

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE HEMOGLOBINA S
EM DOADORES DE SANGUE NA REGIÃO DE
SANTA MARIA-RS E ACONSELHAMENTO
GENÉTICO FAMILIAR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Letícia Loi Giovelli

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE HEMOGLOBINA S EM
DOADORES DE SANGUE NA REGIÃO DE SANTA MARIA-
RS E ACONSELHAMENTO GENÉTICO FAMILIAR**

por

Letícia Loi Giovelli

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva
Co-orientadora: Profa. Dra. Simone Martins de Castro

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE HEMOGLOBINA S EM DOADORES
DE SANGUE NA REGIÃO DE SANTA MARIA-RS E
ACONSELHAMENTO GENÉTICO FAMILIAR**

elaborada por
Letícia Loi Giovelli

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

**José Edson Paz da Silva, Dr.
(Presidente/ Orientador)**

Sandra Trevisan Beck, Dr^a (UFSM)

Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 18 de Fevereiro de 2009.

AGRADECIMENTOS

À Deus, criador e instrutor permanente, pelas lições de humildade e de paciência.

Aos meus pais, Luiz e Leda Loi, por me ensinarem valores e princípios primordiais para minha vida, pela presença constante e apoio, me incentivando e encorajando a seguir em frente e superar os obstáculos.

Ao meu irmão, Leandro Nascimento Loi, pela dedicação e disposição me auxiliando sempre que necessário.

Ao professor Dr. José Edson Paz da Silva, pela orientação, apoio e incentivo para realização deste trabalho. Obrigada pelas oportunidades e pela amizade.

À professora Dra. Simone Martins de Castro, pelas idéias, orientação, amizade e incentivo.

Aos Professores e Funcionários do Curso de Mestrado da UFSM pela cooperação e amizade.

À Karina Danieli, bolsista de iniciação científica, pelo auxílio com as comparações de metodologias e pela disposição e amizade.

À Ana Paula Santin e Sandrine Comparsi Wagner, da UFRGS, pela colaboração com as análises das amostras no estudo molecular.

À bioquímica do Banco de Sangue do HUSM, Adriana Najai Stein Bortolotto, pela amizade, cooperação e auxílio com as coletas de amostras.

Ao bioquímico Zanoni Segala, aos médicos, bioquímicos, técnicos, funcionários e estagiários do Banco de Sangue do HUSM, pela atenção, recepção calorosa e auxílio com dados e amostras para a pesquisa.

À enfermeira Ângela Maria Naidon e bioquímica Miria Esquiavini Gonçalves do Banco de Sangue do Hospital de Caridade Dr. Astrogildo de Azevedo, pela colaboração com as coletas de amostras e orientação aos doadores.

À Letícia do Nascimento e Lisandre Kipper Aguiar, do Banco de Sangue da Casa de Saúde, pela ajuda com coleta de dados e orientação aos doadores.

À bioquímica Iria Faria e demais funcionários do Laboratório de HematoOnco do Hospital Universitário de Santa Maria, pelo auxílio com material e treinamento na parte experimental.

À Alice Odette Brülé e demais funcionários e estagiários do Laboratório de Biologia Molecular do HUSM, pela amizade, atenção e disposição nos ensinamentos de biologia molecular.

Aos colegas e amigos do Mestrado, Aline Klein Mastella, Rossana Barcelos Friedrich, Marcela Arend, Tatiane Spader, Michel Mansur Machado, Rochele Rohde Pozzobon, Elizandra Leal Steffen, por dividirem as dificuldades e conquistas durante este período.

À CAPES pelo apoio financeiro.

E, por fim, ao meu marido, Eduardo Giovelli, por toda a ajuda, incentivo, carinho e compreensão durante esta caminhada e ao meu filho Guilherme Loi Giovelli, pela alegria, disposição e amor.

EPÍGRAFE

É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e
ver a vida passar.

É melhor tentar, ainda que em vão que
sentar-se, fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias
frios em casa me esconder.

Prefiro ser feliz embora louco, que em
conformidade viver.

Martin Luther King

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE HEMOGLOBINA S EM DOADORES DE SANGUE NA REGIÃO DE SANTA MARIA-RS E ACONSELHAMENTO GENÉTICO FAMILIAR

AUTORA: LETÍCIA LOI GIOVELLI

ORIENTADOR: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de Fevereiro de 2009

A Anemia Falciforme é a patologia hereditária monogênica mais freqüente no mundo. A causa dessa doença é uma mutação de ponto na posição seis do gene da globina beta da hemoglobina, trocando o ácido glutâmico por uma valina, com conseqüente modificação físico-química da molécula e originando uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (HbS). O traço falciforme caracteriza o portador assintomático, heterozigoto (HbAS), que não apresenta a doença, nem possui anormalidades no número e forma das hemácias. Esta situação de portador é muito freqüente, no Brasil pode atingir 1 a 5% da população em geral e 6 a 10% dos descendentes africanos, sendo que a maior importância do seu diagnóstico é para o aconselhamento genético da população afetada. Este trabalho teve como objetivos determinar a prevalência do traço falciforme nos doadores de sangue da Região de Santa Maria, promover um aconselhamento genético informando sobre os riscos reprodutivos, comparar os métodos de triagem mais utilizados na detecção da Hb S nos bancos de sangue, quantificar as hemoglobinas anormais encontradas através de eletroforese quantitativa e confirmar através de estudo molecular. O estudo da prevalência de Hb AS nos bancos de sangue foi realizado com a triagem de 26.071 doadores de sangue que se apresentaram aos bancos de sangue do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Hospital de Caridade Dr. Astrogildo de Azevedo e Casa de Saúde. O aconselhamento genético foi realizado através de orientação individual com explicações sobre a condição de portador do traço falciforme e conscientização dos riscos genéticos. Para a comparação das metodologias de triagem de detecção de Hb S foi analisado um total de 4.108 doadores pelos métodos de solubilidade, gel-centrifugação Diamed ID-HbS e eletroforese alcalina qualitativa em fitas de acetato de celulose. Do total de doadores, 88 (0,34%) apresentaram resultado alterado com a presença da Hb S. No aconselhamento genético, 57 (85%) doadores de sangue com traço falciforme compareceram para participar do aconselhamento. Na comparação de metodologias, 23 doadores (0,56%) apresentaram Hb S e 2 doadores (0,05%) apresentaram Hb C. A freqüência para a presença da Hb S nos doadores de sangue pela eletroforese de hemoglobinas foi de 23 (0,56%), pelo teste de solubilidade foi de 22 (0,53%) e pelo teste de gel-centrifugação foi de 20 (0,49%). O teste de solubilidade apresentou 95,6% de sensibilidade e o teste de gel-centrifugação Diamed ID-HbS apresentou 86,9% de sensibilidade quando comparados com a eletroforese de hemoglobinas e ambos mostraram-se 100% específicos. Este estudo mostrou que a prevalência de 0,34% de Hb AS encontrada é um valor que deve ser muito próximo à realidade da região por apresentar um número bastante expressivo de doadores testados. O teste de solubilidade apresentou boa especificidade e sensibilidade demonstrando ser um bom método de escolha para aplicação na triagem de Hb S em doadores de sangue.

Palavras-chave: Traço Falciforme, Prevalência, Metodologias, Aconselhamento Genético

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria

STUDY OF PREVALENCE OF HEMOGLOBIN S FOR BLOOD DONORS IN THE REGION OF SANTA MARIA-RS AND GENETIC COUNSELING FAMILY

AUTHOR: LETÍCIA LOI GIOVELLI

ADVISER: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA

Presentation date: Santa Maria, February 18, 2009.

The Sickle Cell Anemia is the most common monogenic hereditary disease in the world. The cause of this disease is a changing point in the position six of the beta globin gene for hemoglobin, changing the glutamic acid by a valine, with consequent physical and chemical modification of the molecule and result in abnormal hemoglobin, called hemoglobin S (HbS). The sickle cell trait characterized the asymptomatic carriers, heterozygous (HbAS), which does not present the disease or have abnormalities in the number and shape of red blood cells. Carriers in this situation is very frequent, in Brazil can reach 1 to 5% of the general population and from 6 to 10% of African descent, and the greater importance of their diagnosis is for genetic counseling of the affected population. This study aimed to determine the prevalence of sickle cell trait blood donors in the region of Santa Maria, promoting a genetic counseling reporting on reproductive risks, compare the most widely used screening methods for the detection of Hb S in blood banks, quantify abnormal hemoglobin found through quantitative electrophoresis and confirmed by molecular analysis. The study of the prevalence of Hb AS in blood banks was carried out with the screening of 26,071 blood donors who presented to the banks of blood from the University Hospital of Santa Maria (HUSM), Charity Hospital Dr. Astrogildo of Azevedo and Health House. Genetic counseling was conducted through individual guidance with explanations about the condition of sickle cell trait and awareness of genetic risk. To compare the methods of screening for detection of Hb S was analyzed a total of 4,108 donors by the methods of solubility, gel-centrifugation Diamed ID-HbS and hemoglobin electrophoresis qualitative in cellulose acetate. Of the total donors, 88 (0.34%) had results changed with the presence of Hb S. In genetic counseling, 57 (85%) blood donors with sickle cell trait came to attend counseling. In the comparison of methodologies, 23 donors (0.56%) had Hb S and 2 donors (0.05%) had Hb C. The frequency for the presence of Hb S in blood donors by the electrophoresis of hemoglobin was 23 (0.56%), the solubility test was 22 (0.53%) and gel-centrifuge test was 20 (0.49%). The solubility test showed 95.6% sensitivity and gel-centrifuge test Diamed ID-HbS showed 86.9% sensitivity when compared with the electrophoresis of hemoglobin and both proved to be 100% specific. This study showed that the prevalence of 0.34% of Hb AS is a value found to be very close to the reality of the region to present a very significant number of donors tested. The solubility test showed good specificity and sensitivity demonstrating to be a good method of choice for application in screening of Hb S in blood donors.

Keywords: Sickle Cell Trait, Prevalence, Methodologies, Genetic Counseling

LISTA DE ABREVIATURAS

AS	Heterozigose presente em indivíduos com Traço Falciforme
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Δ ALA	Ácido delta levulínico
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CO ₂	Dióxido de Carbono
CAR	República Centro Africana
cm	Centímetro
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
2,3 DPG	2,3 Difosfoglicerato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Gramas
°C	Grau Centígrado
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido Clorídrico
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
HU	Hidroxiuréia
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
IEF	Focalização Isoelétrica

LPLC	Cromatografia Líquida de Baixa Pressão
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
NO	Óxido Nítrico
O. N.	Over night
O ₂	Oxigênio
P.A.	Pureza para análise
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI	Ponto Isoelétrico
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
STA	Síndrome Torácica Aguda
SUS	Sistema Único de Saúde
TRIS	(hidroximetil) aminometano
VCM	Volume Corpuscular Médio
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Hemoglobina.....	18
2.1.1 Molécula de Hemoglobina.....	18
2.1.2 Função da Hemoglobina.....	19
2.1.3 Alterações das Hemoglobinas.....	21
2.2 Hemoglobina S (Hb S).....	22
2.2.1 Histórico.....	22
2.2.2 Fisiopatologia.....	24
2.3 Hemoglobina C (Hb C).....	27
2.4 Anemia Falciforme (Sickle Cell Disease).....	28
2.4.1 Características.....	28
2.4.2 Manifestações Clínicas.....	29
2.4.3 Tratamento.....	33
2.5 Traço Falciforme.....	35
2.5.1 Características.....	35
2.5.2 Traço Falciforme Versus Bancos de Sangue.....	38
2.5.3 Aconselhamento Genético e Triagem Familiar nos Bancos de Sangue.....	40
2.5.4 Diagnóstico do Traço Falciforme nos Bancos de Sangue.....	42
2.5.5 Prevalência de Hemoglobinopatias em Bancos de Sangue.....	45
3. OBJETIVOS.....	49
4. RESULTADOS.....	51
4.1 Artigo 1.....	51
4.2 Artigo 2.....	64

4.3 Artigo 3.....	77
5. DISCUSSÃO.....	93
6. CONCLUSÕES.....	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
8. APÊNDICE.....	112
8.1 Apêndice A.....	112
8.2 Apêndice B.....	114
8.3 Apêndice C.....	115

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias compreendem um grupo de distúrbios hereditários que afetam os genes que codificam as cadeias globínicas alfa (α) e beta (β) da molécula de hemoglobina. Com padrão de herança autossômico recessivo, as hemoglobinopatias são desordens hereditárias muito freqüentes, afetando aproximadamente 7% da população mundial. Atualmente, já foram descritas mais de 1.200 mutações nos genes das cadeias globínicas (LOBO et al., 2003; SOMMER et al., 2006).

Cerca de 900 variantes de hemoglobinas (Hb) já foram descritas, sendo as mais freqüentes a Hb S, Hb C e a Hb D Punjab (NAOUM, 1997; CHINELATO-FERNANDES, BONINI-DOMINGOS, 2005). Quando o controle genético falha (substituição ou mudança da seqüência), é que surgem as chamadas hemoglobinas variantes (NAOUM, 1997). A simples troca de um único aminoácido na composição da cadeia beta globínica provoca o surgimento de uma estrutura hemoglobínica nova, com propriedades físico-químicas bastante diferentes da hemoglobina normal devido à perda de cargas elétricas. Exibe também diferente estabilidade e solubilidade, mostrando uma forte tendência à formação de polímeros quando está em sua forma desoxigenada (NETO, PITOMBEIRA, 2003).

Dentre as hemoglobinopatias, a Anemia Falciforme é a patologia hereditária monogênica mais freqüente no mundo. A causa dessa doença é uma mutação de ponto na posição seis do gene da globina beta da hemoglobina, trocando o ácido glutâmico por uma valina, com conseqüente modificação físico-química da molécula e originando uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (HbS), ao invés da hemoglobina normal, denominada hemoglobina A (HbA) (TOMÉ-ALVES et al., 2000; ANVISA, 2002; LOUREIRO, ROZENFELD, 2005; SILVA et al., 2006). Em geral, os pais são portadores assintomáticos de um único gene afetado (heterozigotos AS), transmitindo, cada um deles, o gene alterado para a criança que, assim, recebe o gene alterado em dose dupla (homozigoto SS) (SILVA et al., 2006). Em determinadas situações, principalmente de baixas concentrações de oxigênio, as moléculas de Hb S podem sofrer polimerização,

com falcização das hemácias, ocasionando a destruição prematura das hemácias e conseqüente anemia hemolítica crônica, fenômenos de oclusão de pequenos vasos sangüíneos, episódios de dor e lesão de diversos órgãos (DUCATTI, et al., 2001; SILVA et al., 2006).

O traço falciforme caracteriza o portador assintomático, heterozigoto (HbAS), que não apresenta a doença nem possui anormalidades no número e forma das hemácias (NAOUM, 1997, p. 42; ALVES et al., 2000). Embora o traço falciforme seja assintomático, há relatos de morte súbita e complicações clínicas, especialmente quando os portadores são expostos a condições extremas de baixa tensão de oxigênio (McCURDY, 1974; RAMALHO, 1976; NAOUM, 1997, p. 43; SILVA, RAMALHO, 1997; ARAÚJO et al., 2004; OULD AMAR, 2006; GRIGNANI et al., 2006). Como diversos autores mostram, essa situação de portador é muito freqüente, no Brasil, pode atingir 1 a 5% da população em geral e 6 a 10% dos descendentes africanos, sendo que a maior importância do seu diagnóstico é para o aconselhamento genético da população afetada (SILVA, RAMALHO, 1997; RAMALHO et al., 2002; DAUDT et al., 2002; ANVISA, 2002; LOUREIRO, ROZENFELD, 2005; SOMMER et al., 2006).

Os portadores do traço falciforme são clínica e hematologicamente saudáveis e, assim, aptos à doação de sangue. Entretanto, esse sangue possui uma utilização restrita, principalmente em portadores de hemoglobinopatias, na acidose grave, nos recém-nascidos e na transfusão intra-uterina, devido ao potencial de falcização das hemácias nessas condições do receptor. Além disso, estão sendo relatadas dificuldades operacionais durante o processamento desse sangue (RAMALHO, 1976; SILVA, RAMALHO, 1997; OULD AMAR, et al., 1997; PRUDÊNCIO et al., 2000; STRONCEK et al., 2002; OULD AMAR, 2006; GRIGNANI et al., 2006). Assim, para aumentar a eficácia terapêutica das transfusões sangüíneas, a detecção de Hb S em doadores de sangue no Brasil foi indicada pela Portaria nº 1376 de 19 de novembro de 1993 (BRASIL,1993), mas a triagem das hemoglobinas anormais nos doadores de sangue se tornou obrigatória a partir de junho de 2004, de acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-RDC 153/04 (BRASIL, 2004).

Em virtude dessa nova Resolução que impôs a obrigatoriedade da realização de uma técnica para detectar as hemoglobinas anormais nos bancos de

sangue, visto que o traço falciforme é uma alteração muito freqüente no Brasil, com nítidas diferenças regionais marcadas pelo processo de miscigenação da população, e ainda, por inexistir estudo da prevalência dessa alteração em nossa região, justifica-se a importância da realização desta pesquisa. Assim, este trabalho teve como objetivo geral determinar a prevalência do traço falciforme nos doadores de sangue da Região de Santa Maria e promover um aconselhamento genético informando sobre os riscos reprodutivos.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hemoglobina:

2.1.1 Molécula de Hemoglobina:

A hemoglobina é uma proteína de estrutura globular e quaternária, com peso molecular de 64.500 Daltons, pigmentada e composta por quatro cadeias polipeptídicas, ou cadeias globínicas, sendo um par denominado de cadeias do tipo alfa e o outro do tipo não-alfa. Sua estrutura é quimicamente ligada a um núcleo prostético de ferro, a ferroprotoporfirina IX (heme) (NAOUM, 1997, p.16; LORENZI et al., 2003, p. 56; NETO, PITOMBEIRA, 2003).

O heme é formado por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por um átomo de ferro. O ferro do heme chega ao eritroblasto, a célula formadora de hemoglobina, ligado a uma proteína transportadora chamada transferrina. Esse complexo ferro-transferrina formado se liga à membrana celular, através de receptores específicos, é absorvido formando uma vesícula, na qual o ferro permanece, e a transferrina volta ao plasma para continuar o transporte de mais ferro. Esse ferro intracitoplasmático entra na mitocôndria para que seja utilizado na síntese do heme. Para a síntese do heme, os eritroblastos utilizam também os aminoácidos glicina e ácido succínico. Uma molécula de cada um dos aminoácidos se condensa para formar o ácido delta levulínico ou Δ ALA. Após, duas moléculas de Δ ALA se condensam formando um anel pirrólico e, então, quatro anéis pirrólicos formam um anel tetrapirrólico. Esse anel tetrapirrólico permanece unido por pontes de meteno formando a protoporfirina, sendo esse o ponto em que o ferro é incorporado à molécula formando o heme (LORENZI et al., 2003, p. 56 e 57).

A globina constitui a maior porção da molécula da hemoglobina e a sua síntese se faz no ribossomo citoplasmático. O que comanda a formação das globinas são os genes das células eritroblásticas. Existem quatro diferentes genes que formam as quatro cadeias polipeptídicas das globinas normais de um indivíduo

adulto. Essas cadeias são denominadas alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ). As moléculas dos quatro tipos de globinas são chamadas monômeros e se associam em quatro cadeias formando tetrâmeros. (LORENZI et al., 2003, p. 59).

A gênese das cadeias globínicas é regulada por agrupamentos de genes nos cromossomos 11 e 16, nos períodos embrionário, fetal e adulto, quando diferentes grupos de genes são ativados ou suprimidos sintetizando as diferentes cadeias globínicas. As diferentes combinações entre essas cadeias globínicas possibilitam o surgimento de hemoglobinas distintas e, para que o tetrâmero funcional seja formado é necessário um perfeito equilíbrio na produção dessas cadeias (NETO, PITOMBEIRA, 2003). No braço curto do cromossomo 16, localizam-se o gene zeta, que codifica as cadeias zeta globínicas, dois pseudogenes, e os genes alfa 1 (α_1) e alfa 2 (α_2), responsáveis pela codificação das cadeias globínicas alfa. No cromossomo 11, localiza-se o complexo dos genes beta, em que se encontram os genes épsilon, gama-glicina, gama-adenina, um pseudogene e os genes delta (δ) e beta (β) (NETO, PITOMBEIRA, 2003; NAOUM, 1997, p. 16).

As combinações entre as diferentes globinas determinam os seis tipos de hemoglobinas humanas produzidas nas fases do desenvolvimento caracterizadas como embrionária (Hemoglobina Gower-1, Portland e Gower-2), fetal e pós-nascimento (Hemoglobina A, A₂ e F) (NAOUM, 1997, p. 23). As diferenças entre as hemoglobinas sintetizadas durante o desenvolvimento do indivíduo, do período embrionário até o adulto, ocorrem para preencher as diferentes necessidades de oxigênio nessas fases. Assim, existe uma faixa de normalidade percentual das hemoglobinas encontradas nos adultos que é: Hb A 95-98%, Hb A₂ 1,5-3% e Hb F 0-1% (LORENZI et al., 2003, p. 59 e 60).

2.1.2 Função da Hemoglobina:

A hemoglobina contida nos eritrócitos desenvolve uma importante função que é o transporte de oxigênio (O₂) dos pulmões para os tecidos e do dióxido de carbono (CO₂) dos capilares teciduais para os pulmões. O transporte de oxigênio se baseia na capacidade do ferro da hemoglobina combinar-se reversivelmente com o oxigênio molecular (NAOUM, 1997, p.18; LORENZI et al., 2003, p.62).

Para cada decilitro (dL) de sangue arterial oxigenado, há cerca de 20 mL de O_2 combinados com a hemoglobina e 0,3 mL de O_2 dissolvido no plasma. Assim, o O_2 dissolvido no plasma aparece em quantidade muito pequena, somente essa quantidade não é suficiente aos tecidos e, se não houver a participação da hemoglobina nesse processo, essa troca não será eficiente (LORENZI et al., 2003, p.62).

A hemoglobina fica saturada de O_2 , pois a tensão de O_2 no pulmão é alta e, quando o sangue arterial chega aos capilares dos tecidos, encontra uma tensão de O_2 muito menor. Então, o O_2 tanto do plasma quanto da hemoglobina atravessa a parede do capilar e vai às células do tecido. A saturação de O_2 baixa nos capilares após a saída do O_2 e isso permite a entrada de CO_2 para a troca gasosa (LORENZI et al., 2003, p.62).

Portanto, além do O_2 , o sangue também transporta CO_2 , cuja taxa é elevada nos tecidos. Nesse local, ocorre absorção do CO_2 pelos eritrócitos e uma parte dele é convertida em ácido carbônico pela enzima anidrase carbônica e outra parte se combina com a hemoglobina formando a carbamino-hemoglobina. Nos pulmões, como a pressão de CO_2 é pequena, esse gás é liberado dos eritrócitos. Esse processo de ligações da hemoglobina com O_2 e CO_2 que permite a troca gasosa entre pulmões e tecidos, é chamado efeito Bohr (LORENZI et al., 2003, p.63).

Um fator determinante para a hemoglobina acontece quando ocorrem as trocas gasosas de O_2 e CO_2 , pois a sua molécula sofre modificações na sua conformação. Quando ela está saturada de O_2 , forma-se a oxi-hemoglobina, que tem configuração diferente da desoxi-hemoglobina, que se forma quando a saturação de O_2 é baixa. Essa mudança de conformação decorre da presença de uma substância liberada durante o metabolismo da glicose, o 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG). O 2,3 DPG se liga e se desliga da molécula de hemoglobina, modificando a sua função, assim, quando se forma a desoxi-hemoglobina o 2,3 DPG está ligado reduzindo a afinidade da hemoglobina pelo O_2 e levando à liberação desse para os tecidos. A expulsão do 2,3 DPG e do CO_2 da molécula da desoxi-hemoglobina provoca a absorção do O_2 , sua ligação com o heme, formando-se a oxi-hemoglobina (LORENZI et al., 2003, p.63 e 64).

2.1.3 Alterações das Hemoglobinas :

As alterações das hemoglobinas ocorrem devido a mudanças na síntese estrutural e quantitativa dos aminoácidos que formam as cadeias globínicas e também envolvem as moléculas e enzimas que participam da formação do grupamento heme. As alterações que envolvem as cadeias de globina se devem à modificação nos genes responsáveis pelo seqüenciamento e estrutura dos polipeptídeos, bem como naqueles genes que regulam a síntese quantitativa desses polipeptídeos (NAOUM, 1997, p.31).

Quando as alterações das hemoglobinas aparecem como resultado de mutações dos genes alfa, beta, gama ou delta, como conseqüência, as cadeias de globina se formam de maneira anormal e são chamadas hemoglobinas variantes, perturbando a função desempenhada pela hemoglobina dos eritrócitos (NAOUM, 1997, p.31; LORENZI et al., 2003, p.61). Assim, as hemoglobinas variantes são aquelas que apresentam estrutura química diferente à da sua hemoglobina normal correspondente, motivada pela mutação de bases nitrogenadas que resultam na substituição de um ou mais aminoácidos nas globinas; como exemplo dessas alterações estão as Hb S e C (NAOUM, 1997, p.31). A Anemia Falciforme ou Drepanocítica é um exemplo de defeito qualitativo da cadeia de globina, no qual ocorre a introdução da valina no lugar do ácido glutâmico, localizado na posição seis do gene da cadeia beta por um processo de mutação (NAOUM, 1997, p.31; LORENZI et al., 2003, p.61).

As mutações que afetam os genes para a síntese quantitativa das globinas provocam um bloqueio de síntese de uma das globinas com intensidades variáveis. Assim ocorrem desequilíbrios do conteúdo entre a globina produzida e a bloqueada, acarretando acúmulo de uma das globinas com conseqüências fisiopatológicas dependentes do tamanho do desequilíbrio ocorrido, como exemplo dessas alterações estão as talassemias (NAOUM, 1997, p.31). As alterações da hemoglobina também podem ser acarretadas devido a distúrbios enzimáticos que envolvem a síntese de heme e causam defeitos hereditários da síntese de porfirina, provocando o surgimento das porfirias e protoporfirias eritropoiéticas (NAOUM, 1997, p.32).

Além dessas alterações da hemoglobina, também são encontradas mutações genéticas que resultam em persistência de síntese da hemoglobina fetal durante a vida adulta. O teor de hemoglobina fetal a partir do nascimento deve cair progressivamente, atingindo, no segundo ano de vida, taxas próximas as do adulto ($\leq 1\%$). Mas, na persistência da hemoglobina fetal, a síntese de cadeias gama persiste durante a idade adulta. Existe forma homozigótica e heterozigótica, a primeira podendo manifestar discretos traços talassêmicos (LORENZI et al., 2003, p.267).

As hemoglobinopatias são designações destinadas às hemoglobinas variantes e talassemias que causam hemólise, policitemia, cianose, anemia ou falcização. Existe um grande número de hemoglobinopatias e, portanto, elas resultam de um defeito qualitativo ou quantitativo numa das cadeias alfa ou beta de globina (NAOUM, 1997, p.31; LORENZI et al., 2003, p.61).

2.2 Hemoglobina S (Hb S):

2.2.1 Histórico:

Em 1910, James B. Herrick publicou o primeiro caso de anemia falciforme, em que descreveu a presença de “corpúsculos vermelhos alongados em formato de foice” no sangue de um estudante negro de Granada que apresentava dor recidivante e anemia grave (HERRICK, 1910 apud LUKENS, LEE, 1998, p. 1121; EMBURY, 1997, p. 976). Bem antes da descrição de Herrick, tribos africanas já conheciam o distúrbio, dando-lhe várias expressões que transmitiam a sensação de dor recidivante (EMBURY, 1997, p. 976). Exames radiológicos de ossos de pessoas que viveram na África há mais de 7.000 anos mostravam lesões características dessa condição mórbida. É interessante destacar que os doentes eram identificados por tatuagem incisional para facilitar o diagnóstico e proibir o casamento com membros sadios do grupo (NAOUM, 1997, p. 36).

Em 1917, Emmel observou a transformação da hemácia na sua forma original, bicôncava, para a forma falciforme *in vitro* (EMMEL, 1917 apud LUKENS,

LEE, 1998, p. 1121). O termo doença falciforme ou “sickle cell disease” foi utilizado pela primeira vez, em 1922, por Mason. Esse autor relacionou algumas características comuns entre os portadores dessa doença, assim, todos eram negróides, apresentavam icterícia, fraqueza, úlceras de membros inferiores, anemia intensa, reticulocitose e eritrócitos falcizados no sangue periférico (NAOUM, 1997, p. 36). Em 1927, Hahn e Gillespie demonstraram as condições que afetam o fenômeno de falcização *in vitro*, incluindo pH, temperatura, fixadores, tonicidade e outras (HAHN, GILLESPIE, 1927 apud LUKENS, LEE, 1998, p. 1121). Diggs e Bill, em 1935, perceberam que algumas dessas células se mantinham na forma falcizada, mesmo após reoxigenação (NAOUM, 1997, p. 36). Em 1940, Ham e Castle formularam a hipótese do atual consagrado “ciclo vicioso de eritrostase” (EMBURY, 1997, p. 976). Essa teoria demonstrava que esse ciclo de estase nas células sangüíneas causava um aumento de viscosidade sangüínea, com demora do fluxo sangüíneo através dos capilares, diminuindo a tensão de oxigênio e provocando mais falcização (NAOUM, 1997, p. 36).

Ainda em 1940, Sherman demonstrou que as células falciformes, ao serem desoxigenadas, exibiam birrefringência óptica. Esse acontecimento foi a primeira evidência de que a hemoglobina S, na ausência de oxigênio, apresentava uma estrutura ordenada no interior dos eritrócitos e sugeriu que a Hb S era diferente da hemoglobina normal (SHERMAN, 1940 apud LUKENS, LEE, 1998, p. 1121; NAOUM, 1997, p. 36). Em 1947, Accioly, no Brasil, pela primeira vez, sugeriu que a falcização ocorria como conseqüência de uma herança autossômica dominante. Entretanto, só em 1949, através das pesquisas de Neel e Beet, é que se definiu a doença somente em estado de homozigose, sendo os heterozigotos portadores assintomáticos (NEEL, 1949 apud LUKENS, LEE, 1998, p. 1121; NETO, PITOMBEIRA, 2003). Também em 1949, Pauling e seus colaboradores mostraram que havia uma diferente migração eletroforética da hemoglobina de pacientes com anemia falciforme quando em comparação com a hemoglobina de indivíduos normais e atribuíram esse fenômeno à mudança de carga da globina (PAULING, 1949 apud LUKENS, LEE, 1998, p. 1121; NETO, PITOMBEIRA, 2003). Posteriormente, coube a Ingram, em 1956, elucidar a natureza bioquímica dessa doença, demonstrando que a anormalidade da Hb S era devida à substituição do ácido glutâmico pela valina na posição seis da cadeia beta da globina, produzindo

a perda de duas cargas negativas por molécula de hemoglobina (INGRAM, 1956 apud LUKENS, LEE, 1998, p. 1121; NAOUM, 1997, p. 37). A partir de 1978, com as observações iniciais de Kan e Dozy, novo impulso foi dado ao estudo da Hb S, pela introdução de técnicas de biologia molecular (NAOUM, 1997, p. 37).

2.2.2 Fisiopatologia:

A Hb S é formada devido à mutação no gene beta da globina, produzindo uma alteração estrutural na molécula. No gene beta S, ocorre a substituição de uma base nitrogenada (adenina por timina) do códon GAG para GTG, resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina na posição seis da globina beta. A valina é um aminoácido neutro ($pI \sim 6$) e o ácido glutâmico é carregado negativamente ($pI = 2,8$). Essa mutação altera o ponto isoelétrico (pI) da Hb S, tornando-a menos negativa (pI da HbA = 6,8; pI da HbS > 6,8), fato que altera a mobilidade da Hb S para uma mobilidade mais lenta quando comparada com a Hb A em eletroforese alcalina (pH 8 a 9) (NAOUM, 1997, p. 37, MANFREDINI, 2007).

Portanto, a simples troca de um único aminoácido na composição da cadeia beta globínica provoca o surgimento de uma estrutura hemoglobínica nova. Essa hemoglobina possui propriedades físico químicas bastante diferentes da hemoglobina normal devido à perda de cargas elétricas, exibe também diferente estabilidade e solubilidade, mostrando uma forte tendência à formação de polímeros, quando em sua forma desoxigenada (NETO, PITOMBEIRA, 2003). A molécula de Hb S, no estado oxigenado, apresenta-se “relaxada” e, nessa conformação estrutural, as globinas ficam mais separadas; mas, no estado desoxigenado, a molécula de Hb S se torna esticada e as globinas ficam mais próximas (NAOUM, 1997, p. 37 e 38; ELGHETANY, DAVEY, 1999, p. 641; MANFREDINI, 2007; ZAGO, PINTO, 2007). Essa mudança de conformação favorece o contato entre as regiões da desoxi-hemoglobina, sendo que, no estado oxigenado isso não é possível. Na forma desoxigenada e com a presença da valina, que interage com o receptor fenilalanina e leucina na molécula adjacente de Hb S, ocorre uma interação hidrofóbica que desencadeia a formação dos polímeros. Os polímeros são compostos por 14 fibras de 21nm de diâmetro, cuja estrutura básica consiste de sete pares de filamentos, um interno e seis periféricos, enovelados entre si, num processo chamado de nucleação, o qual progride com o

alongamento e alinhamento de mais fibras, criando uma estrutura multipolimérica, na forma de um eixo axial no interior da célula (EMBURY, 1997, p. 978; NETO, PITOMBEIRA, 2003). Esses feixes de cristais dentro das hemácias podem ser vistos à microscopia eletrônica e determinam deformações na célula. Assim, forma-se um número considerável de moléculas agregadas que constituem longos feixes de polímeros mudando a morfologia do eritrócito para uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice”, “falcizada” ou “sickle cell” (NAOUM, 1997, p. 37 e 38; ELGHETANY, DAVEY, 1999, p. 641; MANFREDINI, 2007; ZAGO, PINTO, 2007).

A velocidade e a extensão da formação de polímeros, no interior das hemácias, estão na dependência de algumas variáveis independentes: grau de desoxigenação, concentração intracelular de Hb S, temperatura, presença ou ausência de outras hemoglobinas e talassemias (NAOUM, 1997, p. 37; NETO, PITOMBEIRA, 2003). O oxigênio é o elemento mais importante, pois somente a desoxi-Hb S se polimeriza. Dessa forma, qualquer fator que facilite o estado desoxi-Hb S reduzirá a afinidade pelo oxigênio, perpetuando o estado desoxigenado e a polimerização; como exemplo, tem-se a diminuição do pH sanguíneo (NAOUM, 1997, p. 37 e 38). Uma das conseqüências da polimerização é a desidratação celular devido à alteração da bomba de sódio/potássio, com perdas de íons potássio e água, estimulados pela acidificação, edema celular e aumento do cálcio intracelular pela falência da bomba de cálcio/ATPase e, conseqüentemente, aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média da desoxi-Hb S (NAOUM, 1997, p. 40; NETO, PITOMBEIRA, 2003; MANFREDINI, 2007; ZAGO, PINTO, 2007).

A alteração da membrana do eritrócito reflete as alterações que ocorrem no interior da célula, essas modificações possuem conseqüências que se amplificam levando às manifestações clínicas. Dentre as alterações da membrana, ocorre o rearranjo das proteínas espectrina-actina, diminuição de glicoproteínas, geração de radicais oxidantes, externalização da fosfatidilserina e aceleração da apoptose, pelo aumento da atividade do cálcio intracelular. Com essas alterações na membrana e com o enrijecimento de todo o eritrócito, ocorrem eventos como o aumento da adesão celular ao endotélio, desencadeando fenômenos inflamatórios que influenciam também nos granulócitos e plaquetas, diminuição da sobrevivência do

eritrócito em circulação, lesões microvasculares, ativação da coagulação, depleção de NO que contribui para a vasoconstrição e ativação da inflamação (NAOUM, 1997, p. 40; MANFREDINI, 2007; ZAGO, PINTO, 2007).

A polimerização da Hb S deforma o eritrócito, permitindo que a célula perca sua forma normal discóide, tornando-se alongada com filamentos na sua extremidade (NAOUM, 1997, p. 40; MANFREDINI, 2007). A perda da elasticidade que ocorre com essa célula se deve ao incremento da concentração de Hb S intracelular, resultando no aumento da viscosidade do citosol celular; à polimerização da Hb S e à rigidez da membrana, tornando essa célula irreversivelmente falcizada (NETO, PITOMBEIRA, 2003). Esses eritrócitos irreversivelmente falcizados nos indivíduos homozigotos se formam logo após sua liberação pela medula óssea e são, rapidamente, retirados da circulação, um terço por hemólise intravascular e dois terços por fagocitose (NAOUM, 1997, p. 40).

A alteração celular causada pelo processo de falcização influencia intensamente o fluxo sangüíneo, aumentando a sua viscosidade, impossibilita os eritrócitos de transporem o diâmetro menor dos capilares pela sua perda de elasticidade e, além disso, esses eritrócitos falciformes irreversíveis têm aumentada capacidade de adesão ao endotélio vascular. Todos esses fatores associados, favorecem a deposição de grande número de eritrócitos alterados na superfície endotelial com a formação de trombos na micro e macrocirculação (NAOUM, 1997, p. 41; NETO, PITOMBEIRA, 2003). A deposição de grande número de eritrócitos falciformes na superfície endotelial reduz a luz dos capilares, causando estase, que pode ser intensificada pela diminuição da temperatura ambiente. Como conseqüência da estase, ocorre a hipóxia tecidual, levando mais moléculas de Hb S ao estado desoxigenado, piorando a situação circulatória já desfavorável e lesando os tecidos perfundidos por esses capilares. Pode também ocorrer obstrução total dos capilares, causando trombozes, formação de fibrina e, ativação da cascata da coagulação. Os tecidos mal perfundidos podem sofrer infarto com necrose e fibrose, principalmente afetando tecidos como o baço, medula óssea e placenta (NAOUM, 1997, p. 41).

Portanto, pode-se dizer, de maneira resumida, que a anemia falciforme se caracteriza, fundamentalmente, pela polimerização da Hb S induzida por desoxigenação, afoiçamento dos eritrócitos e aumento da viscosidade sangüínea.

Esses fenômenos são responsáveis por todo o quadro fisiopatológico apresentado pelos pacientes com essa doença.

2.3 Hemoglobina C (Hb C):

A hemoglobina C (Hb C) foi descrita, em 1950, por Itano e Neel. Em 1958, os estudos de Hunt e Ingram revelaram que a Hb C se origina da substituição do aminoácido número seis da globina beta, o ácido glutâmico pela lisina. A troca de um aminoácido de carga negativa por outro de carga positiva altera completamente a mobilidade eletroforética da hemoglobina mutante, sendo facilmente diferenciável da Hb A e da Hb S. Essa alteração pode se apresentar em homozigose (Hb CC) ou heterozigose (Hb AC), em ambos os casos as manifestações hemolíticas são discretas (NAOUM, 1997, p.61; LORENZI et al., 2003, p. 260).

A Hb C é freqüente entre os povos africanos, especialmente nos países da região ocidental da África, onde a prevalência da heterozigose para Hb C (Hb AC) chega a 30% da população. Por ter origem africana, assim como a Hb S, a propagação dessa alteração também ocorreu em virtude da escravidão negra para as regiões do mediterrâneo e Américas em diferentes períodos da história. Esse processo de distribuição do gene da globina β^C possibilitou a sua interação com outras hemoglobinas variantes, das quais a Hb S é a combinação mais encontrada (NAOUM, 1997, p.61). A maioria dos casos de heterozigose para Hb C é descoberta por acaso ou em investigações familiares ou para determinar a causa de esplenomegalia ou de hemácias em alvo (ZAGO et al, 2001, p. 286).

Os portadores heterozigotos são assintomáticos, não têm anemia e não apresentam evidência do aumento da destruição precoce dos eritrócitos. No esfregaço sangüíneo, observam-se números moderados (5 a 30%) de células em alvo. A concentração da Hb C nos heterozigotos se situa entre 30 e 40% (NAOUM, 1997, p.61). Embora a concentração de hemoglobina esteja dentro da faixa normal, a média para grupos de indivíduos é baixa. A massa e a sobrevivência das hemácias também podem estar reduzidas, contudo o número de reticulócitos não está aumentado (LUKENS, 1998, p.1161).

Os pacientes homozigóticos apresentam anemia hemolítica de intensidades variáveis. Alguns apresentam esplenomegalia, cansaço e fraqueza, devido à

anemia crônica, à icterícia e ao desconforto abdominal. Os exames hematológicos mostram, além da anemia, reticulocitose discreta (aumento de 2 a 6%), microcitose, esferocitose e hemácias em alvo. A hemoglobina total varia de 9 a 12 g/dL e o hematócrito de 25 a 35%. Na eletroforese, a concentração de Hb C é próxima a 100%. A resistência globular osmótica se mostra aumentada, sendo quase sempre também resistente ao teste de NaCl a 0,36% (NAOUM, 1997, p.61; LUKENS, 1998, p.1161; LORENZI et al., 2003, p. 260).

2.4 Anemia Falciforme (Sickle Cell Disease):

2.4.1 Características:

A anemia falciforme é um distúrbio hereditário causado pelas propriedades anormais dos eritrócitos que apresentam uma hemoglobina alterada chamada Hb S (sickle cell) em homozigose. A anemia falciforme se caracteriza, principalmente, por anemia hemolítica crônica, aumento da suscetibilidade às infecções e episódios recorrentes de vaso-oclusão que levam à dor (EMBURY, 1997, p. 976; SCHNOG, et al., 2004).

A anemia falciforme é uma doença genética, monogênica, hereditária, homozigótica, recessiva e a mais comum entre as hemoglobinopatias. Ela é encontrada particularmente na África equatorial, sendo que a maior incidência ocorre na parte oriental do continente, onde 40 a 50% dos membros de certas tribos estão afetadas. O gene da Hb S é também encontrado em populações não africanas. Uma prevalência de até 25% foi descrita em países como Turquia, Arábia Saudita e Índia (LUKENS, LEE, 1998, p.1134).

As manifestações clínicas da anemia falciforme variam acentuadamente, embora todo paciente com anemia falciforme apresente a mesma mutação genética, a diversidade relativa à severidade das manifestações clínicas é muito grande. Vários fatores modificantes vêm sendo estudados com o objetivo de definir o motivo dessa diversidade (EMBURY, 1997, p. 980; COSTA et al., 2006). Sabe-se que a gravidade clínica da doença possui uma relação direta com a intensidade e a frequência dos episódios de falcização irreversível e que é também influenciada pela quantidade de Hb F na célula. Pacientes com nível aumentado de Hb F

apresentam uma evolução mais benigna da doença, com diminuição das crises dolorosas, de infartos ósseos e de insuficiência de órgãos, pois a Hb F não participa do processo de polimerização que ocorre entre as moléculas da desoxi-Hb S (NAOUM, 1997, p. 51; COSTA, et al., 2006).

Cinco principais haplótipos têm sido identificados em diferentes regiões do mundo, são eles: Senegal, Benin, Bantu ou CAR (República Centro Africana), Asiático ou Saudita ou Indu-árabe, Cameroon (NETO, PITOMBEIRA, 2003). Segundo estudo de Fleury (2001), realizado no Brasil (Rio de Janeiro), através da análise de 148 cromossomos de pacientes com anemia falciforme, o haplótipo CAR é o mais comum (54%), seguido do Benin (44,6%) e por fim o Senegal (1,4%). Pacientes com o haplótipo Senegal e Saudita estão comumente associados a níveis mais altos de hemoglobina fetal (acima de 15%) e apresentam formas clínicas mais brandas. No haplótipo do tipo Benin, os níveis de hemoglobina fetal são intermediários (de 5 a 15%) e os benefícios quanto ao curso clínico são menos marcantes. O haplótipo do tipo CAR apresenta níveis mais baixos de hemoglobina fetal (abaixo de 5%) e o curso clínico mais grave (NETO, PITOMBEIRA, 2003, FLEURY, 2007).

A origem geográfica do gene beta ou o haplótipo da Hb S também tem influência na evolução clínica dos portadores dessa anemia (NAOUM, 1997, p. 51). Segundo Costa et al. (2006), além das diferentes condições clínicas e laboratoriais encontradas entre um e outro haplótipo também existe diferença dentro do mesmo haplótipo em homozigose e a idade, o sexo e os níveis de HbA₂ e HbF foram as variáveis que, provavelmente, seriam as responsáveis por essa diversidade.

2.4.2 Manifestações Clínicas:

As manifestações clínicas mais encontradas nos pacientes com anemia falciforme são:

a) Crises dolorosas: as crises dolorosas são as complicações mais comuns e características da anemia falciforme, além de levar o paciente a inúmeras internações hospitalares. São ocasionadas pela oclusão intermitente da macrocirculação, o que resulta num dano tecidual e leva à dor (NAOUM, 1997, p. 51). Essas crises são principalmente desencadeadas por hipóxia, infecções, febre,

acidose, desidratação e exposição ao frio, porém, muitas vezes, não é possível identificar o fator desencadeante (LOBO et al, 2007). A dor pode afetar qualquer parte do corpo, mas os locais mais freqüentes são os ossos, as articulações, o tórax, as extremidades e o abdômen (EMBURY, 1997, p. 981; NAOUM, 1997, p. 51; LUKENS, 1998, p.1170; SCHNOG, 2004). A intensidade e duração da dor são muito variáveis, dependendo de cada paciente e do genótipo da doença, além de representarem uma medida de severidade da doença e ter correlação com a incidência de morte precoce dos adultos. As manifestações de dor nas crianças ocorrem primeiramente nas mãos e nos pés, com dor e edema nessas extremidades, o que é chamado de síndrome mão-pé (NAOUM, 1997, p. 51; LOBO et al, 2007).

b) Infecções: as crises infecciosas são as manifestações mais evidentes no início da infância, sendo as complicações, devido a elas, a maior causa de hospitalização (LUKENS, 1998, p.1172). As infecções acometem principalmente os pulmões, o trato geniturinário, o sistema nervoso central, os ossos e articulações, o sangue e o líquido espinhal (LUKENS, 1998, p. 1172). Os patógenos comumente envolvidos nas infecções são o *Streptococcus pneumoniae* e o *Haemophylus influenzae*, causando septicemias e meningites principalmente em crianças. O *Staphilococcus aureus* e as bactérias gram-negativas, como a *Salmonella sp.*, acometem mais os adultos, causando meningites e osteomielites. A febre pode ocorrer devido às infecções e deve ser rigorosamente avaliada pelo risco de estar havendo um caso de septicemia, principalmente nos primeiros anos de vida, já que as complicações infecciosas na anemia falciforme são uma importante causa de mortalidade (NAOUM, 1997, p. 52; EMBURY, 1997, p. 982; LUKENS, 1998, p. 1173).

c) Anemia: grande parte dos pacientes com anemia falciforme apresentam níveis de hemoglobina entre 6 e 11 g/dL, sendo, portanto, pacientes com anemia crônica (NAOUM, 1997, p. 53). A anemia crônica se deve também à hemólise dos eritrócitos e aos baixos níveis de eritropoetina. Essa anemia crônica pode se tornar exacerbada por vários motivos, como por crises aplásicas que ocorrem após processos infecciosos, em que acontece queda abrupta da hemoglobina e dos reticulócitos e surgimento de precursores eritroblásticos na medula óssea; e também pela crise aguda de seqüestração esplênica, na qual ocorre súbito acúmulo de sangue no baço, com aumento de tamanho desse órgão, diminuição

da hemoglobina, elevação dos reticulócitos e, às vezes, hipovolemia (NAOUM, 1997, p. 53; EMBURY, 1997, p. 981; LUKENS, 1998, p. 1172).

d) Complicações pulmonares: o comprometimento pulmonar pode ser agudo ou crônico. Ocorre por hiper-reatividade brônquica, tromboembolismo pulmonar ou pela síndrome torácica aguda nos casos agudos e por alterações da função pulmonar e hipertensão pulmonar nos casos crônicos. A Síndrome Torácica Aguda (STA) é uma das principais complicações pulmonares que acometem os pacientes com anemia falciforme, em torno de 30% desses pacientes apresentam essa síndrome e ela pode ser fatal. A STA se apresenta como um quadro clínico com dispnéia, dor torácica, febre, taquipnéia, leucocitose e infiltrados pulmonares visíveis na radiografia. As principais causas da STA são: infecções por alguns patógenos comuns como *Streptococcus pneumoniae* ou agentes atípicos como *Mycoplasma*, *Chlamydia* ou *Legionella*; crises vaso-oclusivas, tromboembolismo, hiperhidratação, sedação excessiva, apnéia do sono e embolia pulmonar gordurosa da medula óssea infartada (EMBURY, 1997, p. 983; LUKENS, 1998, p. 1171; GUALANDRO, *et al*, 2007).

e) Complicações neurológicas: as complicações neurológicas acometem 25% dos pacientes com anemia falciforme, sendo que 5 a 10% dos casos são de Acidente Vascular Cerebral (AVC). As crianças são as mais afetadas pelo AVC, com sinais de hemiparesia, distúrbios visuais, convulsões, paralisia de nervos cranianos ou alteração súbita de comportamento. Apesar de a recuperação ser, muitas vezes, completa, em alguns casos pode deixar seqüelas intelectuais, motoras e sensitivas. A recorrência de casos de AVC em crianças é de 70 a 90 % quando não transfundidas após o AVC, sendo que a terapia transfusional se mostra como um método efetivo de prevenir esse segundo episódio. Outros eventos que podem ocorrer são ataques isquêmicos transitórios, infarto cerebral, hemorragia cerebral, hipertensão intracraniana, trauma, meningite, alterações mentais por distúrbios metabólicos, neuropatia periférica, convulsões e coma (NAOUM, 1997, p. 54; EMBURY, 1997, p. 982; LUKENS, 1998, p. 1171; ANGULO, 2007).

f) Complicações hepatobiliares: as alterações hepáticas podem ser agudas ou crônicas. As agudas são caracterizadas por dor no quadrante superior direito e icterícia. O diagnóstico diferencial inclui crise aguda de falcização hepática,

seqüestro esplênico, colestase intra-hepática, colelitíase, coledocolitíase, colecistite e hepatite viral (TRAINA, SAAD, 2007). A dilatação do fígado (hepatomegalia) inicia por volta de um ano de idade e persiste durante toda vida. O que pode ser observado são distensões dos sinusóides por células falciformes aprisionadas, eritrofagocitose pelas células de Kupffer e graus variados de fibrose periportal e acúmulo de pigmento biliar. A hiperbilirrubinemia acontece devido à hepatite infecciosa intercorrente, falcização intra-hepática ou coledocolitíase. Além disso, os cálculos biliares pigmentários são muito freqüentes, devido ao aumento do catabolismo do heme (EMBURY, 1997, p. 983; LUKENS, 1998, p. 1176).

g) Complicações renais: a nefropatia é uma complicação muito comum que acomete um terço dos adolescentes e adultos jovens, sendo causa de alta mortalidade em adultos. As complicações renais podem ser resultantes de anormalidades medulares, tubulares e glomerulares. Essas complicações se iniciam na infância, em conseqüência da anemia crônica, fluxo sangüíneo aumentado e eventos de veno-oclusão intraparenquimatosos (MAGALHÃES, 2007). O comprometimento do fluxo sangüíneo para a região medular resulta em menor capacidade de concentração urinária, infarto papilar, hematúria, acidose tubular e depuração anormal de potássio. A disfunção tubular pode provocar hiperuricemia e as anormalidades glomerulares podem ser decorrentes da vaso-oclusão, da hiperperfusão e da nefropatia por imunocomplexos, resultando em síndrome nefrótica e, posteriormente, podendo ocorrer insuficiência renal crônica (EMBURY, 1997, p. 983; LUKENS, 1998, p. 1177; SCHNOG, 2004).

h) Complicações cardiovasculares: as alterações cardiovasculares relacionadas à doença falciforme têm sido reconhecidas com maior freqüência e pode ser devido ao aumento da área cardíaca, isquemia do miocárdio, disfunção biventricular e hipertensão pulmonar. As manifestações cardiovasculares ocorrem principalmente por causa da anemia hemolítica crônica, das oclusões da artéria pulmonar e pela hemossiderose miocárdica, ou seja, depósito de ferro secundário às transfusões de sangue. A dilatação cardíaca, devido ao aumento do débito cardíaco imposto pela anemia crônica, começa ainda na infância. O agrupamento de hemácias falcizadas, nas pequenas artérias pulmonares, pode resultar em hipertensão pulmonar e a hemossiderina miocárdica, conseqüência de inúmeras

terapias transfusionais, pode também ser responsável por insuficiência cardíaca intratável (LUKENS, 1998, p. 1175; GUALANDRO, *et al*, 2007).

i) Priapismo: refere-se à ereção dolorosa, prolongada e não desejada do pênis, que afeta cerca de 28 a 38% dos indivíduos do sexo masculino com anemia falciforme. A idade média de acometimento é de 20 anos, sendo que o primeiro episódio pode ocorrer ainda na primeira década de vida. Ocorre um acúmulo de sangue venoso com hemácias falciformes nos corpos cavernosos sem formação de trombo aparente. Embora possa ser autolimitado e de duração relativamente curta, em torno de três horas, esse acúmulo sangüíneo pode durar muitos dias e necessitar de intervenção terapêutica, sendo considerado uma emergência urológica e podendo levar à impotência (NAOUM, 1997, p. 54; EMBURY, 1997, p. 983; LUKENS, 1998, p. 1177; VICARI, FIGUEIREDO, 2007).

Com todas essas manifestações e complicações clínicas apresentadas pelos pacientes com anemia falciforme, o ideal é que o diagnóstico seja feito precocemente nos recém-nascidos, através dos testes de triagem pré-natais, que irão assegurar um tratamento precoce e abrangente, melhorando a qualidade de vida e sobrevivência desses pacientes (SCHNOG, 2004).

2.4.3 Tratamento:

A prevenção das complicações é um fator que deve ser considerado como prioridade até que seja encontrado um mecanismo seguro e amplamente aplicável para a prevenção da falcização intravascular. Como as crises vaso-oclusivas ocorrem devido às infecções, febre, desidratação, acidose, hipóxia e exposição ao frio, medidas para evitar essas condições têm grande importância (LUKENS, 1998, p. 1182). Outro cuidado básico muito empregado está relacionado com o alto risco de doença pneumocócica na infância; um simples esquema de imunização pneumocócica e a profilaxia com penicilina nesse período diminuem muito a taxa de mortalidade no período crítico, situado entre os seis meses e os três anos de idade (LUKENS, 1998, p. 1183; DUCATTI *et al.*, 2001; SCHNOG, 2004; BRAGA, 2007).

A medida terapêutica mais simples, menos controversa e mais eficaz atualmente disponível é a transfusão de sangue, que é utilizada nas complicações

agudas, como Síndrome Torácica Aguda, crise de seqüestro esplênico, crise aplástica e no priapismo. Os objetivos principais da transfusão de sangue são de melhorar a perfusão na microcirculação, pelo decréscimo do número de células contendo Hb S, e de aumentar a oxigenação do sangue e dos tecidos, pela reposição de hemácias contendo Hb A. As indicações da transfusão na anemia falciforme são ainda controversas, mas ela tem sido utilizada com finalidade profilática tanto quanto como adjuvante na terapia de complicações agudas (NAOUM, 1997, p. 56; LUKENS, 1998, p. 1183).

Muitas propostas inovadoras para o tratamento de pacientes com anemia falciforme têm sido estudadas. A hidroxiuréia (HU) é a droga que se mostra mais eficaz, apesar de alguns efeitos colaterais. Ela é um agente mielossupressor que induz um aumento da síntese de Hb F que, por sua vez, é útil na proteção contra eventos de eritrofalção e vaso-oclusão (NAOUM, 1997, p. 57; SCHNOG, 2004; SILVA, SHIMAUTI, 2006). A HU causa outros efeitos além do aumento da Hb F, como: aumento do volume corpuscular médio, melhora da hidratação celular, reticulopenia, redução na expressão de moléculas de adesão na membrana eritrocitária, aumento na produção de óxido nítrico, aumento da eritropetina e do fator de necrose tumoral alfa. As principais indicações de uso da HU, em anemia falciforme, são: pacientes com três ou mais admissões hospitalares por crises vaso-oclusivas nos últimos 12 meses, adultos ou crianças com um ou mais episódios de síndrome torácica aguda nos últimos 24 meses e pacientes com disfunções orgânicas graves (FIGUEIREDO, 2007).

Também é possível curar pacientes com anemia falciforme pelo transplante de células-tronco hematopoéticas. O objetivo do transplante é o de restabelecer uma hematopoese normal, eliminando as obstruções vasculares e a lesão crônica e recorrente do endotélio vascular. A cura da doença na maioria dos pacientes submetidos ao transplante com doador HLA-idêntico revela que os benefícios do procedimento excedem os riscos (PIERONI et al., 2007). Transplantes mieloablativos com doador HLA-idêntico proporcionam uma sobrevida livre da doença em 80-85% dos pacientes com a doença avançada e grave. Os critérios mais aceitos para se indicar o transplante são os publicados pela Escola Européia de Hematologia, sendo eles: crises vaso-oclusivas recorrentes e/ou priapismo apesar de teste com HU, presença de vasculopatia cerebral demonstrada por

ressonância nuclear magnética e requerendo um programa de transfusão crônica por, pelo menos, seis meses, presença de qualquer anormalidade à ressonância magnética angiográfica, fluxos arteriais cerebrais anormalmente altos, AVC sem anormalidades cognitivas graves, osteonecrose em múltiplas articulações, aloimunização com dois ou mais anticorpos, presença de cardiomiopatia da doença falciforme detectada por ecocardiograma, STA recorrente. Além disso, existem outros fatores que devem ser considerados para a realização desse procedimento, principalmente, com relação à identificação de receptores apropriados para realização do transplante e disponibilidade de doadores (NAOUM, 1997, p. 58; EMBURY, 1997, p. 988; PIERONI et al., 2007).

2.5 Traço Falciforme:

2.5.1 Características:

O traço falciforme ou ciclêmico é caracterizado pela presença de Hb S em heterozigose, presente em percentual que varia de 20 a 45% da hemoglobina total (RAMALHO, 1976; SILVA, RAMALHO, 1997). Geneticamente, a condição heterozigota se deve à herança do gene da globina β^S por parte de um dos pais, juntamente com o gene da globina β^A proveniente do outro (NAOUM, 1997, p. 43).

A prevalência desse traço é de aproximadamente 8 a 9% nos negros americanos e 25 a 30% nas populações africanas (EMBURY, 1997, p. 984; SILVA, RAMALHO, 1997; LUKENS, 1998, p. 1188). Os indivíduos heterozigóticos somam, aproximadamente, 2,5 milhões nos Estados Unidos e 30 milhões no mundo; já no Brasil segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2002) cerca de dois milhões de pessoas são portadoras desse traço falciforme (ALVES, 1996; EMBURY, 1997, p. 984).

O traço falciforme raramente está associado a manifestações clínicas ou hematológicas significantes, os indivíduos não apresentam anemia e a morfologia das hemácias é normal no esfregaço sangüíneo. Os processos vaso-oclusivos, sob condições fisiológicas normais, inexistem, não ocorrendo mortalidade e nem morbidade seletivas, portanto, assume o caráter de condição benigna (NAOUM,

1997, p. 43; EMBURY, 1997, p. 984; LUKENS, 1998, p. 1188; TOMÉ- ALVES et al., 2000). Os portadores do traço falciforme não apresentam anormalidades físicas e sua expectativa de vida é semelhante ao da população em geral. Os níveis de hemoglobina variam de 13 a 15 g/dL e Volume Corpuscular Médio (VCM) de 80 a 90 fL. A sobrevivência das hemácias é normal, não ocorrendo hemólise e nenhuma outra alteração laboratorial, além da presença de Hb S em heterozigose (MURAO, FERRAZ, 2007).

Apesar de os indivíduos heterozigotos não apresentarem, normalmente, evidentes manifestações clínicas, existem relatos de complicações clínicas e, até mesmo, de morte súbita em portadores expostos a condições de baixa tensão de oxigênio como anestesia geral, mergulho, vôo em aviões despressurizados, desidratação, esforços físicos extenuantes, infecções respiratórias graves, insuficiência cardíaca respiratória e episódios de acidose. Esses casos podem levar à falcização das hemácias, ocorrendo complicações vasculares, hematúria e, assim, podendo levar à morte. Essas complicações ocorrem muito raramente, pois, com o baixo potencial de falcização dos heterozigotos, as condições precipitantes da produção de hemácias falciformes, ou seja, hipoxemia, desidratação, acidose e vasoconstrição, devem ser muito intensas (McCURDY, 1974; RAMALHO, 1976; ELGHETANY, DAVEY, 1999, p. 642; GRIGNANI et al., 2006).

Ramirez e colaboradores (1976) realizaram um estudo para avaliar as características morfológicas dos glóbulos vermelhos em pacientes com traço falciforme. Eles avaliaram os glóbulos vermelhos de cinco pacientes negros com traço falciforme após realização de exercícios físicos extenuantes. O exercício produziu falcização in vivo, que não foi proporcional a sua intensidade. O grau de aumento da falcização foi de 0,75% comparando com indivíduos com Hb AA, sendo menor do que a falcização in vitro observada após severa hipóxia. Esse estudo concluiu que exercícios físicos podem iniciar falcização em pacientes com traço falciforme.

Nagpal e colaboradores (1977) relataram sete casos de pacientes com retinopatia proliferativa associados com traço falciforme e concluíram que em todos os casos havia também outras doenças sistêmicas adicionais, como diabetes, sífilis, tuberculose ou sarcoidose, associadas ao traço falciforme. Dessa forma, eles

observaram que, na presença de doença sistêmica associada, a retinopatia comumente ocorre em pessoas com traço falciforme.

Sears (1978), com uma extensa revisão de literatura sobre a morbidade do traço falciforme, concluiu que, apesar da grande quantidade de relatos que associam anormalidades com o traço falciforme, poucas relações apresentam comprovação estatística. Assim, ele afirmou que as anormalidades que possuem associação comprovada com o traço falciforme são: infarto esplênico em elevadas altitudes, bacteriúria, bacteriúria e pielonefrite em gestantes, hipostenúria e hematúria.

O estudo realizado por Gonçalves e Ramalho (1985), que avaliou 200 pacientes com dores osteoarticulares intensas, não traumáticas e de etiologia a esclarecer, detectou homozigotos SS e heterozigotos SC em proporções 72 e 53 vezes maiores, respectivamente, que as esperadas ao acaso na população em geral. Essa pesquisa também mostrou que as altas proporções de homozigotos SS e heterozigotos SC encontradas são devidas a uma forte associação causal entre essas hemoglobinopatias e a dor osteoarticular intensa. Entretanto, a frequência de heterozigotos AS não diferiu significativamente da esperada em populações afrodescendentes, o que indicou que o traço falcêmico não deve ser causa frequente de dores osteoarticulares intensas em nosso meio.

Ramalho e colaboradores (1985) avaliaram a presença de hemoglobinopatias em 93 pacientes afrodescendentes com úlceras de membros inferiores. Eles observaram que os homozigotos SS e SC apareceram na amostra em proporções 53 e 73 vezes maior, respectivamente, que as esperadas ao acaso na população afrodescendente. Essas duas hemoglobinopatias foram responsáveis juntas, por 7,5% dos casos de úlceras de membros inferiores na amostra examinada. Já, a frequência de heterozigotos AS não diferiu significativamente da esperada em populações afrodescendentes, indicando que o traço falciforme não apresenta relação com as úlceras de membros inferiores.

O estudo realizado por Kark e colaboradores (1987) com recrutas americanos portadores do traço falciforme, após serem submetidos a exercícios extenuantes, relatou alguns casos de morte súbita. O estudo retrospectivo sobre morte súbita, durante treinamento, envolvendo dois milhões de recrutas das forças armadas dos Estados Unidos, apresentou um risco de morte súbita inexplicada

atribuída à presença de Hb AS entre os recrutas negros de 31 mortes em 100.000, com um risco 28 vezes maior de morte súbita em relação aos negros que possuíam Hb AA. Todas as mortes estavam associadas com exercício físico extenuante e o risco aumentava com a idade. As principais causas de mortalidade foram o AVC, hipertermia e rabdomiólise.

Weisman e colaboradores (1988) estudaram o efeito do treinamento em 22 recrutas negros com traço falciforme sobre o condicionamento físico depois de sete semanas de treinamento em 1270 m de altitude. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os portadores do traço falciforme e o grupo controle dentro dos parâmetros avaliados para determinar a performance dos indivíduos, sugerindo que o traço falciforme não representa um efeito adverso na resposta ao condicionamento físico. Sugarman e colaboradores (1990) relataram, pela primeira vez, infarto esplênico, em um paciente negro de 43 anos com traço falciforme, secundário a hipoxemia por embolismo pulmonar.

2.5.2 Traço Falciforme versus Bancos de Sangue:

Os portadores do traço falciforme são, clínica e hematologicamente, saudáveis e, portanto, aptos à doação de sangue. Assim, para aumentar a eficácia terapêutica das transfusões sangüíneas, a detecção de Hb S em doadores de sangue no Brasil foi indicada pela Portaria nº 1376 de 19 de novembro de 1993 (BRASIL, 1993), mas a triagem das hemoglobinas anormais nos doadores de sangue se tornou obrigatória a partir de junho de 2004, de acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária- RDC 153/04 (BRASIL, 2004). Essa resolução veio ao encontro da necessidade de melhorar, cada vez mais, a qualidade do sangue a ser transfundido o que evidencia sua relevância.

Existem dois grandes motivos para justificar a realização da triagem dos portadores do traço falciforme nos bancos de sangue, que beneficia simultaneamente o doador e o receptor. Primeiro, com relação aos receptores: como o traço falcêmico é muito prevalente, assim como a anemia falciforme, a chance de encontrar um receptor de sangue com essas características é muito

grande, o que diminuiria a eficácia da transfusão. Além disso, o sangue com Hb S não é recomendado para ser utilizado em exsangüinotransfusões, recém-nascidos, crianças com hipoxemia, pacientes submetidos à cirurgia, acidose grave e pacientes com hemoglobinopatias, principalmente pela ineficiência da transfusão com hemácias que possuem uma concentração de Hb A menor e um tempo médio de vida inferior ao esperado. Também beneficia o receptor que estará sendo protegido do recebimento de hemácias anômalas que não podem cumprir com o seu papel tornando a transfusão ineficiente (RAMALHO, 1976; MORAIS, et al., 1987; SILVA, RAMALHO, 1997; PRUDÊNCIO et al., 2000). O segundo benefício da triagem dos doadores de sangue é a identificação do traço falciforme e o aconselhamento genético, uma vez que a detecção de indivíduos heterozigotos é de extrema importância para a saúde pública, pois, além de possível fonte de novos heterozigotos, podem originar indivíduos homozigotos que manifestam uma forma clínica e, portanto, precisam de tratamento precoce (ORLANDO et al., 2000).

Além disso, estão sendo relatadas dificuldades operacionais durante o processamento do sangue com Hb S (RAMALHO, 1976; MORAIS, et al., 1987; SILVA, RAMALHO, 1997; OULD AMAR, et al., 1997; PRUDÊNCIO et al., 2000; STRONCEK et al., 2002; OULD AMAR, 2006; GRIGNANI et al., 2006). A principal dificuldade operacional encontrada nos bancos de sangue é com relação à desleucocitação ineficaz nos concentrados de hemácias provenientes de doadores portadores de Hb S. A dificuldade na leucorredução foi evidenciada em vários estudos, em que ocorre a obstrução total ou parcial dos filtros, prolongando o tempo de filtração e reduzindo a eficácia na remoção de leucócitos inviabilizando a utilização do sangue. Essa ineficiência na remoção dos leucócitos pela reduzida filtração é principalmente explicada pela polimerização da Hb S que ocorre durante a coleta e processamento do sangue (BODENSTEINER, 1994; OULD AMAR, et al., 1997; STRONCEK et al., 2002; OULD AMAR, 2006). Ainda, segundo estudo realizado por Morais e colaboradores (1987), ocorre falcização das hemácias de portadores de Hb S, após 24 horas da coleta nas condições normais de armazenamento nos bancos de sangue, sendo encontrado um percentual de drepanócitos de até 34%, causando ineficácia do processo de transfusão.

2.5.3 Aconselhamento Genético e Triagem Familiar nos Bancos de Sangue:

O aconselhamento genético se caracteriza pelo processo em que as pessoas são testadas e informadas sobre as características genéticas que possuem. No caso dos bancos de sangue, o respeito à privacidade e a garantia da confidencialidade são primordiais, já que os doadores de sangue não são pessoas doentes em busca de serviços de saúde, mas, sim, pessoas que, motivadas pela solidariedade, participam voluntariamente da doação de sangue. Portanto, pela importância que o doador possui no ciclo da política da doação de sangue, é que qualquer exposição da intimidade do doador deve ser entendida como uma questão de saúde pública, pelo risco de outros doadores se sentirem desestimulados à doação (RAMALHO et al., 2002; DINIZ, GUEDES, 2005).

Outro aspecto relevante são os riscos da orientação genética, pois, ainda que pequenos, não são inexistentes. O aconselhamento genético apresenta importantes implicações médicas, psicológicas, sociais, éticas e jurídicas, acarretando um alto grau de responsabilidade às instituições que o oferecem (RAMALHO et al., 2002; RAMALHO, MAGNA, 2007). Segundo estudo de Ramalho e colaboradores (2002), os principais riscos são: rotulação, estigmatização, perda de auto-estima e discriminação dos heterozigotos, por isso, a equipe de aconselhamento genético deve estar preparada para detectar e corrigir esses problemas.

Além disso, é fundamental respeitar o princípio ético da privacidade, o qual determina que os resultados dos testes genéticos de um indivíduo não podem ser comunicados a nenhuma outra pessoa sem o seu consentimento expresso, com exceção, talvez, de familiares com risco genético e, mesmo assim, após falha de todos os esforços para obter a permissão (SILVA, RAMALHO, 1997; RAMALHO et al., 2002). O aconselhamento genético também pode provocar muita confusão para distinguir entre o traço e a doença, sendo preciso que fique bem claro para os pacientes, doadores e comunidade em geral, que o traço falciforme não é uma doença, não é uma forma atenuada da anemia falciforme ou uma forma sub-clínica ou incubada que poderá se transformar em doença em determinadas circunstâncias (FOST, 1992; RAMALHO et al., 2002).

A principal importância do diagnóstico do traço falciforme está associada ao risco de nascimento de futuras crianças com anemia falciforme. Portanto, os portadores do traço falciforme têm o direito de serem informados, através do aconselhamento genético, a respeito dos aspectos hereditários e demais conotações clínicas dessa doença, sendo orientados quanto aos cuidados a serem adotados para reduzir a prevalência da anemia falciforme (SILVA, RAMALHO, 1997; RAMALHO et al., 2002; DINIZ, GUEDES, 2005). Melo-Reis e colaboradores (2006), em relato de caso que destaca a importância do diagnóstico precoce na prevenção das anemias hereditárias, sugerem a inclusão do diagnóstico laboratorial das anemias hereditárias nos exames pré-nupciais e pré-natais, sem, entretanto, induzir a qualquer prática de intervenção ilegal.

Segundo Ramalho e Magna (2007), o objetivo do aconselhamento genético é o de permitir aos indivíduos ou às suas famílias tomar decisões conscientes e equilibradas a respeito da procriação, tratando-se, portanto, de um objetivo primordialmente assistencial, em que os indivíduos devem ser conscientizados do problema, sem serem privados do direito de decisão reprodutiva. Assim, principalmente os casais de risco estarão conscientes da chance de 25 % de nascimento de uma criança com anemia falciforme e também saberão da importância da realização de exames laboratoriais na criança precocemente, visando melhor expectativa e qualidade de vida (SILVA, et al., 1993; SILVA, RAMALHO, 1997; RAMALHO et al., 2002; ANVISA, 2002, BONINI-DOMINGOS, et al., 2004; DINIZ, GUEDES, 2005).

A triagem familiar ampliada para os familiares mais próximos dos doadores de sangue portadores do traço falciforme pode identificar muitos outros portadores e casais de risco antes do casamento e procriação, sendo essa uma estratégia eficaz para uma detecção precoce, permitindo que as famílias conheçam essa alteração e saibam como proceder após as orientações no aconselhamento genético (BANDEIRA et al., 2007). A maioria dos estudos que realizam triagem familiar a partir de casos-índice tem como objetivo detectar precocemente os portadores de traço falciforme para realizar o aconselhamento genético, evitando o nascimento de crianças com anemia falciforme e, conseqüentemente, reduzindo os gastos com tratamento pelos serviços de saúde pública (SILVA, RAMALHO, 1997; AHMED, et al., 2002; ACEDO, et al., 2002; BANDEIRA, et al., 2007).

2.5.4 Diagnóstico do Traço Falciforme nos Bancos de Sangue :

Uma grande variedade de testes qualitativos e quantitativos permite a detecção da Hb AS. Entre os testes qualitativos, está o teste de solubilidade, no qual as hemácias são lisadas e a Hb S é reduzida pelo ditionito de sódio; por ser insolúvel, ela forma polímeros de deoxi-Hb S com esse reagente e turva a solução, enquanto que as soluções contendo outras hemoglobinas permanecem claras.

Outro teste qualitativo é o teste de falcização, que utiliza metabissulfito de sódio como substância redutora, a qual, em contato com as hemácias, extrai o oxigênio, levando as hemácias com Hb S a assumir o formato de foice, verificado pela observação das hemácias ao microscópio (LUKENS, 1998, p. 1181; ELGHETANY, DAVEY, 1999, p. 642; OSHIRO et al., 1999).

O teste de solubilidade não apresenta boa sensibilidade para detecção da presença de Hb S no período neonatal, especialmente nos recém-nascidos prematuros, uma vez que, nesse período, ainda não houve a transição de Hb F para hemoglobina do adulto. Nessa faixa etária, até mais ou menos os seis meses de idade, um teste de solubilidade negativo deve ser interpretado com cautela, principalmente se feito por ocasião de uma situação de emergência. Devido à grande quantidade de Hb F (efeito diluidor) no período neonatal, testes como o de falcização e de solubilidade freqüentemente resultam em falso-negativos (BANDEIRA et al., 2003). Além desse, vários outros testes são comercializados na forma de kit, entre eles o teste em gel-centrifugação, que se baseia no mesmo princípio da falcização "in vitro", utiliza agente redutor e cartão com gel que retêm as hemácias falcizadas, ficando essas suspensas no microtubo durante a centrifugação (OSHIRO et al., 1999).

A eletroforese de hemoglobina em fita de acetato de celulose ou em filme de agarose é um teste amplamente conhecido, podendo ser tanto qualitativo quanto quantitativo. A eletroforese se baseia na diferente mobilidade eletroforética das hemoglobinas carregadas eletricamente permitindo a separação das bandas de migração de hemoglobinas. Como a hemoglobina é uma proteína carregada negativamente, a eletroforese de Hb se baseia nesse princípio. Assim, durante a corrida eletroforética, as proteínas migram para o pólo positivo. As diversas

hemoglobinas com defeitos estruturais causados por substituições de aminoácidos de diferentes pontos isoelétricos, resultam na ocorrência de diferentes mobilidades eletroforéticas (NAOUM, 1997, p. 158). Outras técnicas quantitativas têm sido utilizadas, como Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF), Cromatografia Líquida de Baixa Pressão (LPLC) e Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) (LUKENS, 1998, p. 1181; ELGHETANY, DAVEY, 1999, p. 642; OSHIRO et al., 1999).

Com todos os testes diagnósticos oferecidos para a triagem de hemoglobinopatias, algumas pesquisas mostram comparações entre esses testes. Ballard e colaboradores (1970), comparando o teste de solubilidade com eletroforese de hemoglobina em 619 indivíduos, encontraram 130 amostras positivas no teste de solubilidade e todas foram confirmadas por eletroforese, sendo que o teste de solubilidade para Hb S foi definitivo em 616 amostras, as três amostras restantes eram de recém-nascidos, o que tornou a detecção da Hb S prejudicada.

Matusik e colaboradores (1971) compararam quatro métodos de detecção da Hb S, eletroforese de hemoglobina, teste de falcização com metabissulfito de sódio, teste de solubilidade com tampão fosfato e "Sickledex reagent". Eles utilizaram 110 amostras de sangue e obtiveram concordância de resultados em todas as amostras, sendo que três amostras eram Hb AS, sete Hb SS e o restante Hb AA.

Clark (1972) comparou o teste de solubilidade com tampão fosfato com o teste de falcização com metabissulfito de sódio e confirmou o resultado com eletroforese de hemoglobina. O teste de falcização apresentou 5,3% de resultados falso-negativos nas amostras contendo Hb S comparando com o teste de solubilidade em 418 amostras. O teste de solubilidade apresentou 1,1% de amostras falso-negativas para Hb S e 0,7% de falso-positivas em 1205 amostras testadas em eletroforese de hemoglobina.

Del Guidice e colaboradores (1979) relatam 100% de compatibilidade entre os testes de solubilidade e eletroforese de hemoglobinas em 629 amostras de sangue, sendo 190 com Hb S, com apenas um caso falso-positivo em paciente com Policitemia. Outra análise comparativa também foi realizada por Oshiro e colaboradores (1999), que compararam o teste de solubilidade, o de falcização e o de gel-centrifugação mostrando não haver discrepância entre os métodos em 28

amostras de Hb AS analisadas de um total de 836 amostras de pacientes de pré-natal estudadas.

A pesquisa de Prudêncio, Covas e Domingos (2000), mostra resultados 100 % compatíveis entre as técnicas de solubilidade e de gel-centrifugação em 5.416 doadores de sangue, desses 50 (0,92%) amostras com traço falciforme (Hb AS). Nesse mesmo estudo, os autores compararam as técnicas de solubilidade, gel-centrifugação e eletroforese de hemoglobina em 213 negros e descendentes e encontraram 18 (8,54%) portadores de Hb AS, sendo que essa amostra também apresentou 100 % de compatibilidade entre as técnicas.

O estudo de Surve e colaboradores (2000) detectaram, pelo teste de solubilidade 871 portadores de Hb S dos 932 detectados por HPLC e eletroforese, assim, a solubilidade mostrou uma sensibilidade de 93,8% e especificidade de 100%. Apesar disto, todos os autores recomendam o teste de solubilidade ou gel-centrifugação como testes de triagem em massa pela facilidade e baixo custo, mas com confirmação dos resultados positivos por outros métodos quantitativos.

O estudo realizado por Balasubramaniam e colaboradores (2001) avalia o "Kit" da Diamed ID-Sickle Cell Test. Eles analisaram 131 amostras de sangue contendo hemoglobinas normais e variantes (75 amostras contendo Hb S) determinadas por várias técnicas padronizadas como eletroforese alcalina e ácida, HPLC e teste de solubilidade, e avaliaram tanto o kit para um teste quanto o para múltiplos testes. O kit para um teste foi realizado para todas as amostras e nenhum resultado positivo foi encontrado, inclusive para aquelas amostras que continham mais do que 95% de Hb S, sendo esse problema atribuído ao agente redutor. O kit para múltiplos testes (50 amostras) detectou algumas amostras positivas, assim, de 30 amostras de pacientes com anemia falciforme (Hb SS), quatro foram negativas e as outras apresentaram resultados mais fracos do que o esperado. O resultado do teste para as amostras de pacientes com Hb AS também foram mais fracos do que o esperado e 13 das 34 amostras foram negativas. Quando os testes foram repetidos, os resultados obtidos não foram os mesmos para as amostras e também não houve correlação entre a intensidade da reação e a quantidade de Hb S. Com esses resultados, o estudo conclui que a performance do kit foi bastante desapontador, mostrando-se com baixa sensibilidade e não confiável para detectar

as amostras com Hb S, não recomendando o uso do kit a não ser que a melhora da performance seja demonstrada.

2.5.5 Prevalência de Hemoglobinopatias detectadas em Bancos de Sangue:

Alguns estudos estão sendo realizados em diversas regiões do Brasil, com o intuito de determinar a prevalência de hemoglobinopatias, visto que a heterogeneidade étnica da população brasileira é bastante evidente pela diversidade do contingente de africanos que povoaram as diversas regiões brasileiras (NAOUM, 1984, FILHO et al, 1995, NAOUM, 2000).

Segundo Naoum (2000), o processo de miscigenação brasileiro pode ser analisado sob o ponto de vista da distribuição geográfica. Os estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro e a região litorânea do Nordeste apresentam, de forma mais intensa, a miscigenação branco-negra. Já o interior do nordeste e o extremo norte (Amazonas, Pará e Maranhão) apresentam maior miscigenação branco-indígena, também verificada nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás. Na região Sul, há visível predominância do indivíduo branco, pois se pode constatar que, enquanto nos estados do norte e nordeste a contribuição dos portugueses predominou de forma quase absoluta, nos do sul as diferentes correntes migratórias condicionam maior variabilidade étnica. Além disso, o Censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística no ano de 2000 (IBGE, 2000) indica que, na região Sul do Brasil, a composição da população é de 83,9% de brancos e tão somente de 3,8% de negros e de 11,2% de pardos, sendo que o mesmo levantamento apresenta, na região Nordeste, dados bem distintos, com 31,9% de brancos, 7,5% de negros e 59,3% de pardos.

Naoum e colaboradores (1987) analisaram amostras de 55.217 indivíduos de 40 cidades brasileiras, com idade entre um mês e 90 anos, mostrando prevalência de 3,08% de hemoglobinas anormais, sendo que a condição de heterozigose (AS) foi a mais prevalente, com 1.038 casos (60,95%) do total de 1.703 portadores de hemoglobinopatias. Naoum (2000) realizou outro estudo com 101 mil amostras de sangue de 65 cidades de todas as regiões brasileiras, mostrando que a prevalência da Hb AS é maior na região norte (4,49%) e decresce gradativamente em direção ao sul: nordeste (4,05%), centro-oeste (3,11%),

sudeste (1,87%) e sul (1,87%). No geral a prevalência do traço falciforme na população brasileira foi de 2,1%. Entre pessoas de cor branca, foi de 1,18% e, entre pessoas de cor negra, 4,87%.

No Estado de São Paulo, alguns estudos mostram uma prevalência que varia de 0,76 a 2% de Hb AS em doadores de sangue. Ramalho (1976) investigou a presença de Hb AS em doadores de sangue brasileiros, com uma amostra de 250 doadores de Campinas, encontrou uma prevalência de 2%. Naoum e colaboradores (1985) verificaram que 63% das hemoglobinas anormais são Hb AS (1,76%), em estudo realizado com 7.657 indivíduos das regiões de Presidente Prudente e São José do Rio Preto. Orlando e colaboradores (2000), em São José do Rio Preto, com a análise de 262 doadores de sangue, observaram que 13 (4,96%) apresentaram hemoglobinas anormais, dos quais dois (0,76%) com Hb AS. Em Bragança Paulista, Acedo e colaboradores (2002) obtiveram uma prevalência de 1,68% de hemoglobinopatias do total de 1.846 doadores de sangue e, desses, 1,13% com traço falciforme.

O estudo retrospectivo de Nascimento e Borja (1999), que levantou a frequência de portadores de Hb AS em doadores de sangue de diversos municípios brasileiros, mostrou a maior prevalência no estudo realizado em Salvador com 5,3% de portadores do traço falciforme. No Sergipe, o estudo realizado por Vivas e colaboradores (2006), com 1.345 amostras de doadores de sangue, a frequência de Hb AS foi de 4,1%. No Rio Grande do Norte, estudo de Bezerra e Andrade (1991), com 630 amostras de doadores de sangue, encontrou uma prevalência de 2,22% de Hb AS. No Distrito Federal, Tavares e Bernardes (1980) verificaram uma prevalência de 2,69% de Hb AS em 483 doadores de sangue estudados. Essa frequência subiu para 4,6% entre os afrodescendentes.

No Estado de Minas Gerais, dois estudos mostram uma alta prevalência de Hb AS. Carvalho e colaboradores (1994) avaliaram um total de 705 doadores de sangue e constataram uma prevalência de 3,7% de Hb AS entre 5,2% de hemoglobinopatias. Mello e colaboradores (1998), com um número bem mais significativo de doadores (23.981 doadores de sangue), procedentes da região de Uberlândia encontraram 820 (3,42%) portadores de hemoglobinopatias, sendo 2,48% de Hb AS.

Grignani e colaboradores (2006) verificaram uma prevalência de 1,39% de Hb AS em 6.237 doadores de sangue de Londrina (Paraná). No Rio Grande do Sul, um estudo realizado por Lisot e Silla (2004), com 608 amostras de doadores de sangue de Caxias do Sul encontrou 71 (11,68%) doadores afetados com hemoglobinas anormais, desses seis (0,99%) com Hb AS.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Determinar a prevalência do Traço Falciforme nos doadores de sangue da Região Central do Rio Grande do Sul, sendo o Município de Santa Maria o centro de referência em saúde, e promover um aconselhamento genético informando sobre os riscos reprodutivos.

3.2 Objetivos Específicos:

- Verificar a prevalência de Hb S em doadores de sangue do Hospital Universitário de Santa Maria, da Casa de Saúde e do Hospital de Caridade Dr. Astrogildo de Azevedo, localizados em Santa Maria - RS, os quais recebem doadores de sangue de toda a Região Central do Estado;
- Realizar a comparação dos métodos de triagem mais utilizados na detecção da Hb S nos bancos de sangue que são: teste de solubilidade, teste de gel-centrifugação que utiliza o “Kit Diamed ID-Hb S” e eletroforese qualitativa em acetato de celulose pH 8,5, para padronização de um método de triagem eficiente na detecção da Hb S;
- Quantificar as hemoglobinas variantes encontradas, através de eletroforese quantitativa em gel de agarose pH 9,5;
- Confirmar a presença das hemoglobinas variantes, através de estudo molecular em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
- Promover um aconselhamento genético para os doadores e seus familiares, ascendentes e descendentes.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Artigo 1:

Traço falciforme: uma visão para os centros de hemoterapia

Sickle cell trait: a view for the hemotherapy center

Artigo submetido à Revista Panamericana de Salud Publica.

**TRAÇO FALCIFORME: UMA VISÃO PARA OS CENTROS DE
HEMOTERAPIA**

SICKLE CELL TRAIT: A VIEW FOR THE HEMOTHERAPY CENTER

Letícia Loi Giovelli ¹

José Edson Paz da Silva ²

¹ Mestranda da Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

² Professor Doutor Titular da Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Endereço para correspondência:
Prof. José Edson Paz da Silva
Coordenação do Curso de Farmácia
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Maria
Campus Universitário Camobi- Santa Maria –RS - Brazil
CEP 97105-900

Resumo

As Hemoglobinopatias são as desordens hereditárias muito freqüentes que afetam toda a população mundial e causam um grande problema de saúde pública. O Brasil apresenta uma alta prevalência de Hemoglobina S, com grandes diferenças regionais como conseqüência do processo de miscigenação. Os objetivos dessa revisão bibliográfica são destacar alguns aspectos relevantes do traço falciforme a fim de orientar os profissionais da saúde que atuam nos centros de hemoterapia sobre essa desordem e também, em virtude da falta de padronização de uma técnica de detecção da Hemoglobina S nos centros de hemoterapia, procuramos enfatizar os métodos utilizados e assim, levantar a discussão para a escolha de qual o melhor teste de triagem que deve ser utilizado nesses centros.

Palavras-Chave: Traço Falciforme, Métodos, Centros de Hemoterapia.

Introdução

As alterações das hemoglobinas aparecem como resultado de mutações dos genes alfa, beta, gama ou delta, responsáveis pelo seqüenciamento e estrutura de cada tipo de polipeptídeo. Como conseqüência, as cadeias de globina se formam de maneira anormal, e são chamadas hemoglobinas variantes, perturbando a função desempenhada pela hemoglobina dos eritrócitos (1,2).

Existe um grande número de hemoglobinas anormais, as quais compreendem um grupo de distúrbios hereditários que afetam os genes que codificam as cadeias globínicas alfa (α) e beta (β) da molécula de hemoglobina. Com padrão de herança autossômico recessivo, as hemoglobinopatias são desordens hereditárias muito freqüentes, afetando aproximadamente 7% da população mundial. Devido à alta prevalência e gravidade de suas manifestações clínicas essas desordens representam um problema de saúde pública em muitos países. Atualmente, já foram descritas mais de 1.200 mutações nos genes das cadeias globínicas, dentre estas, a Anemia Falciforme é a patologia hereditária monogênica mais encontrada e clinicamente significativa (3,4).

Essa revisão tem por objetivo destacar alguns aspectos relevantes do traço falciforme afim de orientar os profissionais da saúde que atuam nos centros de hemoterapia sobre essa desordem. Além disso, em virtude da falta de padronização de uma técnica de detecção da Hemoglobina S nos centros de hemoterapia, procuramos enfatizar os métodos utilizados e assim, levantar a questão sobre a escolha de qual o melhor teste de triagem que deve ser utilizado nesses centros.

Características do Traço Falciforme:

O traço falciforme ou siclêmico é caracterizado pela presença de Hb S em heterozigoze, presente em percentual que varia de 22 a 45% da hemoglobina total (5,6). A prevalência deste traço é de aproximadamente 8 a 9% nos negros americanos e 25 a 30% nas populações africanas (6-8). Os indivíduos heterozigóticos somam aproximadamente 2,5 milhões nos Estados Unidos e 30 milhões no mundo, já no Brasil segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (9) cerca de 2 milhões de pessoas são portadoras deste traço falciforme (8,10).

O traço falciforme raramente está associado a manifestações clínicas ou hematológicas significantes, os indivíduos não apresentam anemia, com hemoglobina variando entre 13 e 15 g/dL, e a morfologia e a sobrevivência das hemácias é normal, portanto assume o caráter de condição benigna (7,8,11,12). Apesar de os indivíduos heterozigotos não apresentarem, normalmente, evidentes manifestações clínicas existem relatos de complicações clínicas e até mesmo de morte súbita em portadores expostos a condições de baixa tensão de oxigênio como anestesia geral, mergulho, vôo em aviões despressurizados, também na desidratação, em esforços físicos extenuantes, infecções respiratórias graves, insuficiência cardíaca respiratória e episódios de acidose, que podem levar à falcização das hemácias, causando complicações vasculares, infarto esplênico e complicações renais e do trato geniturinário (5,12-14). Essas complicações ocorrem muito raramente, pois com o baixo potencial de falcização dos heterozigotos as condições precipitantes da produção de hemácias falciformes, ou seja, hipoxemia, desidratação, acidose e vasoconstrição, devem ser muito intensas (5,13,14).

A principal importância do diagnóstico do traço falciforme está associada ao risco de nascimento de futuras crianças com anemia falciforme, portanto os portadores do traço falciforme têm o direito de serem informados, através do

aconselhamento genético, a respeito dos aspectos hereditários e demais conotações clínicas dessa doença. Segundo Ramalho e Magna (15) o objetivo do aconselhamento genético é o de permitir aos indivíduos ou às suas famílias tomar decisões conscientes e equilibradas a respeito da procriação, tratando-se, portanto, de um objetivo primordialmente assistencial, em que os indivíduos devem ser conscientizados do problema, sem serem privados do direito de decisão reprodutiva. Assim, principalmente os casais de risco estarão conscientes da chance de 25 % de nascimento de uma criança homozigota, e também saberão da importância da realização de exames laboratoriais na criança precocemente, melhorando a expectativa e qualidade de vida delas (6,9,15-17).

Diagnóstico do Traço Falciforme versus Centros de Hemoterapia:

O diagnóstico das hemoglobinas anormais passou a ser importante para os Centros de Hemoterapia a partir do momento em que a triagem de hemoglobinopatias nos doadores de sangue do Brasil tornou-se obrigatória através da Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-RDC 153/04 de Junho de 2004 (18). Essa resolução veio ao encontro da necessidade de melhorar cada vez mais a qualidade do sangue a ser transfundido o que evidencia sua relevância, apesar disso, ela não indica o método de diagnóstico de detecção que deve ser realizado para seu cumprimento.

Como os portadores do traço falciforme são clínicos e hematologicamente saudáveis são aptos à doação de sangue, mas como afirmam alguns estudos (5,6,19) esse sangue possui utilização restrita tornando o diagnóstico desta alteração imprescindível. Além disso, estão sendo relatadas dificuldades operacionais no processamento desse sangue AS, principalmente na desleucocitação do concentrado eritrocitário (15,19-22).

Uma grande variedade de testes qualitativos e quantitativos permite a detecção da Hb AS. Entre os testes qualitativos, está o teste de solubilidade, no qual as hemácias são lisadas e a Hb S é reduzida pelo ditionito de sódio; por ser insolúvel, ela forma polímeros de deoxi-Hb S com esse reagente e turva a solução, enquanto que as soluções contendo outras hemoglobinas permanecem (1). Outro teste qualitativo é o de falcização, este teste utiliza o metabissulfito de sódio como substância redutora, a qual em contato com as hemácias extrai o oxigênio, levando

as hemácias com Hb S a assumir o formato de foice, verificado pela observação das hemácias ao microscópio (7,13,23). Vários outros testes são comercializados na forma de “kit”, entre eles o teste de gel-centrifugação, que se baseia no mesmo princípio da falcização “in vitro”, utiliza agente redutor e cartão com gel que retêm as hemácias falcizadas, ficando estas suspensas no microtubo após a centrifugação (23).

A eletroforese de hemoglobina em fita de acetato de celulose ou em filme de agarose é um teste amplamente conhecido, podendo ser tanto qualitativo quanto quantitativo. A eletroforese se baseia na diferente mobilidade eletroforética das hemoglobinas carregadas eletricamente permitindo a separação das bandas de migração de hemoglobinas. Como a hemoglobina é uma proteína carregada negativamente, a eletroforese de Hb se baseia nesse princípio. Assim, durante a corrida eletroforética, as proteínas migram para o pólo positivo. As diversas hemoglobinas com defeitos estruturais causados por substituições de aminoácidos de diferentes pontos isoelétricos, resultam na ocorrência de diferentes mobilidades eletroforéticas. Outras técnicas quantitativas têm sido utilizadas, como Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF), Cromatografia Líquida de Baixa Pressão (LPLC) e Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) (1,7,13,23).

Algumas pesquisas mostram comparações entre os métodos de triagem de hemoglobinopatias. Estas comparações permitem uma análise dos métodos para determinar a padronização de uma técnica para a triagem nos doadores de sangue, principalmente devido ao fato da observação de utilização de diferentes técnicas nos centros de hemoterapia do Brasil.

Ballard e colaboradores (24), comparando o teste de solubilidade com eletroforese de hemoglobina em 619 indivíduos, encontraram 130 amostras positivas no teste de solubilidade e todas foram confirmadas por eletroforese, sendo que o teste de solubilidade para Hb S foi definitivo em 616 amostras, as três amostras restantes eram de recém-nascidos, o que tornou a detecção da Hb S prejudicada.

Matusik e colaboradores (25) compararam quatro métodos de detecção da Hb S, eletroforese de hemoglobina, teste de falcização com metabissulfito de sódio, teste de solubilidade com tampão fosfato e “Sickledex reagent”. Eles utilizaram 110

amostras de sangue e obtiveram concordância de resultados em todas as amostras, sendo que três amostras eram Hb AS, sete Hb SS e o restante Hb AA.

Clark (26) comparou o teste de solubilidade com tampão fosfato com o teste de falcização com metabissulfito de sódio e confirmou o resultado com eletroforese de hemoglobina. O teste de falcização apresentou 5,3% de resultados falso-negativos nas amostras contendo Hb S comparando com o teste de solubilidade em 418 amostras. O teste de solubilidade apresentou 1,1% de amostras falso-negativas para Hb S e 0,7% de falso-positivas em 1205 amostras testadas em eletroforese de hemoglobina.

Del Guidice e colaboradores (27) relatam 100% de compatibilidade entre os testes de solubilidade e eletroforese de hemoglobinas em 629 amostras de sangue, sendo 190 com Hb S, com apenas um caso falso-positivo em paciente com Policitemia. Outra análise comparativa também foi realizada por Oshiro e colaboradores (23) compararam o teste de solubilidade, o de falcização e o de gel-centrifugação mostrando não haver discrepância entre os métodos em 28 amostras de Hb AS analisadas de um total de 836 amostras de pacientes de pré-natal estudadas. Prudêncio e colaboradores (19), encontraram resultados 100 % compatíveis entre as técnicas de solubilidade e de gel-centrifugação em 5.416 doadores de sangue, destes 50 (0,92%) amostras com Hb AS. Neste mesmo estudo os autores compararam as técnicas de solubilidade, gel-centrifugação e eletroforese de hemoglobina em 213 negros e descendentes e encontraram 18 (8,54%) portadores de HbAS, sendo que esta amostra também apresentou 100 % de compatibilidade entre as técnicas.

Entretanto, o estudo realizado por Surve e colaboradores (28) com 3246 indivíduos na Índia, detectou pelo teste de solubilidade 871 portadores de Hb S dos 932 detectados por HPLC e eletroforese, o teste de solubilidade apresentou sensibilidade total de 93,8%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 97,4%, sendo então que 61 (2,6%) portadores de Hb S foram classificados como negativos, mostrando assim que o teste de solubilidade em grandes amostras deixa de detectar alguns casos.

Portanto, este estudo levanta a discussão acerca do uso do método da solubilidade para a detecção da Hb S nos centros de hemoterapia, já que estes trabalham em grande escala e com a utilização desse teste poderão ocorrer casos

falsos negativos e falsos positivos. Apesar disso, deve-se levar em consideração o fato desse teste exigir pouco tempo, ser de fácil realização, sem necessitar de muito treinamento de pessoal e principalmente por ter um custo bem mais acessível facilita a sua realização em todos os centros de hemoterapia.

O estudo realizado por Balasubramaniam e colaboradores (29) avalia o “Kit” da Diamed ID-Sickle Cell Test (DiaMed AG, 1765 Cressir s/Morat, Switzerland) que utiliza a tecnologia de gel-centrifugação. Eles analisaram 131 amostras de sangue contendo hemoglobinas normais e variantes (75 amostras contendo Hb S) determinadas por várias técnicas padronizadas como eletroforese alcalina e ácida, HPLC e teste de solubilidade, e avaliaram tanto o kit para um teste quanto o para múltiplos testes. O “kit” para um teste foi realizado para todas as amostras e nenhum resultado positivo foi encontrado, inclusive para aquelas amostras que continham mais do que 95% de Hb S, sendo esse problema atribuído ao agente redutor. O kit para múltiplos testes (50 amostras) detectou algumas amostras positivas, assim, de 30 amostras de pacientes com anemia falciforme, quatro foram negativas e as outras apresentaram resultados mais fracos do que o esperado. O resultado do teste para as amostras de pacientes com traço falciforme (Hb AS) também foram mais fracas do que o esperado e 13 das 34 amostras foram negativas. Quando os testes foram repetidos, os resultados obtidos não foram os mesmos para as amostras e também não houve correlação entre a intensidade da reação e a quantidade de Hb S. Com esses resultados, o estudo conclui que a performance do “kit” foi bastante desapontadora, mostrando-se com baixa sensibilidade e não confiável para detectar as amostras com Hb S, não recomendando o seu uso a não ser que a melhora da performance seja demonstrada.

Esse último estudo demonstra uma avaliação da performance do método de gel-centrifugação, tal avaliação mostra certa discordância com os estudos de Oshiro (23) e de Prudêncio (19) que apresentam resultados comparativos onde esse teste apresenta-se sensível, causando ainda maior dúvida na escolha do método ideal e mostra a necessidade de maiores estudos sobre as técnicas que melhor se adaptem a realidade dos centros de hemoterapia.

Estudos da prevalência das Hemoglobinopatias nos Centros de Hemoterapia:

Alguns estudos estão sendo realizados em diversas regiões do Brasil, com o intuito de determinar a prevalência de hemoglobinopatias, já que a heterogeneidade étnica da população brasileira é bastante evidente pela diversidade do contingente de africanos que povoaram as diversas regiões brasileiras. Um dos maiores estudos foi realizado por Naoum e colaboradores (30) que analisaram amostras de 55.217 indivíduos de 40 cidades brasileiras, com idade entre 1 mês e 90 anos, encontrando uma prevalência de 3,08% de hemoglobinas anormais, sendo que a condição AS foi a mais prevalente, com 1.038 casos (60,95%) do total de 1.703 portadores de hemoglobinopatias. Ramalho (5) investigou a presença de Hb AS em doadores de sangue brasileiros, com uma amostra de 250 doadores de sangue de Campinas (SP), encontrou uma prevalência de 2%.

No estudo feito por Mello e colaboradores (31) em 23.981 doadores de sangue da região de Uberlândia (MG) os autores encontraram 820 (3,42%) portadores de hemoglobinopatias, sendo 2,48% de Hb AS. Segundo estudo realizado por Orlando e colaboradores (32), na Universidade Estadual de São Paulo, em São José do Rio Preto (SP) com a análise de 262 doadores de sangue, 13 (4,96%) apresentaram hemoglobinas anormais, dos quais 2 (0,76%) com Hb AS. Em Bragança Paulista (SP) Acedo e colaboradores (33) obtiveram uma prevalência de 1,68% de hemoglobinopatias do total de 1.846 doadores de sangue e destes, 1,13 % com traço falciforme. Grignani e colaboradores (14) verificaram uma prevalência de 1,39% de Hb AS em 6.237 doadores de sangue de Londrina (PR). No Rio Grande do Sul um estudo realizado por Lisot e Silla (34) com 608 amostras de doadores de sangue de Caxias do Sul encontrou 71 (11,68%) doadores afetados com hemoglobinas anormais, desses 6 (0,99%) com Hb AS.

Existem dois grandes motivos para justificar a realização da triagem dos portadores do traço falciforme nos bancos de sangue, que beneficia simultaneamente o doador e o receptor. Primeiro, com relação aos receptores: como o traço falcêmico é muito prevalente, assim como a anemia falciforme, a chance de encontrar um receptor de sangue com essas características é muito grande, o que diminuiria a eficácia da transfusão. Além disso, o sangue com Hb S não é recomendado para ser utilizado em exsangüinotransfusões, recém-nascidos,

crianças com hipoxemia, pacientes submetidos à cirurgia, acidose grave e pacientes com hemoglobinopatias, principalmente pela ineficiência da transfusão com hemácias que possuem uma concentração de Hb A menor e um tempo médio de vida inferior ao esperado. Também beneficia o receptor que estará sendo protegido do recebimento de hemácias anômalas que não podem cumprir com o seu papel tornando a transfusão ineficiente (5,6,19). O segundo benefício da triagem dos doadores de sangue é a identificação do traço falciforme e o aconselhamento genético, uma vez que a detecção de indivíduos heterozigotos é de extrema importância para a saúde pública pois, além de possível fonte de novos heterozigotos, podem originar indivíduos homozigotos que manifestam uma forma clínica e portanto precisam de tratamento precoce (31).

Conclusão:

A dificuldade encontrada por parte de alguns centros brasileiros de hemoterapia em cumprir a legislação vigente que exige a realização de um método de detecção da hemoglobina S motivou o estudo deste tema. Assim, a presente revisão procurou contribuir com o conhecimento e defender a importância desse por parte de toda equipe de saúde, salientando aos profissionais relacionados com os centros de hemoterapia acerca da relevância do traço falciforme.

Além disso, através da análise de alguns estudos podemos verificar que a triagem da hemoglobina S pode ser realizada por vários métodos, sendo que em grande escala um método com boa sensibilidade deve ser utilizado para evitar que portadores do traço falciforme não sejam detectados, uma vez que a detecção desses indivíduos é de extrema importância para a saúde pública já que são possíveis fontes de novos casos de anemia falciforme.

Referências Bibliográficas:

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

2. Lorenzi TF, D'Amico E, Daniel MM, Silveira PAA, Buccheri V. Fisiologia das células do sangue e hemostasia. In: _____. *Manual de Hematologia: propedêutica e clínica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2003. p. 45-83.
3. Lobo CLC, Bueno LM, Moura P, Ogeda LL, Castilho S, Carvalho SMF. Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 2003; 13: 154-159.
4. Sommer CK, Goldbeck AS, Wagner SC, Castro SM. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad Saude Publica* 2006; 22:1709-1714.
5. Ramalho AS. Hemoglobina S em doadores de sangue brasileiros. *Rev Ass Med Brasil* 1976; 22: 467-468.
6. Silva RBP, Ramalho AS. Riscos e benefícios da triagem genética: o traço falciforme como modelo de estudo em uma população brasileira. *Cad Saude Publica* 1997; 13: 285-294.
7. Lukens JN. Hemoglobinopatias S, C, D, E & O e doenças associadas. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. *Wintrobe Hematologia clínica*. São Paulo: Editora Manole; 1998. p. 1161-1205.
8. Embury SH. Anemia falciforme e hemoglobinopatias associadas. In: Bennett JC, Plum F. *Cecil tratado de medicina interna*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 976-988.
9. Anvisa. *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes*. Brasília, 2002.
10. Alves AL. Estudo da mortalidade por anemia falciforme. *Inf Epidemiol SUS* 1996; 5: 45-53.
11. Tomé-Alves R, Marchi-Salvador DP, Orlando GM, Palharini LA, Imperial RE, Naoum PC, et al. Hemoglobinas AS/Alfa talassemia - importância diagnóstica. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2000; 22: 388-394.
12. Murao M, Ferraz MHC. Traço Falciforme- heterozigose para hemoglobina S. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007; 29: 223-225.
13. Elghetany MT, Davey FR. Doenças eritrocitárias. In: HENRY, J.B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. São Paulo: Editora Manole; 1999. p. 617-663.
14. Grignani C, Amaral CL, Iamamoto CA, Gonçalves TO, Mashima DA, Matsuo T, et al. Prevalência de traço falciforme em doadores de sangue da região de Londrina-Paraná. *Rev Bras Anal Cli* 2006; 38: 259-62.

15. Ramalho AS, Magna LA. Aconselhamento genético do paciente com doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007; 29: 229-232.
16. Ramalho A S, Magna LA, Silva RBP. A Portaria MS nº 822/01 e a triagem neonatal das hemoglobinopatias. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2002; 24: 244-250.
17. Diniz D, Guedes C. Confidencialidade, aconselhamento genético e saúde pública: um estudo de caso sobre o traço falciforme. *Cad Saude Publica* 2005; 21: 747-755.
18. BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 153 de 14 de junho de 2004. Aprova as normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados e dá outras providências. Brasília, DF, 2004.
19. Prudencio BCAB, Covas DT, Bonini-Domingos CR. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de Hemoglobina S (HbS) em doadores de sangue. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2000; 22: 99-109.
20. Stroncek DF, Rainer T, Sharon V, Byrne KM, Noguchi CT, Klein HG, et al. Sickle Hb polymerization in RBC components from donors with sickle cell trait prevents effective WBC reduction by filtration. *Transfusion* 2002; 42: 1466-1472.
21. Ould Amar AK, Césaire R, Kérob-Bauchet B, Maier H, Bucher B. Altered filterability of fresh sickle cell trait donor blood. *Vox Sang* 1997; 73: 55-6.
22. Ould Amar AK. Red blood cells from donors with sickle cell trait: a safety issue for transfusion? *Transfus Med* 2006; 16: 248-53.
23. Oshiro M, Poli Neto A, Mighita K, Watanabe CI, Palharini DLB. Estudo comparativo entre os testes de solubilidade, falcização e gel-centrifugação para a detecção populacional da hemoglobina S. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1999; 58: 53-6.
24. Ballard MS, Radel E, Sakhadeo S, Schorr JB. A new diagnostic test for hemoglobin S. *J. Pediat.* 1970; 76:117-19.
25. Matusik JE, Powell JB, Gregory DM. Rapid solubility test for detection of hemoglobin S. *Clin. Chem.* 1971; 17(11):1081-1082.
26. Clark KGA. An improved solubility test for haemoglobin S. *J. Clin. Pathol.* 1972; 25(8):730-731.
27. Del Guidice RE, Doaring RM, Teran A. Evaluation of sicklequick a differential solubility test for hemoglobin S. *Am. J. Med. Technol.* 1979; 45(4):287-289.

28. Surve RR, Murkherjee MB, Kate SL, Nagtilak SB, Wadia M, Tamankar AA, et al. Deteccion of the S gene: an evaluation of the solubility test against automated chromatography and haemoglobin electrophoresis. *Br J Biomed Sci* 2000; 57: 292-4.
29. Balasubramaniam J, Phelan L, Bain BJ. Evaluation of a new screening test for sickle cell haemoglobin. *Clin Lab Haem* 2001; 23: 379-383.
30. Naoum PC, Alvarez F, Bonini-Domingos CR, Ferrari F, Moreira HW, Sampaio ZA, et al. Hemoglobinas anormais no Brasil: prevalência e distribuição geográfica. *Rev Bras Patol Clin* 1987; 23: 68-79.
31. Mello SMA, Arantes SCF, Botelho Filho A, Rocha AFS. Prevalência de hemoglobinopatias em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia-MG. *Bol Soc Bras Hematol Hemoter* 2000; 20: 130.
32. Orlando GM, Naoum PC, Siqueira FAM, Bonini-Domingos CR. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2000; 22: 111-121.
33. Acedo MJ, Costa VA, Polimeno NC, Bertuzzo CS. Programa comunitário de hemoglobinopatias: abordagem populacional a partir de doadores de sangue de Bragança Paulista, São Paulo, Brasil. *Cad Saude Publica* 2002; 18: 1799-1802.
34. Lisot CLA, Silla LMR. Triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue de Caxias do Sul, RS, Brasil: prevalência em área de colonização italiana. *Cad Saude Publica* 2004; 20: 1595-1601.

4.2 Artigo 2:

Estudo comparativo entre metodologias de triagem para detecção de Hemoglobina S em bancos de sangue

Comparative study between methods of screening for detection of Hemoglobin S in the blood banks

Artigo submetido ao Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE METODOLOGIAS DE TRIAGEM
PARA DETECÇÃO DE HEMOGLOBINA S EM BANCOS DE SANGUE**

**COMPARATIVE STUDY BETWEEN METHODS OF SCREENING FOR
DETECTION OF HEMOGLOBIN S IN THE BLOOD BANKS**

Letícia L. Giovelli ¹, Karina Danieli ², Adriana N. Bortolotto ³, Aline Klein Mastella ⁴,
Carmen Julieta Arrua ⁵, José Edson Paz da Silva ⁶

1 - Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas,
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Bolsista CAPES

2 - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Bolsista
FIPE

3 - Farmacêutica Hemocentro de Santa Maria

4- Farmacêutica Professora Substituta da Disciplina de Hematologia, Curso de
Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

5 - Médica Hematologista, Hemocentro de Santa Maria

6 - Professor Doutor titular da Disciplina de Hematologia, Curso de Farmácia,
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Resumo:**Estudo comparativo entre metodologias de triagem para detecção de Hemoglobina S em bancos de sangue**

Introdução: O Traço Falciforme é a presença em heterozigose da hemoglobina S (Hb S). Essa condição não causa sintomas clínicos no portador, portanto estes são aptos à doação de sangue. A partir de junho de 2004 através da RDC 153/04 tornou-se obrigatória a triagem de hemoglobinas anormais em doadores de sangue. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi a identificação da Hb S através da comparação de diferentes metodologias de triagem utilizadas nos bancos de sangue. **Material e Método :** Os exames foram realizados no período de Abril de 2007 a Abril de 2008, em todos os doadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), com um total de 4.108 indivíduos. Os testes foram realizados paralelamente entre o teste de solubilidade, o teste de gel-centrifugação (ID-Hb S) e a eletroforese de hemoglobina qualitativa em acetato de celulose pH 8,5. **Resultados:** Dos doadores estudados, 23 doadores (0,56%) apresentaram resultado positivo para a presença de Hb S e 2 doadores (0,05%) apresentaram resultado positivo para a presença de Hb C. Das 23 amostras positivas para Hb S detectadas por eletroforese qualitativa, 22 foram detectadas pelo teste de solubilidade e 20 foram detectadas pelo teste de gel-centrifugação. **Conclusões:** Com relação aos testes estudados algumas vantagens recaem sobre o teste de solubilidade, como custos, facilidade, praticidade e rapidez na execução, estabilidade e durabilidade dos reagentes, precisão nos resultados, demonstrando ser este um bom método de escolha para aplicação na rotina de triagem de Hb S em doadores de sangue.

Unitermos: Hemoglobina S; Traço Falciforme; Teste de Solubilidade; Teste de Gel-centrifugação; Eletroforese de Hemoglobina.

Abstract:**Comparative study between methods of screening for detection of Hemoglobin S in the blood banks**

Background: The sickle cell trait is the presence in heterozygosity of hemoglobin S (Hb S). This condition causes no symptoms in the carrier, so they are suitable for blood donation. From June 2004 through the DRC 153/04 has become mandatory

to screen for abnormal hemoglobin in blood donors. **Objectives:** The purpose of this study was to identify the Hb S by comparing the different methodologies used in screening of blood banks. **Material and Method:** The examinations were conducted during the period April 2007 to April 2008, on all blood donors of the Blood Bank of University Hospital of Santa Maria (HUSM), with a total of 4108 individuals. The tests were conducted in parallel between the solubility test, the gel-centrifuge test (ID-Hb S) and hemoglobin electrophoresis of qualitative in cellulose acetate pH 8.5. **Results:** From the donors studied, 23 donors (0.56%) showed positive for the presence of Hb S and 2 donors (0.05%) showed positive for the presence of Hb C. Of the 23 samples positive for Hb S detected by electrophoresis qualitative, 22 were detected by the test of solubility and 20 were detected by the gel-centrifuge test. **Conclusions:** For the tests studied some advantages lie on the solubility test, such as cost, ease, convenience and speed of execution, stability and durability of reagents, precision in the results, showing that this is a good method of choice for application in routine screening of Hb S in blood donors. **Key words:** Hemoglobin S; Sickle cell trait; Solubility Test; Gel-centrifuge Test; Hemoglobin Electrophoresis.

INTRODUÇÃO:

A Anemia Falciforme é a hemoglobinopatia mais freqüente no mundo, sendo a causa desta doença uma mutação de ponto na posição seis do gene da globina beta da hemoglobina, trocando o ácido glutâmico por uma valina, com conseqüente modificação físico química da molécula. Com isso, origina-se uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (Hb S), ao invés da hemoglobina normal, denominada hemoglobina A (Hb A) ^(1, 2, 11, 20).

O traço falciforme ou traço siclêmico caracteriza o portador de hemoglobina S, heterozigoto (Hb AS), que não apresenta a doença, nem possui anormalidades no número e forma das hemácias^(1,9,14). Os heterozigotos do gene da Hb S, portadores do traço falciforme possuem um percentual de hemoglobina anômala que varia de 22% a 45% da hemoglobina total ^(18,19). Estes portadores são

geralmente assintomáticos, não apresentam nenhuma anormalidade física e sua expectativa de vida é semelhante ao da população em geral⁽²⁾. Seus achados hematológicos são normais, sem anemia, com níveis de hemoglobina variando de 13 a 15 g/dL e VCM de 80 a 90 fL. A sobrevivência das hemácias é normal, portanto, não ocorrendo hemólise e nenhuma outra alteração laboratorial além da presença da hemoglobina S em heterozigose pode ser encontrada⁽¹³⁾. Embora o traço falciforme seja assintomático, há relatos de morte súbita e complicações clínicas, especialmente quando os portadores são expostos a condições extremas de baixa tensão de oxigênio como anestesia geral, mergulho, vôo em aviões despressurizados, também na desidratação, em esforços físicos extenuantes, infecções respiratórias graves, insuficiência cardíaca respiratória e episódios de acidose, que podem levar à falcização das hemácias^(3,8,10,14,15,18,19).

Uma grande variedade de testes qualitativos e quantitativos permite a detecção da Hb S. Dentre eles são amplamente conhecidos o teste de solubilidade e a eletroforese de hemoglobinas, mas também alguns testes são comercializados na forma de “kit”, como o teste em gel-centrifugação da Diamed ID-HbS. Outras técnicas quantitativas também têm sido utilizadas, como Eletroforese por Focalização Isoelétrica (IEF), Cromatografia Líquida de Baixa Pressão (LPLC) e Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)^(4,8,12,16,17,21).

Os portadores do traço falciforme são clínicamente e hematologicamente saudáveis e, assim, aptos à doação de sangue. Assim, para aumentar a eficácia terapêutica das transfusões sangüíneas, a detecção de Hb S em doadores de sangue no Brasil foi indicada pela Portaria nº 1376 de 19 de novembro de 1993⁽⁶⁾, mas a triagem das hemoglobinas anormais nos doadores de sangue tornou-se obrigatória a partir de junho de 2004, de acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária- RDC 153/04⁽⁷⁾.

Esta resolução veio ao encontro da necessidade de melhorar cada vez mais a qualidade do sangue a ser transfundido o que evidencia sua relevância, apesar disto, ela não indica o método de diagnóstico de detecção que deve ser realizado para seu cumprimento. Portanto é muito importante a padronização de uma técnica para a triagem nos doadores de sangue, principalmente devido ao fato da observação de utilização de diferentes técnicas nos bancos de sangue do Brasil. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a comparação dos métodos de

triagem para a detecção de Hb S, o teste de solubilidade, o teste de gel-centrifugação (ID-Diamed) e a eletroforese de hemoglobina, em doadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital Universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

METODOLOGIA

Amostra:

Os métodos de detecção de Hb S foram realizados no período de Abril de 2007 a Abril de 2008 em todos os doadores de sangue aptos que se apresentaram ao Banco de Sangue do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), totalizando 4.108 indivíduos.

As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa, durante o processo de doação, em tubos com anticoagulante EDTA. Estas amostras foram utilizadas no Laboratório de Sorologia do Banco de Sangue do HUSM para detecção de Hb S e após levadas para o laboratório de pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria. O projeto foi aprovado pelo CEP/UFSM 23081.015229/2006-95.

Materiais e Métodos:

As amostras de sangue dos doadores foram submetidas paralelamente aos testes de triagem de Hb S, sendo eles o teste de solubilidade, o teste de gel-centrifugação que utiliza o “Kit Diamed ID-Hb S” e a eletroforese qualitativa em acetato de celulose pH 8,5. O teste de solubilidade e a eletroforese foram realizados no laboratório de pesquisa do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSM, e o teste de gel-centrifugação foi realizado pelo Banco de Sangue do Hospital Universitário. Para a confirmação da presença da Hb S na triagem foi utilizada a eletroforese quantitativa em gel de agarose pH 9,5 utilizando os reagentes da CELMGEL-Hemoglobina Alcalina.

Teste de Solubilidade:

Para este teste utiliza-se solução fosfato preparada com fosfato de potássio monobásico P.A., fosfato de potássio dibásico P.A., saponina P.A. e água

destilada, e juntamente com o ditionito de sódio prepara-se o reagente de uso. Este reagente é utilizado para realizar o teste em tubo de ensaio na proporção de 1:100, ou 2mL de reagente de uso e 20µL de sangue total. Após misturar por rotação e aguardar por 2 minutos à temperatura ambiente. A leitura é realizada colocando o tubo a 2cm de um papel branco com linhas negras horizontais. A turvação da solução indica a presença da Hb S, que ficou insolúvel⁽¹⁴⁾.

Teste de Gel-Centrifugação:

O “Kit” Diamed ID-HbS (Micro Typing System) permite a triagem de Hb S através da realização do teste de gel-centrifugação, o qual utiliza como solução de trabalho um agente redutor liofilizado homogeneizado com 10mL de água bidestilada e sangue total. Devem ser misturados, em tubos de ensaio, 200µL de solução de trabalho e 20µL de sangue, onde se observa a mudança de cor de vermelho para vinho. Os tubos são incubados por 2 a 10 minutos à temperatura ambiente, pipeta-se 20µL desta solução nos microtubos do cartão ID-HbS e centrifuga-se por 10 minutos. Após, deve ser realizada a leitura do cartão. No resultado negativo observa-se a formação de um botão compacto no fundo do microtubo enquanto que no resultado positivo ocorre a formação de uma linha vermelha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel, formada pelas hemácias falcizadas retidas pela malha do gel.

Eletroforese Qualitativa Alcalina em Acetato de Celulose:

Para a eletroforese em acetato de celulose utilizou-se tampão Tris-EDTA-borato 0,025 M pH 8,5, fitas de acetato de celulose e sangue total hemolisado com saponina a 1%. O tampão foi colocado na cuba de eletroforese com voltagem de 200 V e as fitas de acetato de celulose ajustadas na cuba. As amostras são aplicadas na fita e após 20 min. são analisadas as bandas de migração de maneira visual. A eletroforese mostra o padrão migratório característico para cada hemoglobina (A, S, C). Para analisar as bandas foi utilizada uma amostra controle positiva para Hb S⁽¹⁴⁾.

Eletrforese Quantitativa Alcalina em Agarose:

Como teste confirmatório a eletrforese alcalina (pH 9,5) em filmes de agarose foi realizada em todos os doadores detectados como positivos nos testes de triagem, utilizando os reagentes da CELMGEL - Hemoglobina Alcalina. Para a realização da eletrforese alcalina, mistura-se 100 µL de sangue total e 100 µL de hemolisante. Aplica-se 1 µL do hemolisado no filme de gel de agarose alcalino e coloca-se o filme na cuba de eletrforese com o tampão Tris pH 9,5 deixando por 20 minutos a 150 V. Após este tempo retirar o filme, secar completamente a 60°C, mergulhar o filme no corante feito com Ponceau S CELM/ ácido tricloroacético/ água destilada por 5 minutos, retirar do corante e mergulhar no descorante feito com ácido acético glacial P.A./metanol P.A. por 10 minutos e para completar a descoloração deixar o filme mergulhado por 10 minutos no ácido acético 5% e finalmente secar completamente o filme a 60°C A leitura quantitativa das bandas de hemoglobinas foi realizada através do SDS 60 Software.

RESULTADOS:

Após os testes de triagem, entre os 4.108 doadores analisados, 25 (0,61%) apresentaram hemoglobinas variantes. Através dos métodos eletroforéticos foram identificadas 23 (0,56%) amostras positivas para Hb S e 2 (0,05%) amostras positivas para Hb C. Entre as hemoglobinas variantes detectadas por eletrforese, a Hb S correspondeu a 92% dos casos analisados.

Das 23 amostras positivas para Hb S detectadas por eletrforese qualitativa e confirmadas por eletrforese quantitativa, 22 foram detectadas pelo teste de solubilidade e 20 foram detectadas pelo teste de gel-centrifugação. Uma amostra com Hb S foi detectada somente por eletrforese.

A frequência para a presença da Hb S nos doadores de sangue pela eletrforese de hemoglobinas foi de 23 (0,56%), pelo teste de solubilidade foi de 22 (0,53%) e pelo teste de gel-centrifugação foi de 20 (0,49%). O teste de solubilidade apresentou 95,6% de sensibilidade e o teste de gel-centrifugação Diamed ID-HbS apresentou 86,9% de sensibilidade quando comparados com a eletrforese de hemoglobinas e ambos mostraram-se 100% específicos (Tabela 1).

Tabela 1- Desempenho dos testes de triagem para Hb S

Testes/ Hb S	Hb S presente	Hb S ausente
Eletroforese hemoglobina	23 (0,56%)	4.085 (99,44 %)
Teste de solubilidade	22 (0,53%)	4.086 (99,47%)
Teste de gel-centrifugação	20 (0,49%)	4.088 (99,51%)

DISCUSSÃO:

Quando se compara metodologias é comum a observação de estudos controversos, em se tratando de metodologias utilizadas em bancos de sangue isso também ocorre. Algumas pesquisas que mostram comparações entre os testes foram analisadas, como a de Oshiro *et al.*⁽¹⁶⁾ que comparou o teste de solubilidade, o de falcização e o de gel-centrifugação mostrando não haver discrepância entre os métodos em 28 amostras de Hb AS analisadas de um total de 836 amostras de pacientes de pré-natal estudadas, e a de Prudêncio *et al.*⁽¹⁷⁾, que mostra resultados 100 % compatíveis entre as técnicas de solubilidade e de gel-centrifugação em 5.416 doadores de sangue, destes 50 (0,92%) amostras com Hb AS. Neste mesmo estudo os autores compararam as técnicas de solubilidade, gel-centrifugação e eletroforese de hemoglobina em 213 negros e descendentes e encontraram 18 (8,54%) portadores de Hb AS, sendo que esta amostra também apresentou 100 % de compatibilidade entre as técnicas. Outro estudo de Surve *et al.*⁽²¹⁾ detectou pelo teste de solubilidade 871 portadores de HbS dos 932 detectados por HPLC e eletroforese, assim a solubilidade mostrou uma sensibilidade de 93,8% e especificidade de 100%. Apesar disto, todos os autores recomendam o teste de solubilidade ou gel-centrifugação como testes de triagem em massa pela facilidade e baixo custo, mas com confirmação dos resultados positivos por outros métodos quantitativos.

O estudo realizado por Balasubramaniam *et al.*⁽⁴⁾ avalia o “kit” da Diamed ID-Sickle Cell Test. Eles analisaram 131 amostras de sangue contendo hemoglobinas normais e variantes (75 amostras contendo Hb S) determinadas por

várias técnicas padronizadas como eletroforese alcalina e ácida, HPLC e teste de solubilidade. O “kit” para múltiplos testes (50 amostras) detectou algumas amostras positivas, assim, de 30 amostras de pacientes com anemia falciforme, 4 foram negativas e as outras apresentaram resultados mais fracos do que o esperado. O resultado do teste para as amostras de pacientes com Hb AS também foram mais fracas do que o esperado e 13 das 34 amostras foram negativas. Quando os testes foram repetidos os resultados obtidos não foram os mesmos para as amostras e também não houve correlação entre a intensidade da reação e a quantidade de Hb S. Com estes resultados o estudo conclui que a performance do “kit” foi bastante desapontadora, mostrando-se com baixa sensibilidade e não confiável para detectar as amostras com Hb S, não recomendando o seu uso a não ser que a melhora da performance seja demonstrada.

Em nosso estudo (Tabela 1), o teste de solubilidade demonstrou boa especificidade e sensibilidade, pois somente uma amostra não foi detectada como positiva quando comparado com as amostras detectadas por eletroforese qualitativa e confirmadas por eletroforese quantitativa, enquanto que no teste de gel-centrifugação, houve três amostras com resultado falso negativo. Esta discordância no teste de gel centrifugação deve-se provavelmente por problemas no preparo do agente redutor, que requer alguns cuidados quanto à reconstituição do liofilizado, necessitando de água bidestilada e agitação gentil por inversão, além da estabilidade ser de apenas 2 horas, após a reconstituição.

Sabe-se que o teste de solubilidade não apresenta boa sensibilidade para detecção da presença de Hb S no período neonatal, especialmente nos RN prematuros, uma vez que neste período ainda não houve a transição de Hb F para hemoglobina do adulto⁽⁵⁾. Além disso, Prudêncio *et al.*⁽¹⁷⁾, citam algumas condições que podem causar resultados falsos positivos, como na Policetemia, Mieloma Múltiplo, transfusão recente e Insuficiência Renal Crônica e falsos negativos como na presença de baixa quantidade de hemoglobina, mas como estas condições contra indicam as doações de sangue, elas não ocorreram em nosso estudo.

Analisando os custos envolvidos, o preço por exame para detecção de Hb S pelo método de solubilidade é bem menor em relação ao teste de gel-centrifugação ID Hb S (Diamed) e a eletroforese de hemoglobinas. Além disso, outras vantagens recaem sobre o teste de solubilidade, como facilidade, praticidade e rapidez na

execução, estabilidade e durabilidade dos reagentes e também não necessitando de grandes investimentos em treinamento de pessoal, porém o teste de gel-centrifugação também apresenta vantagens como a facilidade de leitura do resultado na presença da Hb S. A eletroforese de hemoglobina apresentou-se como melhor método para detecção das hemoglobinas, inclusive detectando a Hb C que os outros dois testes não encontraram, mas para grandes rotinas, como é o caso de bancos de sangue, ele é um método que exige maior tempo para a execução, treinamento de pessoal, além de apresentar um maior custo se comparado com os outros métodos analisados, sendo um método mais adequado para confirmação de resultados após triagem da Hb S.

CONCLUSÕES:

Através da comparação dos métodos de solubilidade, gel-centrifugação (Diamed ID-Hb S) e eletroforese qualitativa em acetato de celulose (pH 8,5) realizada no presente estudo pode-se demonstrar que em uma rotina de grande escala como ocorre na maioria dos bancos de sangue alguns resultados falso-negativos serão encontrados se os métodos de solubilidade ou de gel-centrifugação forem utilizados, o que é minimizado em se tratando do método de eletroforese de hemoglobinas.

Entretanto, o teste de solubilidade apresenta muitas vantagens na comparação com os outros dois, tais como baixo custo, facilidade, praticidade e rapidez na sua execução, estabilidade e durabilidade dos reagentes e precisão nos resultados, vantagens estas que devem ser consideradas na escolha deste nos bancos de sangue. Portanto, para que ocorra uma padronização de método nos bancos de sangue de todo o país pode-se inferir que o teste de solubilidade deve ser adotado como padrão para triagem da Hb S com posterior confirmação por eletroforese de hemoglobinas garantindo a qualidade do sangue a ser transfundido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. ALVES, R. T. et al., Hemoglobinas AS/Alfa talassemia - importância diagnóstica. Rev. Bras . Hematol. Hemoter., v. 22, n. 3, p. 388-394, 2000.

2. ANVISA. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes, p. 142, 2002.
3. ARAÚJO, M.C.P.E. et al. Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 123-128, jan-fev. 2004.
4. BALASUBRAMANIAM, J. et al. Evaluation of a new screening test for sickle cell haemoglobin. Clin. Lab. Haem; v. 23, p. 379-383, 2001.
5. BANDEIRA, F. M. G. C. et al. Diagnóstico da hemoglobina S: análise comparativa do teste de solubilidade com a eletroforese em pH alcalino e ácido no período neonatal. Rev. Bras. Saude Mater. Infant.; v. 3, n. 3, p. 265-270, 2003.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria n.º 1.376 de 19 de novembro de 1993. Aprova as alterações da Portaria n.º 721/GM, de 09/08/89, que aprova as Normas Técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e dá outras providências. Brasília, Diário Oficial da União, p. 18404, 2 de dezembro de 1993.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 153 de 14 de junho de 2004. Aprova as normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados e dá outras providências. Brasília, DF, 2004.
8. ELGHETANY, M.T.; DAVEY, F.R. Doenças eritrocitárias. In: HENRY, J.B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. São Paulo: Editora Manole; 1999. p. 617-663.
9. EMBURY, S.H. Anemia falciforme e hemoglobinopatias associadas. In: BENNETT, J.C.; PLUM, F. Cecil tratado de medicina interna. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap. 131, p. 976-988.
10. GRIGNANI, C. et al. Prevalência de traço falciforme em doadores de sangue da região de Londrina-Paraná. Rev. Bras. Anal. Cli., v. 38, n. 4, p. 259-262, 2006.
11. LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S. Epidemiologia de internações por doença falciforme no Brasil. Rev. Saúde Pública, v. 39, n. 6, p. 943-949, 2005.
12. LUKENS, J.N. Hemoglobinopatias S, C, D, E & O e doenças associadas. In: LEE, G.R. et al. Wintrobe Hematologia Clínica. 9 ed. São Paulo: Manole, 1998. cap. 38, p. 1161-1205.

13. MURAO, M. et al. Traço falciforme – heterozigose para hemoglobina S. Rev. Bras. Hematol. Hemoter, v. 29, n.3, p. 223-225, 2007.
14. NAOUM, P. C. Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Editora Sarvier; 1997.
15. OULD AMAR, A.K. Red blood cells from donors with sickle cell trait: a safety issue for transfusion? Transfus Med., v. 16, p. 248-253, 2006.
16. OSHIRO, M. et al. Estudo comparativo entre os testes de solubilidade, falcização e gel-centrifugação para detecção populacional da hemoglobina S. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v. 58, n. 2, p. 53-56, 1999.
17. PRUDÊNCIO, B. C. A. B. et al. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de Hemoglobina S (Hb S) em doadores de sangue. Rev. Bras. Hematol. Hemoter, v. 22, n. 2, p. 99-109, 2000.
18. RAMALHO, A.S. Hemoglobina S em doadores de sangue brasileiros. Rev. Ass. Med. Brasil, V. 22, p. 467-468, 1976.
19. SILVA, R. B. P., RAMALHO, A. S. Riscos e benefícios da triagem genética: o traço falciforme como modelo de estudo em uma população brasileira. Cad. Saude Publica, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 285-294, 1997.
20. SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T. Eficácia da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. Rev. Bras. Hematol. Hemoter, v. 28, n. 2, p. 144-148, 2006.
21. SURVE, R. R. et al. Deteccion of the S gene: an evaluation of the solubility test against automated chromatography and haemoglobin electrophoresis. Br. J. Biomed. Sci, v. 57, p. 292-4, 2000.

4.3 Artigo 3:

Estudo da prevalência de Hemoglobina AS em doadores de sangue da Região Central do Rio Grande do Sul

Study of prevalence of Hemoglobin AS in blood donors from the Central Region of Rio Grande do Sul

Artigo submetido à Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE HEMOGLOBINA AS EM DOADORES DE SANGUE DA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL

STUDY OF PREVALENCE OF HEMOGLOBIN AS IN BLOOD DONORS FROM THE CENTRAL REGION OF RIO GRANDE DO SUL

Letícia Loi Giovelli ¹, Karina Danieli ², Adriana Najai Bortolotto ³, Ana Paula Santin ⁴, Simone Martins de Castro ⁵, José Edson Paz da Silva ⁶

1- Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas, UFSM – Bolsista CAPES

2- Curso de Farmácia, UFSM – Bolsista FIPE

3 - Farmacêutica, Hemocentro de Santa Maria

4- Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFRGS.

5- Professora Doutora adjunta da disciplina de Análises Hematológicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS.

6- Professor Doutor titular da disciplina de Hematologia, Curso de Farmácia, UFSM

RESUMO:

O Traço Falciforme caracteriza o portador assintomático, heterozigoto (HbAS), que não possui anormalidades no número e forma das hemácias. Esta situação de portador é muito freqüente, no Brasil pode atingir 1 a 5% da população em geral e 6 a 10% dos descendentes africanos, sendo que a maior importância do seu diagnóstico é para o aconselhamento genético da população afetada. Este trabalho teve como objetivos verificar a prevalência do gene da Hb S nos doadores de sangue da Região Central do Rio Grande do Sul e realizar aconselhamento genético e triagem familiar. Para determinar a prevalência da Hb S foi realizada triagem em 26.071 doadores de sangue que se apresentaram nos serviços de hemoterapia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Hospital de Caridade Dr. Astrogildo de Azevedo e Casa de Saúde, entre Maio de 2006 e Janeiro de 2008. Do total de doadores, 88 (0,34%) apresentaram resultado alterado com a presença da Hb S. No aconselhamento genético, 57 (85%) doadores de sangue com traço falciforme compareceram para participar do aconselhamento. A triagem familiar foi realizada em 27 familiares de 9 doadores com traço falciforme, desses foram encontrados outros 6 (22,2%) portadores de Hb AS. O presente estudo permite concluir que apesar da baixa prevalência encontrada na Região Central do Rio Grande do Sul comparada com outras regiões do Brasil a detecção da Hb AS nos doadores de sangue é imprescindível.

Palavras-chave: Traço Falciforme, prevalência, doadores de Sangue, aconselhamento genético.

ABSTRACT:

The Sickle Cell Trait characterized the asymptomatic carriers, heterozygous (HbAS), which does not have abnormalities in the number and shape of red blood cells. Carriers in this situation is very frequent, in Brazil can reach 1 to 5% of the general population and from 6 to 10% of African descent, and the greater importance of their diagnosis is for genetic counseling of the affected population. This study aimed to determine the prevalence of sickle cell trait blood donors in the central region of Rio Grande do Sul and perform the genetic counseling and family screening. The study of the prevalence of Hb AS in blood banks was carried out

with the screening of 26,071 blood donors who presented to the banks of blood from the University Hospital of Santa Maria (HUSM), Charity Hospital Dr. Astrogildo of Azevedo and Health House, between May 2006 and March 2008. Of the total donors, 88 (0.34%) had results changed with the presence of Hb S. In genetic counseling, 57 (85%) blood donors with sickle cell trait came to attend counseling. The family screening was performed with 27 relatives of 9 donors with sickle cell trait, the other 6 were found (22.2%) with Hb AS. This study shows that despite the low prevalence found in the central region of Rio Grande do Sul compared to other regions of Brazil for the detection of Hb AS in blood donors is essential.

Key words: Sickle cell trait, prevalence, blood donors, genetic counseling.

1 INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias compreendem um grupo de distúrbios hereditários que afetam os genes que codificam as cadeias globínicas alfa (α) e beta (β) da molécula de hemoglobina. Apresentam padrão de herança autossômico recessivo, sendo desordens hereditárias muito freqüentes, afetando aproximadamente 7% da população mundial. Atualmente, já foram descritas mais de 1.200 mutações nos genes das cadeias globínicas ^{1,2}.

Dentre as hemoglobinopatias, a Anemia Falciforme é a patologia hereditária monogênica mais freqüente no mundo. A causa desta doença é uma mutação de ponto na posição seis do gene da globina beta da hemoglobina, trocando o ácido glutâmico por uma valina, com conseqüente modificação físico- química da molécula e originando uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (Hb S), ao invés da hemoglobina normal, denominada hemoglobina A (Hb A) ^{3,4}.

O traço falciforme caracteriza o portador assintomático, heterozigoto (Hb AS), que não apresenta a doença, nem possui anormalidades no número e forma das hemácias ⁵. Embora o traço falciforme seja assintomático, há relatos de morte súbita e complicações clínicas, especialmente quando os portadores são expostos a condições extremas de baixa tensão de oxigênio ⁵⁻⁹. Como diversos autores mostram, esta situação de portador é muito freqüente, no Brasil pode atingir 1 a 5% da população em geral e 6 a 10% dos descendentes africanos, sendo que a maior

importância do seu diagnóstico é para o aconselhamento genético da população afetada^{2,3,10}.

Os portadores do traço falciforme são clínica e hematologicamente saudáveis e, assim, aptos à doação de sangue. Entretanto, este sangue possui uma utilização restrita, principalmente em portadores de hemoglobinopatias, na acidose grave, nos recém-nascidos e na transfusão intra-uterina, devido ao potencial de falcização das hemácias nessas condições do receptor^{8,9,11,12,13}. Assim, para aumentar a eficácia terapêutica das transfusões sangüíneas, a detecção de Hb S em doadores de sangue no Brasil foi indicada pela Portaria nº 1376 de 19 de novembro de 1993¹⁴, mas a triagem das hemoglobinas anormais nos doadores de sangue tornou-se obrigatória a partir de junho de 2004, de acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária- RDC 153/04¹⁵.

Em virtude dessa nova Resolução que impôs a obrigatoriedade da realização de uma técnica para detectar as hemoglobinas anormais nos bancos de sangue, visto que o traço falciforme é uma alteração muito freqüente no Brasil, com nítidas diferenças regionais marcadas pelo processo de miscigenação da população, e ainda, por inexistir estudo da prevalência dessa alteração em nossa região, justifica-se a importância da realização desta pesquisa. Assim, esse trabalho teve como objetivos verificar a prevalência do gene da Hb S nos doadores de sangue da Região Central do Rio Grande do Sul, sendo o Município de Santa Maria o centro desta e a referência para toda a região quando se fala em atendimento especializado de saúde, bem como realizar o aconselhamento genético e detecção da Hb S nos familiares dos doadores portadores do traço falciforme.

2 METODOLOGIA

2.1 Amostra:

Para determinar a prevalência de Hb S foi utilizada uma amostra composta por 26.071 doadores de sangue que foram estudados pela triagem dos respectivos bancos de sangue onde ocorreu a doação. Esse estudo foi realizado no período de Maio de 2006 a Janeiro de 2008, em todos os doadores de sangue que se apresentaram nos serviços de hemoterapia do Hospital Universitário de Santa

Maria (HUSM), Hospital de Caridade Dr. Astrogildo de Azevedo e Casa de Saúde, todos localizados em Santa Maria. A amostra de sangue desses doadores foi obtida através de punção venosa, durante o processo de doação de sangue ou na coleta da segunda amostra para exame confirmatório, em tubos com anticoagulante EDTA.

O trabalho foi submetido e aprovado pelo CEP/UFSM sob número 23081.015229/2006-95.

2.2 Materiais e Métodos:

Para a triagem do traço falciforme os bancos de sangue de Santa Maria estão realizando como rotina o teste de solubilidade no Hospital de Caridade Dr. Astrogildo de Azevedo e na Casa de Saúde e o teste DiaMed-ID-HbS no Hospital Universitário. Para determinar a prevalência foi verificado o número de casos positivos detectados para Hb S a partir dos testes de triagem realizados pelos bancos de sangue.

Nos doadores que foram detectados como positivos nos testes de triagem e retornaram ao banco de sangue para nova coleta foi realizada a eletroforese quantitativa alcalina (pH 9,5) em gel de agarose, utilizando os reagentes da CELMGEL - Hemoglobina Alcalina, para separação eletroforética das hemoglobinas.

Além da eletroforese quantitativa alcalina como teste confirmatório foi também realizado um estudo de biologia molecular com todas as amostras positivas obtidas com o retorno dos doadores para nova coleta de sangue. Este estudo foi realizado em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que após a extração do DNA realizada no laboratório de biologia molecular do HUSM recebeu as amostras e concluiu o estudo molecular confirmatório para Hb S.

No doador do HUSM com resultado positivo nos testes de triagem e confirmatório para Hb S ao retornar ao banco de sangue para obter o resultado foi realizado aconselhamento genético por um dos participantes do estudo. No caso dos doadores do Hospital de Caridade Dr. Astrogildo de Azevedo e Casa de Saúde o procedimento utilizado foi a entrega de carta de informações sobre o estudo pelo profissional que informa os resultados dos exames e pedido de comparecimento no

banco de sangue do HUSM para repetição e aconselhamento genético. Os doadores de sangue que não compareceram para retirar os exames ou não foram encontrados no momento da retirada dos exames foram contatados através de carta ou telefonema para esclarecimento sobre o estudo e pedido de retorno ao banco de sangue do HUSM.

Além disso, os familiares dos doadores foram também convidados para participar da pesquisa e retornar ao banco de sangue em datas determinadas para a realização gratuita da triagem para a Hb S, bem como participar também do aconselhamento genético para os portadores do traço falciforme.

Teste de Solubilidade⁵

Para o teste de solubilidade utiliza-se solução fosfato preparada com fosfato de potássio monobásico P.A., fosfato de potássio dibásico P.A., saponina P.A. e água destilada, e juntamente com o ditionito de sódio prepara-se o reagente de uso. Esse reagente é utilizado para realizar o teste em tubo de ensaio na proporção de 1:100, ou 2mL de reagente de uso e 20 μ L de sangue total. Após mistura-se por rotação e aguarda-se 2 minutos à temperatura ambiente, faz-se a leitura do tubo colocando-o a 2cm de um papel branco com linhas negras horizontais e quando a solução apresentar-se turva e não for possível observar as linhas negras o resultado é a presença de Hb S no sangue.

Teste de Gel-Centrifugação (Bula do Kit DiaMed – ID HbS[®])

O “Kit” DiaMed ID-HbS (Micro Typing System) permite a triagem de Hb S através da realização do teste de gel-centrifugação, o qual utiliza, como solução de trabalho, um agente redutor liofilizado homogeneizado com 10mL de água bidestilada e sangue total. Devem ser misturados, em tubos de ensaio, 200 μ L da solução de trabalho e 20 μ L de sangue, onde se observa a mudança de cor de vermelho para vinho. Os tubos são incubados por 2 a 10 minutos à temperatura ambiente, então, pipeta-se 20 μ L desta solução nos microtubos do cartão ID-HbS e centrifuga-se por 10 minutos. Após, deve ser realizada a leitura do cartão. No resultado negativo observa-se a formação de um botão compacto no fundo do microtubo, enquanto que, no resultado positivo ocorre a formação de uma linha vermelha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel.

Eletroforese Quantitativa Alcalina em Agarose (Bula do Kit CELMGEL – Hemoglobina Alcalina)

Para a realização da eletroforese alcalina mistura-se 100 µL de sangue total e 100 µL de hemolisante fornecido no kit e agita-se vigorosamente formando o hemolisado. Depois disso, aplica-se 1 µL do hemolisado no filme de gel alcalino e coloca-se o filme na cuba de eletroforese com o tampão Tris pH 9,5 deixando por 20 minutos a 150 V. Após este tempo retirar o filme, secar completamente a 60°C, mergulhar o filme no corante Ponceau por 5 minutos, retirar do corante e mergulhar no descorante (ácido acético/ metanol) por 10 minutos e para completar a descoloração deixar o filme mergulhado por 10 minutos no ácido acético 5% e finalmente secar completamente o filme a 60°C. Por último, fazer o escaneamento e determinação quantitativa das frações de hemoglobinas através do programa SDS 60 Software para densitometria por scanner CELM.

Metodologia de Biologia Molecular

A extração foi realizada através da técnica de extração de DNA por Fenol-Clorofórmio.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): Ciclos de 35 vezes – 94°C por 1min.; 57°C por 1min. e 72°C por 2 min. e 1 ciclo a 72°C por 10 min.

Seqüência de primers: P1 277 GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA

P2 278 ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC

O total do fragmento amplificado é de 382 pb.

Digestão para Hb S com enzima Ddel: Deixar a 37°C O.N. As análises da digestão são efetuadas em gel de agarose 2,5%, em cuba de eletroforese com corrente elétrica de 75-90 V por 30 a 45 min. A mutação no códon 6 da beta globina (GAG → GTG) elimina um sítio de restrição da enzima Ddel, assim após a digestão o alelo normal gera três fragmentos de 78, 201 e 88 pb, enquanto que o alelo mutante gera dois fragmentos, um de 288 e outro de 88 pb.

3 RESULTADOS

No período de Maio de 2006 a Janeiro de 2008 foi realizada a triagem de 26.071 doadores de sangue que se apresentaram aos bancos de sangue do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Hospital de Caridade Dr. Astrogildo de Azevedo e Casa de Saúde.

Como apresenta a Tabela 1, o HUSM recebeu um total de 10.546 doadores de sangue, destes 48 doadores (0,45%) apresentaram traço falciforme. No Hospital de Caridade Dr. Astrogildo de Azevedo o número de doadores foi de 9.956, com 25 doadores (0,25%) com traço falciforme, e na Casa de Saúde com 5.569 doadores foram detectados 15 (0,27%) com Hb AS. Do total de 26.071 doadores, 88 doadores (0,34%) apresentaram resultado alterado com a presença da Hb S.

Tabela 1. Prevalência da Hemoglobina AS em doadores de sangue da Região de Santa Maria

População (Hospital)	Hemoglobina S		
	Ausente	Presente	Total
Hospital Universitário	10.498 (99,55%)	48 (0,45%)	10.546
Hospital de Caridade	9.931 (99,75%)	25 (0,25%)	9.956
Casa de Saúde	5.554 (99,73%)	15 (0,27%)	5.569
Total	25.983 (99,66%)	88 (0,34%)	26.071

A eletroforese de hemoglobinas quantitativa pH 9,5 foi realizada em 61 (69,3%) dos doadores com traço falciforme que retornaram ao banco de sangue do HUSM para segunda coleta de sangue e participação nesse estudo, em todos esses sendo confirmado o resultado positivo anteriormente obtido. Na quantificação das hemoglobinas, os valores para Hb S encontrados variaram de 46,7% a 32,7% e para Hb A ficaram entre 65,6% e 52%. O estudo molecular foi realizado em 68 indivíduos (doadores e familiares) detectados portadores de Hb AS e todos confirmaram a presença da Hb AS.

O aconselhamento genético foi realizado através de orientação individual por um dos participantes do estudo, com explicações sobre a condição de portador do

traço falciforme e conscientização dos riscos genéticos. Dos indivíduos convocados, 57 (85%) doadores de sangue com traço falciforme compareceram para participar do aconselhamento. Não foi possível convocar 21 doadores com traço falciforme por falta de dados suficientes para contatar.

A triagem familiar foi realizada em 27 familiares (filhos, irmãos, pais e esposas) de nove doadores com traço falciforme que participaram da pesquisa e trouxeram seus familiares para realizar os exames. Dos 27 familiares, foram encontrados outros seis (22,2%) portadores de Hb AS, detectados por eletroforese de hemoglobinas e confirmados por estudo molecular.

4 DISCUSSÃO

A comparação entre os estudos de prevalência da Hb AS é dificultada pela variação das metodologias de detecção utilizadas e pela heterogeneidade étnica da população brasileira. O presente estudo mostrou que a prevalência de 0,34% de Hb AS encontrada é um valor que deve ser muito próximo à realidade da região por apresentar um número bastante expressivo de doadores testados. Esse resultado foi inferior a outro estudo realizado no Rio Grande do Sul por Lisot e Silla ¹⁶ com 608 amostras de doadores de sangue de Caxias do Sul onde verificaram uma prevalência de 0,99% de Hb AS.

A prevalência de Hb AS encontrada é o reflexo da formação populacional da Região Central do Rio Grande do Sul, onde se situa o Município de Santa Maria, que é formada, principalmente, de descendentes europeus com pequena miscigenação com afrodescendentes, diferentemente de alguns estados do norte e nordeste onde a miscigenação é muito mais intensa. Destacamos, nesse ponto, o Censo ¹⁷ realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística no ano de 2000 que indica que na Região Sul do Brasil a composição da população é de 83,9% de brancos e tão somente de 3,8% de negros e de 11,2% de pardos, sendo que o mesmo levantamento apresenta na Região Nordeste dados bem distintos, com 31,9% de brancos, 7,5% de negros e 59,3% de pardos.

Alguns estudos comprovam essa diversidade de prevalência da Hb AS conforme o contingente de africanos que povoaram cada uma das regiões brasileiras. Os estudos mais aprofundados que englobaram diversas regiões

brasileiras foram realizados por Naoum. Em 1987, Naoum e colaboradores¹⁸ analisaram amostras de 55.217 indivíduos de 40 cidades brasileiras, com idade entre 1 mês e 90 anos, mostrando prevalência de 3,08% de hemoglobinas anormais, sendo que a condição AS foi a mais prevalente, com 1.038 casos (60,95%) do total de 1.703 portadores de hemoglobinopatias. O outro estudo de Naoum¹⁹ foi com 101 mil amostras de sangue de 65 cidades de todas as regiões brasileiras, mostrando que a prevalência da Hb AS é maior na região norte (4,49%) e decresce gradativamente em direção ao sul: nordeste (4,05%), centro-oeste (3,11%), sudeste (1,87%) e sul (1,87%). No geral a prevalência do traço falciforme na população brasileira foi de 2,1%, entre pessoas de cor branca é de 1,18% e entre pessoas de cor negra é de 4,87%.

No Estado de São Paulo, alguns estudos mostram uma prevalência que varia de 0,76 a 2% de Hb AS em doadores de sangue. Ramalho⁸ investigou a presença de Hb AS em doadores de sangue brasileiros, com uma amostra de 250 doadores de Campinas, encontrando uma prevalência de 2%. Naoum e colaboradores²⁰ verificaram que 63% das hemoglobinas anormais são Hb AS (1,76%) em estudo realizado com 7.657 indivíduos das regiões de Presidente Prudente e São José do Rio Preto. Orlando e colaboradores²¹, em São José do Rio Preto com a análise de 262 doadores de sangue, encontraram 13 (4,96%) doadores com hemoglobinas anormais, dos quais 2 (0,76%) com Hb AS. Em Bragança Paulista, Acedo e colaboradores²² obtiveram uma prevalência de 1,68% de hemoglobinopatias do total de 1.846 doadores de sangue e destes, 1,13 % com traço falciforme.

O estudo retrospectivo de Nascimento e Borja²³, que levantou a freqüência de portadores de Hb AS em doadores de sangue de diversos municípios brasileiros, mostrou que a maior prevalência foi verificada em Salvador com 5,3% de portadores do traço falciforme. No Sergipe, o estudo realizado por Vivas e colaboradores²⁴, com 1.345 amostras de doadores de sangue, a freqüência de Hb AS foi de 4,1%. No Rio Grande do Norte, o estudo de Bezerra e Andrade²⁵, com 630 amostras de doadores de sangue, encontrou uma prevalência de 2,22% de Hb AS. No Distrito Federal, Tavares e Bernardes²⁶ verificaram uma prevalência de 2,69% de Hb AS em 483 doadores de sangue estudados. Esta freqüência subiu para 4,6% entre os afrodescendentes.

No Estado de Minas Gerais dois estudos mostram uma alta prevalência de Hb AS. Carvalho e colaboradores ²⁷, avaliaram um total de 705 doadores de sangue e constataram uma prevalência de 3,7% de Hb AS entre 5,2% de hemoglobinopatias. Mello e colaboradores ²⁸, com um número bem mais significativo de doadores (23.981 doadores de sangue), procedentes da região de Uberlândia encontraram 820 (3,42%) portadores de hemoglobinopatias, sendo 2,48% de Hb AS. Na Região Sul do Brasil a frequência de Hb AS diminuiu significativamente como mostra o estudo realizado no Paraná por Grignani e colaboradores ⁹ que verificaram uma prevalência de 1,39% de Hb AS em 6.237 doadores de sangue de Londrina.

Este estudo mostrou também diferentes prevalências entre os bancos de sangue estudados. Foi observada uma prevalência de 0,45% no HUSM e 0,25 e 0,27% nos outros dois hospitais. Essa diferença, provavelmente, deve-se à circunstância de haver diferenças entre o tipo de doações. No HUSM, pela sua vinculação à Universidade Federal e por se constituir em centro de referência regional de saúde pública (SUS), a doação ocorre mais de forma voluntária, já nos outros dois hospitais, a doação é principalmente de forma dirigida.

A prevalência encontrada também pode ser explicada pelas metodologias utilizadas no estudo. Apesar dos resultados falso-negativos descritos na literatura ²⁹, os testes de solubilidade e gel-centrifugação utilizados neste estudo são os mais indicados por estudos de comparações de metodologias para detecção dos doadores com Hb AS ^{12,30}.

Com relação ao aconselhamento genético, os nossos resultados indicam que 85% dos doadores convocados compareceram ao banco de sangue do HUSM, demonstrando interesse em obter maiores esclarecimentos sobre o traço falciforme. E com relação à triagem familiar, apenas 9 doadores compareceram com seus familiares para realizar os exames. Os principais motivos do não comparecimento foram falta de tempo, incompatibilidade de horários ou pelos familiares não residirem na cidade. Este resultado evidencia o desinteresse por parte dos doadores e familiares sobre uma possível alteração genética. Acedo e colaboradores ²² também realizaram aconselhamento genético e triagem familiar em doadores de sangue em Bragança Paulista, nesse estudo 93% dos indivíduos

convocados compareceram ao aconselhamento e todos que compareceram levaram seus familiares para exame.

Nosso estudo permite concluir que apesar da baixa prevalência encontrada na região central do Rio Grande do Sul comparada com outras regiões do Brasil a detecção da Hb AS nos doadores de sangue é imprescindível, pois mesmo não ocorrendo muitos casos de doadores portadores de traço falciforme, esses casos existem e provocam a ineficácia da transfusão. Além disso, evidenciamos através do aconselhamento genético o desconhecimento por parte da população sobre o traço falciforme e suas conseqüências genéticas, ressaltando a importância do aconselhamento genético efetuado pelos bancos de sangue para a diminuição dos possíveis casos de anemia falciforme.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Lobo CLC, Bueno LM, Moura P, Ogeda LL, Castilho S, Carvalho SMF. Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro, Brasil. Rev Panam Salud Publica 2003; 13(2/3): 154-159.
2. Sommer CK, Goldbeck AS, Wagner SC, Castro SM. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul, Brasil. Cad Saude Publica 2006; 22(8): 1709-1714.
3. ANVISA. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. Brasília, 2002.142 p.
4. Silva WS, Lastra A, Oliveira SF, Klautau-Guimarães N, Grisolia CK. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações de Recôncavo Baiano, Brasil. Cad Saude Publica 2006; 22(12): 2561-2566.
5. Naoum PC. Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Sarvier, 1997.171p.
6. McCurdy PR. Sickle cell trait. Am Fam Physisian 1974; 10(5): 141-146.
7. Sears DA. The morbidity of sickle cell trait. Am J Med 1978, 64(6): 1021-1036.
8. Ramalho AS. Hemoglobina S em doadores de sangue brasileiros. Rev. Ass. Med. Brasil 1976; 22(12).

9. Grignani C, Amaral CL, Iamamoto CA, Gonçalves TO, Mashima DA, Matsuo T, et al. Prevalência de traço falciforme em doadores de sangue da região de Londrina-Paraná. *Rev Bras Anal Cli* 2006; 38(4): 259-62.
10. Ramalho AS; Magna LA; Silva RBP. A Portaria MS nº 822/01 e a triagem neonatal das hemoglobinopatias. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2002; 24(4): 244-250.
11. Ould Amar AK; Césaire R; Kérob-Bauchet B; Robert P; Maier H; Bucher B. Altered filterability of fresh sickle cell trait donor blood. *Vox. Sang.* 1997; 73: 55-56.
12. Prudencio BCAB.; Covas DT; Domingos CRB. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de Hemoglobina S (Hb S) em doadores de sangue. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 2000; 22(2): 99-109.
13. Stroncek DF; Rainer T; Sharon V; Byrne KM; Noguchi CT; Klein HG et al. Sickle Hb polymerization in RBC components from donors with sickle cell trait prevents effective WBC reduction by filtration. *Transfusion* 2002; 42: 1466-1472.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria n.º 1.376 de 19 de novembro de 1993. Aprova as alterações da Portaria n.º 721/GM, de 09/08/89, que aprova as Normas Técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e dá outras providências. Brasília, Diário Oficial da União, p. 18404, 2 de dezembro de 1993.
15. BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 153 de 14 de junho de 2004. Aprova as normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados e dá outras providências. Brasília, DF, 2004.
16. Lisot CLA.; Silla LMR. Triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue de Caxias do Sul, RS, Brasil: prevalência em área de colonização italiana. *Cad. Saud. Públ.* 2004, 20(6): 1595-1601.
17. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Contagem da população. IBGE, Rio de Janeiro, 2000.
18. Naoum PC; Álvares Filho F; Domingos CRB; Ferrari F; Moreira HW; Sampaio ZA; Maziero PA; Castilho EM. Hemoglobinas anormais no Brasil: prevalência e distribuição geográfica. *Rev Bras Pat Clín* 1987, 23(3):68-72.
19. Naoum PC. Prevalência e controle da hemoglobina S. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2000; 22 (supl 2): 142-148.
20. Naoum PC; Ângulo IL; Brandão AC; Graciano RAS; Spir M; Nomura E et al. Detecção e conscientização de portadores de hemoglobinopatias nas regiões

- de São José do Rio Preto e Presidente Prudente, SP (Brasil). *Rev Saúde Públ* 1985, 19: 364-373.
21. Orlando GM; Naoum PC; Siqueira FAM; Domingos CRB. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2000, 22(2): 111-121.
 22. Acedo MJ; Costa VA; Polimeno NC; Bertuzzo CS. Programa comunitário de hemoglobinopatias: abordagem populacional a partir de doadores de sangue de Bragança Paulista, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2002, 18(6): 1799-1802.
 23. Nascimento MLP, Borja MMP. Portadores de Hemoglobina S: um estudo comparativo entre vários serviços de hemoterapia brasileiros e o impacto médico-social em Salvador, Bahia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 1999; 21(2): 67-71.
 24. Vivas WLP; Rebouças DS; Fabbro ALD; Cipolotti R. Heterozigose para hemoglobinopatias em doadores de sangue do Centro de Hemoterapia de Sergipe. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2006; 28(4): 284-287.
 25. Bezerra TMM, Andrade SR. Investigação sobre a prevalência de hemoglobinas anormais entre doadores de sangue. *Bras Anál Clín* 1991; 23(4): 117-118.
 26. Tavares-Neto J, Bernardes R. Hemoglobinas anormais em doadores de sangue de Sobradinho, Distrito Federal. *Bras Anál Clín* 1980; 12(1-4): 55-60.
 27. Carvalho MG; Souza MO, Silva MBS; Oliveira JMC; Cardoso ICRA; Carvalho IP et al. Hemoglobinas anormais: perfil estatístico em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais. *Rev Bras Anál Clín* 1994; 26(2): 39-40.
 28. Melo SMA; Arantes SCF; Botelho Filho A; Rocha AFS; Silveira EP. Prevalência de Hemoglobinopatias em Doadores de Sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia-MG, *Bol Soc Bras Hemat Hemot*, 20 (suplemento) 1998, p. 130.
 29. Surve RR; Mukher JEE MB; Kate SL; Nagtilak SB; Wadia M; Tamankar AA et al. Deteccion of the-S gene: an evaluation of the solubility test against automated chromatography and haemoglobin electrophoresis. *Br J Biomed Sci* 2000; 57(4): 292-294.
 30. Oshiro M; Polineto A; Miguita K; Watanabe CI; Palharini DLB. Estudo comparativo entre os testes de solubilidade, falcização e gel-centrifugação para detecção populacional de hemoglobina S. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1999, 58(2):53-56.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O estudo da prevalência de Hb AS, nos bancos de sangue, foi realizado com a triagem de 26.071 doadores de sangue que se apresentaram aos bancos de sangue do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Hospital de Caridade Dr. Astrogildo de Azevedo e Casa de Saúde. O HUSM recebeu um total de 10.546 doadores de sangue, desses 48 doadores (0,45%) apresentaram traço falciforme. No Hospital de Caridade Dr. Astrogildo de Azevedo o número de doadores foi de 9.956, com 25 doadores (0,25%) com traço falciforme. Na Casa de Saúde, com 5.569 doadores foram detectados 15 (0,27%) com Hb AS. Do total de 26.071 doadores, 88 doadores (0,34%) apresentaram resultado alterado com a presença da Hb S.

Os estudos confirmatórios realizados foram a eletroforese de hemoglobinas e o estudo molecular. A eletroforese de hemoglobinas quantitativa pH 9,5 foi realizada em 61 (69,3%) dos doadores com traço falciforme que retornaram ao banco de sangue do HUSM para segunda coleta de sangue e participação nesse estudo, em todos esses sendo confirmado o resultado positivo anteriormente obtido. Na quantificação das hemoglobinas, os valores para Hb S encontrados variaram de 32,7% a 46,7% e para Hb A ficaram entre 52% e 65,6%, estando esses valores dentro dos encontrados na literatura. O estudo molecular foi realizado em 68 indivíduos (doadores e familiares) detectados portadores de Hb AS e todos confirmaram a presença da Hb AS.

A comparação entre os estudos de prevalência da Hb AS é dificultada pela variação das metodologias de detecção utilizadas e pela heterogeneidade étnica da população brasileira. A prevalência de 0,34% de Hb AS encontrada é um valor que deve ser muito próximo à realidade da região por apresentar um número bastante expressivo de doadores testados. Este resultado foi inferior a outro estudo realizado no Rio Grande do Sul, por Lisot e Silla (2004), com 608 amostras de doadores de sangue de Caxias do Sul, no qual verificaram uma prevalência de 0,99% de Hb AS.

A prevalência de Hb AS encontrada é o reflexo da formação populacional da Região Central do Rio Grande do Sul, onde se situa o Município de Santa Maria,

que é formada, principalmente, de descendentes europeus com pequena miscigenação com afrodescendentes, diferentemente de alguns estados do norte e nordeste onde a miscigenação é muito mais intensa. O Censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística no ano de 2000 indica que na Região Sul do Brasil, a composição da população é de 83,9% de brancos e tão somente de 3,8% de negros e de 11,2% de pardos. O mesmo levantamento apresenta, na Região Nordeste, dados bem distintos, com 31,9% de brancos, 7,5% de negros e 59,3% de pardos.

O presente estudo mostrou também diferentes prevalências entre os bancos de sangue estudados. Foi observada uma prevalência de 0,45% no HUSM e 0,25 e 0,27% nos outros dois hospitais. Essa diferença, provavelmente, deve-se à circunstância de haver diferenças entre o tipo de doações. No HUSM, pela sua vinculação à Universidade Federal e por se constituir em centro de referência regional de saúde pública (SUS), a doação ocorre mais de forma voluntária, já nos outros dois hospitais, a doação é principalmente de forma dirigida.

A prevalência encontrada também pode ser explicada pelas metodologias utilizadas no estudo. Os testes de solubilidade e gel-centrifugação são metodologias mais indicadas para triagem de Hb S em doadores de sangue, apesar dos resultados falso-negativos comprovadamente encontrados nos estudos de Clark (1972) e de Surve (2000). Além desses, o presente estudo, através da comparação de metodologias também verificou resultados falso-negativos. Apesar disso, as metodologias empregadas pelos bancos de sangue estudados são as mais indicadas em outros dois estudos de comparações de metodologias para detecção dos doadores com Hb AS (PRUDÊNCIO et al, 2000, OSHIRO et al, 1999).

O aconselhamento genético foi realizado através de orientação individual com explicações sobre a condição de portador do traço falciforme e conscientização dos riscos genéticos. Dos indivíduos convocados, 57 (85%) doadores de sangue com traço falciforme compareceram para participar do aconselhamento. Não foi possível convocar 21 doadores com traço falciforme por falta de dados suficientes para contatar.

A triagem familiar foi realizada em 27 familiares (filhos, irmãos, pais e esposas) de nove doadores com traço falciforme que participaram da pesquisa e

trouxeram seus familiares para realizar os exames. Dos 27 familiares, foram encontrados outros seis (22,2%) portadores de Hb AS, detectados por eletroforese de hemoglobinas e confirmados por estudo molecular.

Com relação ao aconselhamento genético, os resultados indicam que 85% dos doadores convocados compareceram ao banco de sangue do HUSM demonstrando interesse em obter maiores esclarecimentos sobre o traço falciforme. E em relação à triagem familiar apenas nove doadores compareceram com seus familiares para realizar os exames. Os principais motivos do não comparecimento foram falta de tempo, incompatibilidade de horários ou pelos familiares não residirem na cidade. Esse resultado evidencia o desinteresse por parte dos doadores e familiares sobre uma possível alteração genética.

Através da triagem familiar foram encontrados outros 22,2% de portadores do traço falciforme, sendo essa uma estratégia eficaz para identificar muitos outros portadores do traço falciforme e casais de risco antes do casamento e procriação. A maioria dos estudos que realizam triagem familiar a partir de casos-índice tem como objetivo detectar precocemente os portadores de traço falciforme para realizar o aconselhamento genético, evitando o nascimento de crianças com anemia falciforme e conseqüentemente reduzindo os gastos com tratamento pelos serviços de saúde pública (SILVA, RAMALHO, 1997; AHMED, et al., 2002; ACEDO, et al., 2002; BANDEIRA, et al., 2007). Acedo e colaboradores (2002) também realizaram aconselhamento genético e triagem familiar em doadores de sangue em Bragança Paulista, nesse estudo 93% dos indivíduos convocados compareceram ao aconselhamento e todos que compareceram levaram seus familiares para exame.

Para a comparação das metodologias de triagem de detecção de Hb S, foi analisado o total de 4.108 doadores pelos métodos de solubilidade, gel-centrifugação Diamed ID-HbS e eletroforese alcalina qualitativa em fitas de acetato de celulose. Dos doadores estudados, 23 doadores (0,56%) apresentaram resultado positivo para a presença de Hb S e dois doadores (0,05%) apresentaram resultado positivo para a presença de Hb C.

As 23 amostras positivas para Hb S e as duas amostras positivas para Hb C foram detectadas por eletroforese de hemoglobina qualitativa em fitas de acetato de celulose e confirmadas por eletroforese alcalina quantitativa em filmes de

agarose. Das 23 amostras positivas para Hb S detectadas por eletroforese qualitativa e confirmadas por eletroforese quantitativa, 22 foram detectadas pelo teste de solubilidade e 20 foram detectadas pelo teste de gel-centrifugação. Uma amostra com Hb S foi detectada somente por eletroforese.

A frequência para a presença da Hb S nos doadores de sangue, pela eletroforese de hemoglobinas, foi de 23 (0,56%), pelo teste de solubilidade, foi de 22 (0,53%) e, pelo teste de gel-centrifugação, foi de 20 (0,49%). O teste de solubilidade apresentou 95,6% de sensibilidade e o teste de gel-centrifugação Diamed ID-HbS apresentou 86,9% de sensibilidade, quando comparados com a eletroforese de hemoglobinas e ambos se mostraram 100% específicos.

Através da comparação das metodologias foi possível observar que a prevalência foi maior quando a eletroforese foi realizada em todos os doadores do HUSM, passando de 0,45% para 0,56%, isso se deve pela maior sensibilidade desta metodologia com relação às outras utilizadas onde foram encontrados casos falso-negativos (tabela 1, artigo 3 e tabela 1, artigo 2).

Dessa forma, o teste de solubilidade demonstrou boa especificidade e sensibilidade, pois somente uma amostra não foi detectada como positiva comparando com as amostras detectadas por eletroforese qualitativa e confirmadas por eletroforese quantitativa. Enquanto que, no teste de gel-centrifugação, houve três amostras com resultado falso negativo. Essa discordância no teste de gel centrifugação se deve, provavelmente, por problemas no preparo do agente redutor, que requer alguns cuidados quanto à reconstituição do liofilizado, necessitando de água bidestilada e agitação gentil por inversão, além da estabilidade ser de apenas duas horas, após a reconstituição.

Sabe-se que o teste de solubilidade não apresenta boa sensibilidade para detecção da presença de Hb S no período neonatal, especialmente nos recém-nascidos prematuros, uma vez que, nesse período, ainda não houve a transição de Hb F para hemoglobina do adulto (BANDEIRA et al., 2003). Além disso, Prudêncio e colaboradores (2000) citam algumas condições que podem causar resultados falsos positivos, como na Policetemia, Mieloma Múltiplo, transfusão recente e Insuficiência Renal Crônica e também condições propícias a resultados falsos negativos, como na presença de baixa quantidade de hemoglobina, mas como

essas condições contra indicam as doações de sangue, elas não ocorreram em nosso estudo.

Analisando os custos envolvidos, o preço por exame para detecção de Hb S pelo método de solubilidade é bem menor em relação ao teste de gel-centrifugação ID Hb S (Diamed) e a eletroforese de hemoglobinas. Além disso, outras vantagens recaem sobre o teste de solubilidade, como facilidade, praticidade e rapidez na execução, estabilidade e durabilidade dos reagentes e também não necessitando de grandes investimentos em treinamento de pessoal. O teste de gel-centrifugação também apresenta vantagens, como a facilidade de leitura do resultado na presença da Hb S. A eletroforese de hemoglobina se apresentou como melhor método para detecção das hemoglobinas, inclusive detectando a Hb C que os outros dois testes não detectaram. Entretanto, para grandes rotinas, como é o caso de bancos de sangue, a eletroforese é um método que exige maior tempo para a execução, treinamento de pessoal, além de apresentar um maior custo, se comparado com os outros métodos analisados, sendo um método mais adequado para confirmação de resultados após triagem da Hb S.

Assim, através da comparação dos métodos de solubilidade, gel-centrifugação (Diamed ID-Hb S) e eletroforese qualitativa em acetato de celulose (pH 8,5), foi possível demonstrar que, em uma rotina de grande escala, como ocorre na maioria dos bancos de sangue, alguns resultados falso-negativos serão encontrados se os métodos de solubilidade ou de gel-centrifugação forem utilizados, o que pode ser minimizado em se tratando do método de eletroforese de hemoglobinas. Entretanto, o teste de solubilidade apresenta muitas vantagens na comparação com os outros dois, que precisam ser consideradas na escolha deste método pelos bancos de sangue.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Apesar da baixa prevalência encontrada na região central do Rio Grande do Sul comparada com outras regiões do Brasil a detecção da Hb AS nos doadores de sangue é imprescindível, pois mesmo não ocorrendo muitos casos de doadores portadores de traço falciforme, esses casos existem e provocam a ineficácia da transfusão.
- Através da comparação de metodologias o método com maior viabilidade de implantação na rotina de triagem de Hb S em Bancos de Sangue e melhor desempenho quando comparado ao teste confirmatório foi o teste de solubilidade, apresentando confiabilidade satisfatória.
- Os estudos confirmatórios, eletroforese de hemoglobinas quantitativa pH 9,5 e biologia molecular confirmaram todos os resultados positivos para Hb S encontrados na triagem, mostrando o bom desempenho dos métodos.
- O aconselhamento genético, através de orientação individual com explicações sobre a condição de portador do traço falciforme e conscientização dos riscos genéticos, realizado para os doadores de sangue com traço falciforme que compareceram ao Banco de Sangue do HUSM, demonstrou o desconhecimento por parte da população sobre o traço falciforme e suas conseqüências genéticas, ressaltando a importância do aconselhamento genético efetuado pelos bancos de sangue para a diminuição dos possíveis casos de anemia falciforme.
- A triagem familiar realizada nos familiares (filhos, irmãos, pais e esposas) dos doadores com traço falciforme que participaram da pesquisa, permitiu encontrar outros portadores de Hb S, demonstrando ser essa uma estratégia eficaz para identificar portadores do traço falciforme e casais de risco antes do casamento e procriação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEDO, M. J. et al. Programa comunitário de hemoglobinopatias: abordagem populacional a partir de doadores de sangue de Bragança Paulista, São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1799-1802, nov-dez. 2002.

AHMED, S. et al. Screening extended families for genetic hemoglobin disorders in Pakistan. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n. 15, p.1162-1168, 2002.

ALVES, A. L. Estudo da mortalidade por anemia falciforme. **Informe Epidemiológico do SUS**, cap. 5, p. 45-53, 1996.

ANVISA. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**. Brasília, 2002.142 p.

ÂNGULO, I. L. Acidente vascular cerebral e outras complicações do Sistema Nervoso Central. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 262-267, 2007.

ARAÚJO, M. C. P. E. et al. Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 123-128, jan-fev. 2004.

BALASUBRAMANIAM, J. et al. Evaluation of a new screening test for sickle cell haemoglobin. **Clin. Lab. Haem.**, v. 23, p. 379-383, 2001.

BALLARD, M. S. et al. A new diagnostic test for hemoglobin S. **J. Pediat.**; v. 76, p. 117-119, 1970.

BANDEIRA, F. M. G. C. et al. Diagnóstico da hemoglobina S: análise comparativa do teste de solubilidade com a eletroforese em pH alcalino e ácido no período neonatal. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.**; v. 3, n. 3, p. 265-270, 2003.

BANDEIRA, F. M. G. C. et al. Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina S. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2007.

BEZERRA, T. M. M.; ANDRADE, S.R. Investigação sobre a prevalência de hemoglobinas anormais entre doadores de sangue. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 23, n. 4, p. 117-118, 1991.

BONINI-DOMINGOS, A. C.; VIANA-BARACIOLI, L. M. S.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Identificação de variantes de hemoglobina em doadores de sangue. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 26, n. 1, p. 57-59, 2004.

BODENSTEINER, D. White cell reduction in blood from donors with sickle cell trait. **Transfusion**, v. 34, n. 1, p. 84, 1994.

BRAGA, J. A. P. Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 233-238, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria n.º 1.376 de 19 de novembro de 1993. Aprova as alterações da Portaria n.º 721/GM, de 09/08/89, que aprova as Normas Técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e dá outras providências. Brasília, Diário Oficial da União, p. 18404, 2 de dezembro de 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 153 de 14 de junho de 2004. Aprova as normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados e dá outras providências. Brasília, DF, 2004.

CARVALHO, M. G. et al. Hemoglobinas anormais: perfil estatístico em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 26, n. 2, p. 39-40, 1994.

CHINELATO- FERNANDES, A. R.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Contribuição do estudo molecular de hemoglobinas S-like para o conhecimento da diversidade genética da população brasileira. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 3, p. 208-212, 2005.

CLARK, K. G. A. An improved solubility test for haemoglobin S. **J. Clin. Pathol.**; v. 25, n. 8, p. 730-731, 1972.

COSTA, P. J. M. S. et al. Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo bantu da anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 1, p. 40-44, 2006.

DAUDT, L. E. et al. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 833-841, mai-jun. 2002.

DEL GUIDICE, R. E. et al. Evaluation of sicklequick a differential solubility test for hemoglobin S. **Am. J. Med. Technol.**; v. 45, n. 4, p. 287-289, 1979.

DINIZ, D.; GUEDES, C. Confiabilidade, aconselhamento genético e saúde pública: um estudo de caso sobre o traço falciforme. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 747-755, mai-jun. 2005.

DUCATTI, R. P. et al. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 23, p. 23-29, 2001.

ELGHETANY, M. T.; DAVEY, F. R. Doenças eritrocitárias. In: HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19 ed. São Paulo: Manole, 1999. cap. 26, p. 617-663.

EMBURY, S. H. Anemia falciforme e hemoglobinopatias associadas. In: BENNETT, J. C.; PLUM, F. **Cecil tratado de medicina interna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap. 131, p. 976-988.

FIGUEIREDO, M. S. Agentes indutores da síntese de hemoglobina fetal. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 313-315, 2007.

FILHO, F. A. et al. Distribución geográfica etaria y racial de la hemoglobina S en Brasil. **Sangre**, v. 40, n. 2, p. 97-102, 1995.

FLEURY, M. K. Determinação dos haplótipos do gene da globina beta em pacientes com anemia falciforme do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 23, n. 1, p. 57-58, 2001.

FLEURY, M. K. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: aspectos clínicos e laboratoriais. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 39, n. 2, p. 89-93, 2007.

FOST, N. Ethical implications of screening asymptomatic individuals. **FASEB J.**, v. 6, p. 2813-2817, 1992.

GONÇALVES, N. S. L.; RAMALHO, A. S. Alterações hemoglobínicas e dores osteoarticulares. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 25, n. 4, p. 128-130, 1985.

GRIGNANI, C. et al. Prevalência de traço falciforme em doadores de sangue da região de Londrina-Paraná. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 38, n. 4, p. 259-262, 2006.

GUALANDRO, S. F. M.; FONSECA, G. H. H.; GUALANDRO, D.M. Complicações cardiopulmonares das doenças falciformes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 291-298, 2007.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Contagem da população. IBGE, Rio de Janeiro, 2000.

KARK, J. A. et al. Sickle-cell trait as a risk factor for sudden death in physical training. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, n. 13, p. 781-787, 1987.

LISOT, C. L. A.; SILLA L. M. R. Triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue de Caxias do Sul, RS, Brasil: prevalência em área de colonização italiana. **Cad. Saúde. Pública.**, v. 20, n. 6, p. 1595-1601, nov-dez. 2004.

LOBO, C. L. C. et al. Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Panam. Salud Publica**, v.13, n. 2/3, p. 154-145, 2003.

LOBO, C.; MARRA, V. N.; SILVA, R. M. G. Crises dolorosas na doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 247-258, 2007.

LORENZI, T. F. et al. Fisiologia das células do sangue e hemostasia. In:____. **Manual de Hematologia**: propedêutica e clínica. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 45-83.

LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S. Epidemiologia de internações por doença falciforme no Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, v. 39, n. 6, p. 943-949, 2005.

LUKENS, J. N.; LEE, G. R. As hemoglobinas anormais: princípios gerais. In: LEE, G.R. et al. **Wintrobe Hematologia clínica**. 9 ed. São Paulo: Manole, 1998. cap. 36, p. 1120-1152.

LUKENS, J. N. Hemoglobinopatias S, C, D, E & O e doenças associadas. In: LEE, G.R. et al. **Wintrobe Hematologia Clínica**. 9 ed. São Paulo: Manole, 1998. cap. 38, p. 1161-1205.

MAGALHÃES, I. Q. Alterações renais nas doenças falciformes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 279-284, 2007.

MANFREDINI, V. et al. A fisiopatologia da anemia falciforme. **Infarma**, v. 19, n. 1/2, p. 3-6, 2007.

MATUSIK, J. E.; POWELL, J. B.; GREGORY D. M. Rapid solubility test for detection of hemoglobin S. **Clin. Chem.**, v. 17, n. 11, p. 1081-1082, 1971.

McCURDY, P. R. Sickle cell trait. **Am. Fam. Physician.**, v. 10, n. 5, p. 141-146, 1974.

MELLO, S. M. A. et al. Prevalência de hemoglobinopatias em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia-MG. **Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 20, suppl., p. 130, 1998.

MELO-REIS, P. R. A importância do diagnóstico precoce na prevenção das anemias hereditárias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 2, p. 149-152, 2006.

MORAIS, J. F. et al. Falcização em concentrados de hemácias provenientes de doadores com hemoglobina armazenados em condições normais de banco de sangue. **Rev. Med. Univ. Fed. Ceará**, v. 25, n. 1-2, p. 63-69, 1987.

MURAO, M.; FERRAZ, M. H. C. Traço Falciforme- heterozigose para hemoglobina S. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 223-225, 2007.

NAGPAL, K. C. et al. Proliferative retinopathy in sickle cell trait. **Arch. Intern. Med.**; v.137, p. 325-328, 1977.

NAOUM, P. C. Anemias imigrantes. Origem das anemias hereditárias no Brasil. **Ciência Hoje**, v. 3, p. 58-64, 1984.

NAOUM, P. C. et al. Detecção e conscientização de portadores de hemoglobinopatias nas regiões de São José do Rio Preto e Presidente Prudente, SP (Brasil). **Rev. Saúde Públ.**, v. 19, p. 364-373, 1985.

NAOUM, P. C. et al. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. **Rev. Bras. Patol. Clín.**, v. 23, n. 3, p. 68-79, 1987.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997.171p.

NAOUM, P. C. Prevalência e controle da hemoglobina S. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, supl. 2, p. 142-148, 2000.

NASCIMENTO, M. L. P.; BORJA M. M. P. Portadores de Hemoglobina S: um estudo comparativo entre vários serviços de hemoterapia brasileiros e o impacto médico-social em Salvador, Bahia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 21, n. 2, p. 67-71, 1999.

NETO, G. C. G.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

ORLANDO, G. M. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n. 2, p. 111-121, 2000.

OSHIRO, M. et al. Estudo comparativo entre os testes de solubilidade, falcização e gel-centrifugação para a detecção populacional da hemoglobina S. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 53-56, 1999.

OULD AMAR, A. K. et al. Altered filterability of fresh sickle cell trait donor blood. **Vox. Sang.** v. 73, p. 55-56, 1997.

OULD AMAR, A. K. Red blood cells from donors with sickle cell trait: a safety issue for transfusion? **Transfus Med.**, v. 16, p. 248-253, 2006.

PIERONI, F. et al. Transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) em doenças falciformes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 327-330, 2007.

PRUDENCIO, B. C. A. B.; COVAS, D. T.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de Hemoglobina S (Hb S) em doadores de sangue. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n. 2, p. 99-109, 2000.

RAMALHO, A. S. Hemoglobina S em doadores de sangue brasileiros. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 22, n. 12, dez. 1976.

RAMALHO, A. S.; VELLOSO, L. A.; DINIZ M. Síndromes falcêmicas e úlceras de membros inferiores. **An. Bras. Dermatol.**, v. 60, n. 5, p. 307-310, 1985.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; SILVA, R. B. P. A Portaria MS nº 822/01 e a triagem neonatal das hemoglobinopatias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 24, n. 4, p. 244-250, 2002.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A. Aconselhamento genético do paciente com doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 229-232, 2007.

RAMÍREZ, A. et al. Morphological features of red blood cells in subjects with sickle cell trait: changes during exercise. **Arch. Intern. Med.**, v. 136, p. 1064-1066, 1976.

SCHNOG, J. B. et al. Sickle cell disease; a general overview. **Neth. J. Med.**, v. 62, n. 10, nov. 2004.

SEARS, D. A. The morbidity of sickle cell trait. **Am. J. Med.**, v. 64, n. 6, p. 1021-1036, 1978.

SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T. Eficácia da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 2, p. 144-148, 2006.

SILVA, R. B. P.; RAMALHO, A. S.; CASSORLA, R. M. S. A anemia falciforme como problema de saúde pública no Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, v. 27, n. 1, p. 54-58, 1993.

SILVA, R. B. P.; RAMALHO, A. S. Riscos e benefícios da triagem genética: o traço falciforme como modelo de estudo em uma população brasileira. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 285-294, abr/jun. 1997.

SILVA, W. S. et al. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações de Recôncavo Baiano, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 12, p. 2561-2566, dez. 2006.

SOMMER, C. K. et al. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 8, p. 1709-1714, ago. 2006.

STRONCEK, D. F. et al. Sickle Hb polymerization in RBC components from donors with sickle cell trait prevents effective WBC reduction by filtration. **Transfusion**, v. 42, p.1466-1472, 2002.

SUGARMAN, J. et al. Pulmonary embolism and splenic infarction in a patient with sickle cell trait. **Am. J. Hematol.**, v. 33, n. 4, p. 279-281, 1990.

SURVE, R. R. et al. Detecção of the S gene: an evaluation of the solubility test against automated chromatography and haemoglobin electrophoresis. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 57, n. 4, p. 292-294, 2000.

TAVARES-NETO, J.; BERNARDES, R. Hemoglobinas anormais em doadores de sangue de Sobradinho, Distrito Federal. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 12, n. 1-4, p. 55-60, 1980.

TOMÉ- ALVES, R. et al. Hemoglobinas AS/Alfa talassemia - importância diagnóstica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n. 3, p. 388-394, 2000.

TRAINA, F.; SAAD, S. T. O. Complicações hepáticas na doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 299-303, 2007.

VICARI, P.; FIGUEIREDO, M. S. Priapismo na doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 275-278, 2007.

VIVAS, W. L. P. et al. Heterozigose para hemoglobinopatias em doadores de sangue do Centro de Hemoterapia de Sergipe. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 4, p. 284-287, 2006.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Anemias Hemolíticas. In: ___. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001. cap. 29, p. 279-287.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

WEISMAN, I. M. et al. Effect of army basic training in sickle cell trait. *Arch. Intern. Med.*, v. 148, p. 1140-1144, 1988.

APÊNDICES

8. APÊNDICE

8.1 APÊNDICE A- Carta de Informações sobre a Pesquisa do Traço Falciforme

CARTA DE INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA DO TRAÇO FALCIFORME

Estamos realizando um estudo nos doadores de sangue desse Hospital para identificar os portadores do Traço Falciforme e convidamos o doador e seus familiares que estiverem interessados, para participar dessa pesquisa que tem como objetivo detectar esses doadores portadores desta alteração e seus familiares na região de Santa Maria e que não tem custo nenhum para o doador ou para seus familiares.

Para isso será necessário:

1. que o doador e os familiares compareçam ao Banco de Sangue do Hospital Universitário nos dias estabelecidos para uma nova coleta de sangue;
2. assinar o termo de consentimento para que o exame possa ser utilizado no estudo e após receber os resultados e o aconselhamento genético se necessário.

Algumas explicações estão a seguir, e qualquer dúvida estamos dispostos a esclarecer.

Doença Falciforme ou Anemia Falciforme:

A Doença Falciforme é uma anemia hereditária em que os glóbulos vermelhos do sangue (hemácias), diante de certas condições, alteram sua forma e se tornam parecidos com uma foice, daí o nome falciforme. A hemoglobina, pigmento que dá a cor vermelha aos glóbulos vermelhos, é essencial para a saúde de todos os órgãos do corpo, pois transporta o oxigênio. Os glóbulos vermelhos em forma de foice se agregam e dificultam a circulação do sangue nos pequenos vasos do corpo. Com a diminuição da circulação ocorrem lesões nos órgãos atingidos, causando dor, destruição dos glóbulos, icterícia (olhos amarelos) e anemia.

A hemoglobina normal é chamada de A e os indivíduos normais são considerados AA, porque recebem uma parte do pai e outra da mãe. Na Doença Falciforme a hemoglobina produzida é anormal e é chamada de S. Quando a pessoa recebe de um dos pais a hemoglobina A e de outro a hemoglobina S, ele é chamado de "traço falcêmico", sendo representado por AS. O portador de traço falcêmico não é doente, sendo, geralmente assintomático. Quando uma pessoa recebe de ambos, pai e mãe, a hemoglobina S, ela nasce com Anemia Falciforme cuja representação é SS. Então os pais do paciente com Anemia Falciforme deverão ser portadores do traço ou doentes.

A Doença Falciforme pode se manifestar de forma diferente em cada indivíduo. Os portadores do traço falcêmico devem estar prevenidos nos casos de infecções graves principalmente pulmonares, anestesia com baixa oxigenação, trabalho em condições de baixa oxigenação, avião despressurizado, grandes altitudes e na realização de exercício físico muito intenso, pois nesses casos algumas crises podem ser observadas. De maneira geral, este tipo de portador pode permanecer assintomático durante toda a vida e muitas vezes nem chega a saber.

Recomendações:

Aos portadores de traço falciforme, recomenda-se:

1. Orientar seus parentes a fim de identificar outros portadores.
2. Antes do casamento, o futuro parceiro deve fazer exames para verificar se também é portador. No caso de casais, em que ambos sejam portadores, procurar orientação especializada antes de pensar em filhos, já que os pais que apresentam o traço falciforme tem 25% de possibilidade de gerar filhos com doença falciforme.
3. Comunicar ao seu médico que é portador de Hemoglobinopatia nos seguintes casos:
 - a. Gravidez
 - b. Antes de qualquer cirurgia com anestesia geral.
 - c. Se tiver sangue na urina (hematúria)
 - d. Se tiver problemas pulmonares (broncopneumonia)
 - e. Não esquecendo também, do pediatra dos filhos.

Desde já agradecemos a atenção e esperamos a sua colaboração para a nossa pesquisa.

Letícia Loi Giovelli

Bioquímica mestranda UFSM

José Edson Paz da Silva

Prof. Dr. UFSM

8.2 APÊNDICE B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE HEMOGLOBINA S EM DOADORES DE SANGUE NA REGIÃO DE SANTA MARIA E ACOMPANHAMENTO GENÉTICO FAMILIAR

A Anemia Falciforme é uma doença genética e hereditária causada por uma anormalidade na hemoglobina dos glóbulos vermelhos do sangue, formando uma hemoglobina chamada Hemoglobina S, que é responsável pela retirada do oxigênio dos pulmões e transporte dele para os tecidos. Esses glóbulos se deformam, alongam e nem sempre conseguem passar através de pequenos vasos, bloqueando-os e impedindo a circulação do sangue em algumas áreas. Como resultado causa dano no tecido e provoca dor. Mas o curso da doença é muito variável, e as pessoas podem ser doentes ou somente portadoras.

A Anemia Falciforme não deve ser confundida com o Traço Falciforme, onde a pessoa é somente portadora de Hemoglobina S, mas possui uma vida social normal, apenas devendo ter alguns cuidados durante anestésias, cirurgias e elevadas altitudes para evitar os danos.

Estamos realizando uma pesquisa que irá detectar a Hemoglobina S nos doadores de sangue da nossa região. Dentre os principais objetivos da pesquisa está a determinação de quantos doadores de sangue são portadores de Hemoglobina S e fazer um rastreamento dos familiares para essa anormalidade, já que estes dados são desconhecidos em nossa região. A pesquisa será realizada com uma coleta de sangue, usando material descartável evitando qualquer tipo de risco de contaminação, quando o paciente for detectado pela triagem como sendo portador de Hemoglobina S e retornar ao Banco de Sangue para fazer o teste confirmatório, ou quando o doador aceitar trazer os seus familiares para detectar essa situação, não tendo custo ao doador ou a seus familiares, que serão beneficiados com esses resultados, pois saberão se são ou não portadores dessa doença. Além disso, não está previsto nessa pesquisa nenhuma forma de ressarcimento por eventuais danos, mas garantimos o sigilo e privacidade dos resultados e estamos abertos a qualquer esclarecimento no decorrer da pesquisa.

Eu, _____, abaixo assinado, fui informado dos objetivos e dos procedimentos da pesquisa, e
 () aceito ou () não aceito, que seja avaliado para Hemoglobina S.

Assinatura: _____

Pesquisadores Responsáveis: _____

Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

 Bioquímica Letícia Loi Giovelli

 Bioquímica Adriana Stein Bortolotto

8.3 APÊNDICE C- Convite para participação na pesquisa

Santa Maria, Fevereiro de 2008.

CONVITE

Estamos realizando um trabalho de pesquisa na Universidade Federal de Santa Maria sobre a prevalência do Traço Falciforme (presença de Hb S) nos bancos de sangue de Santa Maria, e através deste convite gostaríamos de pedir a sua colaboração e participação na pesquisa. Com os dados obtidos no banco de sangue em que você é doador, estamos entrando em contato com muitos doadores, através de telefone ou carta, que possuem este resultado positivo que nos interessa para a pesquisa e convidando para comparecer no banco de sangue do Hospital Universitário, nas terças ou quintas-feiras, das 9 hs às 12 hs ou à tarde das 13 hs às 16 hs, para fazer uma coleta de sangue e conversar sobre esse resultado e sobre a pesquisa. É **muito importante** o seu comparecimento, tanto para você e seus familiares quanto para nossa pesquisa. Contamos com a sua colaboração. Se não for possível comparecer nestes horários e dias, estamos à disposição para maiores esclarecimentos pelo telefone 96072500.

Obrigada pela atenção.

Letícia Loi Giovelli
Bioquímica Mestranda UFSM

José Edson Paz da Silva
Prof. Dr. UFSM