

HEMOGLOBINOPATIAS

DOENÇA FALCIFORME, TALASSEMIAS E HEMOGLOBINAS INSTÁVEIS

Paulo Cesar Naoum – Professor Titular pela UNESP e Diretor da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, SP.

Abstract

The principal hemoglobinopathies (sickle cell disease, thalassemia and unstable hemoglobins) are almost always inherited, and, to date, over two thousand variants have been identified. These types of hemoglobinopathies result from mutation of a healthy globin gene, with a consequent alteration in the amino acid composition of, or the amount of, a particular globin chain. The first alteration cause qualitative abnormalities in beta-globin such as Hb S, Hb D, Hb C, Unstable hemoglobins and Hb M, and the second represent a quantitative defect – the thalassemias alpha or beta. Origen, pathophysiology and laboratory abnormalities of these hemoglobinopathies are showed in this article.

Palavras-chaves/Key words

Hemoglobinopatias/ Hemoglobinopathies, Doença falciforme/Sickle cell disease, Talassemias/Thalassemias, Hb Instáveis/ Unstable hemoglobins.

Introdução

As sínteses das hemoglobinas humanas normais ocorrem em genes que fazem parte dos cromossomos 11 e 16, e que são transmitidos para todas as células nucleadas precursoras dos eritrócitos, os eritroblastos. Cada célula eritroblástica sequente acumula mais moléculas de hemoglobinas em seus citoplasmas à medida em que evolui. Ao se tornar eritrócito, esta célula passa a ter entre 270 a 320 milhões de moléculas de hemoglobina em seu interior, fato comprovado com o valor padrão da hemoglobina corpuscular média, o HCM, variável entre 27 a 32 picogramas de hemoglobina^{1,2} (figura1).

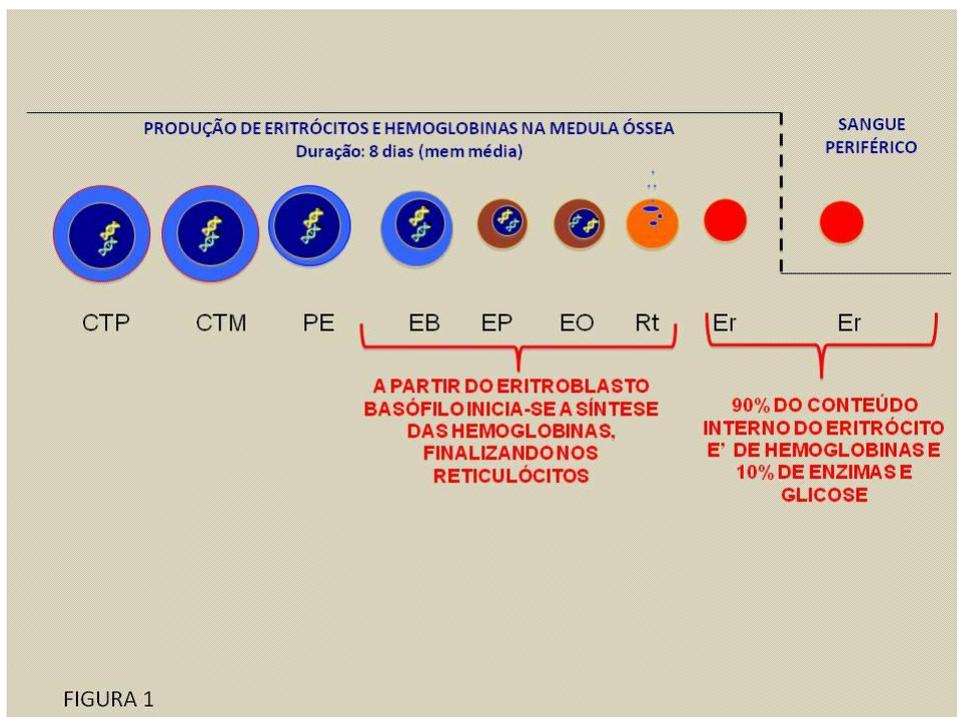


Figura 1- Relação entre síntese de hemoglobinas e eritropoiese

Os genes alfa e beta são transmitidos através de seus respectivos cromossomos 16 e 11, da célula tronco pluripotencial (CTP) para suas células descendentes: célula tronco mielóide (CTM), proeritroblasto (PE), eritroblasto basófilo (EB), eritroblasto policromático (EP) e eritroblasto ortocromático (EO). Em seguida, as moléculas de hemoglobinas passam a compor os reticulócitos e eritrócitos.

O cromossomo 11 tem o agrupamento de genes tipo beta e que são conhecidos por **RCG-beta**, **epsilon**, **gama**, **delta** e **beta**, enquanto que no cromossomo 16 o agrupamento de genes tipo alfa são identificados por **RCG-alfa**, **zeta**, **alfa₁** e **alfa₂**. RCG é a sigla de Região Controladora de Genes, e deste gene partem os estímulos específicos para os respectivos genes que estão sob seu controle. A síntese genética de todos esses genes ocorre de forma equilibrada para a produção das suas globinas correspondentes. As globinas assim formadas se juntam em tetrâmeros para comporem os diferentes tipos de hemoglobinas normais³ (figura 2).

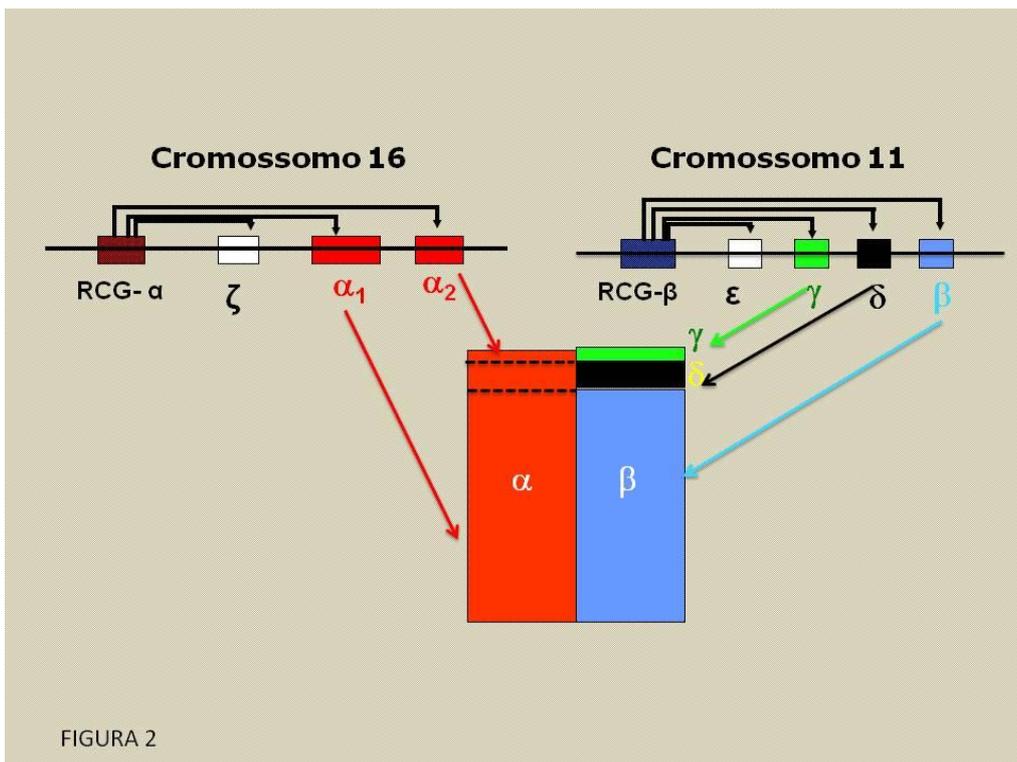


Figura 2- Esquema representativo dos genes nos cromossomos 16 e 11. As sínteses das globinas α , β , δ e γ ocorrem de forma equilibrada. Esta representação explica como se compõe as principais hemoglobinas humanas após o sexto mês de vida.

As sínteses das hemoglobinas se diferenciam conforme as fases de desenvolvimento embrionário e fetal. Logo após o nascimento, a Hb Fetal deixa de ser produzida e é substituída de forma gradual pela Hb A, fato que se estabiliza no sexto mês de vida. A figura 3 mostra as composições

químicas das hemoglobinas embrionárias e fetal. As hemoglobinas embrionárias **Gower-1**, **Portland** e **Gower-2** são muito importantes para o desenvolvimento embrionário pela forma rápida com que libera o oxigênio para as células dos tecidos e órgãos que estão se formando. A **Hb Fetal**, por sua vez, atua somente na fase fetal, quando todos os órgãos estão formados. Pelo fato da circulação de sangue materno-fetal ser muito restritiva, a Hb Fetal passa a ter maior afinidade pelo oxigênio, efetuando, assim, rígido controle de sua liberação para as células dos tecidos e órgãos^{4,5}.

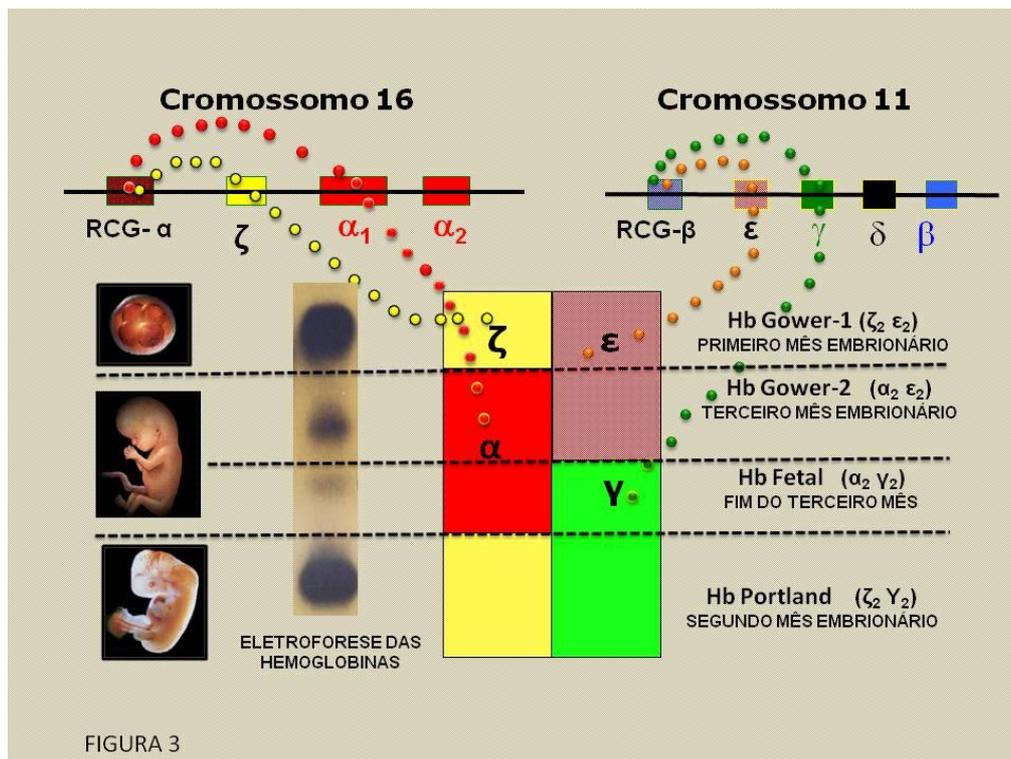


Figura 3- Síntese das hemoglobinas embrionárias e fetal.

Há intrínseco relacionamento genético e fisiológico entre a evolução embrionária e fetal com os tipos específicos de hemoglobinas destas fases. Observe que o embrião ao atingir o terceiro mês de vida, quando o mesmo se transforma em feto, pode ter quatro tipos diferentes de hemoglobinas atuantes: Gower1, Portland, Gower2, e Hb Fetal. Com o desenvolvimento do feto as hemoglobinas embrionárias deixam de ser sintetizadas e a Hb Fetal alcança níveis de concentrações próximos de 100%.

Seis meses após o nascimento há o estabelecimento definitivo das sínteses genéticas das hemoglobinas e suas respectivas concentrações. Os diferentes tipos de hemoglobinas podem ser fracionados e quantificados por meio de eletroforeses e cromatografias^{4,5}. A figura 4 mostra a composição molecular das hemoglobinas e seus fracionamentos por eletroforese alcalina.

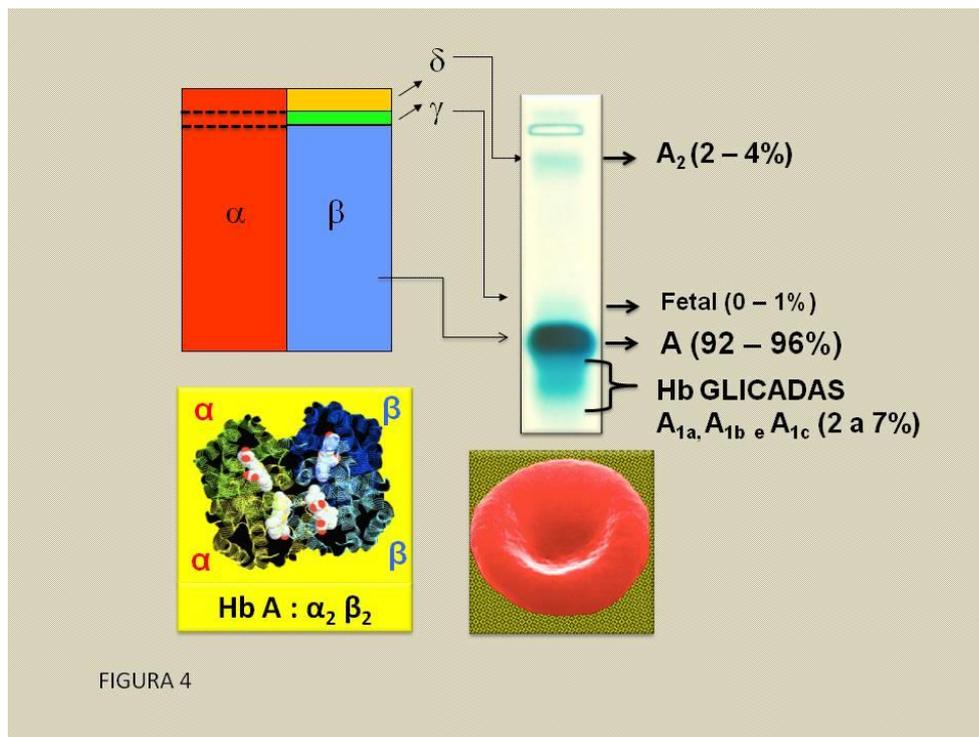


Figura 4- Representação esquemática do equilíbrio das globinas.

Após o sexto mês de nascimento os genes que sintetizam todas as globinas já se tornaram estáveis, portanto, as globinas alfa se combinam com globinas beta, gama e delta para formarem as hemoglobinas A, A₂ e Fetal.

As concentrações das hemoglobinas de uma pessoa permanecem estáveis até o fim de sua vida. A Hb A por ter maior concentração (94-98%) é a mais importante e seu tetrâmero químico é representado por $\alpha_2 \beta_2$.

As hemoglobinas glicadas também podem ser visualizadas por eletroforese alcalina, e as mesmas se posicionam discretamente mais rápidas que a Hb A.

A função primordial das hemoglobinas, quer sejam as embrionárias, fetal ou hemoglobinas A e A₂, é o transporte de oxigênio para todos os tecidos e órgãos através do fluxo sanguíneo. Entretanto, a Hb A é a que melhor representa o controle da liberação do oxigênio por ser a mais prevalente (94 a 98%) dentro do eritrócito. A liberação de O₂, entretanto, depende de uma pequena molécula conhecida por 2,3-DPG (2,3 difosfoglicerato) que se encontra acomodada entre as duas globinas beta do tetrâmero $\alpha_2 \beta_2$. Quando a molécula 2,3-DPG está internalizada é indicativo de que a hemoglobina está oxigenada. A liberação de oxigênio (desoxigenação) se faz gradualmente no sangue venoso. Inicialmente uma globina alfa libera o oxigênio, em seguida a outra globina alfa também o faz, e neste momento a molécula de 2,3-DPG começa a se expor. Na sequência, uma globina beta libera o oxigênio e a molécula de 2,3-DPG se expõe mais ainda. E, finalmente, quando a outra globina beta libera o oxigênio, a molécula de 2,3-DPG se expõe totalmente. Nesta situação a Hb A se encontra completamente desoxigenada. A exposição de 2,3-DPG é a “senha” para que a molécula v se reoxigene outra vez, desta vez no sangue arterial⁶ (figura 5).

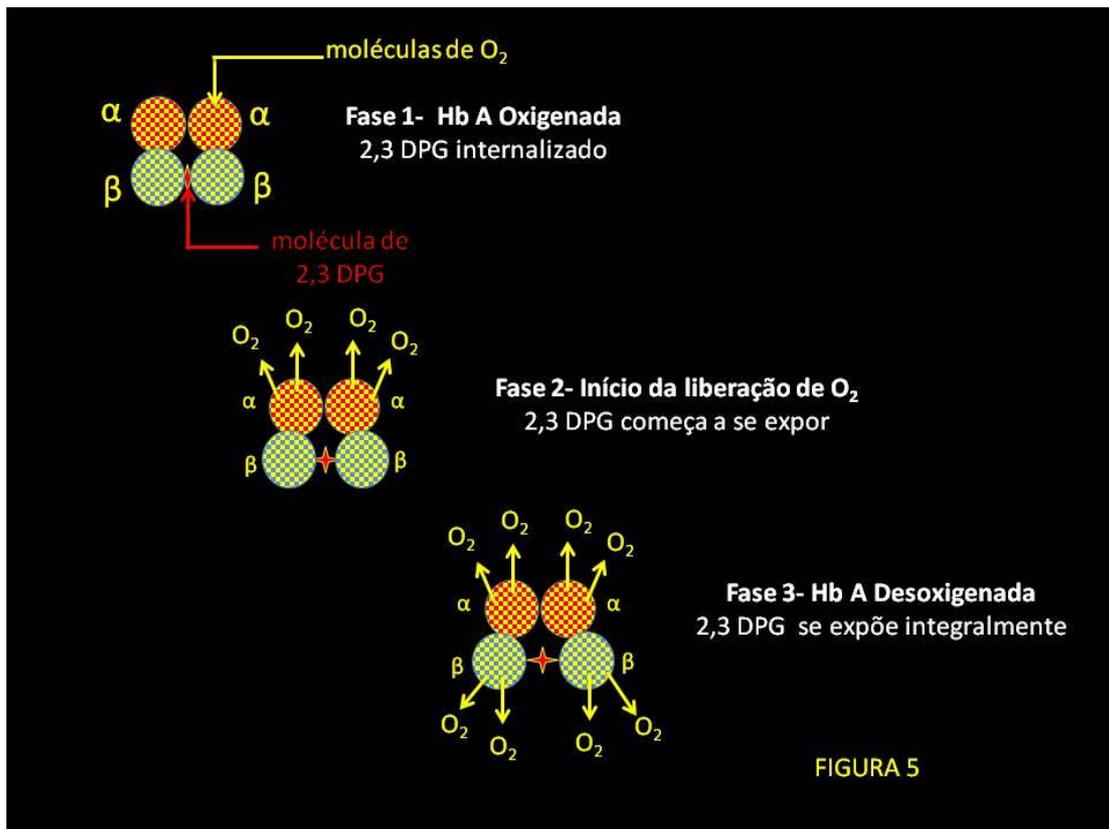


FIGURA 5

Figura 5- Esquema da oxigenação e desoxigenação da hemoglobina A.

Fase 1- A hemoglobina está completamente oxigenada (oxi-Hb) e a molécula de 2,3-DPG está internalizada. Fase 2- O início da liberação do oxigênio (desoxigenação) se inicia com as globinas alfa, e nesta fase a molécula de 2,3-DPG começa a se mover afastando as duas globinas beta. Fase 3- As globinas beta, à medida que se afastam uma da outra, liberam suas moléculas de O_2 , tornando a hemoglobina desoxigenada (desoxi-Hb), e a molécula de 2,3-DPG se expõe completamente. Sua exposição indica que a hemoglobina deve ser reoxigenada quando o eritrócito que a contém passar pela circulação arterial dos pulmões.

Origem das hemoglobinas normais e das hemoglobinopatias

Os processos evolutivos que ocorreram nos reinos microbiano, animal e vegetal se desenvolveram por meio de mutações adaptativas, notadamente em relação aos processos fisiológicos e de inserções ambientais. A origem de pigmentos transportadores de oxigênio também se deu por meio de mutações que aconteceram ao longo de milhões de anos. Apresentamos um resumo ilustrativo da provável relação entre evolução e a síntese das hemoglobinas a partir de um hipotético processo que possa ter ocorrido há 3 bilhões de anos, quando surgiram as primeiras moléculas de DNA. Desta forma, a figura 6 foi elaborada para mostrar a relação entre os períodos geológicos e a origem de proteínas transportadoras de elétrons e oxigênio, e que se transformaram na molécula ancestral da hemoglobina⁷.

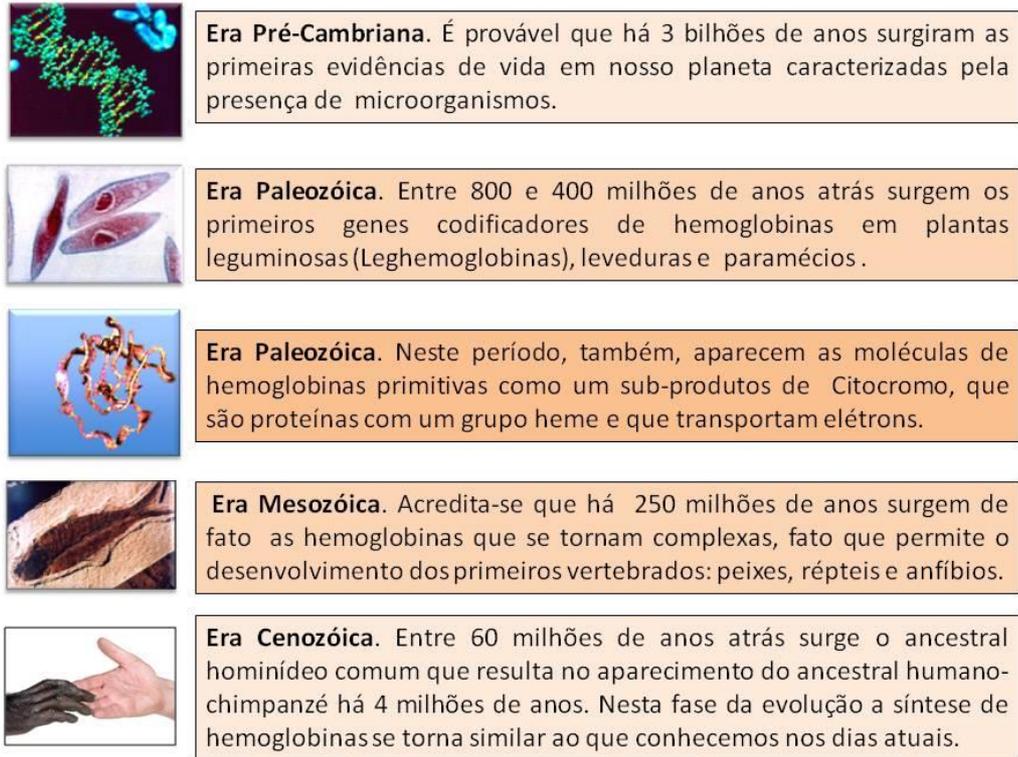


FIGURA 6

Figura 6 – Resumo ilustrativo da evolução que deu origem às hemoglobinas relacionada com os períodos geológicos até a fase evolutiva do ancestral humano-chimpanzé há 4 milhões de anos.

Em relação à origem dos genes específicos para hemoglobinas, acredita-se que mutações sequentes que aconteceram ao longo de aproximadamente 800 milhões de anos foram moldando moléculas de DNA em cromossomos. Essas moléculas, portanto, foram se especializando em genes que se tornaram funcionais para as estruturas orgânicas para as quais foram moldadas. Entre 400 e 200 milhões de anos, quando os genes moldados já exerciam as funções básicas de sínteses de precursores das hemoglobinas, esses genes e seus cromossomos se duplicam. E finalmente, há 4 milhões de anos, dois cromossomos diferentes passam a ter genes diversificados para as sínteses de hemoglobinas, surgindo especificamente no cromossomo 16 os genes tipo α (ξ e α_1 e α_2), e no cromossomo 11 os genes tipo β (ϵ , γ , δ e β)⁷. De forma resumida, todo esse processo evolutivo de genes é mostrado na figura 7.

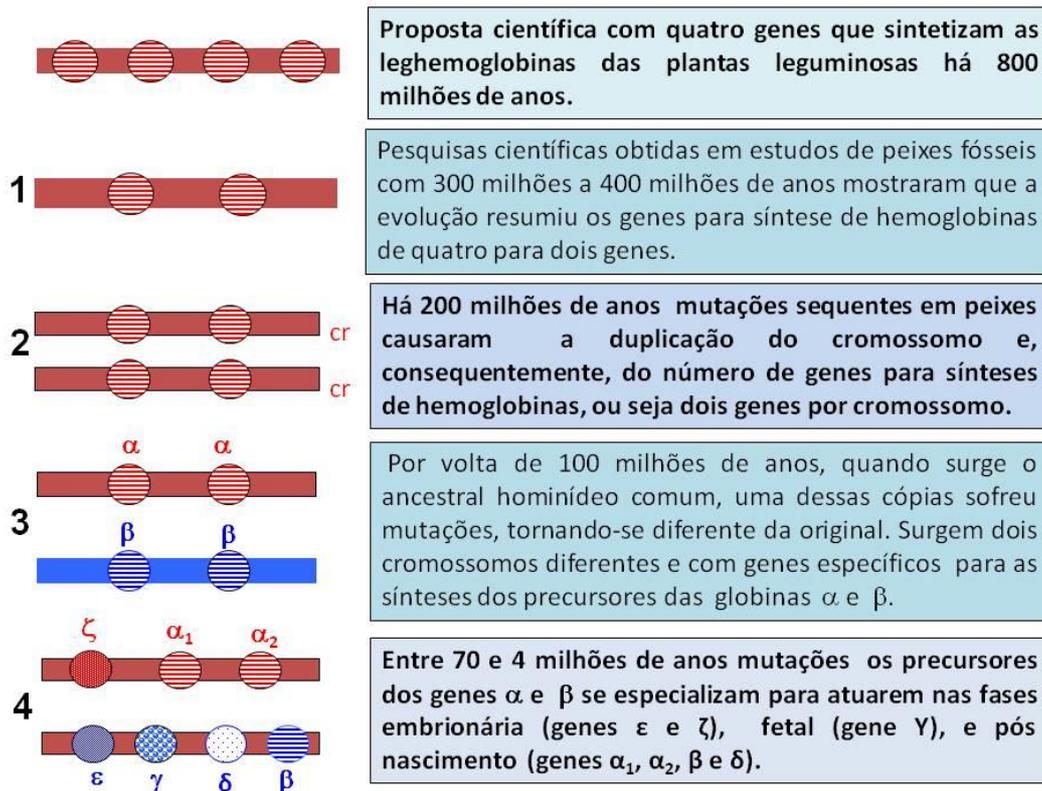


Figura 7 – Quatro esquemas representativos das fases da evolução dos genes que deram origem às hemoglobinas humanas ao longo de 800 milhões de anos.

As mutações continuaram e continuam a acontecer. Na espécie humana, especialmente em relação às hemoglobinas, mutações em diferentes genes podem ter resultado em sínteses de novas proteínas e enzimas. Da mesma forma, mutações também causaram e causam deficiências funcionais de genes, originando diversos tipos de doenças. Em relação às hemoglobinas humanas, acredita-se que entre 350 mil e 50 mil anos atrás possa ter ocorrido mutações que afetaram as sínteses de hemoglobinas em povos dos continentes africano e asiático. Uma dessas mutações de interesse hematológico, genético e químico foi a que deu origem à Hb S. Após esta hemoglobina variante ter se estabelecido funcionalmente, acredita-se que sua difusão populacional possa ter ocorrido devido a um processo adaptativo em que eritrócitos com Hb AS (heterozigotos) tinham maior resistência contra a infecção da malária, enquanto que pessoas portadoras de hemoglobinas normais (Hb AA) eram facilmente afetadas. Esta é a razão pela qual se pode explicar a maior prevalência da Hb S frente às outras hemoglobinas variantes, bem como o seu alto grau de dispersão entre diferentes regiões do mundo. É importante destacar que atualmente se conhece cerca de 4 mil tipos de hemoglobinas mutantes, a maioria das quais não afetam a fisiologia normal das hemoglobinas. Alguns tipos de hemoglobinas variantes, no entanto, podem causar danos aos eritrócitos ou afetar a oxigenação do sangue, como são os casos da homozigose da Hb S (HbSS) e de duplas heterozigoses (Hb SC, Hb SD e Hb S/talassemias), e dad

heterozigoses de Hb Instáveis, hemoglobinas M e hemoglobinas com alta afinidade pelo oxigênio^{7, 8, 9}.

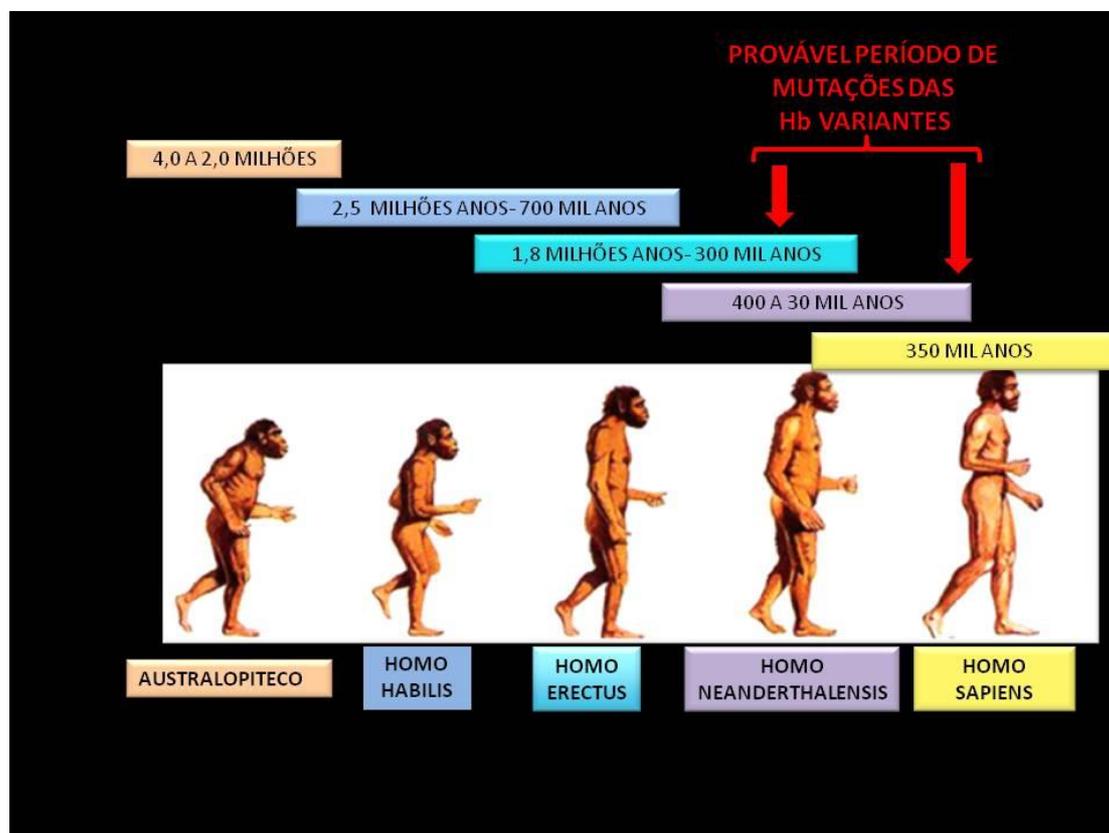


Figura 8- Relação entre a evolução antropológica da espécie humana e o provável período da origem das hemoglobinas variantes.

A molécula da Hb A e regiões suscetíveis a mutações

A molécula da hemoglobina é complexa por conter dois pares de globinas diferentes (ou dímeros) α e β , e quatro grupos heme fixados às suas globinas (figura 9a). Cada uma das duas globinas alfa contém 141 aminoácidos, e cada uma das duas globinas beta contém 146 aminoácidos, totalizando 574 aminoácidos inseridos nas quatro globinas (figura 9b). Esses aminoácidos estão distribuídos no tetrâmero de globinas em seis regiões da molécula: externa, interna, nas sustentações das duas extremidades do grupo heme (proximal e distal), nos contatos entre as duas globinas alfa, nos contatos entre as duas globina beta, e nos contatos entre globinas alfa e beta (figura 9c). Esses contatos são fundamentais para a manutenção da integridade da estrutura molecular notadamente com relação à sua estabilidade, bem como à capacidade de se distender e de retrair durante a desoxigenação e oxigenação, respectivamente^{1, 3, 4}.

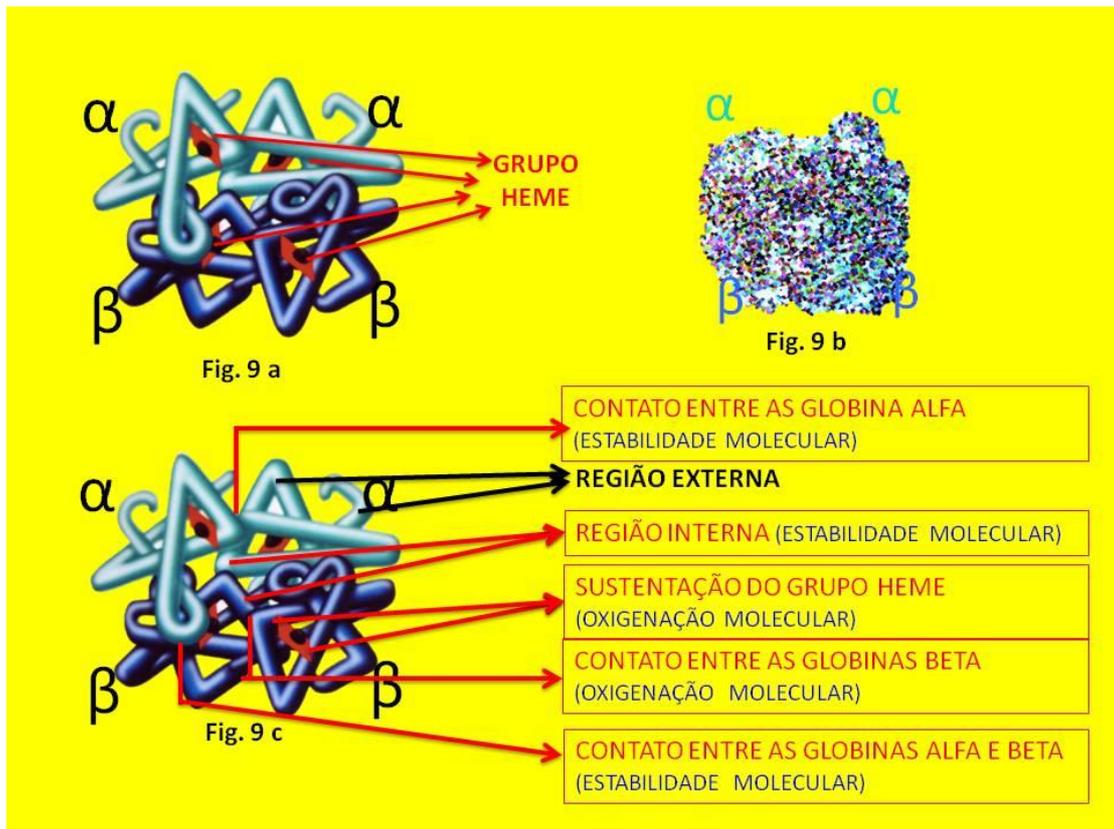


Figura 9 – 9a: estrutura da molécula de hemoglobinas com duas globinas alfa e duas globinas beta, cada uma delas ligada ao respectivo grupo heme; 9b: montagem da molécula de hemoglobina com seus 574 aminoácidos; 9c: especificação das seis regiões passíveis de trocas de aminoácidos e suas consequências patológicas em cor vermelha, e sem consequência patológica em cor preta.

A maioria das mutações envolve a troca de um aminoácido por outro com características físico-químicas diferentes. Dependendo da região da molécula em que ocorreu a troca de aminoácidos, a hemoglobina variante resultante pode ter funções normais ou alteradas. A tabela 1 mostra as seis regiões suscetíveis a mutações relacionadas com patologias e alterações hematológicas^{1, 4, 10}.

Tabela 1 – Relação entre regiões onde ocorrem mutações na molécula de hemoglobina, principais patologias e alterações hematológicas.

Região da molécula	Patologias	Alterações hematológicas
Externa	Nenhuma*	Nenhuma*
Interna	Anemia hemolítica	Hb instáveis; corpos de Heinz
Contato globinas α	Anemia hemolítica	Hb instáveis; corpos de Heinz
Contato globinas β	Eritrocitose	Hb anormais e alteração na de dissociação de oxigênio
Sustentação de Grupo heme	Cianose e Anemia hemolítica	Hb M; metahemoglobinemia; corpos de Heinz
Contato globinas $\alpha\beta$	Anemia hemolítica	Hb Instáveis; corpos de Heinz

* Exceção feita à Hb S, resultante de mutação no aminoácido 6 na região externa da globina beta (β_6 ácido glutâmico (Glu) por valina (Val)).

Conceitos: hemoglobinas variantes (ou anormais), hemoglobinopatias e talassemias

Hemoglobinas variantes (ou anormais) são aquelas que apresentam estruturas químicas diferentes às das hemoglobinas normais: Hb A, Hb A₂ ou Hb Fetal. A maioria das Hb variantes são causadas por mutações pontuais, ou seja, uma base nitrogenada é trocada por outra diferente, o que resulta, enfim, na troca de um aminoácido por outro também diferente. Até o presente foram catalogadas aproximadamente 2 mil Hb variantes por mutações da Hb A, com destaques para as hemoglobinas S, C, D, I, J, Porto Alegre, Niterói, Hasharon, M Boston, etc^{1,10,11,12}.

Há, porém, um pequeno grupo com cerca de 100 tipos de Hb variantes que são resultantes de mutações nos genes delta e gama. Entre estas as originadas por mutações da Hb A₂, por exemplo, Hb B₂, A₂ Babinga, etc., e as mutantes da Hb Fetal, por exemplo, Hb F Texas, entre outras. Situações raríssimas e que também dão origem às Hb variantes ocorrem em crossing-over desiguais do cromossomo 11 promovendo a fusão de genes beta com delta ($\beta\delta$), beta com gama ($\beta\gamma$), e o inverso (delta-beta). As fusão $\beta\delta$ origina vários tipos de globinas híbridas $\beta\delta$ comumente denominadas por Hb Lepore, por outro lado as fusões inversas $\delta\beta$ causam a formação das Hb anti-Lepore. Por fim, a fusão $\beta\gamma$ promove a formação da Hb Kenya. As Hb Lepore e anti-Lepore são, em geral, fenotipicamente similares à talassemia beta menor, com discreto grau de anemia microcítica e hipocrômica^{1, 10}.

Hemoglobinopatias é a denominação que se dá às hemoglobinas variantes que causam aos seus portadores sintomas ou sinais patológicos, por exemplo, *anemia hemolítica e cianose* (comum nas Hb M); *anemia hemolítica com eritrócitos falcizados* (doenças falciforme: Hb SS, Hb SC, Hb SD,

Hb S/β Talassemia); *anemia hemolítica, eritrócitos com corpos de Heinz e urina escura* (Hb Instáveis); *eritrocitose simulando policitemia* (Hb Malmo).

Talasseмииs é o nome que se dá um conjunto de sinais e sintomas presentes nas suas formas de doenças que ocorrem em pessoas com talassemias intermédia e maior. Os principais sinais e sintomas são os seguintes: anemia com eritroblastos, hemólise, esplenomegalia, hepatomegalia, atraso de crescimento, necessidade de transfusões periódicas, entre outros. As talassemias decorrem dos desequilíbrios entre as globinas alfa e beta. Dessa forma, a *talassemia alfa* é uma síndrome causada quando a síntese de globina alfa está diminuída e a da globina beta está normal, enquanto que a *talassemia beta* se deve à diminuição da globina beta em relação à alfa^{3, 13}.

Os conceitos de hemoglobinopatias e talassemias foram elaborados inicialmente em pessoas com a herança genética homocigota, em dupla heterocigose e, em casos excepcionais de heterocigoses das Hb Instáveis, Hb M e Hb com alta afinidade ao oxigênio, como já descrevemos acima. As situações em heterocigoses de quase todas as hemoglobinas variantes e das talassemias não causam alterações fisiológicas e, portanto, carecem de sinais e sintomas^{4,13}. A figura 10 apresenta várias hemoglobinas variantes citadas neste texto.

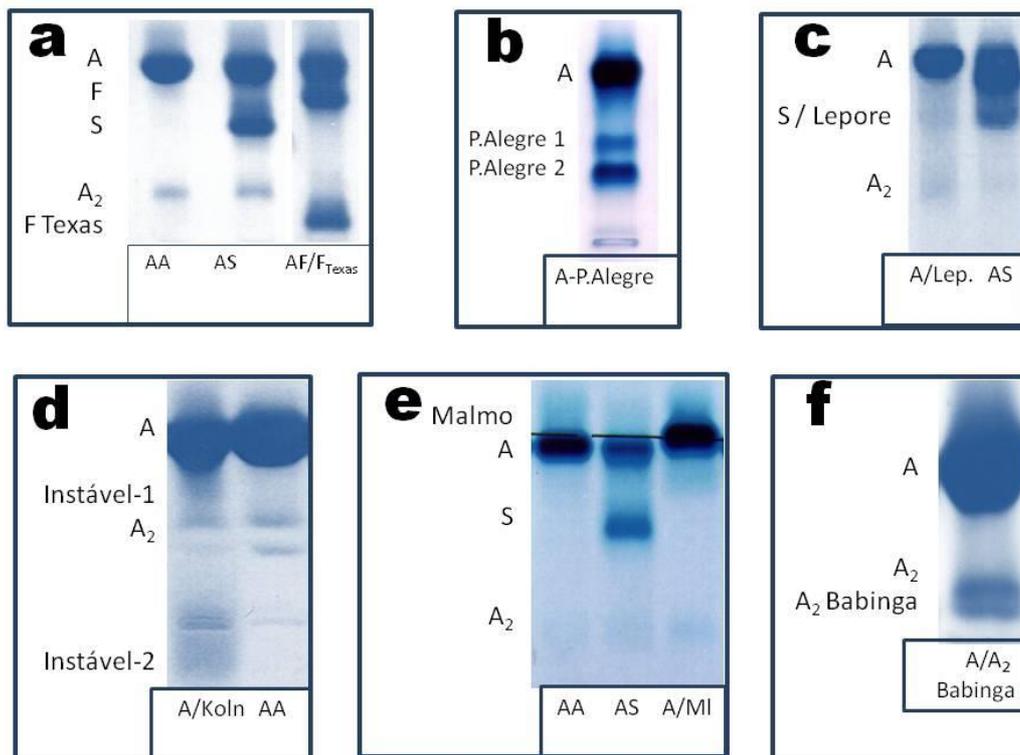


Figura 10

Figura 10. a) Hb AA(normal), Hb AS (traço falciforme) e Hb AF/FTexas (Hb variante da Hb Fetal em recém-nascido); b) Hb A/Porto Alegre (com dois polímeros de hemoglobinas); c) Hb A/Lepore e Hb AS; d) Hb A/Koln (Hb Instável com duas frações); e) Hb AA, Hb AS e Hb A/Malmo (hemoglobina com alta afinidade ao O₂); f) Hb A/A₂ Babinga (Hb variante da Hb A₂).

Hb S: a molécula que alavancou a ciência e tecnologia

Embora a mutação que originou a Hb S tenha ocorrido há milhares de anos, seus efeitos passaram a ser definidos a partir de 1910 quando o médico JB Herrick¹⁴ publicou um artigo em que relatava a presença de eritrócitos com a “forma de foice” em um paciente negro que padecia de acentuada anemia crônica desde o nascimento, icterícia e fortes dores nas articulações. A partir dessa divulgação o conhecimento sobre a Hb S e suas consequências evoluíram em várias áreas biológicas conforme o resumo apresentado na tabela 2.

Tabela 2 – Resumo histórico da evolução de importantes conhecimentos sobre a Hb S realizados por pesquisadores estrangeiros e brasileiros.

Ano	Autor	Resumo do relato científico
1910	JB Herrick ¹⁴	Descreve a clínica da anemia falciforme e a relaciona com pessoas de origem africana
1940	IJ Sherman ¹⁵	Demonstra que a presença das células falciformes se deve à desoxigenação dos eritrócitos
1946	E Silvestroni ¹⁶ e I Bianco	Descreve a associação entre Hb S e beta talassemia (S/β Talassemia)
1949	L Pauling ¹⁷	Separa a Hb S da Hb A por meio de eletroforese e conclui que a Hb S causa doença molecular
1949	JV Neel ¹⁸	Descreve a herança genética da anemia falciforme e seus principais genótipos: Hb AS, Hb SS, Hb SD, Hb SC, Hb S/Tal.β, etc.
1954	AC Allison ¹⁹	Descreve a hipótese de que pessoas com Hb AS são mais resistente à malária
1956	VM Ingram ²⁰	Descreve a troca de aminoácidos na globina β ^S (β ^S 6 ácido glutâmico por valina)
1963	CL Conley ²¹	Demonstra que a clínica da anemia falciforme é amenizada quando a Hb Fetal está elevada
1968	JG White ²²	Estabelece quimicamente a formação de polímeros de deoxi-Hb S no processo da falcização
1972	PC Naoum ²³	Introduz a bioquímica molecular no Brasil através da técnica de fingerprinting de hemoglobinas
1978	YW Kan ²⁴ AM Dozy.	Introduzem a biologia molecular para identificar polimorfismos genéticos da Hb S
1984	PC Naoum ²⁵ e cols.	Descreve como se deu a introdução do gene β ^S no Brasil ao mapear as hemoglobinopatias no estado de São Paulo
1984	J Pagnier ²⁶	Demonstram que a origem da Hb S

ocorreu em pelo menos três regiões da África

1984	FL Johnson ²⁷ e cols.	Realiza o primeiro transplante alogênico de células tronco em paciente com anemia falciforme (Hb SS) transformando-o portador de traço falciforme (Hb AS)
1986	MA Ruiz ²⁸	Realiza no Brasil primeiro estudo preventivo para identificar traço falciforme em recém-nascidos
1989	D Labie ²⁹ e cols.	Demonstra que a origem da Hb S também ocorreu na Índia e Árabia (Arábia Saudita)
1991	RF Rieder ³⁰ e cols.	Associam os diferentes seis haplótipos de Hb S com a diversidade clínica da anemia falciforme
2000	CT Noguchi ³¹ e cols.	Realizaram as primeiras correções do gene β^S em camundongos transgênicos com anemia falciforme, eliminando esta doença genética
2007	F Perroni ³² B Simões	Realiza o primeiro transplante alogênico de células tronco no Brasil, transformando paciente com Hb SS em portador de traço falciforme (Hb AS)

Hb S e suas consequências patológicas

Normalmente, no interior dos eritrócitos, as moléculas de hemoglobinas normais ou variantes quando estão oxigenadas (oxi-Hb) ou desoxigenadas (deoxi-Hb) se mantêm independentes e isoladas. No entanto, este processo físico-químico não ocorre com os eritrócitos que têm mais de 50% de Hb S em seu interior. Nestas condições, quando as moléculas de Hb S se tornam desoxigenadas (deoxi-Hb S), elas se agregam e formam milhões polímeros com disposições lineares, que transformam eritrócitos globulares em alongados com a forma de foice ou meia-lua (figura 11)¹⁵.

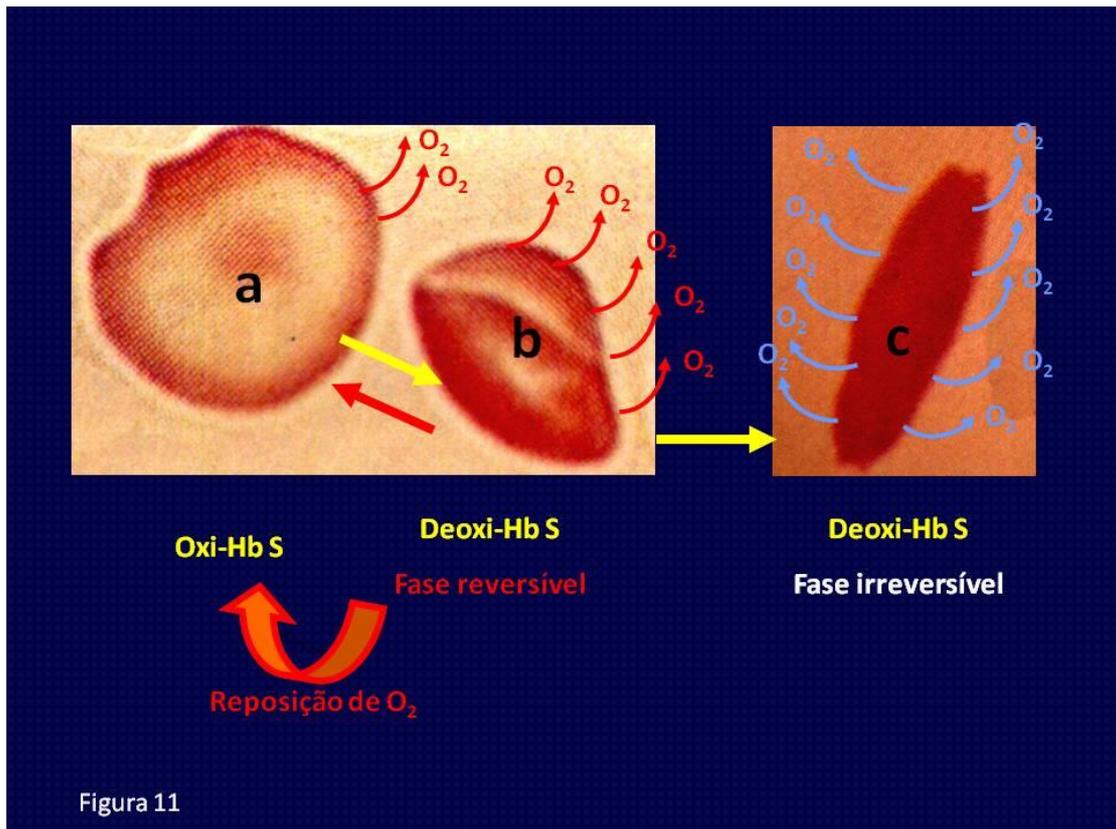


Figura 11 – Eritrócitos contendo mais de 50% de Hb S, ao se desoxigenarem, passam a modificar gradualmente as suas configurações, passando da forma globular (a) para configuração discretamente alongada (b). Nesta fase, se essas células receberem oxigênio e as Hb S se reoxigenarem, é possível que retornem para a forma globular (fase reversível). Porém, se as células com a configuração (b) continuarem perdendo oxigênio elas se transformam em células falciformes irreversíveis (c). São justamente estas células irreversíveis que causam a oclusão vascular em vários órgãos de quem tem doença falciforme.

O aumento do número de células falciformes nos vasos sanguíneos de uma pessoa com doença falciforme causa oclusões vasculares que impedem a oxigenação de tecidos e órgãos. Os principais efeitos patológicos das oclusões são as crises de dores causadas por pequenos infartos teciduais ou orgânicos (figura 12)^{3, 4}.



Figura 12 – Oclusão vascular por células falciformes. Fonte: Sciencesource

A transformação que ocorre no nível molecular das hemoglobinas S oxigenadas em desoxigenadas é a principal causa da mudança de forma dos eritrócitos globulares para falcizados. Este fato se dá por causa da estrutura química do aminoácido valina que ocupou o lugar do ácido glutâmico na posição número 6 da globina beta. Os átomos de hidrogênio da valina que se expõe externamente na globina β^S quando a Hb S se torna desoxigenada, faz com que os mesmos se liguem com regiões hidrofóbicas da globina alfa, formando os polímeros de hemoglobinas S^{4, 33}. A figura 13 mostra por meio de esquemas as alterações da Hb S desoxigenada em comparação com a Hb A oxigenada.

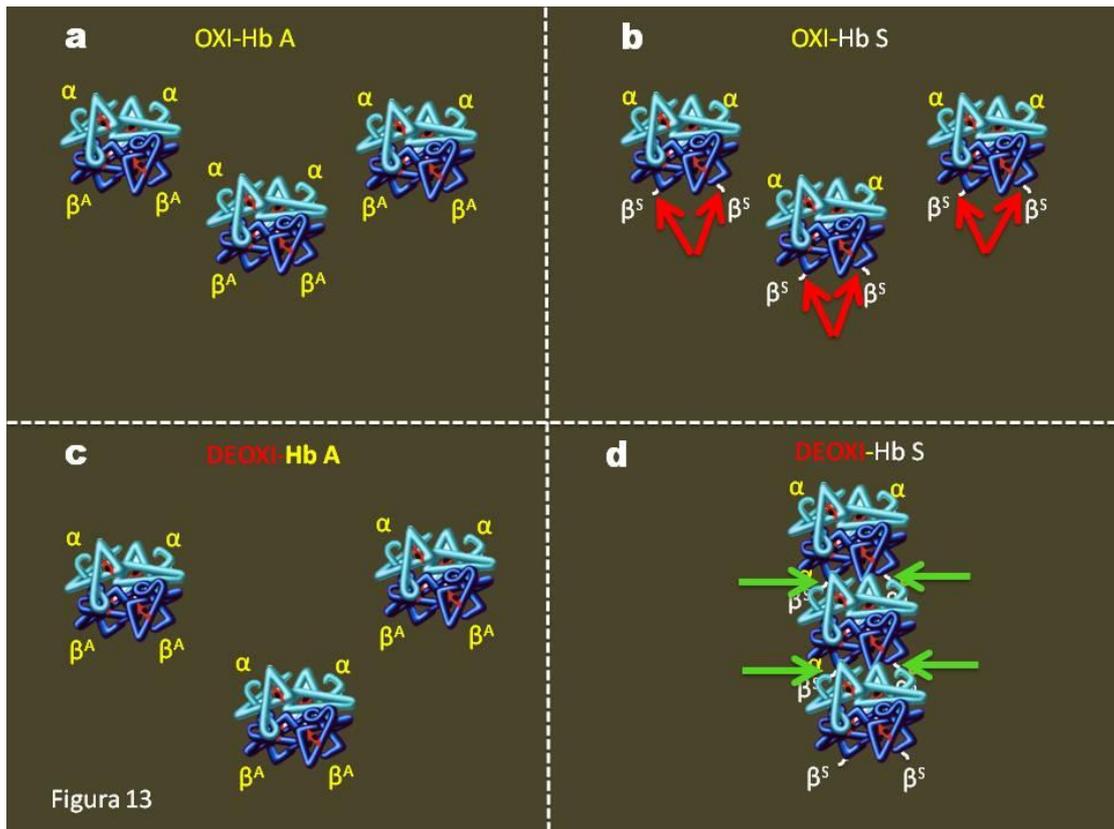


Figura 13 – (a) e (b) Quando as moléculas de Hb A e Hb S estão oxigenadas, portanto nos estados oxi-HbA e oxi-HbS, elas se mantêm independentes e solubilizadas dentro dos eritrócitos; (c) Quando as moléculas de Hb A liberam oxigênio elas se tornam desoxigenadas (deoxi-Hb A) e continuam independentes e solubilizadas; (d) Quando as moléculas de Hb S liberam oxigênio (deoxi-HbS) ocorre uma alteração estrutural causada pela troca do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da globina beta. Dessa forma a valina mutante expõe átomos de hidrogênio que se ligam às porções hidrofóbicas das globinas alfa (setas vermelhas). Esta ligação faz com que as moléculas de Hb S se agregam em formas de polímeros lineares (setas verdes). A formação de milhões de polímeros transformam o eritrócito globular para a configuração alongada, semelhante à foice ou meia-lua.

Doença falciforme: conceitos de fenótipo, genótipo e haplótipo

A maioria das doenças genéticas são inicialmente detectadas através de algumas características clínicas visuais, sinais, sintomas, formas específicas de células, entre outras. Este tipo de identificação de uma possível patologia é conhecido por **fenótipo da doença**. No caso da doença falciforme (DF) que congrega diversas patologias específicas como se verá adiante, o seu fenótipo é caracterizado por anemia, icterícia, presença de células falciformes no esfregaço sanguíneo e necessidades de transfusões periódicas de concentrado de hemácias^{33, 34}. A figura 14 resume todas estas características da DF.

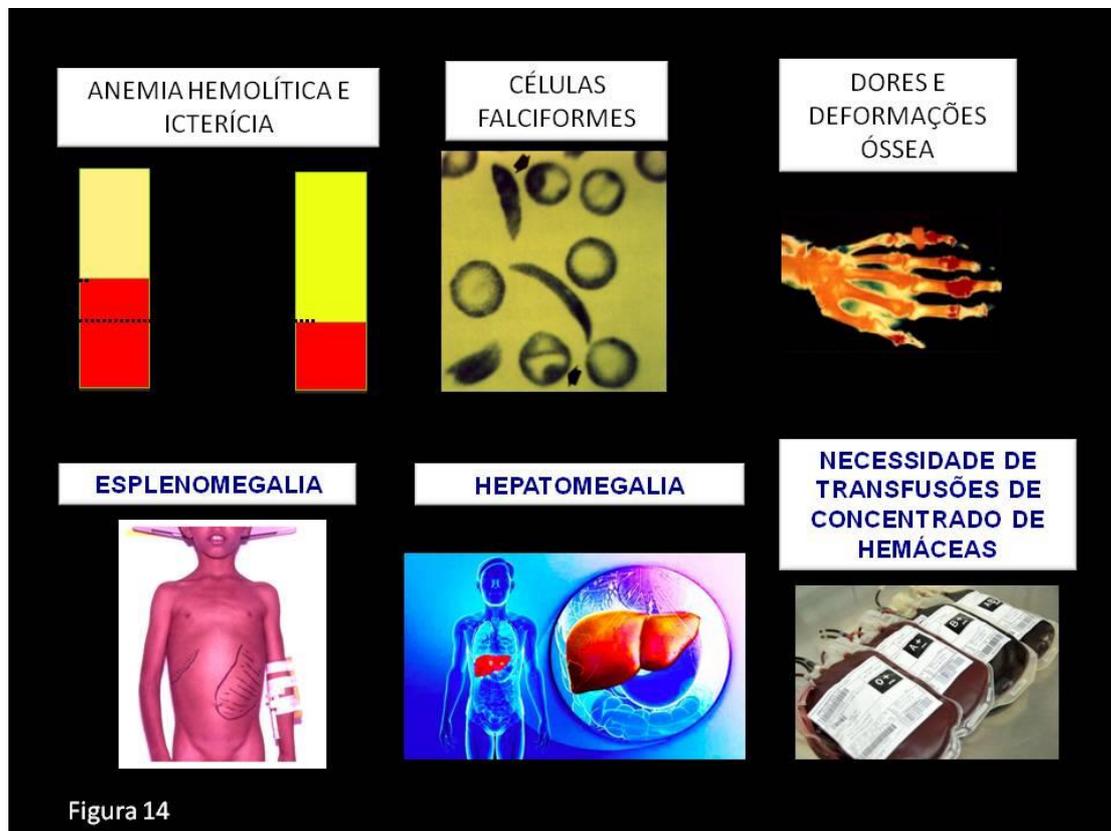


Figura 14 – Principais eventos clínicos e laboratoriais que caracterizam o fenótipo da doença falciforme.

Como foi descrito acima, quando um médico diagnostica em seu paciente a DF por meio do conhecimento do fenótipo é preciso dar continuidade à busca de mais informações, notadamente para identificar qual o tipo de DF do qual é portador: anemia falciforme, hemoglobinopatia SC, hemoglobinopatia SD, Hb S associada à talassemia alfa (S/Tal. α) ou à talassemia beta (S/Tal. β), Hb S com persistência elevada de Hb Fetal (Hb S/PHHF), etc. Para este tipo de caracterização da DF é necessário o uso das seguintes análises laboratoriais: hemograma, eletroforese ou de cromatografia de hemoglobinas, e dosagem de Hb Fetal^{1, 3, 8, 10, 13, 34}, e desta forma é possível identificar os **genótipos da DF**, conforme mostra a figura 15.

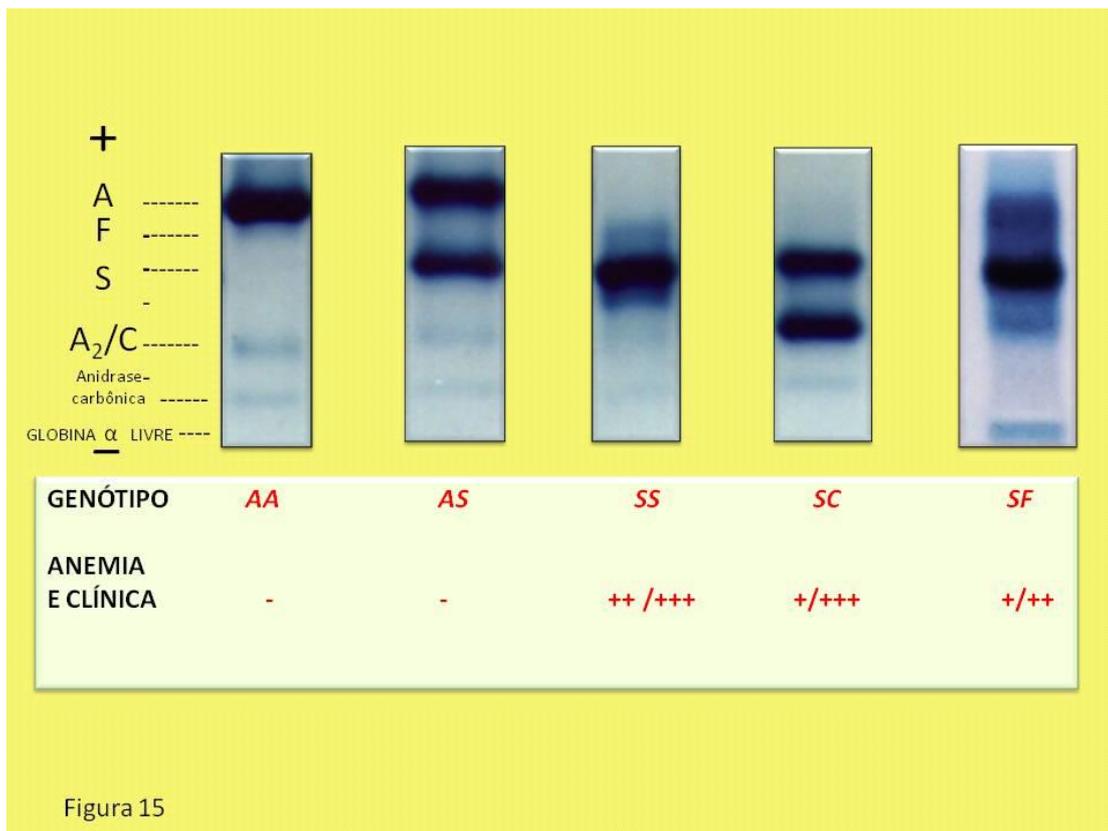


Figura 15 – Genótipos mais comuns de doença falciforme na população brasileira identificados por meio de eletroforese alcalina de hemoglobinas em acetato de celulose.

A diversidade da gravidade clínica na anemia falciforme (Hb SS ou Hb SF) fez com que fossem desenvolvidas análises moleculares para explicar, por exemplo, por que dois pacientes com anemia falciforme acentuada (Hb: 7,0 g/dL) se portavam clinicamente de formas diferentes, por exemplo, enquanto um deles tinha frequentes crises de intensas dores o outro padecia de dores de pouca intensidade e de forma esporádica. Esta diferença de comportamento clínico em uma mesma doença passou a ser alvo de pesquisas. Observou-se que pessoas com anemia falciforme podiam ter seus eritrócitos ocupados com 96-98% de Hb S e com 1 a 5% de Hb Fetal, caracterizando o genótipo Hb SS. E havia um menor número de pessoas com anemia falciforme com eritrócitos ocupados com 75 a 90% de Hb S e com 6 a 20% de Hb Fetal. Relacionou-se, portanto, que pessoas com anemia falciforme associada a Hb Fetal acima de 5% evoluía clinicamente melhor que as que tinham a Hb Fetal abaixo de 5%. Constatou-se, em seguida, que Hb Fetal elevada no mesmo eritrócito com Hb S retarda o processo de falcização. Fisiologicamente a Hb Fetal tem maior afinidade ao oxigênio, de tal forma que à medida que a Hb S libera o oxigênio (deoxi-HbS) a Hb Fetal libera o seu oxigênio para a Hb S, reoxigenando-a e evitando a falcização. Pesquisas com técnicas moleculares realizadas nos anos 80 mostraram que a elevação da Hb Fetal na anemia falciforme estava relacionada com etnias específicas de povos da África e Ásia. A anemia falciforme se diferenciava clinicamente conforme a composição do DNA entre os genes beta e gama.

Deste modo que surgiram os cinco **haplótipos da Hb S**, alguns dos quais mostram associados a elevações de Hb Fetal^{3, 33, 34} (figura 16). No Brasil predomina o haplótipo Bantú em 70 a 80% dos portadores de Hb SS, seguido do Benin (15 a 25%), Camarões (5 a 8%) e atípicos (5 a 8%)³⁴.

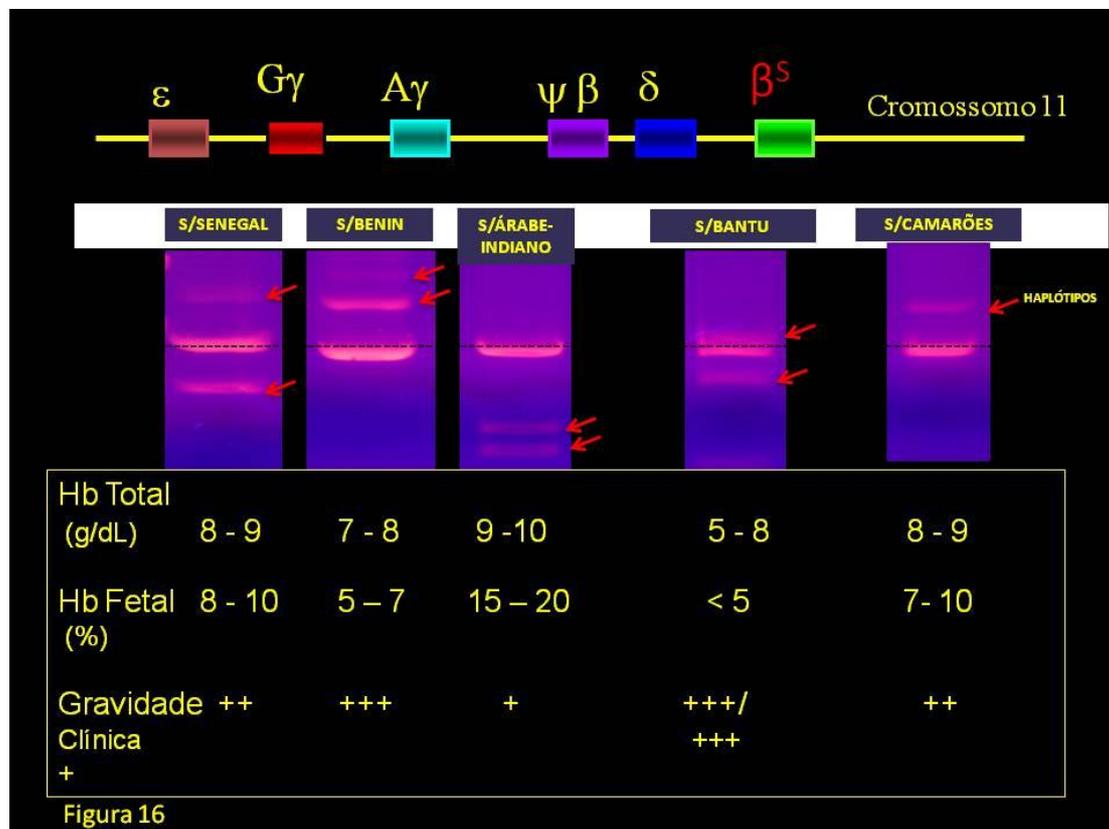


Figura 16- Haplótipos de Hb S em pacientes com anemia falciforme (Hb SS) relacionados com graus de anemia (Hb Total), concentrações de Hb Fetal e gravidade clínica. Observa-se que o aumento da concentração de Hb Fetal diminui os graus de anemia e da gravidade clínica.

Diagnóstico laboratorial da doença falciforme

O diagnóstico laboratorial da doença falciforme é basicamente realizado com apenas três exames laboratoriais: hemograma, eletroforese de hemoglobinas e a dosagem de Hb Fetal. Alguns laboratórios substituíram a técnica da eletroforese por cromatografia HPLC. O hemograma fornece os dados referentes ao grau de anemia do paciente, enquanto que os índices hematimétricos HCM e VCM auxiliam a diferenciar genótipos iguais determinados por eletroforese ou cromatografia, por exemplo, a Hb SF. A tabela 3 mostra especificamente a diferenciação destes casos de Hb SF, assim como o de outros genótipos da doença falciforme. Destacamos ainda nesta tabela a presença do genótipo de Hb AS, que embora seja clinicamente assintomática e sem anemia, é útil como parâmetro de comparação^{3, 8, 34}.

Tabela 3 – Diferenciação dos principais tipos de doença falciforme e de seus genótipos por meio de eletroforese (ou cromatografia) de hemoglobinas, dosagem de Hb Fetal e índices hematimétricos VCM e HCM do hemograma.

Doença Falciforme	Genótipo*	Hb(g/dL)	VCM	HCM	Hb Fetal(%)
Anemia Falciforme	SS	5 a 9	N	N	2 a 5
Anemia Falciforme/PHHF**	SF	9 a 11	N	N	10 a 20
Hemoglobinopatia SC	SC	7 a 11	N	N	0 a 3
Hemoglobinopatias SD***	SD	7 a 11	N	N	0 a 3
Hb S/ Talassemia alfa	SH	6 a 10	D	D	2 a 5
Hb S/ Talassemia beta	SF	6 a 10	D	D	10 a 20
Traço falciforme ****	AS	12 a 16	N	N	0 a 1
Hb Normal ****	AA	12 a 16	N	N	0 a 1

* Genótipo estabelecido por eletroforese ou cromatografia de hemoglobinas

** PHHF: Persistência Hereditária de Hb Fetal

*** Hb D migra na eletroforese alcalina e cromatografia similar à Hb S.

A diferenciação entre Hb S e Hb D se faz por meio de eletroforese ácida.

**** Os valores de Hb(g/dL) aqui representados como padrões pode ter pequenas variações entre diferentes laboratórios.

N: valores normais; D: valores diminuídos.

Talassemias: a doença que desvendou as funções dos genes

A talassemia é uma patologia que surgiu em ancestrais humanos que habitavam as regiões do mar Mediterrâneo e o sudeste asiático. É possível admitir que o primeiro relato da doença tenha sido feito por Hippocrates no ano 400 AC ao descrever o que se segue: *quando crianças com sete anos tiverem fraqueza, descoloração da pele, respiração rápida ao andar e fadiga, junto com o desejo de comer terra, isto indica destruição do seu sangue*". O termo *talassemia*, portanto, tem origem grega com a combinação dos seguintes significados *thalassa* (mar), *aima*,(sangue), *an* (falta de). Portanto, o termo *anaima* (falta de sangue) passou a indicar *anaemia* (em latim) e que se tornou **anemia**. Como se sabe, era comum em algumas ilhas gregas o casamento entre primos de primeiro grau, assim, nestes lugares haviam muitas pessoas com talassemias menor e maior, fato constatado durante as guerras gregas onde era fácil a conquista dessas ilhas, pois os guerreiros "não tinham sangue". Dessa forma surgiu a palavra *thalassa+anaima* (*talassanaima*) que se transformou em *talassemia*, com o significado de "pessoas sem sangue que moram nas ilhas do mar". Entretanto, os fundamentos científicos sobre talassemias tiveram início a partir de 1925 com o artigo de Thomas B. Cooley e Perl Lee³⁵, conforme mostra a tabela 4 em que se relata os principais eventos relacionados com esta doença^{1, 3, 13, 33}.

Tabela 4 – Breve relato dos principais eventos que destacaram as descobertas relacionadas com as talassemias.

Ano	Autor	Resumo do relato científico
1925	TB Cooley ³⁵ P Lee	Descrevem as características da doença: anemia, face mongoloide, palidez, esplenomegalia, hepatomegalia, eritrócitos resistentes a soluções hipotônicas e sangue com eritroblastos. Entre 1925 a 1970 a talassemia era conhecida por anemia de Cooley. Em 1970 passa a ser designada por anemia do mediterrâneo. Somente em 1975 passa a ser conhecida por talassemia.
1935	F Micheli ³⁶ e cols.	Demonstra a hereditariedade da “anemia de Cooley”
1948	E Silvestroni ³⁷ I Bianco	Explicam que a hereditariedade da “anemia de Cooley é típica de herança mendeliana.
1955	E Silvestroni ³⁸ I Bianco	Descrevem a interação genética entre a anemia se Cooley e a Hb S, caracterizando a anemia micro-drepanocítica, atualmente conhecida por Hb S/ <i>Talassemia beta</i> .
1974	H Lehmann ⁴ RG Hunstman	Demonstra que a globina alfa é sintetizada por quatro genes alfa, dois em cada cromossomo 16, e a globina beta é produzida por dois genes beta, um em cada cromossomo 11.
1974	M Barry ³⁹ e cols.	Descrevem os resultados dos primeiros testes realizados em pacientes com talassemia β maior submetidos a terapia quelante de ferro associada com regime de hipertransfusão de eritrócitos realizados entre 1966 a 1973.
1981	DJ Weatherall ⁴⁰ JB Clegg	Descrevem a base molecular das talassemias.
1987	WHO ⁴¹	Apresenta em sua reunião anual realizada em Hierakleion, Ilha de Creta na Grécia o primeiro protocolo terapêutico internacional para o tratamento de pessoas com talassemia β maior.
1990	G Lucarelli ⁴² e cols.	Primeiro transplante alogênico de células tronco em paciente com talassemia beta maior.
2004	FA Naoum ⁴³ e cols.	Associam a baixa prevalência de infartos em portadores de talassemia beta menor com a cinética metabólica acelerada de LDL-colesterol

Causas genéticas das talassemias e diagnóstico laboratorial

A síntese das globinas do agrupamento de genes alfa (RCG- α , ξ , α_1 e α_2) e de genes beta (RCG- β , ϵ , γ , δ e β) ocorre de forma equilibrada para a formação das hemoglobinas A, A₂ e Fetal. Para efeito de compreensão do processo de desequilíbrio na síntese de globinas alfa e beta que causam as talassemias, optamos por representar apenas os resultados das sínteses dos genes α e β , e das respectivas globinas, conforme mostra a figura 17. Quando há desequilíbrio nas sínteses destas globinas, os produtos degradados das globinas livres e não combinadas produzem lesões nos eritrócitos. As lesões expõem algumas proteínas de membrana e tornam os eritrócitos afetados alvos do sistema imune, os quais são retirados precocemente da circulação sanguínea causando a anemia hemolítica da talassemia. As talassemias, enfim, são um grupo heterogêneo de disfunções genéticas causadas por reduções nas sínteses de globinas alfa ou beta. A talassemia mais prevalente em todo o mundo é a do tipo alfa (figura 17b), seguida da talassemia beta (figura 17c). Excepcionalmente há relatos de reduções nas sínteses de globinas delta ou gama que originam as talassemias delta ou gama, respectivamente, sem significado clínico importante^{3, 4, 13, 33, 40}.



Figura 17

Figura 17 – Nesta figura representamos os cromossomos 16 e 11 e seus respectivos grupos de genes alfa e beta. (a) Síntese equilibrada das globinas alfa e beta com produção de Hb AA; (b) As setas em amarelo mostra uma das alterações por falhas de genes alfa que dão origem à talassemia alfa, resultando num desequilíbrio na produção das globinas alfa e beta; (c) A seta branca mostra que um gene beta está com redução total em comparação com outro gene beta que está normal, fato que resulta também num desequilíbrio entre as globinas alfa e beta.

O diagnóstico laboratorial está diretamente relacionado com o grau de não funcionalidade dos genes alfa e beta, conforme mostram as figuras 18 e 19 para a talassemia alfa, e 20 e 21 para a talassemia beta.

DESEQUILÍBRIO α / β	GENE(S) ALFA COM LESÃO FUNCIONAL	DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA TALASSEMIA α	ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS ERITROCITÁRIAS	ALTERAÇÕES LABORATORIAIS ESPECÍFICAS
		TALASSEMIA ALFA MÍNIMA (ASSINTOMÁTICO)	NENHUMA	Hb AH – TRAÇOS DE Hb H (0,2% -1%) EM ELETROFORESE DE Hb
		TALASSEMIA ALFA MENOR (ASSINTOMÁTICO)	Hb NORMAL VCM E HCM DIMINUÍDOS	Hb AH – Hb H VISÍVEL (2% -5%) EM ELETROFORESE DE Hb
		TALASSEMIA ALFA INTERMÉDIA(*)	Hb DIMINUÍDA VCM E HCM DIMINUÍDOS	Hb AH – Hb H VISÍVEL (5%-20%) EM ELETROFORESE DE Hb
		TALASSEMIA ALFA MAIOR(**)	Hb DIMINUÍDA ERITROBLASTOSE ACENTUADA	Hb F/BART'S Hb BART'S PRÓXIMA DE 100% EM ELETROFORESE

Figura 18

Figura 18 – Quadro demonstrativo dos principais tipos de talassemia alfa relacionados com: **grau de desequilíbrio das globinas α/β , genes alfa com lesão funcional, diagnóstico clínico, alterações hematológicas eritrocitárias e alterações laboratoriais específicas.** Lesões parciais dos genes alfa estão caracterizadas com α em cor cinza; lesões totais dos genes alfa estão caracterizadas por traços; (*) também denominada por doença de Hb H; (**) RN natimorto com síndrome hidrópica ou hidropsia fetal.

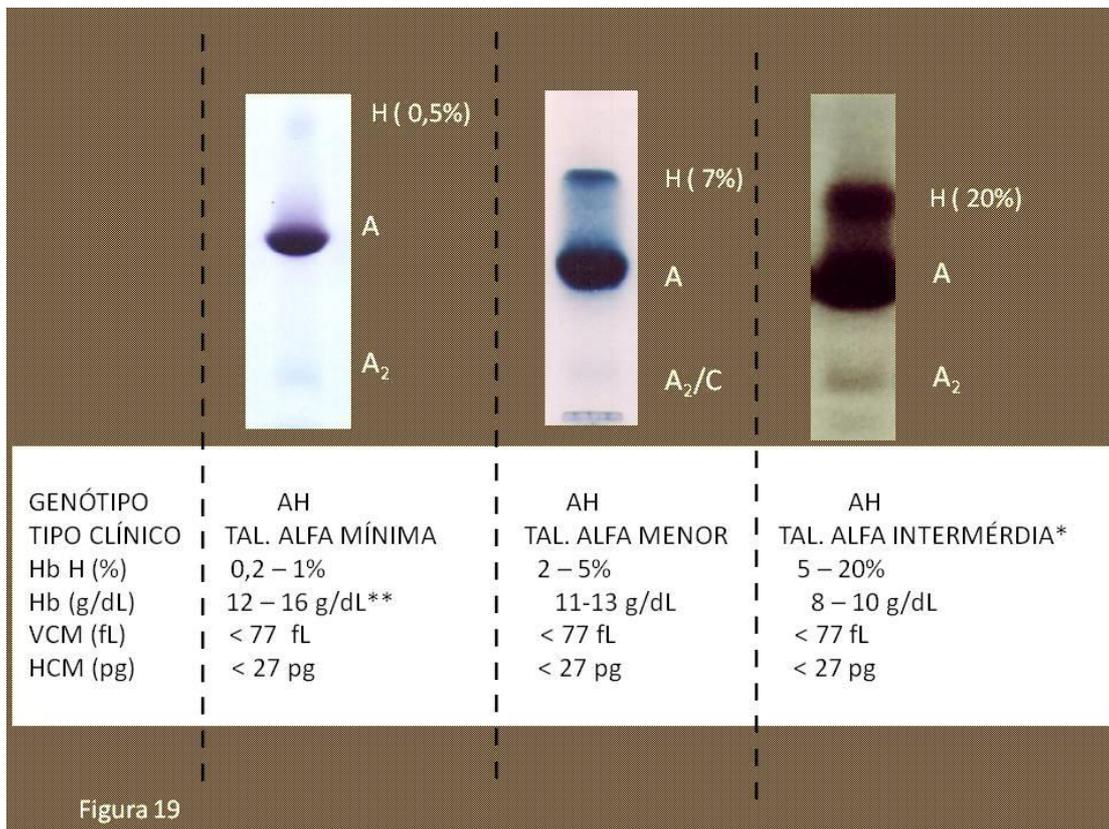


Figura 19

Figura 19 – Eletroforeses alcalina de hemoglobina em acetato de celulose de três casos de talassemias alfa: mínima, menor e intermédia (*doença de Hb H). Se considera talassemia mínima os casos em que a Hb H está presente em baixíssimas concentrações associada a valores padrões de hemoglobina total em g/dL (**). Observa-se que à medida que aumenta a concentração da Hb H na eletroforese os valores de Hb total (g/dL) diminuem.

DESEQUILÍBRIO α/β	GENE(S) BETA COM LESÃO FUNCIONAL	DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA TALASSEMIA β	ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS ERITROCITÁRIAS	ALTERAÇÕES LABORATORIAIS ESPECÍFICAS
		TALASSEMIA BETA MÍNIMA (ASSINTOMÁTICO)	Hb NORMAL VCM E HCM DIMINUÍDOS	Hb A ₂ AUMENTADA EM ELETROFORESE DE Hb MICROPOIQUILOCITOSE (+)
		TALASSEMIA BETA MENOR (ASSINTOMÁTICO)	Hb DIMINUÍDA VCM E HCM DIMINUÍDOS	Hb A ₂ AUMENTADA EM ELETROFORESE DE Hb MICROPOIQUILOCITOSE (++)
		TALASSEMIA BETA INTERMÉDIA(*)	Hb DIMINUÍDA VCM E HCM DIMINUÍDOS	Hb AF (Hb A: 80-90%; Hb F: >5 - 20%) ACENTUADA HIPOCROMIA E MICROPOIQUILOCITOSE
		TALASSEMIA BETA MAIOR	Hb DIMINUÍDA ERITROBLASTOSE ACENTUADA	Hb AF OU Hb FF Hb A: <20%; Hb F: 80-100% ACENTUADA HIPOCROMIA E MICROPOIQUILOCITOSE ERITROBLASTOS

Figura 20 – Quadro demonstrativo dos principais tipos de talassemia beta relacionados com: grau de desequilíbrio das globinas α/β , genes beta com lesão funcional, diagnóstico clínico, alterações hematológicas eritrocitárias e alterações laboratoriais específicas. Lesões parciais dos genes beta estão caracterizadas com β em cor cinza; lesões totais dos genes beta estão caracterizados por traços. (*) a talassemia intermédia é uma classificação eminentemente clínica, não sendo possível determiná-la somente pelos resultados de exames laboratoriais.

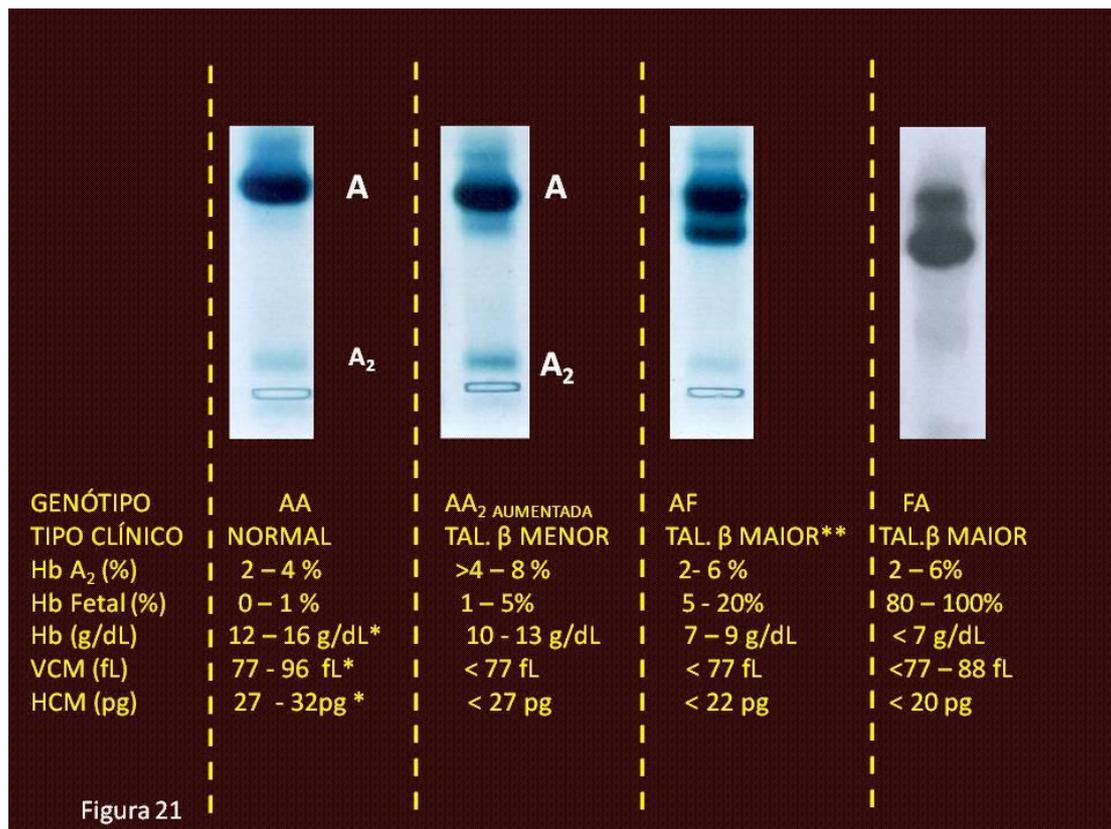


Figura 21 – Eletroforeses alcalina de hemoglobinas em acetato de celulose. Comparações de resultados entre Hb AA (normal), Hb AA₂ aumentada (Tal.β menor), Hb AF (Tal.β maior) e Hb FF (Tal.β maior). (*) valores padrões de normalidade. (**) alguns destes genótipos podem estar associados à talassemia beta intermédia.

A importância do diagnóstico correto nas talassemias

No Brasil, a talassemia beta menor tem prevalência entre 0,5 e 1%, a talassemia alfa mínima entre 15 a 20%, e a talassemia alfa menor entre 3 e 5%. Essas variações ocorrem por causa da extraordinária composição étnica da população brasileira nas suas diversas regiões geográficas. Embora sejam assintomáticas, a maioria dos portadores de talassemias mínima e menor têm eritrogramas muito parecidos com o da anemia ferropriva^{1, 2, 3, 25}. A diferenciação entre estes dois grupos por meio de análises laboratoriais está resumida na tabela 6.

Por outro lado, a forma grave de talassemia beta, conhecida por talassemia beta maior é rara por meio de avaliação relativa, ou seja 1 caso para cada 30 mil pessoas. Porém, se analisarmos sob o ponto de vista absoluto para o Brasil, considerando uma população de 220 milhões de habitantes, é possível admitir que no nosso país há cerca de 7300 pessoas com esta doença. Ao considerarmos as necessidades médicas básicas (médicos, enfermagem, psicólogos, exames laboratoriais, etc.) e terapêuticas, a magnitude do impacto financeiro e social é considerável.

Tabela 6 – Exames fundamentais para diferenciar as talassemias mínima e menor da anemia por deficiência de ferro. A cor vermelha destaca as diferenças de resultados entre estas patologias.

Exames laboratoriais	Tal. mínima e menor		Deficiência de ferro
	Alfa	Beta	
Hemoglobina (g/dL)	< 12	< 12	<12
HCM (pg)	< 27	< 27	< 27
VCM (fL)	< 77	< 77	< 77
Morfologia dos eritrócitos	MH, ESQ, DCR, PB*		MH, LEP
Eletroforese de Hb	AH	AA₂AUMENTADA	AA₂ DIMINUÍDA
Hb A ₂ (%)	< 2 – 3	> 4 - 8	< 2 - 3
Hb Fetal (%)	0 – 1	1 – 5	0 - 1
Hb H (%)	0,2 – 5	0	0
Ferro sérico	NORMAL	NORMAL	DIMINUÍDO
Ferritina	NORMAL	NORMAL	DIMINUÍDO**
CTLFe	NORMAL	NORMAL	NORMAL/ AUMENTADO
Saturação de ferro	NORMAL	NORMAL	DIMINUÍDO

MH: Micrócitos hipocrômicos; ESQ: Esquisócitos; DCR: Dacriócitos; PB: Pontilhados basófilos; LEP: Leptócitos; CTLFe: Capacidade Total de Transporte de Ferro.

* Alterações morfológicas comuns nas talassemias alfa e beta

**Pode estar aumentado em casos associados a processos inflamatórios.

HEMOGLOBINAS INSTÁVEIS

São hemoglobinas anormais raras que causam anemia hemolítica crônica de intensidade variável, muitas vezes acompanhadas de muitos eritroblastos e queratócitos, ou células mordidas. A maioria das hemoglobinas instáveis ocorre por mutações espontâneas sem que haja envolvimento da hereditariedade, e se manifesta clinicamente em diferentes fases da vida: recém-nascidos, infância ou adolescência^{1, 3, 10}. Seus portadores, em geral, têm alterações clínicas bem definidas, conforme mostra a tabela 7.

Tabela 7- Alterações clínicas dos portadores de hemoglobinas (Hb) Instáveis

Alterações Clínicas	Frequência	Comentários
Esplenomegalia	86	Ocorre quando a Hb Instável causa anemia hemolítica crônica .
Sintomas de anemia	80	Anemia de grau variável, pois depende do tipo de lesão molecular. A anemia pode ser desencadeada por drogas oxidantes, febre alta ou infecções virais.
Pigmentúria	64	Importante fator para diagnóstico. Ocorre nos episódios de hemólise.
Cianose	32	Ocorre quando a elevação da metaHb está acima de 5%.
Icterícia neonatal	5	Simula anemia hemolítica autoimune.

O primeiro relato de Hb Instável foi feito em 1964 por Dacie e colaboradores⁴⁴ que descreveu acentuada presença de corpos de Heinz em cinco pacientes acometidos por anemia hemolítica crônica. Atualmente há mais de 200 tipos diferentes de Hb Instáveis descritas em todo o mundo, algumas são mais frequentes e podem ser identificadas em pessoas de diversos países, por exemplo, Hb Köln (β 98 Valina>Metionina) e Hb Hasharon (α 47 Fenilalanina> Histidina)³. No Brasil, o primeiro caso de hemoglobina instável foi relatado por H. Praxedes, em 1972, com a Hb Niterói¹⁰. Esta hemoglobina teve uma característica especial pois foi o primeiro caso de deleção conjunta de três aminoácidos sequências da globina beta (Hb Niterói: β deleção dos aminoácidos 42,43 e 44)¹. Em 2009, duas novas hemoglobinas instáveis foram descritas no Brasil por M. Bezerra e colaboradores, qual seja, a Hb Caruarú e Hb Olinda⁴⁵. A tabela 8 apresenta as dez principais alterações comuns entre as Hb Instáveis^{1, 3, 10}.

Tabela 8 – Dez alterações comuns que ocorrem nas Hb Instáveis

- 1- Originam-se de mutações que envolvem substituições de aminoácidos em regiões sensíveis da hemoglobina, por exemplo, em aminoácidos que promovem a estabilidade da molécula (ver figura 9c).
- 2- Todos os diferentes tipos de Hb Instáveis descritas até o presente são heterozigotas. Provavelmente a homozigose não é compatível com a vida.
- 3- Estão associadas a anemias hemolíticas crônicas ou agudas, com intensidades variáveis: discreta, moderada ou grave.
- 4- A anemia pode ser desencadeada por medicações oxidantes, por exemplo, sulfas e derivados, infecções bacterianas ou virais, e febre alta.
- 5- Em 98% dos pacientes com Hb Instáveis aparecem os corpos de Heinz (produtos degradados das globinas desnaturadas naturalmente) após coloração supravital com azul de crezil brilhante a 1% (figura 22a).
- 6- A degradação da Hb Instável libera os grupos hemes de suas globinas e os mesmos são excretados pela urina sob forma de dipirróis, causando intensa pigmentúria com a cor de chocolate.
- 7- Ainda, durante o processo de degradação da Hb Instável, o ferro é oxidado e a oxihemoglobina se transforma em metahemoglobina, com elevação de sua concentração no sangue.
- 8- O teste determinante para identificar uma Hb Instável é sua desnaturação e precipitação ao calor que ocorre ao aquecer a solução química da hemoglobina a 50°C (figura 22b).
- 9- As Hb Instáveis são visíveis em eletroforese alcalina de hemoglobina, notadamente quando os eritrócitos hemolisados com saponina a 1% (figura 22c). Quando a mutação ocorre na globina beta é possível visualizar a globina alfa livre próxima ao ponto de aplicação da amostra (figura 22d).
- 10- A maioria das hemoglobinas instáveis ocorrem por mutações espontâneas durante a embriogênese.

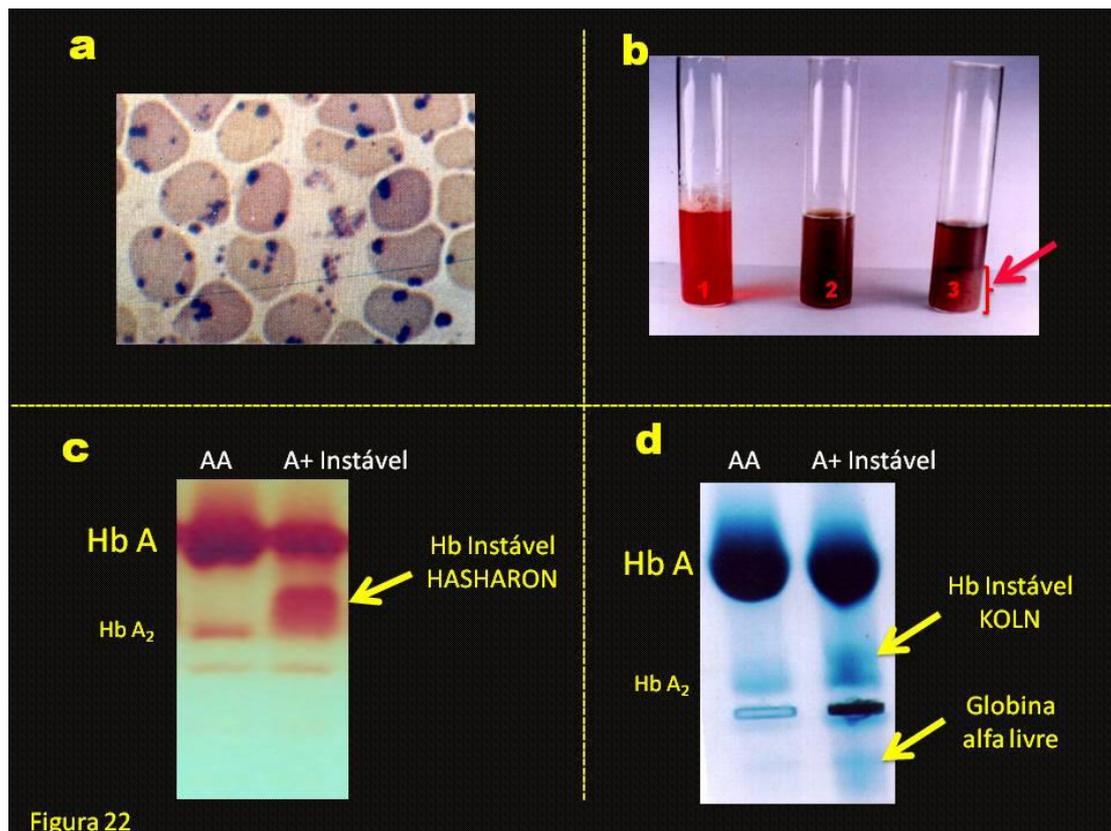


Figura 22 – (a) Eritrócitos com corpos de Heinz após coloração com azul de crezil brilhante a 1%; (b) Teste de instabilidade térmica a 50°C: desnaturação (tubos 1 e 2) e precipitação (tubo 3); (c) Eletroforeses de Hb AA e Hb A+Instável (Hb Hasharon, uma mutante de globina alfa); (d) Eletroforeses de Hb AA e Hb A+Instável (Hb Koln, uma mutante de globina beta) com destaque para a globina alfa livre desta hemoglobina instável.

Referências bibliográficas

- 1- Naoum PC – **Hemoglobinopatias e Talassemias**. Editora Sarvier, São Paulo, 1997.
- 2- Sabath DE – Molecular diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies: a critical review. **Am J Clin Pathol** 148: 6-15, 2017.
- 3- Bain BJ – **Haemoglobinopathy diagnosis**. Blackwell Publish, London, 2005.
- 4- Lehmann H, Hunstman RG – **Man's haemoglobins**. 2nd ed. North Holland Publish Co, Amsterdam, 1974.
- 5- Old J, Hartevelde C – Carrier screening for haemoglobinopathies: past, presente and future. **OBM Genetics** 1: issue 3, 2017.
- 6- Gibson QH – Kinetics of oxygen binding to hemoglobina A. **Biochemistry** 38: 5191-5199, 1999.
- 7- Willian RC – The mind of primitive anthropologists: hemoglobina and HLA, patterns of molecular evolution. **Human Biology** 75: 577-584, 2003.
- 8- Naoum PC, Domingos CRB – Doença falciforme no Brasil. Origem, genótipos, haplótipos e distribuição geográfica. **J Bras Patol** 33:145-153,1997.
- 9- Winterbourn CC – Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. **Semin Hematol** 27: 41-50, 1990.

- 10- Bain BJ, Wild B – **Variant hemoglobins. A guide to identification.** Wiley & Balckwell Publ, 2010.
- 11- Leoneli GG, Imperial RE – Hemoglobinas anormais e dificuldades diagnósticas. **Rev Bras Hemat Hemot** 22: 396-403, 2000.
- 12- Cataldo MJ, Bonini-Domingos AC, Bonini-Domingos CR- Heterozygous for hemoglobina Porto Alegre identified by combination of laboratory diagnostic methodologies. **Rev Bras Hemat Hemot** 34: 305-306, 2012.
- 13- Weatherall DJ, Clegg JB – **The thalassaemia syndromes.** John Willey & Sons Publish, 2008.
- 14- Herrick JB – Peculiar elongated and sickled-shaped red blood corpuscles in case of severe anemia. **Arch Int Med** 6: 517-521, 1910.
- 15- Sherman IJ – The sickling phenomenon with special reference to the differentiation of sickle cell anemia and sickle cell trait. **Johns Hopkins Hospital** 63: 309-324, 1940.
- 16- Silvestroni E, Bianco I – Una nova entità nosologica: la malattia microdrepanocitica. **Haematologica** 29: 455-460, 1946.
- 17- Pauling L, Itano H, Singer SJ – Sickle cell anemia: a molecular disease. **Science** 110: 543-548, 1949.
- 18- Nell JV – The inheritance of sickle cell anemia. **Science** 110: 64-66, 1949.
- 19- Allison AC – Protection afforded by sickled-cell trait against malaria infection. **Br Med J** 1: 290-294, 1954.
- 20- Ingram VM – A specific chemical difference between the globins of normal and sickle cell anemia hemoglobina. **Nature** 178: 792-794, 1956.
- 21- Conley CL – Molecular orientation in sickle cell hemoglobin solutions. **Proc Soc Exp Biol Med** 75: 197-201, 1963.
- 22- White JG – Ultrastructure features of erythrocyte and hemoglobin S sickling. **Arch Int Med** 133: 545-562.
- 23- Naoum PC – **Contribuição à padronização do fingerprinting de hemoglobinas em nosso meio. Interpretação dos peptídeos de Hb A, S, C e D.** Tese de doutoramento, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, 1972.
- 24- Kan YM, Dozy AM – Polimorphism of the DNA sequence adjacent to beta globin structural gene: relationship to sickle mutation. **Proc Natl Acad Sci** 75: 5671-5675, 1978.
- 25- Naoum PC, Mattos LC, Cury PR - Prevalence and geographic distribution of abnormal hemoglobins in state of Sao Paulo, Brazil. **Bull Pan Am Health Organ** 18: 127-138, 1984.
- 26- Pagier JO – Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc Natl Acad Sci** 81: 1771-1773, 1984.
- 27- Johnson FL, Look AT et al – Bone marrow transplantation in a patient with sickle cell anemia. **N Engl J Med** 311:780-783, 1984.
- 28- Ruiz MA, Guerra CCC, Naoum PC – Detecção de hemoglobinas anormais em sangue de cordão de recém-nascidos na cidade de Santos, SP, através de eletroforese em gel de amido, **Bol Soc Bras Hematol Hemoter** 8: 8-13, 1986.
- 29- Labie D – Haplotypes in tribal Indians bearing the sickle gene: evidence for unicentric origin of beta^S mutation and the unicentric origin of the tribal population in India. **Human Biology** 61: 479-491, 1989.

- 30- Rieder RF, Safaya S, et al – Effect of beta-globin cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. **Am J Hematol** 36: 184-189, 1991.
- 31- Noguchi CT, Galdwin M et al – Pathophysiology of a sickle cell trait mouse model: human $\alpha\beta^S$ transgenes with one mouse β -globin allele. **Blood Cells, Molecules, and Disease** 27: 971-977, 2001.
- 32- Pieroni F, Barros GMN, Simões B – Transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) em doença falciforme. **Rev Bras Hemat Hemot** 29: 327-330, 2007.
- 33- Steinberg MH, Hsu H, Nagel RL- Gender and Haplotype effect upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. **Am J Hematol** 48: 175-181, 1995.
- 34- Naoum PC, Naoum FA – **Doença das células falciformes**. Editora Sarvier, São Paulo, 2004.
- 35- Cooley TB, Lee P. A series of cases os splenomegaly in children with anemia and peculiar boné changes. **Trans Am Pediatr Soc** 37: 29-35, 1925.
- 36- Michele F, Penaty, Momigliano LC – Ulteriori ricerche sulla anemia ipocromica splenomegalia con poichilocitosi. **Haematologica** 16:10, 1935.
- 37- Silvestroni E, Bianco I - Recherche clinique, genetique e ematologiche sui malati di anemia microcitica costitucionale e di morbo di Cooley. **Haematologica** 31: 1-5, 1948.
- 38- Silvestroni E, Bianco I – New data on microdrepanocitic disease. **Blood** 10: 623-625, 1955.
- 39- Barry M, Flynn DN – Long-term chelation therapy in thalassaemia major: effect on liver iron concentration and clinical progress. **Br Med J** 1: 16-20, 1974.
- 40- Weatherall DJ, Clegg JB – The molecular basis for mild forms of homozygous beta thalassaemia. **Lancet** 317:522-529, 1981.
- 41- WHO – 5th Annual meeting of the WHO working group of community programmes in hemoglobinopathies. Heraklio, Crete, 1986.
- 42- Lucareli G, Galimberti M, Polchi P – Bone marrow transplantation in patients with thalassemia. **N Engl Med** 322: 417-421, 1990.
- 43- Naoum FA, Gualandro SF, Maranhão RC – Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion in subjects with heterozygous beta-thalassemia. **Am J Hematol** 77: 340-345, 2004.
- 44- Dacie JV et al. Hereditary Heinz Body anaemia: a report of studies on five patients with mild anemia. **Br J Haemat** 10: 388-402, 1964.
- 45- Bezerra MA, Albuquerque D, Santos M – Two new unstable haemoglobins leading to chronic haemolytic anaemia: Hb Caruaru and Hb Olinda. **European J Haemat** 83: 378-382, 2009.