

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ

*Eletroforese e Cromatografia na
Dosagem da Hemoglobina A₂*

Solidônio Arruda Sobreira

Fortaleza - Ceará

1999

Solidônio Arruda Sobreira

***Eletroforese e Cromatografia na
Dosagem da Hemoglobina A₂***

**Monografia apresentada como requisito
final do XIII Curso de Especialização em
Hematologia e Hemoterapia.**

ORIENTADORAS:

Dra. Fátima Marques Barros de Lima

Dra. Rita Marinei de Vasconcelos Coelho

Fortaleza - Ceará

1999

AGRADECIMENTOS

A Deus
Aos familiares
Aos funcionários
Às orientadoras

"Se alguém quer vir após mim, renuncie a si mesmo, tome sua cruz e siga-me. Porque aquele que quiser salvar sua vida, perdê-la-á, e quem perder sua vida por mim ou por este evangelho, salvá-la-á".

Jesus de Nazaré

ÍNDICE

01	Introdução	07
02	Materiais e Métodos	12
03	Resultados	15
04	Discussão	21
05	Conclusão	23
	Summary	24
	Referências Bibliográficas	25

RESUMO

A β -talassemia pode ser definida como um grupo de desordens genéticas cujo resultado é um defeito na síntese das cadeias beta.

Na β -talassemia maior ou anemia de Colley, a concentração da hemoglobina fetal está elevada, já a concentração de hemoglobina A_2 pode estar elevada ou não. Na β -talassemia menor, os níveis de hemoglobina A_2 são maiores que o normal, e um pequeno aumento na quantidade de hemoglobina fetal pode ser visto.

Variações na concentração do menor componente das hemoglobinas, a hemoglobina A_2 , são utilizadas no diagnóstico da β -talassemia.

O presente trabalho é uma comparação entre os principais métodos de dosagem da hemoglobina A_2 , eletroforese em acetato de celulose e microcromatografia.

A análise estatística mostrou que os resultados eletroforéticos e cromatográficos foram diferentes, e a percentagem de hemoglobina A_2 eletroforética foi significativamente maior que a percentagem cromatográfica.

1 INTRODUÇÃO

A hemoglobina é uma proteína de estrutura globular quaternária, transportadora de oxigênio, composta por quatro cadeias polipeptídicas e um grupo prostético, o heme, ligado a cada uma das cadeias de globina.

As hemoglobinas normais contêm dois pares de cadeias polipeptídicas diferentes, cadeias alfa e cadeias não alfa (beta, gama e delta). A hemoglobina A (HbA) é formada por duas cadeias alfa e duas cadeias beta ($\alpha_2\beta_2$). Trata-se da hemoglobina predominante no adulto normal. A hemoglobina fetal (HbF), por sua vez, é constituída de duas cadeias alfa e duas cadeias gama ($\alpha_2\gamma_2$), já a hemoglobina A₂ (HbA₂) é formada por duas cadeias alfa e duas cadeias delta ($\alpha_2\delta_2$) (2,23).

Dois genes específicos produzem a globina alfa, estão localizados no braço curto do cromossomo 16. As demais cadeias globínicas (beta, gama e delta) são produzidas por genes únicos e exclusivos, localizados no braço curto do cromossomo 11 (6).

A partir da quarta semana de vida, inicia-se a produção da HbF, que aumenta progressivamente, terminando por constituir a principal hemoglobina do período fetal. A HbA₂ começa a ser sintetizada na 25ª semana, porém em baixas concentrações até o nascimento. A hemoglobina A é sintetizada a partir da 10ª semana, mantendo-se próxima a 10% até o nascimento.

Durante o primeiro ano de vida, a HbF é gradualmente substituída pela HbA, de tal forma que após seis meses de nascimento a HbF tem concentração de até 1%. Foi progressivamente substituída pela HbA, que passa a representar 96 a 98% das hemoglobinas (17,28).

A talassemia, desordem referida por Cooley e Lee em 1925, abrange um grupo complexo de anormalidades genéticas na síntese da cadeia globínica. A

talassemia maior apresenta manifestações clínicas graves e quase sempre potencialmente fatais, já a talassemia menor tem manifestações clínicas leves ou mínimas ⁽²⁴⁾.

As β -talassemias são transtornos hereditários da molécula de hemoglobina, onde existe uma diminuição da síntese das cadeias beta, que se traduz no sangue periférico por um quadro de anemia microcítica e hipocrômica ⁽²⁵⁾.

Denomina-se β^0 talassemia quando há ausência total na síntese de cadeias beta, e β^+ talassemia quando há redução na síntese. Os indivíduos homocigotos podem ser $\beta^0\beta^0$ ou $\beta^+\beta^+$, já os heterocigotos podem ser $\beta\beta^+$ ou $\beta\beta^0$ ⁽¹⁰⁾.

Na β -talassemia, as cadeias alfa são produzidas normalmente. Como as cadeias beta estão suprimidas total ou parcialmente, a formação do tetrâmero fica prejudicada. O resultado é um excesso de cadeias alfa que se precipitam, causando lesões membranares e provocando sequestração esplênica e eritropoese ineficaz ⁽⁶⁾.

Entre as hemoglobinopatias, verificou-se que a β -talassemia heterocigota é a que maior dificuldade apresentava em ser identificada no Brasil, o que poderia justificar os baixos índices no país ^(15,16).

A talassemia maior, antes anemia do Mediterrâneo ou anemia de Cooley, constitui a forma homocigota da β -talassemia. Está associada à anemia grave, deformidades ósseas, hemólise intramedular e esplênica e hepatoesplenomegalia entre outras alterações. Além dos achados periféricos, há hiperplasia eritroide medular, a HbF está elevada, o que constitui um importante critério diagnóstico, já a HbA₂ pode estar normal ou elevada ^(17,18,29).

A β -talassemia menor, ou traço talassêmico, consiste na forma heterocigota da β -talassemia. A concentração da HbA₂ está elevada, um aspecto importante no diagnóstico, podendo elevar-se até 4 a 8% em mais de 90% dos casos. A HbF pode estar normal ou discretamente elevada ^(17,18).

A β -talassemia tem como principais causas moleculares as substituições e pequenas deleções e inserções que alteram áreas críticas do gene ⁽²⁶⁾. A técnica de amplificação gênica tem permitido analisar os defeitos moleculares do gene beta responsável pela talassemia. Entre várias mutações já observadas, a mutação mais benigna, a partir de parâmetros hematológicos, foi a IVS-I NT 6 ^(12,14,32). Demonstrou-se haver certa relação entre o volume corpuscular médio (VCM) e a gravidade da mutação, onde as mutações β^0 cursam com grau de microcitose mais importante que as β^+ ⁽⁵⁾.

O estudo do DNA também tem possibilitado o diagnóstico pré-natal das talassemias. O DNA fetal pode ser obtido de células nucleadas fetais colhidas por amniocentese ou punção de vilosidades coriônicas ⁽²²⁾.

O estado homocigoto da beta-delta talassemia caracteriza-se pela presença exclusiva da HbF, a HbA e HbA₂ não são produzidas. A forma heterocigota apresenta HbF elevada e HbA₂ normal ou levemente reduzida ^(1,17,30). Observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a beta-delta talassemia e a talassemia menor na amplitude de distribuição eritrocitária (ADE) ⁽²⁰⁾.

A interação hemoglobina S/ β^0 talassemia tem quadro clínico semelhante à anemia falciforme, a concentração da hemoglobina S é variável (entre 80 a 90%), a HbF está elevada, a HbA está ausente e a HbA₂ está aumentada ^(7,17).

A quantificação da HbA₂ consiste numa importante determinação no diagnóstico acurado das β -talassemias, além de servir na triagem dos portadores β -talassêmicos. A identificação destes portadores e o aconselhamento genético têm contribuído para reduzir a incidência da doença ⁽²¹⁾.

A HbA₂ é mais amplamente utilizada no diagnóstico da β -talassemia menor, sua determinação pode estar indicada na presença de achados sugestivos, tais como: hipocromia, anisocitose, poiquilocitose, pontilhado basófilo, células em

alvo, volume corpuscular médio menor que 78 fl e hemoglobina corpuscular média menor que 28 pg ^(11,21).

Os principais métodos para quantificar a HbA₂ são a eletroforese e eluição da HbA₂ em acetato de celulose e a microcromatografia. Outros métodos, menos comuns, incluem ensaios imunoquímicos e cromatografia líquida de alta resolução ⁽⁹⁾.

A cromatografia em DEAE celulose mostra-se como método simples, rápido e preciso, além do baixo custo necessário a sua execução ^(3,19).

Na microcromatografia de troca iônica, a HbA₂ é seletivamente eluída da coluna sob condições específicas de PH e concentração do íon cloreto. Neste PH e força iônica, a HbA adere mais fortemente à celulose que a HbA₂, resultando em rápida separação e eluição. A densidade óptica da HbA₂ é então determinada e comparada à densidade óptica da solução de hemoglobinas totais. Finalmente a percentagem de HbA₂ é calculada ^(4,9,21).

Além de reprodutível, a cromatografia em DEAE celulose não mostra superposição de valores entre o limite superior da normalidade e o limite inferior nos pacientes heterozigotos β -talassêmicos ⁽¹³⁾.

A eletroforese de hemoglobinas está fundamentada nos diferentes tipos de migração de hemoglobinas carregadas quando submetidas a um campo elétrico. As fitas de acetato de celulose são utilizadas para a separação de hemoglobinas em tampão tris-EDTA-borato, PH 8,6. Uma vez separadas, as frações são fracionadas e eluídas para determinação da sua densidade óptica.

A eletroforese em acetato de celulose permite a separação e quantificação da Hemoglobina S, já a hemoglobina C e A₂ migram na mesma posição. Também a hemoglobina G, D e Lepore migram na mesma posição da hemoglobina S e a hemoglobina E, O e C Harlem migram na mesma posição da hemoglobina C ^(9,17).

O objetivo do presente trabalho é proceder um estudo comparativo entre os dois métodos principais para dosagem da HbA₂, eletroforese em acetato de celulose e microcromatografia. Os resultados cromatográficos serão comparados aos eletroforéticos, verificando se ambas determinações são semelhantes ou não, em outras palavras, se existe diferença estatisticamente significativa entre os resultados das referidas técnicas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

AS AMOSTRAS

Foram utilizadas nas análises, 40 amostras de sangue total de pacientes que tinham indicação para dosagem da HbA₂, obtidas no Setor de Hemoglobinas do HEMOCE.

MATERIAIS UTILIZADOS NA ELETROFORESE

- ⇒ Centrífuga Presvac: DCS-16-RVT
- ⇒ Cuba Eletroforética Doles: B-10
- ⇒ Fonte de Corrente Contínua Eccepi: BM 55 Lux
- ⇒ Espectrofotômetro Coleman: SP 395-UV
- ⇒ Fitas de Acetato de Celulose Celogel
- ⇒ Clorofórmio Absoluto
- ⇒ Tampão tris-EDTA-borato
- ⇒ Solução Salina a 0,85%
- ⇒ Pipetas e vidraria

MATERIAIS UTILIZADOS NA CROMATOGRAFIA

- ⇒ KIT ISOLAB para dosagem da Hemoglobina A₂:
 - ◆ Colunas Cromatográficas Preparadas
 - ◆ Agente Eluidor da HbA₂: reagente 1
 - ◆ Agente Eluidor das outras Hemoglobinas: reagente 2
- ⇒ Espectrofotômetro Coleman: SP 395-UV
- ⇒ Pipetas e vidraria

Cada amostra testada foi submetida à microcromatografia em coluna e eletroforese em acetato de celulose. As concentrações obtidas através destas duas metodologias foram emparelhadas para posterior comparação.

PREPARAÇÃO DO HEMOLISADO ELETROFORÉTICO

A amostra de sangue foi centrifugada durante 5 minutos a 2000 rpm para separação do plasma. Obtido o sedimento, procedeu-se a lavagem das hemácias com solução salina 0,85% cerca de três vezes. Lavado o sedimento, adicionou-se igual volume de água destilada, agitando vigorosamente em seguida. Este hemolisado foi deixado em repouso por, no mínimo, 15 minutos. Transcorrido este tempo, adicionou-se uma pequena alíquota de clorofórmio absoluto, a fim de sedimentar o estroma.

SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA

Cada dosagem utilizou duas fitas de acetato de celulose, aplicando-se 10 μ l do hemolisado em ambas as fitas. Após aplicação, as fitas foram devidamente postas na cuba contendo o tampão Tris-EDTA-Borato. Aplicou-se uma corrente de aproximadamente 300 volts, durante 45 minutos. Separadas as hemoglobinas, fracionou-se as bandas de HbA e da HbA₂. A banda HbA₂ foi eluída em 3ml de água destilada, a banda HbA foi eluída em 15ml do mesmo solvente. A eluição transcorreu durante duas horas antes da leitura óptica.

PREPARAÇÃO DO HEMOLISADO CROMATOGRÁFICO

Retirou-se 50 μ l do sangue total, diluindo esta amostra em 200 μ l de água destilada em tubo de hemólise. O hemolisado foi deixado em repouso por, no mínimo, 5 minutos antes do uso.

ABERTURA DA COLUNA CROMATOGRÁFICA

Conforme recomendação técnica, a coluna foi invertida até sedimentação da resina e reinvertida antes do uso, assim permanecendo 30 minutos antes da abertura. Aberta a coluna, permitiu-se o escoamento líquido através da abertura inferior da coluna cromatográfica.

OBTENÇÃO DA FRAÇÃO HbA₂

Adicionou-se 50 µl do hemolisado na coluna, uma vez absorvido, foram colocados 200 µl do agente eluidor da HbA₂, permitindo a perfusão do hemolisado na resina, desprezou-se esta fração. Em seguida, adicionou-se 4ml do mesmo agente eluidor da HbA₂, coletando-se a fração eluída contendo a HbA₂. Separada esta fração, adicionou-se à coluna 4ml do agente eluidor das outras hemoglobinas, coletando-se a fração eluída. Esta última fração foi diluída em 16ml de água destilada.

ESPECTROFOTOMETRIA

Este procedimento foi comum às duas técnicas. A densidade óptica das frações eletroforéticas e cromatográficas foi determinada em 415nm, utilizando água destilada como branco.

CÁLCULO DA PERCENTAGEM DE HbA₂ (%HbA₂)

A fórmula utilizada no cálculo da HbA₂ por eletroforese foi a seguinte:

$$\%HbA_2 = \frac{A_2}{A_2 + (5.A)} \cdot 10^2$$

A₂ ≡ Densidade óptica da fração A₂

A ≡ Densidade óptica da fração A

A fórmula utilizada no cálculo da HbA₂ por cromatografia foi a seguinte:

$$\%HbA_2 = \frac{A_2}{A_2 + (5.N)} \cdot 10^2$$

A₂ ≡ Densidade óptica da fração A₂

N ≡ Densidade óptica das outras hemoglobinas

4 RESULTADOS

Os resultados das 40 dosagens feitas por cromatografia e eletroforese são apresentados nos quadros 1 e 2.

Quadro 1 - Dosagem de Hemoglobina A₂ em Percentagem

Eletroforese	Cromatografia
2,7	2,3
2,6	3,7
3,8	3,0
2,9	2,3
5,0	4,0
4,5	4,6
5,5	3,9
4,0	3,3
8,9	6,9
3,5	3,7
9,7	6,2
4,0	3,8
5,6	3,2
4,5	2,6
6,2	6,9
3,9	1,8
4,6	2,8
7,5	5,7
4,4	2,2
2,3	3,4

Quadro 2 - Dosagem de Hemoglobina A₂ em Percentagem

Eletroforese	Cromatografia
2,8	2,1
5,4	2,4
3,0	2,7
3,7	2,0
4,9	1,5
1,4	3,3
3,2	2,3
3,5	1,8
6,5	2,6
3,8	2,7
3,0	1,0
3,1	3,8
6,3	4,7
3,4	2,8
2,3	1,7
5,4	4,0
6,0	5,3
2,7	1,9
3,1	2,2
3,7	1,4

Quadro 3 - Medidas de Tendência Central e Dispersão da percentagem de hemoglobina A₂ dosada por eletroforese e cromatografia.

Medidas	Eletroforese	Cromatografia
Número de amostras (n)	40,00	40,00
Média Aritmética (\bar{x})	4,30	3,20
Variância (S^2)	3,05	2,06
Desvio Padrão (S)	1,74	1,43
Coefficiente de Variação (CV%)	40,46	44,68
Amplitude (A)	8,30	5,90

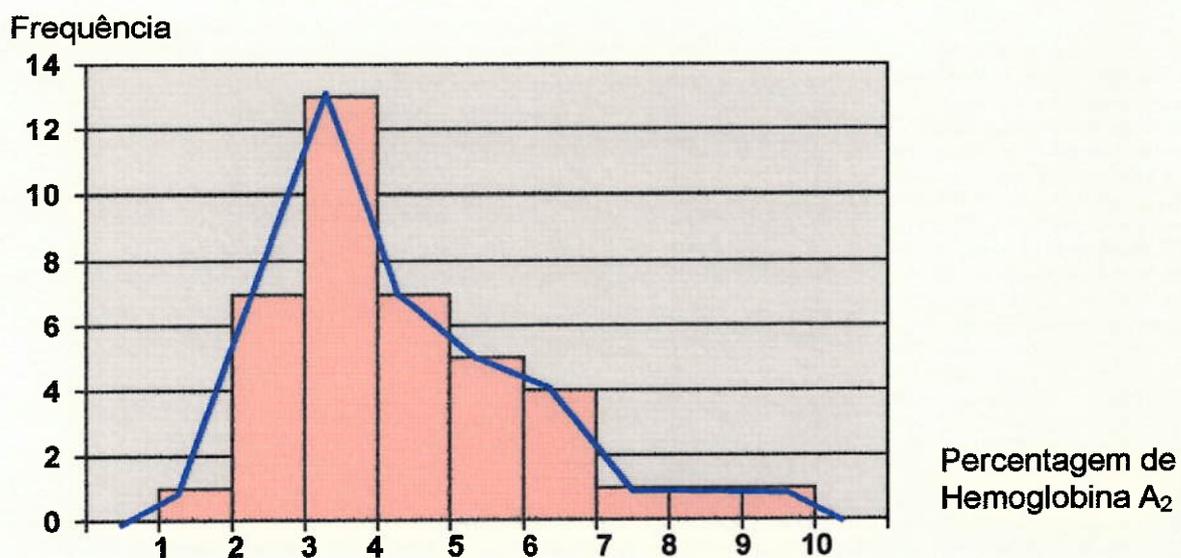
Tabela I - Distribuição de frequências da percentagem de hemoglobina A₂ dosada por eletroforese.

Classe	Frequência	Frequência Relativa %
1 ┆ 2	1	2,5
2 ┆ 3	7	17,5
3 ┆ 4	13	32,5
4 ┆ 5	7	17,5
5 ┆ 6	5	12,5
6 ┆ 7	4	10,0
7 ┆ 8	1	2,5
8 ┆ 9	1	2,5
9 ┆ 10	1	2,5
TOTAL	40	100,0

Tabela 2 - Distribuição de frequências da percentagem de hemoglobina A₂ dosada por cromatografia.

Classe	Frequência	Frequência Relativa %
1 ┆ 2	7	17,5
2 ┆ 3	14	35,0
3 ┆ 4	10	25,0
4 ┆ 5	4	10,0
5 ┆ 6	2	5,0
6 ┆ 7	3	7,5
7 ┆ 8	0	-
8 ┆ 9	0	-
9 ┆ 10	0	-
TOTAL	40	100,0

Figura 1



Histograma da percentagem de hemoglobina A₂ dosada por eletroforese.

Figura 2

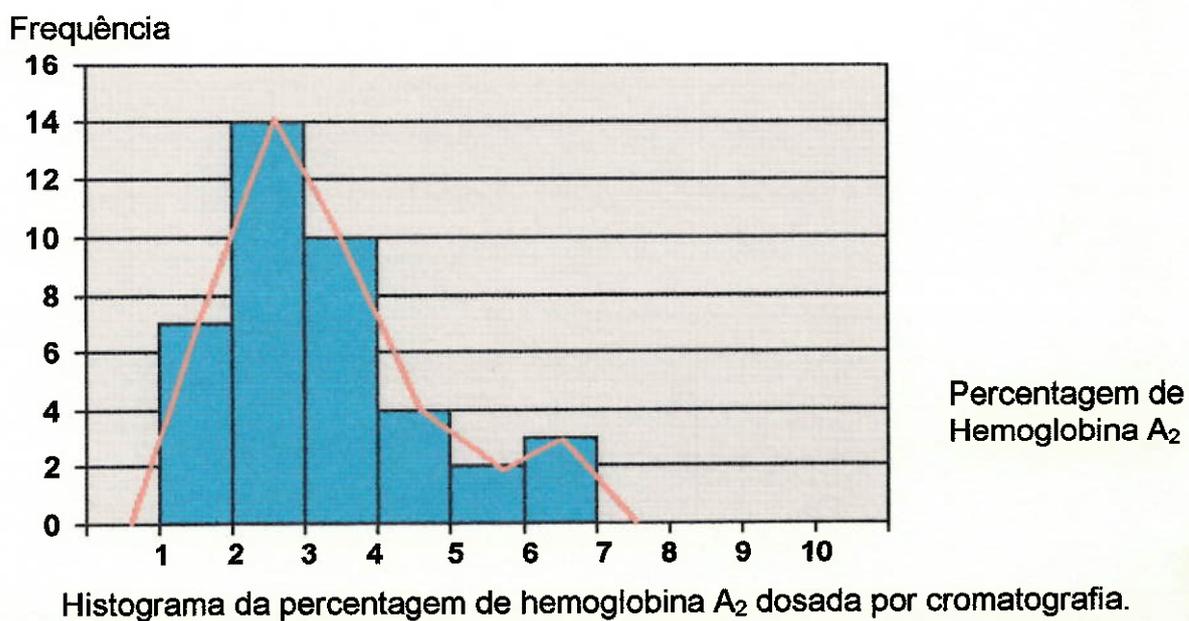
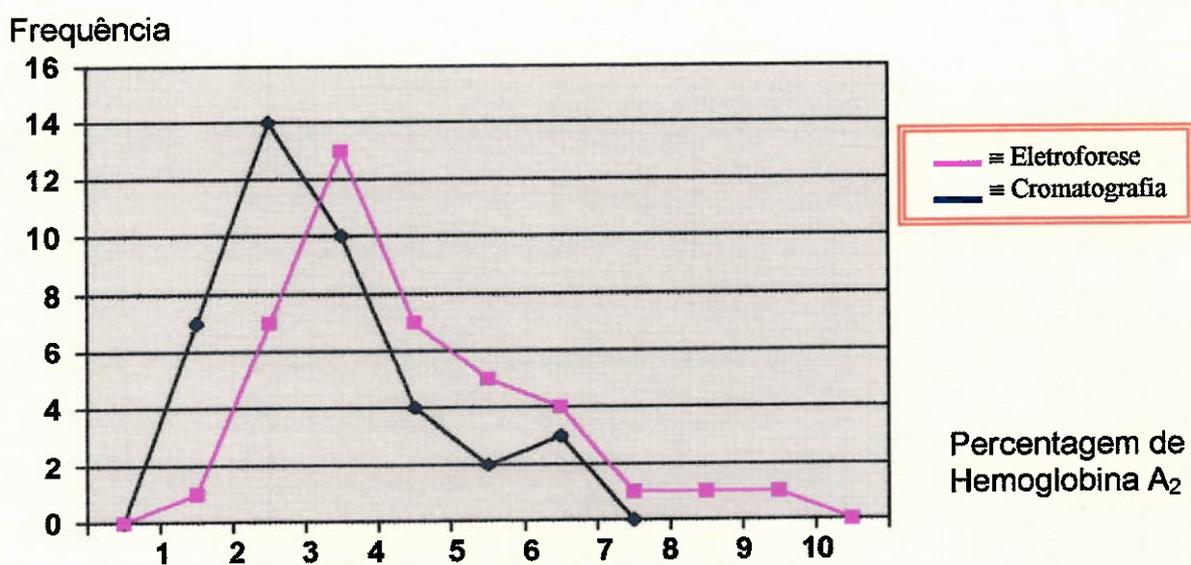


Figura 3



ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos um teste de duas médias para verificar se existe diferença estatisticamente significativa entre os resultados eletroforéticos e cromatográficos. Para tanto, consideramos como hipótese de nulidade (H_0), a média dos resultados eletroforéticos (μ_e) igual à média dos resultados cromatográficos (μ_c), em outras palavras, as diferenças observadas foram meramente devido ao acaso. E como hipótese alternativa (H_1), a média dos resultados eletroforéticos diferente da média dos resultados cromatográficos.

$$H_0 : \mu_e = \mu_c$$

$$H_1 : \mu_e \neq \mu_c.$$

O nível de significância (α) foi fixado em 5%, que tem como região crítica para um teste bilateral de hipóteses escores z superiores a 1,96 ($z > 1,96$) ou inferiores a -1,96 ($z < -1,96$), representando a região de rejeição de H_0 ^(27,31).

Para proceder um teste de duas médias entre duas amostras dependentes e com $n > 30$, o valor de z é dado por:

$$z = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{S^2}{n}}}$$

$\bar{d} \equiv$ Média da diferença entre os valores eletroforéticos e cromatográficos

$S^2 \equiv$ Variância da diferença

$n \equiv$ Número de amostras

A média da diferença ($\Sigma d/n$) entre a eletroforese e a cromatografia foi de 1,12 com variância S^2 de 1,6 e desvio padrão S de 1,26. Aplicando estes valores temos:

$$z = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{S^2}{n}}} = \frac{1,12}{\sqrt{\frac{1,6}{4n}}} = 5,6$$

O valor de z calculado é maior que o z crítico ($5,6 > 1,96$), encontrando-se na região de rejeição de H_0 , portanto as metodologias em questão apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Testando a hipótese de que a média eletroforética foi maior que a média cromatográfica teríamos:

$$H_0 : \mu_e = \mu_c$$

$$H_1 : \mu_e > \mu_c.$$

Neste caso, o valor de z crítico para um teste unilateral de hipóteses com α de 5% é de 1,64. Como z calculado é maior que z crítico, rejeitamos H_0 . Portanto os valores eletroforéticos foram estatisticamente maiores que os cromatográficos.

4 DISCUSSÃO

Observando os resultados eletroforéticos e cromatográficos, encontramos uma diferença substancial entre as duas dosagens. De fato, a média de HbA₂ eletroforética foi de 4,3, a média de HbA₂ cromatográfica foi de 3,2 e a média da diferença \bar{d} foi de 1,12.

A aplicação do teste de hipóteses confirma esta diferença observada, mostrando resultados eletroforéticos maiores. Caso o nível de significância fixado fosse de 1%, a conclusão do teste de hipóteses ainda seria a mesma, pois o valor de z calculado (5,6) seria maior que 2,58 (valor crítico de z para testes bilaterais com α de 1%), e maior que 2,33 (valor crítico de z para testes unilaterais com α de 1%). Considera-se, portanto, os resultados altamente significativos.

A análise do desvio padrão mostra que os resultados eletroforéticos variaram mais que os cromatográficos em torno da média, $4,3 \pm 1,7$ e $3,2 \pm 1,4$ respectivamente. Da mesma forma, a amplitude eletroforética também foi maior, o que se reflete no alargamento da base eletroforética no polígono de frequências superposto (Figura 3).

Observando o mesmo polígono, verificamos que a curva eletroforética está desviada para a direita em relação à cromatográfica, representando a superioridade dos valores eletroforéticos.

O coeficiente de variação ($\bar{S}/X.100$) cromatográfico foi maior que o eletroforético. Este achado pode indicar que as variações cromatográficas em torno da média, embora menores, são mais importantes que as eletroforéticas para fins de dosagem.

Segundo a literatura, os valores de referência da HbA₂ por eletroforese variam de 2,0 a 3,5, e por cromatografia da ISOLAB, de 1,5 a 3,0^(17,21). Estes

valores corroboram o resultado encontrado, ou seja, concentrações estatisticamente diferentes com média eletroforética superior.

As causas desta diferença em amostras desprovidas de hemoglobina variante podem ser várias. Seria razoável supor que a influência da HbF seria o fator determinante, já que na eletroforese apenas a banda HbA é separada, ou seja, a fração A₂ seria determinada apenas em função da HbA, enquanto que na cromatografia todas as frações remanescentes, inclusive a fetal, são eluídas da coluna após a separação da HbA₂. Entretanto, é possível refutar esta hipótese, já que a HbF migra próxima à HbA, e muitas vezes ela é separada e eluída juntamente com a HbA.

Seria mais provável que o próprio tipo de resina, a metodologia do fabricante, bem como vários fatores interferentes na eletroforese, tais como: temperatura, voltagem aplicada, quantidade do hemolisado, subjetivismo no fracionamento das bandas, entre outros, sejam responsáveis pelos resultados diferentes.

A literatura aponta a cromatografia como o método mais preciso e sensível^(3,4,9), além de melhor representar a percentagem de HbA₂ em relação as hemoglobinas totais.

Considerando os valores de referência, nossa concentração média de HbA₂ por ambas as técnicas foi relativamente elevada, o que se justifica pelo uso de amostras de pacientes que tinham indicação clínica para dosagem de HbA₂, muitos dos quais provavelmente β -talassêmicos.

5 CONCLUSÃO

Entre as duas principais metodologias para dosagem da hemoglobina A₂, eletroforese em acetato de celulose e microcromatografia, foi observada uma diferença altamente significativa entre os resultados das referidas técnicas, com valores eletroforéticos estatisticamente maiores que os cromatográficos.

SUMMARY

The β -thalassemia may be defined as a group of genetic disorders which result in defective β chain synthesis.

In the β -thalassemia major or Cooley's anemia, the hemoglobin F level is very high and the hemoglobin A_2 level could be elevated, while in the β -thalassemia minor, the hemoglobin A_2 level is higher than the normal and a small increase in amount of hemoglobin F may be found.

Variations in the level of the minor hemoglobin component, hemoglobin A_2 , are of use in the diagnosis of β -thalassemia.

The present study is a comparison between standard methods to quantify hemoglobin A_2 , cellulose acetate eletrophoresis and microcolumn chromatography.

Statistic analysis showed a difference between eletrophoretic and chromatography results, and the percent of eletrophoretic hemoglobin A_2 was significantly higher than the chromatography percent.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BOLLEKENS, J.A. et al. $\delta\beta$ thalassemia and persistence of fetal hemoglobin. Hematol. Oncol. Clin. North Am., v. 5, n. 3, p. 399-422, 1991.
02. CARR, J.M. Inherited hemolytic anemias. In: ROBINSON, S.H., REICH, P.R. Hematology: pathophysiologic basis for clinical practice. 3. ed. Boston: Little Brown, 1993. cap. 7, p. 145-175.
03. EFREMON, C.D. et al. Microchromatography of hemoglobins: a rapid method for the determination of hemoglobin A₂. Lab. Clin. Med., v. 83, n. 4, p. 657-664, 1974.
04. FAIRBANKS, V.F. et al. Biochemical aspects of hematology. In: BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R. Tietz textbook of clinical chemistry. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. cap. 37, p. 1974-2072.
05. FERRÉ, L.F. et al. Expresión fenotípica de la β -talasemia heterozigota. Sangre, v. 39, n. 5, p. 397-400, 1994.
06. FESSAS, P. et al. The talassemias. Clin. Haematol., v. 3, n. 2, p. 441-435, 1974.
07. GONZALES, A. et al. Quadro clínico e hematológico da S/ β^0 talassemia: comparação com anemia falciforme. Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter., v. 7, n. 135, p. 205, 1985.
08. JANDL, J.H. Blood: textbook of hematology. 2. ed. Boston: Little Brown, 1996. cap. 2: Molecular genetics, p. 71-134.

09. KIM, H.C. et al. Separation of hemoglobins. In: BEUTLER, E., LICHTMAN, M.A., COLLER, B.S., KIPPS, T.J. Williams hematology. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1995. cap. L10, p. L35-L42.
10. LORENZI, T.F. Manual de hematologia: propedêutica e clínica. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. cap. 4: Anemias, p. 217-326.
11. LUKENS, J.N. The thalassemias and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis. In: LEE, G.R., BITHELL, T.C., FOERSTER, J., ATHENS, J.W., LUKENS, J.N. Wintrobe's clinical hematology. 9. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. v. 1, cap. 39, p. 1102-1145.
12. MOLINA, M.A. et al. Frecuencia de las alteraciones moleculares de la β -talasemia heterocigota en el sur de España y su relación con fenotipo hematológico. Sangre. v. 39, n. 4, p. 283-286, 1994.
13. MONTEIRO, A.L.C. et al. Dosagem de hemoglobina A_2 por cromatografia em microcoluna de DEAE-celulose. Rev. Inst. Est. Hematol. Arthur de Siqueira Cavalcanti, v. 6, n. 1/2, p. 5-8, 1989.
14. MOREIRA, H.W. Diagnóstico molecular das talassemias do tipo beta por amplificação gênica (PCR) e eletroforese em gradientes desnaturantes (DGGE). NewsLab, n. 15, p. 85-92, 1996.
15. NAOUM, P.C. et al. Evidências das dificuldades no diagnóstico das hemoglobinopatias obtidas pelo centro de referência de hemoglobinas. Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter., v. 9, n. 146, p. 202-206, 1987.
16. NAOUM, P.C. et al. Hemoglobinopatias no Brasil. Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter., v. 8, n. 141, p. 180-188, 1986.

17. NAOUM, P.C. Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Sarvier, 1997.
18. NIENHUIS, A.E. As talassemias. In: WYNGAARDEN, J.B., SMITH, L.H., BENNET, J.C. Tratado de medicina interna. 19. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, v. 1, pt. 12, p. 901-907.
19. PEREIRA, J.M. et al. Dosagem de hemoglobina A₂ por cromatografia em DEAE-SEPHADEX. Rev. Bras. Anal. Clin., v. 8, n. 3, p. 9-12, 1976.
20. PIERA, J.J. et al. Valores hematimétricos en la $\delta\beta$ talasemia menor: especial importancia de la amplitud de distribución eritrocitária en comparación com la β -talasemia y la ferropenia. Sangre, v. 35, n. 2, p. 134-136, 1990.
21. QUIK-SEP. Hemoglobin A₂ test system: for quantitation of HbA₂. Akron, Ohio: ISOLAB, 1995.
22. RAMALHO, A.S. et al. O diagnóstico pré-natal das hemoglobinopatias. Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter., v. 8, n. 141, p. 177-179, 1986.
23. RANNEY, H.M. et al. Structure and function of hemoglobin. In: BEUTLER, E., LICHTMAN, M.A., COLLER, B.S., KIPPS, T.J. Williams hematology. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1995, cap. 38, p. 417-425.
24. RAVEL, R. Laboratório clínico: aplicações dos dados laboratoriais. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. cap. 5: Anemia por depleção, p. 36-49.
25. REDONDO, J.M.G. et al. Estudio del haplotipo en tres pacientes homocigotos para la beta talasemia. Sangre, v. 32, n. 4, p. 435-482, 1987.
26. SONATI, M.F. As bases moleculares das síndromes talassêmicas. Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter., v. 13, n. 156, p. 22, 1991.

27. SPIEGEL, M.R. Estatística. 2. ed. Rio de Janeiro: Ao livro técnico, 1970. cap. 10: Teoria da decisão estatística e testes de hipóteses e significância, p. 276-309.
28. TELEN, M.J. The mature erythrocyte. In: LEE, G.R., BITHEEL, T.C., FOERSTER, J., ATHENS, J.W., LUKENS, J.N. Wintrobe's clinical hematology. 9. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. v. 1, cap. 5, p. 101-103.
29. TODD, D. Diagnosis of haemolytic states. Clin. Haematol., v. 4, n. 1, p. 63-81, 1975.
30. VERA, P.M. et al. La beta y beta-delta talasemias heterocigotas en la provincia de Alicante. Sangre, v. 33, n. 6, p. 479-482, 1988.
31. VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. 2. ed. Rio de Janeiro: Campus, 1981. cap. II: noções sobre teste de hipóteses, p. 181-190.
32. VILLEGAS, A. et al. Síndromes talasemicas en España: estudios moleculares. Sangre, v. 33, n. 6, p. 479-482, 1988.