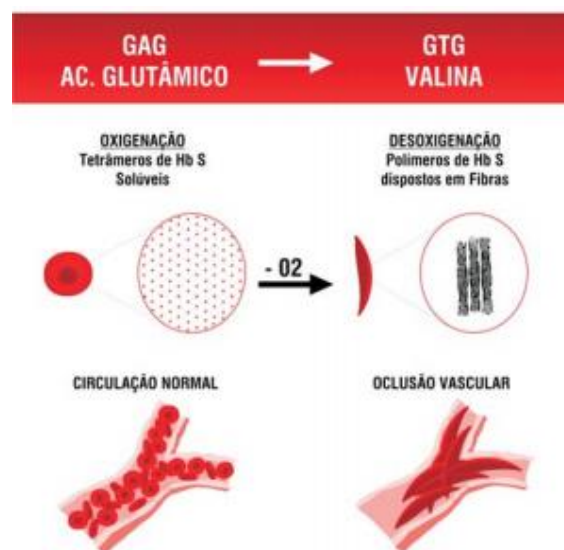
Visualizando a influência de todos estes fatores, dentro de um contexto hemoterápico, realizar uma transfusão com bolsas HbAS exige extrema cautela, pois poderia gerar quadros de hipóxia e hemólise intravascular tanto para receptores HbAA debilitados, como principalmente para receptores HbS, sendo ineficaz para melhora dos mesmos, podendo até piorar seus quadros clínicos. Deste modo, transfusões HbAS são proibidas para neonatos, casos de exosanguíneo transfusão, receptores SS (PRUDÊNCIO, COVAS, DOMINGOS, 2002), estes em específico, são indicados para processos transfusionais visando reduzir as concentrações de HbS, sendo que as mesmas são consideradas adequadas para indivíduos de médio porte

com concentrações menores ou iguais à 50%, e para indivíduos de grande porte, os níveis devem estar menores ou iguais à 30%. Este processo pode ser feito através de eritrocitafereze, que oferece inúmeras vantagens, transfusões simples ou de troca por fim por meio do processo de sangria. E, pacientes que serão submetidos à cirurgia também não são indicados para tais transfusões. Toda esta cautela se torna necessário, visto que, a HbAS pode gerar falhas na oxigenação, deste modo não ser tão eficaz quanto necessário (HEMORIO, 2014).

A doença falciforme caracteriza-se por inflamações crônicas, uma vez que grande parte dos sintomas observados ocorrem devido ao quadro inicial de vaso-oclusão seguida por liberação de mediadores inflamatórios. A mudança da forma bicôncava para forma de foice é o principal fator que contribui para vaso-oclusão, fenômeno principal da doença (MOUSINHO-RIBEIRO et al., 2008).

O acúmulo desses eritrócitos falcizados no endotélio vascular acarreta na diminuição da luz do capilar e estase sanguínea, como observado na figura 3. Em consequência da estase ocorre hipóxia tecidual levando a mais moléculas de HbS desoxigenadas e agravando a situação no local. Com a falta de oxigenação os tecidos tendem a sofrer infartos com necrose tecidual, fibrose, desorganização microvascular e sobrecarga de ferro, comprometendo a funcionalidade do órgão afetado (MOUSINHO-RIBEIRO et. al., 2008).

Figura 3: Demonstração do processo vaso-oclusivo devido a mutação da hemoglobina S e afoçamento das hemácias.



Fonte: (LOBO; MARRA; SILVA, 2007).

Ainda relacionado a vaso-oclusão existem estudos que demonstram que neutrófilos têm papel ativo neste processo, diferenças na sua expressão gênica podem ser responsáveis por algumas das variações fenotípicas da AF (Anemia Falciforme). O endotélio encontra-se alterado na AF devido a um aumento da expressão de ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule – molécula de adesão intercelular), VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular) e fator tissular. Portanto, aparentemente dois eventos inter-relacionados e desencadeados pela polimerização da HbS parecem ser responsáveis pelas manifestações clínicas da doença, a vaso-oclusão e a anemia hemolítica (FIGUEIREDO, 2007).

Além disso, decorrente da hemólise sofrida pelas células há o extravasamento de todo o conteúdo intracelular dos eritrócitos, sendo assim ocorre a liberação de Hb, e uma enzima chamada de arginase, especificamente do tipo I, expressa primariamente no fígado e nas membranas eritrocitárias, importante por converter L-arginina em uréia, e ornitina. Aumentando as concentrações desta enzima devido a hemólise, ocorre a diminuição da concentração de arginina impedindo que a mesma atue como substrato para conversão da óxido nítrico sintase endotelial, posteriormente utilizada para produção de óxido nítrico (NO). Isto soma-se ao fato de que a Hb liberada contendo grupamento heme, pode sequestrar NO endotelial, diminuindo consideravelmente suas concentrações fisiológicas, assim sendo, a queda brusca do NO contribui para a vasoconstrição vista em doentes falciformes, e esta agrava o processo de vaso-oclusão, já que impossibilita o relaxamento do endotélio vascular (SANTOS; CHIN, 2012).

Durantes as crises vaso-oclusivas frequentemente ocorrem dores associadas à isquemia tecidual abrangendo tanto membros inferiores quanto membros superiores (LOBO; MARRA; SILVA, 2007).

Em determinadas situações podem ocorrer dor na região torácica, febre, dispnéia e hipoxemia caracterizando um quadro mais grave, a síndrome torácica aguda. A síndrome torácica aguda acomete de 15 a 43% dos pacientes e frequentemente está associada à fibrose pulmonar, podendo evoluir rapidamente para falência respiratória e óbito (ÂNGULO, 2003).

Decorrente dos numerosos infartos há uma acentuada fibrose do baço que culmina em sua atrofia anatômica, muitas vezes, precedida de perda de função. Como consequência da asplenia há uma maior suscetibilidade a infecções graves, particularmente, infecções por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*,

Neisseria meningitidis e *Klebsiella* sp. tornando esta complicação uma das maiores causas de morte em pacientes com anemia falciforme (ZAGO; PINTO, 2007).

A deformidade celular proveniente da falcização e desfalcização dos eritrócitos com hemoglobina S leva a alterações na membrana eritrocitária que causam desidratação nessas células, tais mudanças relacionam-se com a perda da bomba de sódio e potássio contribuindo para um desequilíbrio hidroeletrolítico com perda de potássio e água, culminando em eritrócitos mais densos, e em um aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) favorecendo a polimerização dos mesmos, existe ainda a perda da bomba de cálcio/ATPase, sendo assim, há um aumento na concentração de cálcio intracelular, e como resultado dessas alterações os eritrócitos tornam-se permanentemente falcizados. A membrana celular é amplamente afetada pelo processo de falcização, gerando diversas alterações como, por exemplo, rearranjo das proteínas espectrina-actina, diminuição de glicoproteínas, geração de radicais livres e externalização da fosfatidilserina, diminuindo, portanto, o tempo de circulação dos eritrócitos na corrente sanguínea (MANFREDINI et. al., 2013).

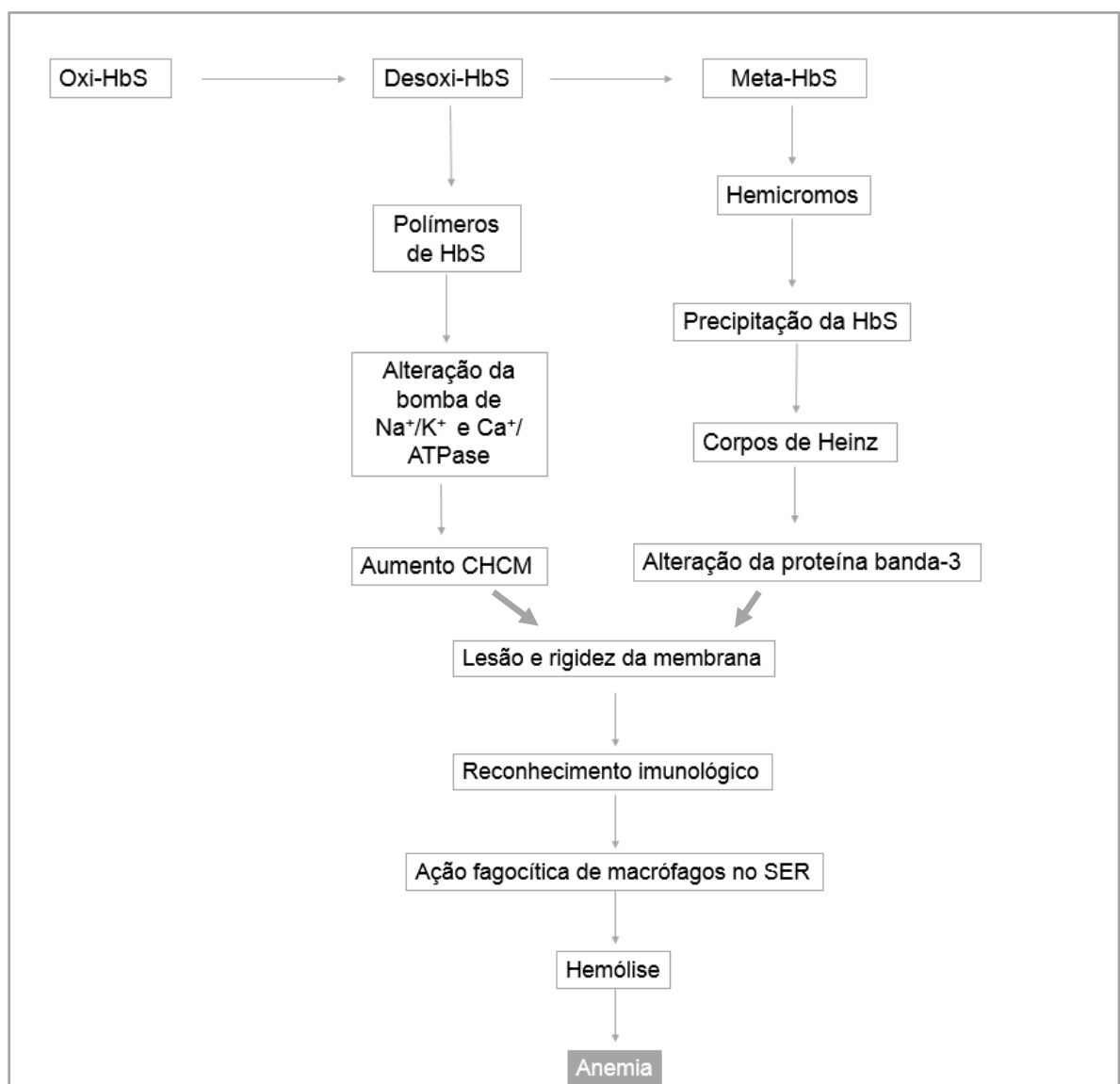
Em decorrência das alterações de membrana, do aumento do CHCM e polimerização de HbS, os eritrócitos são sequestrados e destruídos pelo sistema monocítico fagocitário. A ausência da anemia no nascimento, e seu início acompanhado da queda de hemoglobina fetal pós-natal com síntese de HbS, sugerem que a falcização é necessária para induzir as anormalidades que geram a destruição dos eritrócitos, além disso, muitas vezes durante o decorrer da vida de um mesmo paciente, há uma variação do grau anêmico, indicando que múltiplos mecanismos estão envolvidos neste processo hemolítico (GUALANDRO, 2002).

A hemólise ocorre por destruição tanto extra como intravascular, sendo menos predominante o meio intravascular, constituindo cerca de 1/3 da hemólise total, envolve lise eritrocitária complemento-induzidas, provavelmente causadas pela própria fragmentação celular decorrente do curso da doença. No entanto, a mais frequente é a hemólise que ocorre por meios extravasculares, desencadeada por reconhecimento e fagocitose dos eritrócitos que sofreram falcização e/ou lesão oxido-induzida da membrana celular (GUALANDRO, 2002).

Em virtude do processo de desoxigenação sofrido pela HbS, há o favorecimento da metahemoglonização da mesma, elevando suas concentrações, e tornando a ação da enzima meta Hb-redutase insuficiente, isso irá gerar a formação

de hemicromos e precipitação de hemoglobina S sob formato de corpos de Heinz, isso causa por sua vez, o desalinhamento da banda-3 da membrana celular eritrocitária. Estes eritrócitos que foram falcizados e com alterações estruturais em sua membrana, alteram sua distribuição de Imunoglobulinas G (IgG) em suas superfícies, causando um aumento de concentração das mesmas, facilitando a ligação de com receptores Fc de células endoteliais, e assim induzem a ação fagocitária de macrófagos do reticulo endotelial (SRE), culminando em quadros de hemólise e posteriormente anemia, como visualizado no fluxograma a seguir (NAOUM, 2000).

Figura 4: Fluxograma sobre a sequencia de acontecimento na AF que levam a quadros de anemia e hemólise.



Fonte: Adaptado de (NAOUM, 2000).

A hemólise prematura das células acarreta em uma diminuição de hemoglobina e hematócrito, aumento de reticulócitos, de bilirrubina indireta e desidrogenase láctica (ZAGO; PINTO, 2007).

A clínica da anemia falciforme é muito variável existindo casos com óbitos prematuros e outros com expectativa de vida próximo ao normal, estimulando, então a busca por moduladores da doença (GUALANDRO, 2009).

A hemoglobina fetal, considerada o maior modulador da anemia falciforme, encontra-se em pouquíssima quantidade em indivíduos adultos (GUALANDRO, 2009). Os níveis de HbF são determinados geneticamente e a presença de pequenas elevações em sua concentração não acarretam em nenhuma manifestação clínica. Porém, na anemia falciforme, o aumento de HbF circulante, conhecido como persistência hereditária da hemoglobina fetal tem uma correlação positiva com a doença (ZAGO; PINTO, 2007).

A hemoglobina fetal elevada intervém tanto nos valores hematimétricos quanto nas características clínicas dos pacientes, culminando em menos crises vaso-oclusivas, diminuição do sequestro esplênico, e redução no número de transfusões e hospitalizações. Está atua inibindo a polimerização e consequentemente falcização dos eritrócitos, sendo assim, a concentração de HbF é uma proteção contra a anemia falciforme (MOUSINHO-RIBEIRO et. al., 2008).

A proteção proveniente dos altos níveis de hemoglobina fetal acontece devido a não interação desta com a hemoglobina S, sendo assim, inibe fenômenos de polimerização de HbS e a falcização sofridos pelos eritrócitos. Além disso, a presença de outras hemoglobinas como a hemoglobina F, A e A₂ reduzem a concentração intra-celular da hemoglobina S, portanto corroboram na proteção contra falcização, uma vez que, a formação dos polímeros é HbS concentração-dependente (MOUSSINHO-RIBEIRO et. al., 2008).

Esse aumento da concentração intracelular de HbF age diminuindo a incidência de determinados subfenótipos da doença, principalmente a viscosidade-vaso-oclusão (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

Em síntese, a forma clínica da doença cursa com anemia devido a menor sobrevivência dos eritrócitos, sendo, portanto, uma anemia hemolítica, na qual, observa-se o aumento da bilirrubina indireta, hiperplasia eritróide da medula óssea e elevação dos reticulócitos. Contudo, além da hemólise há outros fatores que

contribuem para o estabelecimento da doença como a carência de folato, insuficiência renal crônica, crises aplásicas e esplenomegalia (ZAGO; PINTO, 2007).

Em consequência da anemia algumas complicações podem ser visualizadas como o retardo da maturação sexual, sobrecarga cardíaca que com o passar dos anos evolui para uma insuficiência cardíaca e contribui diretamente para o desenvolvimento de úlceras nas pernas, sendo tais complicações vistas com maior frequência em homozigotos (ZAGO; PINTO, 2007).

Crises aplásicas afetam principalmente pacientes nos primeiros anos de vida, uma vez que são em grande maioria causadas devido a infecções por parvovirus, que detém a capacidade de parar temporariamente a eritropoese. Em indivíduos normais essa pausa não apresenta relevância clínica, porém, em pacientes falciformes contribui significativamente para agravar os quadros anêmicos (ZAGO; PINTO, 2007).

Uma de suas manifestações mais comum é a dor também sendo responsável por grande quantidade das hospitalizações envolvendo anemia falciforme, podendo ser acompanhada de febre ou não. A gênese da dor está baseada nos episódios de hipóxia tecidual e liberação de pirógenos endógenos. Essas crises dolorosas se apresentam com duração diferente entre os pacientes podendo ser transitória com duração de 5 a 10 minutos ou crises mais prolongadas que podem ter duração de horas ou dias. Em crianças menores de 5 anos ocorre a dactalite, que são as crises dolorosas nos pés e mãos, devido a necrose da medula óssea nas porções distais dos membros, muitas vezes é o primeiro sinal indicativo da doença (MARTINS; MORAES-SOUZA; SILVEIRA, 2010).

O sequestro esplênico é considerado uma complicação grave acarretando em queda abrupta de hemoglobina com possível evolução para choque hipovolêmico fatal se não tratado rapidamente pela equipe médica (MARTINS; MORAES-SOUZA; SILVEIRA, 2010).

O acidente vascular cerebral (AVC) se apresenta como uma das complicações mais graves da anemia falciforme e a principal causa de mortes em crianças com a doença (MARTINS; MORAES-SOUZA; SILVEIRA, 2010).

Dentre as complicações osteo-articulares nos pacientes com anemia falciforme observa-se necrose de cabeça de fêmur, artrite séptica, osteomielite e infarto ósseo, complicações estas provenientes da vaso-oclusão e degeneração dos vasos sanguíneos ósseos (MARTINS; MORAES-SOUZA; SILVEIRA, 2010).

Uma das complicações frequentemente encontradas nos adultos com AF são as úlceras de membros inferiores, que se apresentam de forma espontânea ou resultante de traumatismo (MARTINS; MORAES-SOUZA; SILVEIRA, 2010).

Dentro de um contexto hemoterápico torna-se relevante saber que os heterozigotos pra HbS ou portadores do traço falciforme possuem a hemoglobina S em um percentual que varia de 22 a 45% (SILVA; RAMALHO, 1997). E, portanto, raramente este genótipo está associado a manifestações clínicas e hematológicas significativas, uma vez que, a concentração de HbS dentro dos eritrócitos destes indivíduos é baixa, e, portanto, esses não sofrem o processo de falcização, sendo assim, não se apresentam com morfologia de eritrócitos alterados e, tempo de sobrevivência na circulação é o normal, ou seja, 120 dias. (TOMÉ-ALVES, 2000, ZAGO; PINTO, 2007). Os pacientes heterozigotos, portanto, levam uma vida normal, podendo apresentar qualquer sintoma quando submetidos a situações de baixa oxigenação, apenas. Assim sendo, muitos se tornam doadores de sangue, descobrindo somente da sua condição genética através dos serviços hemoterápicos, visto que, são realizadas triagens para as mesmas por parte de tais instituições, como preconizado na legislação (SILVA; RAMALHO, 1997).

4.4 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de hemoglobinopatias requer cuidado com a metodologia aplicada e com o grupo populacional a ser analisado considerando que em muitos casos as mutações são específicas de determinadas regiões e etnias (ORLANDO et. al., 2000).

A tecnologia adequada é de suma importância para um diagnóstico preciso e correto utilizando de diversos testes laboratoriais seletivos e confirmatórios, assim como, dados clínicos e histórico familiar (ORLANDO et. al., 2000).

O início da investigação laboratorial é feito por meio da análise morfológica das células, na qual espera-se encontrar: microcitose, hipocromia, pontilhado basófilo, eritroblastos, células falcizadas (drepanócitos), células em alvo, entre outras alterações. (ZANATTA; MANFREDINI, 2009).

A hemoglobina encontra-se entre 6 a 12g/dL sendo o valor de referência de 12 a 16g/dL para mulheres e 13 a 17g/dL para homens, portanto, em pacientes falcemicos a mesma encontra-se baixa, indicando anemia. O volume corpuscular

médio (VCM) é variável e menor que 110 fL, normalmente normocítico a levemente macrocítico, já a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em sua maioria é normal. O RDW (*Red Cell Distribution Width* - Larga distribuição de células vermelhas do sangue) se encontra elevado, visto que, este indica a porcentagem de anisocitose, ou seja, variação na forma das células. Também podem ser visualizados corpúsculos de Howell Jolly, pontilhado basófilo e alguns fragmentos de eritrócitos. A hipercromia nesses pacientes é explicada devido à perda excessiva de potássio em relação ao ganho de sódio das células, que resulta na perda de água para o meio extracelular e assim aumento da concentração de hemoglobina (OLIVEIRA, 2008).

O restante dos dados obtidos no hemograma, como leucócitos e plaquetas encontram-se elevadas. O primeiro frequentemente espera-se elevado em quadros hemolíticos e infecciosos e o segundo espera-se aumentado pela atrofia do baço, órgão responsável por armazenar aproximadamente um terço das plaquetas circulantes em situações fisiológicas (NETO; OLIVEIRA, 2004).

Os heterozigotos (HbAS) não apresentam características clínicas e seus achados hematológicos são considerados normais com níveis de hemoglobina variando de 13 a 15 g/dL e volume corpuscular médio (VCM) de 80 a 90 fL (GIOVALLI et. al.,2011).

No Brasil devido sua alta prevalência o diagnóstico de hemoglobinopatias passou a ser obrigatório por meio da criação do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) em 2001. O PNTN determina o diagnóstico das mesmas nos neonatos e de outras doenças tais como hipotireoidismo congênito, fenilcetonúria e fibrose cística. A mortalidade por infecções bacterianas ou por sequestro esplênico tem início após os dois ou três primeiros meses de vida comprovando a relevância de um diagnóstico precoce e a importância deste programa desenvolvido pelo Ministério da Saúde (FERRAZ; MURAO, 2007).

A falta de informação acerca da doença por parte da população, bem como dos profissionais da área da saúde, além do baixo nível socioeconômico são fatores determinantes para a deficiência na triagem neonatal em algumas regiões Brasileiras (SILVA, 2006). Durante o período de 1º de janeiro de 2004 a 26 de dezembro de 2006 nasceram no país 137.040 crianças, das quais apenas 116.271 sofreram os testes de triagem, demonstrando que uma parcela considerável da

população ainda não possui acesso a tais metodologias corroborando para a falta de tratamento, informação e aconselhamento genético no país. (DINÍZ et. al., 2009)

Em neonatos com hemoglobinopatias, sobretudo aquelas que envolvem mutação da cadeia β , os testes de triagem só encontrarão traços de hemoglobina variantes, sendo o perfil hemoglobínico característico só confirmado após o sexto mês de vida, em razão de que neste período é onde ocorre a diminuição de produção da cadeia gama, substituindo a hemoglobina Fetal pela hemoglobina A (FERRAZ; MURAO, 2007).

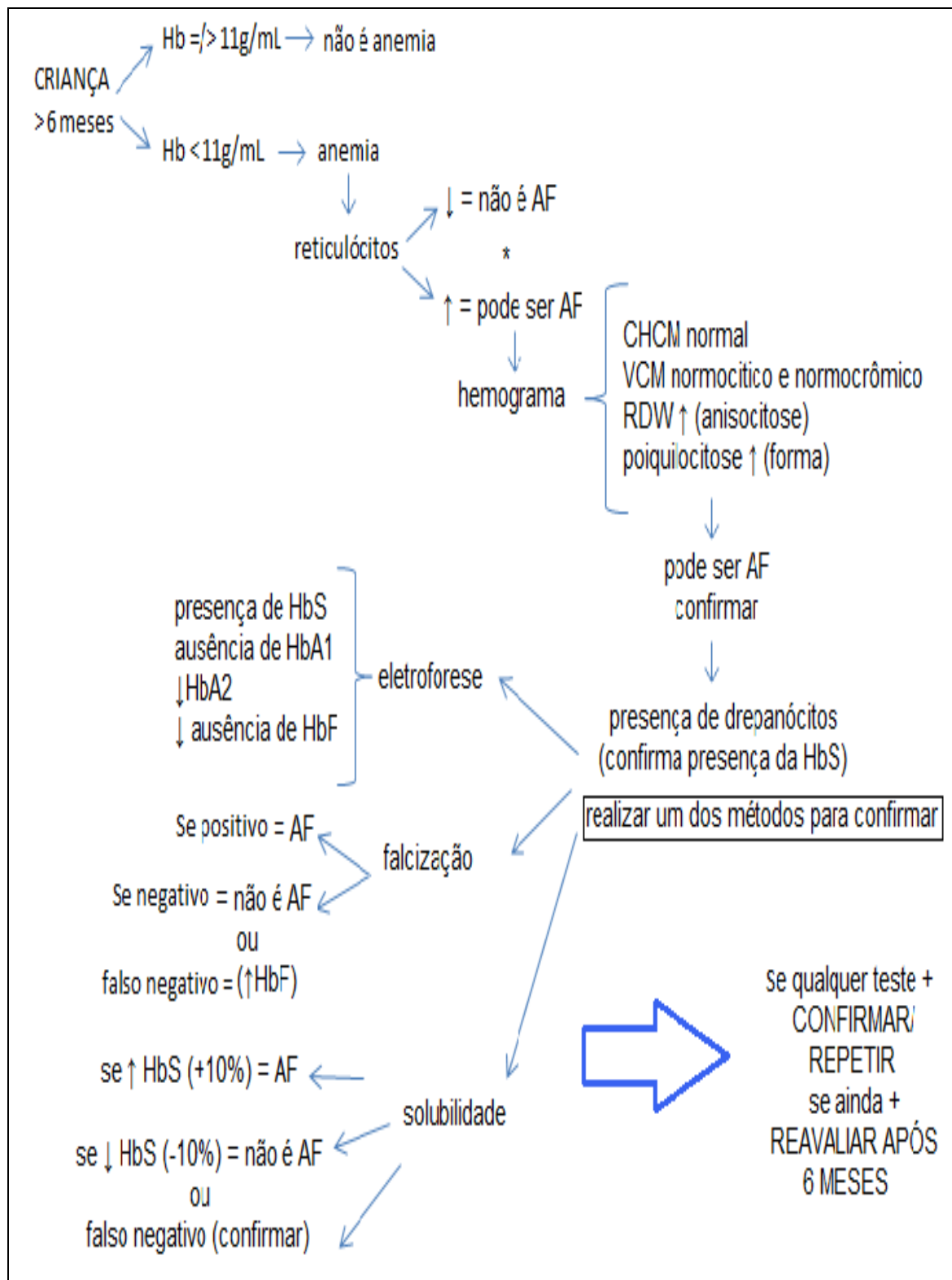
O recém-nascido é geralmente assintomático em consequência do efeito protetor da hemoglobina Fetal sobre a anemia falciforme, visto que a mesma representa 80% do total de hemoglobina circulante nesta fase de vida. Considerando a interferência da HbF no diagnóstico, os testes de solubilidade e falcização não são utilizados durante este período, havendo a necessidade de um teste mais sensível e com melhor custo-benefício. Inicialmente eram utilizados dois procedimentos eletroforéticos associados para confirmação diagnóstica, porém foi observado que as técnicas apresentam uma menor sensibilidade e difícil reprodução em larga escala. A partir dos problemas encontrados envolvendo o diagnóstico por eletroforese a maioria dos programas de triagem neonatal utiliza atualmente a associação de eletroforese por focalização isoeletrica e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) (FERRAZ; MURAO, 2007).

O Diagnóstico molecular tem sido empregado em exame pré-natal, utilizando amostras fetais do líquido amniótico, da vilosidade coriônica ou do plasma materno que através da técnica de PCR é possível fazer a amplificação do gene da β globina e análise de restrição (SONATI; COSTA, 2008).

Devido ao fato de portadores do traço falciforme raramente estarem associados com alguma manifestação clínica ou hematológica significativa, assim não apresentarem anemias, possuindo um caráter benigno, já foi relatado alguns pacientes que tiveram complicações e até mortes súbitas quando expostos a baixas tensões de oxigênio, voo em aviões despressurizados, extremos esforços físico, etc. No entanto, a maioria acaba passando a vida sem saber de sua condição, e por isso, tem grandes chances de procurarem um serviço de hemoterapia com a finalidade de doação de sangue, evidenciando mais uma vez a necessidade de um diagnóstico efetivo e uma triagem adequada. (SANTOS, 2014).

O Fluxograma a seguir demonstra uma sugestão para investigação laboratorial:

Figura 5: Fluxograma dos métodos de diagnóstico da anemia falciforme.



AF- Anemia falciforme, Hb-Hemoglobina, HbF- hemoglobina fetal, HbS- Hemoglobina S, HbA₁- Hemoglobina A1.

Fonte: Modificado de (GATINO; GÓZ, 2012).

4.4.1 Eletroforese

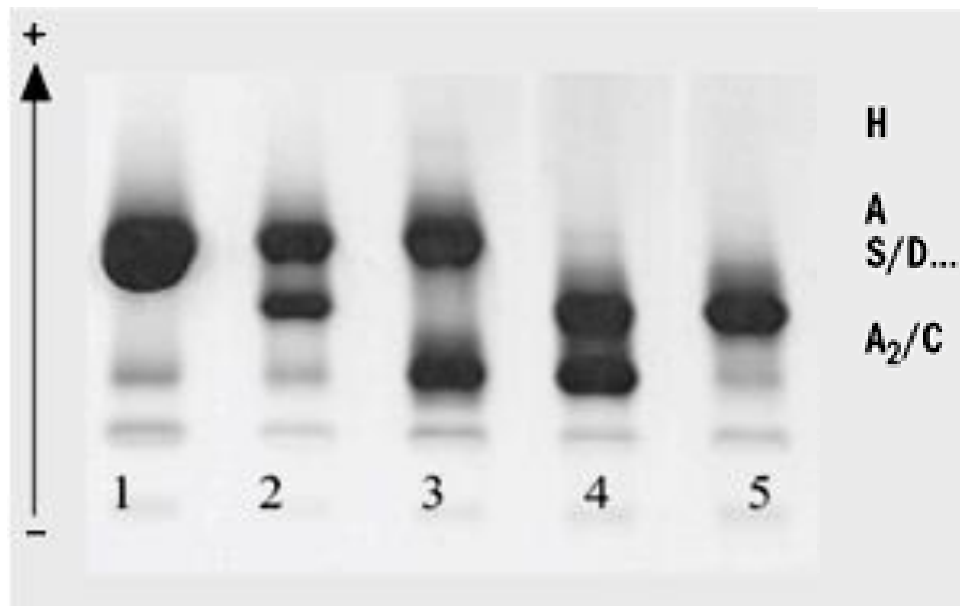
Como diagnóstico pode-se utilizar a eletroforese, podendo ser tanto alcalina em acetato de celulose, quanto eletroforese ácida em agarose, que por meio de um campo elétrico proporciona a separação da hemoglobina, uma vez que, por ser carregada negativamente migra para o polo positivo do gel, e como a HbS é oriunda de uma mutação, possui um padrão de migração diferente da Hb normal (ZANATTA; MANFREDINI, 2009).

A eletroforese em acetato de celulose é feita em pH 8 pois a hemoglobina é uma proteína carregada negativamente, migrando em direção ao polo positivo (ânodo). Essa metodologia é capaz de identificar tanto as hemoglobinas normais, quanto grande parte das variantes. As diferentes migrações observadas entre as distintas hemoglobinas com defeitos estruturais ocorrem devido a alterações de cargas elétricas, que provém de substituições de aminoácidos com pontos isoelétricos (pI) diferentes. As hemoglobinas variantes, oriundas de mutações que não envolvem alterações de cargas elétricas, geralmente apresentam mobilidade eletroforética semelhante a HbAA (ZANATTA; MANFREDINI, 2009).

A eletroforese alcalina em acetato de celulose é uma metodologia que deve ser utilizada como teste inicial para rastrear a presença da HbS, fazendo necessário o uso de outras metodologias para confirmação diagnóstica, uma vez que, existem hemoglobinas com migração semelhante (ZAMARO et. al., 2002).

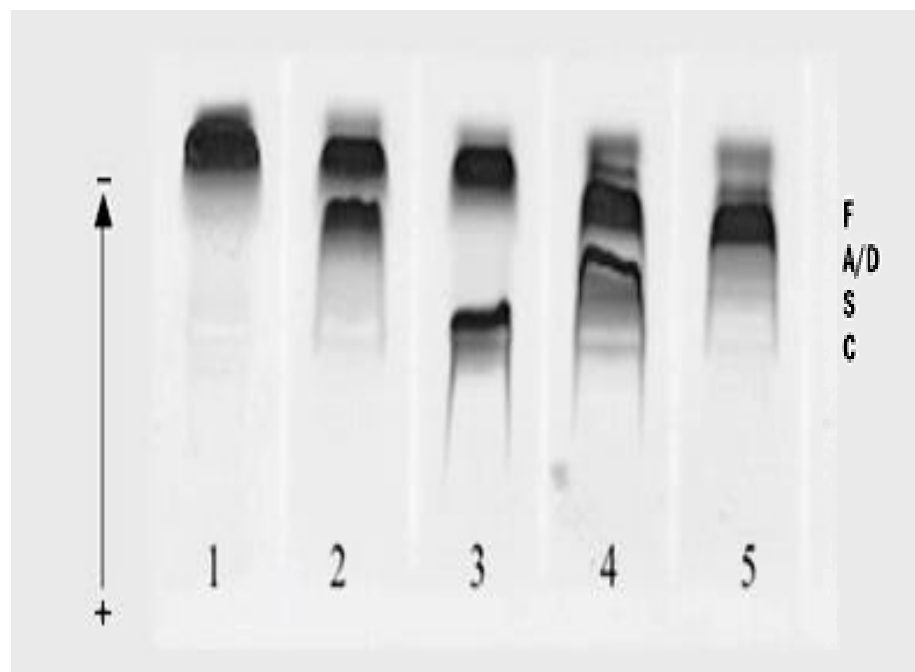
A eletroforese em pH ácido permite a diferenciação de algumas hemoglobinas, dentre elas, HbF, HbA, HbS e HbC, permitindo também a quantificação de HbF como pode ser visualizado na figura 5. Apesar da facilidade desta forma diagnóstica e de sua reprodutibilidade estes não fornecem uma identificação precisa devido ao processo de co-migração de formas semelhantes de Hb. (ZANATTA; MANFREDINI, 2009). As figuras a seguir exibem resultados de eletroforese em gel com pH alcalino e ácido.

Figura 6: Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, sendo representativo na coluna 1 HbAA, coluna 2 HbAS, coluna 3 HbAC, coluna 4 HbSC, e coluna 5 HbSS.



Fonte: (ZAMARO et al., 2002).

Figura 7: Eletroforese de hemoglobina em pH ácido, sendo representativo na coluna 1 HbAA, coluna 2 HbAS, coluna 3 HbAC, coluna 4 HbSC, e coluna 5 HbSS

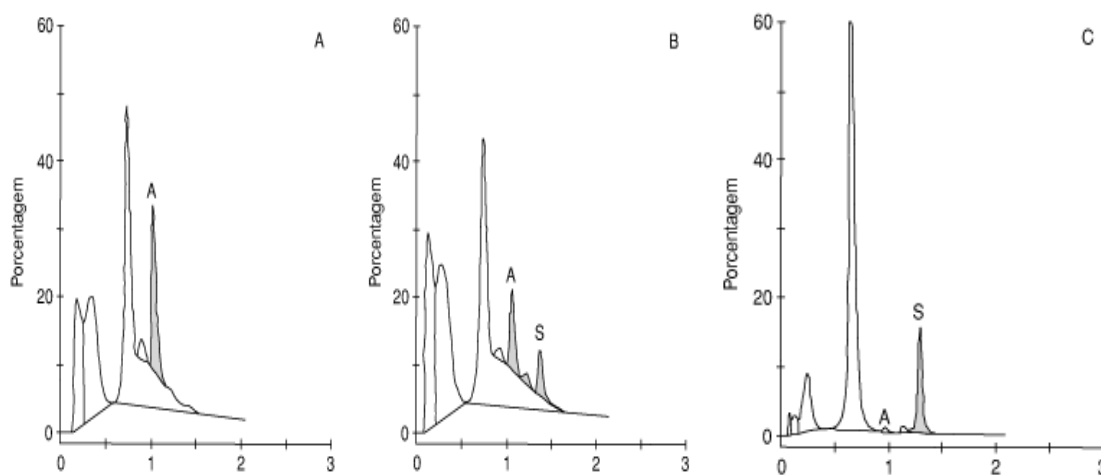


Fonte: (ZAMARO et al., 2002).

4.4.2 HPLC

A técnica de HPLC (cromatografia líquida de alta resolução) para detecção de hemoglobina S consiste em uma cromatografia de troca iônica em sistema fechado onde duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição com controles de gradientes pré-programados passam por meio de uma coluna analítica e um fotômetro de filtro de comprimento de onda duplo (415 e 690nm), monitorando a eluição da hemoglobina na coluna, detectando as alterações de absorbância a 415 nm. A alteração da absorbância é monitorada e representada em um cromatograma como visualizado na figura 6 no qual, é analisado o tempo de retenção de cada hemoglobina, este tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice e se dá de forma diferente para cada hemoglobina, sendo assim, torna-se possível determinar quais hemoglobinas estão presentes na amostra além de quantificá-las (BANDEIRA, 2006).

Figura 8: Perfil cromatográfico das hemoglobinas HbA em A, HbAS em B, e HbS em C.



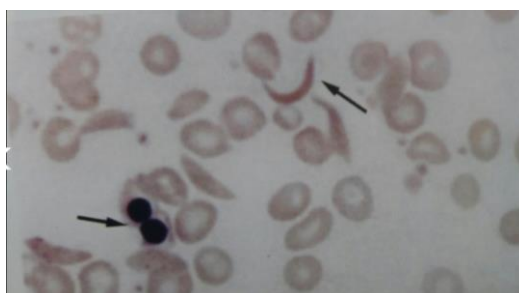
Fonte: (LOBO et al., 2003)

4.4.3 Falcização

O teste de falcização tem como princípio expor as hemácias à baixa tensão de oxigênio forçando sua falcização. Para realização desta metodologia utiliza-se metabissulfito de sódio com a finalidade de reduzir a tensão de oxigênio, sendo

assim, ocorre o preparo da solução com este diluente e a amostra do paciente para ser fixada com esmalte entre lamina e lamínula, e posteriormente analisada por microscopia, como na figura a seguir. (ZANATTA; MANFREDINI, 2009). Entretanto este teste só poderia ser efetuado como triagem uma vez que indica a presença de hemoglobina S, porém não faz distinção entre homozigose, heterozigose ou a concomitância com outras hemoglobinopatias (RUIZ, 1988).

Figura 9: Eritrócitos falciformes, e eritroblastos circulante em sangue periférico, corados por meio da coloração de Leishman.



Fonte: (LORENZI, 2006).

4.4.4 Solubilidade

O princípio do teste de solubilidade é a redução da hemoglobina S, em decorrência de sua insolubilidade em tampão orgânico permitindo assim, o discernimento das demais hemoglobinas que são solúveis em tampão inorgânico. A molécula de hemoglobina é um tetrâmero simétrico, durante a desoxigenação a cadeia β se desloca lateralmente, e devido ao meio conter ditionito de sódio os eritrócitos são lisados, liberando as hemoglobinas desoxigenadas e quando estas possuem a mutação irão turvar a solução. Esta metodologia apresenta boa sensibilidade, baixo custo e fácil execução, porém possuem algumas limitações que acarretam em resultados falsos negativos, tais quais quando associadas a outras hemoglobinas anormais, por exemplo, HbC Harlem e em casos de a amostra contiver baixas concentrações de HbS (PRUDENCIO; COVAS; BONINI-DOMINGOS, 2000).

A maioria dos interferentes, como por exemplo, outras doenças que culminam em resultados falsos, sejam estes resultados falsos positivos ou falsos negativos, inviabilizam também a doação de sangue, assim sendo, diminui os riscos de

resultados errôneo do teste solubilidade nos serviços de hemoterapia (PRUDENCIO; COVAS; BONINI-DOMINGOS, 2000).

Figura 10: Teste de solubilidade realizado em amostra normal (esquerda) e amostra com hemoglobina mutada (direita), onde é possível visualizar a turvação do meio somente no tubo que contém amostra com HbS.

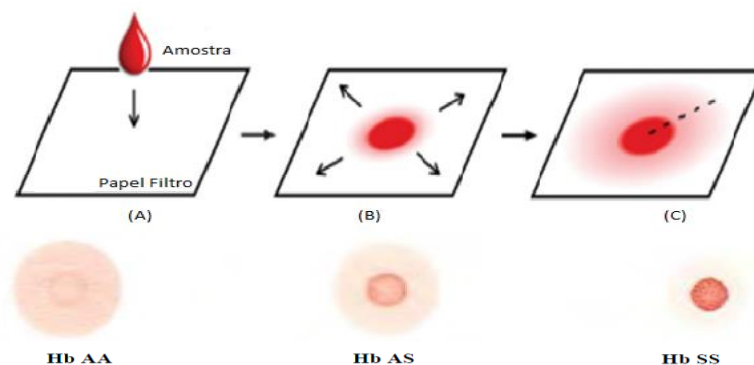


Fonte: (NAOUM, 1999).

4.4.5 PAPEL FILTRO

A técnica de papel filtro consiste em utilizar a solução de ditionito de sódio, já usada na rotina do banco de sangue, durante o teste de solubilidade. Esta solução contém saponina para lisar a membrana do eritrócito que libera hemoglobina na solução e na presença de ditionito de sódio torna-se desoxigenada, juntamente com um tampão fosfato, para que ocorra a polimerização da Hb e sua precipitação, esta solução então seria depositada no papel filtro conforme demonstrado na figura a seguir e a mancha de sangue resultante seria analisada (YANG et al.,2013).

Figura 11: Exemplificação da metodologia da técnica do papel filtro, em (A) é possível visualizar a inserção das amostras no papel, em (B) o processo de absorção da amostra pelo papel filtro, e em (C) o halo de absorção e padrões de resultados.



Fonte: (YANG et al.,2013, SANTOS,2014).

4.5 Efetividade das técnicas laboratoriais

Com o passar dos anos, e o aumento da necessidade de exames cada vez melhores para diagnosticar determinada doença, foi criada uma série de conceitos importantes a cerca do tema, um deles seria o de sensibilidade que mostra a capacidade que o teste possui para detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, logo, de fornecer um diagnóstico correto dos doentes. Também é importante o conceito de especificidade, que é a capacidade possuída pelo teste de detectar os indivíduos verdadeiramente negativos, logo, de fornecer um diagnóstico para pessoas saudáveis. Com tais conceitos pode-se avaliar de modo crítico o uso de uma ou outra técnica, estas comparações baseadas nestes e em outros tópicos foram feitas a fim de facilitar a escolha para o diagnóstico de HbS nos serviços hemoterápicos, em específico. No entanto, vale ressaltar que, não somente estes parâmetros são determinantes na escolha da metodologia, sendo também importante avaliar os custos, quantidade de amostras e efetividade para cada serviço em particular. (GUIMARÃES, 1985)

Hicks (1973) realizou um estudo comparativo para triagem de hemoglobinopatias, no qual, demonstrou que o teste de falcização possui uma sensibilidade de 97% e especificidade de 99,9% enquanto o método de solubilidade apresentou 98,9% de sensibilidade e 100% de especificidade já a eletroforese demonstrou 100% tanto em relação à sensibilidade quanto em relação a especificidade. Neste mesmo estudo também foi possível identificar a porcentagem de resultados falso-positivos e falso-negativos de cada técnica em questão, sendo que para o teste de falcização, teste de solubilidade e eletroforese, os percentuais de falso negativos foram 3%, 1% e 0% respectivamente e os percentuais de falso positivos foram 0,07% para o teste de falcização e 0% para os demais testes. Esses resultados demonstram que a eletroforese é tanto sensível quanto específica, já os testes de falcização e solubilidade são mais específicos que sensíveis.

Surve (2000) avaliou o teste de solubilidade na triagem de HbS que identificou 871 portadores da mutação dos 932 anteriormente detectados por HPLC e eletroforese, portando, a partir disso concluiu que a sensibilidade do teste de solubilidade era de 93,8% e especificidade de 100%, com valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 96,7%, e com esses resultados demonstrou que

a técnica é muito confiável na identificação não somente de homozigotos como também de heterozigotos entretanto ainda é passível de resultados falsos negativos.

Woitowicz e colaboradores (2010) que também realizaram uma comparação entre as metodologias de falcização e solubilidade obtendo resultados semelhantes ao dos estudos supracitados, no qual, verificaram a mesma quantidade de positividade entre as técnicas com a mesma eficiência.

Vale ressaltar que apesar dos resultados similares obtidos entre as técnicas de solubilidade e falcização estas apresentam diferentes aspectos relacionados à execução e interpretação que devem ser levados em consideração na escolha da metodologia que irá ser implementada no laboratório (WOITOWICZ et. al., 2010).

Segundo estudo realizado por Giovelli e colaboradores (2011) que teve por objetivo comparar três métodos de detecção de HbS em 4.108 doadores de sangue aptos que se apresentaram ao banco de sangue do HUSM, foi obtido por resultado entre os mesmos de 23 amostras positivas para presença de HbS por eletroforese quantitativa em gel de agarose com pH 9,5 enquanto o teste de solubilidade identificou 22 (95,6%) amostras positivas, sendo assim, concluíram que o teste de solubilidade apresentou um resultado falso-negativo o que corrobora com o estudos anteriores no quais afirmaram que a eletroforese é uma técnica mais sensível do que o teste de solubilidade para detecção de HbS. Na visão dos autores a eletroforese de hemoglobina demonstrou ser o melhor método, entretanto exige maior tempo de execução, devendo ser considerado quando se trata de triagem de banco de sangue pelo seu grau de sensibilidade, uma vez que esta minimiza resultados falso negativos e garante a qualidade e confiabilidade aos processos transfusionais, porém ao ser efetuada uma análise de custos o teste de solubilidade, e falcização tornam-se escolhas melhores em relação a eletroforese, visto que, o valor por exame é consideravelmente menor, além destes possuírem outras vantagens relacionadas a metodologia da técnica tais quais facilidade, praticidade e maior rapidez na execução (GIOVELLI et. al., 2011).

As vantagens e desvantagens entre os métodos utilizados para detecção de HbS estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1: Comparação entre as técnicas utilizadas para detecção de HbS.

Técnicas	Vantagens	Desvantagens
Teste de solubilidade	Menor custo, menor tempo de preparo e fácil treinamento profissional.	Inespecífico durante período neonatal (HbF), resultados falsos positivos e falso negativos, ineficaz na diferenciação de heterozigose e homozigose, teste manual, maior suscetibilidade para a troca de amostras (necessário cautela na identificação do tubo).
Teste de Falcização	Baixo custo, fácil execução.	Resultados falsos positivos e falsos negativos.
HPLC	Análisor automático, menor trabalho manual, menor tempo de execução, mais amostras analisadas, requer pouca quantidade de amostra.	Alto custo
Eletroforese ácida	Diferenciação das hemoglobinas A ₂ , C, O e E.	Consumo de tempo, migração de porções semelhantes, alto tempo de execução.
Eletroforese alcalina	Diferenciação de hemoglobina A, F e variantes frequentes (S e C).	Não diferencia hemoglobina A ₂ , C, O e E, alto tempo de execução.
Papel filtro	Baixo custo, metodologia simples, requer poucos equipamentos e reagentes.	Difícil manuseio em larga escala, rastreabilidade e logística.

Fonte: Adaptado de (DUARTE, 2012).

Dentre os diversos fatores que devem ser analisados para a escolha de uma metodologia encontram-se tempo de execução, automação, custo da técnica e mão de obra para sua execução. Em suma para detecção de HbS dentro de 5 metodologias, 3 são mais utilizadas sendo estas eletroforese, teste de solubilidade e falcização, porém, ainda pode ser feita a detecção por meio de HPLC, e técnica de papel filtro, usadas em menor frequência. (DUARTE, 2012) As metodologias de alto custo incluem HPLC, e eletroforese, sendo técnicas automatizadas, que necessitam de equipamentos específicos, com curto tempo de execução e necessidade de uma equipe técnica muito bem preparada para realização dos testes, dificultando sua empregação em grandes rotinas de serviços hemoterápicos, possuem também uma maior sensibilidade, quando comparadas as demais técnicas (MORAS, 2012). Por outro lado a automação das técnicas acarreta em uma diminuição na quantidade de técnicos para realização do teste.

O método de HPLC possui algumas vantagens quando comparado exclusivamente a técnica de eletroforese tanto para pH alcalino, quanto ácido, tais como: Maior sensibilidade e rapidez de execução para identificação de frações hemoglonínicas, além de quantificação e fornecimento de resultados qualitativos de Hb variantes presentes em pouca quantidade. Por outro lado, a eletroforese, é muito sensível também e possui um custo bem menor que o HPLC, justificando sua maior utilização. (PINHEIRO et. al., 2006)

Existem ainda, porém, metodologias que possuem um menor custo, levando vantagens quando comparadas aos métodos automatizados citados, como o teste de solubilidade, falcização e papel filtro, sendo este último pouco utilizado, são técnicas manuais, que exigem condições de aparelhagem bem mais simples, treinamento de equipe mais básico, tempo de execução menores, e principalmente valores reduzidos. Estudos anteriormente citados, mostram que os testes de solubilidade e falcização possuem resultados muito semelhantes quando feita uma análise visando sensibilidade e especificidade dos métodos, no entanto, a técnica de falcização necessita de uma prática bastante cautelosa para confecção de lâminas, assim como de um observador experiente para emissão do resultado, possui também um tempo maior de execução, levando no mínimo 1h e no máximo 24h para liberação de resultado final, quando comparada a técnica de solubilidade, que possui liberação imediata dos resultados obtidos, além disso, o teste de solubilidade necessita de uma preparação mais básica e menor experiência por parte da equipe

técnica para execução do método, além disso o teste é realizado com um maior número de amostras por vez quando comparada com a metodologia de falcização. Assim sendo, ambos são baratos, rápidos, sensíveis e específicos, tendo como maior distinção o modo de execução das técnicas. (WOITOWICZ et. al., 2010)

É preciso para um serviço hemoterápico, verificar qual sua necessidade de tempo, valores, disponibilidade de ambientes adequados, e mão de obra para escolher um método que contemple de modo satisfatório sua rotina. (WOITOWICZ et. al., 2010).

4.6 Proposta para utilização de bolsas HbA/HbS

A anemia falciforme encontra-se entre as doenças de cunho genético mais importante em termos epidemiológicos do Brasil e do mundo, necessitando de triagens e aconselhamento genéticos eficientes, no entanto, existem indivíduos que possuem apenas o traço falciforme (PRUDÊNCIO; COSTA; DOMINGOS, 2000), porém, devido ao fato dos mesmos com HbAS não possuírem sintomatologia e levarem vidas normais, muitos não sabem de sua condição e acabam se tornando doadores de sangue. (SILVA; RAMALHO, 1997). Em um serviço hemoterápico de São Paulo (COLSAN – Associação beneficente de coleta de sangue) estimasse que em torno de 1,4% dos concentrados de hemácia obtidos sejam provenientes de doadores que possuem traço falciforme¹.

Com o passar dos anos ocorreu um aumento na preocupação para garantir a segurança nos processos transfusionais, e, portanto, existe um maior rigor na seleção de doadores de sangue (BRENER et. al., 2008). Tal seleção é baseada em parâmetros legais, presentes na portaria 158 de 4 de fevereiro de 2016. Segundo a mesma, no artigo 142 encontra-se a permissão para utilização de hemocomponentes com hemoglobina S para pacientes que não possuam hemoglobinopatias, acidose grave e hipotermia.

Além disso, o concentrado de hemácia (CH) não poderá ser utilizado em transfusões intrauterinas, e procedimentos cirúrgicos com circulação extracorpórea.

¹ Informações concedidas pelo biólogo e gerente de laboratórios, Cristiano Costa, da COLSAN, São Paulo (SP).

A transfusão de concentrados de hemácias contendo hemoglobinas S pode acarretar em repercussões indesejadas, uma vez que existe a possibilidade de falcização das hemácias no receptor e também existe a possibilidade de ocorrer alterações do hemocomponente durante o processo de fracionamento e armazenagem (VIVAS et. al., 2006).

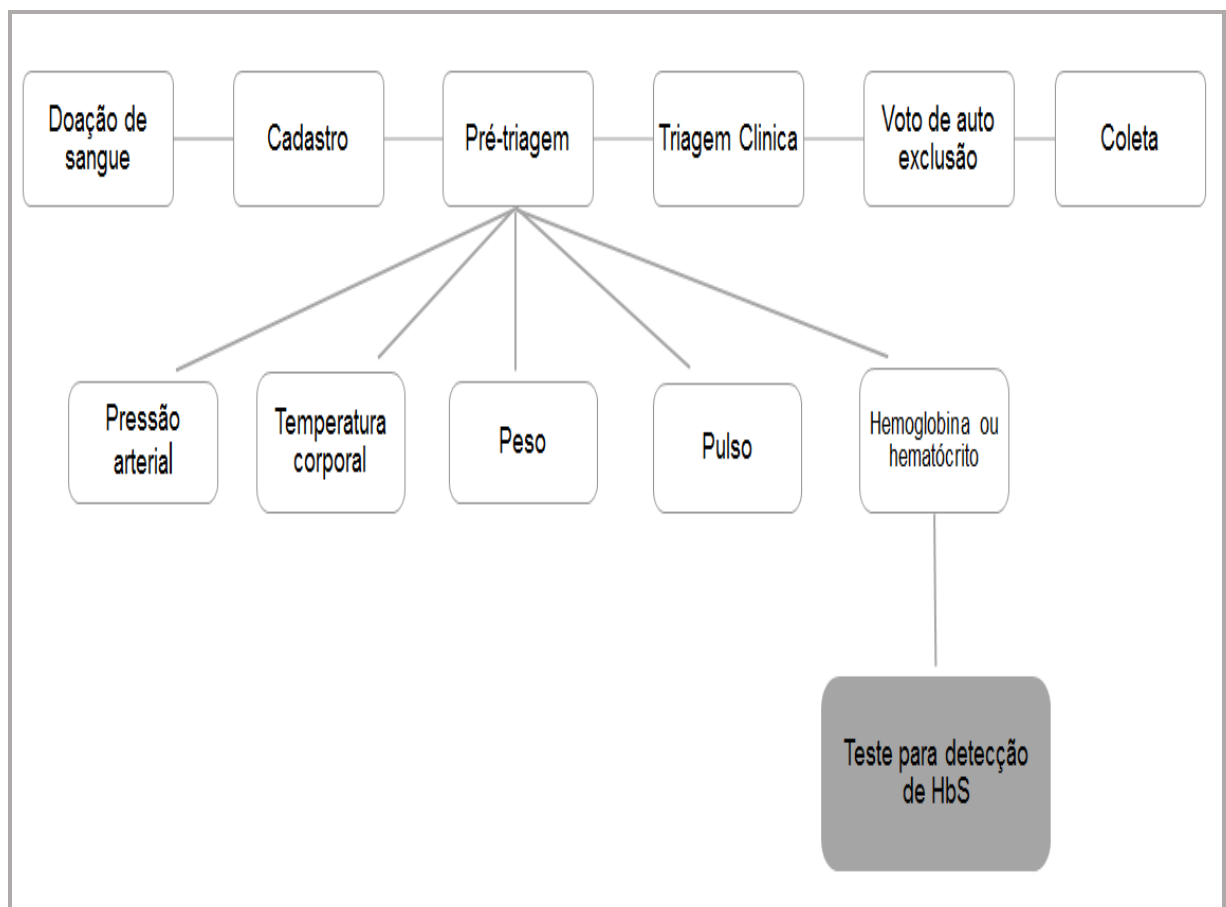
Morais et. al. (1985) verificou que as bolsas de sangue de doadores heterozigotos (HbAS) tendem a falcizar quando armazenadas em condições normais de banco de sangue, ou seja, de 4°C a 6°C $\pm$ 2°C, interferindo inclusive em seu período de estocagem, visto que bolsas HbAA dependendo da solução preservante, sendo bolsas CPDA validas por 35 dias e bolsas com SAGM validas até 42 dias. Porém, o fenômeno de falcização ocorre de forma precoce e já pode ser visualizado após 24h de armazenamento havendo um aumento progressivo quando comparado o primeiro ao vigésimo quinto dia de estoque. Representando mais um motivo de preocupação e cuidados que devem ser tomados com estas bolsas, além disso, é necessário que um maior número de estudos seja feito para fim de novas padronizações a cerca de uma estocagem correta e benéfica para este tipo específico de bolsa.

Porém, os demais pacientes que não apresentam nenhuma das especificidades citadas, poderão receber hemocomponentes com HbAS, isto dificulta a gestão e logística dos hemocentros que necessitam de uma rastreabilidade eficiente para respeitar as prerrogativas da lei, e para garantir a segurança transfusional dos receptores, a opção mais viável para muitos serviços é o desprezo destes CH, acarretando em uma série de transtornos financeiros.

A lei vigente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que determina o regulamento técnico para os procedimentos hemoterápicos, abrangendo desde a coleta do sangue até a transfusão do hemocomponente final, diz que não há necessidade de realizar o descarte das bolsas que tenham sido positivas para hemoglobina S, porém determina a obrigatoriedade do diagnóstico da condição genética por meios de métodos laboratoriais, pelo menos na primeira doação, e que seja feita a identificação no rótulo da mesma. Os serviços também são obrigados a comunicar sobre a condição genética do doador para o mesmo, e este pode voltar a doação, caso queira, não tendo nenhum artigo em específico que barre seu retorno. Este fato evidencia a necessidade de determinar a presença da hemoglobina S em um estágio inicial da doação, ou seja, durante a triagem juntamente com os outros

testes realizados (VIVAS et. al., 2006) como a determinação da concentração da hemoglobina e/ou do hematócrito usados para a seleção de candidatos à doação de sangue com o objetivo de detectar e excluir os mesmos que possuem anemia, assim sendo, pode-se considerar utilizar um teste de detecção de hemoglobina S durante a pré-triagem dos doadores como critério para doação. A figura 7 demonstra o melhor momento para tal realização, (CANÇADO et. al., 2007).

Figura 12: Fluxograma para doação de sangue com a sugestão de detecção de hemoglobina S durante a pré-triagem.



Fonte: arquivo próprio.

Os métodos diagnósticos para detecção da hemoglobina S atualmente abrangem técnicas como HPLC e eletroforese que necessitam de laboratórios clínicos bem equipados com a presença de instrumentos especializados, porém esses recursos não estão disponíveis em algumas situações justificando o uso de metodologias mais simples como o teste de solubilidade ou de papel filtro nas

triagens de doadores de sangue, sendo métodos, rápidos, baratos e que necessitam de um preparo relativamente fácil e básico por parte da equipe técnica (SANTOS, 2014). Deste modo desde o começo as bolsas com HbAS poderiam ser direcionadas para tratamento específico, determinado pelo serviço em particular, que atualmente apesar de já conterem a informação sobre a presença de hemoglobina S em seu rotulo ainda são armazenadas juntamente com as demais bolsas, dificultando a sua utilização e favorecendo a possibilidade de transfundir esta bolsa em pessoas que não poderiam recebe-la ou até mesmo barrar a doação neste momento.

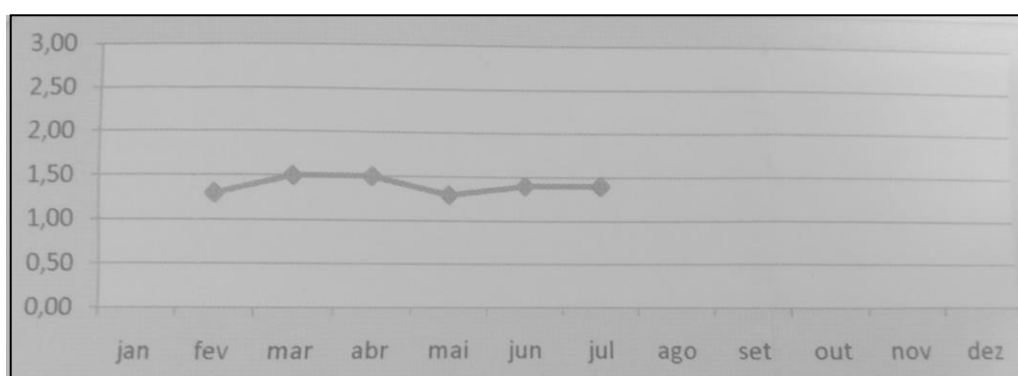
A presença de eritrócitos com HbS em doadores de sangue é significativa atingindo aproximadamente 2,4% como demonstrado em diversos estudos, já citados anteriormente. O artigo 35 da resolução vigente determina que a seleção de doadores possa ser realizada por meio de entrevista com profissional de saúde capacitado visando determinar se a coleta é segura para o doador, e se os hemocomponentes sanguíneos gerados a partir do sangue total coletado pode vir causar algum tipo de risco para o receptor, sendo assim, tendo em mente o dano que um concentrado de hemácias positivo para HbAS pode representar ao seus receptores nas situações determinadas não somente pela legislação como por estudiosos da área, seria interessante o doador ser informado que é portador de traço falciforme e orientado a não realizar a doação de sangue. Entretanto, no artigo 43 que define que a história médica e o antecedente patológico do doador, sejam avaliado segundo as doenças e antecedentes que contraindicam a doação nos anexos I e II, a presença do traço falciforme não está contemplada, portanto, a legislação deixa em aberto a escolha de aceitar ou não um doador com traço falciforme (BRASIL, 2016). De modo que fica a critério dos hemocentros realizarem tal escolha, existindo assim, a necessidade de analisar o custo e o benefício que essa doação de sangue trará ao serviço, tendo em vista que geralmente os hemocentros optam por descartar os concentrados de hemácias HbAS.

É de suma importância que seja levado em consideração a quantidade de doadores testados pelos hemocentros, sendo que, em rotinas numerosas é necessário um sistema extremamente eficiente de rastreabilidade da bolsa, tornando a utilização das mesmas muito dificultosa sob um olhar logístico. Por meio de informações concedidas pela COLSAN - Associação beneficente de coleta de sangue, é possível determinar a quantidade de bolsas desprezadas devido a presença de HbAS, durante o período de fevereiro a julho de 2016. Foram

produzidas neste intervalo de tempo, 75.256 CH e destes 1.051 (1,4%) foram descartados devido a positividade no teste de solubilidade, como pode ser visualizado, em detalhes, no gráfico abaixo.

Essas bolsas geram um custo para a empresa que envolve todo processo de coleta, transporte, armazenamento, fracionamento, exames sorológicos, imuno-hematológicos e a mão de obra dos funcionários, esses gastos, com cada bolsa, não possuem um retorno uma vez que estas são descartas somente na fase final do processo, acarretando em um prejuízo para o serviço.

Gráfico 1: Porcentagem de descarte de bolsa HbS no período de janeiro a julho de 2016.



Fonte: (COLSAN, 2016).

Porém, nos últimos anos uma série de análises feitas sobre um olhar bioético vem acontecendo, com intenção de proteger qualquer população específica de abusos que podem sofrer por alguma condição que possuam. No caso da anemia falciforme deve-se pensar em como tratar as informações genéticas que são obtidas tanto de um doente falciforme, como de um portador do traço falciforme, isto porque informações genéticas afetam em nível central a vida de um indivíduo, desde relações de parentesco, filiação, inserção no mercado de trabalho, adesão aos seguros de saúde, além de toda uma discriminação genética, e valores que envolvem sexo e fatores raciais. (GUEDES; DINÍZ, 2009). Dentro de um contexto hemoterápico, no qual trata-se especificamente da doação de sangue em portadores de traço falciforme, fica o questionamento se poderia ser feito por parte do serviço a exclusão deste doador devido sua condição genética, já que possui um respaldo legal, que permite tal ato. No entanto, a própria legislação preconiza que seja realizada uma análise médica no qual são avaliados os fatores de segurança para o

receptor, justificando a barragem da doação do mesmo, porém isto não está determinado em nenhum momento na legislação de modo que se torna extremamente complexo definir o que fazer com tal doação, tendo que se levar em conta fatores éticos, financeiros e de segurança transfusional.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do presente trabalho possibilitou o estudo da anemia falciforme, as técnicas de detecção laboratorial e o quanto o traço falciforme, muito presente na população brasileira, influencia os serviços de hemoterapia. Além disso, também permitiu uma pesquisa de campo para identificar o custo gasto em bancos de sangue com concentrados de hemácias contendo hemoglobina S e uma reflexão bioética sobre a triagem de doadores.

Como visto ao longo do trabalho existe uma prevalência muito alta de portadores do traço falciforme que são doadores em potencial, e que descobrem desta condição genética somente no estágio final de todo o fluxo da doação, portanto a um excesso de gastos desnecessários com coleta, transporte, armazenagem, fracionamento, exames sorológicos e imuno-hematológicos com essas bolsas que poderiam ser evitados se existisse uma triagem para hemoglobina S no momento da pré-triagem como sugerido ao longo do trabalho.

Além disso, como observado e consolidado por diversos estudos existe uma real necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre as técnicas de detecção de hemoglobina S para determinar qual seria a melhor metodologia, em relação ao custo-efetividade para ser aplicada nos centros de hemoterapia.

Dada à importância do assunto, torna-se necessário que um estudo de cunho prático seja feito, visando caracterizar as vantagens e desvantagens para implementação de um teste para detecção de hemoglobina S no momento da pré-triagem de doadores de sangue, e dentre os métodos vistos nesta revisão os que melhor se encaixam nesta etapa seriam o de papel filtro ou o método de solubilidade por serem técnicas que não necessitam de ambiente laboratorial equipado, porém ainda seria necessário uma avaliação para implementação da técnica na triagem com o intuito de verificar sua sensibilidade, especificidade e viabilidade da realização da mesma no início do processo, além de ponderações a respeito do impacto ético que isto causaria, visando não somente evitar custos desnecessários como garantir a segurança dos processos transfusionais. Sendo de boa prática, ter um fluxo próprio e sistema efetivo de rastreabilidade para tais bolsas, detectando a existência do traço desde o momento da coleta, podendo posterior a doação, ser realizada uma confirmação com outras técnicas, com fluxo de armazenamento (tempo e temperatura), processamento e transfusão diferenciados. Impedindo que haja

perdas financeiras e que os doadores se sintam lesados eticamente, de alguma forma. Em legislação não há nenhum tipo de impedimento com relação a tal implementação no fluxo de trabalho dos bancos de sangue, além disso, ao saber previamente sobre a presença do traço falciforme o serviço hemoterápico poderia sugerir logo de início ao doador procurar um aconselhamento genético, muito indicado nestes casos, com breves explicações sobre sua situação, visto que a maioria das pessoas são leigas no assunto, uma vez que é obrigatório por parte do serviço notificar dessa condição assim que descoberta. Se realizado na pré-triagem, o doador logo ao saber já teria um respaldo mais especializado, além disso os bancos de sangue poderiam contribuir grandemente com a atualização de saúde pública do país fornecendo dados constantes e atualizados sobre tal condição aos órgãos designadas para isso, ajudando o governo a pensar em melhorias para auxiliar tais pessoas. No entanto, ao reforça-se que seria necessário um estudo prático para que tais mudanças sejam efetivas, verificando qual o grau de modificações e treinamentos os serviços deveriam passar, para que de fato as vantagens sobre estes processos apareçam como previsto.

REFERÊNCIAS

ACEDO, Maria Júlia et al. Programa comunitário de hemoglobinopatias: abordagem populacional a partir de doadores de sangue de Bragança Paulista, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p.1799-1802, dez. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2002000600036>. Acesso em: 18 jul. 16.

ÂNGULO, Ivan Lucena. CRISES FALCIFORMES. **Medicina (ribeirao Preto. Online)**, São Paulo, v. 36, n. 2/4, p.427-430, 30 dez. 2003. Universidade de São Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v36i2/4p427-430>. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/757>>. Acesso em: 07 jun. 16.

ANVISA. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**. Brasília, 2002. 142 p. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/anvisa/diagnostico.pdf>>. Acesso em: 06 dez. 2015.

BANDEIRA, Flavia Miranda Gomes de Constantino et al. Diagnóstico da hemoglobina S: análise comparativa do teste de solubilidade com a eletroforese em pH alcalino e ácido no período neonatal. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v. 3, n. 3, p.265-270, set. 2003. FapUNIFESP (SciELO).

BANDEIRA, Flavia Miranda Gomes C et al . Triagem familiar para o gene HBB*S e detecção de novos casos de traço falciforme em Pernambuco. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 234-241, abr. 2008 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102008000200007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 16 set. 2016.

BANDEIRA, Flavia M. G. C. Triagem familiar ampliada para o gene da hemoglobina S. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v.28, n.2, p.161-162, Jun. 2006.

Brasil. Ministério da. Saúde. Portaria nº 158 de 4 de fevereiro de 2016. **Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos**. Brasília, DF; 2016.

BRENER, Stela et al. Fatores associados à aptidão clínica para a doação de sangue: determinantes demográficos e socioeconômicos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 30, n. 2, p.108-113, abr. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842008000200007>. Acesso em: 03 set. 16.

CANÇADO, Rodolfo D. et al. Avaliação laboratorial da deficiência de ferro em doadoras de sangue. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 2, p.153-159, jun. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000200014>. Acesso em: 03 set. 16.

DUARTE, Wellington Vali. **Análises das metodologias laboratoriais para o diagnóstico de anemia falciforme**. 2012. 35 f. Tese - Curso de Biomedicina, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2012. Disponível em: <http://repositorio.ucb.br/jspui/bitstream/10869/1629/1/Wellington_Vali_Duarte.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2016.

DINIZ, Debora et. al. Prevalência do traço e da anemia falciforme em recém-nascidos do Distrito Federal, Brasil, 2004 a 2006. **Cad, Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p188-194, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2009000100020> Acesso em: 29 ago. 2016.

FERRAZ, Maria Helena C.; MURAO, Mitiko. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p.218-222, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v29n3/v29n3a05.pdf>>. Acesso em: 10 maio 16.

FIGUEIREDO, Maria Stella. Fatores moduladores da gravidade da evolução clínica da anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p.215-217, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v29n3/v29n3a04>> Acesso em: 16 maio 16.

GIOVELLI, Letícia Loi et al. Estudo comparativo entre metodologias de triagem para detecção de hemoglobina S em bancos de sangue. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 2, p.137-140, abr. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442011000200007>. Acesso em: 15 abr.16.

GUALANDRO, Sandra F. M.; FONSECA, Guilherme H. H.; GUALANDRO, Danielle M.. Complicações cardiopulmonares das doenças falciformes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 29, n. 3, p. 291-298, Set. 2007 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300020&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 29 jul. 2016.

GUEDES, Cristiano; DINIZ, Debora. A ética na história do aconselhamento genético: um desafio à educação médica. **Rev. bras. educ. med.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 247-252, June 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-55022009000200012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 29 jul. 2016.

GUIMARÃES, Carolina S. Exames de laboratório: Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 2, n. 18, p.117-120, jun. 1985.

HEMORIO. **Protocolos de Tratamento: hematologia e hemoterapia**. Rio de Janeiro, 2014. 273p. Disponível em: < <http://www.hemorio.rj.gov.br/protocolo.pdf>>. Acesso em: 14 set. 16.

HELMAN, Ricardo; CANCADO, Rodolfo Delfini; OLIVATTO, Cristina. Incidência de aloimunização eritrocitária em pacientes com doença falciforme: experiência de um centro em São Paulo. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo , v. 9, n. 2, p. 160-164, June 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082011000200160&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 ago. 16.

HICKS, E. J. ; GRIEP, J. A.; NORDSCHOW, C. D. Comparison of Results for Three Methods of Hemoglobin S Identification. *Clin. Chem*, 19/5, 1973. p. 533-535.

JÚNIOR, José Francisco Comenalli Marques. Transusão de hemácias contendo hemoglobina S. **Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter**, Campinas, v. 16, n. 166, p.229-232, ago. 1994.

KATO, Gregory J.; GLADWIN, Mark T.; STEINBERG, Martin H.. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Reviews**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.37-47, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048670/>>. Acesso em: 15 ago. 16.

LIDANI, Kárita C. F.; BARROS, Rodrigo F.; BOVO, Fernanda. Relação entre prevalência da hemoglobina S e origem étnica de doadores de sangue no estado do Paraná. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 4, p.212-217, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1676-24442015000400212&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 25 jul. 16.

LOBO, Clarisse; MARRA, Vera Neves; SILVA, Regina Maria G.. Crises dolorosas na doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p.247-258, set. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842007000300011>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300011>. Acesso em: 12 jul. 16.

LOBO, Clarisse Lopes de Castro et al. Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro, Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2-3, p.154-159, mar. 2003. FapUNIFESP (SciELO).

MANFREDINI, Vanusa et al. A FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, [S.l.], v. 19, n. 1/2, p. 3-6, jan. 2013. ISSN 2318-9312. Disponível em: <<http://www.revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=216&path%5B%5D=204>>. Acesso em: 16 maio 2016.

MARTINS, Paulo Roberto Juliano; MORAES-SOUZA, Hélio; SILVEIRA, Talita Braga. Morbimortalidade em doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 32, n. 5, p.378-383, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Paulo_Martins21/publication/262518908_Morbidity-mortality_in_sickle_cell_disease/links/56cae6ad08ae1106370b371b.pdf>. Acesso em: 15 ago. 16.

MORAIS, Jandira Freitas. Falcização em concentrados de hemácia provenientes de doadores com hemoglobina armazenadas em condições normais de banco de sangue. **Rev. Med. Univ. Fed. Ceará**, Fortaleza, v. 25, n 1-2, p. 63-69,1985.

MORAES, Karen C. M.; GALIOTI, Jose B.. A doença falciforme: um estudo genético-populacional a partir de doadores de sangue em São José dos Campos, São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 32, n. 4, p.286-290, 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842010005000084>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000400004>. Acesso em: 25 jul. 16.

MOUSINHO-RIBEIRO, Rita de Cassia et al. Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 30, n. 2, p.136-141, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842008000200012>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842008000200012>. Acesso em: 20 jul. 16.

MURAO, Mitiko; FERRAZ, Maria Helena C.. Traço falciforme: heterozigose para hemoglobina S. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 29, n. 3, p. 223-225, Set. 2007 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 01 set. 16.

NAOUM, Paulo Cesar; BONINI-DOMINGOS, Claudia R.. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 226-228, Set. 2007. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151684842007000300007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 30 set. 15.

NAOUM, Paulo Cesar. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 22, n. 1, p.5-22, jan. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842000000100003>. Acesso em: 10 jul. 16.

NETO, Gentil Claudino de; PITOMBEIRA, Maria da Silva. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p.51-56, fev. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442003000100011>. Acesso em: 03 abr. 16.

OLIVEIRA, Maria Regina A. Azevedo; **Hematologia Básica: fisiopatologia e estudo laboratorial**. 4 ed. São Paulo: Luana, 2008. 480 p.

OLIVEIRA, Raimundo A.G.; NETO, Adelino P., **Anemias e Leucemias – conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais**. 1 ed. São Paulo: Roca, 2004. 421 p.

ORLANDO, Giselda M. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 22, n. 2, p.111-121, ago. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842000000200007>. Acesso em: 15 ago. 16.

PRUDÊNCIO, Brígida C. A. B.; COVAS, Dimas T.; BONINI-DOMINGOS, Claudia R.. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de Hemoglobina S (Hb S) em doadores de sangue. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 22, n. 2, p.99-109, ago. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842000000200006>. Acesso em: 17 jul. 16.

PINHEIRO, Luciano Silveira et al . Prevalência de hemoglobina S em recém-nascidos de Fortaleza: importância da investigação neonatal. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 2, p. 122-125, fev. 2006. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032006000200008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 04 set. 2016.

RUIZ M.A., ANGELA I. Proposta de um protocolo para portadores de doença falciforme. Boletim. 1988; 10:183-190.

SANTOS, Elen Gonçalves dos. **Desenvolvimento de uma metodologia rápida e de baixo custo para diagnóstico da Anemia Falciforme**. 2014. 147 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Tecnologia Nuclear - Materiais, Autarquia Associada À Universidade de São Paulo, São Paulo 2014. Disponível em: <http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Elen_Goncalves_dos_Santos_D.pdf>. Acesso em: 20 maio 2016.

SANTOS, Jean Leandro dos; CHIN, Chung Man. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 783-790, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000400025&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 01 set. 2016.

SILVA, José Edson Paz da; GIOVELLI, Letícia Loi. TRAÇO FALCIFORME: UMA VISÃO PARA OS CENTROS DE HEMOTERAPIA. **Revista Saúde**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p.23-28, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v39n1/v39n1a10>>. Acesso em: 15 abr. 16.

SILVA, R.B.P.; RAMALHO, A.S. Riscos e benefícios da triagem genética: o traço falciforme como modelo de estudo em uma população brasileira. **Cad. Saúde Pública**, v. 13, p. 285-94, 1997.

SILVA, Wellington dos Santos et. al. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 12, p. 2561-2566, Dec. 2006. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2006001200006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 07 ago. 2016.

SONATI, Maria de Fátima; COSTA, Fernando Ferreira. Genética das doenças hematológicas: as hemoglobinopatias hereditárias. **J. Pediatr. (Rio J.)**, Porto Alegre, v. 84, n. 4, supl. p. S40-S51, ago. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572008000500007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 04 ago. 2016.

SURVE, R. R; MUKHERJEE, M. B.; KATE, S. L.; NAGTILAK, S. B.; WADIA, M.; TAMANKAR, A. A.; GHOSH, K.; COLAH, R. B.; MOHANTY, D. Detection of the beta s gene: an evaluation of the solubility test against automated chromatography and hemoglobin electrophoresis. **Br J Biome Sci** 2000; 57:292-294.

TOME-ALVES, Renata et al . Hemoglobinas AS/alfa talassemia: importância diagnóstica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 22, n. 3, p. 388-394, Dec. 2000 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151684842000000300005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 01 set. 15.

TORRES, Felipe R.; BONINI-DOMINGOS, Claudia R.. Hemoglobinas humanas: hipótese malária ou efeito materno? **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 27, n. 1, p. 53-60, Mar. 2005 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842005000100013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 14 jul. 16.

VIVAS, Wanessa L. P. et al. Heterozigose para hemoglobinopatias em doadores de sangue do Centro de Hemoterapia de Sergipe. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 28, n. 4, p.284-287, dez. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842006000400013>. Acesso em: 27 jul. 16.

V. HOFFBRAND, P. A. H. MOSS. **Fundamentos em Hematologia**. 6º ed. Rio de Janeiro, Artmed, 2013.

YANG, Xiaoxi et. al. A simple, rapid, low-cost diagnostic test for sickle cell disease. **Lab On A Chip**, New Orleans, p.1464-1467, fev. 2013.

WOITOWICZ, Erika Janz et al. TRAÇO FALCIFORME: ESTUDO COMPARATIVO DE TÉCNICAS LABORATORIAIS UTILIZADAS PARA A TRIAGEM DA DOENÇA. **Va**, Curitiba, v. 11, n. 2, p.74-79, 31 dez. 2010. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/academica/article/view/21371/14091>>. Acesso em: 22 ago. 16.

ZAGO, Marco Antonio; PINTO, Ana Cristina Silva. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 29, n. 3, p. 207-214, set. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300003&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 25 maio 2016.

ZAMARO, Paula Juliana Antoniazzi et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à HbS. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p.261-266, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442002000400003>. Acesso em: 22 jul. 16.

ZANATTA, Talita; MANFREDINI, Vanusa. Comparação entre métodos laboratoriais de diagnóstico de Doenças Falciformes. **NewsLab**, São Paulo, v. 94, p.180-194, jan. 2009. Disponível em: <<http://docplayer.com.br/3569887-Comparacao-entre-metodos-laboratoriais-de-diagnostico-de-doencas-falciformes.html>>. Acesso em: 23 jul. 16.