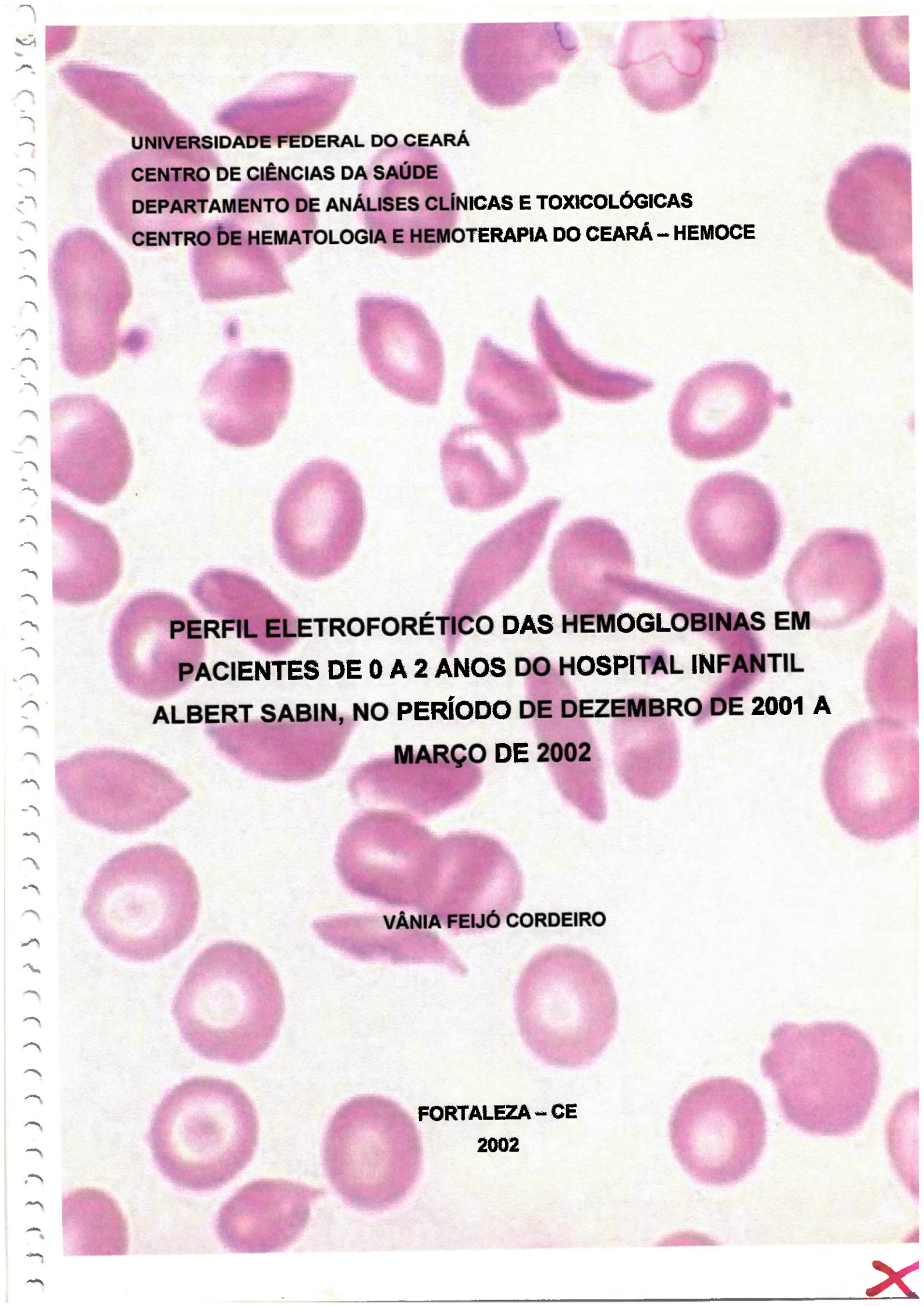


The background of the entire page is a microscopic image of numerous red blood cells (erythrocytes). These cells are stained a deep pink or magenta color and are distributed across the white background. Some cells are in sharp focus, showing their characteristic biconcave disc shape with a lighter center. Others are slightly out of focus, creating a sense of depth. The overall effect is a dense field of these cellular structures.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ – HEMOCE**

**PERFIL ELETROFORÉTICO DAS HEMOGLOBINAS EM
PACIENTES DE 0 A 2 ANOS DO HOSPITAL INFANTIL
ALBERT SABIN, NO PERÍODO DE DEZEMBRO DE 2001 A
MARÇO DE 2002**

VÂNIA FEIJÓ CORDEIRO

**FORTALEZA – CE
2002**

A red 'X' mark is located in the bottom right corner of the page, outside the main text area.

VÂNIA FEIJÓ CORDEIRO

PERFIL ELETROFORÉTICO DAS HEMOGLOBINAS EM PACIENTES DE 0 A 2 ANOS DO HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN, NO PERÍODO DE DEZEMBRO DE 2001 A MARÇO DE 2002

Monografia apresentada como requisito final do XVI Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia

Orientadores:

Dra. Francisca Vânia Barreto de A. F. Gomes

Dr. Jesamar Correia Matos

Co-Orientadoras:

Dra. Rita Marinei Coelho

Dra. Fátima Marques

FORTALEZA – CE

2002

PERFIL ELETROFORÉTICO DAS HEMOGLOBINAS EM PACIENTES DE 0 A 2 ANOS DO HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN, NO PERÍODO DE DEZEMBRO DE 2001 A MARÇO DE 2002

Vânia Feijó Cordeiro

Monografia apresentada como requisito final do XVI Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia

Data: 30/04/2002

Orientadores:

Dra. Francisca Vânia Barreto de A. F. Gomes

Dr. Jesamar Correia Matos

Dedicatória

**Dedico este trabalho ao meu Pai, a
quem eu devo a minha profissão e
tudo o que sou.
Saudades...**

AGRADECIMENTOS

- **A Deus;**
- **A minha mãe Lourdes, por ter entendido a minha ausência;**
- **Ao meu marido Walber, pela colaboração efetiva na realização deste trabalho;**
- **Aos meus filhos Vinicius e Elicius por suportarem minhas exigências;**
- **A Dra. Francisca Vânia Barreto, pelo incentivo e inestimável colaboração no exercício deste trabalho;**
- **A Dra. Alana, a atenção e o carinho que dispensa aos alunos deste curso;**
- **Aos amigos João Batista e Janice Lustosa pela ajuda que deram substituindo-me em meu trabalho;**
- **A Rita Marinei e Fátima Marques pela orientação prática e transmissão de conhecimentos;**
- **A Cristina, Lucimar e Gervásia pelo empenho nas coletas de sangue;**
- **Aos funcionários do HEMOCE;**
- **Aos funcionários do Laboratório do HIAS.**

“A mente que se abre a uma nova idéia nunca volta ao tamanho original.” (Albert Einstein)

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	12
2. CASUÍSTICA E MÉTODOS	18
3. RESULTADOS	28
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÃO	40
6. BIBLIOGRAFIA	41

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de detectar a incidência de hemoglobinas anormais em pacientes atendidos no ambulatório geral de Pediatria do Hospital Infantil Albert Sabin, em Fortaleza – CE, de forma aleatória no período de dezembro de 2001 a março de 2002, bem como, traçar o perfil eletroforético destas hemoglobinas e utilizar dados obtidos para hipótese de diagnósticos e orientação do clínico para suspeição de doenças. Um total de 337 amostras de sangue de pacientes com idade variando de 0 a 2 anos de ambos os sexos, foram submetidas a eletroforese de hemoglobinas em ágar-amido; eletroforese qualitativa em acetato de celulose pH 8,0-9,0; teste de solubilidade de Itano e eletroforese ácida em ágar-fosfato, pH 6,2.

Das 337 amostras estudadas 14 (4,15%) apresentaram fenótipos hemoglobínicos anormais, sendo 12 (3,56%) diagnosticadas como HbAS; 01 (0,30%) com diagnóstico de HbSS; 01 (0,30%) com diagnóstico de HbAC. Os resultados encontrados são compatíveis com os da literatura, onde as incidências estão coerentes com os resultados de outros estudos.

SUMMARY

This study Albert Sabin was carried through with the objective to detect the incidence of abnormal hemoglobins in patients taken care of in the general clinic of Pediatrics of the Infantile Hospital, in Fortaleza – CE, of random form in the period of December of 2001 the March of 2002, as well as, to trace the eletrophoretic profile of these hemoglobins and to use given gotten for diagnostic hypothesis and prompt of the physician for suspicion of illnesses.

A total of 337 samples of blood of patients with age varying of 0 the 2 years of both the sexes, had been submitted electrophoreses of hemoglobins in agar-starch; electrophoreses qualitative in cellulose acetate pH 8.0-9.0; test of solubility of Itano and acid electrophoreses in agar-phosphate, pH 6.2. Of 337 studied samples 14 (4.15%) they had presented abnormal hemoglobins phenotypes, being 12 (3.56%) diagnosed as HbAS; 01 (0.30%) with diagnosis of HbSS; 01 (0.30%) with diagnosis of HbAC. The joined results are compatible with the ones of literature, where the incidences are coherent with the results of other studies.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01 – Ficha de identificação aplicada a todos os pacientes	18
Figura 02 – Coleta de sangue por punção venosa com uso de EDTA	19
Figura 03 – Método hemolisado rápido (aplicação da saponina)	20
Figura 04 – Método hemolisado rápido (aplicação da amostra)	21
Figura 05 – Eletroforese de hemoglobinas em ágar-amido (aplicação)	23
Figura 06 – Cubas eletroforéticas e fonte geradora de corrente	23
Figura 07 – Eletroforese de hemoglobinas em gel ágar-amido (alcalina)	24
Figura 08 – Interpretação do Teste de solubilidade (Itano)	25
Figura 09 – Eletroforese em acetato de celulose pH 8,6 (aplicação)	26
Figura 10 – Eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose pH 8,6. (1) HbAS; (2) HbAC e (3) HbSS	26
Figura 11 – Eletroforese ácida em ágar-fosfato, pH 6,2 (aplicação)	27
Figura 12 – Eletroforese de hemoglobinas em ágar-ácido, pH 6,2	27

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 01 – Distribuição dos pacientes segundo os fenótipos hemoglobínicos observados nas amostras analisadas	28
Tabela 02 – Prevalência global das hemoglobinas normais e anormais nos pacientes do HIAS	29
Tabela 03 – Distribuição dos pacientes segundo faixa etária	30
Tabela 04 – Distribuição dos pacientes por sexo	31
Tabela 05 – Casos estudados e sua distribuição segundo a característica racial.	32
Tabela 06 – Distribuição dos pacientes segundo a classificação, por faixa etária	33
Tabela 07 – Distribuição dos pacientes segundo os tipos de hemoglobinas por sexo	34
Tabela 08 – Distribuição dos pacientes segundo os tipos de hemoglobinas por cor	35

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 01 – Fenótipos observados nas amostras analisadas	28
Gráfico 02 – Prevalência das hemoglobinas em relação ao universo pesquisado	29
Gráfico 03 – Distribuição dos pacientes segundo a faixa etária	30
Gráfico 04 – Distribuição dos pacientes por sexo	31
Gráfico 05 – Distribuição dos pacientes segundo característica racial	32
Gráfico 06 – Distribuição dos pacientes segundo as hemoglobinas normais por faixa etária	33
Gráfico 07 – Distribuição dos pacientes segundo as hemoglobinas anormais por faixa etária	33
Gráfico 08 – Distribuição dos pacientes segundo os tipos de hemoglobinopatias por sexo	34
Gráfico 09 – Distribuição dos pacientes segundo o tipo de hemoglobinas normais por cor	35
Gráfico 10 – Distribuição dos pacientes segundo o tipo de hemoglobinas anormais por cor	35

1. INTRODUÇÃO

A hemoglobina é uma proteína globular, tetramérica de peso molecular (PM) igual a 65.000. Estruturalmente, é formada por quatro cadeias polipeptídicas que interagem na ligação de oxigênio. Duas delas são constituídas de 141 aminoácidos cada e são chamadas tipo alfa (α) e as outras duas possuem 146 aminoácidos cada e são denominadas tipo beta (β). Cada cadeia polipeptídica, denominada globina, está ligada a um grupo prostético, tetrapirrólico, chamado heme e que contém o átomo de ferro no estado ferroso e que dá a cor vermelha à hemoglobina. ⁽¹¹⁾

A principal função da hemoglobina é a de promover a absorção, o transporte e a liberação do oxigênio aos tecidos. ⁽¹⁵⁾

Ao final da gestação, a HbA aumenta, chegando a ser, quando do nascimento, de 20-30%, enquanto a HbF ou hemoglobina fetal ainda representa 70-80% da hemoglobina do indivíduo. No quinto mês de vida a HbA atinge níveis semelhantes aos do adulto, e a HbF passa a representar um porcentagem mínima. ⁽¹⁵⁾

No adulto as hemoglobinas humanas normais são compostas por três frações protéicas denominadas por HbA₁, HbA₂ e Hb fetal; cada uma dessas com concentrações bem definidas (HbA₁ = 96 a 98%; HbA₂ = 2,5 a 3,5%; Hb fetal = 0 a 1%). ⁽²⁴⁾

As cadeias de polipeptídeos que se denominam α (alfa) podem ser do tipo zeta (3), observado somente no período embrionário ou do tipo alfa propriamente dito existente no período embrionário e constituinte das hemoglobinas após o nascimento do indivíduo normal. As cadeias polipeptídicas que se denominam não alfa podem ser do tipo beta, gama, delta e epsilon. ⁽²⁸⁾

Um indivíduo com hemoglobinas normais é classificado como sendo portador de hemoglobina A (HbA). ⁽²³⁾

A hemoglobina A é o tipo predominante entre as hemoglobinas normais. ⁽²¹⁾

As hemoglobinas anormais constituem a base para a classificação das hemoglobinopatias, grupo de anormalidades hereditárias em que a produção da hemoglobina normal é suprimida e substituída, parcial ou totalmente, pela formação de uma ou mais das muitas variantes hemoglobínicas. ⁽¹⁴⁾

1.1 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias, também conhecidas como distúrbios hereditários da hemoglobina humana, são doenças geneticamente determinadas e apresentam morbidade significativa em todo o mundo. Milhões de pessoas trazem em seu patrimônio genético, hemoglobinas anormais em várias combinações com conseqüências que variam das quase imperceptíveis às letais. Dessa forma, as anemias hereditárias compreendem um grupo de condições de considerável complexidade.

O Brasil se caracteriza por significativa mistura racial onde o processo de colonização teve grande influência na dispersão dos genes anormais, principalmente talassemias e falcemias. Assim, a distribuição das hemoglobinas anormais, provenientes de formas variantes e talassemias, está relacionada com as etnias que compõem nossa população. Dentre as hemoglobinas variantes as mais freqüentes na população brasileira são a hemoglobina S (HbS) e C (HbC), ambas de origem africana, mostrando a intensa participação do negro na composição populacional brasileira. As talassemias são mais freqüentes em regiões que tiveram maior participação da colonização italiana. Outras variantes raras como as hemoglobinas D, J, I, N, G são encontradas em diferentes localidades. ⁽²²⁾

As alterações genéticas das hemoglobinas humanas podem ser manifestadas qualitativamente e quantitativamente.

As variações qualitativas são causadas por anormalidade dos genes estruturais responsáveis pela elaboração da seqüência de aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas das hemoglobinas. Desta forma, mutações nesses genes podem

promover a troca de um aminoácido por outro, com características diferentes ao do original podendo provocar lesões pouco ou muito extensas na molécula, e dependendo do local em que ocorre a mutação pode, inclusive, alterar o seu desempenho fisiológico. Por exemplo: HbS (Glu ► Val), HbC (Glu ► Lys), etc.

As alterações quantitativas refletem no desequilíbrio das concentrações das hemoglobinas normais A₁, A₂ e Fetal. As variações dos níveis quantitativos dessas hemoglobinas decorrem de mutações nos genes reguladores para esses três tipos de hemoglobinas. Em consequência, a diminuição da síntese de cadeias alfa ou de cadeias beta dão origem, respectivamente, as alfa talassemias e as beta talassemias.⁽²⁵⁾

1.1.1 Anemia Falciforme

A anemia falciforme constitui uma causa significativa de morbidade e mortalidade entre indivíduos negros.⁽¹²⁾

A causa da alteração hemoglobínica é a substituição do ácido glutâmico por uma valina na posição 6 do segmento A da cadeia polipeptídica β .⁽¹⁵⁾

Essa é uma doença genética em que o heterozigoto também chamado de portador do traço falciforme apresenta apenas um gene mutante. Para a produção de cadeia beta têm-se dois genes Beta (Beta/Beta). Nesse caso o genótipo é constituído de um gene mutante e de outro normal (Beta S/Beta). O homozigoto para a anemia falciforme apresenta dois genes mutantes (Beta S/Beta S). Essa é uma herança autossômica recessiva; a doença somente se expressa quando dois genes mutantes se encontram e afeta ambos os sexos.

Dados com base na prevalência permitem estimar a existência de 2 milhões de portadores do gene do Hb"S"; mais de 8.000 afetados com a forma homozigótica (Hb"S"); e outro tanto de afetados com outras formas de doenças falciformes (DF) como Hb"SC", Hb"SD", "Sb" talassemia etc. Estima-se o nascimento de 700 a 1.000 casos novos anuais de DF no país.⁽²⁾

A troca de aminoácidos que caracteriza essa mutação faz com que haja uma alteração da carga elétrica de hemoglobina, o que em baixas tensões de oxigênio faz com que a hemoglobina se polimerize. Essa polimerização ocorre no sentido longitudinal, formando os tactóides – polímeros de hemoglobina que fazem com que a forma discóide do eritrócito normal assuma uma forma de foice e também acarreta a perda da maleabilidade, tornando-o rígido. Isso faz com que ocorram nos tecidos e órgãos oclusões vasculares, característica comum desses pacientes. Essas oclusões acarretam crises de intensas dores ósseas, torácicas e abdominais e afetam o crescimento, o sistema geniturinário, o sistema cardiopulmonar, o sistema nervoso, a visão, anormalidades ósseas, esplenomegalia, hepatomegalia, infecções e úlceras de perna. ⁽³⁰⁾

1.1.2 Hemoglobinopatia C

A HbC é o segundo tipo mais freqüente de hemoglobinas anormais no Brasil. Sua prevalência média é 0,6% em nossa população, no estado de heterozigose, ou HbAC. ⁽²⁰⁾

A HbC corresponde à substituição do ácido glutâmico na posição 6 da cadeia β pela lisina. ⁽¹⁵⁾

A consequência dessa mutação é a cristalização da hemoglobina na parte central do eritrócito, caracterizando a célula alvo, codócitos. ⁽³²⁾

A hemoglobina C é menos solúvel que a hemoglobina A em tampão fosfato diluído e mesmo dentro dos eritrócitos e isto lhe permite, sob condições especiais de secagem parcial, observar a formação de cristais dentro dos eritrócitos. ⁽²¹⁾

Pode ocorrer uma associação da hemoglobinopatia S com a C. Pais portadores de hemoglobinopatias S e C podem ter descendentes SC. Essa doença apresenta manifestações clínicas semelhantes a anemia falciforme só que bem menos severa. ⁽³²⁾

1.1.3 Hemoglobinopatia D

A hemoglobina D tem mobilidade eletroforética semelhante à da hemoglobina S, mas não sofre o fenômeno da falcização. Essa ocorre quando se associa à HbS (forma heterozigótica HbSD). Há numerosas variantes que recebem o nome do local onde foram descritas, como, por exemplo, a HbD-Punjab, da Índia. A forma HbDD causa anemia e esplenomegalia discretas. ⁽¹⁵⁾

A interação da HbS com a HbD foi descrita pela primeira vez por Itano, em 1951, em uma família caucasiana americana. ⁽¹³⁾

1.2 Eletroforese de Hemoglobinas

Considerando que todas essas hemoglobinopatias determinam importantes manifestações clínicas, cabe ressaltar a importância do diagnóstico laboratorial precoce destas patologias, evitando as consequências deletérias da doença.

A eletroforese de hemoglobina é provavelmente o método laboratorial mais útil para separação e medição de hemoglobinas normais e algumas anormais. Por meio da eletroforese, são separados diferentes tipos de Hb formando uma série de bandas distintamente pigmentadas em um meio (acetato de celulose ou gel de amido). Os resultados são então comparados com aqueles de uma amostra normal.

A eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino permite identificar as hemoglobinas: A, F, S/G/D, C/E/O-Arab, H e outras variantes menos comuns.

A eletroforese em pH ácido geralmente é um estudo complementar depois da corrida eletroforética em fita alcalina. Há diferenças nas mobilidades das bandas. Distinguem o S do D, C da E, C Harlem e O-Arab.

A eletroforese de hemoglobina permite a identificação de diversos tipos de hemoglobina, que podem identificar uma doença hemolítica. Por exemplo, se HbA₂ for de 4 a 5,8% da hemoglobina total, então existe a implicação da talassemia menor. Se

HbA₂ estiver abaixo de 2%, isso sugere uma doença de hemoglobina H. A talassemia menor é também sugerida se HbF for 2 a 5% da hemoglobina total, e talassemia maior se HbF compreender 10 a 90%. Se o total da hemoglobina for HbF, isso sugere persistência hereditária homozigota de hemoglobina fetal. Se HbF compreender 15% do total de hemoglobina, isso sugere HbS homozigota.

Outras doenças sugeridas por variações de hemoglobina incluem anemia falciforme (80% de HbS homozigota) e doenças de HbC (90 a 98% de HbC homozigota).

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram analisadas no período de dezembro de 2001 a março de 2002, um total de 337 amostras de sangue de pacientes com idade de 0 a 2 anos, de ambos os sexos atendidos no Laboratório do Hospital Infantil Albert Sabin, que é considerado de referência em nosso estado.

Dados adicionais, como cor da pele, sexo, foram devidamente catalogados em fichas de identificação (figura 1).

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO	
Pesquisa de Hemoglobinas Anormais em Pacientes do Hospital Albert Sabin	
Nome do Paciente: _____	
Idade: _____	Sexo: _____ Cor da Pele: B ☐ NB ☐
Naturalidade: _____	Nacionalidade: _____
Endereço: _____	Nº _____
Bairro: _____	Cidade: _____ Estado: _____
Telefone: _____	
Doença Prévia: SIM ☐ NÃO ☐ Qual: _____	
_____ Autorização	

FIGURA 01 – Ficha de identificação aplicada a todos os pacientes

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa com o uso de anticoagulante (EDTA) (figura 2).



FIGURA 02 – Coleta de sangue por punção venosa com uso de EDTA.

Depois das amostras colhidas e devidamente identificadas, as mesmas foram posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Hemoglobina do HEMOCE, onde foram submetidas às análises laboratoriais específicas para a detecção e identificação das hemoglobinas anormais.

As metodologias empregadas para as análises foram: Testes Seletivos - eletroforese em gel de ágar-amido e teste de solubilidade (Itano)

Todas as amostras consideradas anormais ou suspeitas através dos testes seletivos de triagem e detecção de hemoglobinas anormais foram submetidas a nova eletroforese em acetato de celulose "cellogel", em tampão alcalino pH 8,6 de Tris EDTA Borato e eletroforese de diferenciação em ágar-fosfato pH 6,2 (Ácido).

2.1 Métodos

A. Preparação de hemolisados

Para que as amostras fossem submetidas a procedimentos eletroforéticos e bioquímicos para caracterizar as hemoglobinopatias, foi necessário lisar as células para obtenção da solução de hemoglobinas pelo método hemolisado rápido com saponina 1%.

- Hemolisado rápido (usado para eletroforese em pH alcalino):

Esse procedimento técnico é recomendável para estudo populacional, principalmente nas suspeitas de hemoglobinas instáveis e talassemia alfa.

Procedimento:

- em placa de Kline misturar um volume de 20µl de sangue com 2 gotas de reativo hemolisante (saponina 1%), Figuras 3 e 4.



FIGURA 3 – Método hemolisado rápido - (aplicação da saponina).



FIGURA 4 – Método hemolisado rápido – (aplicação da amostra).

- a homogeneização deve se processar até a hemólise completa da mistura.
- utilizar o hemolisado após 5 minutos.
- Solução de hemoglobina – com clorofórmio (usado para eletroforese em pH ácido)

A obtenção do hemolisado entre 10 e 15g/dl de hemoglobina tal qual o método descrito a seguir é importante para a dosagem de Hemoglobina Fetal, Hemoglobina A2 e Metahemoglobina.

Procedimento:

- centrifugar 2ml de sangue colhido com anticoagulante a 1500 RPM, durante cinco minutos.

- remover o plasma e lavar os eritrócitos 3 vezes com solução salina a 0,85%. Centrifugar e desprezar o sobrenadante.
- ao volume de eritrócitos lavados, adicionar um volume de clorofórmio idêntico ao do hemolisado formado. Agitar vigorosamente e centrifugar a 2000 RPM, por 15 minutos.
- a solução de hemoglobina sobrenadante (hemolisado), é retirada por meio de pipeta Pasteur e transferido para um frasco limpo com identificação da amostra. A concentração do hemolisado geralmente é variável entre 10 e 15g/dl.

B. Eletroforese em gel de ágar amido (pH alcalino)

O gel de ágar amido foi preparado com a mistura de 300mg de ágar-noble, 600mg de amido de milho (MAISENA®), 600mg de fécula de mandioca (ARROZINA®) em 40ml de solução de Tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,8. Após a agitação constante para dissolução da mistura, a mesma é levada ao fogo até a formação do gel. Rapidamente, com pipeta volumétrica distribui-se o conteúdo do recipiente sobre uma placa padronizada de 10 por 15cm e com 1mm de espessura, aplicando e deixando a película de gel em repouso, até seu completo resfriamento e solidificação. Então, todas as amostras em torno de 80 são aplicadas da mesma maneira na película de gel amido (figura 5).

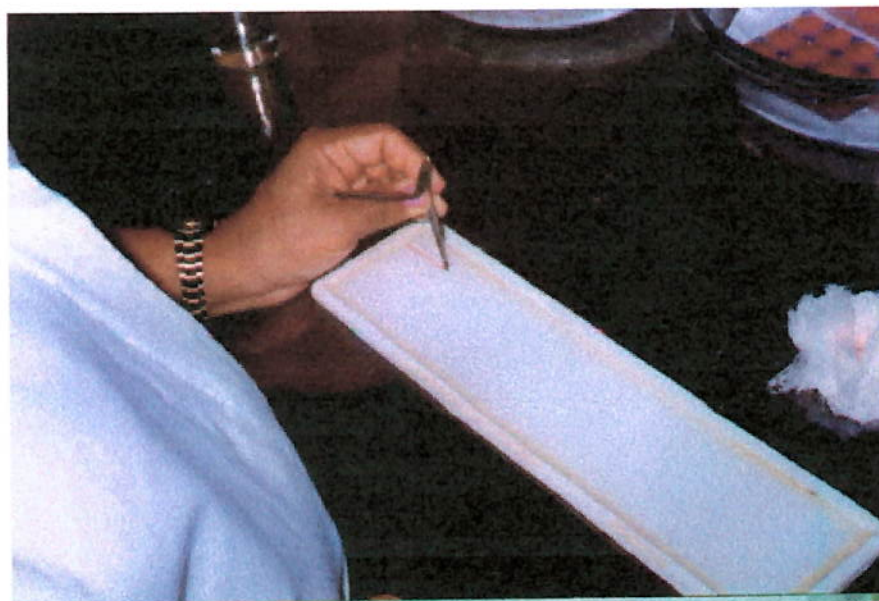


FIGURA 5 – Eletroforese de hemoglobinas em gel de ágar-amido (aplicação).

Utilizou-se para confrontação e análise das corridas eletroforéticas, padrões eletroforéticos já conhecidos como normais e anormais. Após as amostras já terem sido aplicadas, são levadas a uma cuba eletroforética (Figura 6). Através de uma fonte (Figura 6) aplica-se uma corrente elétrica de 300 volts durante 30 minutos, sendo a corrida eletroforética, realizada do pólo negativo para o positivo da cuba (Figura 7).

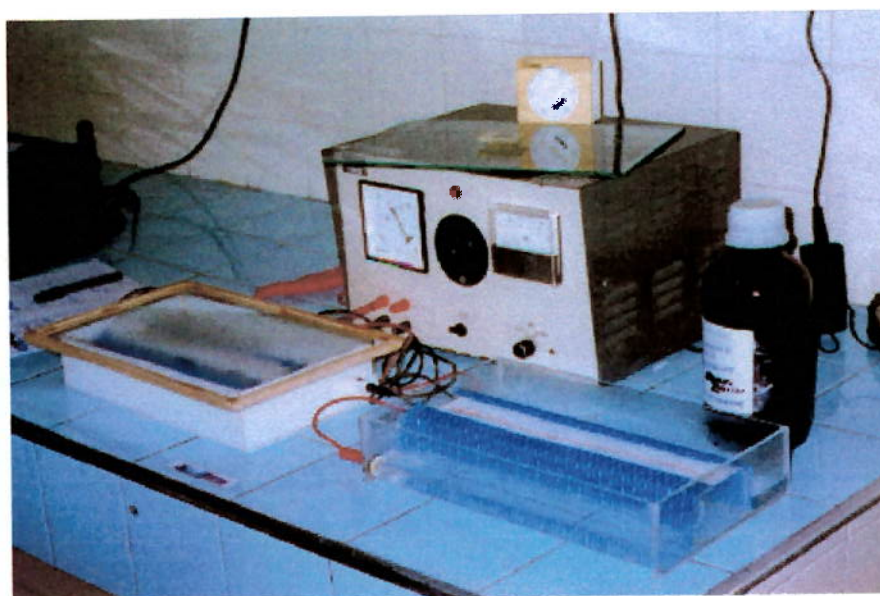


FIGURA 6 – Cubas eletroforéticas e fonte geradora de corrente

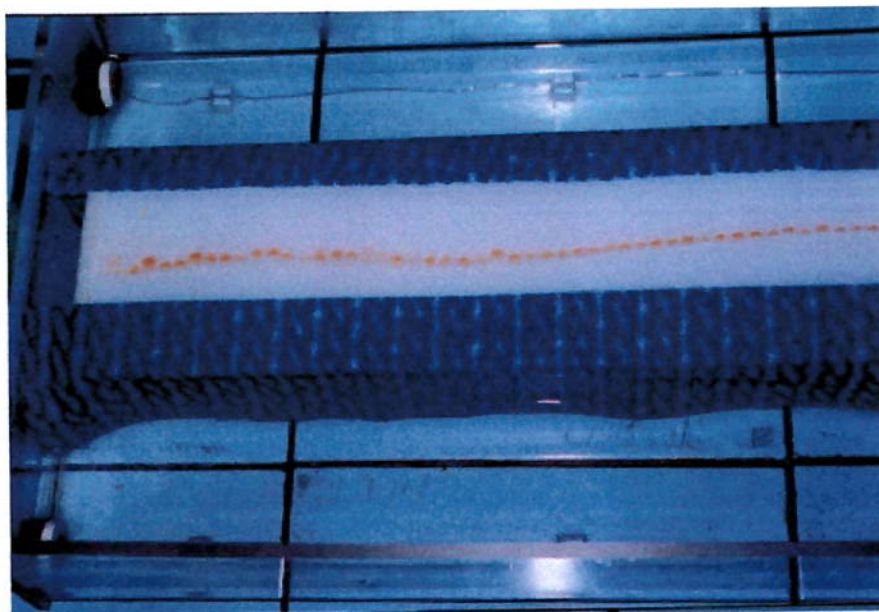


FIGURA 7 – Eletroforese de hemoglobinas em gel de ágar-amido (alcalina).

C. Teste de Solubilidade (Itano, 1955)

Esse teste é baseado na baixa solubilidade de HbS na sua forma reduzida, em comparação com HbA, HbD e Hb Fetal.

Reagentes:

a. Tampão Fosfato	pH 6,8.
KH_2PO_4	40.12g
Na_2HPO_4	70.47g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	5.00g

Dissolver em 200ml de água destilada em um frasco com capacidade para 250ml, e completar após dissolução até 250ml com água. Filtrar em papel Whatman nº 1 (triplo). Acrescentar 800mg de saponina.

Procedimento:

- tomar dois tubos de ensaio e marcar (controle = HbA) e P (paciente)

- pipetar 1ml de solução tamponada de saponina em cada tubo, e a seguir adicionar 0,01ml de sangue nos respectivos tubos. Homogeneizar por inversão e deixar em repouso por 5 minutos.

- colocar os tubos em frente a um papel branco com linhas negras horizontais. Observar a presença de turvação nos tubos.

Interpretação:

- negativo – (hemolisa) – solução transparente
- positivo – (resistente) – solução turva, indica a presença de hemoglobina S (Figura 8).

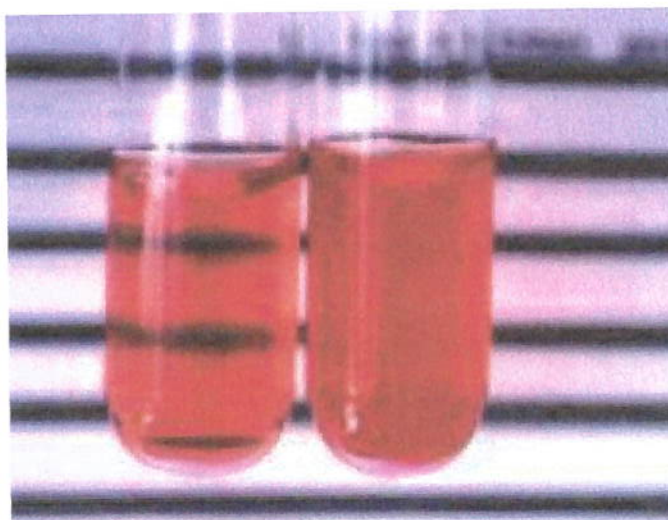


FIGURA 8 – Interpretação do teste de solubilidade (Itano).

D. Eletroforese qualitativa em acetato de celulose pH 8,0 – 9,0. (alcalina)

Este método qualifica e quantifica hemoglobinas normais e grande parte das anormais. As diferentes mobilidades encontradas em Hb anormais são originadas por alterações de cargas elétricas, causadas por substituições de aminoácidos de diferentes pl. Existem, entretanto, hemoglobinas anormais oriundas de mutações que não envolvem mudanças de cargas elétricas, portando-se em eletroforese com mobilidade idêntica à HbA. Nesse caso, para a caracterização dessas hemoglobinas utilizam-se outros processos eletroforéticos. A HbS apresenta mobilidade eletroforética diferente da

hemoglobina A1, se posicionando entre as hemoglobinas A1 e A2, porém com a mesma mobilidade da HbD. Figuras 9 e 10.



FIGURA 9 –Eletroforese em acetato de celulose pH 8,6 (aplicação)

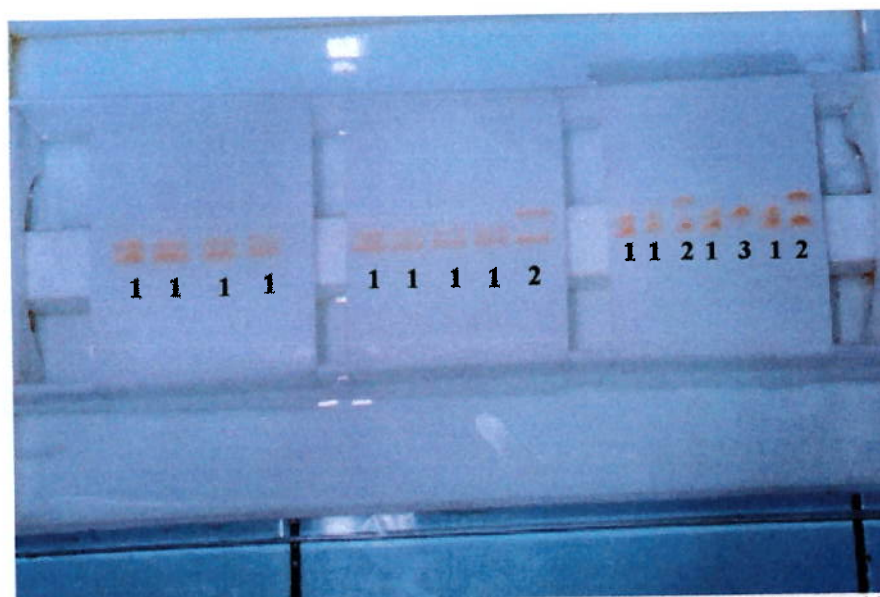


FIGURA 10 – Eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose pH 8,6. (1) Hb AS; (2) Hb AC e (3) Hb SS.

E. Eletroforese ácida em ágar-fosfato, pH 6,2 (Figuras 11 e 12).

O emprego da eletroforese em ágar ácido é específico para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas mais lentas que a hemoglobina A, quais sejam:

HbS da HbD e HbC da HbE, que migram em posições similares em eletroforese alcalinas.

Por meio dessa técnica, as HbS e C separam-se da HbA, enquanto que HbD e HbE migram na mesma posição de HbA. Esse método permite também a caracterização semi-quantitativa de hemoglobina Fetal.



FIGURA 11 – Eletroforese ácida em ágar-fosfato, pH 6,2 (aplicação).



FIGURA 12 – Eletroforese de hemoglobinas em ágar- ácido, pH 6,2 .

3- RESULTADOS

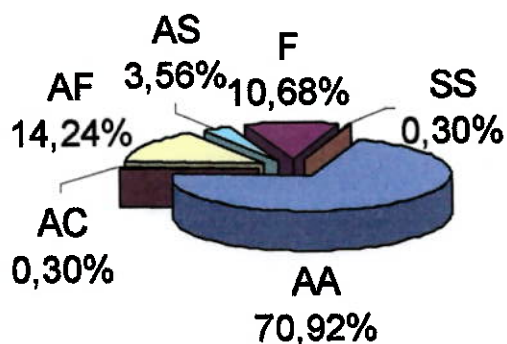
Foram analisadas 337 amostras de sangue de pacientes do HIAS. Conforme mostram a tabela e o gráfico 01 (abaixo), foram evidenciados 239 (70,92%) portadores de HbAA; 12 (3,56%) portadores de HbAS; 01 (0,30%) portador de HbSS; 01 (0,30%) portador de HbAC; 48 (12,24%) portadores de HbAF; 36 (10,68%) portadores de HbF.

A maioria dos pacientes apresentou hemoglobina do tipo AA que é considerada normal.

TABELA 01 – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO OS FENÓTIPOS HEMOGLOBÍNICOS OBSERVADOS NAS AMOSTRAS ANALISADAS

FENÓTIPO	NÚMERO DE PACIENTES	PERCENTUAL
AA	239	70,92%
AC	1	0,30%
AF	48	14,24%
AS	12	3,56%
F	36	10,68%
SS	1	0,30%
TOTAL	337	100,00%

GRÁFICO 01 - FENÓTIPOS OBSERVADOS NAS AMOSTRAS ANALISADAS

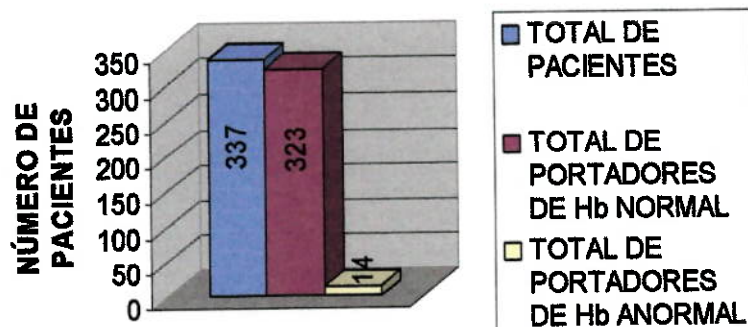


Na tabela e no gráfico 02 (abaixo), pôde-se verificar que, no total analisado, 14 pacientes apresentaram fenótipos hemoglobínicos anormais, o que equivale a uma incidência de 4,15%, enquanto que 323 pacientes apresentaram fenótipos hemoglobínicos normais equivalendo a uma incidência de 95,85%.

TABELA 02 - PREVALÊNCIA GLOBAL DAS HEMOGLOBINAS NORMAIS E ANORMAIS NOS PACIENTES DO HIAS

TOTAL DE PACIENTES	TOTAL DE PORTADORES DE Hb NORMAL	PORCENTAGEM DE Hb NORMAL	TOTAL DE PORTADORES DE Hb ANORMAL	PORCENTAGEM DE Hb ANORMAL
337	323	95,85%	14	4,15%

GRÁFICO 02 - PREVALÊNCIA DAS HEMOGLOBINAS EM RELAÇÃO AO UNIVERSO PESQUISADO

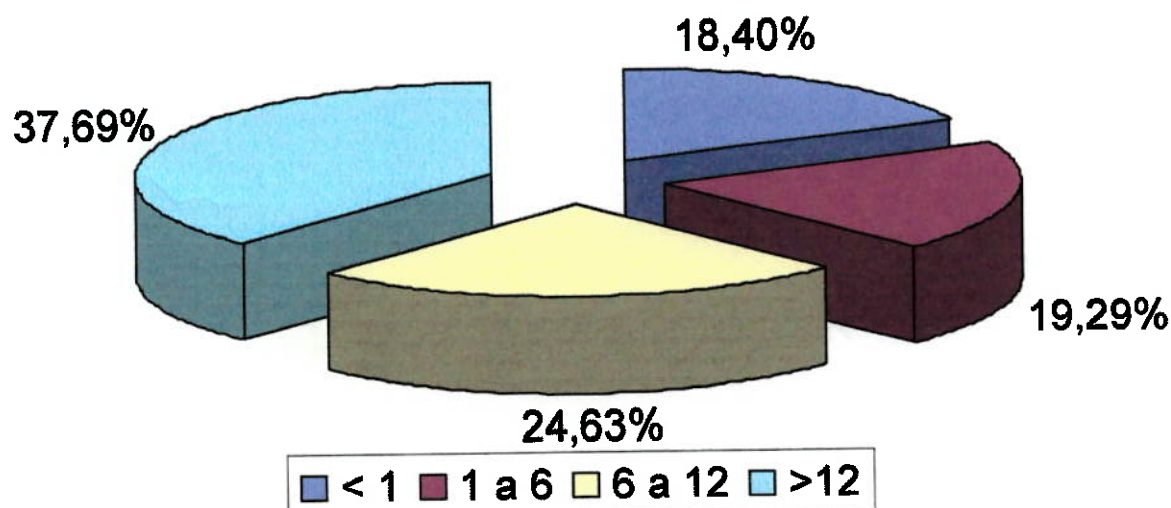


A faixa etária do paciente variou entre 0 e 2 anos de idade e conforme mostram a tabela e o gráfico 3 (abaixo) a maioria dos pacientes estudados tinha idade acima de 12 meses.

**TABELA 03 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES
SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA**

FAIXA ETÁRIA (MESES)	NÚMERO DE PACIENTES	PERCENTUAL %
< 1	62	18,40
1 a 6	65	19,29
6 a 12	83	24,63
>12	127	37,68
TOTAL	337	100,00

**GRÁFICO 03 - DISTRIBUIÇÃO DOS
PACIENTES SEGUNDO A FAIXA
ETÁRIA (em meses)**

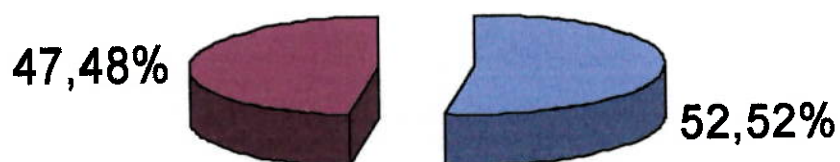


Na tabela e no gráfico 4, pôde-se notar que a freqüência de pacientes do sexo masculino foi ligeiramente maior que a freqüência do sexo feminino.

TABELA 04 – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES POR SEXO

SEXO	Nº DE PACIENTES	PORCENTAGEM %
MASCULINO	177	52,52
FEMININO	160	47,48
TOTAL	337	100

**GRÁFICO 04 - DISTRIBUIÇÃO DOS
PACIENTES POR SEXO**



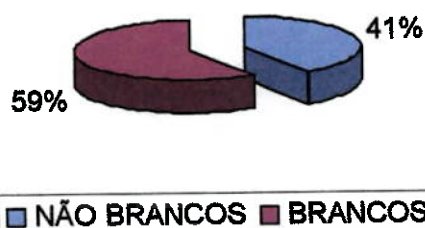
■ MASCULINO ■ FEMININO

Na tabela e no gráfico 5, foi analisado a distribuição dos pacientes segundo a característica racial e verificou-se que houve predominância de pacientes da cor branca na amostra estudada.

TABELA 05 - CASOS ESTUDADOS E SUA DISTRIBUIÇÃO SEGUNDO A CARACTERÍSTICA RACIAL

TIPO RACIAL	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAGEM
NÃO BRANCOS	138	40,95%
BRANCOS	199	59,05%
TOTAL	337	100,00%

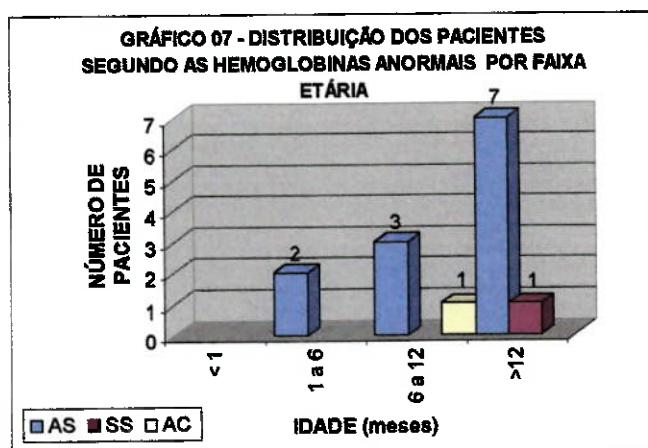
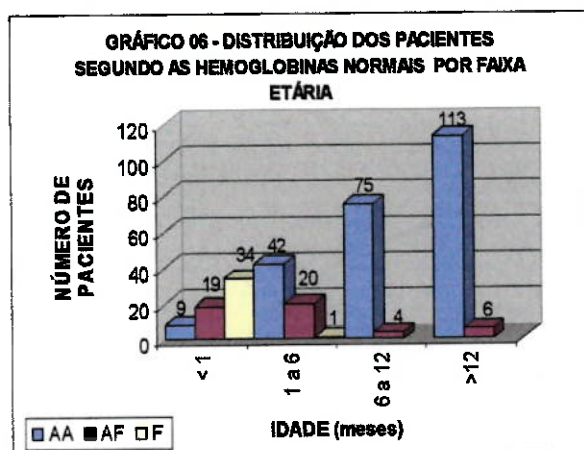
GRÁFICO 05 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO CARACTERÍSTICA RACIAL



É possível evidenciar na tabela 6 e nos gráficos 6 e 7 (abaixo), a distribuição dos pacientes segundo os tipos de hemoglobina e de acordo com a faixa etária. Pode-se observar que a HbAA (normal) e a HbAS (anormal) são mais frequentes nos pacientes com idade maior que 12 meses. Verifica-se também a incidência da HbF em pacientes com menos de 1 mês.

TABELA 06 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO, POR FAIXA ETÁRIA

IDADE (MÊSES)	TOTAL DE AMOSTRAS TESTADAS	HEMOGLOBINAS NORMAIS						HEMOGLOBINAS ANORMAIS					
		AA	%	AF	%	F	%	AS	%	SS	%	AC	%
< 1	62	9	2,67	19	5,64	34	10,09						
1 a 6	65	42	12,46	20	5,93	1	0,30	2	0,59				
6 a 12	83	75	22,26	4	1,19			3	0,89			1	0,30
>12	127	113	33,53	6	1,78			7	2,08	1	0,30		
TOTAL	337	239	70,92	49	14,54	35	10,39	12	3,56	1	0,30	1	0,30

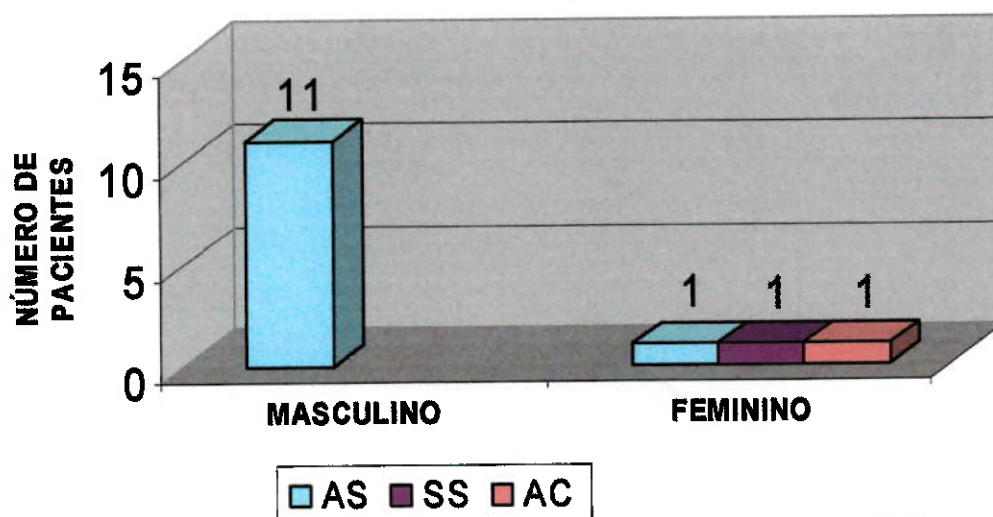


A tabela 7 e o gráfico 8 (abaixo) mostram distribuição dos pacientes segundo os tipos de hemoglobinas classificadas como normais e anormais e de acordo com o sexo, pôde-se constatar que a maioria dos pacientes apresentou hemoglobinas normais tanto do sexo masculino como do sexo feminino. No entanto, o sexo masculino apresentou um percentual muito mais elevado de hemoglobinas anormais que no sexo feminino.

TABELA 07 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO OS TIPOS DE HEMOGLOBINAS POR SEXO

SEXO	TOTAL DE AMOSTRAS TESTADAS	HEMOGLOBINAS NORMAIS						HEMOGLOBINAS ANORMAIS					
		AA	%	AF	%	F	%	AS	%	SS	%	AC	%
MASCULINO	177	124	36,80	22	6,53	20	5,93	11	3,26				
FEMININO	160	115	34,12	26	7,72	16	4,75	1	0,30	1	0,30	1	0,30
TOTAL	337	239	70,92	48	14,24	36	10,68	12	3,56	1	0,30	1	0,30

GRÁFICO 08 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO OS TIPOS DE HEMOGLOBINOPATIAS POR SEXO



A tabela 8 e os gráficos 9 e 10 (abaixo) mostram que a maioria dos pacientes estudados foram predominantemente brancos e que nestes, a HbAA e a HbSS foram mais freqüentes.

TABELA 08 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO OS TIPOS DE HEMOGLOBINAS POR COR

SEXO	TOTAL DE AMOSTRAS TESTADAS	HEMOGLOBINAS NORMAIS						HEMOGLOBINAS ANORMAIS					
		AA	%	AF	%	F	%	AS	%	SS	%	AC	%
NÃO BRANCOS	138	90	26,71	25	7,42	18	5,34		0,00		1,19	1	0,30
BRANCOS	199	149	44,21	23	6,82	18	5,34	8	2,37	1	0,30		
TOTAL	337	239	70,92	48	14,24	36	10,68	8	2,37	1	0,30	1	0,30

GRÁFICO 09 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO O TIPO DE HEMOGLOBINAS NORMAIS POR COR

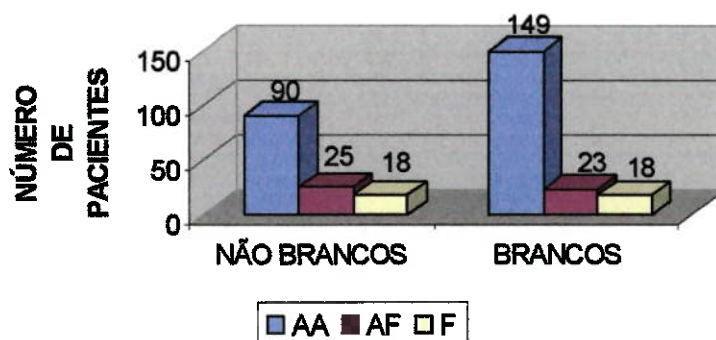
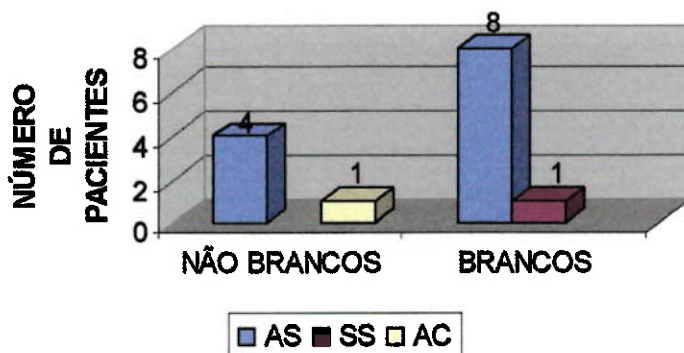


GRÁFICO 10 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO O TIPO DE HEMOGLOBINAS ANORMAIS POR COR



4. DISCUSSÃO

A população brasileira caracteriza-se por apresentar grande heterogeneidade genética, derivada da contribuição dos seus grupos raciais formadores, por si também já muito diversificados, e dos diferentes graus com que eles se inter cruzam nas várias regiões do país (NAOUM, 1982).

A miscigenação da população brasileira é resultante das imigrações que ocorreram no período da colonização compreendido entre os séculos XVI e XIX, nos quais o Brasil recebeu milhões de imigrantes europeus e asiáticos. A frequência das anemias hereditárias reflete a diversidade de origens raciais e os diferentes graus de origens raciais e os diferentes graus de mistura entre brasileiros de cada região do país. As hemoglobinopatias, especialmente síndromes falcêmicas, hemoglobina C (HbC) e talassemias são comuns no Brasil com prevalências diferenciadas.

Atualmente, 250 milhões de pessoas, aproximadamente 4,5% da população mundial, são portadores de um gene defeituoso que determina anomalia da hemoglobina. A cada ano cerca de 300.000 lactentes nascem com um transtorno hemoglobínico maior (ANAIS NESTLÉ, 1999).

A literatura aponta que cerca de 5 a 6 milhões de brasileiros são portadores heterozigóticos de hemoglobinas anormais e, cerca de 10 a 12 mil brasileiros, são portadores das formas homozigóticas mais severas (TOLOI & PAZZIANOTO, 1990).

Sabe-se que a incidência da hemoglobina S é prevalente em indivíduos negróides, em especial naqueles oriundos do oeste africano. Altas frequências de hemoglobina C são observadas em indivíduos provenientes da África ocidental. Os diferentes tipos de talassemia beta são mais comuns entre povos cujos ancestrais apresentam origem mediterrânea, e as talassemias alfa, em povos asiáticos, mediterrâneos e negros africanos (MOREIRA, 1999).

A Organização Mundial de Saúde recomenda a implantação de programas para prevenção e controle de hemoglobinopatias na América Latina, especialmente no Brasil.

Segundo SCHMIDT, as hemoglobinopatias têm sido bastante estudadas no Brasil, quanto à distribuição e incidência em grupos raciais, mas não em nível de triagem em recém-nascidos.

No sentido de oferecer medidas profiláticas e informações às famílias sobre a condição presente é que, nos Estados Unidos da América, a partir de 1970, foram instituídas leis estaduais que tornam obrigatória a triagem, não só a recém-nascidos, mas também a pré-escolares, mulheres grávidas, casais em exames pré-nupciais, internos de instituições penais ou combinações desses grupos (PANTALEÃO, 1993).

No continente africano, só recentemente a triagem neonatal para hemoglobinas anormais teve início, apesar de já existirem dados de frequência e prevalência (PANTALEÃO, 1993).

A detecção de indivíduos portadores das formas imperceptíveis de hemoglobinopatias, os heterozigotos, são extremamente importantes para a saúde pública pois, além de representarem, fontes de novos heterozigotos, podem, através de casamentos entre portadores, originar indivíduos homozigotos e duplos heterozigotos como, por exemplo, os portadores de hemoglobina SC (HbSC) que manifestam uma forma clínica. Portanto torna-se indispensável que, os chamados "casais de risco", constituídos por dois heterozigotos, sejam orientados quanto ao seu risco genético, podendo assim, esses casais tomarem decisões conscientes e equilibradas a respeito da procriação bem como os cuidados necessários em relação a sua eventual prole (diagnóstico pré-natal dessas patologias, por exemplo).

As análises e estudos das hemoglobinas anormais têm sido restritos a centros médicos especializados e dirigidos a pacientes com suspeita clínica de serem portadores dessas patologias hereditárias. Soma-se a esses fatos, o alto custo de exames necessário para a realização de diagnósticos laboratoriais seguros dessas patologias (NAOUM et al., 1985). Entretanto segundo NAOUM, et al., (1985), com o

desenvolvimento da técnica seletiva por meio de eletroforese em gel ágar-amido, têm sido possível realizar estudos populacionais a um custo operacional acessível.

O presente trabalho nos permitiu a identificação de 14 (4,15%) pacientes com fenótipos hemoglobínicos anormais; a hemoglobina AS foi prevalente com um percentual de 3,56%; enquanto que as hemoglobinas SS e AC apresentaram um percentual de 0,30% cada uma delas. Resultados semelhantes foram encontrados em outros grupos populacionais em diversas regiões do Brasil.

Verificou-se que a maioria dos pacientes estudados foram predominantemente brancos e que nestes, a HbAA e a HbSS foram mais freqüentes.

Considerando-se as alterações de hemoglobinas serem de origem hereditárias, a intensa miscigenação, particularmente na região Nordeste, que se tem processado com o passar das décadas, proporcionou que o fenótipo S deixasse de ser característica restrita à população negróide sendo também encontrado entre a caucasóide (PANTALEÃO, 1993).

O Ceará, ao contrário de outras regiões, recebeu pequena influência da raça negra, em decorrência da própria estrutura da economia cearense na época de sua colonização. Entretanto, recebeu fortes influências das raças brancas e indígenas, devido aos colonizadores e às tribos indígenas nativas (TEIXEIRA, 2000)

No Ceará, SANTOS, M.M.S., 1987 realizou uma investigação de hemoglobinopatias em 260 crianças na faixa etária de 6 meses a 7 anos, provenientes das creches São Gabriel e Tia Júlia, situados em Fortaleza. A incidência de hemoglobinas anormais foi de 4,23%, sendo HbAS (3,46%) e HbAC (0,77%).

Podemos citar o estudo feito por BRAGA (1993), no Laboratório de patologia clínica do Hosp. Distrital Governador Gonzaga Mota – José Walter (Distrital V de Fortaleza – CE), onde foram detectados 2,7% de hemoglobinas anormais sendo HbAS (1,89%), HbAC (0,48%) e HbAD (0,32%) em pacientes na faixa etária de 1 dia de nascido a 87 anos.

Em uma amostragem de sangue de 1.850 indivíduos residentes em Natal, foram detectadas por Bezerra, T.M.M et. al. as seguintes hemoglobinas anormais: em 46 (2,48%) HbAS; em 03 (0,16%) HbSS; em 02 (0,11%) HbAC.

Brum, M.A.R. et al., analisaram 1.271 amostras de sangue, provenientes de pessoas aparentemente sadias da comunidade universitária, de crianças de três creches municipais e de escolares do primeiro grau na cidade de Campo Grande – MS. Foram detectadas dentre as hemoglobinas anormais 40 (3,15%) HbAS; 08 (0,63%) HbAC.

Foi verificada a prevalência de hemoglobinopatias em pacientes no Laboratório de Patologia Clínica da Fundação São Francisco Xavier no Hospital Márcio Cunha em 717 pacientes no período de janeiro de 1998 à março de 2000 e foram encontrados 165 (23,01%) de portadores de hemoglobinas anormais (FREIRE, N. et. al., 2000).

Mais recentemente MARTINS, V.S. (2001), demonstrou que das 400 amostras estudadas em pacientes com idade de 02 a 21 anos, 14 (3,5%) apresentaram fenótipos hemoglobínicos anormais, sendo 11 (2,80%) HbAS; 01 (0,30%) HbSS e 01 (0,30%) sugestivo de HbAC.

Diante dos resultados apresentados pela vasta literatura sobre o assunto, que se aproximam bem dos resultados apresentados neste trabalho, constata-se que a hemoglobina S foi a hemoglobina estrutural anormal mais observada dentre os anormais – confirmando ser a hemoglobinopatia hereditária mais frequentemente observada em nosso meio, corroborando dados anteriores publicados na literatura nacional.

5. CONCLUSÃO

Através da análise dos resultados apresentados pelo grupo populacional estudado conclui-se que:

1. A metodologia laboratorial proposta ofereceu subsídios para a correta avaliação das diferentes formas de hemoglobinas anormais.
2. Existe um percentual significativo de portadores de hemoglobina S, na amostra estudada.
3. Há uma maior prevalência de hemoglobinopatia AS entre os pacientes do sexo masculino.
4. Os resultados obtidos em nosso estudo indicam que as hemoglobinopatias em nosso meio não representam um problema de saúde pública dada à baixa incidência. Entretanto há necessidade de enfatizar a importância que as hemoglobinas anormais representam para a nossa população, justificando um estudo contínuo de detecção de hemoglobinopatias que possibilite um melhor conhecimento genético e bioquímico, além de permitir a identificação e conscientização dos portadores dessas características hereditárias.

6. BIBLIOGRAFIA

1. ARAÚJO, J.T.; RIBEIRO, V.S.; BODEMEIER, L. Aspectos de Laboratório da Anemia Drepanocítica, SP.
2. BANDEIRA, F.M.G.C. et al. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina "S" detectados através da triagem em sangue de cordão umbilical. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro, p. 3-4, Jun. 1990.
3. BEZERRA, T.M.M. Quantificação de hemoglobina A2 por eletroforese em acetato de celulose. *RN, Rev. Bras. Pat. Clín.*, vol. 20, n. 5, 1984.
4. BEZERRA, T.M.M.; ALBUQUERQUE, L.M.M.; LIMA, A.A.B.; ANDRADE, S.R. Prevalência de hemoglobinas anormais em Natal, Rio Grande do Norte, *Rev. Bras. Anál. Clín.*, 23 (3): 73-76, 1991.
5. BRAGA, W.M.S. Pesquisa de Hemoglobinas anormais na população do distrito V de Fortaleza, 1993.
6. BRUM, M.A.R. et al. Hemoglobinas anormais em Campo Grande – MS, *Revista LAES & HAES*, p. 86-92, 1996.
7. CARVALHO, W.F. Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-Hematologia, cap. 15, p. 79-85; cap. 17, p. 94-96; MG, 1986.
8. FAILACE, R. Hemograma: Manual de Interpretação. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1992, cap.3, p. 40-86.
9. FREIRE, N. et. al. Prevalência de Hemoglobinopatias em pacientes do Laboratório de Patologia Clínica da Fundação São Francisco Xavier e a sua Importância no Aconselhamento Genético, *Rev. NewsLab*, n. 43, p. 116-120, 2000.
10. GALLO DA ROCHA, H.H.A.; GAMA DE SÁ, A.C. Hemoglobinopatias mais encontradas em 238 solicitações médicas de estudo eletroforético de hemoglobinas e discussão da experiência clínico-laboratoria por ocasião da leitura dos laudos, *Rev. LAES & HAES*, v. 1, p. 96-106, 2002.
11. GUILHEN, J. C. S. Estudo da prevalência das Hemoglobinopatias na Região de Alfenas – MG. 2001, 12p. Universidade de Alfenas – MG. Disponível em: <http://www.medstudents.com.br/content/resumos/resumo.doc>. Acesso em: 27/01/2002.
12. ISSELBACHER, K. J. et al. *Medicina Interna*, v. 2, p. 1818-1826, 1995.

13. ITANO, H. A. Third abnormal hemoglobin associated with hereditary hemolytic anemia. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 37, p. 775, 1951.
14. LIMA, A. O. et al. Métodos de laboratório aplicados à clínica: Técnica e interpretação. 7ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1992. Cap. 21, p. 24.
15. LORENZI, T. F. Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica – São Paulo, MEDSI, 1999.
16. MARTINS, V.S. Pesquisa de Hemoglobinas anormais em pacientes do Hospital Infantil Albert Sabin, Fortaleza – CE, 2001.
17. MIRANDA, S.R.P. et al. Hb Köln [$\alpha_2 \beta_2 98$ (FG5) valmet] identified by DNA analysis in a Brazilian family, *Brazilian Journal of Genetics*, 20, 4, 745-748, 1997.
18. MOREIRA, H.W. Triagem das hemoglobinopatias por isoeletrofocalização, *J. Bras. Patol.*, Rio de Janeiro, v. 35, n. 3, p. 141-145, 1999.
19. MURAD, A.M. Associação das Hemoglobinas S – Lepore, MG, *JBM*, v. 63, n. 1, 1992.
20. NAOUM, P. C. Eletroforese – Técnicas e Diagnósticos. São Paulo, p. 62-63, 1988.
21. NAOUM, P.C. Hemoglobinopatias e talassemias – São Paulo : Savier, 1997.
22. NAOUM, P.C. Hemoglobinopatias no estado de São Paulo: métodos de estudo, prevalência, distribuição geográfica, relações históricas e antropológicas. São José do Rio Preto, 1982. Tese (Livre-Docência) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Univ. Est. Paulista.
23. NAOUM, P.C.; ANGULO, I.L.; BRANDÃO, A.C.; GRACIANO, R.A.S.; SPIR, M.; NOMURA, E.; ANJOS, I.D. Detecção e conscientização de portadores de hemoglobinopatias nas regiões de São José do Rio Preto e Presidente Prudente, SP (Brasil). *Rev. Saúde Pública*, v. 19, n. 4, p. 364-372, 1985.
24. NAOUM, P.C.; DOMINGOS, C.R.B.; MAZIERO, P.A.; CASTILHO, E.M.; GOMES, C.T.; ALVARES, F.F.; MORAIS, J.C.; ANGULO, I.L.; MATTOS, L.C. “Você tem anemia hereditária?” Resultados do programa de conscientização e detecção de hemoglobinas anormais em escolares de São José do Rio Preto, SP (Brasil). *Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter.* v. 9, n. 143, p. 20-28, 1987.
25. NAOUM, P.C.; MATTOS, L.C.; CHALELA, C. R.; UEZUNO, M.M. Manual Técnico para detecção de hemoglobinopatias freqüentes, São Paulo, 30p.
26. NESTLÉ NUTRITION SERVICES Anais NESTLÉ – Hemoglobinopatias, 58:32-41, 1999.

27. ORLANDO, G.M. et al. Diagnóstico Laboratorial de Hemoglobinopatias em Populações Diferenciadas, São Paulo, 12p. Disponível em: <http://www.sbhh.com.br/revista/artigos>. Acesso em: 06/04/2002.
28. PANTALEÃO, S.M. Triagem de hemoglobinopatias estruturais em recém-nascidos de João Pessoa – PB, Rev. Bras. Pat. Clín., v. 29, n. 1, 1993.
29. RUIZ, M. A.; GUERRA, C.C.C.; NAOUM, P.C Detecção de hemoglobinas anormais em sangue de cordão de recém-nascidos na cidade de Santos, São Paulo, através da eletroforese em gel de ágar-amido. Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter., v. 8, n. 137, p. 8-12, 1986.
30. SANTOS, M.M.S. Hemoglobinopatias. Estudos feitos no Estado do Ceará, nas creches São Gabriel e Tia Júlia, Fortaleza, 1987.
31. SCHMIDT, B.J. Screening for Inborn Errors of Metabolism in Brazil. Infants screening, 11:24, 1988.
32. SILVA, J.R. et al. Tamizaje de Hemoglobinopatias em uma muestra de la población infantil de Cartagena, Universidad de Cartagena, Facultad de Medicina, 6p. Disponível em: <http://www.encolombia.com/33-2-pediatria-tamizaje.htm>. Acesso em: 27/01/2002.
33. SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. Interpretação Laboratorial do Eritrograma, p. 83-88. 1999.
34. TASSO, E. Hemoglobinopatias, Univ. Federal de São Paulo, 4p. Disponível em: <http://www.virtual.epm.br/cursos/genetica/htm/hemoglo.htm>. Acesso em: 27/01/2002.
35. TEIXEIRA, A.F. Prevalência de Hemoglobinas anormais em gestantes do Hospital e Maternidade Dr. César Calls. Fortaleza – CE, p. 31, 2000.
36. TOLOI, M.R.T.; PAZZIANOTO, C.R. Hemoglobinopatias em crianças com alterações eritrocitárias. Rev. Bras. Patol. Clín. v. 26, n. 1, p. 2-5, 1990.