

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Lara da Silva Moraes

**PRINCIPAIS MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO
DE β TALASSEMIAS**

São Paulo

2019

Lara da Silva Moraes

**PRINCIPAIS MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO
DE β TALASSEMIAS**

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

São Paulo

2019

Lara da Silva Moraes

**PRINCIPAIS MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO
DE β TALASSEMIAS**

São Paulo, 21 de novembro de 2019.

Professor Orientador – Prof^a Dr^a Juliana Vieira dos Santos Bianchi

Professor Examinador – Prof^a Leila Jaldim Borracha Gonçalves

São Paulo

2019

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me proporcionado chegar até aqui com saúde, determinação e coragem.

À minha família, por todo apoio, amor, incentivo e paciência durante todos esses anos de faculdade. Sem vocês não seria possível ter ido tão longe.

Às minhas amigas Gabriela e Jenyffer, que acompanham meu crescimento pessoal e profissional desde muito cedo e sempre torceram por mim.

Aos meus colegas da faculdade, em especial a Maria Vitória e Leandro, que desde o princípio me acolheram e tornaram esses quatro anos mais leves e divertidos.

À professora Juliana, por ter orientado meu trabalho e me apresentar áreas que eu mais me identifiquei durante o curso. Sou grata por ter você como exemplo de profissional e pessoa.

Aos professores e ao Centro Universitário São Camilo, que fizeram a grande diferença na minha formação e com toda certeza, eu não teria feito escolha melhor.

RESUMO

As talassemias são hemoglobinopatias que acometem milhões de pessoas em todo o mundo e tem como causa diferentes mutações no DNA que levam a deficiência na síntese de cadeias de globina. Quando acometida a síntese de α globinas, denomina-se como α talassemia e de β talassemia quando acometida a síntese de β globinas. A gravidade dessas doenças está relacionada com a quantidade de cadeias de globinas produzidas e as cadeias residuais produzidas em excesso. Devido à heterogeneidade clínica e genética, além da avaliação do histórico do paciente, é de extrema importância que sejam realizados alguns métodos de diagnóstico para a investigação das diferentes formas da doença, e que sejam empregadas as medidas necessárias para garantir uma melhor qualidade de vida para o paciente. Em geral, o início da investigação laboratorial se dá pelo hemograma completo, em que se deve observar se há alteração na morfologia eritrocitária, diminuição dos índices hematimétricos e o aumento de reticulócitos. Em seguida, podem ser feitos diversos testes baseados em proteínas, como a eletroforese de hemoglobinas, focalização isoelétrica e cromatografia líquida de alta performance (HPLC), além de testes moleculares para detectar a mutação quando houver necessidade de investigação. Cada método de diagnóstico tem sua particularidade, vantagem e desvantagem, e a escolha do método deve ser de acordo com a demanda e complexidade de cada serviço.

Palavras chave: diagnóstico, globinas, hemoglobinopatias, talassemia, talassemia beta.

ABSTRACT

Thalassemias are hemoglobinopathies that affect millions of people worldwide and are caused by different DNA mutations that lead to deficiency in the synthesis of globin chains. When α globin synthesis is affected, it is called α thalassemia and β thalassemia when β globin synthesis is affected. The severity of these diseases is related to the amount of globin chains produced and the excess chains produced. Due to clinical and genetic heterogeneity, as well as the assessment of the patient's history, it is extremely important that some diagnostic methods be investigated to investigate the different forms of the disease, and that necessary measures are taken to ensure a better quality of life for the patient. In general, the beginning of the laboratory investigation gives the complete blood count, and should observe whether there are changes in erythrocyte morphology, rates of hematimetric indices and reticulocyte increase. Several protein-based tests can then be performed, such as hemoglobin electrophoresis, isoelectric focusing and high performance liquid chromatography (HPLC), as well as molecular testing to detect a mutation when further investigation is needed. Each diagnostic method has its particularity, advantage and disadvantage, and the choice of method should be according to the demand and complexity of each service.

Key words: diagnosis, globins, hemoglobinopathies, thalassemia, beta thalassemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Molécula de hemoglobina	14
Figura 2 – Clusters do gene de globina nos cromossomos 16 e 11 e síntese de cadeias individuais na globina na vida pré e pós-natal	16
Figura 3 – Distribuição global dos distúrbios de hemoglobina, em termos de nascimentos de bebês afetados a cada 1.000 nascimentos	18
Figura 4 – Classificação das α talassemias	21
Figura 5 – Classificação das β talassemias	22
Figura 6 – Patologia molecular e celular da β talassemias	23
Figura 7 – Diferenciação entre a deficiência de ferro e a talassemia minor pelo RDW	31
Figura 8 – Extensão sanguínea de paciente com β talassemia intermediária	32
Figura 9 – Extensão sanguínea de paciente com β talassemia intermediária	33
Figura 10 – Extensão sanguínea de paciente com β talassemia major	35
Figura 11 – Extensão sanguínea de paciente com β talassemia major	35
Figura 12 – Radiografia de crânio de paciente com talassemia major	36
Figura 13 – Alterações ósseas em crianças com β talassemia major	36
Figura 14 – Eletroforese de hemoglobinas	41
Figura 15 – Etapas iniciais da focalização isoelétrica	42
Figura 16 – Mobilidades de diferentes hemoglobinas em matriz de focagem isoelétrica	43
Figura 17 – Resultado de HPLC na separação de hemoglobinas	45
Figura 18 – Fluxograma para diagnóstico de β talassemias	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Nascimentos anuais de indivíduos com hemoglobinopatias importantes em milhões em diferentes países	18
Quadro 2 - Algumas mutações que causam talassemia β , segundo sua localização na molécula, o defeito que provocam e o resultado na síntese de globinas	26
Quadro 3 – Principais categorias das talassemias β	29
Quadro 4 – Alterações clínicas e hematológicas na β talassemia	37
Quadro 5 – Várias técnicas utilizadas para o diagnóstico de distúrbios da hemoglobina	49

LISTA DE SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
BPG	Bisfosfoglicerato
CHCM	Concentração Da Hemoglobina Corpuscular Média
dntps	Desoxirribonucleotídeos Trifosfato
ddntps	Didesoxirribonucleotídeos Trifosfato
DFO	Desferroxamina
DGGE	Eletroforese Em Gel Com Gradiente De Temperatura
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
EROs	Espécies Reativas De Oxigênio
EUA	Estados Unidos Da América
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HPLC	Cromatografia Líquida De Alta Performance
PCR	Reação Em Cadeia Da Polimerase
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
RDW	Amplitude De Distribuição Dos Glóbulos Vermelhos
RFLP	Polimorfismo De Comprimento De Fragmentos De Restrição
RNA	Ácido Ribonucleico.
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
VCM	Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
3 METODOLOGIA.....	13
4 DESENVOLVIMENTO	14
4.1 Hemoglobina	14
4.2 Hemoglobinopatias.....	17
4.3 β Talassemia	22
4.3.1 Aspectos moleculares	24
4.3.2 Classificação clínica e molecular.....	27
4.3.3 Quadro clínico e diagnóstico laboratorial	29
4.3.4 Métodos laboratoriais baseados em proteínas.....	38
4.3.4.1 Eletroforese de hemoglobinas.....	39
4.3.4.2 Focalização isoelétrica	41
4.3.4.3 Cromatografia líquida de alta performance	43
4.3.5 Métodos laboratoriais moleculares.....	45
4.3.6 Custo-efetividade dos métodos realizados para diagnóstico de β talassemias	47
4.3.7 Tratamento	50
4.3.8 Aconselhamento genético	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias são desordens hereditárias que acometem milhares de pessoas em todo o mundo, atingindo mais de 7% da população mundial. São doenças de caráter genético e estão relacionadas à síntese das cadeias de globina das moléculas de hemoglobina presentes nos eritrócitos. Essas doenças são originadas a partir de diferentes mutações que podem alterar de forma qualitativa ou quantitativa a síntese das hemoglobinas, como exemplo, podemos citar a anemia falciforme e as talassemias, respectivamente (TEIXEIRA, 2014).

As talassemias são caracterizadas pela redução na síntese de uma ou mais cadeias de globinas que formam o tetrâmero de hemoglobina. Dependendo da mutação, pode ser alterada a síntese de cadeias α , β , δ ou γ , e assim, podemos classificar as alterações de acordo com a cadeia deficiente. A β talassemia é caracterizada pela diminuição ou ausência da síntese das cadeias β (MARTINS, 2010).

A grande variabilidade genética e as diferentes manifestações clínicas permitiram que a β talassemia fosse classificada em diferentes formas clínicas. Sendo assim, ela pode ser classificada como β talassemia major nos casos em que há ausência na produção de cadeias β , ou então pode ser classificada como β talassemia minor quando a diminuição na síntese de cadeias β é pouco reduzida. Ainda, é possível classificá-la como β talassemia intermediária, nos casos em que são encontrados fenótipos clínicos intermediários entre a minor e a major (MARTINS, 2010).

Por se tratar de uma doença genética, há uma grande heterogeneidade clínica e é necessária uma investigação laboratorial para identificação das diferentes formas desta doença para que o paciente seja direcionado para uma melhor forma de tratamento e tenha um aumento na expectativa de vida (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 2007).

Para a correta identificação da hemoglobinopatia é importante que seja feito um passo a passo, inicialmente pela história clínica do paciente, seguido por uma avaliação hematológica por meio de um hemograma completo. Em seguida, devem ser realizados testes analíticos baseados em proteínas, como eletroforese de

hemoglobinas, focalização isoelétrica, cromatografia líquida de alta performance, e ainda, podem ser realizados até testes moleculares para identificação da mutação. Dessa forma, é possível descartar outras possíveis doenças e chegar ao diagnóstico correto para esses pacientes (LAVOURAS, 2015).

No presente trabalho serão abordados os diferentes métodos utilizados para a triagem e diagnóstico das β talassemias e suas particularidades, além de propor a ordem para realização de cada método para um diagnóstico correto.

2 OBJETIVOS

Elaborar uma revisão bibliográfica abordando aspectos relacionados à classificação e métodos de diagnóstico das β talassemias.

3 METODOLOGIA

Para realização deste trabalho foi realizada uma revisão bibliográfica nas bases de dados do Pubmed e Google Acadêmico. Além disso, a pesquisa se estendeu a mais de dez livros do acervo do Centro Universitário São Camilo nas áreas de hematologia básica e clínica, patologia, biologia molecular e técnicas laboratoriais. Foram utilizados cerca de vinte artigos, dissertações e teses, sendo todos os materiais na língua portuguesa e/ou inglesa, sem restrição de data para inclusão.

Dentre as palavras-chave utilizadas incluem-se: hemoglobinopatias, talassemias, diagnóstico das talassemias, β talassemia, eletroforese de hemoglobinas, HPLC, tratamento das β talassemias, triagem neonatal das hemoglobinopatias, classificação das β talassemias e entre outras.

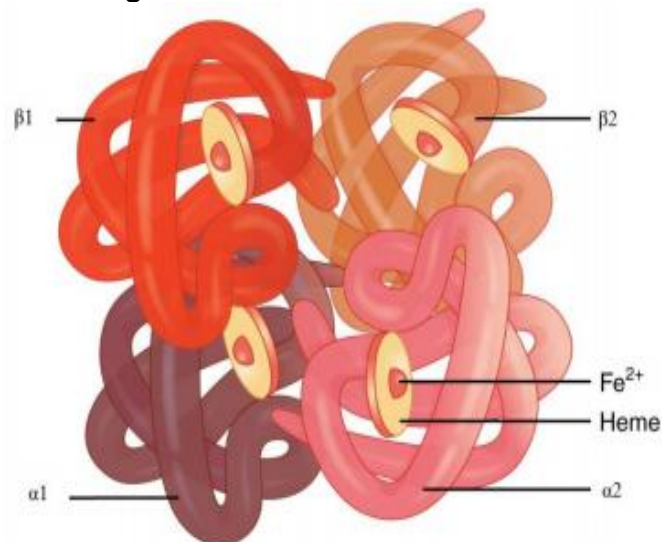
4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma proteína especializada encontrada no interior dos eritrócitos, com a função de realizar o transporte de oxigênio aos tecidos e o retorno de dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões. Como podemos observar em sua representação na figura 1, a molécula de hemoglobina possui quatro cadeias polipeptídicas, chamadas de globina, que variam geneticamente e são agrupadas a um grupo prostético, chamado de grupo heme, formado por um átomo de ferro em uma estrutura porfirínica responsável por se associar ao oxigênio (HOFFBRAND, 2013).

Em adultos saudáveis, existem três tipos de hemoglobina: HbA, HbA2 e HbF. A HbA é a principal hemoglobina presente no adulto, com sua parte proteica composta por quatro cadeias, sendo duas delas formadas por α globinas com 141 aminoácidos e duas formadas por β globinas, com 146 aminoácidos; A HbF é composta por duas cadeias α e duas cadeias γ e a HbA2 é formada por duas cadeias α e duas cadeias δ (SILVA; RIBEIRO NETO, 2013).

Figura 1 – Molécula de hemoglobina



Fonte: Lavouras, 2015.

A afinidade da hemoglobina ao oxigênio depende de diversos fatores como pressão de oxigênio, pH e 2,3 bisfosfoglicerato (BPG). A partir da diferença de pressão de oxigênio ocorre a liberação de oxigênio para os tecidos, levando ao

afastamento das cadeias de globina e permitindo a entrada de 2,3 BPG, resultando em uma deoxi-hemoglobina. Já nos pulmões, a ligação com o oxigênio leva a uma aproximação das cadeias e expelle-se o 2,3 BPG da molécula, deixando a molécula com maior afinidade pelo oxigênio (AZEVEDO, 2013).

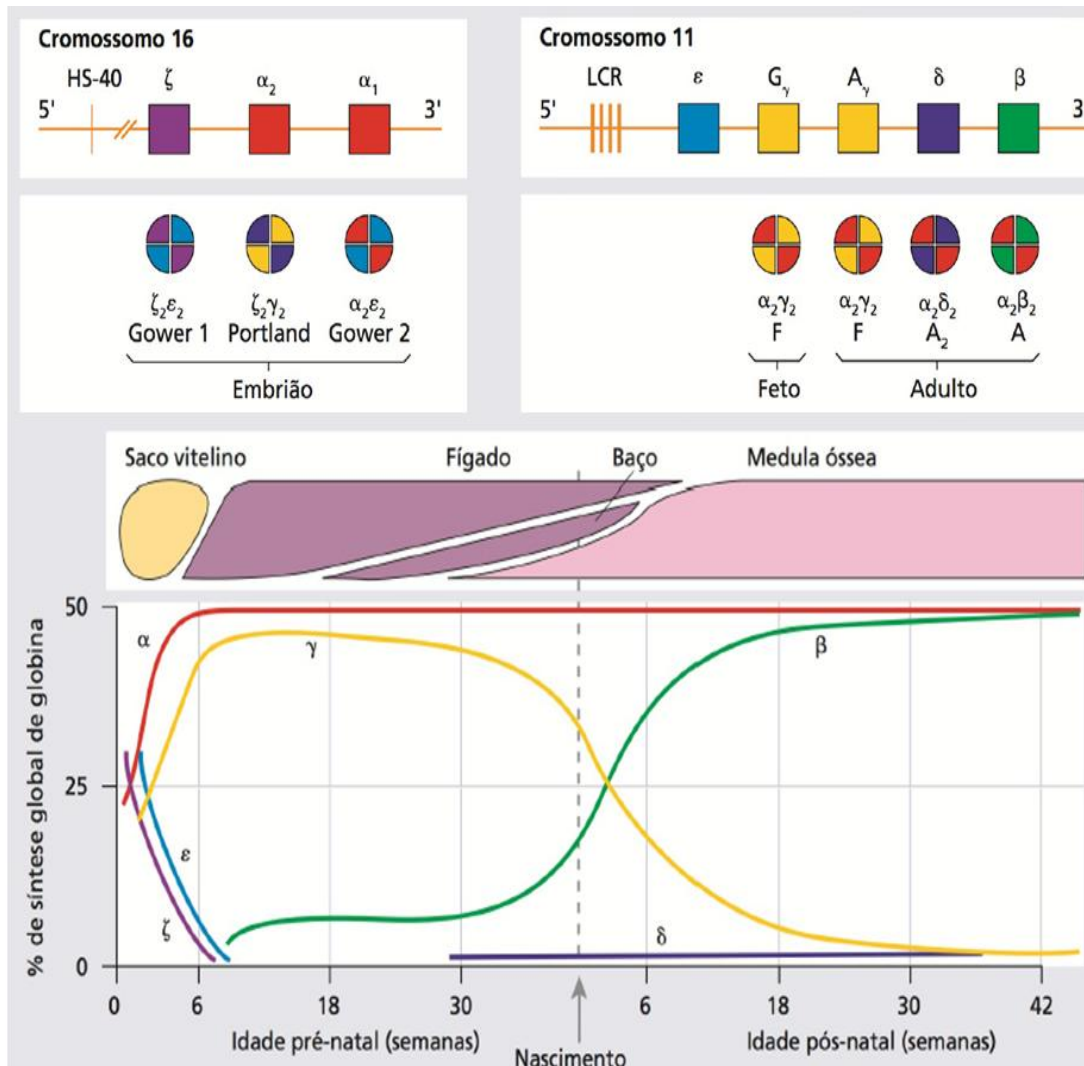
Existem diferentes hemoglobinas ao longo da vida de um indivíduo, e essas se diferenciam entre si por suas características físico-químicas e mobilidades eletroforéticas diferentes (SILVA; RIBEIRO NETO, 2013).

Durante o processo de eritropoese, o início da síntese da molécula de hemoglobina ocorre do proeritroblasto até a fase de reticulócito, célula responsável pela produção de cerca de 35% da hemoglobina, e quando as células tornam-se eritrócitos, elas deixam de produzi-la. Para que haja uma produção normal de hemoglobina, deve-se ter um suprimento adequado de ferro, protoporfirinas e globinas. A síntese da globina é determinada por genes específicos e caso haja mutações nestes, pode haver variação estrutural na molécula ou alterações na quantidade sintetizada das mesmas e quando uma mutação é expressa clinicamente, temos uma hemoglobinopatia (AZEVEDO, 2013).

Os genes responsáveis pelas cadeias de globina encontram-se no cromossomo 11 e no cromossomo 16. O gene responsável por cadeias ξ e os dois genes responsáveis por cadeias α encontram-se no cromossomo 16, enquanto que os genes responsáveis pelas cadeias ϵ , δ , β e γ se encontram localizados no cromossomo 11 (MCPHERSON; PINCUS, 2012).

Na figura 2 podemos observar que nos estágios embrionários temos a HbGower 1, formada por duas cadeias ϵ e duas ξ , e já no início da oitava semana de gestação ocorre à substituição das cadeias por cadeias α adultas e duas diferentes cadeias fetais, designadas $G\gamma$ e $A\gamma$. Na mudança do estágio embrionário para o fetal, começam a ser produzidas HbGower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e HbPortland ($\zeta_2\gamma_2$) e depois a HbF ($\alpha_2\gamma_2$) passa a ser predominante. Posteriormente ao nascimento, as cadeias γ são progressivamente substituídas pelas cadeias β e δ e após seis meses cerca de 97% da hemoglobina é formada pela HbA ($\alpha_2\beta_2$), enquanto HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) é encontrada em aproximadamente 3%, e a HbF em pequenas quantidades, até à vida adulta (TORRES; BONINI-DOMINGOS, 2005).

Figura 2 – Clusters do gene de globina nos cromossomos 16 e 11 e síntese de cadeias individuais na globina na vida pré e pós-natal



Fonte: Hoffbrand, 2013.

Como observado na figura 2, no cromossomo 16 encontramos os genes responsáveis pela síntese das globinas ζ e α , portanto a síntese da HbGower 1, HbPortland e HbGower 2 estão relacionadas ao cromossomo 16. Já no cromossomo 11 temos os genes responsáveis pela síntese das cadeias de globinas ϵ , δ , β e γ , portanto a síntese da HbF, HbA e HbA₂ estão relacionadas ao cromossomo 11. Em relação à porcentagem da síntese de cada tipo de hemoglobina ao longo da vida de um indivíduo, observamos que até a sexta semana de idade pré-natal tem uma porcentagem decrescente de globinas ζ e ϵ , e crescente de cadeias α e γ , além disso, a hematopoese ocorre no saco vitelino; após a sexta semana pré-natal, a hematopoese começa a ocorrer no fígado e posteriormente também no baço, com a

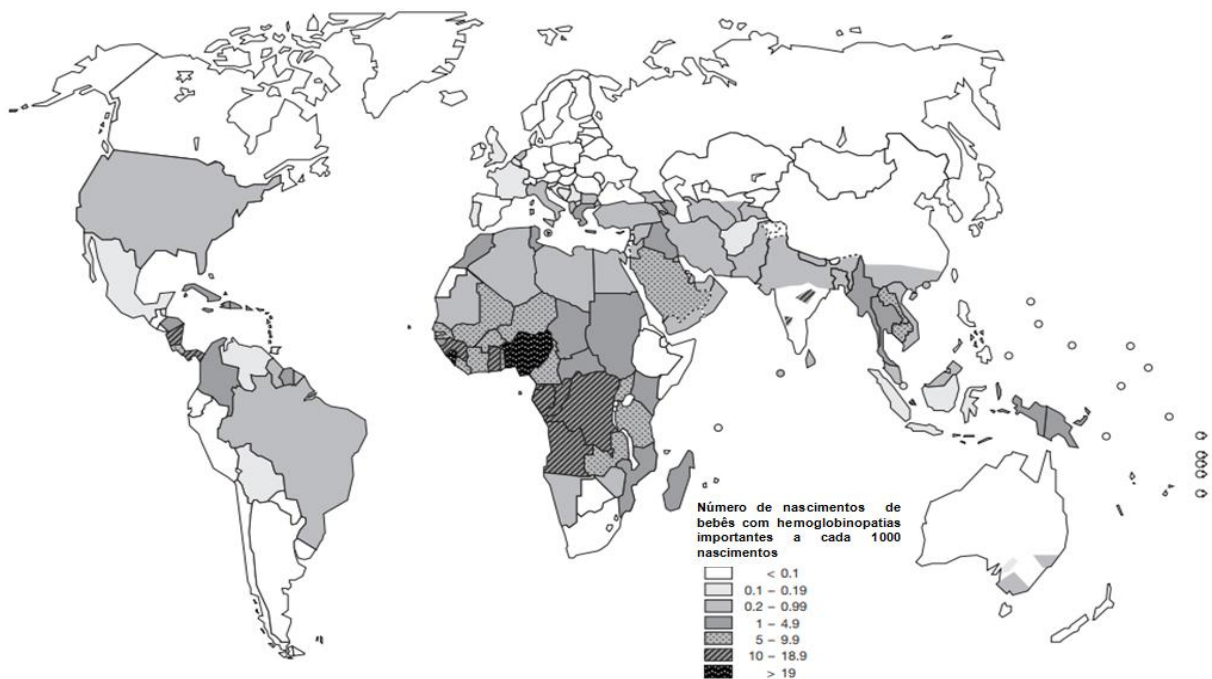
síntese de α , γ e β globinas. Após o nascimento, a hematopoese diminui no fígado e no baço e passa a ocorrer principalmente na medula óssea, com células apresentando principalmente α e β globinas, além de outros tipos de globina como δ e γ em menores quantidades (TORRES; BONINI-DOMINGOS, 2005).

4.2 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são doenças hereditárias relacionadas com a síntese das cadeias globínicas da hemoglobina. A etiologia dessas doenças está relacionada às mutações nas sequências dos genes das globinas, tanto nas regiões codificadoras quanto nas regiões responsáveis pelo controle da expressão gênica, que originaram genes α e β mutados. Assim, originam-se hemoglobinas alteradas, como a HbS, HbC, HbD, além das talassemias α e β (LAVOURAS, 2015).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que há mais de 270 milhões de pessoas no mundo com mutação nos genes globínicos, responsáveis por determinar hemoglobinas anormais e que a cada ano nascem mais de 300.000 indivíduos com anemia falciforme ou as formas mais graves de talassemia (FERREIRA, 2012). Na figura 3 observamos um mapa representando a distribuição global das hemoglobinopatias. Também podemos observar no quadro 1, uma estimativa dos nascimentos anuais de indivíduos com hemoglobinopatias importantes e prevalentes.

Figura 3 – Distribuição global dos distúrbios de hemoglobina, em termos de nascimentos de bebês afetados a cada 1.000 nascimentos



Fonte: OMS, 1996.

Quadro 1 – Nascimentos anuais de indivíduos com hemoglobinopatias importantes em diferentes países

Hemoglobinopatias	Nascimentos anuais (milhões)
HbS	217.331
Doença SC	54.736
β talassemia major	22.989
HbE β talassemia	19.128
HbS β talassemia	11.074
Doença da HbH	9.568
Hb de Bart	5.183

Fonte: Adaptado de Williams; Weatherall, 2012.

O defeito na síntese de uma ou mais cadeias de globina, gera um desequilíbrio entre as subunidades α e β , seja pela redução parcial ou total na produção das cadeias globínicas. Assim, o processo de eritropoese é dificultado e a hemoglobinizacão torna-se deficiente nos eritroblastos. As talassemias apresentam-se com quadros morfológicos alterados no sangue periférico de intensidade e tipo

variável. A grande diferença das talassemias quando comparadas às outras hemoglobinopatias, é que nas talassemias a hemoglobina tem estrutura primária normal enquanto que as outras apresentam hemoglobinas variantes, estruturalmente anômalas (SILVA; RIBEIRO NETO, 2013).

As talassemias podem ser classificadas de acordo com o tipo de cadeia globínica afetada, sendo que as talassemias α e β são as mais frequentes e estudadas, mas os genes de outras hemoglobinas podem ser afetados como os genes δ e γ (SILVA; RIBEIRO NETO, 2013).

É difícil fazer uma estimativa da verdadeira frequência das hemoglobinopatias, uma vez que sua distribuição é extremamente heterogênea em vários países mesmo em pequenas distâncias geográficas, o que está diretamente relacionado com a migração populacional. Entretanto, podemos dizer que as talassemias tem alta incidência na região da bacia do Mediterrâneo e partes da África, Oriente Médio, sudeste da Ásia e da Melanésia e Pacífico. Não há dificuldade em encontrar indivíduos acometidos com talassemia no mundo, uma vez que, diferente da anemia falciforme que é causada devido à mutação de uma única base do gene da β globina, as talassemias são resultantes de qualquer mutação que envolva a redução da síntese das cadeias de globina. Assim, existem muitos casos devido aos vários “alvos” para essas mutações no gene, juntamente com a grande quantidade de movimentos populacionais no mundo (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

A α talassemia tem sua prevalência próxima a 5,2% da população mundial, e pode ser considerada uma hemoglobinopatias muito frequente no Brasil. A α^+ talassemia é prevalente em quase todos os continentes, com grande frequência em populações da Ásia e da Oceania (China, Tailândia, Indonésia e outros), e da região do Mediterrâneo (Itália e Grécia), enquanto que a α^0 talassemia é limitada à região do Mediterrâneo e Sudeste Asiático. No Brasil, a α talassemia tem alta frequência, com a maioria dos casos relacionados com a deleção de um gene α . Estima-se que na população brasileira haja uma prevalência de 10% a 20% de portador silencioso e 1% a 3% do traço α talassêmico, e casos de doença da HbH são muitos raros. Ao nos referirmos à população afrodescendente no Brasil, essas frequências aumentam e isso nos permite concluir que o elevado grau de miscigenação racial no Brasil aumente a probabilidade de associação entre esse tipo de talassemia e outras hemoglobinopatias (CANÇADO, 2006).

A α talassemia teve seu primeiro relato em meados de 1950, quando Rigas (EUA) e Goultas (Grécia) analisavam dados laboratoriais de indivíduos suspeitos de apresentarem β talassemia devido à microcitose e hipocromia dos eritrócitos, mas que apresentavam níveis normais de HbA₂ e HbF, com a presença de outra hemoglobina com migração mais rápida que a HbA, posteriormente denominada HbH. Com isso, descobriu-se a doença da HbH, em que há apenas um gene funcional de α globina e há um excesso de cadeias de β globina, formando tetrâmetros de β globinas (CANÇADO, 2006).

A estrutura genética, molecular e a organização dos genes α tornaram-se mais claras a partir da década de 1970 com o avanço da biologia molecular, o que permitiu a classificação de diferentes formas de α talassemia, relacionadas à deficiência de um, dois, três ou quatro genes α (CANÇADO, 2006). Em situações em que apenas um gene sofre deleção e ainda há síntese de cadeias do tipo α , podemos chamá-la de talassemia α^+ e quando os dois genes do mesmo haplótipo estão afetados e não há nenhuma síntese de cadeia do tipo α , designa-se talassemia α^0 (DOTTO; SILVA, 2005).

A seguir podemos observar na figura 4 as diferentes classificações da α talassemia, o perfil genético e as manifestações apresentadas em cada caso:


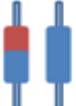
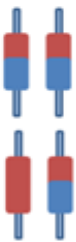
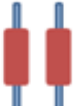
Figura 4 – Classificação das α talassemias

	Fenótipo	Genótipo	Manifestações clínicas
	Indivíduo saudável	$(\alpha\alpha/\alpha\alpha)$	Ausentes
	Portador silencioso	$(-\alpha/\alpha\alpha)$	A vida adulta pode apresentar ligeira hipocromia de detecção difícil, ou nenhuma alteração no sangue periférico
	Traço talassêmico	$(--/\alpha\alpha)$ $(-\alpha/-\alpha)$	Sem alteração clínicas relevantes, podendo apresentar microcitose e hipocromia, ou até hipocromia e ferro sérico normais em adultos
	Doença da HbH	$(--/-\alpha)$	Anemia hemolítica crônica de gravidade variada, esplenomegalia e alterações ósseas. Presença de hipocromia e poiquilocitose no sangue periférico
	Hidropsia fetal	$(--/--)$	Morte intrauterina ao final da gestação ou poucas horas depois do nascimento. Importante hepatoesplenomegalia e edemas

Fonte: Elaborada pela autora baseado em Belisário, 2010; Zago; Falcão; Pasquini, 2013.

A β talassemia é uma doença muito prevalente, acometendo aproximadamente de 80 a 90 milhões de pessoas em todo o mundo (cerca de 1,5% da população mundial), incluindo suas três classificações: β talassemia minor, β talassemia intermediária e β talassemia major (ORIGA, 2016). Entre 2013 e 2015 foi feito um levantamento do número de pessoas com as formas graves de talassemia no Brasil e observou-se que 51,4% das pessoas com talassemia, apresentam a talassemia β maior, 43,2% β talassemia intermediária, e 5,4% possuem talassemia α , sendo que a maior parte dos doentes encontravam-se na região Sudeste (60%), Nordeste (17%) e Sul (10,4%) (BRASIL, 2016). A seguir podemos observar na figura 5 as diferentes classificações da β talassemia, o perfil genético e as manifestações apresentadas em cada caso:

Figura 5 – Classificação das β talassemias

	Fenótipo	Genótipo	Manifestações clínicas
	Indivíduo saudável	(β/β)	Ausentes
	β talassemia menor	(β/β)	Níveis de hemoglobina ligeiramente diminuídos, discreta anemia com microcitose e hipocromia, e diminuição do VCM e HCM
	β talassemia intermediária	$(-\beta)$ (β/β) $(-\beta)$	Níveis de hemoglobina entre 7 e 11 g/dL, anemia crônica pode ser mais intensa em algumas situações e podem depender de transfusão sanguínea. Além disso, é comum reticulocitose no hemograma
	β talassemia major	$(-/-)$	Níveis de hemoglobina entre 1 e 7 g/dL, anemia microcítica hipocrômica grave. É dependente de transfusão e há diminuição da expectativa de vida caso não seja tratada

Fonte: Elaborada pela autora baseado em Teixeira, 2014; Zago; Falcão; Pasquini, 2013; Alexandre; Marini, 2013.

4.3 β Talassemia

Na β talassemia podemos encontrar diferentes apresentações clínicas de acordo com a alteração genética encontrada no cromossomo 11. A gravidade da doença está relacionada ao desequilíbrio da síntese de cadeias de globina, resultando em um excesso de cadeias de α que precipitam nos precursores eritróides e provocam danos oxidativos tornando a membrana da célula mais rígida (BRASIL, 2016).

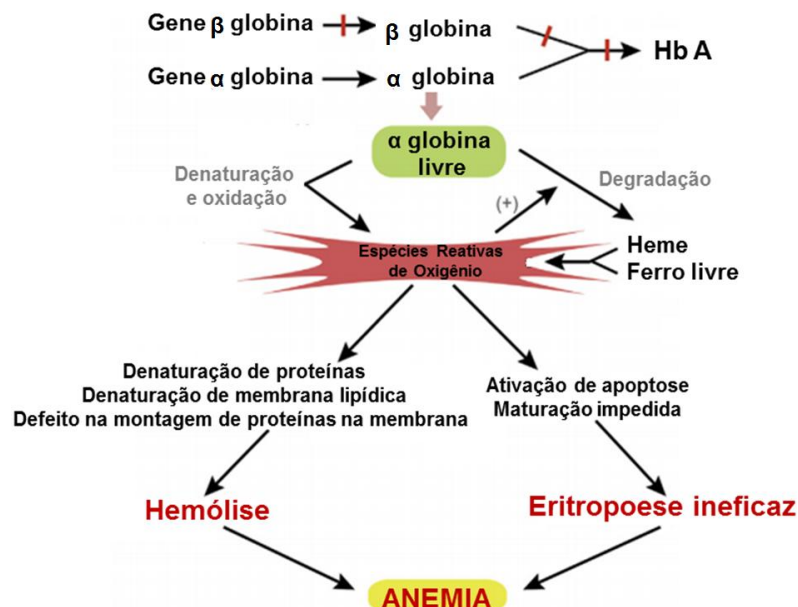
Alguns autores afirmam que a rigidez da membrana eritrocitária está relacionada com as cadeias α oxidadas que se ligam a proteínas do citoesqueleto, como a anquirina e espectrina, provocando alteração nas suas propriedades e alterações mecânicas. Ainda, quando ocorre a oxidação das cadeias de globina há formação de hemicromos capazes de associar-se a proteína banda 3 da membrana, resultando em antígenos externos que interagem com anticorpos específicos. Esses

eventos acabam comprometendo a mitose e metabolismo celular e fazem com que os eritrócitos sejam retirados da circulação muitas vezes de forma precoce pelos sinusóides esplênicos, por um processo chamado de hemocaterese. Assim há um aumento da concentração de bilirrubina indireta no sangue periférico e devido ao aumento de função do baço, podendo evoluir para uma esplenomegalia (MARTINS, 2010).

Ainda, na medula óssea acontecem fenômenos como a peroxidação dos lipídeos da membrana e formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, devido a pouca hemoglobinizacão das células, elas tornam-se mais sensíveis à agressão oxidante devido à perda de potássio e ATP (adenosina trifosfato) por terem a membrana comprometida, o que deixa a célula mais rígida e sua saída da medula óssea para o sangue periférico é dificultada, caracterizando uma eritropoese ineficaz. Dessa forma, pode ocorrer também uma hipertrofia da medula e formação de tecidos eritropoiéticos extra medulares (MARTINS, 2010; ORIGA, 2016).

Na figura 6 podemos observar a representação da fisiopatologia da β talassemia, com o aumento da hemocaterese e de eritropoese ineficaz.

Figura 6 – Patologia molecular e celular da β talassemia



Fonte: Adaptado de Mettananda; Higgs, 2018.

Com a redução total ou parcial das cadeias de β globina, o excesso de outras cadeias de globina é degradado e oxidado, gerando ferro e grupo heme livre

juntamente com as espécies reativas de oxigênio. Assim ocorre uma cascata de eventos que dificultam a formação adequada das membranas eritrocitárias, provocam hemólise e ocorre eritropoese ineficaz, fatores que levam a anemia (METTANANDA; HIGGS, 2018).

Os indivíduos afetados por essas alterações genéticas podem ser heterozigotos ou homozigotos, ou seja, podem ter apenas um gene defeituoso ou um par de genes mutados, respectivamente. No caso de portadores heterozigotos, em geral, encontramos indivíduos assintomáticos que apresentarão algumas características hematológicas importantes para identificação da doença, podendo apresentar até manifestações mais perigosas como anemia grave. Já os portadores homozigotos apresentam formas ainda mais graves da doença, com severidade variável, podendo ter uma associação de graus diferentes de anemia hemolítica hipocrômica acompanhados ou não de hiperplasia eritróide de medula óssea. Além disso, observam-se outras manifestações em outros órgãos como hepatomegalia, esplenomegalia, retardo no crescimento somático e sexual e deformidades no esqueleto, principalmente nos ossos do crânio e face (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013; ALEXANDRE; MARINI, 2013; LAVOURAS, 2015).

4.3.1 Aspectos moleculares

De acordo com Zaha (2014), pode-se chamar de mutação “qualquer modificação súbita e hereditária no conjunto gênico de um organismo, não explicável pela recombinação da variabilidade genética preexistente”. A mutação pode acontecer em qualquer base nitrogenada, seja envolvendo somente um par de bases (mutação pontual) ou então alguns pares de bases (adição/inserção ou deleção).

As mutações podem ser classificadas de acordo com o tipo de alteração molecular. Dentre as mutações pontuais temos as mutações *missense*, *nonsense* e *frameshift*. Chamamos de mutações “*missense*” aquelas que ocorrem a partir da troca de um nucleotídeo na região codificadora do gene, originando um novo códon, que leva a criação de um aminoácido diferente na proteína. Já as mutações “*nonsense*” são aquelas caracterizadas pela substituição do códon original por um códon de parada, levando a terminação da proteína traduzida de forma prematura.

As mutações “*frameshift*” estão relacionadas a adição e deleção de um ou mais pares de bases que são capazes de modificar a fase de leitura (com exceção dos múltiplos de três que restabelecem a fase de leitura original) (ZAHA, 2014).

Atualmente, já foram identificados e bem caracterizados mais de 200 pontos de mutação causando talassemia β , levando a pequenas variações com alelos, chamadas de β^+ , até grandes variações, que levam à ausência completa das cadeias de β globina, causando as talassemias β^0 . Entretanto, a maioria dos casos de β talassemia são causados por mutações que afetam poucos pares de bases e que interferem na transcrição, processamento, transporte, estabilidade e tradução do RNAm (BRASIL, 2016).

A distribuição dos diferentes tipos de mutação está relacionada com as distribuições regionais e étnicas por todo o mundo. Por exemplo, a mutação IVS1-110 (G>A) e CD39 (CAG>TAG) são muito comuns no Mediterrâneo e no Oriente Médio, enquanto que a IVS1-5 (G>C) é mais frequente no sul da Ásia e a CD41/42 (-TTCT) no sudeste da Ásia (METTANANDA; HIGGS, 2018).

As mutações que levam à β^0 talassemia geralmente estão relacionadas a mutações do códon de iniciação, mutações *nonsense*, mudanças de estrutura e mutações que envolvem *splicing* e processamento de RNA. Já nos casos de talassemia β^+ em que se tem uma pequena redução das cadeias β , geralmente trata-se de mutação no promotor (sequência CACCC e TATA box), sinal de poliadenilação, regiões não traduzidas ou anormalidades de processamento. Nos casos ainda mais leves em que há efeitos sutis na síntese de β globina são observados mutações no promotor ou regiões não traduzidas do RNAm (METTANANDA; HIGGS, 2018).

As mutações que acontecem nas regiões reguladoras e que afetam a transcrição acontecem pela substituição de nucleotídeos no TATA box e CAT box, na região promotora 5' do gene β . Esse tipo de alteração está relacionado às formas mais moderadas da doença, pois tem o início de transcrição reduzido. As mutações que alteram o RNAm geralmente estão localizadas no “cap” da extremidade 5', região de clivagem do RNAm e também no sinal de poliadenilação AATAAA da extremidade 3'. As primeiras alteram o primeiro resíduo e afetam a função do RNAm, reduzindo a transcrição e torna mais lento o processo de formação do “cap”, o que altera a estabilidade do RNAm; as mutações da extremidade 3' são marcadas pela

grande redução da clivagem de RNAm, levando a síntese de moléculas mais longas e instáveis (BRASIL, 2016).

Já quando há casos mais graves de talassemia β^0 , temos mutações que afetam a tradução em sua grande maioria é colocado um códon de terminação na região codificadora, de forma a interromper a tradução (mutações *nonsense*). Após a síntese da cadeia, como as mesmas são muito instáveis, elas são degradadas e gera um estado similar ao que ocorre quando há redução das cadeias β . Também é comum a inserção ou deleção de um único nucleotídeo na região codificante do gene, atrapalhando a leitura normal e interferindo na tradução do RNAm (mutações *frameshift*) (BEZERRA, 2007).

Para que um RNA seja funcional, ele precisa passar por um processo de *splicing* para a retirada de íntrons e permanência de éxons. Caso haja mutações nas uniões éxons-íntron ou próximas a elas, o processo de *splicing* é prejudicado levando a manifestação da talassemia β^0 (BEZERRA, 2007).

Existem ainda aquelas mutações mais raras em que apesar do gene da β globina normal, sua expressão é silenciosa. Existem alguns casos de outras variantes de β globina, chamados de β talassemia dominantemente herdada, em que mesmo que haja uma síntese normal, as moléculas formadas são muito instáveis e não formam tetrâmeros estáveis de hemoglobina. Assim, ocorre deficiência funcional de β globina e resulta em fenótipo de talassemia β (METTANANDA; HIGGS, 2018).

No quadro 2 podemos observar os diferentes tipos possíveis de mutações, a classificação genética e exemplos:

Quadro 2 – Algumas mutações que causam talassemia β , segundo sua localização na molécula, o defeito que provocam e o resultado na síntese de globinas

DEFEITO	TIPO
RNAm não funcional	
Mutações <i>nonsense</i> CD17 A→T, CD35 C→A, CD39 C→T, CD43 G→T	β^0

Mutações <i>frameshift</i> CD5 -CT, CD6 -C, CD8/9 +G, CD16 -C, CD35 -C, CD41/42 -TTCT	β^0
Mutação do códon de início ATG ATG→AGG, ATG→ACG	β^0
Processamento anormal do RNA	
Mutações internas nos íntrons IVS-1 nt6 T→C, IVS-1 nt110 G→A, IVS-2 nt705 T→G, IVS-2 nt745 C→G IVS-1 nt116 T→G, IVS-2 nt654 C→T	β^+
Mutações nos limites éxon-íntron IVS-1 nt1 G→A, IVS-1 nt2 T→G, IVS-2 nt849 A→G, IVS-2 nt849 A→C IVS-1 nt5 G→C, IVS-1 nt5 G→T, IVS-1 nt128 T→G, IVS-2 nt843 T→G	β^0 β^+
Redução da transcrição do RNAm (mutações na região promotora)	
-101 C→T, -92 C→T, -88 C→T, -31 A→G, -30 T→A, -28 A→C	β^+
Mutações do sítio de poliadenilação do RNAm (AATAAA)	
AACAAA, AATAAG, AATGAA, AATAGA, A (Del AATAA)	β^+

Fonte: Adaptado de Zago; Falcão; Pasquini, 2013.

4.3.2 Classificação clínica e molecular

Para o diagnóstico clínico das β talassemias é necessário um conjunto de dados clínicos, laboratoriais e moleculares, levando em consideração a gravidade da anemia apresentado (BRASIL, 2016).

Os pacientes que apresentam a β talassemia minor/traço talassêmico β herdaram um único gene alterado, portanto a redução das cadeias de β globina é muito pequena o que não promove grandes prejuízos. Esse tipo de talassemia não necessita de tratamento, uma vez que os níveis de hemoglobina estão apenas

ligeiramente diminuídos (ALEXANDRE; MARINI, 2013). Pode ser mais preocupante em algumas ocasiões como a infância, processos infecciosos ou inflamatórios crônicos ou durante a gravidez, em que é necessário ter maior cautela para não confundir à talassemia minor com outra forma mais grave da doença (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

Já aqueles acometidos com β talassemia intermediária, podem ter herdado diferentes genes de β globina mutados ou interação de β talassemia com outras hemoglobinopatias. Nesse caso, os níveis de hemoglobina estão diminuídos e a anemia crônica pode ser mais intensa em situações de infecções ou carência de folato, ainda, em alguns casos podem depender de transfusão sanguínea (ALEXANDRE; MARINI, 2013).

A β talassemia major é a forma clínica mais grave e pode ser considerada fatal em curto prazo, entretanto os doentes vêm apresentando um melhor prognóstico devido às melhoras nos tratamentos transfusionais e na quelação de ferro. Caso não seja tratada, a expectativa de vida não ultrapassa a segunda ou terceira década de vida, mas quando ocorrem transfusões regulares desde o primeiro ano de vida o nível de hemoglobina fica em níveis razoáveis e é possível ultrapassar os 40 anos de idade (TEIXEIRA, 2014).

As β talassemias também apresentam uma classificação molecular, na qual se utiliza a representação β^+ nos casos em que há apenas a redução da produção das cadeias de β globina, enquanto que quando há ausência denomina-se talassemia β^0 . Assim, os indivíduos homocigotos para β^0 (β^0/β^0), ou seja, que herdaram um gene β^0 do pai e outro da mãe, não têm nenhuma síntese de cadeias de β globina. Já os indivíduos que são homocigotos para β^+ (β^+/β^+), heterocigotos para β^0 (β/β^0), heterocigotos para β^+ (β/β^+) ou dupla heterocigose (β^+/β^0), têm produção de cadeias β , mesmo que reduzida (OLIVEIRA; POLI NETO, 2004).

Como a HbA é formada por cadeias α e β , na talassemia β^0 , não há síntese de HbA, há aumento de HbF (até 98%) e a HbA2 representa cerca de 2%. Nas talassemias β^+ a HbF está entre 60-95%, com a presença de HbA e HbA2 pode ou não estar aumentada, mas sempre com uma relação A2/A aumentada. Em geral, a maioria das talassemias β heterocigotas apresenta-se com uma anemia leve ou ainda com níveis de hemoglobina e hematócrito normais (MCPHERSON; PINCUS, 2012). No quadro 3 podemos observar as principais categorias das talassemias β com seus padrões de eletroforese de hemoglobinas:

Quadro 3 – Principais categorias das talassemias β

Síndrome	Genótipo	Classificação clínica	Padrão da eletroforese da hemoglobina
Estados homocigotos			
β^+ talassemia	β^+/β^+	Talassemia major ou intermediária	HbA 10-20%; HbA2 variável; HbF 70-80%;
β^0 talassemia	β^0/β^0	Talassemia major	Nenhuma HbA; HbA2 2%; HbF 98%;
Estados heterocigotos			
β^+ talassemia	β^+/β	Talassemia minor	HbA 80%; HbA2 > 3,5%; HbF 2-6%;
β^0 talassemia	β^0/β	Talassemia minor	HbA 80%; HbA2 > 3,5%; HbF 2-6%;

Fonte: Adaptado de Hoffbrand; Pettit, 2000; MCPerson; Pincus, 2012; Lima, 2001.

4.3.3 Quadro clínico e diagnóstico laboratorial

Para iniciar o diagnóstico laboratorial das talassemias pode-se partir de um hemograma completo com uma avaliação criteriosa da morfologia eritrocitária, dedicando uma maior atenção ao VCM e à contagem de reticulócitos, além da eritrocitose. Depois de identificada a anemia e suspeitar-se de uma síndrome talassêmica, deve-se realizar a eletroforese de hemoglobina, podendo utilizar outras

técnicas concomitantemente, como a focalização isoeétrica e análise molecular (OLIVEIRA; POLI NETO, 2004).

Há certa dificuldade no diagnóstico da β talassemia minor, por não ser possível distinguir essa forma clínica por exames laboratoriais de rotina, necessitando sua identificação por técnicas de biologia molecular. Em geral, os indivíduos com β talassemia minor não apresentam sintomas e acabam sendo diagnosticados por meio do histórico familiar ou triagem populacional. Entretanto, embora na β talassemia minor a redução da síntese de β globina seja pouca, pode-se observar pacientes com algumas manifestações clínicas que variam de acordo com a etnia, como por exemplo, a astenia, cansaço e palidez cutânea (BRASIL, 2016).

É comum apresentarem uma leve anemia, que pode ser evidenciada em mulheres no período gestacional. Há relatos de aumento da absorção de ferro que pode levar a uma sobrecarga de ferro em raros casos. Os valores de hemoglobina de pacientes afetados com β talassemia minor ficam em aproximadamente 12 g/dL para homens e 10 g/dL para mulheres, portanto não tem necessidade transfusional. Habitualmente, há aumento das células vermelhas no hemograma, com discreta anemia, microcitose e hipocromia, com a uma diminuição do VCM (Volume Corpuscular Médio) (aproximadamente 67 fL) e do HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) (aproximadamente 22 pg), raramente há diminuição do CHCM (Concentração Da Hemoglobina Corpuscular Média) (aproximadamente 32 g/dl) (GREER et al., 2009) e alguns estudos apontam que os pacientes com β talassemia minor encontram-se com o RDW por volta de 15,6% (MELGAREJO, 2015).

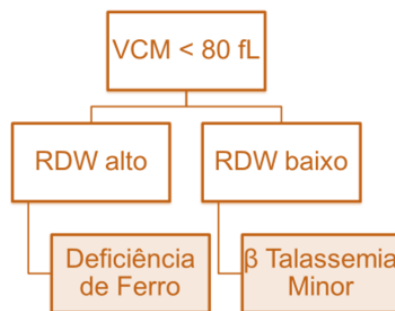
Trata-se de pacientes que não apresentam deformidades ósseas e nem hepatoesplenomegalia. Geralmente, o que caracteriza as β talassemias minor são os níveis de HbA2 acima de 3,5 (BRASIL, 2016).

É comum que a β talassemia minor ser diagnosticada de forma errônea como anemia por deficiência de ferro e seja tratada de forma inadequada. Alguns autores afirmam que o RDW, um parâmetro que está relacionado à amplitude de distribuição eritrocitária, pode ser utilizado para a diferenciação dessas duas doenças. Nos casos em que o valor do RDW encontra-se aumentado pode-se pensar em uma anemia por deficiência de ferro, enquanto que nos casos de β talassemia minor ele se encontra com valores ligeiramente alterados ou inalterados, o que podemos

observar na figura 7. A explicação para a pequena variação dos valores de RDW em pacientes com β talassemia minor se dá por todos os eritrócitos apresentarem microcitose constante decorrente de uma mutação genética que leva a deficiência na síntese das cadeias globínicas, fornecendo valores constantes de RDW, enquanto que na anemia por deficiência de ferro as células são produzidas normalmente na medula óssea com ausência de mutações, o que permite que sejam produzidas tanto células com tamanhos normais quanto células com tamanhos anormais, levando a uma significativa variação nos valores de RDW devido à anisocitose. Entretanto, ainda há controvérsias sobre a relevância do uso do RDW para o diagnóstico das duas doenças e não é indicado que esse índice seja utilizado como parâmetro único de diagnóstico (MELGAREJO, 2015).

Além do RDW, alguns autores constataram que os valores de ferro e ferritina séricos podem auxiliar na diferenciação dessas doenças. Nesse caso, pacientes que apresentarem esses parâmetros dentro dos valores de referência, mas apresentarem hipocromia e microcitose podem ser sugestivos de apresentarem β talassemia minor (MELGAREJO, 2015).

Figura 7 – Diferenciação entre a deficiência de ferro e a talassemia minor pelo RDW



Fonte: Adaptado de Silva et al., 2016.

Já na β talassemia intermediária, a gravidade da doença está diretamente relacionada com a alteração molecular no gene β . Portanto, quanto menor for o desequilíbrio da síntese das diferentes globinas, menores serão as concentrações de globinas precipitadas dentro dos eritrócitos, e assim serão menores as complicações clínicas observadas (BEZERRA, 2007).

É caracterizada essencialmente como independente de transfusão nos casos em que o valor de hemoglobina não esteja menor que 7,0 g/dL. Entretanto, como

sua complexidade e gravidade podem variar de acordo com as associações de desordens genéticas, a dependência ou não de transfusão é diferente em cada caso. Em geral, os pacientes que apresentarem manifestações da doença nos primeiros anos de vida irão necessitar de transfusões ao longo da vida, enquanto que pacientes que apresentarem manifestações mais tardias provavelmente não irão precisar (GREER et al., 2009).

Aqueles que apresentam β talassemia intermediária independente de transfusão, em geral, só apresentam icterícia leve e são caracterizados por uma anemia discreta, hipocrômica e microcítica. Alguns casos os pacientes com β talassemia intermediária apresentam as mesmas alterações que os pacientes com β talassemia major, entretanto, os graus são menos intensos, como poiquilocitose, células em alvo e pontilhados basófilos (LIMA, 2001).

Também é comum encontrar trombocitopenia, neutropenia e reticulocitose no hemograma (ALEXANDRE; MARINI, 2013).

Nas figuras 8 e 9 observam-se lâminas de extensão sanguínea de pacientes com talassemia β heterozigótica:

Figura 8 – Extensão sanguínea de paciente com β talassemia intermediária: 1. Células-alvo; 2. Eritroblasto com pontilhados basófilos; 3. Contração irregular de eritrócitos; 4. Eritroblastos

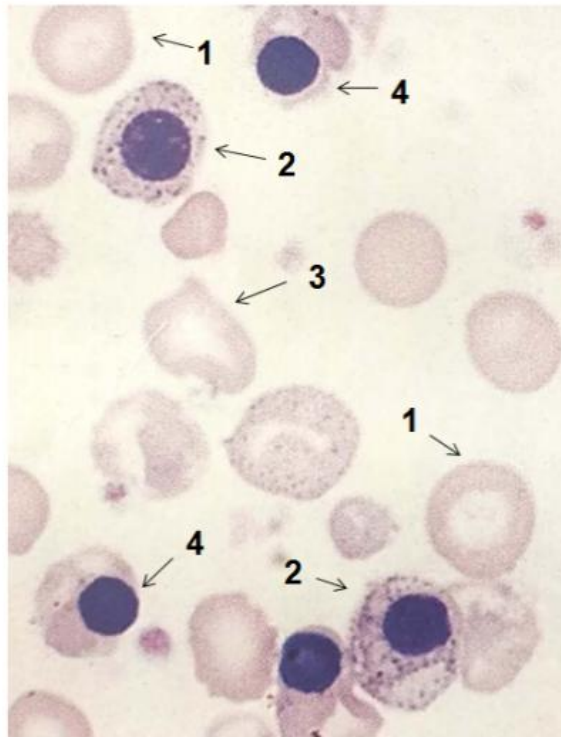
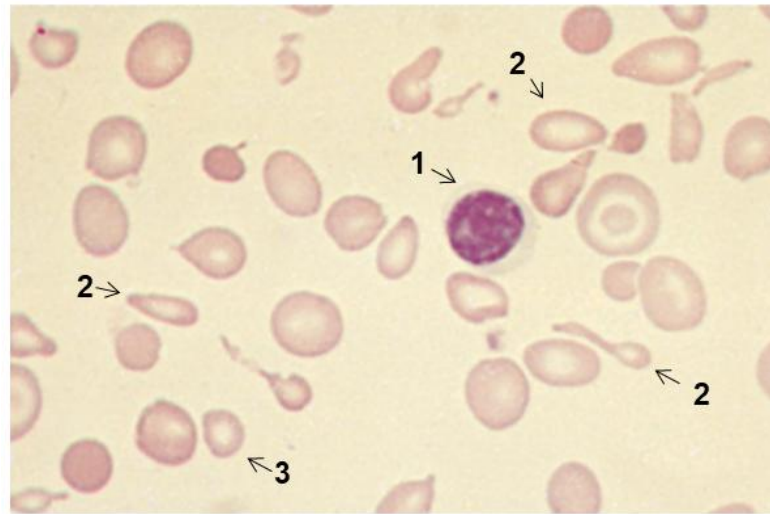


Figura 9 – Extensão sanguínea de paciente com β talassemia intermediária: 1. Eritroblasto; 2. Poiquilocitose e hipocromia; 3. Microcitose e hipocromia



Fonte: Longo, 2015.

Não apresentam comprometimento do crescimento, mas é possível palpar o baço desde o início da manifestação da doença e ocorre o aumento do mesmo de acordo com a diminuição dos valores de hemoglobina. É comum encontrar pacientes com anormalidades ósseas, fraturas relacionadas a pequenos traumas, osteoporose e anormalidades esqueléticas, devido ao aumento da eritropoese e atividade excessiva de medula óssea, indicando a necessidade transfusional nesses pacientes. A eritropoese extramedular pode ser encontrada em até 65% dos casos (GREER et al., 2009).

É comum os pacientes apresentarem anemia crônica com um aumento da absorção de ferro no trato gastrointestinal, implicando numa sobrecarga de ferro que pode causar complicações mais sérias (BEZERRA, 2007).

Além disso, caso o paciente não receba transfusão quando necessário, um conjunto de fatores como a eritropoese ineficaz, a anemia e a hipóxia fazem com que tenha diminuição da regulação da hepcidina. A hepcidina é um importante regulador do metabolismo do ferro, e quando encontrada em pequena quantidade no organismo há maior absorção de ferro. Assim, com a diminuição da hepcidina ocorre uma absorção excessiva de ferro no duodeno e desenvolve-se uma sobrecarga de ferro. Em pacientes que passam por transfusões regulares, também ocorre isso devido à intensa destruição dos eritrócitos. Ainda, quando há uma saturação da ligação do ferro à transferrina, o ferro é encontrado na circulação não ligado à

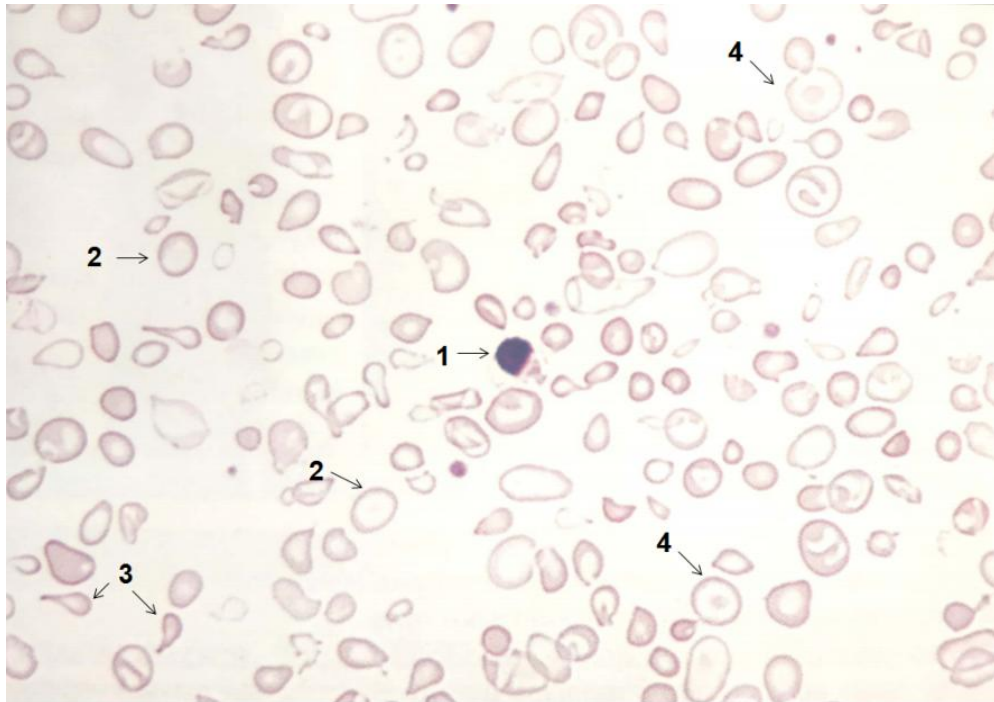
mesma, tornando-se um importante catalisador e responsável pela formação de radicais livres, promovendo estresse oxidativo com danos nas mitocôndrias, membranas lipídicas, proteínas e DNA, e conseqüentemente comprometendo alguns órgãos (ORIGA, 2016).

O aumento da concentração de ferro no sangue pode levar a diversas complicações e até mesmo a morte a partir da segunda década de vida, iniciando com sinais e sintomas relacionados ao retardo no crescimento e maturidade sexual, além de alterações endocrinológicas, escurecimento de pele e principalmente complicações cardíacas. As complicações cardíacas vão desde sopros cardíacos até cardiomegalias, insuficiência cardíaca, hipertrofia dos ventrículos e alterações no ritmo que podem ser evitados ao realizar transfusões regulares juntamente com o uso de quelantes de ferro (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

Já na talassemia major o valor da hemoglobina encontra-se abaixo de 7 g/dL, portanto trata-se de uma forma clínica dependente de transfusão. Em geral, os sintomas iniciam com uma anemia microcítica com valores de VCM entre 50 e 60 fL, hipocrômica com HCM de 14 a 20 pg e grave com hemoglobina de 1 a 7 g/dL (ORIGA, 2016).

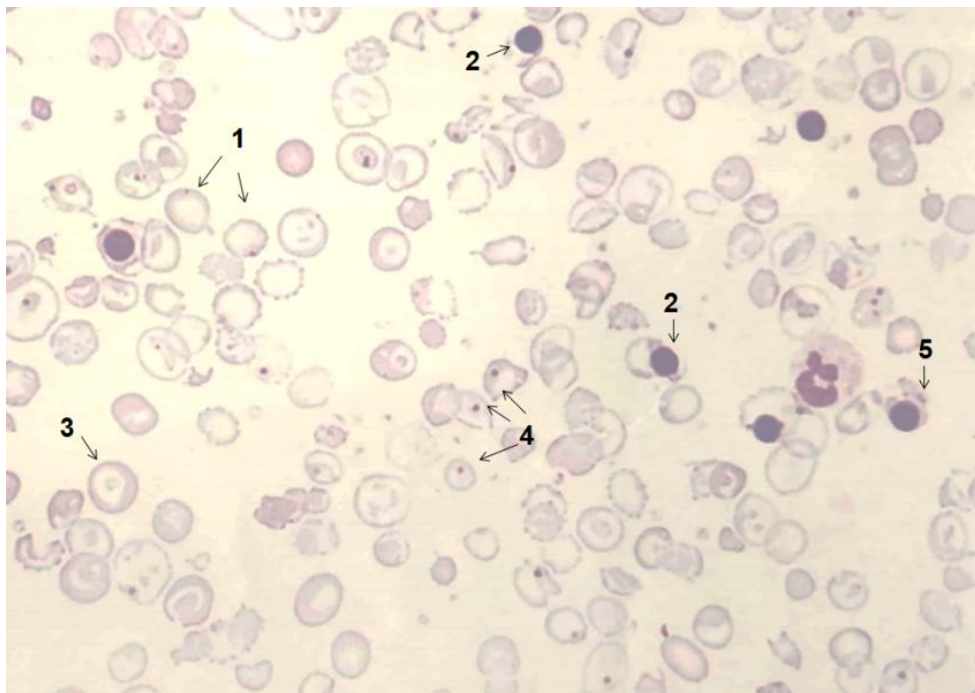
A análise morfológica das lâminas dos pacientes suspeitos de apresentarem β talassemia major nota-se a presença de microcitose com hipocromia nos eritrócitos, além de anisocitose, poiquilocitose e anisocromasia. Ainda, observa-se pontilhado basófilo, células em alvo, corpúsculos de Howell-Jolly, anéis de Cabot, policromasia, siderócitos, muitos eritroblastos e sinais de regeneração eritrocitária (LIMA, 2001). Na figura 10 podemos observar uma lâmina de um paciente com β talassemia major, em que se mostra a presença de células microcíticas hipocrômicas proeminentes, células-alvo e eritroblastos no sangue periférico. Na figura 11 também podemos observar presença de células hipocrômicas, presença de células-alvo e eritroblastos, juntamente com siderócitos e Howell-Jolly, além do aumento da contagem de plaquetas encontrados nos pacientes com β talassemia major (HOFFBRAND; PETTIT, 2000).

Figura 10 – Extensão sanguínea de paciente com β talassemia major: 1. Eritroblasto; 2. Células hipocrômicas; 3. Dacriócitos; 4. Células em alvo.



Fonte: Hoffbrand; Pettit, 2000.

Figura 11 – Extensão sanguínea de paciente com β talassemia major: 1. Células hipocrômicas; 2. Eritroblastos; 3. Células em alvo; 4. Howell-Jolly; 5. Siderócitos.



Fonte: Hoffbrand; Pettit, 2000.

Geralmente, a partir dos seis meses de idade inicia-se um ciclo de transfusões recorrentes, e aqueles que não recebem o cuidado transfusional adequado apresentam prejuízo no crescimento, palidez, icterícia, musculatura pouco desenvolvida, hepatoesplenomegalia, osteoporose, deformidade dos ossos e eritropoese extramedular, conforme a figura 12 e figura 13 (ORIGA, 2016).

Figura 12 – Radiografia de crânio de paciente com talassemia major: Alargamento de díploe consequente à hiperplasia crônica de medula óssea.



Fonte: Zago; Falcão; Pasquini, 2013.

Figura 13 – Alterações ósseas em crianças com β talassemia major: (A) Crânio com proeminência dos ossos frontal e parietal, além dos maxilares aumentados; (B) Hipertrofia mandibular com tendência a expor dentes superiores.



Fonte: Hoffbrand, 2013; Teixeira, 2014.

A talassemia major manifesta-se desde os primeiros meses de vida, com bebês que não prosperam e tornam-se mais pálidos de forma progressiva. Também são comuns complicações alimentares, diarreia, irritabilidade e crises de febre recorrentes (ORIGA, 2016). Nessa classificação de talassemia, a sobrecarga de ferro pode causar diferentes complicações, como complicações cardíacas, hepáticas

e endócrinas, sendo que as cardíacas são as principais causas de morte dos doentes acometidos com essa forma clínica (TEIXEIRA, 2014).

Observam-se no quadro 4 as principais alterações clínicas e hematológicas das três formas de β talassemia:

Quadro 4 – Alterações clínicas e hematológicas na β talassemia

TALASSEMIAS			
	MAJOR	INTERMEDIÁRIA	MINOR
Gravidade	++++	++	+
Esplenomegalia	++++	+++/**	+/0
Icterícia	+++	++/+	0
Alterações ósseas	++++/**	+/0	0
Hemoglobina	< 7	7-10	> 10
Hipocromia	+++	++	+
Microcitose	+++	++/**	+/****
Células em alvo	+++	++	0/+
Pontilhado basófilo	++	+	+
Reticulócitos	5-15%	3-10%	2-5%
Eritroblastos	+++	+/0	0

Fonte: Silva, et al., 2016.

Existem alguns conflitos no diagnóstico das talassemias, como por exemplo, na β talassemia menor em que muitas vezes há uma associação com anemia

ferropênica. A baixa concentração de ferro interfere na síntese da δ globina, provocando uma menor síntese de HbA₂ e deixando ela em um nível “normal” no sangue do paciente. Além disso, pode ser uma associação da β talassemia minor com a α talassemia, reduzindo o desequilíbrio entre as globinas α e β , apresentando uma concentração normal de HbA₂ e dificultando a percepção da HbH. Na β talassemia major também encontramos dificuldade no diagnóstico especialmente naqueles pacientes em que receberam transfusão recentemente e também pela dificuldade de realizar exames nos pais antes de dar o diagnóstico definitivo (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 2007).

4.3.4 Métodos laboratoriais baseados em proteínas

Para um diagnóstico correto em casos de suspeita de β talassemias e triagem das mesmas, primeiramente são feitos os testes de triagem com métodos primários como a eletroforese de hemoglobinas, focalização isoelétrica ou a cromatografia líquida de alta performance. Caso tenha um resultado normal, esse resultado é reportado, mas se o resultado obtido for anormal, os testes primários devem ser feitos novamente para casos de amostras inadequadas ou pela qualidade do teste. Porém se ainda os resultados permanecem alterados, os mesmos devem ser reportados e passar por uma segunda triagem, em que são feitos também testes moleculares (AGUINAGA et al., 2015).

Existem vários métodos para identificação laboratorial das hemoglobinopatias e dentre eles, a eletroforese de hemoglobina sempre foi o método de escolha em diversos países e vem se tornando mais moderna, com maior produção e sensibilidade, principalmente na triagem de recém-nascidos. A escolha do teste de para o diagnóstico de β talassemia e outras hemoglobinopatias varia de laboratório para laboratório de acordo com seu protocolo e demanda. Entretanto, métodos moleculares vêm sendo usados em alguns laboratórios a fim de ter uma análise mais abrangente e determinar a natureza da hemoglobinopatias, mas ainda são pouco usados devido ao seu custo, tempo e a necessidade de profissionais treinados. A seguir serão descritos os testes mais utilizados, desde os mais tradicionais até os moleculares (AGUINAGA et al., 2015).

4.3.4.1 Eletroforese de hemoglobinas

A eletroforese de hemoglobinas é importante para a triagem das hemoglobinopatias, uma vez que as hemoglobinas apresentam características físico-químicas e mobilidades eletroforéticas diferentes e isso pode ser visualizado nesta técnica (BRASIL, 2016).

Os aminoácidos que compõem as proteínas possuem cadeias laterais ionizantes anfotéricas, ou seja, podem ter carga negativa e positiva. A mobilidade eletroforética de cada hemoglobina varia de acordo com sua carga e o meio em que ela se encontra, refletindo diretamente na sua velocidade de migração. Quando colocadas num campo elétrico, as moléculas migram em uma velocidade e uma direção, por exemplo, em pH de 8,6 todas as hemoglobinas humanas têm carga total negativa, portanto migram ao polo positivo ou ânodo presente no sistema. De acordo com a carga das moléculas, acontecem diferentes migrações e é possível identificar as diversas hemoglobinas existentes comparando a distância percorrida com a mobilidade de hemoglobinas já conhecidas (LAVOURAS, 2015; LIMA, 2001).

A HbA é chamada de “hemoglobina rápida” por ser uma das hemoglobinas de maior mobilidade eletroforética em um pH alcalino, juntamente com a Hb de Bart e HbH, enquanto que a HbC é comumente chamada de “hemoglobina lenta” por apresentar menor mobilidade nesse pH (LAVOURAS, 2015). Na lista a seguir podemos observar as hemoglobinas em ordem crescente de velocidades eletroforéticas: HbA₂ = HbC = HbE < HbO < HbS = HbD < HbL = HbP < HbG < HbQ < HbF < HbA < HbM = HbK < HbJ < HbN < Hb de Bart = HbI = HbH. Como observado, as diferentes hemoglobinas embora tenham suas particularidades, algumas têm a mesma mobilidade eletroforética, necessitando de testes complementares para a diferenciação das mesmas e confirmação de diagnóstico (LIMA, 2001).

A eletroforese qualitativa em meio alcalino (pH de 8,6) com acetato de celulose é utilizada para separar as hemoglobinas normais e as variantes mais comuns, como a HbS e HbC. O grande viés é que a HbD, por exemplo, apresenta a mesma mobilidade que a HbS, enquanto que a HbE tem a mesma mobilidade que a HbC. Dessa forma, deve ser feita a eletroforese em meio ácido, em que a HbD e HbE têm a mesma mobilidade que a HbA, e a HbS e HbC se separam da HbA. Portanto, para que seja feita a triagem adequada das hemoglobinopatias, deve-se

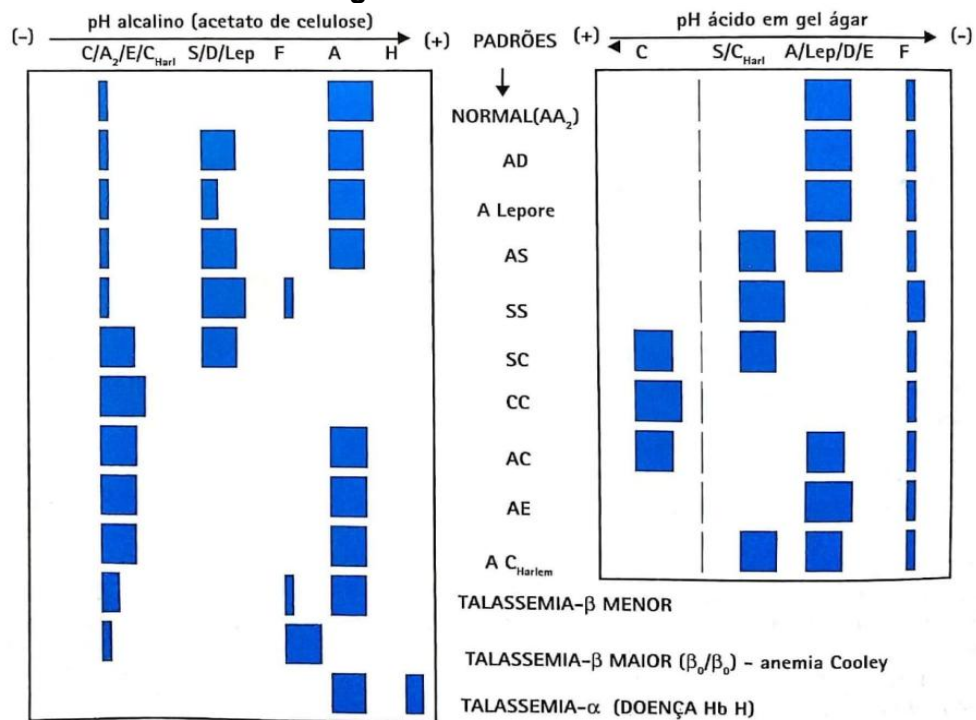
associar a eletroforese em meio ácido e a eletroforese em meio alcalino para a correta identificação da expressão dos genes das diferentes hemoglobinas, como a HbS, HbC e HbE, uma vez que não podem ser identificadas utilizando somente um tipo de eletroforese de hemoglobina (BRASIL, 2016).

Para a realização da técnica deve ser coletada uma amostra de sangue do paciente em questão em um tubo com anticoagulante e prepara-se um hemolisado. Há diversos métodos para se realizar a eletroforese, entretanto os mais empregados utilizam papel filtro, acetato de celulose, gel de ágar, gel de amido e gel de acrilamida. Deposita-se pequena quantidade do hemolisado na suspensão empregada do lado do polo negativo. Posteriormente, essa suspensão deve ser colocada em uma cuba com tampão entre os pólos positivo e negativo, e liga-se uma corrente elétrica por determinado tempo. A partir desse momento começa a separação das diferentes moléculas de hemoglobina, uma vez que aquelas que apresentam maior carga negativa irão migrar mais para o pólo positivo comparado àquelas que possuem menor carga negativa naquele pH. Os detalhes técnicos variam de acordo com o método e os aparelhos escolhidos para o teste (LIMA, 2001).

Dentre as vantagens da eletroforese de hemoglobinas, podemos dizer que é se trata de um método barato, rápido e simples, que permite diferenciar as principais hemoglobinas. Entretanto, como algumas hemoglobinas apresentam mobilidades eletroforéticas semelhantes, a diferenciação pode ser dificultada. Além disso, as mutações em que não há mudança na carga da hemoglobina podem ser “silenciadas” e não são detectadas nesta técnica (LAVOURAS, 2015; LIMA, 2001).

Na figura 14 podemos observar uma eletroforese de hemoglobinas e o perfil encontrado em pacientes com talassemia β major, talassemia β minor e talassemia α .

Figura 14 – Eletroforese de hemoglobinas



Fonte: Oliveira; Poli Neto, 2004.

4.3.4.2 Focalização isoeétrica

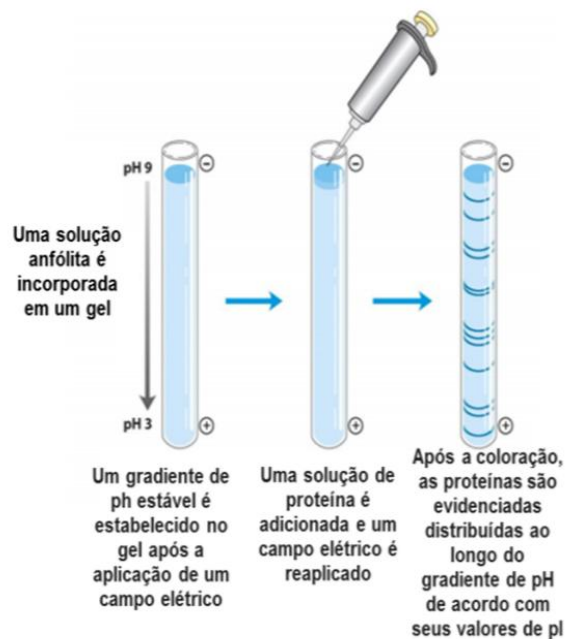
A focalização isoeétrica é uma técnica em que as hemoglobinas são separadas de acordo com o ponto isoeletrico das frações proteicas que a compõem ao longo de um gradiente de pH com uma alta resolução (MCPHERSON; PINCUS, 2012).

É uma técnica em que há maior resolução comparada à eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose. Embora seja um teste mais trabalhoso e demorado, tornou-se uma técnica muito utilizada no diagnóstico de hemoglobinopatias devido à sua simplicidade, custo e boa qualidade dos resultados. O principal objetivo desse método é separar HbD da HbS e a HbC da HbE e da HbO-Arab (BRASIL, 2016; MÜLLER, 2005).

Como podemos observar na figura 15, na focalização isoeletrica forma-se um gradiente de pH a partir de substâncias anfólicas que geralmente são ácidos poliméricos sintéticos. Aplica-se um campo elétrico na mistura dos anfólicas (proteínas com carga líquida positiva, negativa ou nula, dependendo da sua

composição da estrutura primária e pH do meio) e assim, forma-se um gradiente de pH. Mantém os anfólitos em um meio com um catodo em pH mais básico, geralmente o hidróxido de sódio, e o ânodo em pH mais ácido, geralmente o ácido fosfórico. A partir desta organização, de acordo com o ponto isoelétrico de cada proteína, elas irão se comportar de formas diferentes num dado ponto e serão focalizadas. As hemoglobinopatias são bem caracterizadas em um pH de 6 a 8 (BRASIL, 2016; MÜLLER, 2005).

Figura 15 – Etapas iniciais da focalização isoelétrica

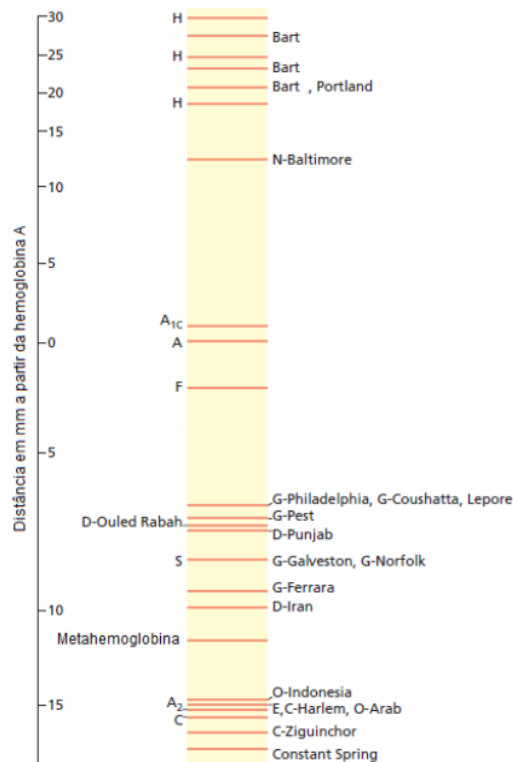


Fonte: Caracelli; Schpector, 2007.

A necessidade ou não de coloração varia de fabricante para fabricante, além da leitura dos géis que podem ser lidos molhados ou secos. Por meio dos padrões de migração de controles já conhecidos é feita a identificação das bandas, seguida da comparação e obtenção de resultado (AGUINAGA et al., 2015).

Na figura 16 podemos observar um diagrama representando uma matriz de focagem isoelétrica demonstrando a distância das diferentes hemoglobinas a partir da HbA.

Figura 16 – Mobilidades de diferentes hemoglobinas em matriz de focagem isoeletrica



Fonte: Lavouras, 2015

É considerada uma técnica muito mais específica do que a eletroforese de hemoglobinas por diferenciar bandas de todos os fenótipos de hemoglobina no ponto isoeletrico (pI) de cada fração. Estudos apontam que é uma ótima opção para a separação de HbA e HbF e outras variantes de hemoglobinas, além de estar sendo muito utilizada para diagnóstico de hemoglobinas anormais em sangue de cordão umbilical. Outro ponto positivo desta técnica seria a necessidade de usar somente uma pequena quantidade de eritrócitos (4 microlitros) e a possibilidade de realizar até 80 amostras por vez. Todas essas facilidades ajudam na realização da triagem das hemoglobinopatias em adultos, crianças e recém-nascidos (BERTHOLO; MOREIRA, 2006).

4.3.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Performance

Estudos do *College of American Pathologists* evidenciaram que a HPLC (*High-performance Liquid Chromatography* - Cromatografia Líquida de Alta Performance), tem se mostrado equivalente ou até mesmo superior às técnicas de eletroforese. A HPLC de permuta catiônica tem sido o método de escolha para

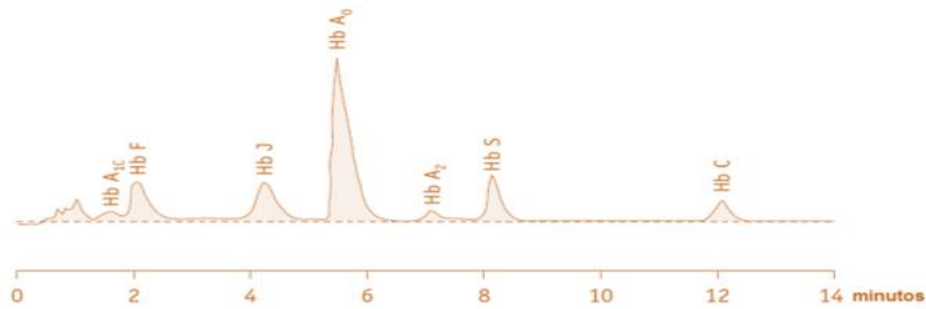
rastreio de hemoglobinas variantes e quantificação de HbA2 e HbF, e assim, permite o diagnóstico de talassemias e outras hemoglobinopatias a partir do sangue de cordão umbilical. Atualmente existem equipamentos automatizados utilizados em rotina laboratorial para o diagnóstico de hemoglobinopatias, usado principalmente para quantificar HbA2, HbF, HbA, HbS e HbC (CLARKE; HIGGINS, 2000).

Trata-se de uma técnica baseada numa cromatografia em coluna, utilizada para separação e identificação de compostos. Difere-se das outras técnicas por não estar relacionada com a ionização dos aminoácidos e sim das interações iônicas e hidrofóbicas da amostra com a matriz, permitindo a separação das diferentes hemoglobinas (LAVOURAS, 2015).

A HPLC é caracterizada por separar a HbS e a HbC das outras hemoglobinas que possuem migração similar nas técnicas de eletroforese. Entretanto, não é uma técnica capaz de separar HbE da HbA2, o que poderia ser útil para diferenciar uma homozigose para HbE de uma heterozigose para HbE e β^0 talassemia. Assim, para realizar a separação da HbE e HbA2 deve-se realizar outras técnicas (SABATH, 2017).

Primeiramente a amostra do paciente passa por uma fase estacionária presente em uma coluna de cromatografia carregada negativamente, e então de acordo com as cargas positivas de cada molécula ocorre uma separação por adsorção. Em seguida, ocorre a passagem para uma fase móvel em que há separação por eluição, em que há um líquido com uma crescente concentração de cátions em uma coluna. Os cátions competem com as proteínas absorvidas pelos sítios aniônicos e assim, as moléculas positivas são eluídas de acordo com a sua afinidade com a fase estacionária. Após a separação, por meio de um sistema óptico e softwares, as diferentes hemoglobinas são identificadas pelo seu tempo de retenção e quantificadas a partir de picos correspondentes. As hemoglobinas que apresentarem maior carga positiva ficarão mais tempo retidas no sistema. Como cada hemoglobina possui tempo de retenção característico, essa tecnologia permite a identificação das variantes de hemoglobina conhecidas, o que pode ser demonstrado na figura 17 (LAVOURAS, 2015).

Figura 17 – Resultado de HPLC na separação de hemoglobinas



Fonte: Lavouras, 2015

Dentre as vantagens desta técnica podemos citar a simplicidade com a automação que além de promover uma alta resolução e velocidade para obtenção de resultados, permite a realização de várias amostras ao mesmo tempo, com pequenas quantidades de sangue e menor manipulação dos técnicos, garantindo uma alta reprodutibilidade (AGUINAGA et al., 2015).

4.3.5 Métodos laboratoriais moleculares

Em geral, as β talassemias são identificadas por técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), como o PCR alelo específico para casos de mutações já conhecidas, eletroforese em gel com gradiente de temperatura (DGGE), Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), PCR em tempo real e sequenciamento de DNA para casos em que não há conhecimento das mutações (LAVOURAS, 2015).

Dentre as técnicas mais utilizadas, temos a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) que consiste em utilizar as sequências de reconhecimento de enzimas de restrição correspondentes ao alelo normal ou ao alelo mutado do gene em questão. Caso a sequência esteja presente, a enzima de restrição “corta” o DNA e depois é observado o resultado em eletroforese em gel comparando o tamanho dos fragmentos. Para a realização desta técnica é feita a extração do DNA e amplificação por PCR. Em seguida é feita a adição das enzimas de restrição no material amplificado e incuba-se por determinado tempo. É separada uma fração da mistura, realiza-se uma eletroforese

e visualiza o tamanho dos fragmentos depois da coloração, é feito um registro de imagem e análise para finalizar diagnóstico (AGUINAGA et al., 2015).

Dentre os pontos favoráveis a este teste podemos citar a facilidade em sua execução e análise, além disso, quando comparado a outros métodos é considerado um método mais barato. Entretanto, como se trata de um teste com muitas etapas manuais, acaba levando à uma baixa produtividade e se restringe a realização de poucas amostras por vez levando um tempo relativamente longo para realização, logo é indicado somente para laboratórios com uma menor rotina (AGUINAGA et al., 2015).

O sequenciamento de Sanger é o método mais prático para a detecção de mutações em um indivíduo, e como os casos de β talassemia são em grande maioria causados por mutações pontuais, esse tem sido um dos métodos moleculares mais eficazes na identificação da mesma. É um método muito benéfico para o diagnóstico, uma vez que determina qualquer alteração que tenha nos pontos de interesse do gene, além disso, oferece alto rendimento. Entretanto possui algumas desvantagens relacionadas ao tempo que demanda para realização dos testes, necessidade de um profissional treinado para revisar e o tamanho do gene e número de amostras (AGUINAGA et al., 2015). Comparando à técnica de sequenciamento do gene da β globina com o gene da α globina, podemos dizer que o sequenciamento da β globina é mais simples por haver apenas um único gene de β globina no cromossomo 11 (SABATH, 2017).

Para a realização da técnica é feita a extração do DNA, amplificação, além dos primers e DNA polimerase, utiliza-se os ddNTPs (Didesoxirribonucleotídeos Trifosfato). Como os ddNTPs não possuem hidroxila no final da sua molécula como os dNTPs (Desoxirribonucleotídeos Trifosfato), quando eles são incorporados acabam interrompendo a extensão da amplificação. Além disso, cada um dos ddNTPs apresentam um fluoróforo diferente incorporado à molécula emitindo um comprimento de onda diferente. Após a amplificação, a mistura passa por uma etapa de purificação e os produtos são levados à eletroforese para separar as moléculas com base no seu tamanho e carga. O produto desse processo passa por um feixe de laser e como cada fluoróforo apresenta um comprimento de onda diferente, a informação é captada e direcionada para um software de um equipamento, exibindo a sequência (AGUINAGA et al., 2015).

Foi descoberta uma técnica de sequenciamento nova, chamada de pirosequenciamento, na qual é feita a detecção pontual de mutações, sendo possível realizar várias amostras de forma semiautomatizada e com custo próximo ao apresentado na técnica convencional de PCR e menor encontrado nos outros tipos de sequenciamento. Mostrou-se eficaz para detecção de mutações em pequenas regiões nos genes de globinas, de forma rápida, flexível, precisa e confiável (MARTINO, 2018).

Nessa técnica os nucleotídeos são adicionados na reação e ao serem incorporados pela RNA polimerase liberam pirofosfato (PPi), que é convertido em ATP pela enzima sulfúrilase. Com isso, gera energia para que a enzima luciferase converta luciferina em oxiluciferina e obtém assim, luz visível em tempo real. Portanto, a cada nucleotídeo adicionado, é gerado um pico de luz que será captado por um dispositivo. Assim, a sequência complementar a fita de DNA é construída e pode ser visualizada no programa e o resultado é mandado para um software (MARTINO, 2018).

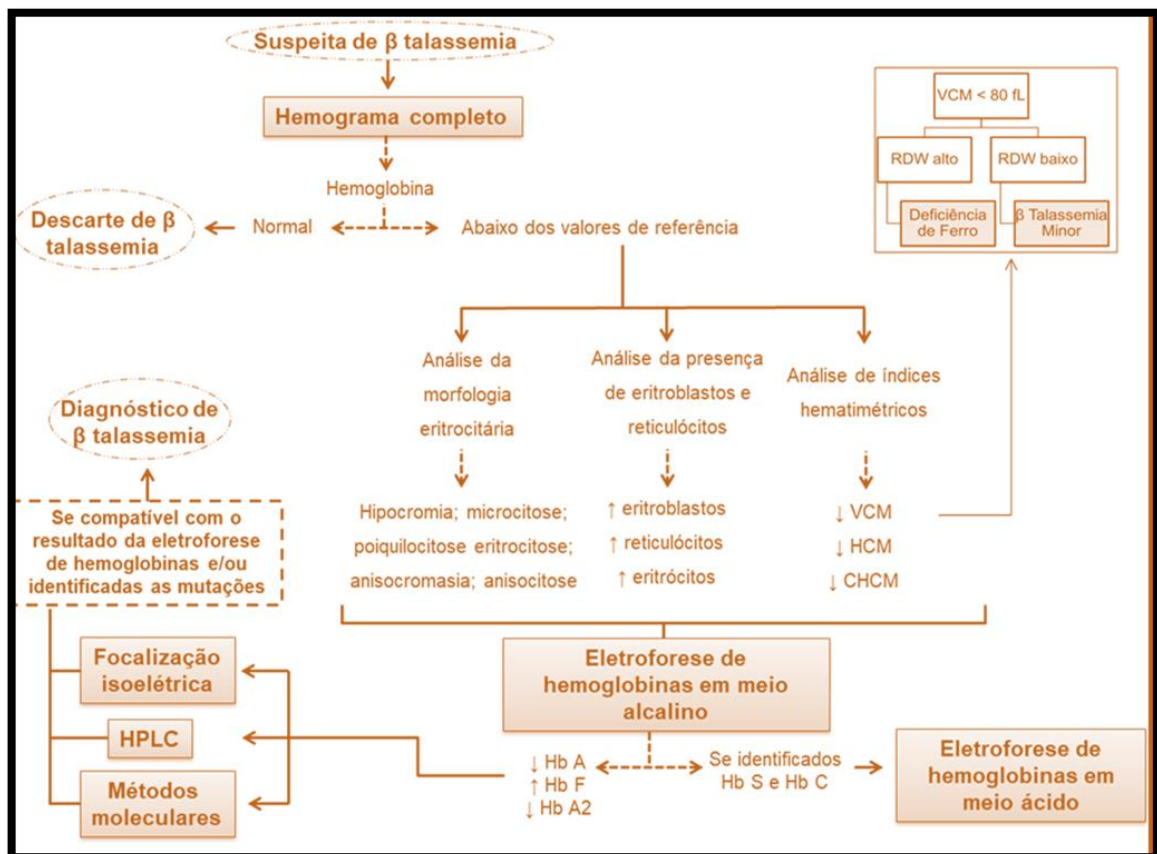
4.3.6 Custo-efetividade dos métodos realizados para diagnóstico de β talassemia

A triagem das talassemias inicia-se com um hemograma completo, o qual permite a análise dos índices hematimétricos e assim, sabe-se sobre a forma, tamanho e a contagem de hemoglobina dos eritrócitos. A análise dos índices hematimétricos juntamente com outras técnicas de triagem de hemoglobinopatias é indicada para a triagem inicial das talassemias. Dentre essas técnicas, podemos citar a eletroforese de hemoglobina, primeiramente em pH alcalino que separa as hemoglobinas normais e a maioria das anormais por meio da diferença eletroforética. Em complemento, pode ser realizada também a eletroforese de hemoglobinas em pH ácido para a separação da HbS, HbC e HbE, embora seja uma técnica de baixa sensibilidade, especificidade e trabalhosa (MARTINO, 2018).

Ainda, temos a focalização isoelétrica que permite uma análise quantitativa e qualitativa da corrida das hemoglobinas em gel, porém é uma técnica trabalhosa, demorada e exige maior treinamento de funcionários para a interpretação dos resultados. Já a HPLC é importante para a identificação de mutações que alteram o

tempo de retenção da hemoglobina, no entanto, algumas variantes de hemoglobina apresentam tempos e perfis de retenção semelhantes, tornando necessário o uso de outros testes mais específicos, como os testes moleculares (MARTINO, 2018). Na figura 18, sugere-se um fluxograma para o diagnóstico das β talassemias e os resultados esperados:

Figura 18 – Fluxograma para diagnóstico de β talassemias



Fonte: Elaborada pela autora baseado em Martino, 2018

Como já citado anteriormente, hoje em dia existem diversos testes utilizados para triagem de pacientes com suspeita de hemoglobinopatias, mas nenhum destes testes permite a detecção de mutações nos genes da β globina, impossibilitando o diagnóstico definitivo e tornando necessária a utilização de outros testes confirmatórios para identificar os portadores, e ainda, detectar novas e raras mutações resultantes da variabilidade genética nas populações do mundo todo. Os testes moleculares, como os sequenciamentos, são utilizados para o diagnóstico definitivo dessas doenças por permitirem a análise completa do genoma e assim, um

diagnóstico mais específico (MARTINO, 2018). Por fim, a triagem das hemoglobinopatias e seu diagnóstico podem ser feitos por diversos métodos, cada um com suas particularidades, vantagens e limitações, que foram resumidamente mostrados no quadro 5:

Quadro 5 – Várias técnicas utilizadas para o diagnóstico de distúrbios da hemoglobina

Método	Vantagens	Limitações
Eletroforese em acetato de celulose (pH alcalino)	Baixo custo.	Baixa resolução, não utilizado em laboratórios modernos, pode não detectar β talassemias em recém-nascidos.
Eletroforese em ágar citrato (pH ácido)	Pode distinguir variantes incomuns de HbS ou HbC, baixo custo.	Cromatografia líquida de alta resolução e alta performance pode normalmente substituir.
Focalização isoeletrica	Boa resolução, amplamente utilizada, custo relativamente baixo.	Não é possível identificar definitivamente algumas variantes, insensíveis para α -talassemia, não é quantitativa, pode não identificar β -talassemia no período neonatal.
Cromatografia líquida de alta performance	Quantitativa, boa resolução, rápida, amplamente adotada.	Não é possível identificar definitivamente algumas variantes, insensíveis para α -talassemia, pode não identificar β -talassemia no período neonatal.

Sequenciamento de Sanger	Melhor método atual para caracterização de variantes de globina e mutações pontuais que causam talassemia.	Não é utilizado para detectar deleções.
Pirosequenciamento	Os resultados são quantitativos, mais rápidos e sensíveis comparados ao sequenciamento Sanger.	A sequência de DNA alvo é de apenas 20 a 50 nucleotídeos.

Fonte: Sabath, 2017; Traeger-Synodinos et al., 2014.

4.3.7 Tratamento

Como dito anteriormente, os pacientes acometidos com talassemia minor geralmente não apresentam sintomas e não há necessidade de tratamento mesmo com alterações hematológicas. Já quando se trata de talassemia intermediária os pacientes podem necessitar de transfusões regulares e caso não aderirem ao tratamento podem apresentar algumas complicações (DOTTO; SILVA, 2005).

Em geral, o tratamento para β talassemia major é baseado em transfusões de concentrado de hemácias, uso de quelantes de ferro, esplenectomia e ainda, apoio psicológico ao paciente talassêmico e aos seus familiares, uma vez que a doença abrange complicações psicológicas e sociais. É importante que a família tenha consciência da natureza hereditária da doença, sua evolução, possíveis complicações e o tratamento adequado para uma melhor qualidade de vida. Com o uso dessas medidas é possível aumentar a sobrevida dos pacientes doentes, que embora levem a β talassemia como uma doença crônica, têm um aumento da expectativa de vida mediana para 25 anos. Ainda, há possibilidade de realizar um transplante de célula tronco hematopoiética, em que se substitui a medula doente por um tecido de doador saudável, erradicando a doença (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

As transfusões propostas aos pacientes talassêmicos tem o objetivo de corrigir a anemia, a supressão da eritropoese e a inibição da absorção de ferro no trato gastrointestinal, complicações frequentes nos pacientes que não passam por terapia transfusional. Após confirmação de diagnóstico de β talassemia major deve-se iniciar a terapia transfusional caso o paciente atenda à alguns critérios: 1. Resultados menores que 7,0 g/dL de hemoglobina durante um intervalo mínimo de duas semanas (excluindo outras causas que podem levar à queda de hemoglobina como infecções, perda de sangue e deficiência de ácido fólico) ou 2. Resultados de hemoglobina maior que 7,0 g/dL com paciente apresentando outras complicações como mudanças faciais, fraturas, comprometimento do crescimento e hematopoese extramedular. Espera-se o valor médio de hemoglobina de 12 g/dL e após transfusão esse valor será próximo de 14 a 15 g/dL (BRASIL, 2016).

Existem vários fatores que influenciam na quantidade de sangue a ser transfundido, como o peso do paciente, o valor de hemoglobina esperado e o hematócrito da bolsa a ser transfundida. Normalmente não se deve exceder o valor de 15 a 20 ml/kg e para que a volemia não aumente rapidamente e deve-se ter uma velocidade de infusão próxima de 5 ml/kg/h (BRASIL, 2016).

Devido a necessidade dos pacientes talassêmicos passarem por transfusões recorrentes e também por terem maior absorção de ferro no trato gastrointestinal, ocorre o progressivo acúmulo de ferro no organismo. A sobrecarga de ferro ao chegar a valores próximos de 1,0-1,5 g/kg torna-se incompatível com a vida, o que leva o talassêmico à necessidade de passar por tratamento regular com quelantes de ferro para que não alcance esses valores críticos (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

No início da década de 60 foi introduzida a desferroxamina (DFO) como quelante de ferro padrão no tratamento de pacientes cronicamente transfundidos e que apresentavam sobrecarga de ferro. O acúmulo de ferro no coração é a principal causa de morte nos pacientes talassêmicos, embora também tenha acometimento do fígado. Depois de diversos estudos, foi comprovado que pacientes que apresentavam talassemia major ao usar a DFO por via parenteral tinha o aumento da sobrevida e diminuição das complicações associadas à sobrecarga de ferro, além de reverter alterações cardíacas já estabelecidas. Também existem fármacos que podem ser usados via oral, com eficiência comprovada e com a vantagem de não ser por administração parenteral, mas não há um consenso sobre o uso isolado de

este fármaco substituir o uso de DFO (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013; PAULA; SAAD; COSTA, 2003).

Com a necessidade de realizar transfusões recorrentes para sobreviver, há uma conseqüente sobrecarga de ferro, que pode resultar em dano para múltiplos órgãos como o coração, fígado e pâncreas. Assim, o tratamento crônico com transfusões regulares e uso de quelantes de ferro melhora a sobrevida dos pacientes com talassemia. Entretanto, as principais causas de óbito em pacientes talassêmicos são secundárias a sobrecarga de ferro no coração e no fígado, pois existem muitos casos em que há baixa aderência ao tratamento com quelantes, o que faz com que esses pacientes ainda apresentem uma menor expectativa de vida comparada às pessoas que não têm a doença (SIMÕES et al., 2009).

Outro ponto importante relacionado às transfusões recorrentes é a aloimunização eritrocitária, decorrente ao desenvolvimento de anticorpos pelo paciente contra os antígenos das hemácias do doador podendo levar a uma reação hemolítica transfusional. Como isso, os pacientes têm dificuldade em encontrar concentrados de hemácias compatíveis e aumentam as chances de acontecer outras reações transfusionais (MOTA, 2018).

É comum o desenvolvimento de esplenomegalia maciça em pacientes com talassemia major secundariamente ao aumento da destruição de eritrócitos e pela presença de hematopoese extra medular esplênica. Assim, o paciente talassêmico pode apresentar hiperesplenismo, com encurtamento da sobrevida dos eritrócitos e quadro anêmico torna-se mais grave. Para evitar a esplenectomia e avaliar se é realmente necessária, deve-se colocar o paciente num regime transfusional adequado por vários meses e avaliar se houve melhora no quadro de eritropoese extra medular (BRASIL, 2016).

Em geral, a esplenectomia é indicada quando ocorre o aumento de 50% ou mais da necessidade transfusional no período de um ano. Também se leva em consideração a sobrecarga de ferro, pois se o uso de quelantes for suficiente para reduzir o acúmulo de ferro, evita-se a esplenectomia mesmo que haja uma necessidade do aumento transfusional. Entretanto, o método para a esplenectomia deve ser analisado paciente a paciente, levando em consideração os riscos e benefícios individuais (BRASIL, 2016)

Outra opção de tratamento é o transplante de medula óssea, que desde 1982 se mostrou disponível como um tratamento radical da talassemia. Trata-se de um

método eficiente para pacientes que não apresentem riscos ou que apresentem só um risco de complicações graves, desde que tenha um doador familiar HLA (Antígeno Leucocitário Humano) idêntico, proporcionando uma sobrevida superior à 85%, enquanto que os pacientes que possuem maiores riscos de complicações apresentam uma sobrevida menor. Alguns especialistas dizem que o transplante é uma medida muito invasiva e deve ser feita o quanto antes para que tenha menores complicações, mas quando os doentes passam por esse tratamento radical têm chance de uma sobrevida sem complicações graves (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

O transplante alogênico de células hematopoiéticas é uma opção potencialmente curativa a β talassemia, entretanto essa forma de tratamento apresenta dificuldade em encontrar um doador compatível, além de oferecer riscos como a rejeição do enxerto e doença do enxerto contra o hospedeiro (HOSSAIN; BUNGERT, 2017; RIBEIL et al., 2017).

Recentemente a terapia gênica vem se mostrando como uma alternativa para a cura desta doença, uma vez que os riscos oferecidos tanto pelas transfusões de concentrados de hemácias quanto o transplante alogênico são preocupantes e limitam o tratamento. Assim, as terapias gênicas tornaram-se uma opção para corrigir o gene alterado ou para aumentar a produção de HbF nesses pacientes (MOURA JUNIOR, 2017).

Estudos recentes propõem a terapia gênica como alvo para tratamento de doentes falciformes e β talassêmicos, por meio de técnicas que adicionam um gene corrigido de β globina a partir de vetores lentivirais em células-tronco hematopoiéticas autólogas. Os vetores lentivirais transferem estruturas genéticas para as células do paciente afetado e as células modificadas são transplantadas de volta para o mesmo. Um estudo realizado verificou que um paciente que apresentava o estado grave da doença foi capaz de ficar sem realizar transfusões por mais de 6 anos (THOMPSON et al., 2018).

4.2.1.8 Aconselhamento genético

Para que haja uma prevenção do desenvolvimento de formas talassêmicas e suas complicações é importante que haja um aconselhamento genético retrospectivo em famílias em que tenha nascido um filho com talassemia major, ou então um aconselhamento genético prospectivo para detectar indivíduos heterozigotos antes da procriação. Quando detectados os portadores heterozigotos é possível que aconteça uma prevenção do matrimônio com outro portador, ou então optar por não ter filhos (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

Ainda pode ocorrer o diagnóstico intrauterino com baixo risco obstétrico, no qual se coletam amostras de células fetais das vilosidades coriônicas entre a 9ª e a 12ª semana de gestação e é feito o diagnóstico a partir de métodos de análise de DNA, como sequenciamento, eletroforese em gel, hibridização com oligonucleotídeos ou análise de ligação com polimorfismos (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) foi instituído em 2001, como uma medida de ação preventiva para diversas doenças, incluindo as hemoglobinopatias, o qual tem o objetivo de diagnosticar essas doenças em recém-nascidos, interferindo e instituindo o tratamento precoce específico e a diminuição ou até eliminação de complicações associadas às doenças. As talassemias ainda não têm cura, mas podem ser controladas. Por isso, quando o diagnóstico e o tratamento são feitos precocemente há uma redução na morbidade e mortalidade (MONTEIRO, 2014).

Para a triagem das hemoglobinopatias é necessária coleta de sangue em papel de filtro seguindo critérios estabelecidos no Programa Nacional de Triagem Neonatal. Os testes e o devido tratamento devem ser realizados antes de 4 meses de vida para que tenha prevenção de outras complicações que inviabilizam uma boa qualidade de vida para criança. Podem ser utilizadas diferentes técnicas para a triagem inicial dessa doença, desde que não haja resultado inconclusivo. Caso o resultado seja inconclusivo deve ser feita uma reavaliação da amostra por outra técnica mais sensível e específica, de forma complementar, e reportar o resultado no laudo (BRASIL, 2002).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A β talassemia é uma doença hereditária que está relacionada com mutações que implicam na síntese defeituosa de cadeias β na molécula de hemoglobina. Assim, são formados agregados instáveis de outras globinas no interior dos eritrócitos, que se precipitam e tornam os eritrócitos anormais. Essas células acabam sendo mortas na medula óssea, ou então, as hemácias que vão para o sangue periférico são capturadas precocemente pelo baço, caracterizando uma eritropoese ineficaz, que dentre diversas manifestações clínicas, causa uma anemia de grau variável.

Para que esses pacientes tenham uma melhor qualidade de vida, deve ser feita uma triagem a partir do hemograma completo e observar alguns critérios, entre eles os índices hematimétricos, como CHCM, VCM e HCM, que normalmente encontram-se diminuídos nos pacientes β talassêmicos. Além disso, ao observar o esfregaço sanguíneo desses pacientes, é comum identificar alteração na morfologia celular, presença de eritroblastos e reticulócitos, e ainda, o número total de eritrócitos estão aumentados. Depois de observadas essas alterações, deve-se prosseguir com outros testes que envolvem a análise de proteínas que compõem as moléculas de hemoglobina para que seja verificada a síntese das mesmas.

Dentre as técnicas utilizadas atualmente, a eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose é a técnica mais usual por permitir a diferenciação das moléculas de hemoglobina variantes, ter baixo custo e pela facilidade em ser executada. Entretanto, existem outras técnicas capazes de fazer isso como a focalização isoelétrica, cromatografia líquida de alta performance e técnicas moleculares capazes de identificar a mutação responsável por causar a doença, que embora sejam capazes de fornecer bons resultados e de apresentarem boa resolução, muitas delas acabam sendo mais caras devido ao uso de equipamentos e/ou dependem de mão de obra treinada, tornando-as menos utilizadas na rotina de um laboratório clínico. Cada uma das técnicas tem suas particularidades, com vantagens e desvantagens, portanto, cabe ao serviço decidir qual técnica será empregada para diagnóstico das β talassemias.

É de extrema importância que seja realizada a triagem neonatal das hemoglobinopatias como a talassemia para que não aconteçam graves manifestações clínicas e o indivíduo tenha conhecimento das possíveis complicações que podem vir a acontecer. Além disso, é necessário que sejam tomadas todas as medidas possíveis para que não haja transfusões recorrentes, e não ocorra aloimunização desses pacientes e assim, evite a possibilidade de reações transfusionais e sobrecarga de ferro.

Para isso, é necessária que seja realizada uma investigação sobre o histórico familiar do paciente juntamente com a realização de exames laboratoriais, para então chegar ao diagnóstico de uma β talassemia.

REFERÊNCIAS

AGUINAGA, Maria del Pilar et al. Hemoglobinopathies: Current Practices for Screening, Confirmation and Follow-up. Maryland: Association Of Public Health Laboratories, 2015.

ALEXANDRE, Jessica Malu; MARINI, Danyelle Cristine. Conhecendo e tratando as hemoglobinopatias: anemia falciforme e beta-talassemia. Foco, Mogi guaçu, v. 4, n. 5, p. 41-60, jul./dez. 2013.

AZEVEDO, Maria Regina Andrade de. Hematologia Básica: fisiopatologia e diagnóstico laboratorial. 5. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2013. 399 p.

BELISÁRIO, André Rolim. GENÓTIPOS DA TALASSEMIA ALFA E HAPLÓTIPOS DO AGRUPAMENTO DE GENES DA GLOBINA BETA COMO MODULADORES DA GRAVIDADE NA DOENÇA FALCIFORME EM CRIANÇAS DO PROGRAMA ESTADUAL DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS MATRICULADAS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS. 2010. 178 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

BERTHOLO, Luciane Cristina; MOREIRA, Haroldo Wilson. Focalização isoelétrica na identificação das hemoglobinas. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. Araraquara, p. 163-168. jun. 2006.

BEZERRA, Marcos André Cavalcanti. Aspectos Clínicos, Bioquímicos e Moleculares das Síndromes Talassêmicas em População do Estado de Pernambuco. 2007. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Médicas, Ciências Básicas, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde (Org.). Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. 90 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Orientações para o diagnóstico e tratamento das talassemias beta. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

CARACELLI, Ignez; SCHPECTOR, Julio Zukerman. Proteínas: da extração à estrutura 3D, Bauru: Slides, 2007. 56 slides, color.

CANÇADO, Rodolfo D.. Talassemias alfa. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São Paulo, v. 28, n. 2, p.81-87, maio 2006.

CLARKE, Gwendolyn M.; HIGGINS, Trefor N.. Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. Clinical Chemistry, Alberta, v. 48, n. 8, p.1284-1290, maio 2000.

DOTTO, Fátima Rosane Colpo; SILVA, José Edson P.. Talassemias alfa e beta: Revisão. 2005. 37 f. Monografia (Especialização) - Curso de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

FERREIRA, Mônica Calil Borges. DOENÇA FALCIFORME: UM OLHAR SOBRE A ASSISTÊNCIA PRESTADA NA REDE PÚBLICA ESTADUAL – Hemocentro Regional de Juiz de Fora. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

GREER, John P. et al. Wintrobe's clinical hematology. 12. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2009. 2 v.

HOFFBRAND, Victor; PETTIT, John e. Atlas colorido de hematologia clínica. 3. ed. São Paulo: Manole, 2000.

HOFFBRAND, Vitor. Fundamentos em Hematologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 462 p.

HOSSAIN, Mir A.; BUNGERT, Jörg. Genome Editing for Sickle Cell Disease: A Little BCL11A Goes a Long Way. *Molecular Therapy*, Gainesville, v. 25, n. 3, p.561-562, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.02.003>.

LAVOURAS, Laura Inês da Cruz. HEMOGLOBINOPATIAS: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E SUA IMPORTÂNCIA. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Análises Clínicas, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.

LIMA, A. Oliveira. Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001.

LONGO, Dan L. Hematologia e oncologia de Harrison. 2 ed. Porto Alegre: AMGH, 2015.

MARTINO, Camila Cruz de. Prevalência das Beta-Talassemias em Pacientes com Anemia Falciforme de 4 Estados do Brasil. 2018. 39 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

MARTINS, Michelle Freitas. Caracterização clínica, hematológica e molecular dos adultos com β talassemia no Ceará. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Patologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MCPHERSON, Richard A.; PINCUS, Matthew R.. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 21. ed. Barueri: Manole, 2012. 1638 p.

MELGAREJO, Celsa Raquel Villaverde. BETA TALASSEMIA MENOR: ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS. 2015. 72 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia-bioquímica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "julio de Mesquita Filho" Unesp, Araraquara, 2015.

METTANANDA, Sachith; HIGGS, Douglas R.. Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia. *Hematology/oncology Clinics Of North America*, Oxford, v. 32, n. 2, p.177-191, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2017.11.003>.

MONTEIRO, Maria Lúcia de Souza. APRIMORAMENTO DA TRIAGEM NEONATAL EM UMA MATERNIDADE PÚBLICA: UM PLANO DE AÇÃO. 2014. 19 f. Monografia (Especialização) - Curso de Enfermagem, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MOTA, Debora da Silva. PROTOCOLOS TRANSFUSIONAIS EM DOENTES FALCIFORMES. 2018. 62 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

MOURA JUNIOR, Nélio Gomes de. Anemia Falciforme: um panorama atual da doença. 2017. 53 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

MULLER, Marcelo Marcos. TÉCNICA DE FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA NA DETERMINAÇÃO DE VARIEDADES DE *Helianthus tuberosus* L. 2005. 37 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

NAOUM, Paulo Cesar; BONINI-DOMINGOS, Claudia R.. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p.226-228, jun. 2007.

OLIVEIRA, Raimundo Antonio Gomes; POLI NETO, Adelino. Anemias e Leucemias: Conceitos Básicos e Diagnóstico por Técnicas Laboratoriais. São Paulo: Roca, 2004.

OMS (Org.). Controle de doenças hereditárias. Geneva: Oms, 1996. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41846/WHO_TRS_865.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 09 jul. 2019.

ORIGA, Raffaella. β -Thalassemia. Genetics In Medicine, Cagliari, v. 19, n. 6, p.609-619, 3 nov. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2016.173>.

PAULA, Erich V. de; SAAD, Sara T. O.; COSTA, Fernando F.. Quelação oral de ferro na Beta-Talassemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, Campinas, v. 25, n. 1, p.59-63, maio 2003.

RIBEIL, Jean-antoine et al. Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *New England Journal Of Medicine*, Paris, v. 376, n. 9, p.848-855, 2 mar. 2017. *New England Journal of Medicine (NEJM/MMS)*. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1609677>.

SABATH, Daniel E.. Molecular Diagnosis of Thalassemias and Hemoglobinopathies. *American Journal Of Clinical Pathology*, Seattle, v. 148, n. 1, p.6-15, 12 jun. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/aqx047>.

SILVA, Alexsandro Macedo; RIBEIRO NETO, Luciane Maria. *Hematologia: Métodos e interpretação*. São Paulo: Roca, 2013. 450 p.

SILVA, Paulo Henrique da et al. *Hematologia laboratorial: Teoria e procedimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2016.

SIMÕES, Belinda P. et al. Consenso Brasileiro em Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas: Comitê de Hemoglobinopatias. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, Ribeirão Preto, v. 32, n. 1, p.46-53, nov. 2009.

TEIXEIRA, Pedro Miguel dos Santos. *Hemoglobinopatias: Clínica, diagnóstico e terapêutica*. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.

THOMPSON, Alexis A. et al. Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *New England Journal Of Medicine*, Chicago, v. 378, n. 16, p.1479-1493, 19 abr. 2018. *New England Journal of Medicine (NEJM/MMS)*. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1705342>.

TRAEGER-SYNODINOS, Joanne et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis

of the haemoglobinopathies. *European Journal Of Human Genetics*, [s.l.], v. 23, n. 4, p.426-437, 23 jul. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2014.131>.

TORRES, Felipe R.; BONINI-DOMINGOS, Claudia R.. Hemoglobinas humanas – hipótese malária ou efeito materno?. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, São José do Rio Preto, v. 27, n. 1, p. 53-60, mar. 2005.

WEATHERALL, David John; CLEGG, John B.. *The Thalassaemia Syndromes*. 4. ed. Oxford: Blackwell Science, 2001

WILLIAMS, Thomas N.; WEATHERALL, David J.. World Distribution, Population Genetics, and Health Burden of the Hemoglobinopathies. *Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine*, Reino Unido, v. 2, n. 9, p.1-15, 1 set. 2012. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a011692>. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/9/a011692.full.pdf+html>>. Acesso em: 27 mar. 2019.

ZAGO, Marco Antonio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo. *Hematologia: Fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu, 2004.

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

ZAHA, Arnaldo. *Biologia molecular básica*. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014.